



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

REDUCCIÓN DEL SITIO ACTIVO DE CATALASAS DE SUBUNIDADES PEQUEÑAS  
MEDIANTE RAYOS X

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Osvaldo Gómez Secundino

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Rudiño Piñera  
[Instituto de Biotecnología - UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Lilian González Segura  
[Facultad de Química - UNAM](#)

Dra. Adela Rodríguez Romero  
[Instituto de Química - UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos Septiembre 2016



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.

## **Jurado**

Presidente	Dra. Gloria Saab Rincón (IBT-UNAM)
Secretario	Dr. José Fernando Lledias Martínez (IBT-UNAM)
Vocal	Dr. Carlos Amero Tello (CIQ-UAEMor)
Vocal	Dra. Lidia Riaño Umbarila (IBT-UNAM)
Vocal	Dra. Carmen Nina Pastor Colón (CIDC-UAEMor)

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Estructural del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El proyecto contó con el apoyo de los donativos CONACyT (204639) y PAPIIT (IN209114). El estudiante contó con beca otorgada por el CONACyT (308492).

## ***DEDICATORIA***

A mis padres, Sergio y Minerva. Por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Minerva, Sergio y Leonardo. Por todos los momentos agradables que hemos vivido.

A mi sobrina Ximena, por todas sus ocurrencias, cantos y bailes.

A todos mis familiares y amigos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Enrique Rudiño, por brindarme la oportunidad de trabajar en su muy agradable laboratorio y también por su gran calidad humana.

A las Dras. Lilian González Segura y Adela Rodríguez Romero, miembros del comité tutorial, por todas sus valiosas aportaciones.

A los miembros de mi jurado de examen: Dra. Gloria Saab Rincón, Dr. José Fernando Lledias Martínez, Dr. Carlos Amero Tello, Dra. Lidia Riaño Umbarila y Dra. Carmen Nina Pastor Colón. Por la revisión exhaustiva de este trabajo.

A la técnico académico Biol. Sonia Rojas, por su arduo trabajo y dedicación. También por todo su apoyo amable y cariñoso. De igual manera a la auxiliar de laboratorio Mariana Ortiz y a la laboratorista Aurelia Ocampo.

A mis compañeros de laboratorio César, Adelaida, Víctor Rivelino, Claudia, Rayana, Yasel, Adam, Ariadna Berenice, Francisco Murphy, Antony, Víctor Hugo, Arisbeth, Elena Lizbeth, Nizaa, Jesús Lara, Beatriz, Ricardo, Rubén, Santos y Edith.

A la Unidad de Docencia del IBT-UNAM: Lic. J. Antonio Bolaños Guillen y Gloria Villa Herrera.

A mis compañeros de maestría, especialmente a Alma, Ángel, Wendy, Laura, Emma, Daniela, Carolina y Daniel.

A mis amigos: Ángel, Yareli, Walter, Iraís, Alejandro, Ever, Anayeli, Anahí, Olaf, Alexis, Lilia, Héctor, Joaquín, Gustavo, Verónica, Francisco y Antonio.

A A.G.T., por todo su apoyo, coraje y cariño.

A todo el Instituto de Biotecnología, por su gran ambiente de trabajo y oportunidades de superación.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>Índice general</b> .....	<b>3</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>5</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>6</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>7</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>12</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>13</b>
La cristalización de proteínas como una herramienta para conocer mecanismos moleculares .....	<b>18</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>18</b>
Efecto de los rayos X en los cristales de proteína .....	<b>18</b>
Uso del daño por radiación como herramienta para obtener información adicional de una metaloproteína .....	<b>19</b>
Reducción inducida por rayos X en el sitio activo de la catalasa 3 de <i>Neurospora crassa</i> , una catalasa de subunidades grandes .....	<b>22</b>
La catalasa de hígado bovino, una catalasa de subunidades pequeñas .....	<b>26</b>
Cristalización de la catalasa de hígado bovino .....	<b>28</b>
Mecanismo catalítico de la catalasa de hígado bovino .....	<b>29</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>32</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>32</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>32</b>
Pureza de la enzima .....	<b>32</b>
Cristalización .....	<b>33</b>
Obtención del mayor estado de oxidación de los sitios activos de la enzima .....	<b>35</b>

Colecta de datos .....	36
Procesamiento de datos .....	36
<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>37</b>
Pureza de la enzima .....	37
Cristalización .....	42
Procesamiento de datos .....	45
Microespectrofotometría UV-Vis .....	54
Consideraciones generales .....	56
Pruebas preliminares de la catalasa de eritrocitos humanos.....	57
<b>Conclusiones .....</b>	<b>62</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>62</b>
<b>Glosario .....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO A</b> Sitios activos de la BLC probando diferentes parámetros .....	<b>67</b>
<b>ANEXO B</b> Parámetros utilizados en los cálculos con RADDPOSE-3D .....	<b>73</b>
<b>ANEXO C</b> Equipo de microespectrofotometría UV-Vis de la línea 11-1 del SSRL .....	<b>74</b>
<b>ANEXO D</b> Comparación estructural entre BLC y HEC .....	<b>75</b>
<b>ANEXO E</b> Contactos cristalográficos de BLC .....	<b>77</b>
<b>ANEXO F</b> Colecta de datos en múltiples cristales .....	<b>78</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>80</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>BLC</b>	<b>Catalasa de hígado bovino</b>
<b>HEC</b>	<b>Catalasa de eritrocitos humanos</b>
<b>SSRL</b>	<b>Stanford Synchrotron Radiation Lightsource</b>
<b>BNL - NSLS</b>	<b>Brookhaven National Laboratory – National Synchrotron Light Source</b>
<b>ANL - APS</b>	<b>Argonne National Laboratory - Advanced Photon Source</b>
<b>UV-Vis</b>	<b>Ultravioleta - Visible</b>
<b>NADP(H)</b>	<b>Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato</b>
<b>Gy</b>	<b>Gray</b>
<b>PEG</b>	<b>Polietilenglicol</b>
<b>SDS – PAGE</b>	<b>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</b>
<b>RPE</b>	<b>Resonancia Paramagnética Electrónica</b>
<b>PDB</b>	<b>Banco de Datos de Proteínas</b>

## LISTA DE TABLAS

**Página**

<b>Tabla 1.</b> _ Códigos de acceso y datos relevantes de las estructuras de catalasas y catalasas-peroxidasas depositadas en el PDB .....	<b>17</b>
<b>Tabla 2.</b> _ Las tres formas cristalinas de la catalasa de hígado bovino .....	<b>28</b>
<b>Tabla 3.</b> _ Matriz 1 para la cristalización de la catalasa de hígado bovino .....	<b>33</b>
<b>Tabla 4.</b> _ Matriz 2 y 3 para la cristalización de la catalasa de hígado bovino .....	<b>34</b>
<b>Tabla 5.</b> _ Matriz 4 y 5 para la cristalización de la catalasa de hígado bovino .....	<b>35</b>
<b>Tabla 6.</b> _ Matriz para la cristalización de la catalasa de eritrocitos humanos .....	<b>35</b>
<b>Tabla 7.</b> _ Morfología de los cristales de catalasa de hígado bovino crecidos en diferentes condiciones. Los últimos cristales corresponden a la catalasa de eritrocitos humanos .....	<b>44</b>
<b>Tabla 8.</b> _ Estadísticas de colecta de datos y afinamiento de las estructuras de catalasa de hígado bovino en estado de reposo y remojado en ácido peracético. Los datos en paréntesis corresponden a la faja de mayor resolución en cada caso .....	<b>53</b>
<b>Tabla 9.</b> _ Estadísticas de colecta de datos y afinamiento de la estructura de catalasa de eritrocitos humanos. Los datos en paréntesis corresponden a la faja de mayor resolución en cada caso .....	<b>59</b>
<b>Tabla 10.</b> _ Estadísticas de colecta de datos y afinamiento de las estructuras de catalasa de eritrocitos humanos de cristales remojados en solución de ácido peracético. Los datos en paréntesis corresponden a la faja de mayor resolución en cada caso .....	<b>61</b>



## LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.\_** Modelo sugerido por Vetrano y cols., el cual muestra las tres rutas catalíticas de las catalasas de mamíferos ..... 14
- Figura 2.\_** Catalasa 3 de *Neurospora crassa* (imagen de la izquierda) y la catalasa de hígado bovino (a la derecha), catalasas de subunidad grande y pequeña, respectivamente. Al lado de cada catalasa se muestra un esquema de cómo interaccionan dos monómeros de cada enzima. Nótese que la catalasa de subunidad grande posee un dominio extra (en verde) en comparación con la de subunidad pequeña ..... 14
- Figura 3.\_** Región hemo-NADP(H) de la catalasa de eritrocitos humanos, una catalasa de subunidad pequeña. Dicha representación puede ser extrapolable a cualquier catalasa de este tipo. Nótese la relativa exposición del grupo hemo al solvente mediada por un canal. En el caso de las catalasas de subunidad grande este canal es más largo, lo que reduce la exposición relativa al solvente del grupo prostético ..... 15
- Figura 4.\_** Electrones solvatados y otros radicales libres producto de la radiólisis del agua ..... 19
- Figura 5.\_** En la parte superior izquierda se puede apreciar la distribución de la dosis de radiación X absorbida como función del ángulo de rotación en cristales individuales y en la parte inferior se muestra la construcción de los grupos de datos de difracción compuestos. Estos datos de difracción compuestos representan estructuras que han recibido diferentes dosis de rayos X y que presentarán diferencias en el estado redox de su sitio activo ..... 20
- Figura 6.\_** Mecanismo propuesto por Berglund y colaboradores para la reducción de la peroxidasa de rábano picante. Los cuatro eventos de foto-reducción en el grupo prostético hemo permitieron la elucidación estructural de los compuestos III, I y II de los estados férrico y ferroso de la enzima ..... 21
- Figura 7.\_** Imagen cristalográfica del Compuesto I de la Peroxidasa de Rábano Picante a 1.57 Å de resolución. Código PDB 1HCH. El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1 y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5 ..... 21
- Figura 8.\_** A la izquierda, imagen de un cristal de Cat3 de *N. crassa* en estado férrico. Condiciones de cristalización: 1 µL de Cat3 6mg/mL, Hepes 10 mM pH 7, 1 µL de tartrato dibásico de amonio 0.2 M, PEG 3350 20% pH 6.5. A la derecha, la imagen de un cristal de Cat3 de *N. crassa* al formarse el “Compuesto I”. Para obtenerlo, los cristales en estado férrico se remojaron en una solución de ácido peracético 100 mM, PEG 400 40%, MES 100 mM pH 5.2 ..... 22

**Figura 9.**\_ Estructuras que muestran el proceso de reducción diferencial del “Compuesto I”: a) 0.165 MGy a 2.45 Å, b) 0.20 MGy a 2.1 Å, c) 0.263 MGy a 2.2 Å y d) 1.31 MGy a 2.2 Å. Los monómeros A, B, C, y D aparecen ordenados de izquierda a derecha. El mapa 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> aparece en 1 ..... 23

**Figura 10.**\_ Estructuras que muestran el proceso de reducción diferencial del “Compuesto I” en mapas de omisión a 3.5 Å : a) 0.165 MGy a 2.45 Å, b) 0.20 MGy a 2.1 Å, c) 0.263 MGy a 2.2 Å, d) 1.31 MGy a 2.2 Å, e) 2.09 MGy a 2.2 Å y f) 2.89 MGy a 2.2 Å. Los monómeros A, B, C y D aparecen ordenados de izquierda a derecha ..... 24

**Figura 11.**\_ Espectros de UV-Vis obtenidos durante el proceso de reducción de cristales de “Compuesto I” a diferentes dosis de rayos X. Se puede apreciar un desplazamiento de la banda de Soret (aproximadamente de 402 nm a 426 nm), así como cambios en los picos a 565 nm, 594 nm, 617 nm, 665 nm ..... 25

**Figura 12.**\_ En la imagen de la izquierda se muestra una subunidad de la catalasa de hígado bovino, en la cual se puede apreciar la localización del grupo hemo y el NADP(H) (Tomado de 19). En la imagen de la derecha se muestra el túnel de acceso al grupo hemo de 19.49 Å de longitud calculado mediante el programa MOLE 2.0. Asimismo, a manera de comparación se presenta en la imagen inferior, el túnel de acceso al sitio activo de la catalasa 3 de *N. crassa*, el cual cuenta con una longitud de 55.56 Å (También calculado con MOLE 2.0) ..... 27

**Figura 13.**\_ Diferentes estructuras cristalinas que muestra la catalasa de hígado bovino. De izquierda a derecha: Los prismas se obtuvieron por enfriamiento de la proteína en una solución alcalina de fosfatos. Las agujas se observaron mediante una solución de ácido fosfórico y sulfato de amonio. Las láminas se consiguieron por cristalización lenta en ácido fosfórico y una pequeña cantidad de sulfato de amonio ..... 28

**Figura 14.**\_ Posicionamiento de la primera molécula de peróxido de hidrógeno mediante los residuos catalíticos Histidina 75 y Asparagina 148 para la posterior formación del compuesto I en la catalasa de eritrocitos humanos ..... 29

**Figura 15.**\_ Formación del compuesto I en la catalasa de eritrocitos humanos ..... 30

**Figura 16.**\_ Reducción del compuesto I para volver al estado en reposo de la catalasa de eritrocitos humanos ..... 30

**Figura 17.**\_ Ciclo catalítico de catalasas que unen NADP(H) sugerido por Sicking y colaboradores. Este esquema supone la transferencia de dos electrones desde el NADPH hasta el grupo hemo en Compuesto I para así volver al estado basal e impedir la formación del compuesto II ..... 31

