

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Reducción inducida por rayos X en el sitio activo de la catalasa 3 de
Neurospora crassa.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Andrés Zárate Romero

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Rudiño Piñera, Instituto de Biotecnología, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Adela Rodríguez Romero, Instituto de Química, UNAM.

Dr. Alfredo Torres Larios, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

MÉXICO, D. F. junio, 2013



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por la beca de doctorado que recibí de agosto de 2009 a Julio de 2013. Además de la beca mixta que recibí en dos ocasiones por un periodo total de 4 meses.

Este proyecto fue realizado en el laboratorio 8 del IBT-UNAM se agradece al CONACYT por el financiamiento a través del proyecto de No. 102370 y a la UNAM por el financiamiento a través del proyecto PAPIIT IN204611.

A la Biol. Sonia Patricia Rojas Trejo su ayuda y conocimiento fueron fundamentales en la realización de diversos experimentos de este proyecto.

Al personal del LANEM (Dra. Adela Rodríguez Romero y M. en C. Georgina E. Espinosa Pérez), por habernos otorgado acceso al equipo de difracción y la asistencia técnica recibida durante la colecta de datos.

Al personal de la Unidad de Docencia del IBT, particularmente al Lic. J. Antonio Bolaños Guillén y a Gloria Villa Herrera por sus ayuda en todos los tramites que realicé como estudiante del posgrado.

A mi comité tutor compuesto por los Dres. Alfredo Torres Larios y Adela Rodríguez Romero. Por su aportación a mi proyecto y la evaluación constante.

Al jurado de examen de grado integrado por los Dres: Wilhelm Hansberg Torres, Marcela Ayala Aceves, Lilian González Segura, Gerardo Corzo Burguete y Adelaida Díaz Vilchis por haberse tomado el tiempo de revisar mi tesis y aportar su conocimiento y experiencia en las correcciones que me hicieron para mejorar mi trabajo.

Al personal de la línea X6A del NSLS: Edwin Lazo y los Dres. Vivian Stojanoff y Jean Jakoncic por su ayuda en la colecta de mis cristales y el análisis de mis datos durante mi estancia en el BNL.

A mis compañeros del laboratorio que me apoyaron cada vez que lo necesité tanto en lo académico como en lo personal. Ha sido muy agradable trabajar a su lado y muy cómodo trabajar en sus mesas durante su ausencia: Alejandro Torres, Hugo Serrano, Adam Campos, Eugenio De la mora, Nizaa Jiménez, Eduardo Rosas, César Cardona, Norman Morales, Berenice Juárez y Claudia Rodríguez.

A mi tutor el Dr. Enrique Rudiño Piñera. Gracias por tu apoyo en estos cuatro años de doctorado, eres un excelente tutor y puedo decir que ha sido un gran honor trabajar en tu grupo.

A Dios porque mi vida es maravillosa y eso me permitió trabajar con dedicación en mi proyecto de doctorado.

DEDICATORIA

A mi inspiración, a mi fuerza, a la mujer que me empujó a seguir adelante para conseguir mis objetivos. Gracias Elizabeth Gallardo Lozada has sido la mejor elección de mi vida, todos mis logros son tuyos también.

A mis padres Rolando Zárate Pavón y Rosa María de Jesús Romero Jiménez, quienes con gran esfuerzo me educaron y me enseñaron el valor del trabajo constante y la honestidad.

A Andrés Zárate Gallardo porque tú eres todas mis razones, todos mis sueños y todos mis anhelos. Tú cambiaste mi vida, tú eres mi causa para seguir trabajando, para tratar de ser un hombre digno de ser tu padre. Eres el regalo más grande que Dios me dio. Esto y todo lo bueno que pueda hacer es por ti.

INDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. ANTECEDENTES	11
II.1 Las catalasas monofuncionales dependientes de hemo	11
II.2 La CAT-3 de <i>Neurospora crassa</i>	14
II.3 Características de los compuestos intermediarios	18
II.4 La reducción inducida por rayos X y su uso como una herramienta cristalográfica	23
II.5 Moléculas de agua en los sitios activos de la CAT-3 y sus asimetrías	25
III. HIPÓTESIS:	28
IV OBJETIVOS	28
VI. 1 Objetivo general	28
IV. 2 Objetivos particulares	28
V SECCIÓN EXPERIMENTAL	29
V.1 Expresión y purificación de la enzima	29
V.2 Identificación de la enzima	31
V.3 Dispersión dinámica de luz	32
V.4 Dispersión de rayos X de ángulo bajo	32
V.5 Caracterización por espectroscopia UV-visible de los intermediarios en solución	34
V.6 Cristalización	34
V.7 Colecta de datos con un flujo intenso de rayos-X	35
V.8 Colecta de datos con un flujo atenuado de rayos X	36
V.9 Procesamiento de los datos	37
V.10 Colecta de espectros de los cristales	38

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
VI.1 Purificación de la CAT-3	39
VI.2 Determinación del estado de oligomerización de la CAT-3 por dispersión dinámica de luz (DLS)	41
VI.3 Determinación del estado de oligomerización de la CAT-3 por dispersión de rayos X de ángulo bajo (SAXS)	42
VI.4 Obtención del compuesto I en solución	45
VI.5 Cristalización de la CAT-3 y obtención del compuesto I	46
VI.6 Obtención de estructuras cristalográficas en el estado férrico	47
VI.7 Obtención de estructuras cristalográficas del Compuesto I	56
VI.8 Reducción inducida por rayos X: cristalografía y espectroscopía UV-visible	61
CONCLUSIONES	72
PERSPECTIVAS	72
REFERENCIAS	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Catalasas de Subunidades Grandes y Catalasas de Subunidades Pequeñas.	13
Figura 2	Dominios de la CAT-3 y estructura del canal de acceso.	15
Figura 3	Sitio activo de la CAT-3 en el estado férrico.	16
Figura 4	Espectros de absorbancia UV-visible de distintas catalasas.	19
Figura 5	Estructuras cristalográficas de los intermediarios del ciclo catalítico descritos en las catalasas.	21
Figura 6	Estrategia de colecta de datos de múltiples cristales.	24
Figura 7	Diferencias en los sitios activos en el tetrámero de CAT-3.	26
Figura 8	Purificación de la CAT-3.	40
Figura 9	Dispersión dinámica de luz de la CAT-3.	41
Figura 10	Resultados de SAXS.	43
Figura 11	Modelo de la CAT-3 obtenido por SAXS.	44
Figura 12	Obtención del compuesto I en solución.	45
Figura 13	Cristalización de la CAT-3.	46
Figura 14	Organización de la CAT-3 en los cristales.	50
Figura 15	Sobreposición entre los tetrámeros de las estructuras.	51
Figura 16	Conformación alternativa en el residuo S388.	52
Figura 17	Tetrámeros existentes en la estructura tetragonal.	53
Figura 18	Ajuste entre los tetrámeros obtenidos en $P4_32_12$ y el patrón de SAXS.	55
Figura 19	Preparación y colecta de los cristales del compuesto I.	58

Figura 20	Sitio activo de la CAT-3 en los cristales en el estado férrico y los remojados en PAA.	59
Figura 21	Canal de acceso en los cristales en el estado férrico y los remojados en PAA.	60
Figura 22	Espectroscopía UV-visible de la reducción del compuesto I.	63
Figura 23	Figura 23. Reducción diferencial del compuesto I.	66
Figura 24	Reducción diferencial del compuesto I en mapas de omisión.	67
Figura 25	Figura 25. Espectroscopía UV-visible de la reducción del estado férrico.	71

LISTA DE ACRÓNIMOS

ADP Parámetro de desplazamiento atómico

ANC	catalasa de <i>Aspergillus niger</i>
BLC	Catalasa de hígado de bovino
CAT-1	Catalasa 1 (<i>Neurospora crassa</i>)
CAT-3	Catalasa 3 (<i>Neurospora crassa</i>)
CATPO	Catalasa fenol oxidasa (<i>Scytalidium thermophilum</i>)
DLS	Dispersión dinámica de luz
HEC	Catalasa de eritrocito humano
HPC	Catalasa de <i>Helicobacter pylori</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HPIL	Hidroperoxidasa II (<i>Escherichia coli</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano picante
LSC	Catalasa de subunidad grande
MGy	Mega Gray (1 Gy= 1 J/kg)
MPD	2-metil-2,4-pentenediol
PAA	Ácido peracético
PDB	Banco de datos de proteínas
PEG	Polietilenglicol
PMC	Catalasa de <i>Proteus mirabilis</i>
PVC	Catalasa de <i>Penicillium vitale</i>
RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media
SAXS	Dispersión de rayos X de ángulo bajo
SSC	Catalasa de subunidad pequeña

RESUMEN

La catalasa 3 (CAT-3) de *Neurospora crassa* es una enzima homotetramérica que cataliza la dismutación de 2 moléculas de peróxido de hidrógeno, generando dos moléculas de agua y una de oxígeno. Pertenece al

clado 2 de las catalasas monofuncionales dependientes de hemo (catalasas de subunidades grandes). La estructura cristalográfica de la CAT-3 (PDB-3EJ6) fue afinada nuevamente al inicio de este proyecto eliminando las moléculas de agua en la vecindad de los sitios activos. La nueva estructura sugiere que esta enzima se puede reducir en respuesta al daño por radiación durante la colecta de datos. En tres de los monómeros se observa una molécula de agua en el sitio activo de la enzima a 3.8 Å del hierro del grupo hemo, lo cual correlaciona estructuralmente con un estado ferroso. En el cuarto monómero se observan dos moléculas de agua en el sitio activo, la primera a 2.2 Å y la segunda a 4.2 Å del hierro del grupo hemo en estado de reposo (férrico). El objetivo principal de este proyecto fue obtener la estructura cristalográfica de un estado intermediario oxidado de la vía catalítica de la catalasa, el compuesto I. Y a través de daño secundario específico durante la colecta de datos producir el compuesto II de la vía peroxidante, el estado de reposo y finalmente el estado ferroso. Al tratarse de una enzima tetramérica, se puede comparar la sensibilidad de los cuatro grupos hemo en los sitios activos. Lo anterior se logró mediante el uso de cristales de la CAT-3 recombinante, la estrategia de colecta de datos de múltiples cristales y la espectroscopia UV-visible acoplada a la colecta de datos. Las estructuras del compuesto I y su proceso de reducción inducido por rayos X muestran una respuesta diferencial de los diferentes monómeros a la reducción, confirmaron la existencia de un estado ferroso y mostraron evidencia de la producción del compuesto II en la CAT-3. Además, durante el desarrollo de este proyecto, la estructura de la CAT-3 se determinó en dos nuevos grupos espaciales (P1 y P4₃2₁2) que muestran la estabilidad de la CAT-3, pero también la flexibilidad conformacional de la enzima. Por último, se realizaron experimentos de DLS y SAXS cuyos resultados confirman que el estado oligomérico de la enzima en solución es un tetrámero, al igual que en la estructura cristalográfica.

ABSTRACT

Catalase 3 (CAT-3) is a homotetrameric enzyme that belongs to the clade 2 of heme dependent mono-functional catalases (Large Subunit Catalases). The crystal structure of CAT-3 (PDB-3EJ6) was refined again in this project without the

water molecules neighbouring the active sites. The new structure suggests that this enzyme can be reduced by radiation damage during data collection. In three of the monomers one water molecule was observed in the active site of the enzyme at 3.8 Å from the Iron heme center and is structurally correlated with a ferrous state. In the fourth monomer two water molecules were observed at the active site, the first at 2.2 Å and the second one at 4.2 Å from the iron heme center in the resting state (ferric). The focus of this project was to obtain the crystal structure of an oxidized intermediate state of the catalytic pathway of this catalase, compound I, and through specific secondary damage during the data collection, produce the compound II of the peroxidant pathway, the resting state, and the ferrous state. As this is a tetrameric enzyme, we can compare the sensitivity of the four iron heme active sites using crystals of a recombinant CAT-3, multicrystal data collection strategy and UV-vis spectroscopy coupled to crystal data collection. Structures of compound I and its X-ray driven reduction process shows a differential response to reduction in the different monomers, confirming the existence of a ferrous state and giving some insights of compound II production in CAT-3. Additionally, as results of this project, the structure of CAT-3 was determined in two new space groups (P1 and P4₃2₁2) showing both the stability of the CAT-3 fold and the conformational flexibility of the enzyme. Finally some DLS and SAXS experiments were performed and confirmed that the oligomeric state of the enzyme in solution is a tetramer.

I. INTRODUCCIÓN

La CAT-3 de *N. crassa* es una enzima homotetramérica formada por subunidades de 78,850 Da. Pertenece al clado 2 de las catalasas monofuncionales dependientes de hemo. Cataliza la dismutación de dos moléculas de peróxido de hidrógeno a dos moléculas de agua y una molécula de oxígeno. En la primera estructura cristalográfica de esta enzima (código PDB 3EJ6

a 2.3 Å de resolución) la unidad asimétrica contiene un tetrámero, cada monómero contiene un grupo prostético hemo en el sitio activo. Cuando se comparan entre sí los sitios activos de los diferentes monómeros, pueden observarse pequeñas diferencias en los mapas de densidad electrónica $2F_o-F_c$ y F_o-F_c . Los cambios que son de interés para este proyecto se localizan en la zona de la vecindad del grupo hemo. Es importante recordar que toda la información estructural de estas enzimas, proviene de los experimentos de difracción de rayos X. En estos experimentos, la dosis de radiación acumulada en el cristal produce cambios estructurales entre ellos destacan, por su aplicación como una herramienta cristalográfica y por su importancia en el estudio de los mecanismos de reacción basados en estructura, la reducción química de los sitios metálicos en el cristal. En este proyecto de investigación se evaluó el efecto que la dosis de rayos X absorbida por cristales de la CAT-3 produce en sus sitios activos. Esto se realizó a través de la comparación de los cuatro monómeros que forman la estructura. Ninguno de los intermediarios que pueden formarse durante el ciclo catalítico de las catalasas, además del estado de reposo, ha sido descrito estructuralmente para la CAT-3.

La estructura cristalográfica de la CAT-3 obtenida a mayor resolución (1.85 Å) a la previamente depositada en el PDB (3EJ6 2.3 Å), las estructuras obtenidas a partir de *datasets* compuestos con diferente dosis de radiación depositada y el uso de la espectrometría UV-visible acoplada a la colecta de datos muestran el proceso de reducción ordenado de los cuatro sitios activos del tetrámero de la CAT-3. De esta manera se evidencia que la dosis de vida del compuesto I, descrito por primera vez para la CAT-3 en este trabajo, es inferior a 0.263 MGy (aproximadamente el 10% de la dosis necesaria para colectar un *dataset* completo a alta resolución en un sistema cristalino ortorrómbico). Además, que la reducción de cristales del compuesto I y del estado férrico conducen al estado ferroso y que es posible generar un intermediario distinto a partir de la reducción del compuesto I. Al mismo tiempo, la reducción diferencial sugiere un mecanismo no concertado entre los diferentes monómeros.

II. ANTECEDENTES

II.1 Las catalasas monofuncionales dependientes de hemo

Las células habitualmente modulan sus sistemas de respuesta a estrés a través de proteínas reguladoras que detectan la presencia de diferentes compuestos, provocan los cambios apropiados en la transcripción y, ocasionalmente, traducción o proteólisis. La mayoría de los organismos producen

una o más catalasas, además de otras enzimas como las superóxido dismutasas, las peroxidases y las peroxirredoxinas, para responder ante el estrés oxidante [1], [2]. La reacción que llevan a cabo las catalasas es la dismutación de dos moléculas de peróxido de hidrógeno a dos moléculas de agua y una de oxígeno. Existen tres clases de enzimas que presentan actividad de catalasa aunque no están relacionadas en secuencia o estructura: las catalasas monofuncionales dependientes de hemo [3], las catalasa-peroxidases dependientes de hemo, relacionadas por su secuencia y estructura con las peroxidases de plantas [4] y las catalasas homohexaméricas que contienen 2 iones de manganeso en el sitio activo y que hasta ahora solo se han identificado en procariontes [5]. Las catalasas monofuncionales dependientes de hemo son enzimas ubicuas y homotetraméricas que se encuentran distribuidas en arqueas, bacterias, hongos, plantas y animales. El origen de estas catalasas es monofilético y se encuentran clasificadas en tres diferentes clados: clado 1 en algas verdes y plantas, clado 2 en arqueas, bacterias y hongos; y clado 3 en arqueas, bacterias, hongos y animales. Las catalasas de los clados 1 y 3, también llamadas Catalasas de Subunidades Pequeñas (SSC, por sus siglas en inglés), están compuestas por subunidades cuyo peso molecular se encuentra en intervalos de 55 a 69 kDa, a diferencia de las anteriores, las enzimas del clado 2 están formadas por subunidades de mayor peso molecular, en un intervalo de 75 a 86 kDa, por lo que también se les conoce como Catalasas de subunidades grandes (LSC, por sus siglas en inglés) (Figura 1) [1].

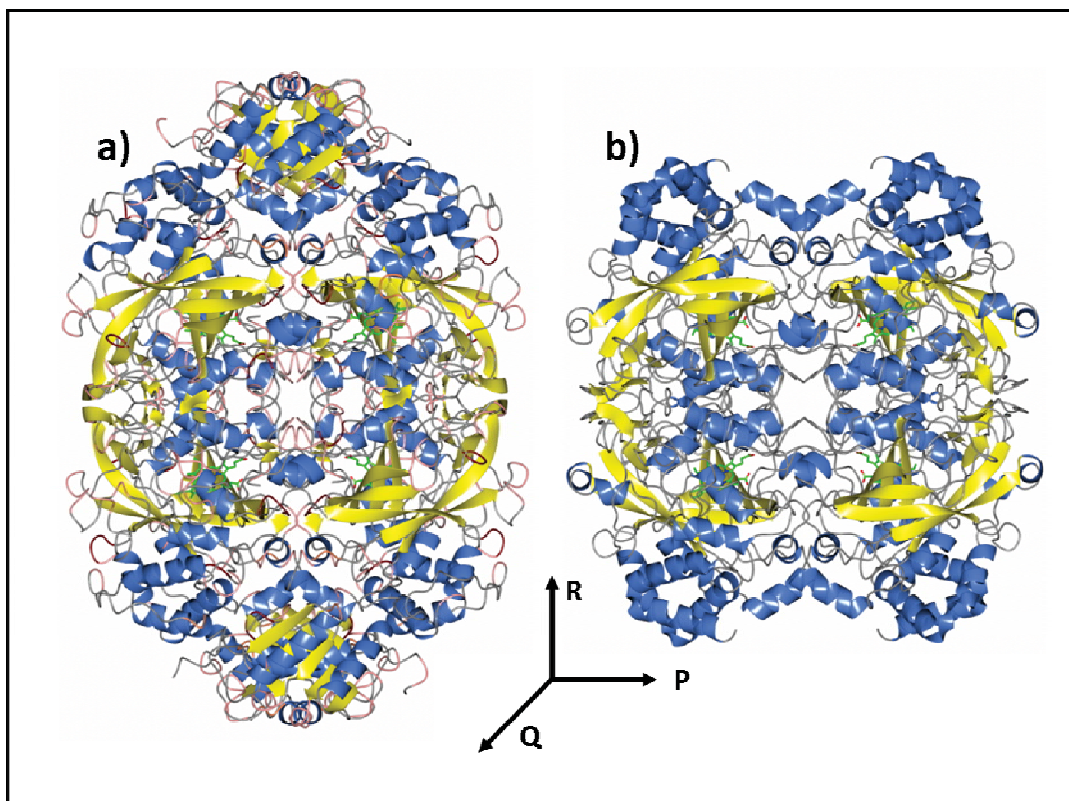
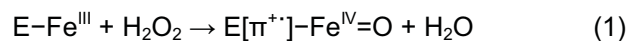
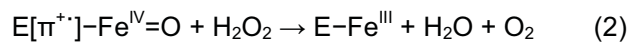


Figura 1. Catalasas de subunidades grandes y Catalasas de subunidades pequeñas. a) CAT-3 (PDB 3ZJ5); b) Catalasa de *Enterococcus faecalis* (PDB 1S18). Las catalasas grandes tienen subunidades cuya peso molecular es de 75 a 86 kDa, mientras que la de las pequeñas va de 55 a 69 kDa. La principal diferencia en el tamaño está dada por la presencia del dominio C-terminal en las catalasas grandes.

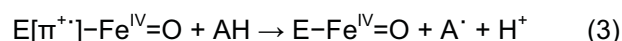
La reacción que llevan a cabo las catalasas ocurre de la siguiente manera: primero la oxidación del Fe (III) de alto espín ($S=5/2$) en reposo con una molécula de peróxido de hidrógeno, generando al compuesto I intermediario con un catión- π radical de porfirina (1).



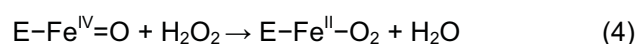
En el segundo paso, el compuesto I es reducido con dos electrones provenientes de una segunda molécula de peróxido de hidrógeno, formando oxígeno molecular y agua. En este paso se regenera el estado Fe (III) de reposo (2).



Durante el segundo paso puede ocurrir también la reducción del compuesto I por un electrón si la concentración del peróxido de hidrógeno es muy baja y un donador externo alcanza el sitio activo, esto resulta en la formación del compuesto II que es inactivo (3) [6].



El compuesto II puede reaccionar con otra molécula de peróxido de hidrógeno y formar el compuesto III, que también es inactivo (4) [7].



En la única LSC que se ha documentado la existencia de las reacciones de la vía peroxidante es la catalasa de *Aspergillus niger* (ANC) [8], mientras en las SSC hay reportes describiendo dichas reacciones en diversas enzimas.

Las catalasas de subunidades grandes son resistentes a la inactivación por sustrato teniendo actividad a concentraciones mayores a 3 M de H_2O_2 , o incluso a 5 M en el caso de la catalasa de *A. niger* [1], [9], [10], aparentemente este fenómeno es debido a la regulación del tránsito de las moléculas de peróxido de hidrógeno hacia el sitio activo, y porque la enzima cuenta con un mecanismo de control del flujo de electrones. En el caso de las SSC conforme aumenta la concentración de H_2O_2 , las enzimas se inactivan aunque los intervalos de concentración en los que se inactivan van de 0.2 M en la catalasa de *Pseudomonas aeruginosa* hasta 1 M en el caso de la PMC [10].

II.2 La CAT-3 de *Neurospora crassa*

Neurospora crassa posee 3 catalasas monofuncionales, 2 LSC, la CAT-1 y la CAT-3, y una SSC, la CAT-4. Además posee una catalasa peroxidasa, la CAT-2

CAT-1 y CAT-3 están presentes durante el ciclo de vida asexual de *N. crassa* pero son expresadas de forma diferencial. Durante la germinación y el inicio del crecimiento la actividad de catalasa se debe principalmente a la CAT-1, debido a que se acumula en los conidios. Durante la fase de crecimiento

exponencial tardío la actividad de catalasa de CAT-3 es la predominante. En esta etapa se observa además, la acumulación de ARN mensajero (ARNm) de *cat-3* [12].

La transcripción de ARNm de *cat-3* también se incrementa cuando el micelio de *N. crassa* se expone a condiciones de estrés tales como el H_2O_2 , el paraquat, el cadmio, el choque de calor, el ácido úrico, y el tratamiento con nitrato. La actividad de la catalasa está regulada principalmente por la transcripción. Aunque la concentración de la enzima también se puede regular por su degradación [13].

La CAT-3 pertenece al clado 2 de las catalasas monofuncionales dependientes de hemo (LSC) y es un homotetrámero que tiene un peso molecular de 78,850 Da por cada subunidad. Tiene un péptido señal de 31 (ver Apéndice A) residuos en el extremo N-terminal que es utilizado en el proceso de secreción de la enzima [1], [11].

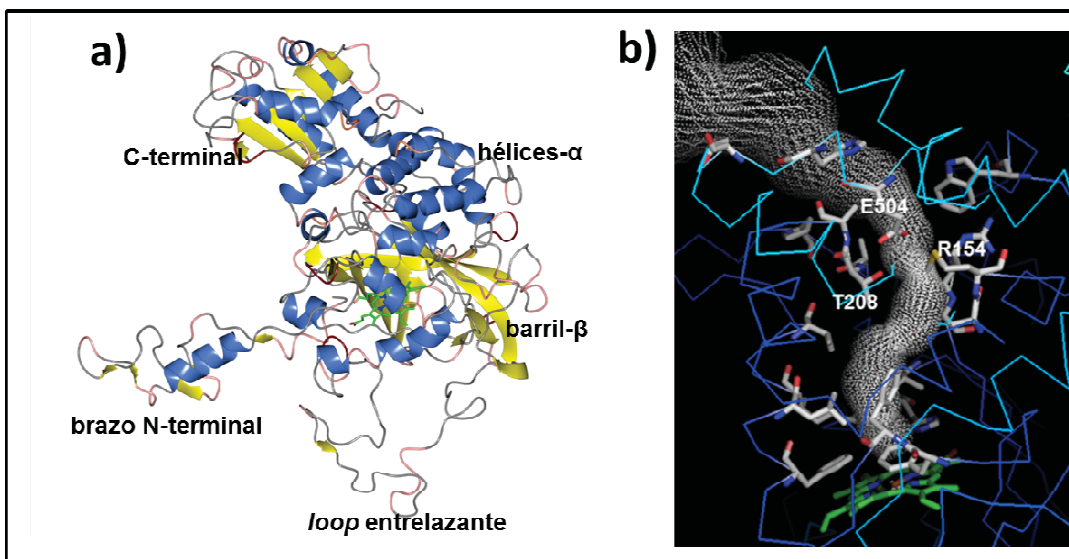


Figura 2. Dominios de la CAT-3 y estructura del canal de acceso. a) Los dominios de la CAT-3. El brazo N-terminal interactúa principalmente con el asa entrelazante de la subunidad relacionada en el eje Q, el grupo hemo (en verde) se encuentra en una cavidad delimitada por el dominio de barril β , el dominio C-terminal estabiliza la interacción entre los monómeros relacionados en el eje P; b) Canal de acceso. El

acceso a través del canal de 31 Å que separa al sitio activo de la superficie está restringido en la estructura cristalográfica por una zona angosta con un radio de 1.2 Å, delimitada por los residuos T208, E504 y R154.

La cinética de saturación de la CAT-3 indica que tiene dos componentes, esto es consistente con la existencia, dentro del homotetrámero, de dos sitios activos, uno saturado a concentración milimolar de H_2O_2 y otro a concentración molar. Ambos componentes parecen tener cooperatividad positiva y esta es mayor en el segundo componente. Los parámetros cinéticos estimados para la CAT-3 y CAT-1 son muy similares y los datos experimentales se ajustan a la suma de dos ecuaciones de Hill, siendo los valores del número de Hill 1.2 para el primer componente y 1.7 para el segundo [1], [9].

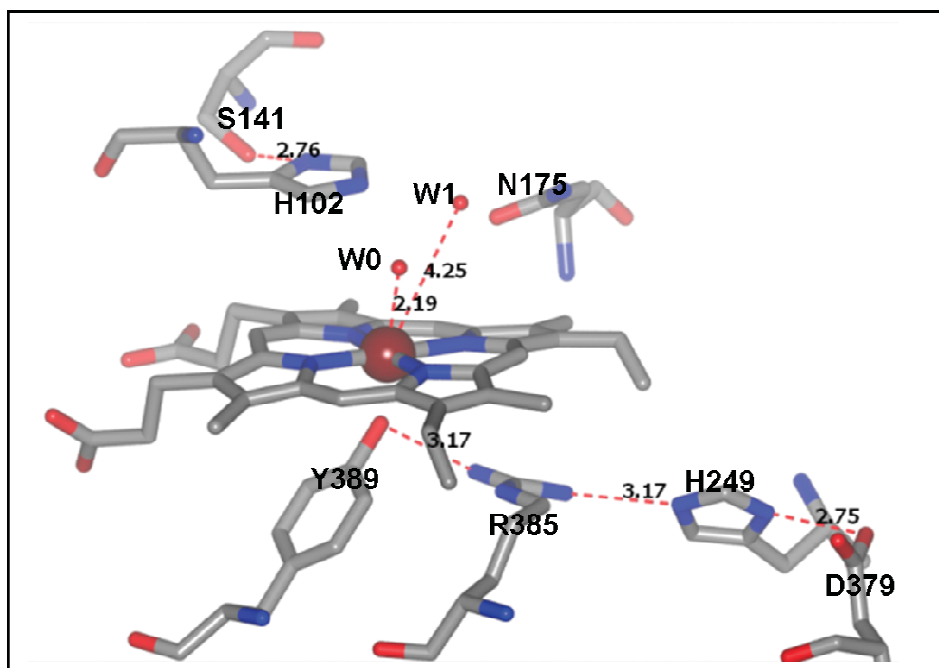


Figura 3. Sitio activo de la CAT-3 en el estado férrico. El sitio activo del monómero A de la estructura 3EJ6 muestra los residuos catalíticos H102 y N175, la Y389 que da el quinto sitio de coordinación al hierro del hemo y los residuos R385, H249 y D379 para los que se ha propuesto un rol como sistema de relevo de electrones. La molécula de agua W0 solo se observa en este monómero mientras W1 aparece en los cuatro.

La estructura cristalográfica de la CAT-3 (PDB 3EJ6) es muy parecida a las de otras LSC como son la HPII de *Escherichia coli* (PDB 1GGE), la CAT-1 de *N. crassa* (PDB 1SY7), la PVC de *Penicillium vitale* (PDB 4CAT) y la estructura

reportada recientemente para la CATPO de *Scytalidium thermophilum* (PDB 4AUM). Cada monómero está formado por los siguientes dominios: un brazo amino-terminal, un barril β de 8 hebras antiparalelas, un asa envolvente, un dominio de 4 hélices α y un dominio C-terminal con una topología similar a las flavodoxinas (Figura 2a). A diferencia de las LSC, las SSC carecen del dominio C-terminal.

El sitio activo de la enzima se encuentra en una cavidad delimitada por el dominio de barril- β , y las hélices X3 y X9. Además hay contacto con algunos residuos del brazo N-terminal de la subunidad relacionada en el eje P. Para que una molécula de H_2O_2 pueda llegar hasta el sitio activo desde la superficie debe hacerlo a través del canal principal. Este canal tiene una longitud de ~ 31 Å desde el sitio activo hasta la superficie de la enzima (Figura 2b) [1].

En el sitio activo de la estructura 3EJ6 (Figura 3) se encuentra el grupo hemo en cuyo extremo distal, el átomo N^{δ} del residuo H102 catalítico forma un enlace de hidrógeno con el hidroxilo del residuo S141, el N^{ϵ} forma un enlace de hidrógeno con una molécula de agua (W1). Hay una segunda molécula de agua W0 que está a 2.2 Å de distancia del hierro en la subunidad A, en los otros tres monómeros B, C y D hay solo una molécula de agua (W1) [1].

El quinto enlace de coordinación del hierro del hemo está dado por el residuo proximal Y389. El hierro se encuentra en el mismo plano del hemo a una distancia de 1.9 Å del fenolato de la Y389. La distancia promedio fenolato-hemo en las catalasas de subunidades pequeñas y grandes es comparable a esta distancia (1.9 ± 0.1 Å). El fenolato en la CAT-3 forma un enlace de hidrógeno con el grupo NH_2 de la R385 conservada, este NH_2 forma un enlace de hidrógeno con el N^{ϵ} de la H249, pero a diferencia de otras LSC (CAT-1 y HP11), no forma un segundo enlace de hidrógeno con una molécula de agua. Se ha propuesto que la CAT-3 tiene un mecanismo de relevo de carga descrito previamente para la catalasa de eritrocitos de *Homo sapiens* (HEC) [14]. Este mecanismo involucraría los residuos R385, H249 y D379 que forman enlaces de hidrógeno entre ellos y son capaces de transportar electrones desde la tirosina hacia el aspártico [1].

Dicho sistema de relevo de electrones podría reducir parcialmente la tendencia de formar el compuesto II a partir del compuesto I.

Hasta hace poco se consideraba que un sistema de compuerta en la entrada del canal principal de la catalasa (formado por una zona muy angosta delimitada por los residuos T208, E504 y R154 (Figura 2b)) regula el tránsito de las moléculas de peróxido de hidrógeno hacia el sitio activo, restringiendo el flujo de moléculas de peróxido a bajas concentraciones del mismo, evitando así la formación de los compuestos II y III. Sin embargo resultados recientes de experimentos de cinética enzimática en mutantes de los residuos equivalentes a T208 y E504 en HP11, muestran que al cambiar estos residuos hay solo un ligero efecto en la eficiencia catalítica de la enzima. De acuerdo a publicaciones anteriores del mismo grupo, la longitud del canal en las LSC no tiene un efecto crítico en el recambio catalítico de la enzima y tiene solo un impacto menor en el acceso del sustrato hacia el sitio activo [15].

En simulaciones de dinámica molecular realizados a partir del PDB 1SY7 de la CAT-1 se ha mostrado que la constricción en el canal no aparece en solución, y que incluso el radio del canal es mayor en una concentración de 6 M de H_2O_2 [16]. Estos resultados explicarían porque en estructuras de PVC se han podido encontrar dentro del canal principal compuestos con un radio molecular mayor al de la compuerta, como el ácido peracético (PAA) (PDB 2IUF) o el 3-amino-1,2,4-triazol (PDB 2XF2) [17].

II.3 Características de los compuestos intermediarios

Las hemoproteínas presentan cambios en la coloración que pueden ser correlacionados con diferentes estados de oxidación y coordinación, cada uno de los intermediarios de la vía peroxidante o la catalítica tiene un espectro de absorbancia visible característico. La caracterización con espectroscopia UV-visible de intermediarios en catalasas se ha publicado para la enzima en estado

férrico, el compuesto I, el compuesto II y el compuesto III en diversas catalasas (Figura 4) [17–22].

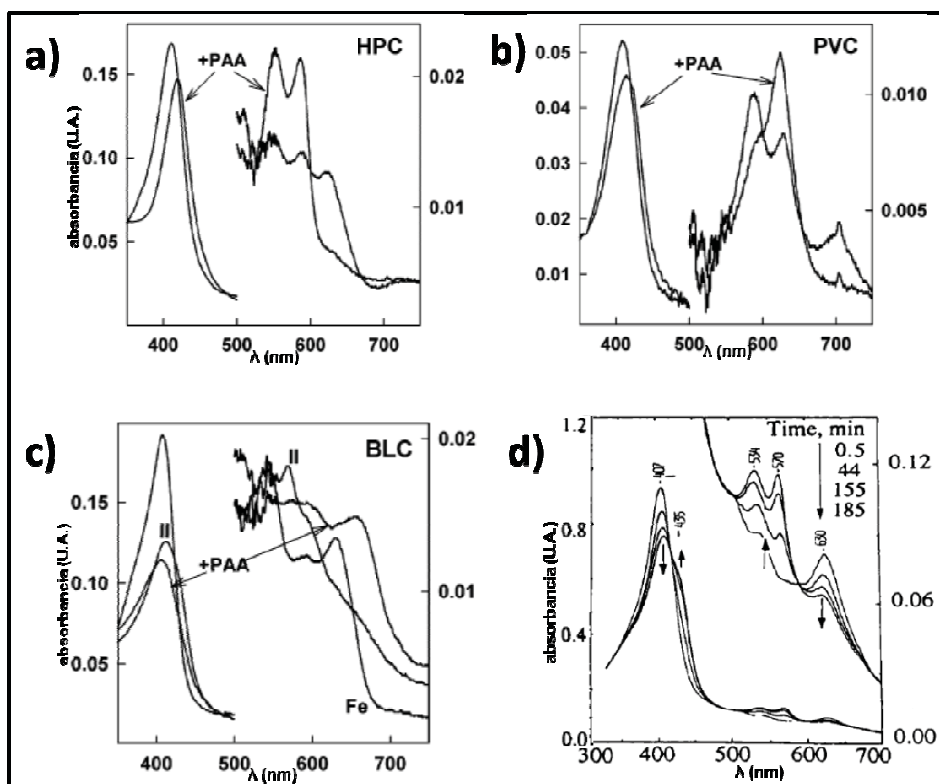


Figura 4. Espectros de absorción UV-visible de distintas catalasas. a) Se muestra el espectro de la HPC en estado férrico y del compuesto II en respuesta a la incubación con PAA; b) En los espectros de la PVC se muestra la enzima en el estado férrico con poblaciones de hemo b y d, la enzima incubada en PAA forma el compuesto I; c) En la BLC la enzima incubada con PAA forma el compuesto I y posteriormente da paso a la formación del compuesto II; d) Se muestra la enzima de *A. niger* en estado férrico y la obtención del compuesto II por la reacción con H_2O_2 generado por la reacción entre glucosa y glucosa oxidasa a diferentes períodos de incubación. Las figuras a), b) y c) se modificaron de [17], la figura d) se modificó de [20].

En algunas LSC se ha caracterizado el espectro del estado férrico de la enzima. La HPII se caracteriza por un pico en la banda de Soret a ~ 403 nm y máximos en la región visible a 588 nm y 712 nm [19]. En CATPO de *Scytalidium thermophilum* la banda de Soret está en 406 nm y hay dos picos en la región visible a 590 nm y 715 nm [21]. A diferencia de las LSC, en la BLC la banda de

Soret se encuentra en 403-405 nm y tiene máximos en la región visible a 500 nm, 540 nm y 622 nm. Esto coincide con lo observado para otras SSC [18], [19]. Las diferencias entre los picos de la región visible están relacionadas con la presencia de hemo d o hemo b en la enzima y no con el tamaño de las subunidades. La CAT-3 y la ANC son las únicas LSC para las que se ha descrito la presencia de hemo b en lugar de hemo d en el sitio activo, aunque en las catalasas que contienen hemo d se ha demostrado que el estado inicial del hemo es en b y debido a un proceso de oxidación en las primeras rondas de la catálisis se genera hemo d [23]. Se ha mostrado que la exposición de CAT-1 a oxígeno en singulete provoca este cambio. Hay evidencia de que el oxígeno en singulete puede ser producido ocasionalmente durante la catálisis [24].

En las catalasas el compuesto I ha sido obtenido principalmente mediante la incubación de la enzima con PAA o metil peróxido de hidrógeno, aunque otra alternativa es la incubación de la enzima en una solución con una baja concentración de peróxido de hidrógeno. En las LSC el espectro UV-visible del compuesto I ha sido publicado para la PVC [17], que en comparación con el espectro del estado férrico presenta una disminución en la absorbancia de la banda de Soret y un desplazamiento del máximo en la región visible a 625 nm. En esta enzima se encuentran poblaciones de hemo b y d. Una versión proteolizada de la HPII mutada en H392A (que contiene hemo b) presenta, en comparación al estado férrico, un decremento en la intensidad de la banda Soret y un desplazamiento del máximo visible de 630 a 680 nm [25]. La ANC presenta un decaimiento en la intensidad de la banda de Soret y un desplazamiento en el máximo visible de 625 a 666 nm. Los picos observados en el estado férrico a 500 y 540 nm no se observan en el compuesto I. En las SSC el compuesto I se ha descrito para la PMC [18], la HPC [17] y la BLC [26]. En las tres enzimas los espectros son muy parecidos mostrando la disminución en la banda de Soret y el desplazamiento del pico de 630 a 680 nm.

Los cambios en los espectros de absorbancia UV-visible correspondientes a la formación del compuesto II para las LSC han sido descritos únicamente para

ANC, en sus espectros UV- visibles se observa un desplazamiento en la banda de Soret y la aparición de dos picos a 534 nm y 570 nm [20]. Para las SSC, en la BLC se observa un pico en la banda de Soret a 424 nm y dos picos a 534 y 567 nm respectivamente [22]. En la PMC el espectro es muy similar con máximos en la región visible a 535 y 575 nm [18].

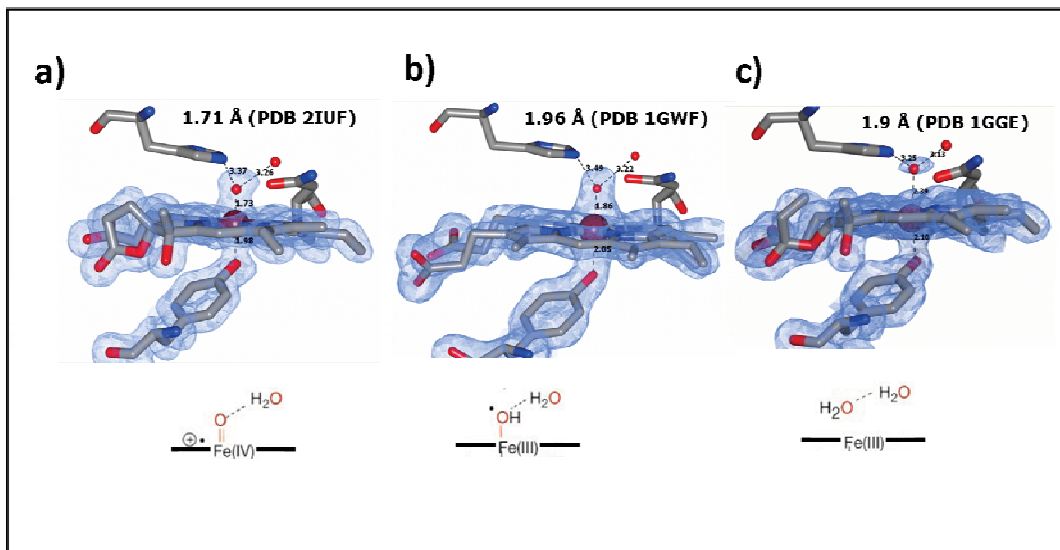


Figura 5. Estructuras cristalográficas de los intermediarios del ciclo catalítico descritos en catalasas. a) Estructura del compuesto I de la PVC; b) Estructura del compuesto II de la MLC; c) Estructura de la HPII en estado férrico. En las tres estructuras se muestran los residuos histidina y asparagina conservados, así como el grupo hemo, en conformación d para a) y c) o b para b). El mapa de densidad electrónica $2F_o-F_c$ se muestra en azul a 1σ .

El compuesto III ha sido descrito únicamente para una LSC, la ANC que se caracteriza por un pico en la banda de Soret a 417 nm y máximos en 549 y 599 nm [20]. En las SSC, la BLC muestra la banda de Soret a 416 nm y dos picos a 549 nm y 585 nm [22].

Los cambios estructurales del sitio activo de las catalasas durante la formación de los compuestos intermediarios I y II se han descrito para dos SSC, la MLC [27] y la PMC [6], [18]. En las LSC solo hay un caso que muestra la estructura cristalográfica del compuesto I, este es la PVC [17].

En los compuestos I y II se puede observar del lado distal del hemo una molécula de oxígeno ligada al hierro y en el caso del estado férrico una molécula de agua. Hay un residuo de histidina conservado (H102 en la CAT-3) que está a ~ 3.5 Å del oxígeno unido al hierro o de la molécula de agua en la posición W0. El residuo conservado de asparagina (N175 en la CAT-3) forma un enlace de hidrógeno con el agua W1.

Para la estructura del compuesto I de PVC (PDB 2IUU) (Figura 5a) la distancia Fe-O es relativamente corta, 1.72 Å, para todas las copias en la unidad asimétrica, la comparación con el compuesto I de la catalasa de *Helicobacter pylori* (HPC 2IQF) muestra que tiene una distancia mayor (1.80 Å o 1.85 Å) en las subunidades que forman su unidad asimétrica, lo anterior sugiere un estado de protonación distinto en la enzima y por lo tanto una respuesta diferente a la incubación en PAA [17]. Si se consideran las distancias observadas en otras hemoproteínas podemos ver que la distancia Fe-O en estructuras de compuesto I va de 1.67 Å en P450 (PDB 2CPP), hasta 1.87 Å en CCP (PDB 1ZBY).

En el caso de las LSCs no se ha determinado hasta ahora una estructura del compuesto II, aunque se ha sugerido que la estructura de PVC podría encontrarse en una mezcla entre ambos estados como consecuencia de reducción del compuesto I durante la colecta del cristal usado para determinar la estructura. [17]. Para las SSCs el compuesto II ha sido descrito en *Micrococcus lysodeikticus* (Figura 5b) y en *Proteus mirabilis*. En la estructura de MLC (PDB 1GWF) la distancia entre Fe-O es de 1.87 Å, [27] mientras que para la estructura de PMC (PDB 2CAG) la distancia Fe-O fue fijada a una distancia de 1.71 Å debido a la resolución e integridad del *dataset* utilizado [18]. Para otras hemoproteínas como la peroxidasa de rábano picante HRP (PDB 1H55) o la mioglobina de corazón de caballo (PDB 1GJN) las distancias Fe-O son de 1.84 Å y 1.92 Å respectivamente [28].

No hay evidencia cristalográfica del compuesto III en catalasas, aunque está determinado para otras hemoproteínas como HRP [29] o Mb [30].

II.4 La reducción inducida por rayos X y su uso como una herramienta cristalográfica

Los tres fenómenos a través de los cuáles los rayos X interactúan con un cristal son la dispersión elástica (0.16 %), el efecto fotoeléctrico (1.68 %) y la dispersión inelástica (0.16 %) [31]. Mientras la dispersión inelástica genera el patrón de difracción, la absorción fotoeléctrica y la dispersión de Compton son los efectos físicos responsables del daño primario causado por los rayos X. Dichos fenómenos provocan la ruptura de enlaces S-H, O-H, N-H y C-H, así como la formación de electrones solvatados (e^-_{aq}), $\cdot OH$ y $\cdot H$ en una escala de tiempo de picosegundos [32]. Dichas especies radiolíticas son muy reactivas y se difunden a través del cristal durante el daño secundario. Esto conduce tanto a la ruptura de enlaces en la proteína como a la formación de más radicales en una escala de tiempo de microsegundos a milisegundos cuando los experimentos se realizan a temperatura ambiente [33]. El daño primario solo se puede disminuir si la dosis de radiación absorbida por cristal disminuye. Sin embargo, el daño secundario si se puede disminuir si la colecta de datos se hace a temperaturas menores a 100 K y/o se adicionan radioprotectores y recolectores de electrones en la solución crioprotectora [34], [35].

El daño provocado por los rayos X se puede utilizar como una herramienta para obtener información adicional de una metaloproteína. Además de la estructura obtenida por cristalografía convencional. Cuando se irradian cristales de una metaloproteína con un haz intenso de rayos X sus centros metálicos aceptan electrones lo cual cambia su estado de oxidación y en algunos casos su coordinación. El uso de técnicas de XAS [36], espectroscopia de RAMAN [30] y espectroscopia UV-visible [37], [38] han confirmado estas modificaciones en diversas enzimas.

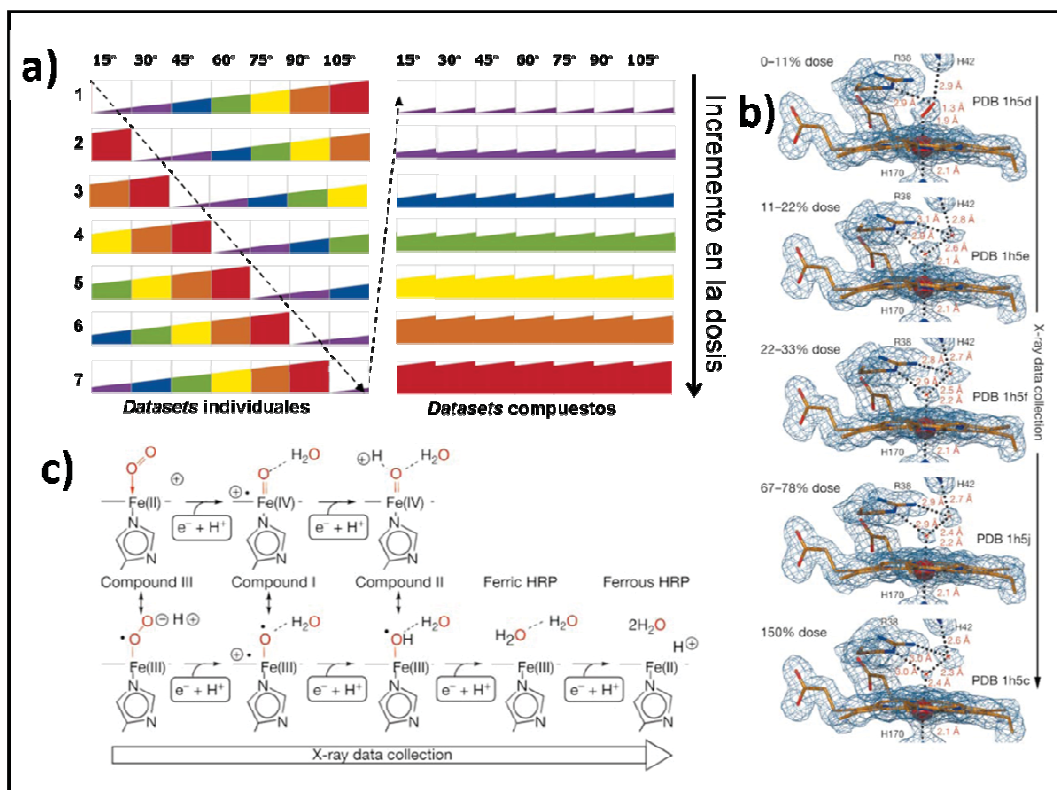


Figura 6. Estrategia de colecta de datos de múltiples cristales. a) El esquema presenta la distribución de la dosis de radiación X absorbida como función del ángulo de rotación en cristales individuales. La construcción de los *datasets* compuestos a partir de las pequeñas secciones de los *datasets* individuales se muestra a la derecha, indicando la flecha punteada que sección de cada *dataset* se usa para obtener un *dataset* compuesto; b) Los *datasets* compuestos representan estructuras que han recibido diferentes dosis de rayos X, éste método permite realizar experimentos similares a las titulaciones redox durante la colecta de datos utilizando varios cristales crecidos bajo las mismas condiciones; c) Mecanismo de reducción inducida por rayos X propuesto para los intermediarios de la catálisis por HRP [29].