<b>Figura 18.</b> _ SDS-PAGE 8% del liofilizado de la catalasa de hígado bovino antes del paso de purificación. La banda más intensa alrededor de 60 kDa pertenece al monómero de la catalasa de hígado bovino. En los tres carriles se aplicó la misma muestra .....	<b>37</b>
<b>Figura 19.</b> _ Cromatograma de la columna de exclusión molecular. Se puede apreciar la presencia de un pequeño “hombro” del lado izquierdo del pico principal, motivo por el cual solamente se juntaron las fracciones 12-19 (en la parte central del pico de mayor intensidad) .....	<b>38</b>
<b>Figura 20.</b> _ SDS-PAGE 8% de las fracciones colectadas luego de la purificación. Como se puede observar, todavía se detecta la presencia de otras bandas debajo de la banda de 60 kDa .....	<b>38</b>
<b>Figura 21.</b> _ Cromatograma obtenido durante la purificación de la enzima mediante la columna de intercambio iónico .....	<b>39</b>
<b>Figura 22.</b> _ SDS-PAGE 10% de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de la enzima mediante la columna de intercambio iónico .....	<b>39</b>
<b>Figura 23.</b> _ Cromatograma obtenido luego del proceso de purificación de la enzima mediante la columna de exclusión molecular Sephacryl 300. No se obtiene un pico uniforme en el cromatograma, esto debido a posibles formas alternativas o estados de oligomerización de la enzima, al igual que lo reportado por Prakash y colaboradores <sup>39</sup> o impurezas .....	<b>40</b>
<b>Figura 24.</b> _ SDS-PAGE 10% de algunas fracciones colectadas luego de la purificación mediante la columna de exclusión molecular. La fracción 29 corresponde al “hombro” derecho del cromatograma y la fracción 24 se encuentra en medio de la señal más intensa .....	<b>40</b>
<b>Figura 25.</b> _ Análisis de la composición de la muestra de catalasa de hígado bovino mediante geles nativos e isoelectroenfoque. En el gel nativo se utilizó albúmina como proteína de referencia, la cual tiene una masa molecular de aproximadamente 66 kDa .....	<b>41</b>
<b>Figura 26.</b> _ Análisis de la muestra de catalasa mediante dispersión dinámica de luz en un equipo Zetazaiser nano SP de Malvern. La muestra se analizó sin ningún paso de purificación y se observó un solo pico alrededor de un tamaño de radio hidrodinámico de 5, correspondiente al tetrámero de la enzima .....	<b>42</b>
<b>Figura 27.</b> _ Cristales de la catalasa de hígado bovino obtenidos por el método de <i>batch</i> mediante las condiciones provistas por la Dra. Stojanoff (BNL-EEUU) .....	<b>42</b>
<b>Figura 28.</b> _ Equipo utilizado para las pruebas de cristalización en presencia de campos magnéticos. La bobina crea un campo magnético radial en donde la mayor intensidad se detecta en el centro de la circunferencia. Diagrama elaborado por la Dra. Rayana Ruiz Arellano .....	<b>45</b>
<b>Figura 29.</b> _ Formas II (A) y III (B) de cristales de catalasa de hígado bovino .....	<b>46</b>

**Figura 30.**\_ Se observó que el primer liofilizado de BLC de Sigma con el cual se trabajó, contenía NADP(H) unido a la enzima. En esta imagen se puede apreciar que el dinucleótido encaja adecuadamente con el mapa de densidad electrónica. Las ocupaciones correspondientes para cada monómero son: 0.91 para los monómeros A y B, 0.77 para el monómero C y 0.82 para el monómero D. El mapa  $2F_{obs} - F_{calc}$  se encuentra a 1  $\sigma$  y el mapa  $F_{obs} - F_{calc}$  a 3.5  $\sigma$  ..... 47

**Figura 31.**\_ Sitios activos de cristales de BLC en estado de reposo a 2.29 Å de resolución. El mapa  $2F_{obs} - F_{calc}$  se encuentra a 1  $\sigma$  y el mapa  $F_{obs} - F_{calc}$  a 3.5  $\sigma$  ..... 48

**Figura 32.**\_ Diagrama de la estrategia de colecta utilizada ..... 48

**Figura 33.**\_ Sitios activos de cristales de BLC remojados en ácido peracético a 2.3 Å de resolución. Para obtener esta estructura se utilizaron los 180 grados totales de la primera colecta. El mapa  $2F_{obs} - F_{calc}$  se encuentra a 1  $\sigma$  y el mapa  $F_{obs} - F_{calc}$  a 3.5  $\sigma$  ..... 49

**Figura 34.**\_ Esquema que representa los grados y segmento del cristal procesado para lograr estructuras con la menor dosis de radiación depositada posible ..... 50

**Figura 35.**\_ Sitios activos de cristales de BLC remojados en ácido peracético a 2.34 Å de resolución. Para obtener esta estructura se utilizaron solamente 90 grados de la primera colecta del mismo cristal. El mapa  $2F_{obs} - F_{calc}$  se encuentra a 1  $\sigma$  y el mapa  $F_{obs} - F_{calc}$  a 3.5  $\sigma$ . La dosis acumulada en el cristal fue de 0.02 MGy ..... 51

**Figura 36.**\_ Esquema que representa los grados y segmento procesados en la segunda colecta del mismo cristal para la obtención de estructuras con una dosis de radiación depositada mayor ..... 51

**Figura 37.**\_ Sitios activos de cristales de BLC remojados en ácido peracético a 2.48 Å de resolución. Para obtener esta estructura se utilizaron solamente 90 grados de la segunda colecta del mismo cristal. El mapa  $2F_{obs} - F_{calc}$  se encuentra a 1  $\sigma$  y el mapa  $F_{obs} - F_{calc}$  a 3.5  $\sigma$ . La dosis acumulada en el cristal fue de 0.09 MGy ..... 52

**Figura 38.**\_ Cambios observados en el sitio activo de la enzima en el monómero D a una resolución de 2.5 Å. El mapa  $2F_{obs} - F_{calc}$  se encuentra a 1  $\sigma$  y el mapa  $F_{obs} - F_{calc}$  a 3.5  $\sigma$ . La dosis acumulada en el cristal fue de 0.25 MGy ..... 53

**Figura 39.**\_ Cambios en el espectro UV-Vis de cristales de la catalasa de hígado bovino a dosis crecientes de rayos X (de 0 MGy a 1.467157 MGy) ..... 54

**Figura 40.**- Espectros de catalasa en solución reducidos con ditionita o por fotorreducción con lámpara de tungsteno. Modificado de 48. El primer espectro muestra la reducción del hierro a un estado de oxidación de +2 mediante fotorreducción de la catalasa en solución mediante una lámpara de tungsteno y el segundo ejemplo muestra el proceso de reducción inducido por ditionita ..... 55

**Figura 41.**\_ Imagen del túnel principal que conecta la superficie de la enzima con el sitio activo de las catalasas de hígado bovino y eritrocitos humanos.  
Obtenidos mediante el programa MOLE 2.0 ..... 57

**Figura 42.**\_ Sitios activos de la catalasa de eritrocitos humanos en condiciones nativas a 2.0 Å de resolución. El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1 y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5 ..... 58

**Figura 43.**\_ La catalasa de eritrocitos humanos presentaba NADP(H) unido a los monómeros A y C con ocupaciones de 1. Estructura a 2.0 Å de resolución. El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1 y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5 ..... 58

**Figura 44.**\_ Sitios activos de la catalasa de eritrocitos humanos luego del remojo de los cristales en la solución de ácido peracético a 2.29 Å de resolución. El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1 y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5 ..... 60

**Figura 45.**\_ Densidad positiva que aparece en una de las fenilalaninas cercanas al grupo hemo (marcada con rojo) en cristales de catalasa de eritrocitos humanos que han sido remojados en solución de ácido peracético a 2.29 Å de resolución.  
El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1 y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5 ..... 60

**Figura 46.**\_ Al cambiar la fenilalanina del modelo original por una tirosina, se puede apreciar que el mapa de densidad electrónica se ajusta adecuadamente (marcado con rojo). El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1 y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5 ..... 61

## RESUMEN

Las catalasas son oxidorreductasas presentes en la mayoría de los organismos aerobios y tienen la capacidad de degradar el peróxido de hidrógeno para producir agua y oxígeno. Dentro del ciclo catalítico de esta enzima, se forma un intermediario conocido como el compuesto I, el cual es un radical catiónico oxoporfirín de hierro +4. Este intermediario ha sido caracterizado por espectrometría y en algunos casos, por cristalografía de rayos X.

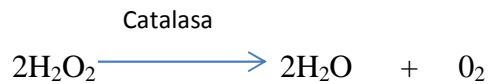
En el presente trabajo, hemos intentado obtener la estructura cristalográfica del compuesto I de la catalasa de hígado bovino y de la catalasa de eritrocitos humanos (ambas son catalasas de subunidades pequeñas). Además se analizaron mediante cristalografía los cambios en el sitio activo de estas enzimas producto de los rayos X y como herramienta complementaria se obtuvieron espectros UV-Vis de cristales de catalasa de hígado bovino.

Si bien, las imágenes del sitio activo son muy susceptibles a los cambios en resolución, integridad y segmento del cristal analizado durante el análisis de datos de difracción, se observó la presencia del compuesto I en la catalasa de hígado bovino y posteriormente se analizaron los flujos electrónicos cercanos al sitio activo, producto de los daños por radiación. También se observó mediante espectroscopía UV-Vis que los rayos X redujeron el hierro del grupo hemo en los cristales de enzima hasta un estado de oxidación de +2. Este efecto también ocurre en los ensayos de microespectrofotometría realizados previamente por el grupo durante el proceso de reducción de la Catalasa 3 de *Neurospora crassa*.

En cuanto a la catalasa de eritrocitos humanos, en las pruebas preliminares, no fue posible apreciar el compuesto I. Sin embargo, se observó en la estructura cristalográfica que una de las fenilalaninas cercanas al sitio activo se oxidó en una tirosina, producto del tratamiento de los cristales de proteína con ácido peracético.

## INTRODUCCIÓN

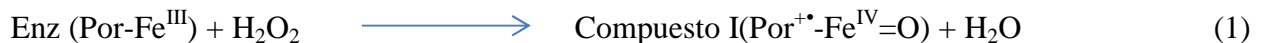
Las catalasas son enzimas antioxidantes que se encuentran presentes en la mayoría de los organismos aerobios, siendo una de las biomoléculas responsables de prevenir el daño oxidativo en las células, lo anterior al degradar el peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua y una de oxígeno<sup>1</sup> con una gran eficiencia mediante la siguiente reacción:



Estas enzimas se clasifican en tres grupos principales:

1. **Catalasas típicas o monofuncionales:** Clasificadas como E.C. 1.11.1.6 (oxidorreductasas). Poseen plegamientos casi idénticos entre ellas. Respecto a su organización cuaternaria, forman homotetrámeros con masas moleculares que oscilan entre 225 y 270 kDa. Presentan una meseta de actividad que va de pH 5 a 10 y pueden utilizar pequeños compuestos orgánicos como sustrato<sup>1,8</sup>.

El mecanismo de reacción común entre ellas consiste en la oxidación del hierro de su grupo hemo, originalmente en estado de reposo (ferricatalasa) mediante una primera molécula de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para formar un grupo oxiferril con un radical porfirín catiónico, llamado “compuesto I”<sup>1,5,67</sup>:



Posteriormente, el compuesto I oxida una segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y vuelve de esta manera a su estado de reposo:



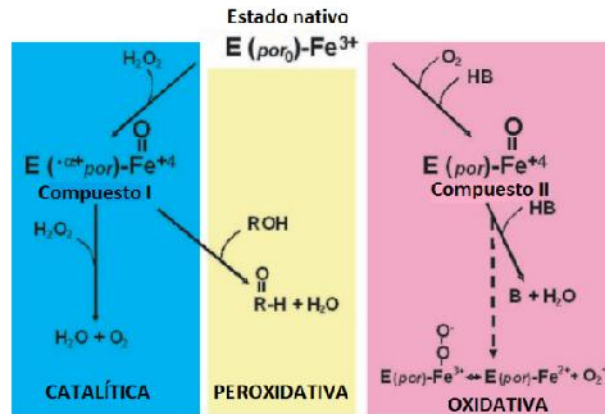
Otro estado de la catalasa, llamado “compuesto II” resulta de la reducción del compuesto I por un electrón:



Asimismo, las catalasas de mamíferos tienen habilidad limitada para actuar como peroxidasa. Un ejemplo de este proceso se puede apreciar durante la oxidación de etanol para formar acetaldehído<sup>1</sup>:

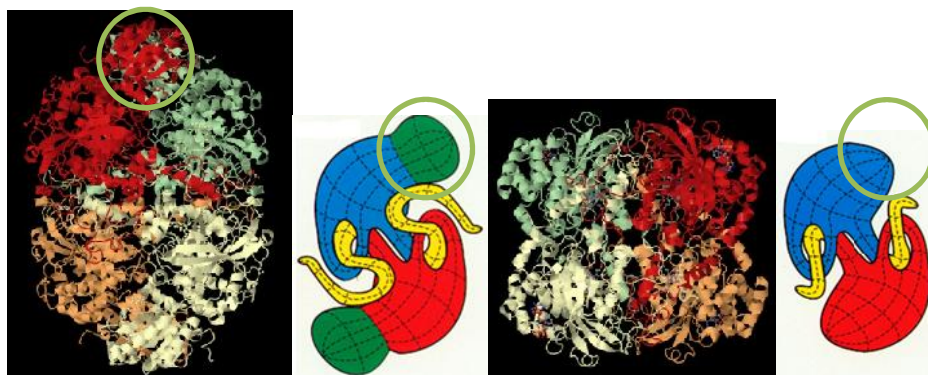


Cabe señalar, que en 2005 Vetrano y colaboradores sugirieron que las catalasas de mamíferos, las cuales pertenecen a este grupo, también poseen actividad oxidativa, además de la peroxidativa y catalítica ya reportadas anteriormente (Figura 1)<sup>2</sup>.



**Figura 1.** Modelo sugerido por Vetrano y cols., el cual muestra las tres rutas catalíticas de las catalasas de mamíferos. (Modificado de 2).

Basados en el tamaño de sus subunidades, las catalasas monofuncionales se subdividen en catalasas de subunidades pequeñas (55-60 kDa por subunidad) y en catalasas de subunidades grandes (75-86 kDa por subunidad). En la Figura 2 se aprecia la estructura tridimensional de una catalasa de cada grupo.

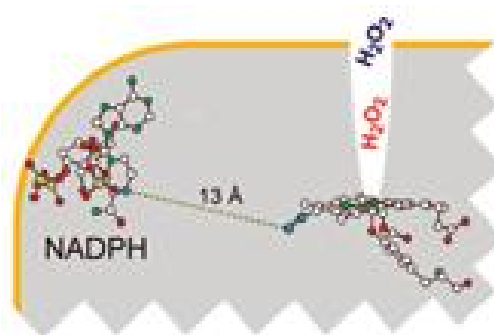


**Figura 2.** Catalasa 3 de *Neurospora crassa* (imagen de la izquierda) y la catalasa de hígado bovino (a la derecha), catalasas de subunidad grande y pequeña, respectivamente. Al lado de cada catalasa se muestra un esquema de cómo interaccionan dos monómeros de cada enzima. Nótese que la catalasa de subunidad grande posee un dominio extra (en verde) en comparación con la de subunidad pequeña<sup>67,68</sup>.



Basados en análisis filogenéticos también se pueden subdividir en tres grupos o clados<sup>9</sup>: aquellas catalasas de los clados 1 y 3 se encuentran en bacterias, hongos y animales, poseen subunidades pequeñas y un grupo prostético hemo tipo b. También presentan un sitio de unión al NADP(H) en cada una de sus subunidades (Figura 3), son sensibles a la desnaturalización y se inhiben o inactivan por su sustrato y por el 3-amino-1,2,4-triazol<sup>67</sup>, el cual se une a una histidina funcional en el sitio catalítico.