El uso de una estrategia denominada “colecta de datos de múltiples cristales” (MDCS por sus siglas en inglés, *Multicrystal Data collection strategy*) [29] permite distribuir la dosis total de rayos X necesaria para coleccionar la información de una estructura cristalográfica completa (un *dataset*) en diferentes paquetes de información (Figura 6a). Cada uno de estos paquetes contiene una fracción de la estructura obtenida desde un ángulo distinto en la colecta del cristal. Si se coleccionan varios cristales crecidos en las mismas condiciones partiendo desde una

orientación distinta en la colecta de cada uno, cada *dataset* completo puede dividirse en diferentes paquetes y al procesar juntos los paquetes de distintos cristales conteniendo la misma dosis pueden obtenerse *datasets* compuestos con la información de la estructura completa. Esta propuesta se implementó por primera vez en cristales de HRP [29] y permitió usar el daño provocado por radiación X para evidenciar la producción de los intermediarios de las reacciones redox que ocurren en un cristal irradiado (Figuras 6b y 6c). En algunas publicaciones recientes se ha demostrado la aplicación de esta metodología para estudiar diversas metaloproteínas [39]. El uso de la microespectrofotometría de UV-visible [40] o la espectroscopia de Raman [30] acopladas a la colecta permiten validar los cambios provocados por la radiación en los sitios metálicos durante los experimentos de difracción y así sustentar la evidencia cristalográfica. Se ha sugerido que al igual que en HRP, la formación de intermediarios reducidos puede ser inducida a través de los e^-_{aq} que se producen como resultado de la dosis absorbida por los cristales en otras enzimas [29].

II.5 Moléculas de agua en los sitios activos de la CAT-3 y sus asimetrías

Al inicio de este proyecto se afinó nuevamente la estructura de la CAT-3 (PDB 3EJ6) después de eliminar las moléculas de agua cercanas al grupo hemo en cada uno de los monómeros. En el mapa de diferencia F_o-F_c , se observan picos positivos los cuales presentan diferencias en cada uno de los monómeros. En el modelo publicado aparecen dos moléculas de agua en el monómero A, pero en este nuevo mapa de diferencia (F_o-F_c a $\pm 3.5\sigma$) se observa un pico con dimensiones correspondientes a dos moléculas de agua para el monómero D, pero solo una molécula en el modelo para los monómeros A, B y C (Figura 7).

En las catalasas no se ha demostrado la existencia de un estado ferroso de la enzima ni tampoco se ha reportado su obtención, probablemente porque no forma parte de los intermediarios de la vía catalítica o la peroxidante. Sin embargo en estructuras cristalográficas de otras hemoproteínas como la HRP y la Mb, se ha mostrado que en el estado ferroso el sitio equivalente a W0 en la CAT-3 se

encuentra vacío [29], [30]. Si en la CAT-3 la ausencia de W0 en los monómeros A, B y C corresponde al estado ferroso de la enzima, lo cual no se ha descrito anteriormente, podría ser explicado por la reducción del sitio activo durante la colecta del cristal. Anteriormente ya se ha revisado la presencia de las moléculas de agua en el sitio activo de diversas catalasas mostrando que en algunas de ellas W0 está presente en algunos monómeros mientras en otros está ausente. En las publicaciones que describen éste comportamiento no se ha dado una explicación para la ausencia de W0 en las cuatro subunidades de las catalasas o sólo en algunas [1], [11], [41].

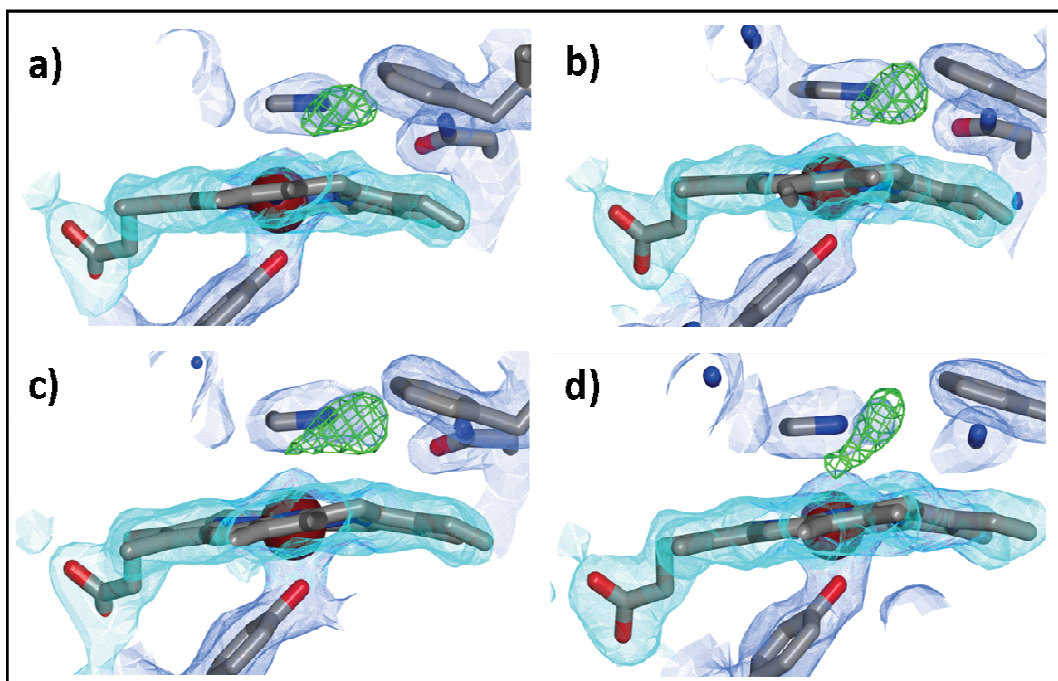


Figura 7. Diferencias en los sitios activos en el tetrámero de la CAT-3. Las figuras a), b), c) y d) corresponden a los monómeros A, B, C y D respectivamente de la CAT-3. La estructura 3EJ6 fue afinada nuevamente sin las moléculas de agua en el sitio activo. Cuando se recalculan fases se observan picos positivos en el mapa F_o-F_c a 3.5σ (verde) mostrando sitios que podrían ser ocupados por las moléculas de agua W1 y W0. En esta comparación se observa que el pico positivo en D es el único que justifica modelar 2 moléculas de agua (W0 y W1). En A, B y C solo puede modelarse W1. El mapa $2F_o-F_c$ aparece a 1σ en azul o azul claro alrededor del grupo hemo.

Con los antecedentes presentados se puede plantear que la CAT-3 se reduce en respuesta al daño provocado por la radiación durante la colecta. Si en lugar de iniciar la colecta de un cristal de la CAT-3 en el estado de reposo (férrico) la colecta se inicia desde un estado más oxidado (el compuesto I) se puede seguir el curso de la reducción en los cuatro monómeros de la enzima durante un proceso más largo. Lo anterior permitirá identificar los cambios ocurridos en los cuatro sitios activos y comparar la sensibilidad que presente cada monómero al daño por radiación.

III. HIPÓTESIS:

La exposición de cristales de la CAT-3 en distintos estados de oxidación a los rayos X conducirá a la reducción de los sitios activos de forma diferencial, la reducción conducirá al estado férrico y permitirá explorar la obtención del compuesto II y el estado ferroso, que no han sido descritos para esta enzima.

IV OBJETIVOS

VI. 1 Objetivo general

Caracterizar mediante cristalografía y espectroscopía UV-visible el proceso de reducción inducida por rayos X en el sitio activo de los cuatro monómeros que forman la CAT-3 de *Neurospora crassa*.

IV. 2 Objetivos particulares

1. Expresar y purificar a la enzima recombinante 6xHis-CAT-3 a partir de la cepa de expresión BL21 (DE3) de *E. coli*.
2. Determinar el estado de oligomerización de la enzima, para poder extrapolar los resultados obtenidos de la cristalografía al comportamiento de la enzima en solución.
3. Cristalizar y determinar la estructura de la enzima recombinante 6xHis-CAT-3 en el estado basal.
4. Cristalizar y determinar la estructura del compuesto I de la enzima utilizando la técnica de colecta de datos en múltiples cristales y cuantificando la dosis absorbida por cada cristal.
5. Caracterizar mediante la espectroscopía UV-visible a los cristales del estado férrico y el compuesto I, así como a los intermediarios obtenidos durante el proceso de reducción.
6. Analizar las estructuras obtenidas y los espectros UV-visible asociados.

V SECCIÓN EXPERIMENTAL

V.1 Expresión y purificación de la enzima

El gen completo que codifica para la CAT-3 de *N. crassa*, inicialmente clonado en el sitio *EcoRI* del plásmido PSM-3 [13], se subclonó en el sitio *EcoRI* del vector pCold I. La construcción se utilizó para transformar bacterias de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*. El vector pCold I se induce a bajas temperaturas (16°C) y confiere resistencia a ampicilina, el uso de este vector permite obtener la CAT-3 fusionada a una etiqueta de 6 histidinas. La clonación y transformación de la construcción fueron realizados por estudiantes del laboratorio 103 –OTE del IFC-UNAM, a cargo del Dr. W. Hansberg. Amablemente nos fue proporcionada una muestra de la cepa conservada en glicerol al 50%.

La cepa BL21 (DE3) de *E. coli* transformada con la construcción CAT3-pCold se conservó a -80°C en glicerol al 30%. Con el objetivo de separar colonias, se estrió la cepa en una caja de Petri con agar LB suplementado con 200 mg/L de ampicilina. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C y se utilizó una colonia para inocular un precultivo 500 ml de medio LB suplementado con ampicilina 200 mg/L a 37°C y una agitación de 225 rpm durante 12 h.

El precultivo de 500 ml se utilizó para inocular 4.5 l de medio de cultivo LB suplementado con 200 mg/l de ampicilina. El cultivo se incubó a 37°C con una agitación de 225 rpm durante 2 h, después de las cuales se midió la densidad óptica (D.O.) del cultivo a una $\lambda=600$ nm, cuando el cultivo alcanzó una D.O. entre 0.5 y 0.7 U.A. Se indujo la sobreexpresión de la CAT-3 por un choque térmico a 16°C además de la adición de IPTG 300 μ M. Después de inducir el cultivo se adicionó hemo a una concentración de 30 μ M para suplementar el grupo hemo necesario para obtener una enzima activa. La inducción continuó por 24 h a 16 °C.

Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 3,500 g durante 10 minutos, el medio se desechó y la pastilla de bacterias fue resuspendida en 120 ml de una solución amortiguadora de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM pH 8, NaCl 300 mM e Imidazol 15 mM. Se adicionó una pastilla de *complete Roche* (mezcla de inhibidores de proteasas) por cada 2 l de cultivo. La suspensión de bacterias se

sonicó en tres repeticiones con pulsos intermitentes de 2 minutos por 1 minuto de reposo. Posteriormente el lisado bacteriano se centrifugó por 45 minutos a 13,000 g. Se recuperó la fracción soluble que presentaba una coloración café, característica de la CAT-3 en estado férrico.

La purificación de la enzima recombinante se llevó a cabo en tres pasos. El primer paso de la purificación consistió en una cromatografía de afinidad a níquel utilizando dos columnas de flujo rápido *HisTrap FF* de GE-Healthcare acopladas para tener un volumen de columna total de 10 ml, la columna fue previamente equilibrada con 5 volúmenes de la solución amortiguadora de lisis, la fracción soluble del lisado bacteriano se inyectó a través de la columna usando una bomba peristáltica a 2.5 ml/min, posteriormente se realizó un lavado de la columna con 5 ml de la solución de lisis, seguido de un lavado con 5 volúmenes de columna de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM pH 8, NaCl 300 mM e imidazol 40 mM. Para eluir la proteína se hicieron diferentes lavados incrementando la concentración de imidazol en la solución de lisis llevándola a 100 mM, 150 mM, 200 mM y 250 mM. Las diferentes fracciones que mostraban el color café característico de la CAT-3 en estado férrico fueron dializadas juntas contra una solución de Tris 20 mM pH 8 a 4°C.

El segundo paso de purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico usando la resina *High-Q BioRad* empacada en una columna de 1.5 cm de diámetro y montada en un equipo *BioLogic LP* de *BioRad*. El volumen de la columna es de 40 ml y fue equilibrado con 3 volúmenes de columna de la solución de unión de Tris 20 mM pH 8 a un flujo constante de 1.5 ml/min, posteriormente se cargó la solución conteniendo la proteína y se realizó un lavado con la solución de unión hasta que la absorbancia a $\lambda=280$ nm volvió a 0. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de NaCl que incrementó en un intervalo de 0 a 500 mM, la proteína empezó a eluir en una concentración aproximada de NaCl de 200 mM. Las fracciones de la purificación que presentaban el color café característico de la CAT-3 en estado férrico se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 8% en condiciones

no reductoras (solución amortiguadora de carga 1 M Tris pH 8.5, SDS 1%, azul de bromofenol 0.05 mg/l) y se tiñeron con azul de Coomassie. Las fracciones en las que se identificó la CAT-3, de acuerdo al peso molecular esperado para el dímero de la enzima (162.4 kDa), se concentraron y se dializaron en una solución de Tris 20 mM pH 8 y NaCl 100 mM.

El último paso de purificación fue realizado por cromatografía de exclusión molecular en una columna *Superdex 200*. La columna fue equilibrada con 1.5 volúmenes de columna, usando un amortiguador de Tris 20 mM pH 8 y NaCl 100 mM a un flujo de 3 ml/min y una presión de 0.1 MPa. Se aplicó un volumen de 2 ml de la CAT-3 a 7 mg/ml, se colectaron diferentes fracciones desde la elución del volumen muerto hasta la fracción correspondiente al volumen de elución esperado para el monómero de la enzima, la curva de calibración de la columna se presenta en el Apéndice B. Las fracciones colectadas se analizaron con SDS-PAGE en condiciones no reductoras de acuerdo al peso molecular esperado para el dímero de la enzima. Las fracciones en las que se identificó la CAT-3 se juntaron en un tubo *Amicon* con corte de 30 kDa (Millipore) y se concentraron por ultrafiltración a 3000 g. La solución conteniendo la CAT-3 se dializó por ultrafiltración contra una solución amortiguadora de 10 mM de HEPES pH 7 y se almacenó a 4° C. La proteína se conservó a una concentración de 4 mg/ml. La concentración final de la enzima se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro por el método de Bradford y por el coeficiente de extinción a 280 nm.

V.2 Identificación de la enzima

Se identificó actividad de catalasa en los geles de SDS-PAGE al 8% en condiciones no reductoras. Cada gel se incubó durante 5 minutos en una solución de metanol al 10%, el metanol se recuperó y se lavó el gel con agua corriente por 1 minuto, posteriormente se incubó durante 10 minutos en H₂O₂ 10 mM y se lavó nuevamente con agua corriente. Finalmente se reveló la actividad de catalasa al incubar el gel en ferricianuro de potasio 0.2 M y cloruro férrico 0.2 M. Las zonas en las que no se observa actividad de catalasa presentan una coloración azul

después de 2 minutos, mientras las bandas con actividad de catalasa aparecen de color blanco [24].

Para confirmar la identidad de la enzima se envió una muestra de la banda correspondiente al dímero al servicio de espectrometría de masas del IBT. La proteína fue digerida con Tripsina o endoproteinasa Glu-C en experimentos independientes. Las muestras se secuenciaron por masas/masas acoplado a cromatografía líquida (LC-MS/MS) por disociación inducida por colisión CID y disociación por colisión de alta energía.HCD de acuerdo al reporte entregado por la unidad de proteómica.

V.3 Dispersión dinámica de luz

A partir de la proteína purificada en la fracción dimérica de la CAT-3, se realizaron por triplicado experimentos de dispersión dinámica de luz a concentraciones de 100 µg/ml y 1 mg/ml respectivamente y fueron realizados utilizando un equipo Zetasizer nano S de Malvern Instruments, cada colecta se realizó a 20°C con periodos de lectura de 15 s. Los resultados obtenidos en los experimentos fueron comparados con los valores calculados con el *software* Zetasizer a partir del peso molecular calculado para el monómero, dímero y tetrámero de la enzima.

V.4 Dispersión de rayos X de ángulo bajo

Se utilizó una muestra de la fracción dimérica de la CAT-3, obtenida en el paso de purificación por exclusión molecular, para colectar un patrón de dispersión de rayos X de ángulo bajo en la línea X9 del sincrotrón NSLS (Fuente Nacional de Luz Sincrotrón por sus siglas en inglés) del BNL (Laboratorio Nacional de Brookhaven), la enzima mantuvo en una solución amortiguadora de HEPES 100 mM pH 7 a una concentración de 5 mg/ml y 1 mg/ml, el tiempo de colecta de cada espectro fue de 30 s. Las intensidades de los patrones de dispersión obtenidos

fueron graficadas utilizando el software de la línea de colecta X9 del NSLS *pyXS* y posteriormente se utilizó el paquete de programas ATLAS [42] para procesar los datos y obtener un modelo tridimensional.

En un experimento adicional realizado en la línea SWING del sincrotrón SOLEIL. Se inyectaron 60 μ l de una solución de la CAT-3 a 2 mg/ml en solución amortiguadora de HEPES 20mM pH 7 y NaCl 100 mM a una columna Shodex KW402.5-4F. La línea SWING de SAXS tiene acoplado un sistema de HPLC serie 1200 de *Agilent technologies* que permite realizar experimentos acoplados a cromatografía de exclusión molecular [43].

Durante la cromatografía el flujo en la columna se mantuvo en 200 μ l/min con una presión promedio de 5 MPa. Se colectaron 50 patrones de dispersión de la solución amortiguadora. Durante la colecta, cuando se registró un aumento de la absorbancia a $\lambda=280$ nm en el espectrofotómetro UV se obtuvo un pico único del cual se colectaron 200 patrones de dispersión con las siguientes condiciones: $t= 10$ ms/patrón, área = 0.4×0.1 mm². Las imágenes correspondientes al pico de la proteína se normalizaron y promediaron. Las intensidades de los patrones de dispersión correspondientes a la solución amortiguadora se promediaron y se llevó a cabo la sustracción de la intensidad de la solución amortiguadora de la muestra de proteína diluida en la solución amortiguadora, esto permitió obtener las intensidades correspondientes a la CAT-3. A partir de las intensidades de dispersión graficadas y mediante el uso del paquete de programas ATLAS se procesaron los datos para generar un modelo tridimensional. La comparación entre el patrón de dispersión experimental y los calculados para las diferentes especies oligoméricas posibles de la CAT-3 (modelados a partir de la estructura cristalográfica) se realizó utilizando el programa *FoXS* [44] en el paquete de programas *Chimera 1.8* [45]. Los valores de radio de giro de las diferentes especies dimericas de la CAT-3 o el tetrámero se calcularon en el programa *pdbutil* del servidor NMR server (<http://spin.niddk.nih.gov/bax/nmrserver/pdbutil/ss.html>).

V.5 Caracterización por espectroscopia UV-visible de los intermediarios en solución

Para obtener el espectro de absorbancia UV-visible de la CAT-3 se usó un equipo *Evolution 300* de *Thermo Scientific*. Se realizó un barrido con incrementos de 1 nm de longitud de onda desde 250 hasta 850 nm. Se utilizó como blanco una solución amortiguadora de acetato de sodio-ácido acético 50 mM pH 5.2.

Se colectó un espectro a partir de la enzima en estado férrico a una concentración de 200 µg/ml en solución amortiguadora de 50 mM de acetato de sodio pH 5.2.

Para obtener el compuesto I en solución se incubó la enzima a una concentración de 200 µg/ml en solución amortiguadora de acetato de sodio-ácido acético 50 mM pH 5.2 y se adicionó 1 µl de una solución de PAA 50 mM. Un minuto después se verificó la formación del compuesto I por un barrido en espectrofotometría UV-visible.

V.6 Cristalización

Se obtuvieron cristales de la CAT-3 en el grupo espacial P1 por difusión de vapor en gota colgante. Se prepararon gotas mezclando 1 µl de la CAT-3 a 3.5 mg/ml en HEPES 10mM pH 7 con 1µl de de HEPES 100 mM pH 7.5 y PEG 10,000 al 20% (condición 38 del kit *Crystal Screen* de *Hampton Research*), las gotas se equilibraron contra 1ml de solución de reservorio y se mantuvieron en incubación a 277 K. Se observaron cristales después de dos semanas.

Se obtuvieron cristales de la CAT-3 en el grupo espacial P2₁2₁2₁ por el método de *microbatch* [46], las gotas se prepararon mezclando 2 µl de la CAT-3 a 6 mg/ml en HEPES 10 mM pH 7 con 2 µl de de tartrato dibásico de amonio 200 mM y PEG 3,350 al 20% (solución 38 del kit PEG/Ion *Hampton Research*). Las gotas en los pozos de *microbatch* se cubrieron con 10 µl de aceite de parafina y se incubaron a 277 K. Los cristales aparecieron después de 5 días, y crecieron en un periodo de 3 semanas.

Se obtuvieron cristales de la CAT-3 en el grupo espacial $P4_32_12$ utilizando la siguiente condición: se prepararon gotas mezclando 1 μl de la CAT-3 a 6 mg/ml en HEPES 10 mM pH 7 con 1 μl de MES 100 mM pH 5.5 y MPD al 50% y se equilibraron contra 1 ml de solución de cristalización en el reservorio a 277 K. Se observó la presencia de cristales de color café después de 2 meses.

Los cristales de la CAT-3 en el grupo espacial P1 se criopreservaron con HEPES 100 mM pH 7.5 y PEG 400 al 40%.

Los cristales de la CAT-3 del grupo espacial $P2_12_12_1$ en estado de reposo (férrico) se criopreservaron en una solución de MES 100 mM pH 6.5 y PEG 400 al 40%. El compuesto I se obtuvo por remojado de los cristales en una solución de MES 100 mM pH 6.5, PEG 400 al 40% y ácido peracético 50 mM.

Los cristales de la CAT-3 en el grupo espacial $P4_32_12_1$ se criopreservaron usando la misma solución del reservorio. Posteriormente los cristales se almacenaron en nitrógeno líquido.

V.7 Colecta de datos con un flujo intenso de rayos-X

El cristal en el grupo espacial $P4_32_12$ fue colectado en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas Biológicas (LANEM). La fuente de rayos X es un ánodo rotatorio Micromax-007 HF con óptica VM-HR y esta acoplado a un detector RAXIS IV++.

Los cristales de los grupos espaciales P1 y $P2_12_12_1$ fueron colectados en la línea X6A del NSLS. La línea tiene un flujo de 1.2×10^{10} fotones/s con una apertura de 200 μm x 200 μm y un detector Q-270 de ADSC (CCD).

Se colectaron 360 imágenes de difracción de un cristal del grupo espacial P1 con dimensiones de 120 μm x 80 μm x 10 μm bajo las siguientes condiciones: $\lambda=0.98 \text{ \AA}$, $t= 30 \text{ s}$, $\Delta\phi=1^\circ$, $d= 300 \text{ mm}$ y apertura de haz de 200 μm x 200 μm .

La colecta de datos de los cristales en el grupo espacial $P2_12_12_1$ en el estado férrico se realizó en las siguientes condiciones: $\lambda= 0.98 \text{ \AA}$, $\Delta\phi= 0.5^\circ$, $d = 240 \text{ mm}$, $t= 20 \text{ s}$ y apertura del haz= $0.15 \text{ mm} \times 0.15 \text{ mm}$, se colectaron un total de 250 imágenes de difracción.

La colecta de un cristal en el grupo espacial $P4_32_12$ se realizó bajo las siguientes condiciones: $\lambda=1.54 \text{ \AA}$, $t= 1500 \text{ s}$, $\Delta\phi= 0.5^\circ$ y $d= 155 \text{ mm}$, se colectó un *dataset* de 100 imágenes de difracción.

En un primer intento de obtención de la estructura del compuesto I se colectó un cristal remojado en ácido peracético, se colectaron un total de 1080 imágenes de difracción bajo las siguientes condiciones $\lambda= 0.98 \text{ \AA}$, $\Delta\phi= 0.25^\circ$, $d= 240 \text{ mm}$, $t= 15 \text{ s}$. La colecta de los cristales remojados en ácido peracético, usados para obtener *datasets* compuestos, se realizó bajo las siguientes condiciones de colecta: $\lambda= 0.98 \text{ \AA}$, $\Delta\phi=0.3^\circ$, $d = 210 \text{ mm}$, $t=30 \text{ s}$. Se colectaron 366 imágenes de difracción para cada uno de los cristales, el primer cristal se orientó con el eje más largo en posición perpendicular al haz de rayos X y con una de las caras del cristal en posición normal respecto al haz de rayos X. Cada uno de los siguientes cristales se orientó en un ángulo 10° mayor con respecto al plano normal al haz de rayos X en relación al cristal anterior en la serie.

Para calcular el flujo de Rayos X en la línea X6A se usó un fotodiodo de silicón de arreglo PIN, acoplado a un amperímetro en la línea X6A para medir la corriente del haz de rayos X con diferentes áreas y energía, una vez obtenida la corriente se usó el programa en línea *X-ray photon flux calculator* para obtener el flujo de fotones [47]. El cálculo de dosis depositada en los cristales se llevó a cabo con *RADDOSE* [31] considerando un perfil del haz tipo gaussiana, se usaron las medidas promedio de los cristales de $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$.

V.8 Colecta de datos con un flujo atenuado de rayos X

Para depositar una menor dosis de radiación en los cristales, se disminuyó el flujo de fotones en la línea X6A mediante el uso de atenuadores de aluminio.

Con el objetivo de obtener *datasets* compuestos colectaron 8 cristales del compuesto I de la CAT-3. El tiempo de exposición se modificó en cada *dataset* para que cada cristal recibiera una dosis de 0.0010-0.0012 MGy por imagen, $\lambda=0.9794$, $d=250$ mm, $\Delta\phi=0.5^\circ$ con un área de exposición de $150 \mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$, colectándose 240 imágenes por *dataset*. Las dosis depositadas fueron calculadas con el programa *RADDOSE* [31].

V.9 Procesamiento de los datos

Los diferentes *datasets* de cristales del grupo espacial $P2_12_12_1$ se indexaron, integraron y escalaron con el paquete de programas XDS [48]. La determinación de fases se realizó en todos los casos por reemplazo molecular con *Phaser* [49]. Para la estructura 3ZJ5 ($P2_12_12_1$ férrico) se utilizó como modelo de búsqueda el monómero A de la estructura 3EJ6 obteniéndose un tetrámero. La búsqueda de fases para la estructura 4AJ9 ($P2_12_12_1$ remojado con ácido peracético) se realizó utilizando como modelo de búsqueda las coordenadas de la estructura 3ZJ5.

El afinamiento para todas las estructuras se realizó inicialmente mediante afinamiento de cuerpo rígido en *Refmac* [50]. El afinamiento de coordenadas xyz, ADPs, y ocupaciones se realizó usando *Phenix* [51]. La construcción de los modelos se concluyó con *Coot*. Únicamente en el caso de los *datasets* compuestos, se utilizó el modelo del tetrámero obtenido de la estructura 4AJ9 directamente en el afinamiento de cuerpo rígido, el afinamiento de estas estructuras obtenidas mediante *datasets* compuestos se realizó del mismo modo que las anteriores. El modelo final de la estructura 4AJ9 fue evaluado usando el servidor Molprobity [52].

El *dataset* obtenido del cristal en el grupo espacial $P4_32_12$ se indexó e integró con *MOSFLM* [53]. El escalamiento de los datos se continuó en *SCALA* [54] del paquete de programas cristalográficos CCP4i. Se obtuvo un modelo por reemplazo molecular formado por 3 de los 4 monómeros, el cuarto monómero se

encontró cuando se utilizaron los diferentes dominios del monómero faltante y el modelo previo con los 3 monómeros como modelo de búsqueda. El modelo obtenido se afinó en *Buster-TNT* [55] y se terminó de modelar usando *Coot*. La estructura se validó con el servidor MolProbity.

Para el caso de los *datasets* compuestos se hizo el corte de reflexiones aceptadas a 2.2 Å de resolución para la serie con flujo máximo en la línea y a 2.45 Å para la serie de baja dosis. Los patrones de difracción se indexaron, integraron y escalaron con XDS. Los factores de estructura se afinaron directamente por cuerpo rígido usando el modelo del PDB 4AJ9 en *Refmac5*. El subsecuente afinamiento de las estructuras se realizó utilizando la el paquete de programas *Phenix* y la construcción de los modelos se terminó con *Coot*.

En las estructuras que se obtuvieron del compuesto el afinamiento del sitio activo se realizó aplicando restricciones de un ángulo de 170 ° con $\sigma = 20^\circ$ entre el fenolato de Y389, el hierro del hemo y el oxígeno unido. Y se restringió la distancia entre el hierro del hemo y el oxígeno unido a 1.7 Å con σ de 0.2 Å. Para validar las estructuras se prepararon mapas de omisión, eliminando el hemo del sitio activo, el oxígeno unido y el agua de la posición W1, se recalcularon fases y se afino el modelo usando 3 ciclos de recocido simulado, iniciando en una temperatura de 3000° C. La temperatura se disminuyó en pasos de 100° C hasta alcanzar 300° C.

V.10 Colecta de espectros de los cristales

La colecta de espectros de absorbancia UV-visible de cristales de la CAT-3 tanto no expuestos como previamente expuestos a los rayos X se realizó mediante una colecta remota en la línea BL11-1 del SSRL (Fuente de radiación de luz sincrotrón de Stanford), los cristales se rotaron 360°, colectando un espectro de absorbancia UV-visible cada 10°, una vez que se identificó un área con una señal adecuada (donde el espectro de absorbancia UV-visible permitió diferenciar los picos de cada intermediario), se colectó un espectro con un incremento de 2° para identificar el ángulo con mayor señal, una vez identificada el área con mejor

respuesta en el intervalo UV-visible, se fijó la posición angular del cristal y se realizó la exposición a los rayos X colectando cada 1 o 2 segundos nuevamente un espectro, las condiciones de colecta fueron apertura del haz de 50 μm x 50 μm y $\lambda=0.98$. Las condiciones de colecta se ajustaron para depositar una dosis de 7.7×10^{-4} MGy/s para los cristales del estado férrico y del compuesto I. La extracción de los datos para graficar los espectros se realizó con un programa específicamente diseñado para la línea.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Purificación de la CAT-3

La enzima fue purificada de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología (Figura 8a y 8b). En el paso de exclusión molecular la proteína eluyó a un volumen de 178 ml. De acuerdo a la calibración de la columna este valor correspondería a una peso molecular de 212 kDa el peso molecular estimado para el tetrámero de la enzima es de 329.8 kDa y para el dímero de la proteína es de 164.9 kDa. La enzima purificada se analizó por SDS-PAGE al 8% en condiciones no reductoras para monitorear la presencia de oligómeros de la CAT-3 durante todos los pasos de purificación. La población que se observó mayoritariamente en los geles de la proteína purificada migró en un peso molecular más cercano al peso molecular de 164.9 kDa calculado para el dímero con el programa PI/MW del servidor EXPASY [56]. Los 4.65 kDa adicionales al peso de 77.8 kDa del monómero reportado para la enzima nativa corresponden a una secuencia de 27 residuos adicionales en el extremo N-terminal provenientes del vector pColdI (que incluyen la etiqueta de 6xHis). En el gel la banda considerada como dímero migró más cercana al marcador de peso molecular de 130 kDa que al de 170 kDa. En un zimograma revelado por química de Fenton se demuestra que la banda del dímero presenta actividad de catalasa de la misma forma que otra banda que migró en un peso molecular mayor (por encima del marcador de 170 kDa) la cual se consideró como la población tetramérica de la enzima (Figura 8c). Lo anterior coincide con lo

reportado para la CAT-1 [9] purificada de *N. crassa*, en donde los zimogramas muestran que las fracciones diméricas presentan actividad.

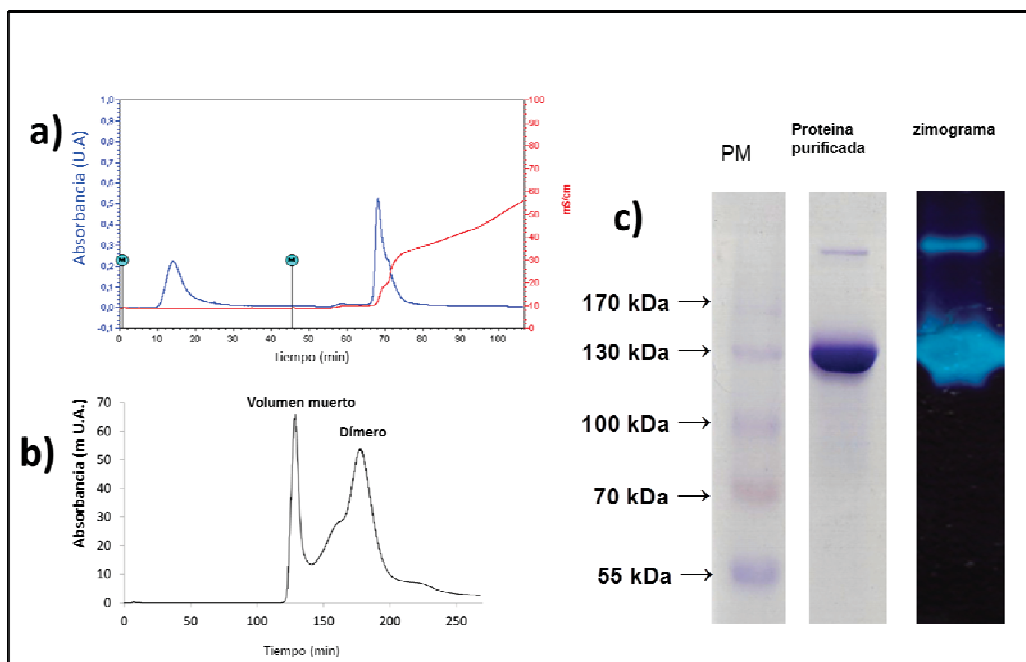


Figura 8. Purificación de la CAT-3. a) Cromatografía de la CAT-3 en intercambio aniónico, la enzima empieza a eluir a una concentración aproximada de 200mM de NaCl (En un gradiente de NaCl de 0 a 500 mM), el eje de las ordenadas muestra en azul la absorbancia a 280 nm y en rojo la conductividad; b) Cromatograma de elución de la CAT-3 en Superdex 200, el primer pico corresponde al volumen muerto, el segundo es aproximado al volumen de elución estimado para el dímero de CAT3 de acuerdo a la curva de calibración de la columna (Apéndice B); c) Gel desnaturante no reductor al 8%, la proteína parcialmente desnaturada migra en un peso molecular cercano al del dímero, de izquierda a derecha se muestran PM= Marcador de peso molecular *PageRuler* de Fermentas, Proteína purificada por exclusión molecular (Tinción de Coomassie), Zimograma de la proteína purificada revelado por química de Fenton.

La secuenciación por espectrometría de masas identificó a la proteína purificada como CAT-3 cubriéndose un 64.4% de la secuencia (ver Apéndice A), a partir del residuo 74. Aunque podría interpretarse que la enzima está incompleta debido al patrón de migración electroforético y a que la secuenciación por espectrometría de masas no identificó péptidos entre los primeros 74 residuos. La determinación de la estructura cristalográfica mostró la secuencia a partir del residuo N37. La migración de la proteína en la electroforesis no coincide

exactamente con el peso esperado probablemente debido a que la enzima se desnaturaliza solo parcialmente, ya que la muestra no se calentó, por lo que los contactos que estabilizan al dímero de la enzima no se pierden. El sitio hemo aparentemente no se vería afectado ya que la actividad de catalasa se mantiene.

VI.2 Determinación del estado de oligomerización de la CAT-3 por dispersión dinámica de luz (DLS)

Los experimentos de dispersión dinámica de luz se realizaron con la fracción “dimérica” de la enzima a concentraciones de 100 µg/ml y 1 mg/ml. El interés principal del experimento era determinar el estado de oligomerización de la proteína en solución para compararlo con las condiciones de cromatografía de exclusión molecular (en la que la proteína se inyectó a una concentración de 7 mg/ml) y de cristalización (en la que la proteína se usó a concentraciones de 3.5 mg/ml a 6 mg/ml).

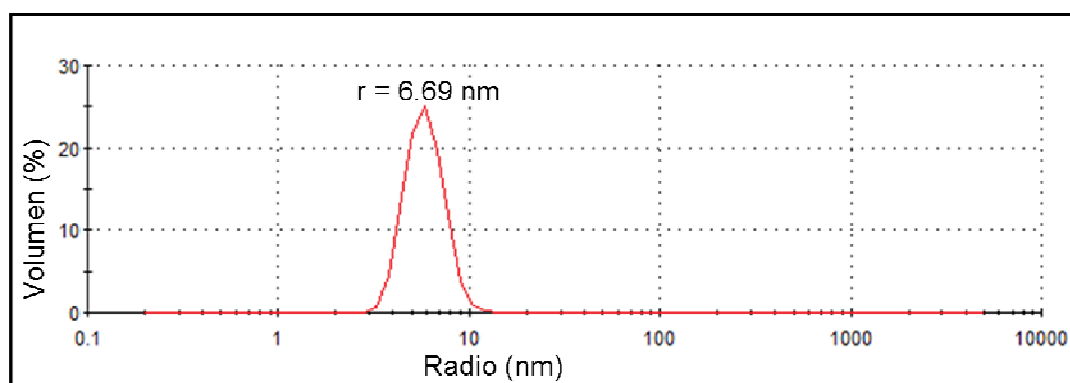


Figura 9. Dispersión dinámica de luz de la CAT-3. El resultado del experimento de DLS muestra un radio hidrodinámico de 6.69 nm. El valor es más cercano al calculado para el tetrámero de la CAT-3. Se muestra el promedio de 4 mediciones realizadas a 0.1 mg/ml.

Con la evidencia de la electroforesis se consideró que la proteína se diluye durante la cromatografía de exclusión molecular favoreciendo la formación del dímero. Trabajando a concentraciones bajas se esperaba confirmar el estado dimérico de la enzima. El experimento permitió determinar un radio hidrodinámico de 6.69 nm para la muestra (Figura 9). Éste valor es más cercano al calculado

para el tetrámero (6.93 nm) que para el dímero (5.21 nm). El experimento fue realizado 12 horas después de la purificación, se consideró la oligomerización del dímero a tetrámero durante este periodo como una posibilidad.

VI.3 Determinación del estado de oligomerización de la CAT-3 por dispersión de rayos X de ángulo bajo (SAXS)

Se utilizó el programa AutoRg (ATSAS) para calcular el radio de giro R_g a partir de la gráfica de Guinier obtenida del análisis de los patrones de SAXS colectados en la línea X9 del NSLS para dos diferentes concentraciones de la CAT-3 (5 mg/ml y 1 mg/ml). Se obtuvo un $R_g = 41.3 \pm 0.02 \text{ \AA}$ el cual es un valor muy cercano al valor teórico calculado para el tetrámero de 41.32 \AA . El R_g calculado para los dímeros AB, AC y AD es: 38.7 \AA , 39.6 \AA y 32.2 \AA respectivamente.

Adicionalmente se procesaron los datos de SAXS obtenidos en el experimento de colecta acoplado a HPLC realizado en la línea SWING del sincrotrón *SOLEIL*. El R_g calculado a partir de la gráfica de Guinier para el promedio de 150 patrones de dispersión es de $41.1 \pm 0.02 \text{ \AA}$ (Figura 10). El procesamiento del patrón de dispersión se realizó utilizando el paquete de programas ATSAS y permitió obtener un modelo que se puede sobreponer con la estructura del tetrámero determinada por cristalografía (Figura 11). Lo anterior a pesar de haber utilizado la muestra que se purificó por exclusión molecular acoplada a la línea y que eluyó en un volumen aproximado al calculado para el dímero.

Se comparó el patrón de dispersión experimental con patrones de dispersión calculados con el servidor FoXS (paquete de programas *Chimera 1.8*) para diferentes modelos que corresponden a la estructura tetramérica de la CAT-3 (PDB 3ZJ5 determinado en este trabajo) o a los posibles dímeros de AB, CD o AD (Figura 10b) obtenidos de esta. La observación a los patrones muestra que la curva calculada a partir del tetrámero puede sobreponerse mejor con la curva experimental que cualquiera de las correspondiente a los posibles dímeros (Figura

10c). Cuando se revisan los valores χ del ajuste del tetrámero (PDB 3ZJ5) de 3.82 en comparación con el ajuste de los dímeros AB= 94.86, AC= 142.415 y AD= 125.4, queda claro que el estado de oligomerización de la proteína en solución, al menos a estas condiciones de pH, concentración y fuerza iónica, es el tetramérico.

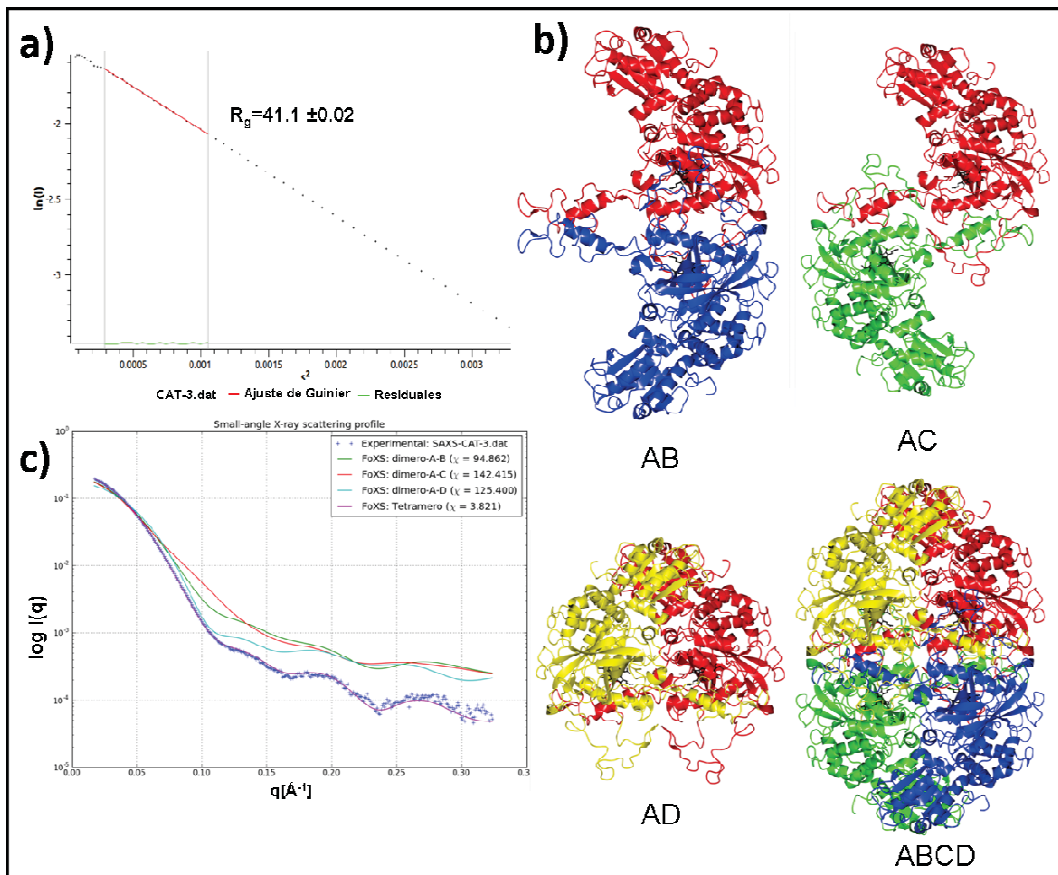


Figura 10. Resultados de SAXS. a) La gráfica de Guinier permitió calcular un R_g (radio de giro) de 41.1 ± 0.02 nm usando 17 puntos experimentales. Dicho valor de R_g se aproxima al valor teórico del tetrámero; b) El esquema muestra los diferentes posibles dímeros que podrían representar la fracción dimérica de la CAT-3 y el tetrámero; c) Ajuste entre el patrón experimental y los calculados para los posibles dímeros y el tetrámero de la CAT-3. El valor de χ de 3.821 confirma que la proteína es un tetrámero.

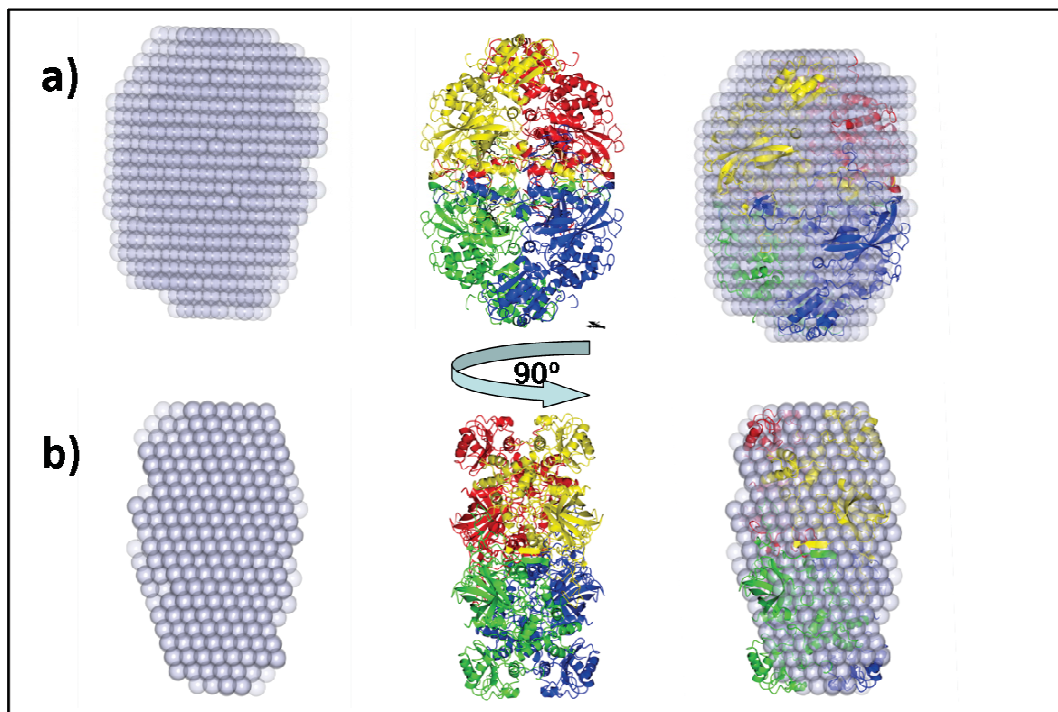


Figura 11. Modelo de la CAT-3 obtenido por SAXS. a) La sobreposición (derecha) entre el modelo de perlas obtenido *ab initio* a partir de los datos experimentales de SAXS (izquierda) con las coordenadas de la estructura cristalográfica 3EJ6 (centro) valida el comportamiento del tetrámero en solución; b) Se muestra la sobreposición entre el modelo y la estructura después de rotar los modelos 90° con respecto a la figura a).

Volumen de elución mostrado por la enzima en la cromatografía de exclusión molecular sugiere un estado dimérico, sustentado por el patrón de SDS-PAGE y el zimograma que muestra actividad en la banda que migra en el peso del dímero. Dicha conformación dimérica podría ser inducida por la presión durante la cromatografía de exclusión molecular (de 0.1 MPa en FPLC hasta 5 MPa en HPLC) o las condiciones de pH y/o concentración de SDS a la que es sometida la proteína durante la electroforesis.

Aunque en este trabajo no se profundizó en analizar las causas por las que se observa la fracción dimérica llama la atención que presente actividad en los zimogramas. Esto permite plantear la pregunta de ¿cuál podría ser la contribución que la fracción dimérica tiene en el comportamiento cinético de la enzima?

VI.4 Obtención del compuesto I en solución

El análisis espectroscópico de la enzima en estado férrico mostró un espectro similar al reportado para la ANC y dos catalasas pequeñas, la BLC y la HPC. El espectro muestra la banda de Soret a 406 nm con una relación 1:1 entre la absorbancia a 280 nm y a 406 nm, dos picos a 496 nm y 535 nm respectivamente y la banda de transferencia de carga en 618 nm.

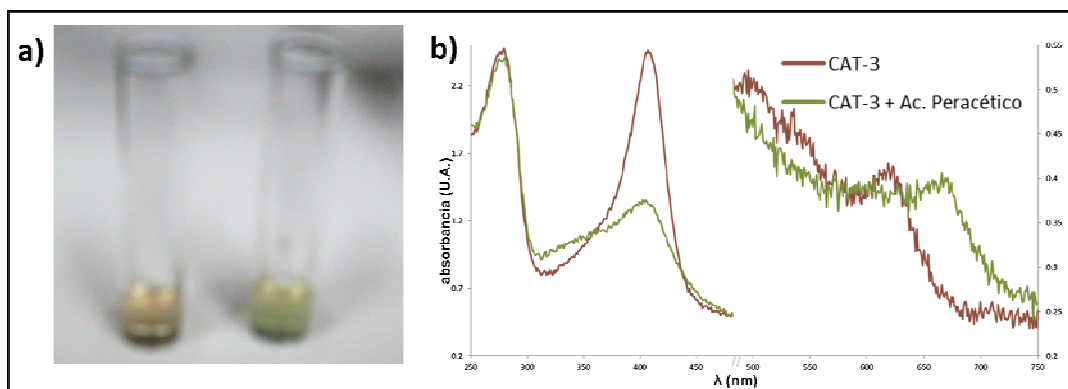


Figura 12. Obtención del compuesto I en solución. a) Obtención de compuesto I en solución. La enzima en estado férrico tiene un color café característico (izquierda), al incubarse con ácido peracético se torna verde pálido (derecha); b) Espectros de absorbancia UV-visible de la enzima en estado de reposo (línea café) y la incubada con ácido peracético (verde). Los cambios en el espectro coinciden con los reportados para el compuesto I de las catalasas con hemo b. El aumento de la escala muestra el desplazamiento de la banda de transferencia de carga de la proteína de 618 a 665 nm.