Por el contrario, aquellas que se encuentran en el clado 2 poseen subunidades grandes, un grupo prostético hemo tipo d o b, no unen NADP(H), son muy resistentes a la desnaturalización y a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno<sup>67</sup>, además se encuentran presentes solamente en bacterias y hongos.



**Figura 3.** Región hemo-NADP(H) de la catalasa de eritrocitos humanos, una catalasa de subunidad pequeña. Dicha representación puede ser extrapolable a cualquier catalasa de este tipo. Nótese la relativa exposición del grupo hemo al solvente mediada por un canal. En el caso de las catalasas de subunidad grande este canal es más largo, lo que reduce la exposición relativa al solvente del grupo prostético (Tomado de 5).

2. **Catalasas-peroxidasas:** Estas enzimas no solamente son capaces de una eficiente dismutación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sino que también lo reducen eficientemente con ayuda de varios donadores de electrones orgánicos e inorgánicos. Por sus características, algunas se clasifican entre E.C. 1.11.1.6 y E.C. 1.11.1.7<sup>8,9</sup>.

Actualmente existe evidencia para suponer la forma hidroxiferril del compuesto II en peroxidasas, al menos para el citocromo P450, cuya basicidad al producir dicho intermediario afecta la reactividad del grupo hemo<sup>3</sup>:



Por otro lado, Casadei y colaboradores demostraron mediante difracción de neutrones que el compuesto II de la citocromo c peroxidasa no presenta este estado de protonación<sup>4</sup>.

Las catalasas-peroxidasas han sido aisladas principalmente de bacterias y hongos, generalmente son dímeros que poseen subunidades de aproximadamente 80 kDa cada una, son reducidas por ditionita, presentan sensibilidad al calentamiento y a la presencia de solventes orgánicos<sup>5,6,8,9</sup>.

Ejemplos de organismos que poseen este tipo de catalasas son *Ustilago maydis*, *Aspergillus flavus* y *Giberella zeae*, entre otros<sup>6</sup>.

3. **Pseudocatalasas o Mn-catalasas:** Son enzimas hexaméricas que no contienen un grupo prostético hemo en su estructura. Se encuentran presentes en organismos que viven en ambientes microaerofílicos, como la bacteria mesófila *Lactobacillus plantarum* y la bacteria termófila *Thermus thermophilus*. Su actividad se deriva de un centro de reacción rico en manganeso<sup>7</sup>.

En la actualidad se encuentran depositadas en el PDB las estructuras cristalográficas de catalasas de diversos organismos. Gracias a estas estructuras tridimensionales se ha podido visualizar el sitio activo de las catalasas en estado nativo o formando el compuesto I, así como las interacciones producidas por algunos inhibidores con su blanco (Tabla 1).

PDB	CATALASA	ORGANISMO	RESOLUCIÓN (Å)	CLADO	GRUPO HEMO	COMENTARIO
4CAT	PVC	<i>Penicillium vitale</i>	3.0	2	D	NATIVA
7CAT	BLC	<i>Bos taurus</i>	2.5	3	B	NATIVA
1IPH	HPII/KatE	<i>Escherichia coli</i>	2.8	2	D	NATIVA
1A4E	CAT-A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.4	3	B	COMPLEJO CON AZIDA
1DGF	HEC	<i>Homo sapiens</i>	1.5	3	B	NATIVA
1GGF	HPII	<i>Escherichia coli</i>	2.3	2	B	COMPLEJO CON H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
1HBZ	MLC	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	1.5	3	B	NATIVA
1GWE	MLC	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	0.88	3	B	ALTA RESOLUCIÓN
1GWF	MLC	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	2.0	3	B	COMPUESTO II
1M7S	CAT-F	<i>Pseudomonas syringae</i>	1.8	1	B	NATIVA
1M85	PMC	<i>Proteus mirabilis</i>	2.0	3	B	NATIVA
1QWM	HPC	<i>Helicobacter pylori</i>	1.6	3	B	COMPLEJO CON ÁCIDO FÓRMICO
1S18	EFC	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.3	3	B	NATIVA
1SY7	CAT-1	<i>Nerospora crassa</i>	1.7	2	B	NATIVA
1YE9	HPII/Kat-E	<i>Escherichia coli</i>	2.8	2	B	FORMA TRUNCADA
2IUF	PVC	<i>Penicillium vitale</i>	1.7	2	D	COMPUESTO I
2J2M	EOC	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	2.4	1	B	NATIVA
2ISA	VSC	<i>Vibrio salmonicida</i>	2.0	3	B	NATIVA
2IQF	HPC	<i>Helicobacter pylori</i>	1.9	3	B	COMPUESTO I
3EJ6	CAT-3	<i>Neurospora crassa</i>	2.3	2	B	NATIVA
2XF2	PVC	<i>Penicillium vitale</i>	1.8	2	D	COMPLEJO CON AMINOTRIAZOL
2XQ1	PAC	<i>Pichia angusta</i>	2.9	3	B	NATIVA
<b>ESTRUCTURAS DE CATALASAS-PEROXIDASAS REPRESENTATIVAS</b>						
1ITK	HmKatG	<i>Haloarcula marismortui</i>	2.0			NATIVA
1MWV	BpKatG	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1.7			NATIVA
1UB2 (NO PUBLICADO)	SeKatG	<i>Synechococcus elongatus</i>	2.4			NATIVA
1SJ2	MtKatG	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2.4			NATIVA
1X7U	BpKatG	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1.9			MUTANTE
2B2S	BpKatG	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	2.0			COMPUESTO I
2CCA	MtKatG	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2.0			MUTANTE
2FXG	BpKatG	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	2.0/1.9/1.9			NATIVA, PH 4.5/6.5/8.5
3N3O	BpKatG	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1.7			COMPLEJO CON NAD
3N3Q	BpKatG	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1.9			COMPLEJO CON INH-S324T

**Tabla 1.\_** Códigos de acceso y datos relevantes de las estructuras de catalasas y catalasas-peroxidadas depositadas en el PDB (Modificado de 8).

## LA CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS COMO UNA HERRAMIENTA PARA CONOCER MECANISMOS MOLECULARES

A la fecha, se cuenta con un gran abanico de herramientas para estudiar la estructura y los mecanismos moleculares de las enzimas. Dentro de estos análisis podemos mencionar a la resonancia magnética nuclear, la difracción de neutrones, la espectroscopía de infrarrojo y de UV-Visible, la espectroscopía de RAMAN, la resonancia paramagnética electrónica y por supuesto la difracción de rayos X.

La cristalografía de proteínas es el método experimental más común para la obtención de modelos tridimensionales detallados de macromoléculas, el cual se basa en la interacción de un haz de rayos X con un cristal. Los cristalógrafos parten de altas concentraciones de proteína pura y caracterizada para crecer los cristales mediante precipitación lenta y controlada de una solución acuosa puesta bajo una gran diversidad de condiciones químicas y físicas. El uso de esta técnica junto con otras estrategias experimentales como el uso de sustratos análogos o mutaciones sitio-específicas, han permitido proponer y en ocasiones visualizar los mecanismos de acción de un gran número de enzimas. Aunque muchas proteínas tienen actividad en el estado cristalino, se debe tener en cuenta que el empaquetamiento cristalino, las soluciones de cristalización, el pH, la temperatura, la viscosidad, la constante dieléctrica y de manera importante los daños por radiación causados por los rayos X durante el experimento de difracción pueden producir alteraciones en el comportamiento de la muestra<sup>10</sup>.

### ANTECEDENTES

#### EFFECTO DE LOS RAYOS X EN LOS CRISTALES DE PROTEÍNA

Durante la colecta de datos de difracción de rayos X el tiempo de vida media del cristal se encuentra limitado por la dosis absorbida expresada en Gray (1 Gy = 1 J/Kg). El Gray es la energía depositada por unidad de masa de un determinado material y está en función del coeficiente de absorción de los átomos en el material, el flujo de rayos X y su energía, así como el tamaño y el tiempo de irradiación, entre otros.

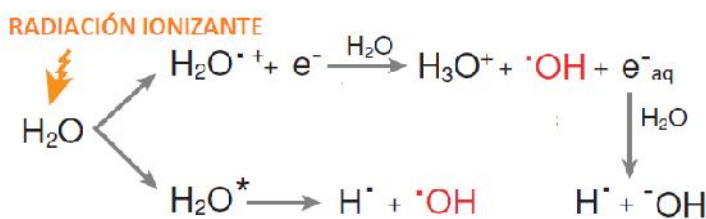
El haz de rayos X irradiado sobre el cristal interactuará con éste mediante los siguientes fenómenos:

- Efecto fotoeléctrico (Interacción dominante).
- Dispersión inelástica o de Compton.
- Dispersión elástica o de Thomson (Produce el patrón de difracción).

La dispersión inelástica y el efecto fotoeléctrico son los responsables del daño primario causado a las proteínas, que se produce básicamente por la interacción del haz con el cristal. La energía aquí depositada se disipará de dos maneras, ya sea en forma de calor o por ruptura de enlaces covalentes.

Cada fotoelectrón que llega a la muestra también puede producir electrones secundarios y otros radicales generados por el agua del medio (Figura 4) que migran a zonas de más afinidad electrónica como centros metálicos y puentes disulfuro presentes en la proteína, provocando el daño secundario. Este tipo de daño es dependiente de la temperatura y el tiempo.

El conjunto de todos estos fenómenos resultará en el deterioro del cristal: disminución de la difracción y resolución, el aumento del volumen de la celda unitaria, el daño sitio específico (ruptura de puentes disulfuro, ruptura de la cadena principal, la oxidación de la cadena lateral de los residuos aminoacídicos<sup>15</sup>; la descarboxilación de aspartatos, glutamatos y del carboxilo terminal, así como la pérdida del hidroxilo de tirosinas y susceptibilidad por parte de centros metálicos y cromóforos). El daño primario solamente se puede disminuir si la dosis de radiación absorbida y el tiempo de exposición del cristal a los rayos X disminuyen. Sin embargo, el daño secundario se puede disminuir si la colecta de datos se hace a temperaturas menores a 100 K y/o se adicionan radioprotectores o recolectores de electrones/radicales en la solución crioprotectora o en cocrystalización<sup>11, 12, 13, 14</sup>.



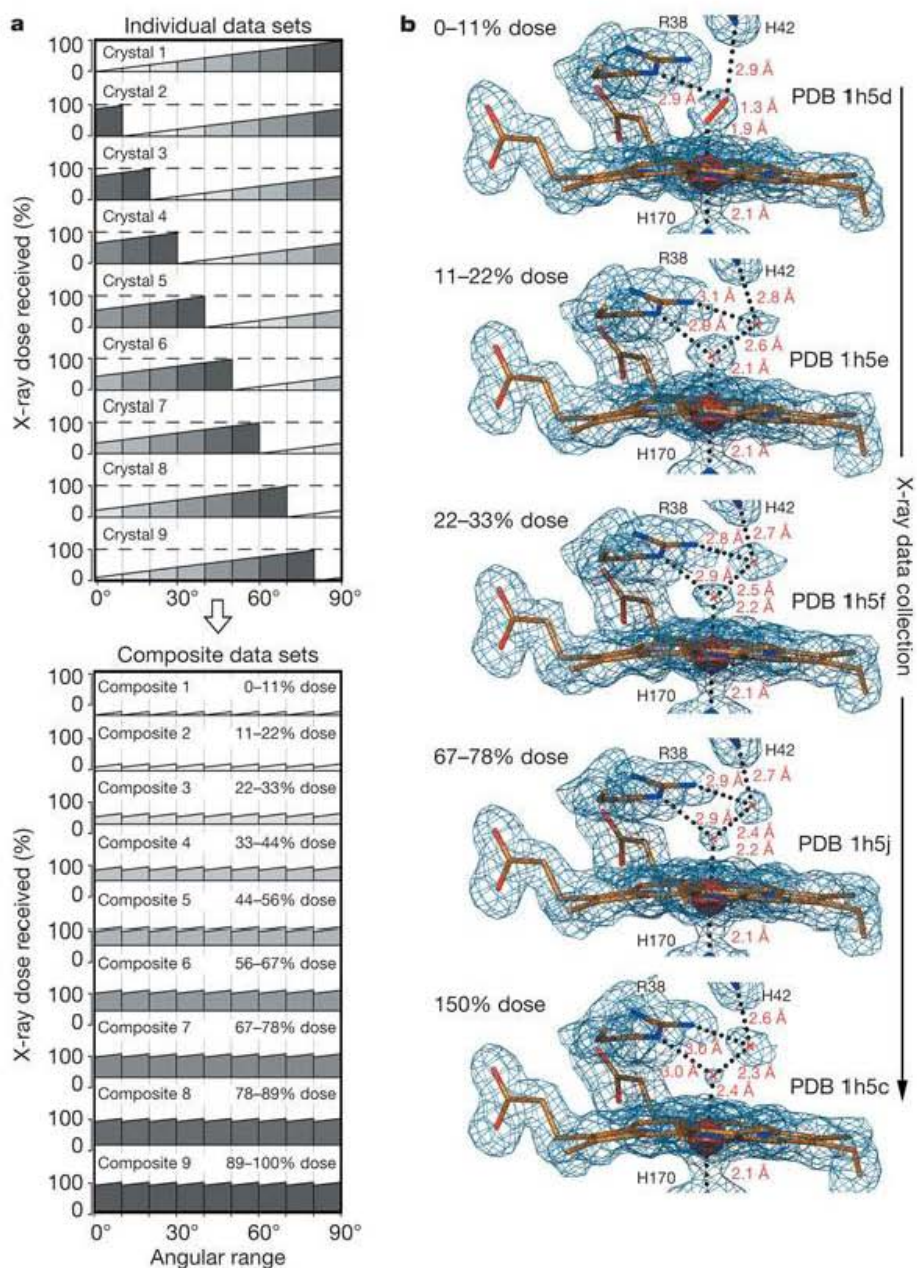
**Figura 4.\_** Electrones solvatados y otros radicales libres producto de la radiólisis del agua (Modificado de 15).