Después de la incubación de la proteína con ácido peracético se observó un cambio en la coloración a verde pálido. La caracterización de la enzima en espectroscopía UV-visible muestra un decaimiento en la banda de Soret de la enzima así como un desplazamiento en la banda de transferencia de carga de 618 nm en el estado férrico de reposo a 665 nm en la enzima en el estado de compuesto I (Figura 12).

VI.5 Cristalización de la CAT-3 y obtención del compuesto I

Los cristales del grupo espacial P1 aparecieron cinco días después de la preparación de las pruebas, tenían forma de placas con bordes de distintas dimensiones y presentaban el color café característico de la enzima en estado férrico (Figura 13b). Diversos intentos de optimizar esta condición de cristalización modificando la concentración de PEG, el tamaño de PEG o el pH fracasaron, se lograron obtener algunos cristales con buena apariencia aunque difractaron a muy baja resolución.

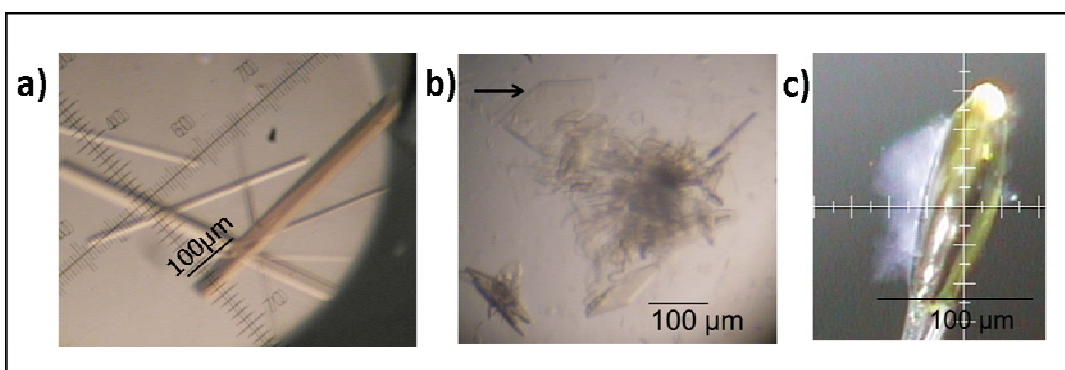


Figura 13. Cristalización de la CAT-3. a) Cristal de CAT3 correspondiente al grupo espacial $P2_12_12_1$; b) Cristales obtenidos en el grupo espacial P1, la flecha señala el cristal usado para obtener la estructura; c) Cristal del grupo espacial $P4_32_12$. Todos los cristales mostraron el color café característico de la enzima en el estado férrico.

Los cristales del grupo espacial $P2_12_12_1$ de la CAT-3 se obtuvieron mediante el método de *microbatch*. Se observaron 5 días después de la preparación de las gotas presentando el color café característico de la enzima en estado férrico (Figura 13a). Los mejores cristales para difracción fueron aquellos con forma de barras. Las medidas promedio de los cristales seleccionados para los experimentos fueron $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$. Además del método de *microbatch* se logró obtener cristales en las mismas condiciones por el método de difusión de vapor en gota colgante aunque estos crecieron como placas y difractaron a baja resolución.

Los cristales del grupo espacial $P4_32_12$ se observaron dos meses después de la preparación de las gotas, estos cristales tenían forma de barras pequeñas con dimensiones aproximadas de $100\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ y presentaban el color característico de la proteína (Figura 13c).

El compuesto I en cristales se obtuvo como esta descrito en la sección de metodología, se observó un cambio de coloración del cristal de café a verde, indicando la formación del compuesto I. Se utilizó un tiempo promedio de incubación de 1 minuto ya que en algunos cristales después de un periodo de incubación mayor a 30 s los cristales mostraron cuarteaduras y esto afecta la calidad del patrón de difracción (incremento de la mosaicidad, pérdida de resolución).

VI.6 Obtención de estructuras cristalográficas en el estado férrico

La colecta del cristal descrito en la sección anterior para el grupo espacial P1 permitió obtener una estructura a $3.1\ \text{Å}$ de resolución con un tetrámero en la unidad asimétrica. Los parámetros estadísticos de la estructura se presentan en la tabla 1. La estructura se depositó en el PDB con el código 3ZJ4. Sus parámetros de celda unitaria son: $a=85.44\ \text{Å}$, $b=88.20\ \text{Å}$, $c=104.39\ \text{Å}$, $\alpha=82.08^\circ$, $\beta=82.47^\circ$, $\gamma=62.33^\circ$. El valor de RMSD entre el tetrámero determinado en la estructura de P1 y el de la estructura ortorrómbica (PDB 3EJ6) es de $0.42\ \text{Å}$ y se calculó considerando 2721 C α s (la sobreposición se muestra en la figura 15). Debido a la resolución, esta estructura se afinó usando simetrías no cristalográficas, un valor ADP por residuo y ocupación de 1 para todos los átomos. No fue posible modelar conformaciones alternas o átomos de solvente. A comparación del modelo publicado con anterioridad (PDB 3EJ6), en este grupo espacial los diferentes monómeros del tetrámero tienen un menor número de contactos entre las copias de la unidad asimétrica (ver tablas de contactos en el Apéndice C), una vista global del empacamiento se presenta en la figura 14.

Tabla 1. Parámetros estadísticos de las estructuras de la CAT-3 colectadas a partir de cristales en estado férrico.

Estructura	<u>3ZJ4</u>	<u>3ZJ5</u>	<u>Tetragonal</u>
Grupo especial	P1	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P4 ₃ 2 ₁ 2
Celda Unitaria (Å, °)	a=85.44, b=88.20, c=104.39 α =82.08, β =82.47, γ=62.33.	a=131.52, b=154.80, c=160.74 α = β = γ=90	a=207.51, b=207.51, c= 137.04 α = β = γ=90
Resolucion (Å)	3.10	1.95	2.95
Reflexiones únicas	47,857	270,245	62,656
Integridad (%)	98.6 (97.1)	95.0 (87.8)	99.3 (98.0)
I/σI	8.5 (2.8)	7.0 (2.6)	9.1 (2.8)
Rsym (%)	17.4 (51.1)	14.2 (43.2)	11.1 (46.3)
Redundancia	4.0 (3.9)	3.8(3.8)	4.1 (4.1)
Mosaicidad (°)	0.23 (XDS)	0.80 (iMosflm)	0.13 (XDS)
<u>Afinamiento</u>			
Límites de resolución (Å)	29.5 (3.1)	42.5 (1.95)	30.0 (2.95)
R _{work} (%)	19.70	15.64	25.53
R _{free} (%)	24.51	19.65	30.44
Átomos de protein	21,333	21606	21,339
Átomos de hemo	172	172	172
Átomos de tartrato	-	10	--
Átomos de PEG	-	144	--
Átomos de solvent	-	2189	321
Longitud de enlaces (RMSD Å)	0.003	0.007	0.009
Ángulo de enlaces (RMSD °)	0.863	1.120	1.110
<u>Valores B promedio (Å²)</u>			
Proteína	43.80	11.90	77.11
Hemo	24.70	5.00	59.70
Solvente	-	17.50	34.65
PEG	-	30.70	--
Tartrato	-	26.80	--

La colecta del cristal $P2_12_12_1$ en el estado férrico permitió obtener una estructura a 1.95 Å con un tetrámero en la unidad asimétrica (los parámetros estadísticos se presentan en la tabla 1), dicha estructura fue depositada en el PDB con el código 3ZJ5. Las dimensiones de celda unitaria de $a=131.52$ Å, $b=154.80$ Å, $c=160.74$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$ son aproximadas a las de la estructura 3EJ6 depositada en el PDB ($a=131.84$ Å, $b=154.51$ Å, $c=164.21$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$). El valor de RMSD entre la estructura 3ZJ5 y la estructura 3EJ6 es de 0.4 Å considerando 2705 Cas (la sobreposición se muestra en la figura 15).

El incremento en la resolución cuando se compara la estructura 3ZJ5 con 3EJ6, 1.95 Å contra 2.3 Å, permitió modelar una mayor cantidad de moléculas de agua con respecto al modelo anterior 2819 comparadas con 1364. Cuando se analiza el canal de acceso hacia el sitio activo en los monómeros, aunque no se encuentran modificaciones relevantes en el radio del mismo, se encuentra un número diferente de moléculas de agua en el canal en dos de los monómeros. En los monómeros C y D se encuentran 3 moléculas de agua (al igual que en 3EJ6), en el monómero A hay 3 moléculas de agua en 3ZJ5 mientras en 3EJ6 hay 2, finalmente en el monómero B se observan 4 moléculas de agua en el canal comparadas con 3 en 3EJ6. En esta estructura se observan fragmentos de PEG de diferentes longitudes en la superficie de la enzima, resulta interesante que algunos de estos fragmentos están en sitios donde la estructura 3EJ6 se encontraba glicosilada, principalmente en los sitios ubicados en la intercara formada por copias de la unidad asimétrica. Otro cambio que se observa en esta estructura es la presencia de residuos con conformaciones alternas en diversos sitios de la enzima, en los que están en la superficie no parece que pueda correlacionarse con las características cinéticas de la enzima pero hay dos que podrían ser importantes por su ubicación. El primero es el residuo de R147 que se encuentra en la intercara entre los monómeros relacionados en el eje P a 2.3 Å del residuo de R147 en el otro monómero. En la estructura de la PVC (2IUF) este residuo también presenta una conformación alterna. El residuo de G148, contiguo a R147 forma parte del canal de intercomunicación [57] aunque en este residuo no se observa ningún cambio conformacional. Si la doble conformación observada en

R147 tiene importancia en el movimiento de moléculas de agua a través del canal de intercomunicación no ha sido determinado.

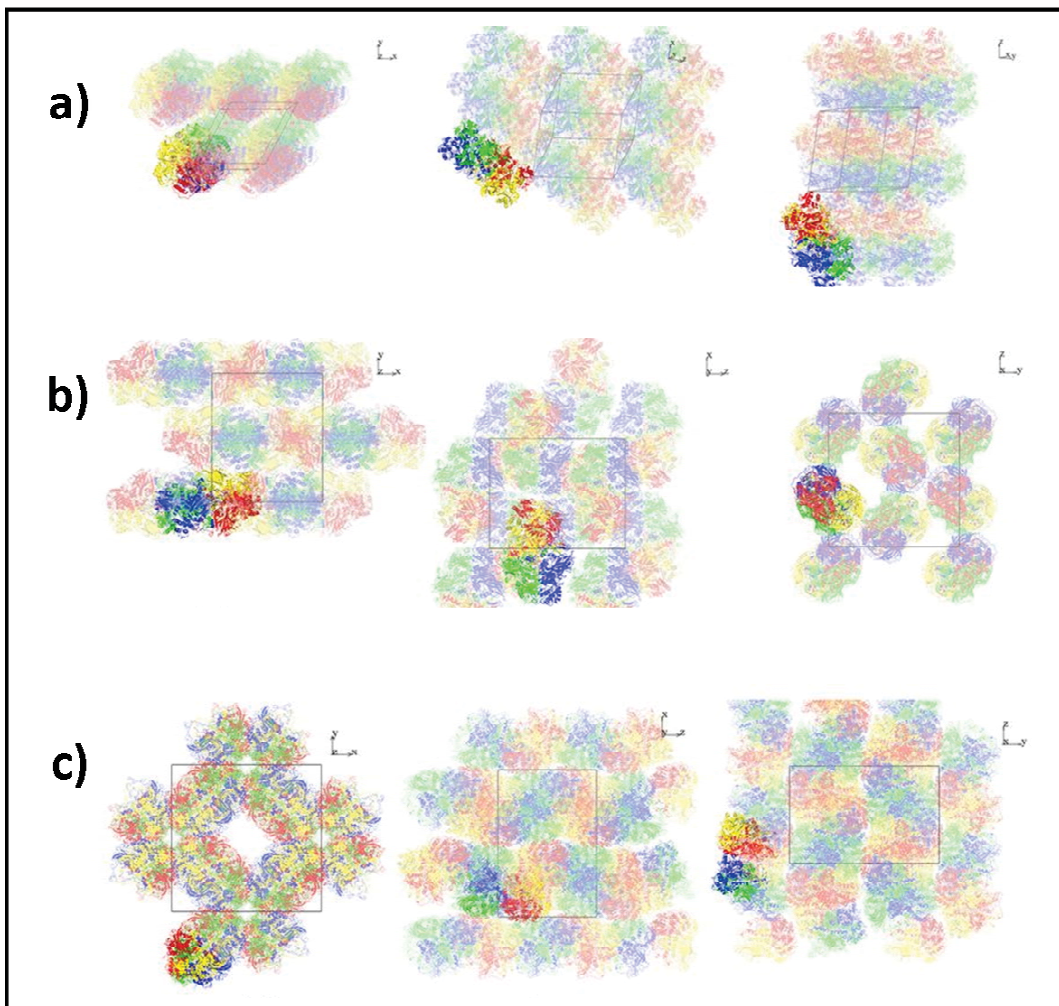


Figura 14. Organización de la CAT-3 en los cristales. a) Vista del empacamiento de la CAT-3 en la estructura 4ZJ4 (P1 3.1 Å); b) Vista del empacamiento de la CAT-3 en la estructura 4ZJ5 (P2₁2₁2₁ 1.95 Å); c) Vista del empacamiento de la CAT-3 en la estructura 4BIM (P4₃2₁2 2.95Å). Para los tres ejemplos se muestra de izquierda a derecha las caras *ab*, *ac* y *bc* de la celda unitaria. En a) y b) la unidad asimétrica está formada por un tetrámero a diferencia de c) en donde está formada por dos dímeros separados.

La S388, el residuo previo a la tirosina (Y389) que da el quinto sitio de coordinación al hierro del hemo, es el otro residuo que presenta una doble conformación, aunque las dos están a una distancia de enlace de hidrógeno del

D92 del monómero relacionado en el eje P (Figura 16). Este residuo de serina esta conservado en todas las estructuras de las LSC depositadas en el PDB, pero presenta doble conformación sólo en otra enzima, la CATPO de *Scytalidium thermophilum* [21], pero con una orientación distinta. Con únicamente la evidencia cristalográfica no se puede establecer si el residuo S388 es importante para determinar el estado del grupo hemo en la proteína como hemo b. A diferencia de las otras LSC, la estructura de CAT-3 es la única que tiene una ocupación completa de hemo b en lugar de hemo d.

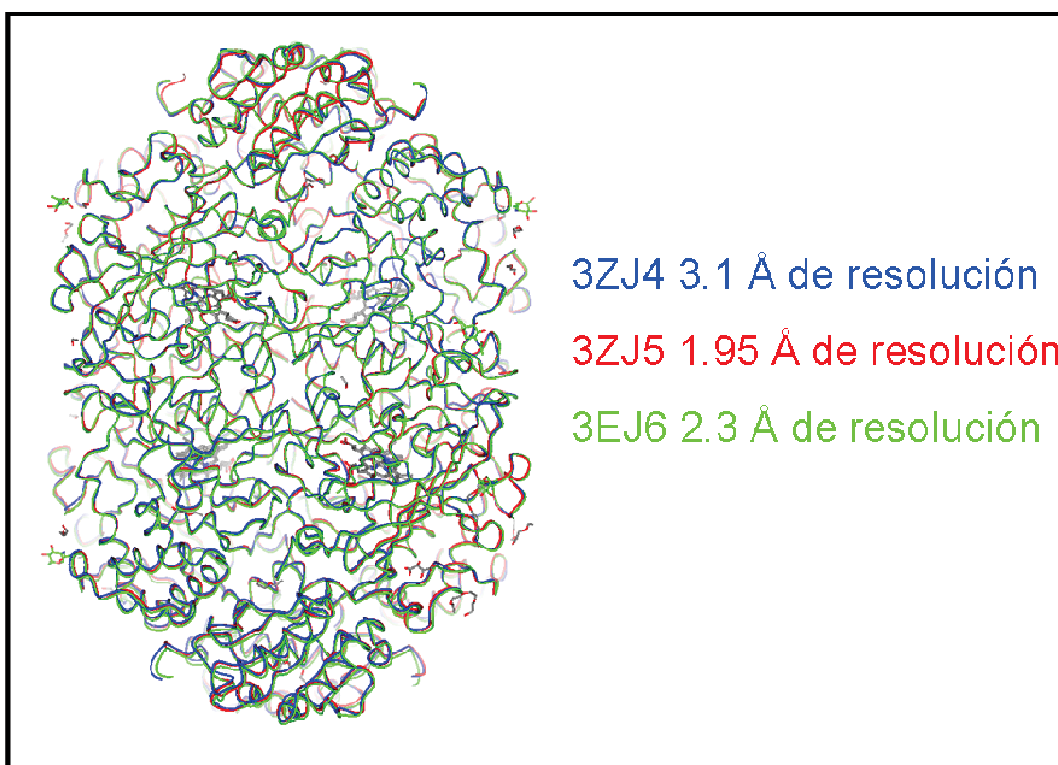


Figura 15. Sobreposición entre los tetrameros de las estructuras. Se muestra la sobreposición entre la estructura 3EJ6 [1], 3ZJ4 y 3ZJ5.

Como se mencionó con anterioridad diversos fragmentos de PEG son claramente visibles en los mapas de densidad electrónica $2F_o-F_c$ de las estructura 3ZJ5. Adicionalmente un ión tartrato fue modelado en la proximidad del residuo K173, aunque no interactúa directamente con átomos de este residuo el ión

tartrato está estabilizado por enlaces de hidrógeno con moléculas de agua. Resulta interesante que, de varias condiciones de cristalización similares a las usadas para obtener la estructura 3ZJ5 (PEG 3,350 al 20 % y distintos iones a 0.2 M) se lograron obtener cristales, incluso con una apariencia similar, pero con muy pobre capacidad de difracción. Esto sugiere que el tartrato dibásico de amonio participa en la estabilización de la red cristalina a pesar que solo se observa una molécula de tartrato en toda la unidad asimétrica.

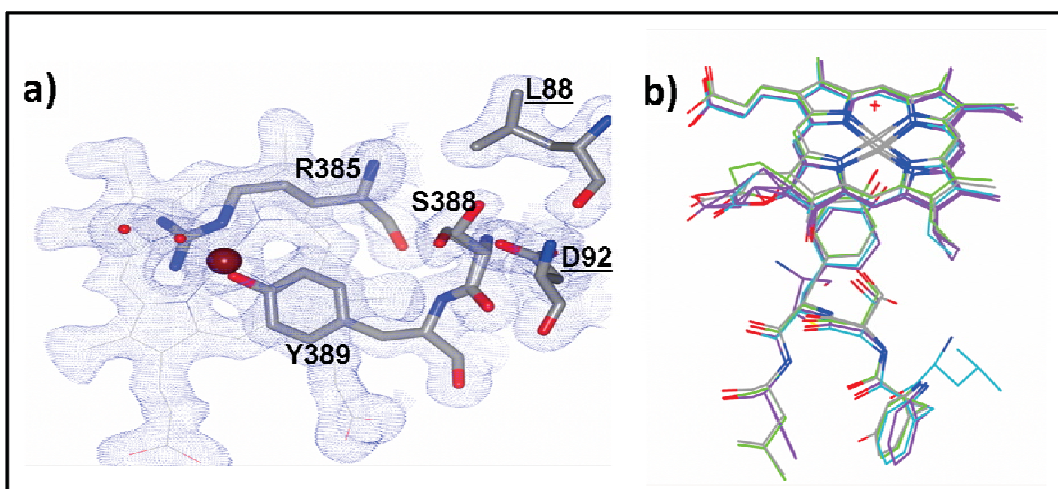


Figura 16. Conformación alternativa en el residuo S388. a) El residuo S388 (conservado en las LSCs) presenta doble conformación en esta estructura, la conformación alternativa pierde el enlace de hidrógeno con el residuo D92 de la subunidad relacionada en el eje P; b) sobreposición de 4AJ9 (gris) con PVC (2IUf verde), CAT-1 (1SY7 morado) y HPII (1GGE azul), la estructura de CAT-3 es la única que tiene hemo b en lugar de hemo d, además de un residuo tirosina en lugar de fenilalanina en la posición Y387. En a) el mapa. $2F_o - F_c$ se muestra a 1σ en azul.

A partir de los cristales en el grupo espacial $P4_32_12$ se determinó una estructura a 2.95 Å (los parámetros estadísticos se presentan en la tabla 1). A diferencia de las otras estructuras determinadas en este proyecto, en las que la unidad asimétrica es un tetrámero, en la estructura 4BIM la unidad asimétrica está formada por 2 dímeros independientes que pueden dar origen a dos tetrámeros distintos al aplicar los operadores simétricos del grupo espacial $P4_32_12$ (figura 17).

De los dos tetrámeros que se pueden originar, el generado por el dímero AB tiene un RMSD de 0.47 Å comparado con la estructura 3EJ6 considerando 2574 C α s. El tetrámero generado por CD tiene un RMSD de 1.61 Å comparado con la estructura 3EJ6 usando 2544 C α s, este tetrámero aparece distorsionado. Se observa una separación entre la intercara del monómero D y su simétrico (relacionados en el eje R). Este cambio puede describirse como una rotación de $\sim 5^\circ$ si se considera un plano que cruza el tetrámero “normal” en el eje P.

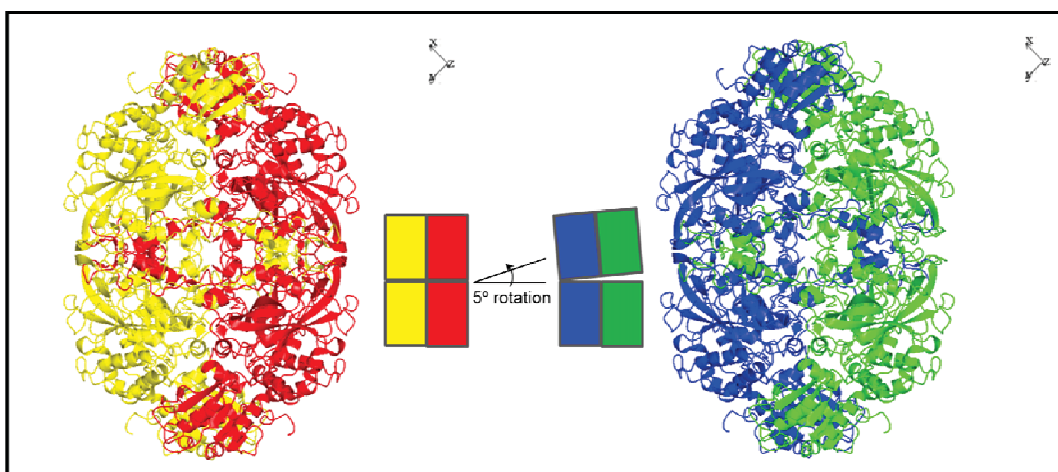


Figura 17. Tetrámeros existentes en la estructura tetragonal. Mediante la aplicación de los operadores simétricos del grupo espacial $P4_32_12$ se puede generar un tetrámero a partir del dímero AB (izquierda) con la misma conformación que los del grupo espacial $P2_12_12_1$ y P1. A partir del dímero CD (derecha) se genera un tetrámero “distorsionado” con una separación en la intercara entre D y su simétrico. El cambio puede describirse como una rotación de 5° si se considera la intercara como un plano (centro).

Cuando se ajusta el patrón de dispersión de SAXS con los patrones calculados para los tetrámeros generados a partir del dímero AB (que es prácticamente idéntico a las estructuras 3EJ6 y 3ZJ5) y el dímero CD se observa un valor cercano para ambas estructuras, lo que implica que el patrón de dispersión también valida esta estructura (figura 18). Aunque no hay evidencia suficiente para sugerir que esta estructura “distorsionada” tiene alguna implicación biológica, se ha reportado en una estructura de la catalasa HP11 de *E. coli* determinada a partir de una mutante inactiva (H128N, equivalente a H102 en la CAT-3), presenta cambios en la conformación de residuos localizados en la

intercara de los dímeros relacionados en R, específicamente en la zona cercana a la cavidad central, como respuesta a la incubación con H_2O_2 [58]. Aunque los cambios no son idénticos puede que en HPII estén limitados por la red cristalina previamente formada. En el caso de la CAT-3 es probable que la enzima exista en esta conformación “distorsionada” en solución y sea estabilizada por moléculas de MPD que difunden en la intercara del dímero. En la zona donde está la separación en la intercara hay densidad electrónica sin asignar en esta posición podría modelarse una molécula que no se ha identificado. Un eje de simetría de orden 2 cruza la estructura en esa posición lo que dificulta el modelado con precisión de un compuesto.