### USO DEL DAÑO POR RADIACIÓN COMO HERRAMIENTA PARA OBTENER INFORMACIÓN ADICIONAL DE UNA METALOPROTEÍNA

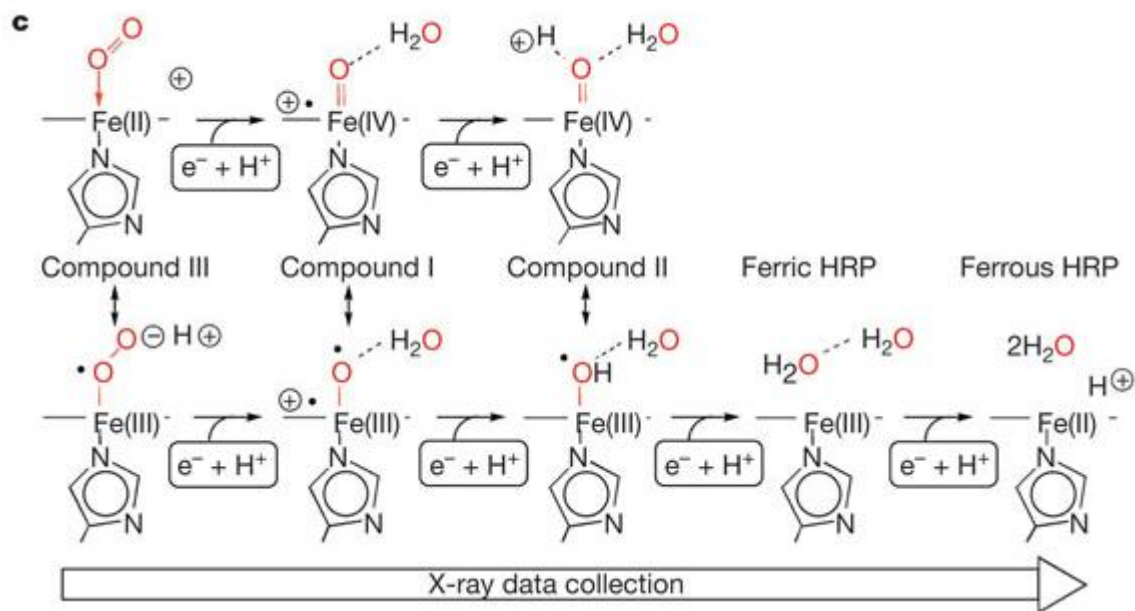
Cuando se irradian cristales de metaloproteínas con un haz de rayos X, sus centros metálicos aceptan electrones, lo cual cambia su estado de oxidación y en algunos casos su coordinación. El uso de técnicas complementarias como espectroscopía de UV-Visible han confirmado estas modificaciones para diversas enzimas, las cuales pueden correlacionar con los mapas de densidad electrónica obtenidos por difracción de rayos X.

En el 2002 Berglund y colaboradores describieron una estrategia efectiva para aprovechar el daño por radiación y obtener de esta manera imágenes tridimensionales de los intermediarios redox de la ruta catalítica en la peroxidasa de rábano picante a altas resoluciones. El método utilizado se conoce como “Colecta de datos en múltiples cristales” y se basa en la regulación sistemática de la dosis de rayos X absorbida por el cristal de proteína, lo que permite el control de las reacciones redox en la enzima.

Al coleccionar varios cristales partiendo desde orientaciones distintas en la colecta de cada uno, cada grupo de datos de difracción completo puede dividirse en distintos paquetes y al procesar juntos los paquetes de diferentes cristales, y conteniendo la misma dosis pueden obtenerse datos compuestos con la información de la estructura completa (Figuras 5 y 6). Para obtener mayor información sobre cómo se forman los conjuntos de datos compuestos, revisar el ANEXO F.

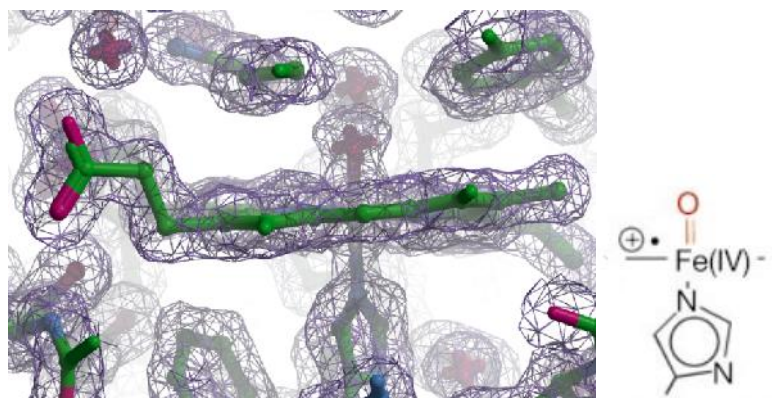


**Figura 5.** En la parte superior izquierda se puede apreciar la distribución de la dosis de radiación X absorbida como función del ángulo de rotación en cristales individuales y en la parte inferior se muestra la construcción de los grupos de datos de difracción compuestos. Estos datos de difracción compuestos representan estructuras que han recibido diferentes dosis de rayos X y que presentarán diferencias en el estado redox de su sitio activo (Tomado de 16).



**Figura 6.** Mecanismo propuesto por Berglund y colaboradores para la reducción de la peroxidasa de rábano picante. Los cuatro eventos de foto-reducción en el grupo prostético hemo permitieron la elucidación estructural de los compuestos III, I y II de los estados férrico y ferroso de la enzima (Tomado de 16).

La importancia de este trabajo estriba en que lograron obtener imágenes cristalográficas confiables y caracterizadas de cada uno de los intermediarios catalíticos de esta peroxidasa. La estructura de mayor interés para el presente trabajo, es la del Compuesto I (Código PDB 1HCH), ya que sirvió como punto de comparación para las estructuras obtenidas por nuestro grupo de trabajo. En la Figura 7 se muestra la imagen del Compuesto I, el cual se caracteriza por una distancia de aproximadamente 1.7 Å entre el hierro del grupo hemo y el oxígeno con el cual forma el enlace.

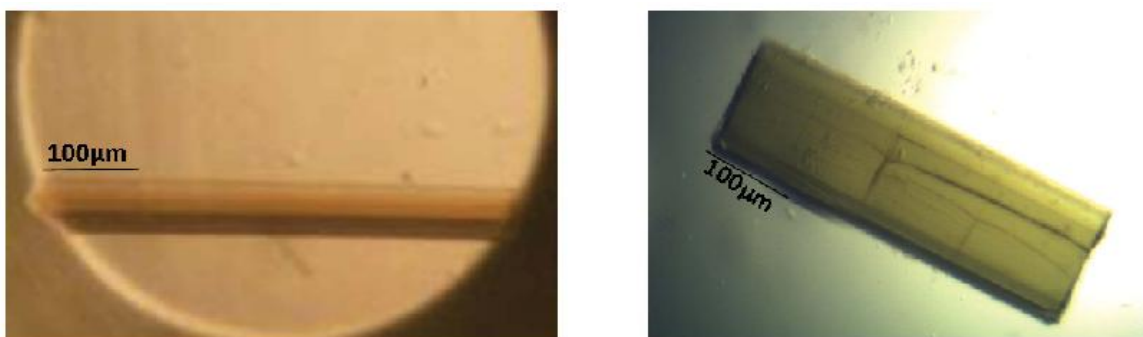


**Figura 7.** Imagen cristalográfica del Compuesto I de la Peroxidasa de Rábano Picante a 1.57 Å de resolución. Código PDB 1HCH. El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1 Å y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5 Å.

## REDUCCIÓN INDUCIDA POR RAYOS X EN EL SITIO ACTIVO DE LA CATALASA 3 DE *NEUROSPORA CRASSA*, UNA CATALASA DE SUBUNIDADES GRANDES

Previamente a este trabajo, en nuestro grupo se exploró el efecto de la radiación X sobre los cristales en estado oxidado de la catalasa 3 de *Neurospora crassa*<sup>17</sup>, la cual es un homotetrámero formado por subunidades grandes (78 850 Da) y que pertenece al clado 2 de las catalasas monofuncionales. Su grupo hemo se encuentra localizado aproximadamente a 31 Å de la superficie de la enzima.

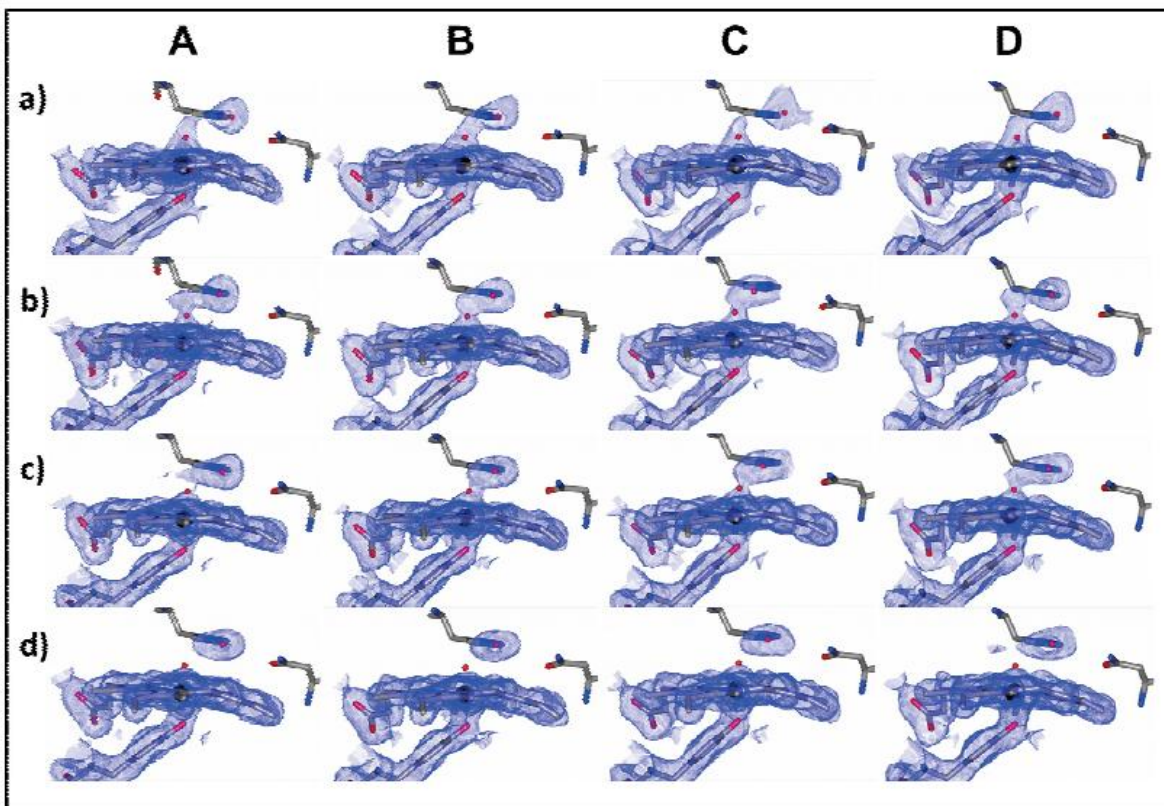
Durante el desarrollo del proyecto se obtuvieron cristales de dicha catalasa, los cuales presentaron un característico color café. Al remojar estos cristales en una solución con ácido peracético 100 mM se llegó al máximo estado de oxidación (el “Compuesto I”), lo cual propició un cambio de coloración de cristal de café a verde (Figura 8).



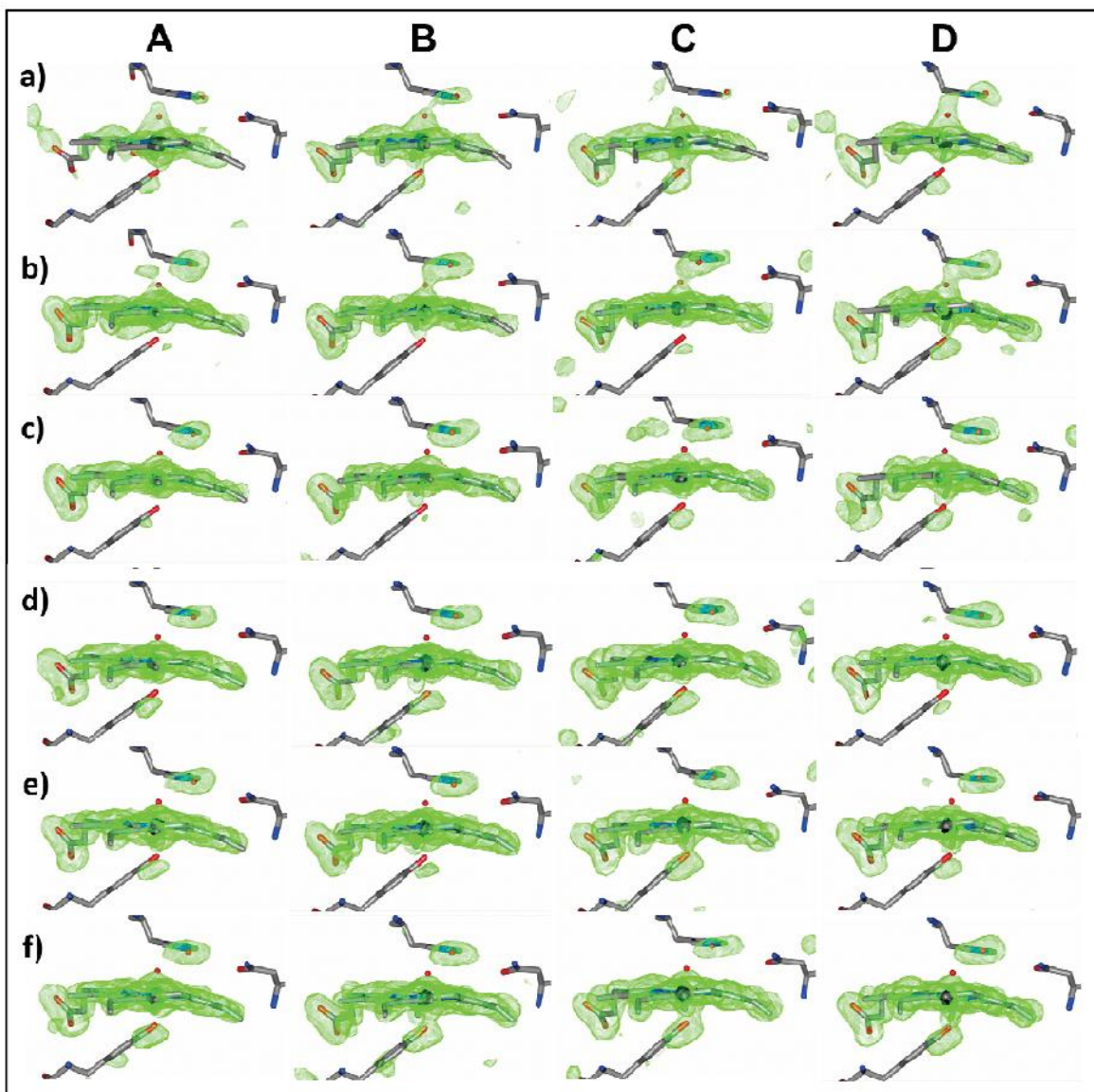
**Figura 8.** A la izquierda, imagen de un cristal de Cat3 de *N. crassa* en estado férrico. Condiciones de cristalización: 1 μL de Cat3 6mg/mL, Hepes 10 mM pH 7, 1 μL de tartrato dibásico de amonio 0.2 M, PEG 3350 20% pH 6.5. A la derecha, la imagen de un cristal de Cat3 de *N. crassa* al formarse el “Compuesto I”. Para obtenerlo, los cristales en estado férrico se remojaron en una solución de ácido peracético 100 mM, PEG 400 40%, MES 100 mM pH 5.2 (Tomado de 17).