Queda la posibilidad de que esta estructura sea un artefacto cristalográfico provocado por la secuencia de 27 residuos adicionales a la secuencia original de la CAT-3, sin embargo ninguno de estos residuos (incluyendo los primeros 36 residuos de la secuencia original de la CAT-3) es visible en ninguna de las estructuras, esta es la única condición en la que se observa esta alteración y la única que tiene MPD como agente precipitante. Para analizar si esta estructura es un artefacto se puede intentar la obtención de cristales en esta condición utilizando la enzima purificada directamente de micelio de *N. crassa* [1].

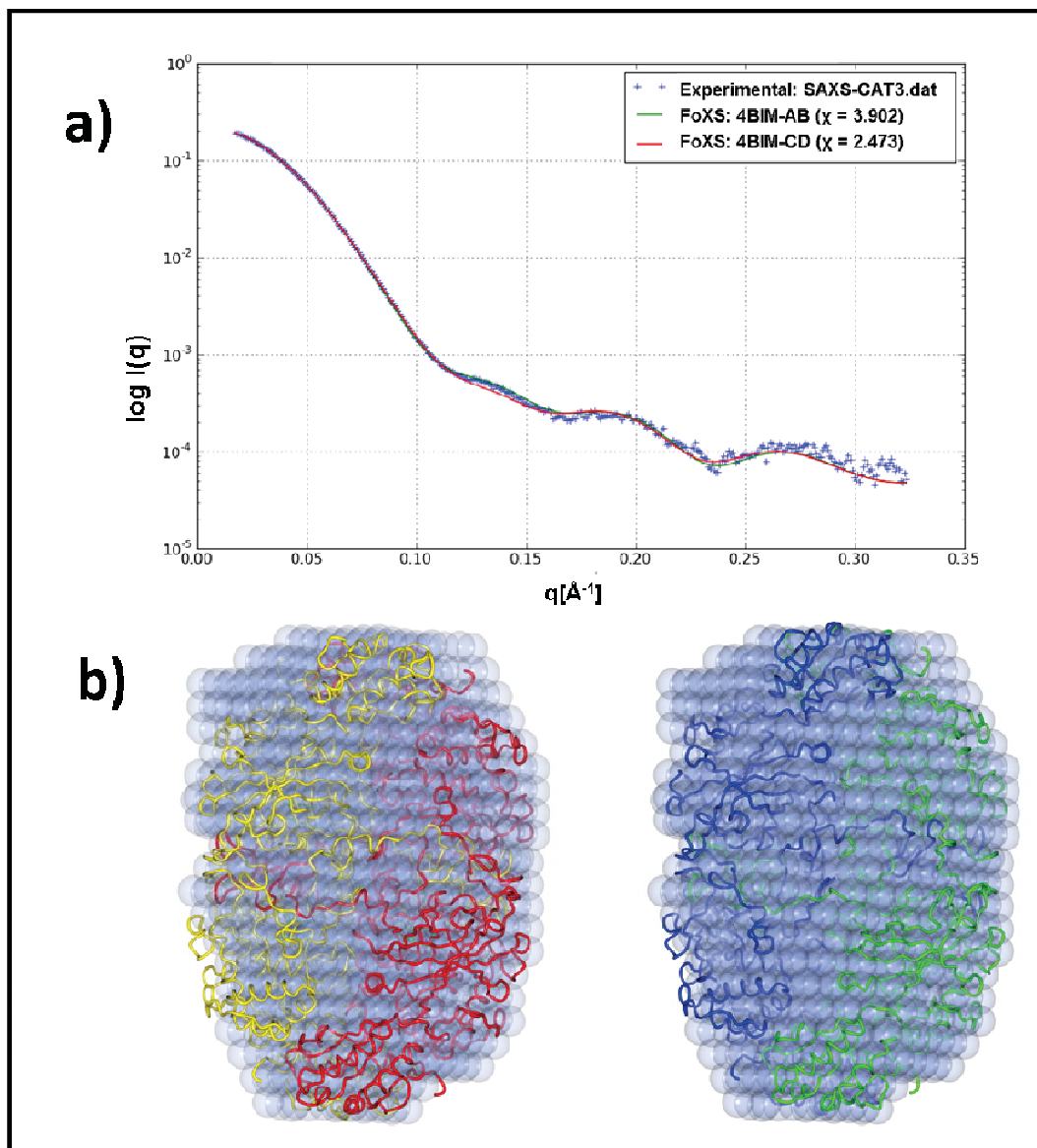


Figura 18. Ajuste entre los tetrámeros obtenidos en $P4_32_12$ y el patrón de SAXS. a) En el ajuste entre los patrones de dispersión calculados a partir de los tetrámeros AB y CD de la estructura 4BIM el valor χ del tetrámero CD es ligeramente inferior al de AB; b) La sobreposición de los modelos muestra que ambos tetrámeros AB o CD, pueden explicar el modelo ab initio determinado en SAXS.

VI.7 Obtención de estructuras cristalográficas del Compuesto I

La difracción de un cristal del grupo espacial $P2_12_12_1$ remojado en ácido peracético, que mostraba una coloración verde al inicio de la colecta (figura 19), permitió obtener una estructura a 1.85 Å de resolución (4AJ9), sin embargo en el mapa de densidad electrónica $2F_o-F_c$ de la estructura no se observa presencia del compuesto I o el compuesto II (enlace doble o enlace simple entre un átomo de oxígeno y el hierro del grupo hemo respectivamente). Si alguno estuviera presente debería observarse densidad electrónica continua entre el átomo de hierro del hemo y un átomo de oxígeno modelado a una distancia en el intervalo de 1.7 a 1.9 Å. Cuando se revisó el mapa de diferencia F_o-F_c en las cercanías del grupo hemo se determinó que está justificado modelar 2 moléculas de agua, respectivamente en las posiciones W1 y W0 mencionadas anteriormente, pero no el oxígeno unido al hierro del hemo (figura 20). En los cuatro monómeros de la CAT-3 se modelaron las dos moléculas de agua correspondientes al estado férrico. Al comparar la estructura 4AJ9 (estado férrico remojado con ácido peracético) a una dosis final de 1.51 MGy con 3ZJ5 (estado férrico) a 1.18 MGy se observa en los mapas $2F_o-F_c$ y F_o-F_c que el sitio activo de la enzima muestra densidad electrónica justificando la presencia de una molécula de agua en la posición W1 en tres de los cuatro monómeros y solo un monómero con dos moléculas de agua. Igual a lo observado en la estructura 3EJ6 en donde el monómero D presentaba un pico alargado correspondiente a dos moléculas de agua en las posiciones W0 y W1. Lo anterior sugiere que la enzima colectada en un estado férrico inicial se reduce al estado ferroso. Del cristal a partir del cual se colectó la estructura 4AJ9 se colectaron un total de 1080 imágenes de difracción y se determinó una estructura a una dosis final de 4.5 MGy usando los últimos 360 imágenes de difracción, la estructura se nombró Dat-3 PAA, a pesar de haber incrementado la dosis al triple las dos moléculas de agua W1 y W0 aún permanecen en el sitio activo. La tabla 2 muestra los parámetros estadísticos de las estructuras 4AJ9 y Dat-3 PAA.

Tabla 2. Parámetros estadísticos de las estructuras de la CAT-3 colectadas a partir de cristales remojados en ácido peracético.

<u>Estructura</u>	<u>4AJ9</u>	<u>Dat-3 PAA</u>
Grupo especial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Celda Unitaria (Å)	a(130.75), b(154.19), c(160.3)	a (130.75), b (154.19), c(160.3)
Resolucion (Å)	1.85	2.10
Reflexiones únicas	268,553	186,161
Integridad (%)	98 (84.8)	98.8 (99.0)
I/σ	15.9 (4.3)	6.8 (3.7)
R_{sym} (%)	8.9 (30.4)	11.9 (28.1)
Redundancia	3.6(2.6)	3.3 (2.9)
Mosaicidad (°)	0.11(XDS)	0.25 (XDS)
<u>Afinamiento</u>		
Límites de resolución (Å)	30 (1.85)	29.7 (2.09)
R_{work} (%)	17.7	18.17
R_{free} (%)	21.7	22.82
Átomos de proteína	21614	21496
Átomos de hemo	172	172
Átomos de acetato	32	32
Átomos de PEG	144	126
Átomos de solvente	2116	1713
Longitud de enlaces (RMSD Å)	0.007	0.007
Ángulo de enlaces (RMSD °)	1.075	1.121
<u>Valores B promedio (Å²)</u>		
Proteína	12.0	12.01
Hemo	3.90	3.87
Solvente	15.53	15.50
PEG	27.8	28.80
Acetato	11.6	15.24

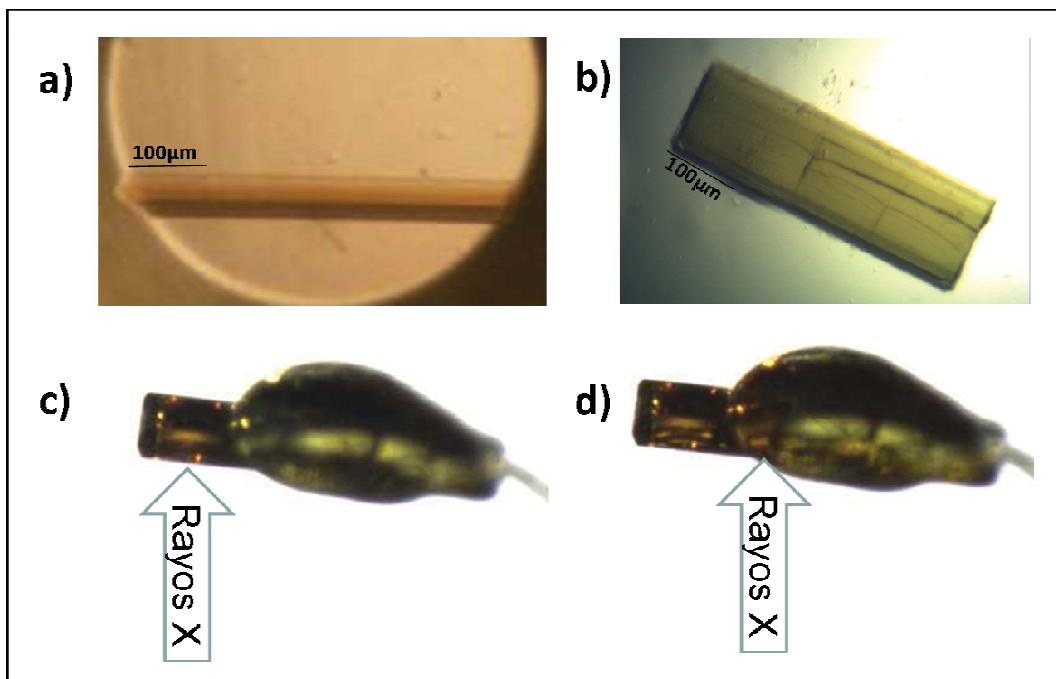


Figura 19. Preparación y colecta de los cristales del compuesto I. a) Cristal de la CAT-3 en el grupo espacial $P2_12_12_1$ obtenido por el método de *microbatch*; b) Cristal de la misma condición que a) remojado en solución crioprotectora con PAA para obtener el compuesto I; c) Cristal de la CAT-3 en estado de compuesto I después de colectar un *dataset* el sitio donde han incidido los rayos X muestra un cambio de coloración que está relacionado con la reducción del sitio activo; d) Colecta de un segundo *dataset*, los cambios están limitados al área expuesta.

Aunque no se podía validar la presencia de compuesto I estructuralmente y sólo se tenía como evidencia el cambio de coloración del cristal durante el remojado. La estructura mostraba 3 cambios en el canal principal (Figura 21); el primero, que ya se mencionó, es que la estructura tenía dos moléculas de agua en el sitio activo a diferencia del estado férrico, esto sugiere que el cristal se encontraba en un estado distinto, más oxidado, al inicio de la colecta. El segundo es la presencia de un ión acetato a 10 Å del hierro del hemo, formando un enlace de hidrógeno con el residuo D155, el ión acetato no forma parte de la condición original de cristalización pero es un producto de la reacción entre el sitio activo y el ácido peracético para formar compuesto I. El ácido peracético puede degradarse también a ácido acético y H_2O_2 . Si se sobrepone la estructura 4AJ9 con la estructura del compuesto I de PVC (PDB 2IUF) [17] el ión acetato en el canal se

encuentra exactamente en la misma posición, se puede observar también una molécula de ión peracetato que en 4AJ9 coincide con la posición de 2 moléculas de agua la primera a 3.1 Å de D155 y la segunda a 2.7 Å de T208. Finalmente en la estructura 4AJ9, el residuo V195 tiene doble conformación aparentemente provocada por la presencia del ión acetato en esa posición. Tomando en cuenta los cambios registrados en el canal principal y el cambio de coloración del cristal durante el remojado, se concluyó que sí ocurrió la formación del compuesto I pero fue reducido durante la colecta. El intervalo de dosis depositada en esta estructura va de 0 a 1.51 MGy (de acuerdo al cálculo ejecutado con *RADDOSE*), lo anterior indica que el compuesto I en la enzima es estable a dosis inferiores a 1.51 MGy.

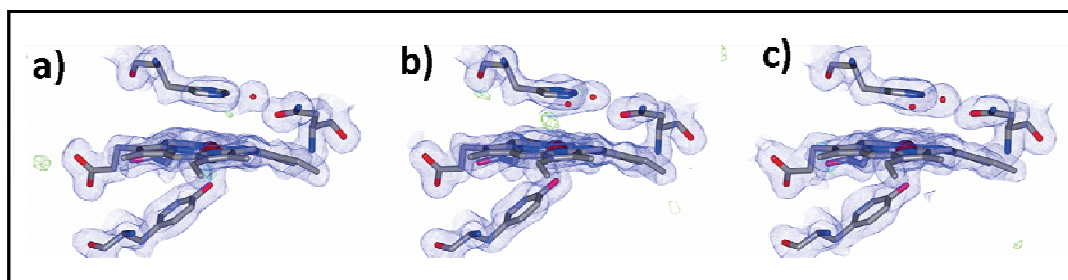


Figura 20. Sitio activo de la CAT-3 en los cristales en el estado férrico y los remojados en PAA. a) Sitio activo de la estructura 3ZJ5 de la CAT-3 (estado férrico), se observa una molécula de agua en la posición W1 lo que sugiere que la enzima se redujo; b) Sitio activo de la estructura 4AJ9 (estado férrico + PAA) se observan 2 moléculas de agua (W1 y W0) a pesar de que se esperaba encontrar un oxígeno unido (a ~ 1.72 Å del hierro) exactamente en la posición donde se observa el pico positivo en el mapa F_o-F_c , que sugiere una existencia, con baja ocupación, del compuesto I; c) Sitio activo de Dat3-PAA (mismo cristal usado para determinar la estructura 4AJ9 con una dosis total de 4.5 MGy) se observan las 2 moléculas de agua W1 y W0, el pico positivo del mapa F_o-F_c ya no está presente a esta dosis. Todas las figuras corresponden al monómero D de cada estructura. El mapa $2F_o-F_c$ aparece a 1σ en azul y el mapa F_o-F_c a 3.5σ en verde.

Cuando se colecta un *dataset* completo de un cristal se deposita una dosis muy alta capaz de reducir el compuesto I. Por tal motivo se recurrió a la estrategia de colecta de datos de múltiples cristales y además se disminuyó el flujo de fotones en línea de rayos X. Un total de 9 cristales de la CAT-3 remojados en ácido peracético fueron colectados, después de la integración y escalamiento de los *datasets* se estableció un corte de las reflexiones a 2.2 Å de resolución, se

integró cada *dataset* por partes, formando paquetes de 33 imágenes de difracción, correspondientes a 9.9° de rotación en la colecta. Se integró además un *dataset* con las primeras 25 imágenes de difracción de cada cristal alcanzando una integridad del 85% y con una dosis de 0.20 MGy. Las estructuras obtenidas a partir de estos *datasets* compuestos se nombraron como 10°, 20°, 30° y así sucesivamente hasta llegar a 110° que fue el ángulo total colectado para cada cristal. Por cada 10° de colecta cada estructura hay un incremento de 0.26 MGy en la dosis. La estructura obtenida con 25 imágenes se nombró 8° y se calculó que tiene una dosis de 0.20 MGy.

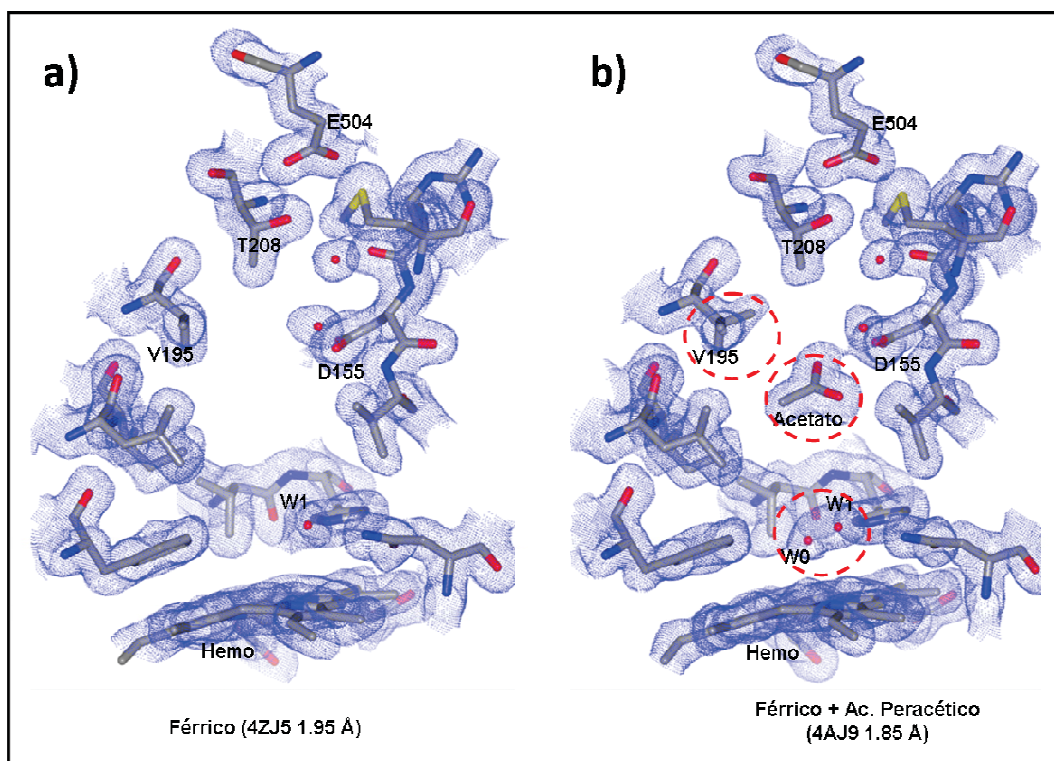


Figura 21. Canal de acceso en los cristales en el estado férrico y los remojados en PAA. a) Canal de acceso de la estructura 3ZJ5 de la CAT-3 (estado férrico); b) Canal de acceso de la estructura 4AJ9 de la CAT-3 (estado férrico + PAA). La presencia de las dos moléculas de agua W1 y W0, una molécula de acetato y la doble conformación del residuo V195 en 4AJ9 en comparación con 4ZJ5 sugieren que la formación del compuesto I se llevó a cabo y fue reducido durante la colecta. El mapa. $2F_o - F_c$ aparece a 1 σ en azul.

Para realizar la colecta a una dosis inferior a 0.26 MGy, se disminuyó el flujo mediante el uso de atenuadores de aluminio. Se logró colectar cada imagen

con una dosis de 0.0010-0.0012 MGy (un orden de magnitud menor comparado con las colectas anteriores). Se colectaron un total de 9 *datasets* de los cuales solo se utilizaron para el análisis aquellos que alcanzaran una resolución de 2.45 Å (3 *datasets* provenientes de diferentes zonas del mismo cristal), la drástica disminución del flujo afectó directamente la intensidad de las reflexiones de cada cristal, aunque una resolución de 2.45 Å es suficiente para validar en los mapas de densidad electrónica la presencia de compuesto I. Con estos experimentos se obtuvo una estructura con una dosis de 0.16 MGy a la que se nombró BD-1 (baja dosis). El mapa y el modelo obtenido a partir de este *dataset* muestran la presencia de compuesto I claramente en los cuatro monómeros, con una distancia de 1.74-1.77 Å entre el hierro y el oxígeno. Cuando se analizaron ocupaciones en esta estructura se encontró que el oxígeno ligado al hierro del hemo tiene una ocupación de 0.8 para el monómero A, 0.9 para los monómeros B y C, 1 para el monómero D. Tanto el uso de *datasets* compuestos como la colecta a bajo flujo permitieron obtener estructuras del compuesto I a dosis inferiores a 1.5 MGy (dosis en 4AJ9). El compuesto I tiene una ocupación distinta dependiente de la dosis.

VI.8 Reducción inducida por rayos X: cristalografía y espectroscopía UV-visible

Los espectros de absorbancia UV- visible colectados para los cristales de la CAT-3 remojados en PAA (Figura 22) muestran al principio de la colecta los picos característicos tanto de la enzima en estado férrico como aquellos del compuesto I, lo que indica que desde el principio de la colecta (0 MGy) hay una mezcla de poblaciones. En el espectro aparecen picos correspondientes a 500 nm, 535 nm, 617 nm y 665 nm en la región visible, además de la banda de Soret que aparece ligeramente desplazada a la izquierda ~402 nm en comparación con el espectro de la enzima en estado férrico observada en solución. Los picos de estos espectros también coinciden con los reportados en catalasas con hemo b para la ANC [20] y la BLC [26].

Tabla. 3 Estadística de los *datasets* compuestos

Estructura	BD-1	Cp I 8°	Cpl 10°	cpl 50°	Cpl 110°
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Celda Unitaria (Å)	a(130.86), b(154.01), c(160.12)	a(131.1), b(154.5), c(160.9)	a(131.1), b(154.5), c(160.9)	a(131.1), b(154.5), c(160.9)	a(131.1), b(154.5), c(160.9)
Resolución (Å)	30 (2.5)	30 (2.1)	30 (2.2)	30 (2.2)	30 (2.2)
Reflexiones únicas	110,454	153,208	158,332	156,657	159,994
Integridad (%)	96.6 (98.3)	80.9 (81.8)	95.6 (95.8)	94.6 (95.9)	96.6 (96.2)
I/σ	7.69 (2.97)	4.39 -(2.03)	6.77 (3.41)	6.87 (3.50)	6.80 (3.21)
R _{sym} (%)	17.3 (47.8)	15.7 (37.3)	14.5 (35.2)	13.6 (34.2)	14.9 (37.2)
Redundancia	4.97 (4.90)	2.02 (1.917)	3.35 (3.30)	2.93 (2.88)	3.14 (3.19)
Afinamiento					
Límites de R_{work} (%)	29.7 (2.5)	29.6 (2.1)	29.6 (2.2)	29.0 (2.2)	29.6 (2.2)
R_{work} (%)	18.62	16.04	16.05	15.8	15.56
R_{free} (%)	24.57	21.39	20.81	20.32	20.33
Átomos de R_{free}	21,302	21,591	21,591	21,608	21,610
Átomos de hemo	172	172	172	172	172
Átomos de R_{free}	32	32	32	32	32
Átomos de PEG	-	120	120	120	120
Átomos de R_{free}	947	1,956	1,952	1,770	1,978
Longitud de R_{free}	0.008	0.004	0.008	0.006	0.005
Ángulo de enlaces R_{free}	1.175	0.882	1.085	0.999	0.916
Valores B					
Proteína	9.4	12.9	14.4	13.9	14.9
Hemo	3.9	5.5	7.2	6.9	7.0
Solvente	10.73	15.65	16.90	16.33	18.41
PEG	-	28.50	29.41	28.36	28.51
Acetato	12.51	15.62	12.85	12.82	15.57

La estructura a menor dosis determinada para el compuesto I es BD-1 (2.45 Å). A una dosis de 0.16 MGy en la estructura se observa un átomo de oxígeno

unido al hierro del hemo a una distancia de 1.74 Å en el mapa $2F_o-F_c$ la molécula de oxígeno está justificada dentro de la densidad electrónica (Figura 23a). El mapa de omisión F_o-F_c muestra un pico positivo que justifica la presencia del compuesto I en el modelo al igual que la molécula de agua W1 (figura 24a). Cuando en el espectro de absorbancia UV-visible se observa el curso que han tomado los cambios hasta esta dosis, se presenta una disminución en los picos de 617 nm y 665 nm al mismo tiempo que se observa la aparición de dos picos a 565 nm y 594 nm respectivamente, además de un desplazamiento de la banda de Soret hacia la derecha de 402 a 426 nm, aunque al ser una mezcla de poblaciones el pico es más amplio que en el espectro en solución. Se puede esperar que haya al menos una población más además de los estados de compuesto I y férrico iniciales.