Posteriormente los cristales del Compuesto I fueron irradiados con diferentes dosis de rayos X y se obtuvieron las imágenes cristalográficas durante el proceso de reducción utilizando la técnica de colecta de datos en múltiples cristales. Se analizaron los mapas de densidad electrónica y de diferencias convencionales (Figura 9) y también mapas de omisión de todo el grupo hemo (Figura 10), esperando modelar de una manera más adecuada los cambios en el sitio activo. Asimismo, estos datos cristalográficos fueron analizados de manera paralela con espectros UV-Visible de los cristales expuestos a rayos X, confirmando de esta manera el cambio en el sitio activo de la enzima (Figura 11).

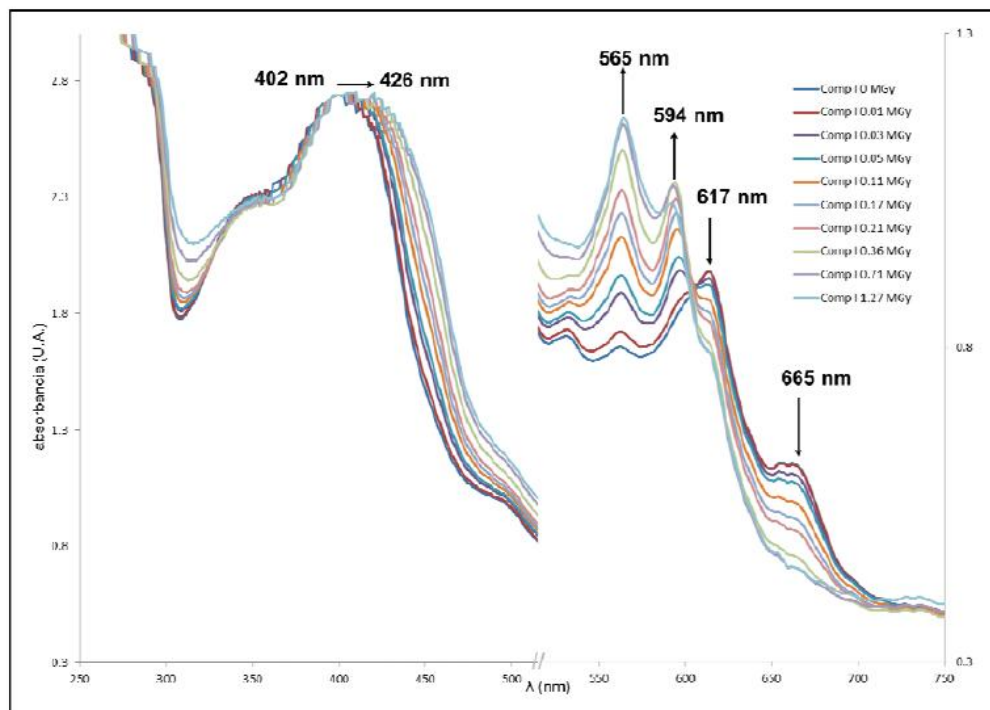




**Figura 9.** Estructuras que muestran el proceso de reducción diferencial del “Compuesto I”: a) 0.165 MGy a 2.45 Å, b) 0.20 MGy a 2.1 Å, c) 0.263 MGy a 2.2 Å y d) 1.31 MGy a 2.2 Å. Los monómeros A, B, C, y D aparecen ordenados de izquierda a derecha. El mapa  $2F_o - F_c$  aparece en 1 (Tomado de 17).



**Figura 10.** Estructuras que muestran el proceso de reducción diferencial del “Compuesto I” en mapas de omisión a 3.5 Å : a) 0.165 MGy a 2.45 Å, b) 0.20 MGy a 2.1 Å, c) 0.263 MGy a 2.2 Å, d) 1.31 MGy a 2.2 Å, e) 2.09 MGy a 2.2 Å y f) 2.89 MGy a 2.2 Å. Los monómeros A, B, C y D aparecen ordenados de izquierda a derecha (Tomado de 17).



**Figura 11.** Espectros de UV-Vis obtenidos durante el proceso de reducción de cristales de “Compuesto I” a diferentes dosis de rayos X. Se puede apreciar un desplazamiento de la banda de Soret (aproximadamente de 402 nm a 426 nm), así como cambios en los picos a 565 nm, 594 nm, 617 nm, 665 nm (Tomado de 17).

Si bien en este trabajo se logró mostrar que los rayos X son capaces de reducir los sitios activos de esta catalasa de subunidades grandes de manera diferencial, posiblemente existieron problemas de difusión hasta el sitio activo por parte del ácido peracético o durante el proceso de reducción, de ahí que se decidió explorar el efecto sobre catalasas de subunidades pequeñas, donde el canal de acceso al sitio activo es mucho más ancho y corto.

Algunos de los problemas que llevaron a nuestro grupo de bioquímica estructural a probar con otra catalasa cuyo sitio activo se encontrara más expuesto al solvente, fueron:

- La resolución de la estructura de la Cat3 de *N. crassa* (2.1 – 2.4 Å) al parecer no es suficiente para apreciar de manera muy clara los intermediarios catalíticos que se producen durante el proceso de reducción (aunque sí se pueden apreciar cambios en los sitios activos).
- Las estructuras del Compuesto I obtenidas contaban con una distancia  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$  mucho mayor a las normalmente reportadas (1.6 – 1.8 Å), indicando que posiblemente se estaba perdiendo este intermediario o que posiblemente había una superposición de diferentes estados.

- El experimento de microespectrofotometría UV-Vis arrojó un espectro muy complejo, con varios picos difíciles de asignar, lo cual hacía complicado correlacionar con las imágenes del sitio activo obtenidas por cristalografía para de esta manera describir el proceso de reducción inducido por rayos X.

A partir de estos hechos, se eligió como modelo de estudio a la catalasa de hígado bovino, ya que se puede obtener de manera comercial de la empresa Sigma, está ampliamente caracterizada en solución y además, los sitios activos tienen mayor exposición relativa al solvente al ser una catalasa de subunidades pequeñas<sup>67</sup>.

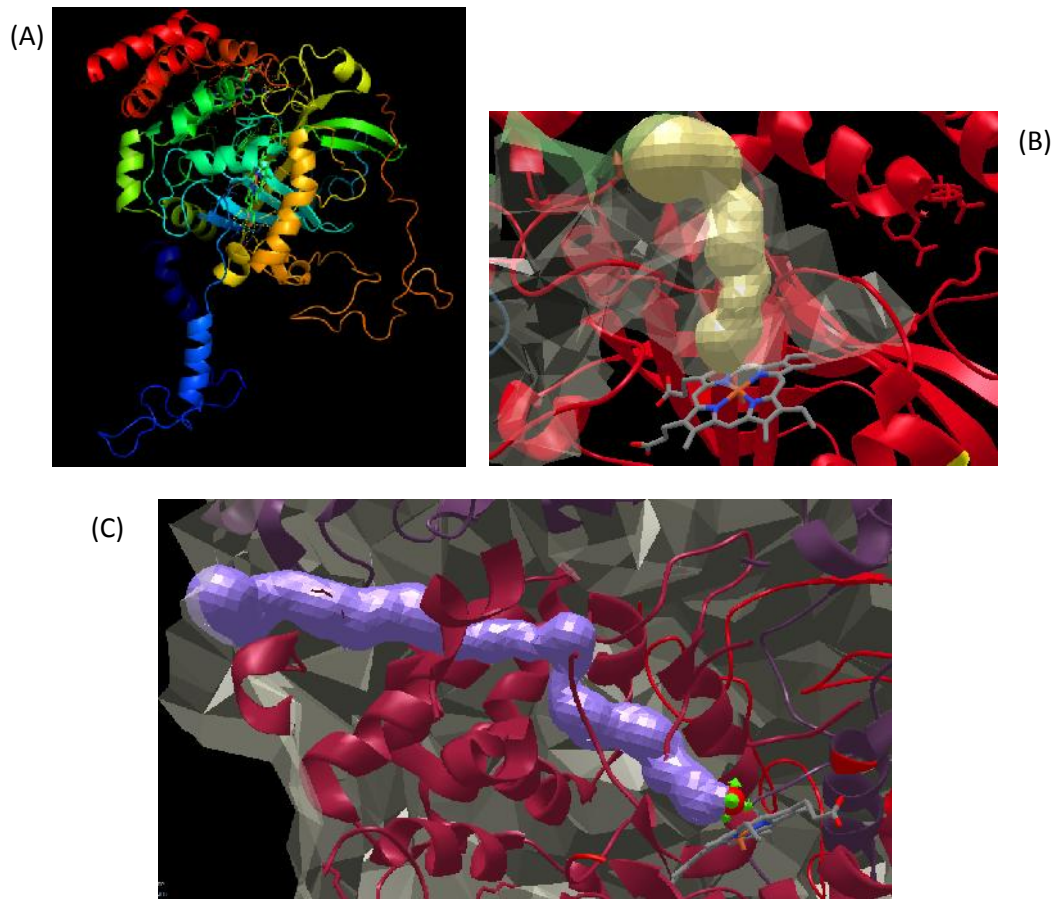
### LA CATALASA DE HÍGADO BOVINO, UNA CATALASA DE SUBUNIDADES PEQUEÑAS

La catalasa de hígado bovino es una catalasa cuya localización celular está restringida al peroxisoma, forma un homotetrámero, pertenece al clado 3 y posee 506 residuos de aminoácidos por subunidad. El grupo hemo está localizado a aproximadamente 20 Å debajo de la superficie molecular (Figura 12) y es accesible por un canal con residuos hidrofóbicos. De igual manera cuenta con un canal lateral, el cual se ha propuesto que podría permitir la salida de las moléculas producto de la catálisis. En esta catalasa, el ligando proximal del grupo hemo es la tirosina 357, mientras que la histidina 74 y la asparagina 147 son residuos importantes en la parte distal. Al ser una catalasa de subunidad pequeña une NADP(H).

Aunque en la actualidad se desconoce el efecto exacto que produce esta coenzima sobre el grupo hemo, se ha propuesto que previene la inactivación por sustrato al impedir la formación del compuesto II mediante la producción de ferricatalasa, que es el estado inicial del ciclo catalítico<sup>1,5</sup>. También se ha observado que podría mediar la inactivación por monocloroamina y ditioeritritol<sup>18</sup>.

La catalasa de hígado bovino está formada por cuatro diferentes regiones, enunciadas a continuación<sup>8</sup>:

- La región amino terminal, formada desde el primer aminoácido hasta la histidina 74 esencial para el ciclo catalítico.
- La región barril con ocho hebras antiparalelas, es la más conservada entre las catalasas. La primera mitad contiene la asparagina esencial del sitio activo y la segunda mitad puede unir al NADP(H).
- La región de cuatro hélices alfa.
- Región del asa envolvente. Une el barril con el dominio de hélices .

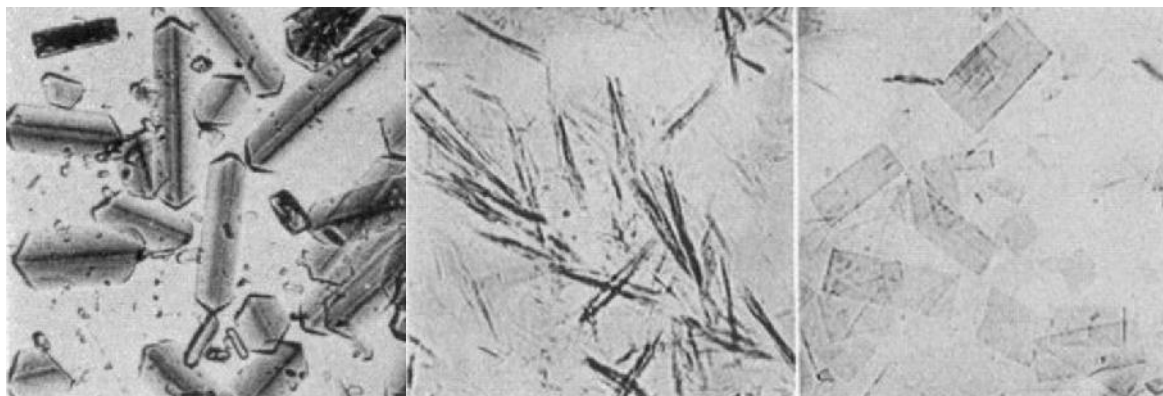


**Figura 12.\_** (A) Subunidad de la catalasa de hígado bovino, en la cual se puede apreciar la localización del grupo hemo y el NADP(H) (Tomado de 19). (B) Túnel de acceso al grupo hemo de 19.49 Å de longitud calculado mediante el programa MOLE 2.0. (C) A manera de comparación se presenta el túnel de acceso al sitio activo de la catalasa 3 de *N. crassa*, el cual cuenta con una longitud de 55.56 Å (También calculado con MOLE 2.0).

Cabe destacar que el amino terminal de un monómero se entrelaza con el asa envolvente del otro. Una característica esencial que permite diferenciar a las catalasas de subunidades pequeñas con las grandes es la presencia del dominio tipo flavodoxina en el carboxilo terminal en las catalasas de subunidades grandes<sup>18</sup>.

## CRISTALIZACIÓN DE LA CATALASA DE HÍGADO BOVINO

Aunque la catalasa de hígado bovino fue una de las primeras hemo-proteínas en ser cristalizada, no se conoció su estructura sino hasta varias décadas después. Los primeros cristales reportados datan de los años treinta y fueron obtenidos por Sumner y Dounce, quienes obtuvieron cristales de esta enzima con formas de agujas, láminas delgadas y prismas<sup>20</sup> (Figura 13).



**Figura 13.** Diferentes formas cristalinas de la catalasa de hígado bovino. De izquierda a derecha: Los prismas se obtuvieron por enfriamiento de la proteína en una solución alcalina de fosfatos. Las agujas se observaron con una solución de ácido fosfórico y sulfato de amonio. Las láminas se consiguieron por cristalización lenta en ácido fosfórico y una pequeña cantidad de sulfato de amonio (Tomado de 20).

Hoy en día se sabe que la catalasa de hígado bovino puede presentar estas 3 formas cristalinas con los siguientes parámetros de la celda unitaria y grupos espaciales (Tabla 2).