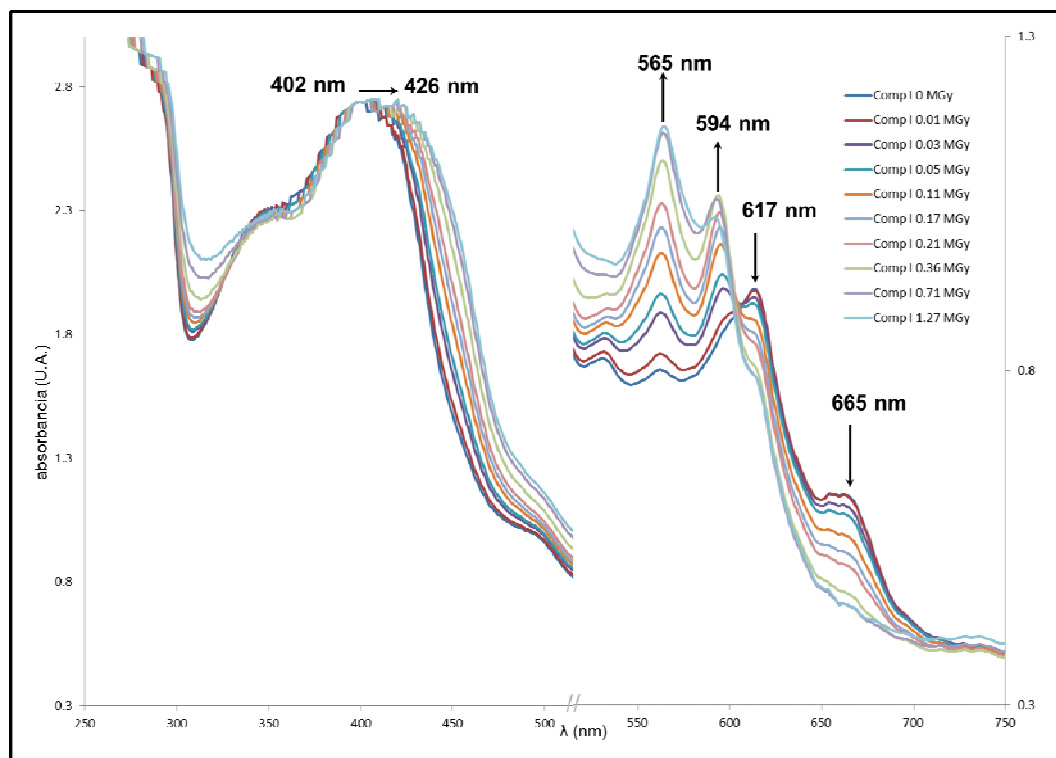


Figura 22. Espectroscopía UV-visible de la reducción del compuesto I. La gráfica muestra la presencia de los picos en la banda de transferencia de carga para el compuesto I (665 nm) y el estado férrico (617 nm) al principio de la colecta, se observa la aparición de un pico a 565 nm y otro a 594. Se observa un desplazamiento de la banda de Soret aproximadamente de 402 a 426 nm.

En la estructura de 8° (0.20 MGy), aunque en el mapa $2F_o-F_c$ hay densidad electrónica continua entre el hierro y el oxígeno, hay también un pico adicional por encima del oxígeno en donde se puede modelar la molécula de agua W0 en una ocupación parcial, W1 permanece en la misma posición (figura 23b). El espectro asociado no manifiesta un cambio relevante entre 0.17 MGy y 0.20 MGy, se mantiene la tendencia del incremento en la absorbancia para los picos de 565 nm y 594 nm mientras disminuye en los picos de 617 nm y 665 nm. El pico positivo en el mapa F_o-F_c para esta estructura muestra que el oxígeno en el monómero A casi ha desaparecido, en B y C la densidad disminuye parcialmente mientras D es el único monómero en que la densidad es clara cubriendo la posición del oxígeno (figura 24b).

En el mapa $2F_o-F_c$ de la estructura de 10° (0.26 MGy) ya no se observa densidad electrónica en la posición del oxígeno en el monómero A, en los monómeros B y C el oxígeno modelado aún aparece dentro de la densidad electrónica que ha disminuido, mientras D es el único monómero en el que la posición del oxígeno está aún justificada totalmente por el mapa $2F_o-F_c$ (Figura 23c). En el mapa F_o-F_c ya no aparece la densidad continua en ninguno de los 4 monómeros (figura 24c). El sitio en el que originalmente se había modelado el oxígeno ahora aparece vacío. Mientras el pico positivo en el mapa $2F_o-F_c$ que está por encima de esta zona se ha alargado justificando la presencia de las dos moléculas de agua W0 y W1. El siguiente espectro de absorbancia UV-visible que fue colectado a 0.36 MGy muestra la misma tendencia en los cambios, los picos de la región visible en 617 nm y 665 nm continúan disminuyendo mientras los de 565 nm y 594 nm continúan aumentando.

Resulta evidente que la desaparición de compuesto I después de 0.26 MGy (10°) es casi completa de acuerdo al mapa $2F_o-F_c$, aunque el mapa F_o-F_c ya no muestra el pico positivo en este punto. Los cambios ocurren principalmente para el monómero A, seguidos de los monómeros B y C y finalmente el monómero D.

Cuando se comparan estos mapas $2F_o-F_c$ y F_o-F_c con aquellos de las estructuras a 50° (1.31 MGy) y 110° (2.89 MGy), no se observan cambios en el

sitio activo y los cuatro monómeros permanecen en la conformación estructural asociada al estado férrico (Figuras 23d y 24d-f). La evolución del espectro UV-visible con respecto a la dosis se monitoreó hasta alcanzar solo 1.27 MGy, que comparado con las estructuras cristalográficas es más cercano a la estructura de 50°, a esta dosis, el pico a 665 nm (asociado al compuesto I) ha desaparecido casi en su totalidad y el de 617 nm (asociado al estado férrico) permanece como un hombro cercano al pico de 594 nm, que en este espectro muestra un decaimiento. Hasta el espectro anterior (0.73 MGy) dicho pico había mostrado un incremento constante. El único pico que continúa incrementando conforme a la dosis es el de 565 nm.

Si se comparan los resultados de obtención del compuesto I mostrados aquí con la única estructura de este intermediario determinada para LSCs la catalasa de PVC (PDB 2IUJ) [17], debe aclararse que no se menciona la dosis depositada en el cristal aunque el cabezal del archivo PDB refiere que la colecta de datos se realizó en un ánodo rotatorio, podría esperarse que la dosis utilizada haya sido muy baja. Hay pocos reportes en los cuales se valida la presencia de un estado intermediario en relación a la dosis calculada [29], [30]. En el caso de mioglobina de caballo los resultados muestran que tras una dosis de tan solo 0.010 MGy la enzima se reduce en un 10% en comparación al estado inicial y que el uso de radioprotectores como el ascorbato tiene muy poco efecto en la protección de los intermediarios [30].

Como se mencionó con anterioridad hay una ocupación distinta entre los sitios activos de los distintos monómeros para el oxígeno unido al hierro en el compuesto I de acuerdo a las estructuras a dosis de 0.16 y 0.20 MGy. Los resultados de microespectrometría UV-visible en el cristal a 0 MGy muestran que hay una ocupación parcial de compuesto I desde el principio de la colecta. Si los monómeros responden de forma distinta al remojado, la resistencia a la reducción que se observa en el monómero D comparado con los otros 3 monómeros podría ser atribuida a una ocupación mayor del compuesto I en respuesta al remojado en

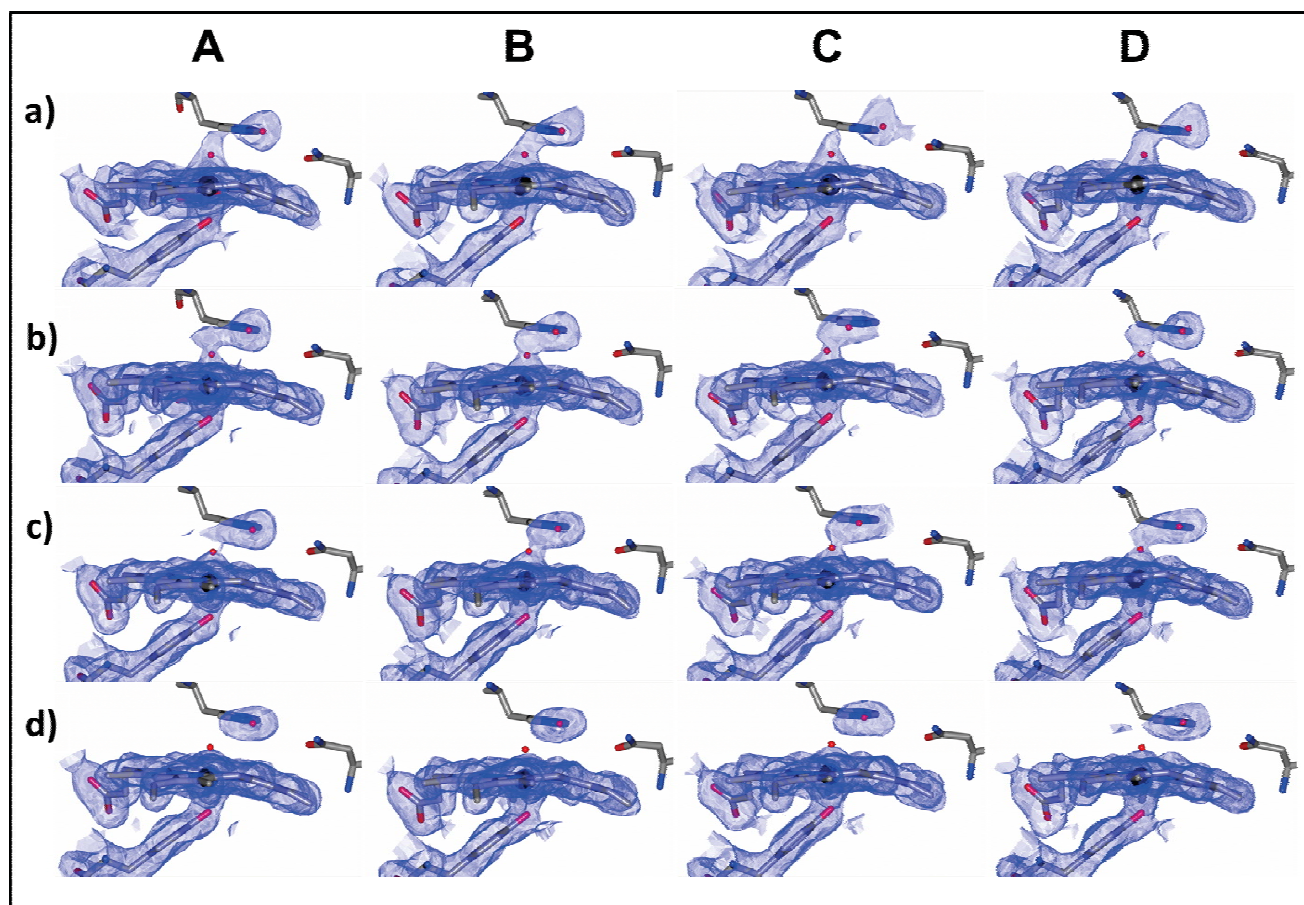


Figura 23. Reducción diferencial del compuesto I. Las estructuras del compuesto I a) 0.165 MGy-2.45 Å ;b) 0.20 MGy-2.1 Å; c) 0.263 MGy-2.2 Å; d) 1.31 MGy-2.2 Å. Muestran el proceso de reducción inducida por rayos X en los sitios activos del tetrámero. Los monómero A, B, C y D de cada estructura aparecen ordenados de izquierda a derecha, el compuesto I del monómero A es el primero en que disminuye la densidad

electrónica en las coordenadas del oxígeno a 1.74 Å del hierro del hemo, seguido de los monómeros B y C, finalmente D es el último monómero en reducirse como se observa en el panel c). El mapa. $2F_o - F_c$ aparece a 1 σ en azul.

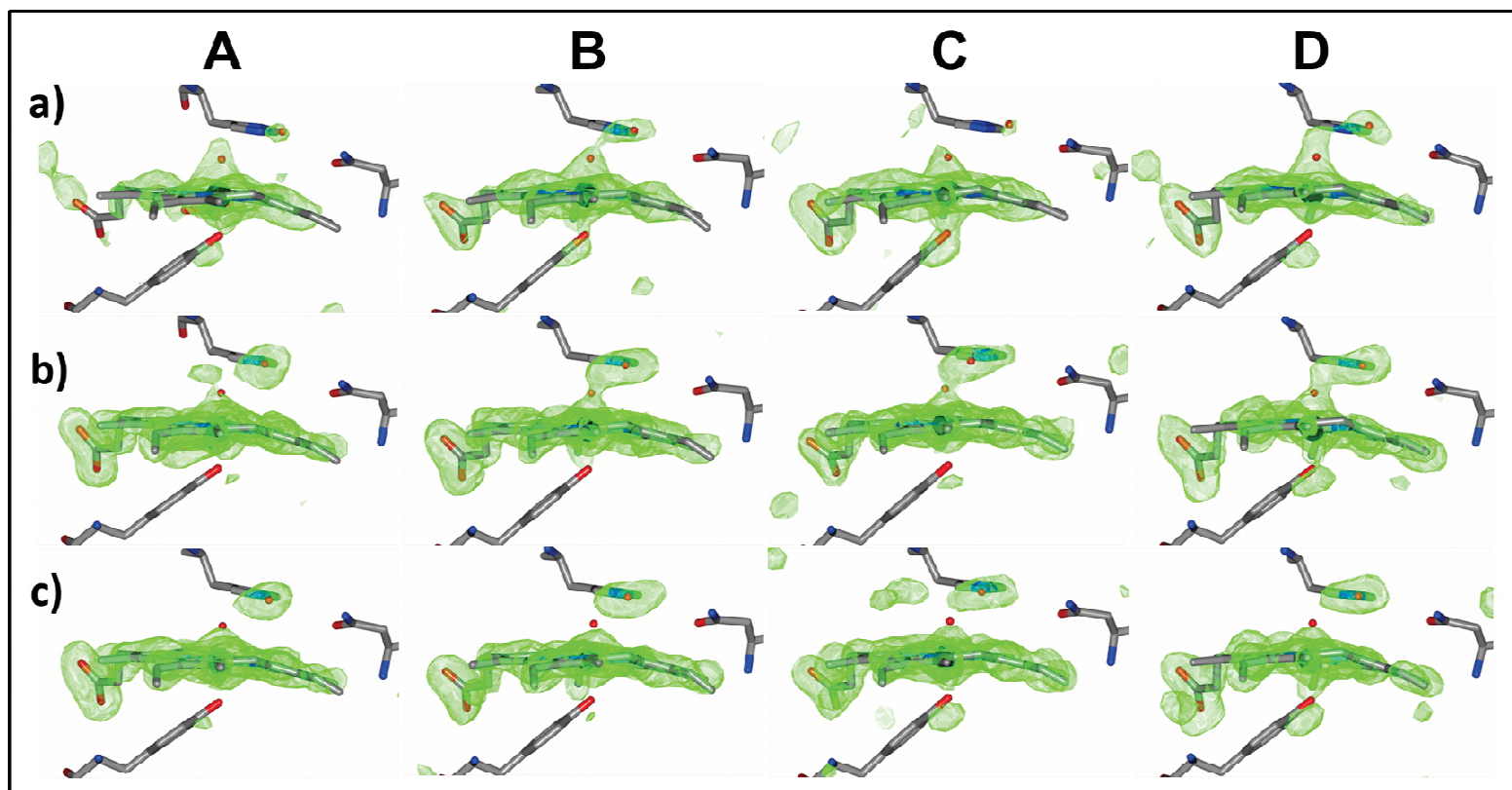


Figura 24. Reducción diferencial del compuesto I en mapas de omisión. Las estructuras del compuesto I a) 0.165 MGy-2.45 Å; b) 0.20 MGy-2.1 Å; c) 0.263 MGy-2.2 Å; d) 1.31 MGy-2.2 Å; e) 2.09 MGy-2.2 Å; f) 2.89 MGy-2.2 Å. Muestran el proceso de reducción inducida por rayos X en los sitios activos del tetrámero. Los monómeros A, B, C y D de cada estructura aparecen ordenados de izquierda a derecha, a 0.20 MGy el ...

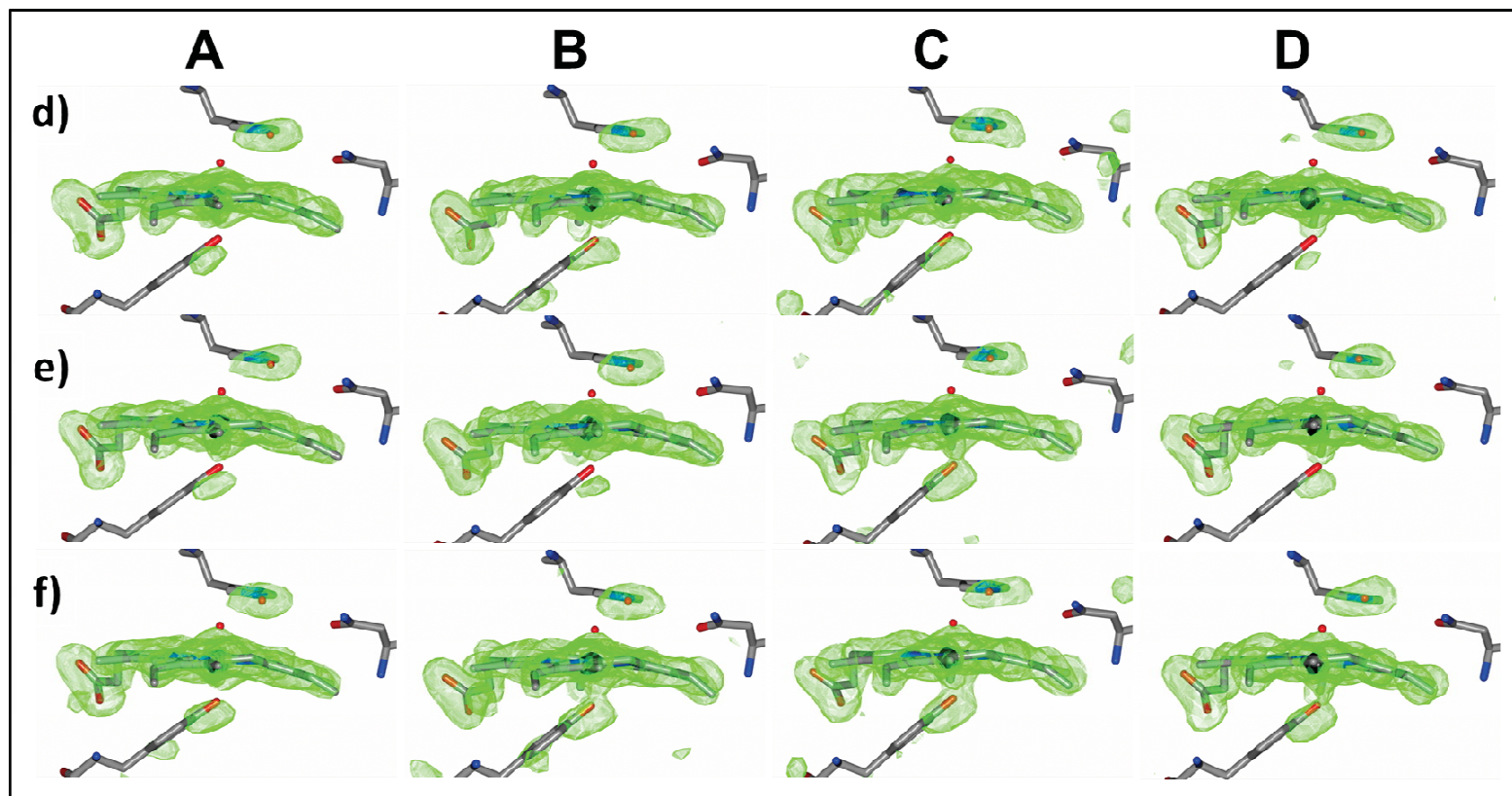


Figura 24 (Continuación). Reducción diferencial del compuesto I en mapas de omisión. ...compuesto I del monómero A es el primero en que disminuye el pico positivo en el mapa en las coordenadas del oxígeno a 1.74 Å del hierro del hemo, seguido de los monómeros B y C, finalmente D es el último monómero en reducirse como se observa en el panel b). Los mapas de omisión se presentan a 3.5 σ en verde.

ácido peracético. Hay un caso de reducción diferencial reportado para la enzima R2F (ribonucleótido reductasa) de *Corynebacterium ammoniagenes*.

Esta enzima es un homotetrámero que posee 2 hierros en cada sitio activo. En dicho trabajo se mostró que los sitios más susceptibles a la reducción correlacionan con los que son más accesibles en el remojo de una apo-proteína con una solución con iones Fe^{2+} . Lo anterior sugiere una componente de difusión en el proceso de reducción. A temperaturas inferiores a 110 K la única especie móvil en el cristal es el electrón solvatado [59]. Se analizó si esta podría ser la causa del comportamiento de la CAT-3, sin embargo en la estructura de la CAT-3 en el grupo espacial $P2_12_12_1$, cuando se analizan los contactos de cada monómero entre las copias, no se encuentra un patrón que explique la reducción diferencial en el cristal. El monómero D tiene una superficie de contacto de 493 \AA^2 , A 460.5 \AA^2 , B 741.4 \AA^2 y C 898.5 \AA^2 (tabla de contactos en Apéndice C), sin que en ninguno de ellos el acceso desde la superficie al canal principal esté bloqueado por alguno de los contactos. Si la enzima tuviese el comportamiento descrito para R2F, se esperaría que A y D tuvieran los mismos valores de ocupación o se redujeran a la misma dosis.

En la estructura 3ZJ5 (estado férrico) el monómero B es el único con dos moléculas de agua, esto pareciera contradecir la evidencia de una reducción más lenta en el monómero D, aunque la estructura 3EJ6 (también en estado férrico) coincide con los resultados de los experimentos cristalográficos realizados para cristales del compuesto I presentados aquí. La densidad electrónica de la segunda molécula de agua W0 podría explicarse por una movilidad incrementada de la molécula W1, la molécula W0 se modeló a 3.1 \AA que claramente no es la posición identificada para el intermediario férrico, considerando que las imágenes de difracción que permitieron obtener los *datasets* compuestos provienen de 10 cristales, puede decirse que hay una población significativa que respalda la hipótesis de una mayor resistencia del monómero D a la reducción.

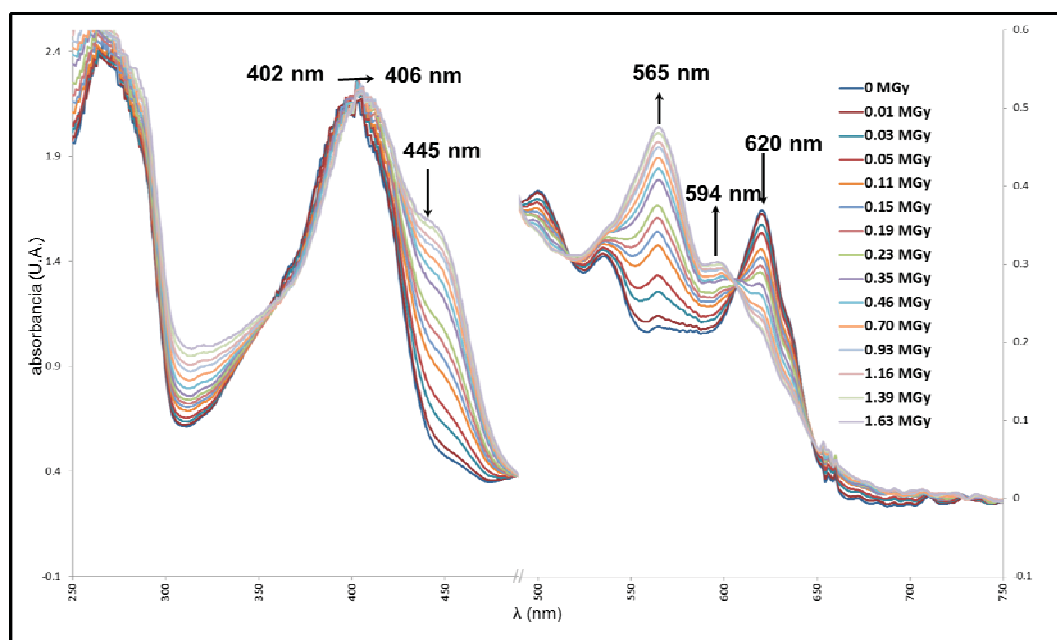


Figura 25. Espectroscopía UV-visible de la reducción del estado férrico. La gráfica muestra la presencia del pico en la banda de transferencia de carga para el estado férrico a 620 nm al principio de la colecta, conforme incrementa la dosis se observa el incremento en la intensidad de un pico en 565 nm correspondiente, probablemente al estado ferroso. Al mismo tiempo se observa el incremento en un hombro a 594 nm. La banda Soret que al inicio de la colecta está en 402 nm se desplaza hacia 406 nm y se registra la aparición de un hombro a 445 nm. El pico de 500 nm disminuye y mientras el de 535 nm aparece como un hombro del pico en 565 nm ambos son característicos del estado férrico

La confirmación de la hipótesis de daño diferencial se demuestra cuando se colectan cristales de la enzima en estado férrico, soportado por la identificación de exactamente los mismos picos entre el espectro del estado férrico obtenido en solución y el obtenido de un cristal no expuesto a los rayos X (figura 25), mostrando que después de la colecta de un *dataset* los monómeros A, B y C presentan solo la molécula de agua W1 en el sitio activo mientras D aún tiene las dos moléculas W0 y W1. Esto puede corroborarse con los cambios en el espectro de absorbancia UV-visible al inicio de la colecta de un cristal en estado de reposo (férrico) se observan los mismos picos que en la proteína en solución. Aunque la banda Soret está claramente en 402 nm y el pico de 496 nm aparece en 500 nm los picos de 535 nm y 620 nm se observan exactamente en la misma posición. Después de la exposición a los rayos X mientras el pico a 620 nm decae,

incrementa un pico principal en 565 nm con un hombro en 594 nm, al mismo tiempo que hay un ligero desplazamiento en la banda de Soret de 402 nm a 406 nm con un hombro en 445 nm. La intensidad en el pico de 500 nm disminuye y el pico de 535 nm se observa como un hombro en el pico de 565 nm.