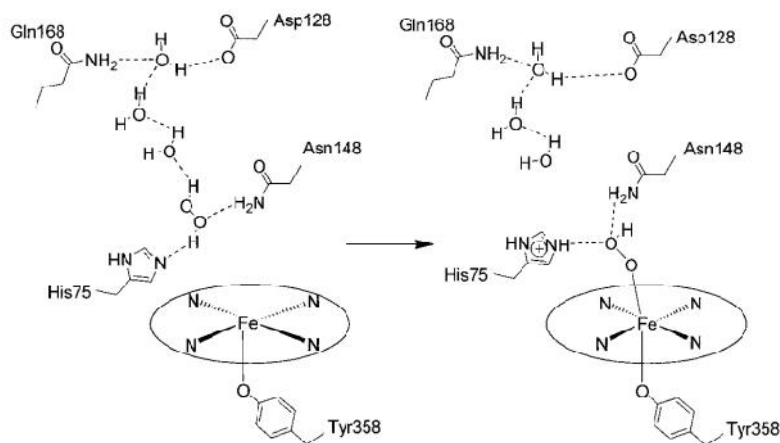
	<b>FORMA I</b>	<b>FORMA II</b>	<b>FORMA III</b>
GRUPO ESPACIAL	P <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub>	P <sub>2</sub> <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P <sub>2</sub> <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
PARÁMETROS DE LA CELDA UNITARIA			
a (Å)	142.0	87.8	68.7
b (Å)	142.0	140.6	173.7
c (Å)	103.7	232.4	186.3
(°)	90	90	90
(°)	90	90	90
(°)	120	90	90
RESOLUCIÓN (Å)	2.5	2.3	2.7
CÓDIGO PDB	7cat	4blc	3nwl

**Tabla 2.** Las tres formas cristalinas de la catalasa de hígado bovino (Modificado de 21).

## MECANISMO CATALÍTICO DE LA CATALASA DE HÍGADO BOVINO

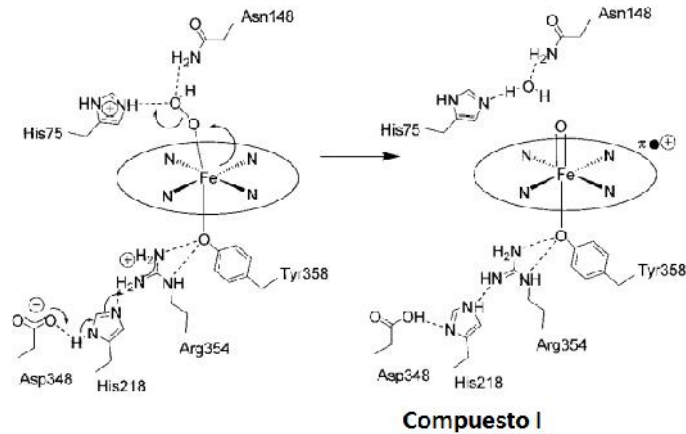
En cuanto al mecanismo de reacción de la catalasa, se han propuesto muchos modelos. En 1997, Ivancich y cols. corroboraron mediante estudios de RPE la formación del compuesto I como el clásico radical catiónico oxoporfirín de hierro IV en varias catalasas. Contrastantemente, el compuesto I de la catalasa de hígado bovino tenía un tiempo de vida muy corto y además pudieron ser detectadas la presencia de dos formas para este compuesto. Adicionalmente, detectaron la formación de un radical tirosil, del cual se desconoce si tendría algún rol importante en la función catalítica<sup>22</sup>.

En el 2000 Putnam y colaboradores obtuvieron estructuras cristalográficas de la catalasa de eritrocitos humanos unida a diferentes inhibidores, esperando obtener mayor información sobre el mecanismo catalítico de esta enzima. En este trabajo se propone un modelo sobre el mecanismo de reacción, el cual presento a continuación y que puede ser extrapolado a cualquier catalasa de subunidades pequeñas debido al alto contenido de residuos aminoacídicos conservados (Figuras 14-16):



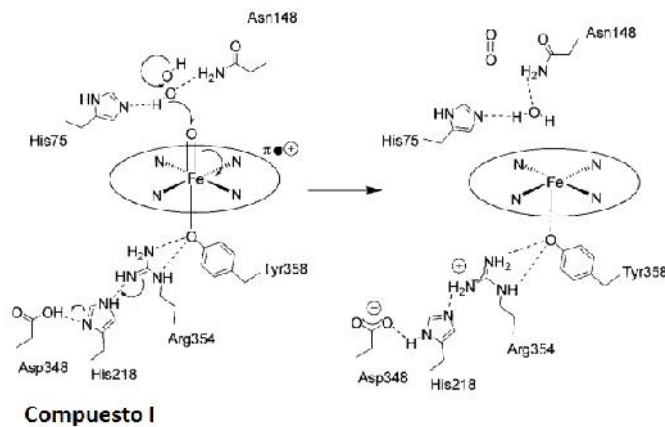
**Figura 14.** Posicionamiento de la primera molécula de peróxido de hidrógeno mediante los residuos catalíticos Histidina 75 y Asparagina 148 para la posterior formación del compuesto I en la catalasa de eritrocitos humanos (Modificado de 23).

- Como pasos iniciales, las moléculas de peróxido de hidrógeno atraviesan el canal hidrófóbico de la enzima. Posteriormente ocurre la ruptura heterolítica mediante la acción del centro metálico y los residuos de Histidina y Asparagina en la parte distal del sitio activo.



**Figura 15.** Formación del compuesto I en la catalasa de eritrocitos humanos (Modificado de 23).

- Al formarse el compuesto I disminuye la repulsión entre la arginina 354 y el grupo oxiferril.

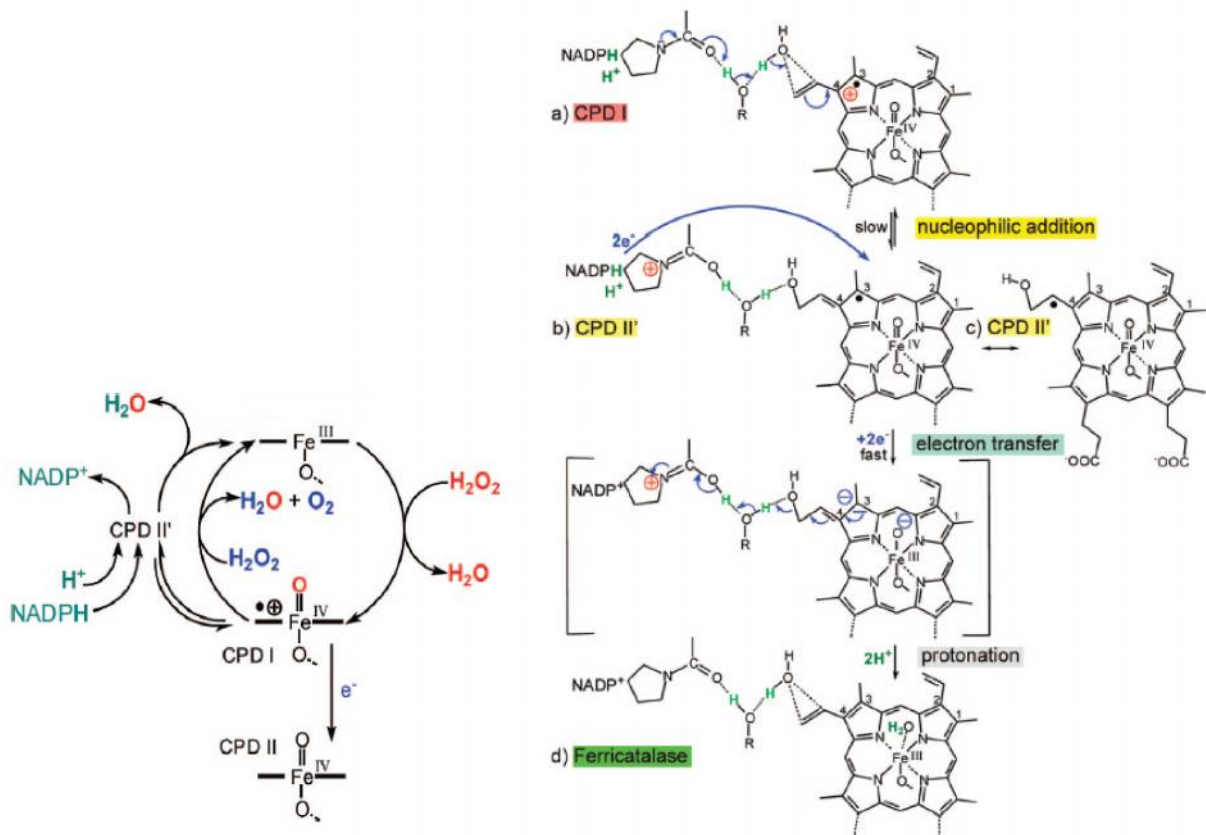


**Figura 16.** Reducción del compuesto I para volver al estado en reposo de la catalasa de eritrocitos humanos (Modificado de 23).

- La oxidación de la segunda molécula de peróxido de hidrógeno ocurre gracias al posicionamiento de la Histidina 75 y la Asparagina 148 nuevamente. Se produce agua y oxígeno para posteriormente volver al estado de reposo.



Debido a la complejidad del ciclo, se hace énfasis solamente en esta parte del mecanismo de reacción, ya que no está del todo claro el resto de lo que ocurre en estas catalasas debido a que unen NADP(H) y muchas hipótesis han sido propuestas. Si bien sabemos que además del estado de reposo y el Compuesto I también existe el Compuesto II, se ha propuesto que existe otro intermediario, conocido como Compuesto II', el cual se forma mediante la transferencia de electrones desde el NADPH hacia el grupo hemo, pasando por una prolina, serina y una molécula de agua. Esta transferencia de electrones impediría que se forme el Compuesto II y llevaría el Compuesto I de vuelta al estado de reposo (Figura 17).



**Figura 17.** Ciclo catalítico de catalasas que unen NADP(H) sugerido por Sicking y colaboradores. Este esquema supone la transferencia de dos electrones desde el NADPH hasta el grupo hemo en Compuesto I para así volver al estado basal e impedir la formación del compuesto II. (Tomado de 5).

Al no tener muy claro todo lo que ocurre en el ciclo catalítico de estas enzimas, se vuelve importante e interesante realizar más estudios que puedan llevar a un mayor entendimiento de las catalasas. Al obtener la estructura del Compuesto I y reducir el sitio activo mediante dosis crecientes y controladas de rayos X, podríamos obtener un esquema más detallado de los distintos estados de óxido-reducción que pudieran presentar estas enzimas. También sería importante ver el comportamiento en conjunto de los cuatro monómeros que conforman la enzima.

## **HIPÓTESIS**

Al tener los sitios activos de la BLC una mayor accesibilidad relativa al solvente, será más factible afectar el estado de óxido-reducción del grupo hemo al utilizar ácido peracético como sustrato o mediante dosis crecientes de radiación X en comparación con las catalasas de subunidades grandes, lo cual nos permitirá una mejor caracterización estructural de los cambios en el sitio activo.

## **OBJETIVOS**

- **OBJETIVO GENERAL:**

Caracterizar mediante cristalografía y microespectroscopía UV-Visible el proceso de reducción inducida por rayos X en los sitios activos de la catalasa de hígado bovino y comparar estos resultados con los previamente obtenidos para la catalasa 3 de *Neurospora crassa*.

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Buscar condiciones de cristalización para la catalasa de hígado bovino que mejoren su resolución, lo que nos permitirá tener una mayor apreciación de los cambios en el sitio activo. Creemos que una resolución de al menos 2 Å es necesaria.
2. Determinar la estructura del estado más oxidado de la enzima y de ser posible, los intermediarios obtenidos mediante el proceso de reducción por rayos X.
3. Analizar las estructuras obtenidas y comparar con los resultados previamente reportados para la catalasa 3 de *N. crassa*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

1. **Pureza de la enzima:** Se suspendió el polvo liofilizado de la catalasa de hígado bovino (Sigma. CAS:9001-05-2) en solución Hepes 10 mM y 200 mM NaCl a pH 7 y se aplicó en una columna de exclusión molecular (Sephacryl 300) debido a que previamente el SDS-PAGE 8% mostró que la proteína no contaba con la pureza suficiente para cristalizarla. La pureza y homogeneidad de la muestra luego de la purificación se confirmó nuevamente con geles SDS-PAGE 8% y 10%.

Para conocer mejor la composición de la muestra, se corrió un gel nativo en un equipo “Phast System” para proteínas de 50-750 kDa. De igual manera, se realizaron pruebas de isoelectroenfoque “Phast System IEF 3-9”. Como otra manera de analizar la composición de la muestra, se realizaron ensayos de dispersión dinámica de luz en el equipo Zetazaiser Nano de la marca Malvern, en el laboratorio del Dr. Carlos Amero Tello, investigador del CIQ-UAEMor. Para dicho análisis se utilizó 1 mL de muestra a 1 mg/mL de enzima en Hepes 10 mM pH 7.5.

En una segunda etapa, se adquirió liofilizado de catalasa de hígado bovino de Sigma (C9322-10G. Lote: SLBK8209V) y se resuspendió en amortiguador Tris 20 mM pH 8. Posteriormente se aplicaron 20 mg en una columna de intercambio aniónico Hitrap Q Sepharose FF de 1 mL. Se colectaron fracciones de 2 mL a 1.5 mL/min. La elución se realizó con amortiguador Tris 20 mM pH 8 y 1 M de NaCl. De las fracciones colectadas se montaron pruebas de cristalización en difusión de vapor de gota colgante.

Al notar mediante SDS-PAGE que no se contaba todavía con la pureza requerida para montar pruebas de cristalización, nuevas fracciones colectadas por este método fueron inyectadas posteriormente en una columna de exclusión molecular Sephacryl 300 de 350 mL bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Las fracciones más puras fueron concentradas y se montaron pruebas de cristalización tanto en gota colgante como en *microbatch*, esta vez en presencia de un campo magnético de 20 Gauss, esperando que el campo magnético pudiera orientar la enzima durante el proceso de cristalización (el hierro del grupo hemo es un átomo paramagnético, lo cual lo hace susceptible al efecto de campos magnéticos) y de esta manera mejorar sus propiedades de difracción frente a rayos X. El campo magnético fue producido por una bobina casera que crea un campo magnético radial.

2. **Cristalización:** Se juntaron las fracciones más puras obtenidas durante cada proceso de purificación y se concentraron en tubos Amicon Ultra (Milipore) con membrana de corte de 30 kDa y hasta llegar a la concentración final de proteína requerida para cada una de las condiciones de cristalización probadas. Se cuantificó proteína mediante el método de Bradford. Se montaron pruebas de cristalización siguiendo el método de *microbatch* a 18 °C y utilizando la condición provista por el grupo de la Dra. Stojanoff (BNL-EEUU): 12.5 mg/mL de proteína, 0.01 M Hepes (Sigma), 20% PEG 4000, 0.1M de fosfato monobásico/dibásico de sodio a pH 6.6. Al cabo de 3 días se obtuvieron pequeños cristales en forma de prismas, los cuales difractaron a una resolución de 2.55 Å. Al no ser suficiente esta resolución para nuestros propósitos, se realizaron matrices en las cuales se cambiaron la concentración de proteína, PEG y pH a dos temperaturas diferentes (18 °C y 4 °C):

Concentración de proteína (mg/mL)	Concentración de PEG 4000 (%)	25	20	15	25	20	15
14.5		*	*	*	•	•	•
12.5		*	*	*	•	•	•
10.5		*	*	*	•	•	•
8.5		*	*	*	•	•	•

\*Gota colgante.

\*Gota colgante. Cristales llevados a difractar.

•Gota sentada.

•Gota sentada. Cristal llevado a difractar luego de un año.

**Tabla 3.** Matriz 1 para la cristalización de la catalasa de hígado bovino.

Concentración de PEG 4000 (%)	pH	6.4	6.6	6.8
15		*	*	1
18		*	*	*
20		*	*	*
22		*	*	2

1 Cristal crecido en microbatch a 18 °C y llevado a difractar.

2 Cristal crecido en microbatch a 4 °C y llevado a difractar.

**Tabla 4.**\_ Matriz 2 y 3 para la cristalización de la catalasa de hígado bovino.

También se pusieron algunas pruebas preliminares con el kit PEG/Ion de Hampton Research.

Posteriormente se probaron las condiciones de cristalización aportadas por el Dr. Ulises Salazar Kuri de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla:

40 mg/mL de proteína se disolvieron en amortiguador Hepes 10 mM pH 7.5 y se diluyó con:

1. Condición 1. PEG 4000 8% + Tris 100 mM pH 8.0
2. Condición 2. PEG 4000 8% + Tris 100 mM pH 9.0
3. Condición 3. PEG 4000 8% + Hepes 100 mM pH 7.0
4. Condición 4. PEG 4000 8% + 100 mM amortiguador de fosfatos pH 6.6

Se pusieron pruebas de cristalización en *microbatch* y gota colgante con y sin presencia de campos magnéticos. También, se probaron volúmenes equivalentes de solución de proteína y agente precipitante y utilizando el doble de solución de proteína en comparación con el agente precipitante

Al encontrar en un artículo publicado por Tzu-Ping Ko<sup>24</sup> y colaboradores que el PEG como agente precipitante aparentemente produce cristales de BLC con malas propiedades para la difracción que afectan la resolución, se diseñó la siguiente matriz:

**Condición 1.** 15 µL de solución de enzima 40 mg/mL + 15 µL de NaCl 1% + 5 µL de amortiguador 100 mM de fosfatos pH 6.2-6.8 y 10 % de propanol.

**Condición 2.** Mezclar volúmenes iguales de solución de proteína 40 mg/m con solución 0.05 M de formato de magnesio.

Concentración de proteína (mg/mL)	pH 6.2	pH 6.4	pH 6.6	pH 6.8	0.05 M de formato de magnesio	0.1 M de formato de magnesio
10	*	*	*	*	+	+
20	*	*	*	*	+	+
30	*	*	*	*	+	+
40	*	*	*	*	+	+

\*Gota sentada.

+Gota colgante.

+Gota colgante. Cristales llevados a difractar.

**Tabla 5.**\_ Matriz 4 y 5 para la cristalización de la catalasa de hígado bovino.

Asimismo se montaron pruebas de cristalización con la catalasa de eritrocitos humanos obtenida de Sigma (C3556-0.5mg Lote: SLBJ8923V) mediante la técnica de gota colgante a 18 °C y partiendo de las condiciones reportadas por Putnam y colaboradores en el año 2000: ~ 40 mg/mL de proteína en 50 mM Tris pH 8.0 y un volumen equivalente de una solución 6.5% - 8% PEG 4000.

Concentración de PEG 4000 (%)	pH	7.5	8.0	8.5
6		①	*	*
7		*	*	*
8		*	*	*

① Condición en la cual se obtuvieron cristales.

**Tabla 6.**\_ Matriz para la cristalización de la catalasa de eritrocitos humanos.

3. Obtención del mayor estado de oxidación de los sitios activos de la enzima: Con el fin de obtener distintos estados de oxidación, los cristales obtenidos en los pasos anteriores fueron remojados en las siguientes condiciones:
  - a) Solución crioprotectora (Cristal en estado de reposo): 40 % de PEG 400, 100 mM de amortiguador de fosfato monobásico/dibásico de sodio pH 6.6.
  - b) Solución crioprotectora con ácido peracético (~100 mM): 40 % de PEG 400, 100 mM de amortiguador de fosfato monobásico/dibásico de sodio pH 6.6, 100 mM de ácido peracético.
  - c) Solución crioprotectora con ácido peracético (~100 mM) y KCN 20 mM: 40 % de PEG 400, 100 mM de amortiguador de fosfato monobásico/dibásico de sodio pH 6.6, 100 mM de ácido peracético y 20 mM de KCN.
  - d) Solución crioprotectora con ácido peracético (~60 mM) y  $K_4(Fe(CN)_6)$  20 Mm: 40 % de PEG 400, 100 mM de amortiguador de fosfato monobásico/dibásico de sodio pH 6.6, 60 mM de ácido peracético y 20 mM de  $K_4(Fe(CN)_6)$ .

Para los cristales de catalasa de eritrocitos humanos se probaron las siguientes condiciones:

- a) Solución crioprotectora (Cristal en estado de reposo): 40 % de PEG 400, 50 mM de amortiguador Tris pH 7.5.
- b) Solución crioprotectora con ácido peracético (~100 mM): 40 % de PEG 400, 50 mM de amortiguador Tris pH 7.5, 100 mM de ácido peracético.

Para la obtención del Compuesto I, todos los cristales fueron remojados en la solución crioprotectora con ácido peracético por un tiempo de aproximadamente 1 a 2 minutos, ya que existen reportes en los cuales se demuestra que se alcanza este estado en aproximadamente este intervalo<sup>16,17,25</sup>.

4. Colecta de datos: Los cristales se difractaron en la línea 19-BM-D de *Argonne National Laboratory, Advanced Photon Source*, la cual cuenta con un rango de energía de 6-13.5 keV y un flujo de  $1 \times 10^{11}$  fotones/segundo. Se colectaron 360 imágenes de difracción ( $180^\circ$ ). Luego de la primera colecta de las 360 imágenes, se regresó al origen y se colectó el cristal dos veces más.

También se colectaron datos en la línea X6A del *National Synchrotron Light Source*, la cual cuenta con un rango de energía de 5.4-23 KeV y un flujo de  $1 \times 10^{11}$  fotones/segundo. Asimismo se colectaron datos de difracción en la línea 14-1 del *Stanford Synchrotron Radiation Lightsource*, mientras que los espectros UV-Visible fueron colectados en la línea 11-1. La línea 14-1 posee un rango de energía de 6-13 KeV y un flujo de  $1.3 \times 10^{11}$  fotones/segundo. En cuanto a la línea 11-1, ésta cuenta con un rango de energía de 10.6-15 KeV, un flujo de  $4 \times 10^{11}$  fotones/segundo y el microespectrofotómetro UV-Visible.

5. Procesamiento de datos: La determinación del grupo espacial e integración de los datos se realizó con el programa *XDS*<sup>26</sup>. El escalamiento de los datos se realizó con *XSCALE*, seguido del uso del convertidor *XDSCONV* y posteriormente el *F2MTZ*, éste último perteneciente a la suite *CCP4*<sup>27</sup>. Las fases se resolvieron mediante reemplazo molecular en *PHASER-MR*<sup>28</sup>. El afinamiento de cuerpos rígidos y restricción geométrica se llevaron a cabo en *Refmac*<sup>29,30</sup>, para posteriormente realizar otros pasos de afinamiento con *Phenix.Refine*<sup>31</sup> y *COOT*<sup>32</sup>. Finalmente, se calcularon los mapas de omisión mediante *Phenix.Composite\_omit\_map*. En algunos casos, también se utilizó el programa *AUTOPROC*<sup>33</sup> para el análisis inicial de los datos.

Para el corte de resolución se siguieron los criterios sugeridos por Diederichs y Karplus en sus trabajos, en los cuales proponen que la calidad de los modelos mejora significativamente con la inclusión de datos débiles de altas fajas de resolución que comúnmente son rechazados. Además, argumentan que los estadísticos denominados *R*'s (como el  $R_{\text{merge}}$ ), no son un buen criterio para evaluar la calidad de los datos o la consistencia interna a una resolución dada y en su lugar, proponen el uso de los estadísticos basados en coeficientes de correlación de Pearson entre intensidades calculadas y aquellas obtenidas experimentalmente. Dichos coeficientes (denominados CC), presentan un comportamiento más estable y lineal<sup>34,35,36</sup>.

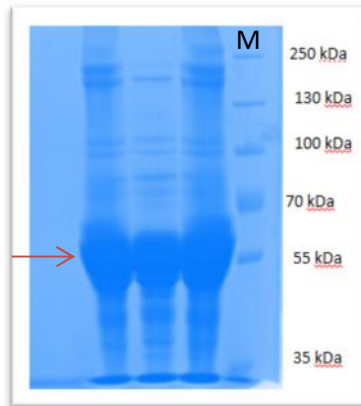
Aunque en un inicio se tomó en cuenta el  $R_{merge}$ , al final se decidió dar mayor preponderancia al CC1/2, no observando alteraciones en los mapas de densidad electrónica que indicaran un mal manejo de los datos (Para mayor información sobre los programas y estadísticos utilizados en cristalografía, revisar el Glosario).

La dosis de radiación depositada en el cristal se calculó mediante el programa RADDPOSE-3D<sup>37</sup>, el análisis de los túneles de las enzimas se realizó mediante el programa MOLE-2.0<sup>38</sup> y las gráficas se elaboraron mediante el programa R.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

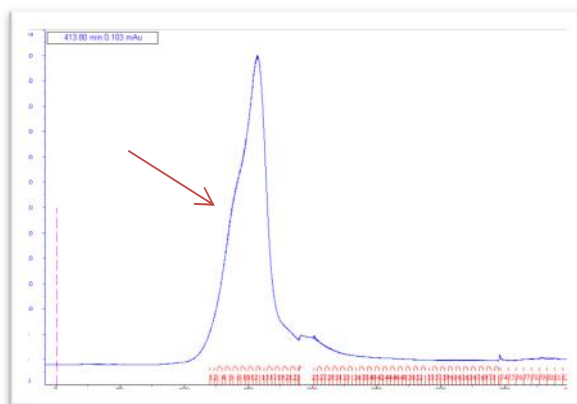
- Pureza de la enzima:

Para evaluar el grado de pureza de la enzima realizamos una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 8%) donde observamos varias bandas que pudiesen corresponder a oligómeros de la enzima y otras impurezas. La banda de mayor concentración se encuentra alrededor de 60 kDa, que corresponde a un monómero de la catalasa de hígado bovino (Figura 18).

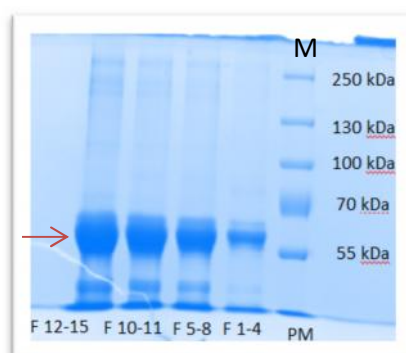


**Figura 18.** SDS-PAGE 8% del liofilizado de la catalasa de hígado bovino antes del paso de purificación. La banda más intensa alrededor de 60 kDa pertenece al monómero de la catalasa de hígado bovino. En los tres carriles se aplicó la misma muestra.

Se usó la cromatografía de exclusión molecular para purificar la enzima. En este proceso de purificación de la catalasa, se obtuvo un pico parcialmente sobrelapado (Figura 19). Se tomaron las fracciones donde se encontraba principalmente la catalasa de hígado bovino y se realizó un nuevo gel de electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE 8%). En el gel se apreció que la separación no fue completamente eficiente, ya que se observaron bandas por debajo de la banda principal de 60 kDa (Figura 20).



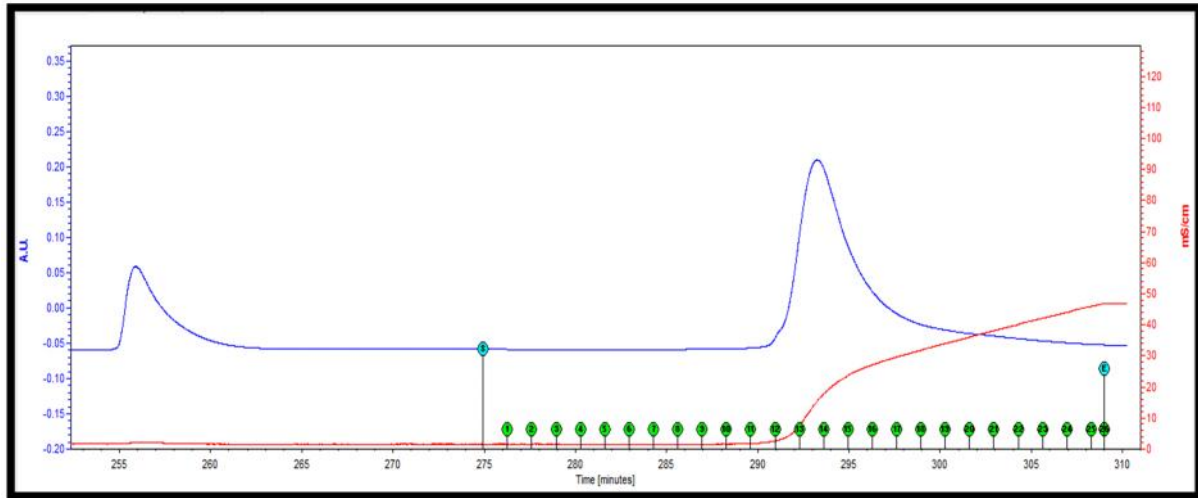
**Figura 19.** Cromatograma de la columna de exclusión molecular. Se puede apreciar la presencia de un pequeño “hombro” del lado izquierdo del pico principal, motivo por el cual solamente se juntaron las fracciones 12-19 (en la parte central del pico de mayor intensidad).



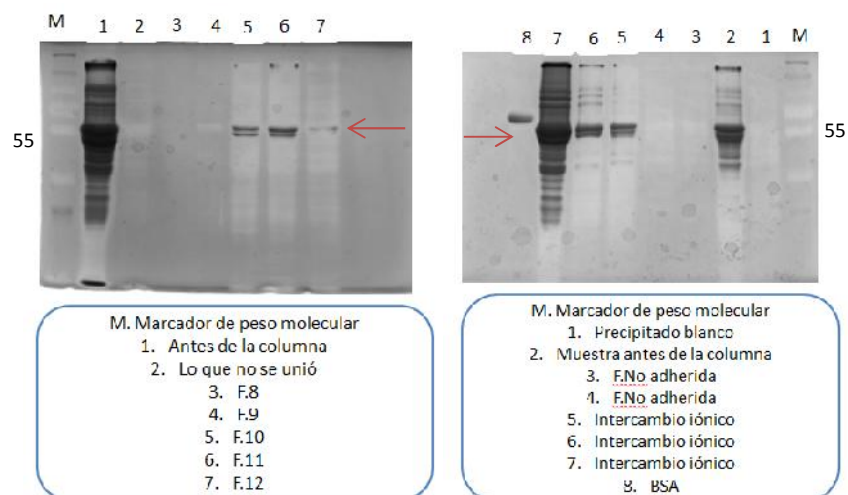
**Figura 20.** SDS-PAGE 8% de las fracciones colectadas luego de la purificación. Como se puede observar, todavía se detecta la presencia de otras bandas debajo de la banda de 60 kDa. F=Fracción.