Aunque en catalasas no se ha descrito hasta ahora la presencia de un estado ferroso, la comparación del espectro reducido con los descritos para el estado ferroso en lactoperoxidasa de bovino confirma la presencia de un pico en 561 nm y otro en 593 nm [60]. Mientras en mioglobina de caballo el estado ferroso, que tiene vacante el sexto sitio de coordinación muestra un pico aproximadamente en 565 nm [61], se ha descrito también para la Mb un estado acuoferroso con picos en 568 nm y 530 nm. Aunque en los espectros de la CAT-3 no se observa el pico a 530 nm, ni la molécula de agua a 2.3 Å del hierro, al menos no al mismo tiempo en los 4 monómeros.

CONCLUSIONES

El uso en la cristalografía de *datasets* compuestos y la atenuación de la dosis permitió obtener información estructural de la CAT-3 que no sería posible con la cristalografía tradicional.

La reducción de los sitios activos de la CAT-3 ocurrió de forma diferencial y ordenada. El monómero D es el menos susceptible a la reducción, independientemente del estado de oxidación inicial de la colecta.

El compuesto I de la CAT-3 exhibe una resistencia similar a la reportada para la Mb de caballo de 0.2 MGy. No hay evidencia suficiente para comparar la sensibilidad de CAT-3 a la reducción por rayos X contra otras LSC.

La reducción del compuesto I inducida por rayos X conduce a la formación de al menos un intermediario más, no descrito previamente para esta enzima. El estado del sitio activo en el que el sexto sitio de coordinación está vacío pertenece al estado ferroso.

PERSPECTIVAS

1. Analizar el efecto de periodos prolongados de incubación en ácido peracético, para incrementar la población del compuesto I en el cristal, probar crioprotectores que permitan un periodo de incubación mayor.
2. Analizar el efecto que la organización de la matriz cristalina tiene en la ocupación del compuesto I durante el remojo de los cristales, incubando cristales de los otros grupos espaciales P1 y P4₃2₁2 y colectando espectros de absorbancia UV-visible de estos.
3. Realizar los experimentos de obtención del compuesto I y reducción con rayos X en solución para determinar la contribución del estado férrico en los espectros de absorbancia.

REFERENCIAS

- [1] A. Díaz, V.-J. Valdés, E. Rudiño-Piñera, E. Horjales, and W. Hansberg, "Structure-function relationships in fungal large-subunit catalases.," *Journal of molecular biology*, vol. 386, no. 1, pp. 218–32, Feb. 2009.
- [2] P. Chelikani, I. Fita, and P. C. Loewen, "Diversity of structures and properties among catalases.," *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 61, no. 2, pp. 192–208, Jan. 2004.
- [3] M. G. Klotz, G. R. Klassen, and P. C. Loewen, "Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases.," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 14, no. 9, pp. 951–8, Sep. 1997.
- [4] K. G. Welinder, "Bacterial catalase-peroxidases are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1080, no. 3, pp. 215–20, Nov. 1991.
- [5] V. V. Barynin, M. M. Whittaker, S. V. Antonyuk, V. S. Lamzin, P. M. Harrison, P. J. Artymiuk, and J. W. Whittaker, "Crystal structure of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*.," *Structure*, vol. 9, no. 8, pp. 725–38, Aug. 2001.
- [6] P. Andreoletti, A. Pernoud, G. Sainz, P. Gouet, and H. M. Jouve, "Structural studies of *Proteus mirabilis* catalase in its ground state, oxidized state and in complex with formic acid," *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, vol. 59, no. 12, pp. 2163–2168, Nov. 2003.
- [7] O. M. Lardinois, "Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide.," *Free radical research*, vol. 22, no. 3, pp. 251–74, Mar. 1995.
- [8] O. M. Lardinois, M. M. Mestdagh, and P. G. Rouxhet, "Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1295, no. 2, pp. 222–238, Jul. 1996.
- [9] A. Díaz, R. a Muñoz-Clares, P. Rangel, V.-J. Valdés, and W. Hansberg, "Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen.," *Biochimie*, vol. 87, no. 2, pp. 205–14, Feb. 2005.
- [10] J. Switala and P. C. Loewen, "Diversity of properties among catalases.," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 401, no. 2, pp. 145–54, May 2002.
- [11] A. Díaz, E. Horjales, E. Rudiño-Piñera, R. Arreola, and W. Hansberg, "Unusual Cys-Tyr covalent bond in a large catalase.," *Journal of molecular biology*, vol. 342, no. 3, pp. 971–85, Sep. 2004.
- [12] S. Michán, F. Lledías, J. D. Baldwin, D. O. Natvig, and W. Hansberg, "Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases.," *Free radical biology & medicine*, vol. 33, no. 4, pp. 521–32, Aug. 2002.
- [13] S. Michán, F. Lledías, and W. Hansberg, "Asexual development is increased in *Neurospora crassa* cat-3-null mutant strains.," *Eukaryotic Cell*, vol. 2, no. 4, pp. 798–808, 2003.
- [14] C. D. Putnam, a S. Arvai, Y. Bourne, and J. a Tainer, "Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism.," *Journal of molecular biology*, vol. 296, no. 1, pp. 295–309, Feb. 2000.
- [15] V. Jha, P. Chelikani, X. Carpena, I. Fita, and P. C. Loewen, "Influence of main channel structure on H₂O(2) access to the heme cavity of catalase KatE of *Escherichia coli*.," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 526, no. 1, pp. 54–9, Oct. 2012.

- [16] W. Hansberg, R. Salas-Lizana, and L. Domínguez, "Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure.," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 525, no. 2, pp. 170–80, Sep. 2012.
- [17] M. Alfonso-Prieto, A. Borovik, X. Carpena, G. Murshudov, W. Melik-Adamyán, I. Fita, C. Rovira, and P. C. Loewen, "The structures and electronic configuration of compound I intermediates of *Helicobacter pylori* and *Penicillium vitale* catalases determined by X-ray crystallography and QM/MM density functional theory calculations.," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, no. 14, pp. 4193–205, Apr. 2007.
- [18] P. Gouet, H. M. Jouve, P. A. Williams, I. Andersson, P. Andreoletti, L. Nussaume, and J. Hajdu, "Ferryl intermediates of catalase captured by time resolved Weissenberg crystallography and UV-vis spectroscopy," *Nature Structural Biology*, vol. 3, no. 11, pp. 951 – 956, 1996.
- [19] a Hillar, P. Nicholls, J. Switala, and P. C. Loewen, "NADPH binding and control of catalase compound II formation: comparison of bovine, yeast, and *Escherichia coli* enzymes.," *The Biochemical journal*, vol. 300 (Pt 2, pp. 531–9, Jun. 1994.
- [20] O. Lardinois and P. Rouxhet, "Characterization of hydrogen peroxide and superoxide degrading pathways of *Aspergillus niger* catalase: a steady-state analysis," *Free radical research*, vol. 20, no. 1, pp. 29–50, 1994.
- [21] Y. Yuzugullu, C. H. Trinh, M. a Smith, A. R. Pearson, S. E. V Phillips, D. Sutay Kocabas, U. Bakir, Z. B. Ogel, and M. J. McPherson, "Structure, recombinant expression and mutagenesis studies of the catalase with oxidase activity from *Scytalidium thermophilum*," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 69, no. Pt 3, pp. 398–408, Mar. 2013.
- [22] Y. S. Kim, S. M. Kim, and S. Han, "Nitric Oxide Converts Catalase Compounds II and III to Ferricatalase," *Notes*, vol. 23, no. 11, pp. 1664–1666, 2002.
- [23] C. Obinger, M. Maj, P. Nicholls, and P. Loewen, "Activity, peroxide compound formation, and heme d synthesis in *Escherichia coli* HP11 catalase.," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 342, no. 1, pp. 58–67, Jun. 1997.
- [24] F. Lledías, P. Rangel, and W. Hansberg, "Oxidation of catalase by singlet oxygen.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 17, pp. 10630–7, Apr. 1998.
- [25] P. Chelikani, X. Carpena, R. Perez-Luque, L. J. Donald, H. W. Duckworth, J. Switala, I. Fita, and P. C. Loewen, "Characterization of a large subunit catalase truncated by proteolytic cleavage.," *Biochemistry*, vol. 44, no. 15, pp. 5597–605, Apr. 2005.
- [26] D. DeLuca, R. Dennis, and W. Smith, "Inactivation of an animal and a fungal catalase by hydrogen peroxide," *Archives of biochemistry and biophysics*, 1995.
- [27] G. N. Murshudov, A. I. Grebenko, J. a. Brannigan, A. a. Antson, V. V. Barynin, G. G. Dodson, Z. Dauter, K. S. Wilson, and W. R. Melik-Adamyán, "The structures of *Micrococcus lysodeikticus* catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex," *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, vol. 58, no. 12, pp. 1972–1982, Nov. 2002.
- [28] H.-P. Hersleth, U. Ryde, P. Rydberg, C. H. Görbitz, and K. K. Andersson, "Structures of the high-valent metal-ion haem-oxygen intermediates in peroxidases, oxygenases and catalases.," *Journal of inorganic biochemistry*, vol. 100, no. 4, pp. 460–76, Apr. 2006.
- [29] G. I. Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szöke, A. Henriksen, and J. Hajdu, "The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution.," *Nature*, vol. 417, no. 6887, pp. 463–8, May 2002.

- [30] H.-P. Hersleth and K. K. Andersson, "How different oxidation states of crystalline myoglobin are influenced by X-rays.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1814, no. 6, pp. 785–96, Jun. 2011.
- [31] J. W. Murray, E. Rudiño-Piñera, R. L. Owen, M. Grninger, R. B. G. Ravelli, and E. F. Garman, "Parameters affecting the X-ray dose absorbed by macromolecular crystals.," *Journal of synchrotron radiation*, vol. 12, no. Pt 3, pp. 268–75, May 2005.
- [32] R. Henderson, "Cryo-protection of protein crystals against radiation damage in electron and X-ray diffraction," *Proceedings of the Royal Society of ...*, vol. 241, no. 1300, pp. 6–8, 1990.
- [33] R. Henderson, "The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules," *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 28, no. 02, pp. 171–193, 1995.
- [34] A. Hiroki, S. M. Pimblott, and J. a. LaVerne, "Hydrogen Peroxide Production in the Radiolysis of Water with High Radical Scavenger Concentrations," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 106, no. 40, pp. 9352–9358, Oct. 2002.
- [35] E. De la Mora, I. Carmichael, and E. F. Garman, "Effective scavenging at cryotemperatures: further increasing the dose tolerance of protein crystals.," *Journal of synchrotron radiation*, vol. 18, no. Pt 3, pp. 346–57, May 2011.
- [36] E. De la Mora, J. E. Lovett, C. F. Blanford, E. F. Garman, B. Valderrama, and E. Rudino-Pinera, "Structural changes caused by radiation-induced reduction and radiolysis: the effect of X-ray absorbed dose in a fungal multicopper oxidase.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 68, no. Pt 5, pp. 564–77, May 2012.
- [37] J. McGeehan, R. B. G. Ravelli, J. W. Murray, R. L. Owen, F. Cipriani, S. McSweeney, M. Weik, and E. F. Garman, "Colouring cryo-cooled crystals: online microspectrophotometry.," *Journal of synchrotron radiation*, vol. 16, no. Pt 2, pp. 163–72, Mar. 2009.
- [38] J. Colletier, D. Bourgeois, B. Sanson, D. Fournier, J. L. Sussman, I. Silman, and M. Weik, "Shoot-and-Trap : Use of specific x-ray damage temperature-controlled cryo-crystallography," 2008.
- [39] A. Gumiero, C. L. Metcalfe, A. R. Pearson, E. L. Raven, and P. C. E. Moody, "Nature of the ferryl heme in Compounds I and II.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 20, pp. 18344–18344, May 2011.
- [40] C. M. Wilmot, T. Sjögren, G. H. Carlsson, G. I. Berglund, and J. Hajdu, "Defining redox state of X-ray crystal structures by single-crystal ultraviolet-visible microspectrophotometry.," *Methods in enzymology*, vol. 353, no. 2000, pp. 301–18, Jan. 2002.
- [41] X. Carpena, M. Soriano, M. G. Klotz, H. W. Duckworth, L. J. Donald, W. Melik-Adamyán, I. Fita, and P. C. Loewen, "Structure of the Clade 1 catalase, CatF of *Pseudomonas syringae*, at 1.8 Å resolution.," *Proteins*, vol. 50, no. 3, pp. 423–36, Feb. 2003.
- [42] P. V. Konarev, M. V. Petoukhov, V. V. Volkov, and D. I. Svergun, "ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 39, no. 2, pp. 277–286, Mar. 2006.
- [43] G. David and J. Pérez, "Combined sampler robot and high-performance liquid chromatography: a fully automated system for biological small-angle X-ray scattering experiments at the Synchrotron SOLEIL SWING beamline," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 42, no. 5, pp. 892–900, Sep. 2009.

- [44] D. Schneidman-Duhovny, M. Hammel, and A. Sali, "FoXS: a web server for rapid computation and fitting of SAXS profiles.," *Nucleic acids research*, vol. 38, no. Web Server issue, pp. W540–4, Jul. 2010.
- [45] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin, "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.," *Journal of computational chemistry*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–12, Oct. 2004.
- [46] N. E. Chayen, "Comparative Studies of Protein Crystallization by Vapour-Diffusion and Microbatch Techniques," *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, vol. 54, no. 1, pp. 8–15, Jan. 1998.
- [47] R. L. Owen, J. M. Holton, and C. Schulze-briese, "Determination of X-ray flux using silicon pin diodes," no. X, pp. 143–151, 2008.
- [48] W. Kabsch, "Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 66, no. Pt 2, pp. 133–44, Feb. 2010.
- [49] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, and R. J. Read, "Phaser crystallographic software.," *Journal of applied crystallography*, vol. 40, no. Pt 4, pp. 658–674, Aug. 2007.
- [50] G. N. Murshudov, a a Vagin, and E. J. Dodson, "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 53, no. Pt 3, pp. 240–55, May 1997.
- [51] P. V Afonine, R. W. Grosse-Kunstleve, N. Echols, J. J. Headd, N. W. Moriarty, M. Mustyakimov, T. C. Terwilliger, A. Urzhumtsev, P. H. Zwart, and P. D. Adams, "Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 68, no. Pt 4, pp. 352–67, Apr. 2012.
- [52] V. B. Chen, W. B. Arendall, J. J. Headd, D. a Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson, and D. C. Richardson, "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 66, no. Pt 1, pp. 12–21, Jan. 2010.
- [53] A. Leslie and H. Powell, "Processing Diffraction Data with Mosflm," in *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*, 2007, pp. 41–51.
- [54] P. Evans, "Scaling and assessment of data quality.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 62, no. Pt 1, pp. 72–82, Jan. 2006.
- [55] E. Blanc, P. Roversi, C. Vonrhein, C. Flensburg, S. M. Lea, and G. Bricogne, "Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 60, no. Pt 12 Pt 1, pp. 2210–21, Dec. 2004.
- [56] E. Gasteiger, M. R. Wilkins, A. Bairoch, J. C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel, and D. F. Hochstrasser, "Protein identification and analysis tools on the ExPASy server.," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 112, pp. 531–52, Jan. 2005.
- [57] L. Domínguez, A. Sosa-Peinado, and W. Hansberg, "Catalase evolved to concentrate H₂O₂ at its active site.," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 500, no. 1, pp. 82–91, Aug. 2010.
- [58] W. Melik-Adamyan, J. Bravo, X. Carpena, J. Switala, M. J. Maté, I. Fita, and P. C. Loewen, "Substrate flow in catalases deduced from the crystal structures of active site variants of HPII from *Escherichia coli*.," *Proteins*, vol. 44, no. 3, pp. 270–81, Aug. 2001.

- [59] J. J. Griese and M. Högbom, "X-ray reduction correlates with soaking accessibility as judged from four non-crystallographically related diiron sites.," *Metallomics : integrated biometal science*, vol. 4, no. 9, pp. 894–8, Aug. 2012.
- [60] W. Jantschko, P. G. Furtmüller, M. Zederbauer, K. Neugschwandtner, C. Jakopitsch, and C. Obinger, "Reaction of ferrous lactoperoxidase with hydrogen peroxide and dioxygen: an anaerobic stopped-flow study.," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 434, no. 1, pp. 51–9, Feb. 2005.
- [61] K. Nienhaus and G. U. Nienhaus, "Probing heme protein-ligand interactions by UV/visible absorption spectroscopy.," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 305, pp. 215–42, Jan. 2005.

Apéndice A

Secuencia completa de la proteína recombinante CAT-3

La secuencia presentada corresponde al total de residuos codificados por la construcción pColdI-CAT-3 expresada en *E. coli* BL21 (DE3).

La secuencia en amarillo corresponde a los 27 residuos provenientes del vector pCold (conteniendo la etiqueta 6xHis).

La secuencia en azul corresponde a los 31 residuos reportados en la enzima purificada de *N. crassa* como señal de secreción.

La secuencia en verde corresponde a los residuos identificados durante la secuenciación de la proteína en el Laboratorio universitario de proteómica del IBT.

```

      10      20
MNHKVVHHHHH HIEGRHMELG TLEGSEF

      10      20      30      40      50      60
MRVNALLPLS GLIGTALAAC PFADPSALGR RAEGGEVDAR QRLKEVEVDD NGQFMTTDFG

      70      80      90      100     110     120
GNIEE QFSLR AGGRGSTLLE DFIFRQK LQH FDHERIPERV VHAR GAGAHG IFTSYGDWSN

      130     140     150     160     170     180
ITAASFLGAR DKQTPVVFVRF STVAGSRGSA DTAR DVHGFA THFYTDEGNF DIVGNNIPVF

      190     200     210     220     230     240
FIQDAIRFPD LIHSVKPSPD NEVPQAATAH DSAWDFSSQ PSALHTLFWA MSGNGIPRSY

      250     260     270     280     290     300
RHMDGFGIHT FRLVTEDGKS KLVKWHWKTG QGK AALVWEE AQVLAGKNAD FHRQDLWDAI

      310     320     330     340     350     360
ESGNAPSWEI AVQLIDEKKA QAYGFDLLDP TKFLPEEFAP LQVLGEMTLN RNPMMYFAEL

      370     380     390     400     410     420
EQISFQPGHI VRGVDFTEDP LLQGRLYSYL DTQLNRHRGP NFEQLPINRP VSGVHNNHRD

      430     440     450     460     470     480
GQGQAWIHKN IHHYSPSYLN KGYPAAQANT VGRGFFTTPG RTASGVLNRE LSATFDDHYT

      490     500     510     520     530     540
OPRLFFNSLT PVEQQFVINA IRFEASHVTN EQVK KNVLEQ LNK ISNDVAK RVAVALGLEA

      550     560     570     580     590     600
POPDPTYHNN NVTRGVSIFN ESLPTIATLR VGVLSSTKGG SLDKAKALKE QLE KDGLKVT

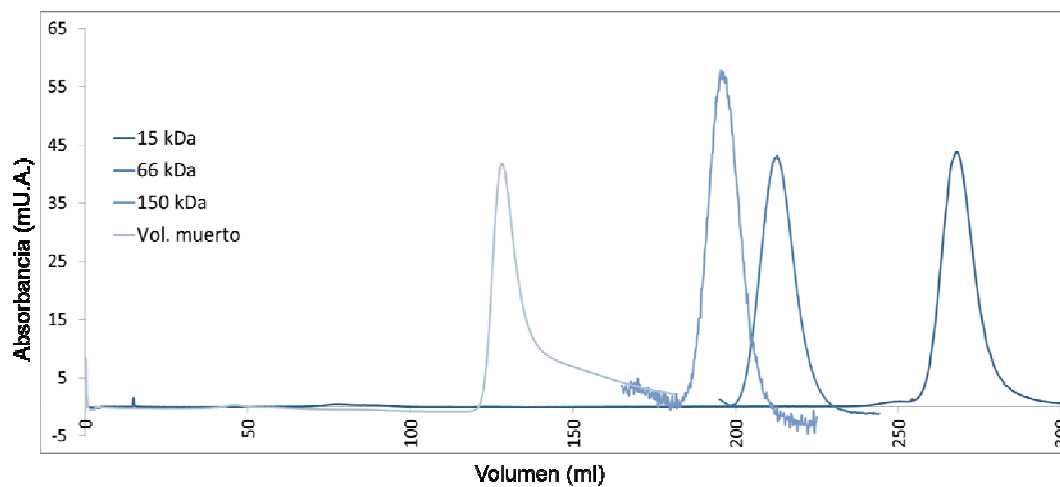
      610     620     630     640     650     660
VIAEY LASGV DQTYSAADAT AFDVVVAEG AERVFSGKGA MSPLFPAGRQ SQILTDGYRW

      670     680     690     700     710
GKPVAAVGS A KKAQSIGVE EKEAGVYAGA QDEVIKGVEE GLKVFKFLER FAVDGDDEE

```

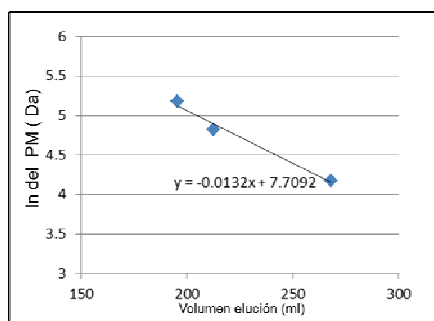

Apéndice B

Calibración de la columna superdex 200



Los marcadores utilizados se presentan en la siguiente tabla, cada marcador se corrió a un flujo de 3 ml/min y una presión de 0.11 MPa.

Marcador	Peso molecular	Volumen de elución
Citocromo C	15 kDa	268 ml
Albúmina	66 kDa	212.5 ml
Alcohol deshidrogenasa	150 kDa	195.5 ml
Dextrano azul	2000 kDa	128 ml (Volumen muerto)



Apéndice C

Área de superficie de contacto (\AA^2) entre la unidad asimétrica y sus copias en P1 (PDB 3ZJ4), P2₁2₁2₁ (PDB 3ZJ5) y P4₃2₁2 (PDB 4BIM).

P1

x,y,z	x, y, z	x-1, y+1, z	x,y,z-1	x-1, y, z	x, y-1, z	x-1, y, z+1	x, y-1, z+1
A	B/2094.4 C/4792.4 D/5437.1	A/0.3				B/25.1 C/2.9	B/11.8 C/4.7
B	A/2094.4 C/5429.5 D/4823.0		A/186.9		C/152.4		
C	A/4792.4 B/5429.4 D/2084.3	A/2.2, B/55.3					
D	A/5437.1 B/4823.0 C/2084.3	A/372.6 D/2.9		A/184.9 C/63.9		B/5.4 C/53.8	

P2₁2₁2₁

x, y, z	x, y, z	-x-1/2, -y, z-1/2	-x, y-1/2, -z+1/2	x-1,y,z	x-1/2, -y-1/2,-z+1	-x+1/2,-y,z-1/2
A	B/2055.7 C/4721.8 D/5440.6		D/149.3			
B	A/2055.7C/ 5395.5 D/4731.9		D/3.8	A/56.4 D/22.4	A/78.1	
C	A/4721.8B/ 5395.5D/20 66.5	B/580.7	D/209.3	A/108.5		
D	A/5440.6B/ 4731.9 C/2066.5					A/68.2

P₄₃₂₁₂

x, y, z	x, y, z	-y, -x, -z +1/2	-y -1/2, x-1/2, z+3/4	-y-1/2, x-1/2, z-1/4	x, y, z-1
A	B/5553.1 C/260.6	A/2907.8	C/330 D/208.4		
B	A/5553.1 C/640.2 D/243.7	A/4911.9 B/2127.7	C/245.8	A/412.6	
C	A/260.6 B/640.2 D/5648.7	C/1753 A/535.1		A/11.5	
D	B/243.7 C/5648.7	C/4585.1 D/1814.1		A/201.0 B/28.9 C/102.2 D/9.3	A/35.7