Al no obtener el grado de pureza suficiente mediante exclusión molecular, se decidió utilizar una columna de intercambio iónico. Antes de pasar por la columna de intercambio aniónico, la muestra se centrifugó por 3 minutos a 3,000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5424 R. Al término de la centrifugación se obtuvo un precipitado blanco que posteriormente fue analizado por SDS-PAGE 10% (Figuras 21-22).



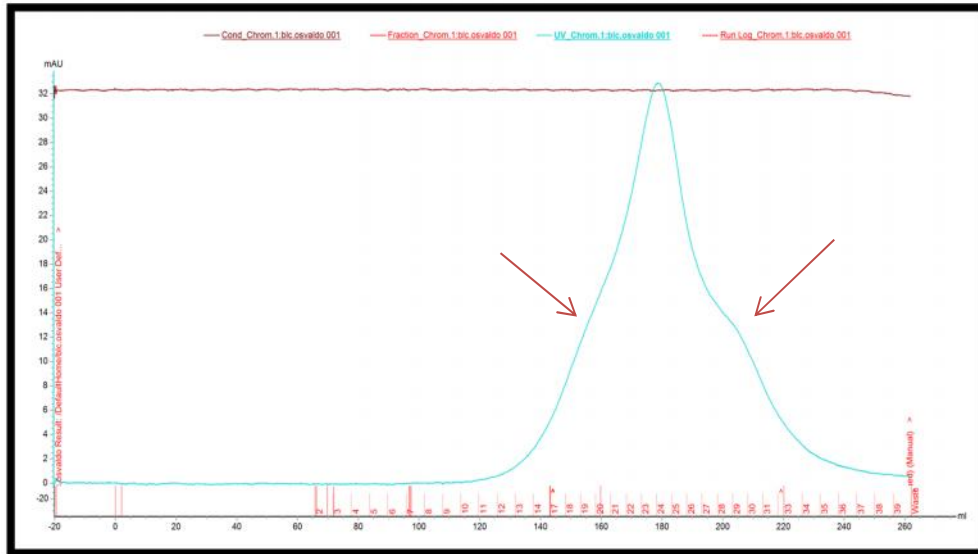


**Figura 21.\_** Cromatograma obtenido durante la purificación de la enzima mediante la columna de intercambio iónico.

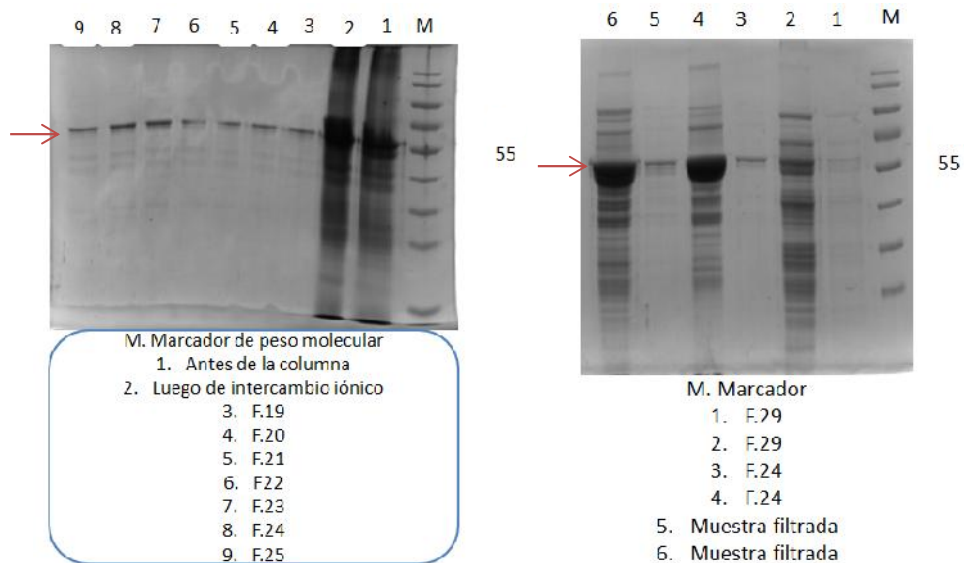


**Figura 22.\_** SDS-PAGE 10% de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de la enzima mediante la columna de intercambio iónico. Las columnas 5,6 y 7 muestran concentraciones mayores de la enzima purificada para una mejor visualización de lo que se obtuvo durante la purificación. F=Fracción.

Posteriormente, las fracciones más puras obtenidas por este método fueron inyectadas en una columna de exclusión molecular Sephacryl 300, siguiendo el método descrito anteriormente. En el cromatograma (Figura 23) se observa el solapamiento de dos picos en cada extremo del pico principal y los análisis en SDS-PAGE al 10 % siguen mostrando la presencia de otras bandas en la muestra después de la purificación (Figura 24):

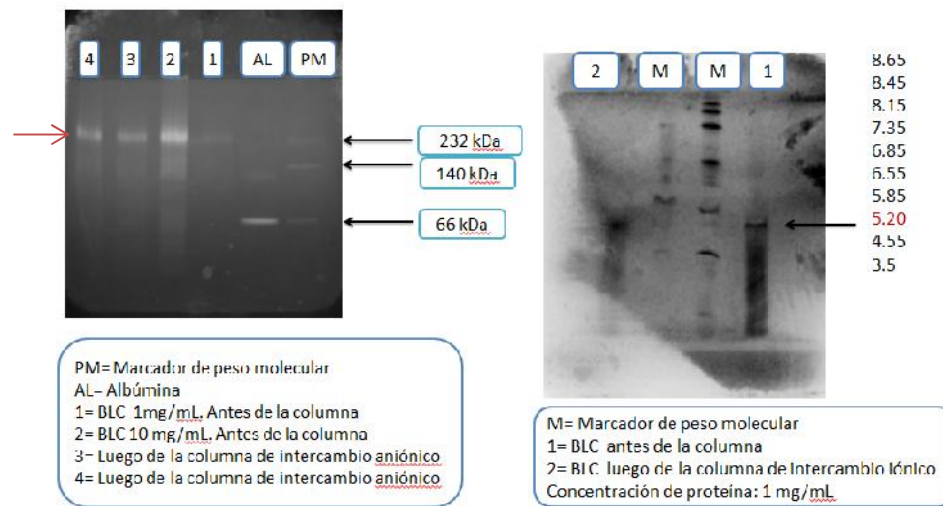


**Figura 23.** Cromatograma obtenido luego del proceso de purificación de la enzima mediante la columna de exclusión molecular Sephacryl 300. No se obtiene un pico uniforme en el cromatograma, esto debido a posibles formas alternativas o estados de oligomerización de la enzima, al igual que lo reportado por Prakash y colaboradores<sup>39</sup> o impurezas.



**Figura 24.** SDS-PAGE 10% de algunas fracciones colectadas luego de la purificación mediante la columna de exclusión molecular. La fracción 29 corresponde al “hombro” derecho del cromatograma y la fracción 24 se encuentra en medio de la señal más intensa. F=Fracción.

También se evaluó la composición de la muestra mediante geles nativos y geles de isoelectroenfoque PHAST SYSTEM (Figura 25):



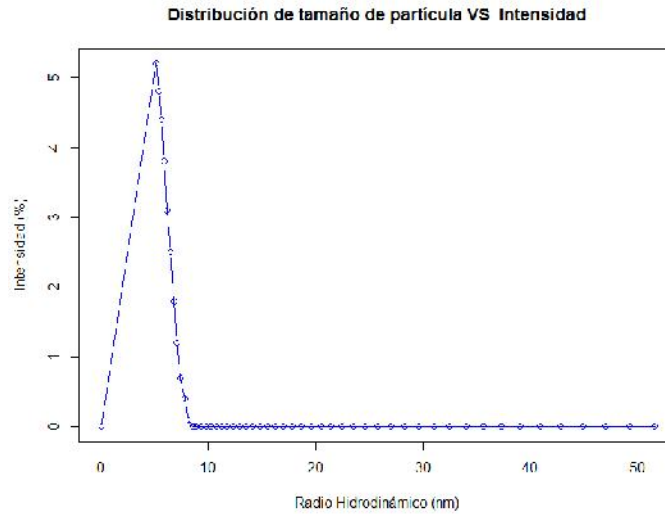
**Figura 25.** Análisis de la composición de la muestra de catalasa de hígado bovino mediante geles nativos e isoelectroenfoque. En el gel nativo se utilizó albúmina como proteína de referencia, la cual tiene una masa molecular de aproximadamente 66 kDa.

En dicho gel se puede observar que está presente el tetrámero, que corresponde a la banda de aproximadamente 240 kDa. Como punto de comparación se cargó albúmina, la cual tiene una masa molecular alrededor de 66 kDa, valor aproximado a la masa molecular del monómero de la BLC.

De igual manera, se corroboró el punto isoeléctrico de la enzima mediante isoelectroenfoque con geles PHAST SYSTEM IEF 3-9. Se obtuvo un valor de 5.2, el cual es muy cercano al punto isoeléctrico teórico (que es de 5.4).

En ambos geles no se observa de manera clara la presencia de otros contaminantes en la muestra, ya sea antes o después de los pasos de purificación en columna.

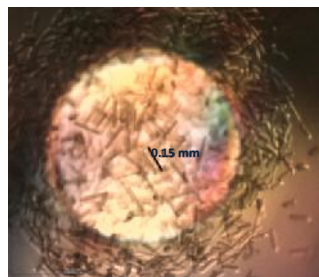
Como otra manera de analizar la composición de la muestra, se realizaron ensayos de dispersión dinámica de luz con el equipo Zetaziser nano SP de Malvern Instruments. Se obtuvo una señal intensa con un radio hidrodinámico cercano a 5, el cual corresponde al tetrámero de la enzima. El equipo indicó una muestra monodispersa (Figura 26), a pesar de observar una gran cantidad de bandas en los geles de SDS-PAGE 10%:



**Figura 26.**\_ Análisis de la muestra de catalasa mediante dispersión dinámica de luz en un equipo Zetazaiser nano SP de Malvern. La muestra se analizó sin ningún paso de purificación y se observó un solo pico alrededor de un tamaño de radio hidrodinámico de 5, correspondiente al tetrámero de la enzima.

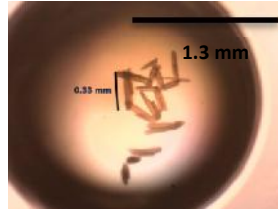
- Cristalización:

Los cristales fueron generados a partir de la proteína obtenida en los procesos de purificación y crecidos en la condición proporcionada por la Dra. Stojanoff, los cuales difractaron a una resolución aproximada de 2.55 Å (Figura 27). Como nosotros nos encontramos interesados en obtener imágenes del sitio activo a una mejor resolución (superior a 2.0 Å) fue necesario realizar matrices variando el pH, concentración de proteína, concentración PEG 4000 y la temperatura. Todos los cristales crecidos en estas nuevas condiciones y que fueron difractados lo hicieron a una resolución de 2.8 – 3.0 Å (Tabla 7).



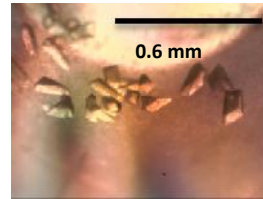
**Figura 27.**\_ Cristales de la catalasa de hígado bovino obtenidos por el método de *batch* mediante las condiciones provistas por la Dra. Stojanoff (BNL-EEUU).

A)



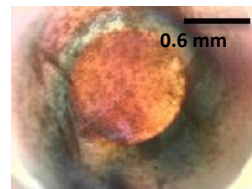
14.5 mg/mL de proteína. 0.01 M de HEPES pH 7. 15 % de PEG 4000. 0.1 M amortiguador de fosfatos pH 6.6. Método de gota colgante. Gota de 4  $\mu$ L. 18  $^{\circ}$ C

B)



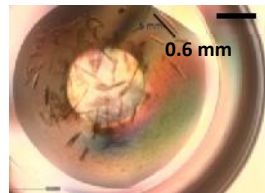
12.5 mg/mL de proteína. 0.01 M de HEPES pH 7. 15 % de PEG 4000. 0.1 M amortiguador de fosfatos pH 6.8. Método de *microbatch*. Gota de 8  $\mu$ L. 4  $^{\circ}$ C

C)



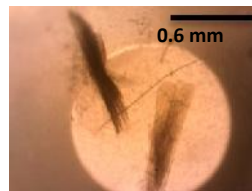
12 mg/mL de proteína. 0.01 M de HEPES pH 7. 22 % de PEG 4000. 0.1 M amortiguador de fosfatos pH 6.8. Método de *microbatch*. Gota de 8  $\mu$ L. 18  $^{\circ}$ C

D)



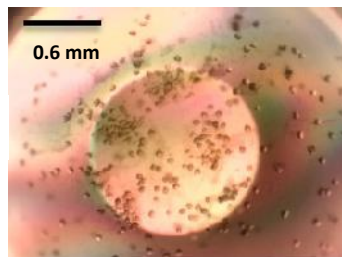
10.5 mg/mL de proteína. 0.01 M de HEPES pH 7. 15 % de PEG 4000. 0.1 M amortiguador de fosfatos pH 6.8. Método de *microbatch*. Gota de 8  $\mu$ L. 18  $^{\circ}$ C

E)



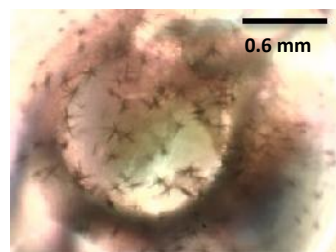
12.5 mg/mL de proteína. 0.01 M de HEPES pH 7. 15 % de PEG 4000. 0.1 M amortiguador de fosfatos pH 6.6. Método de *microbatch*. Gota de 8  $\mu$ L. 18  $^{\circ}$ C

F)

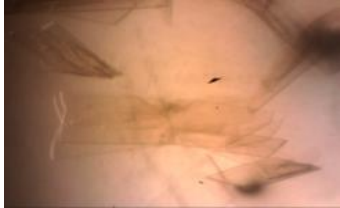

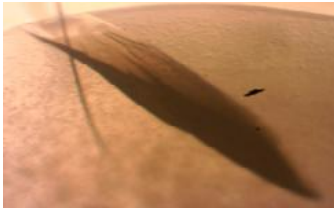
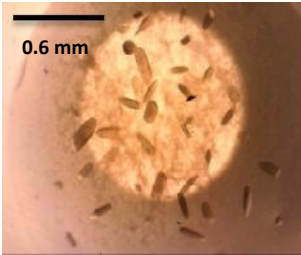
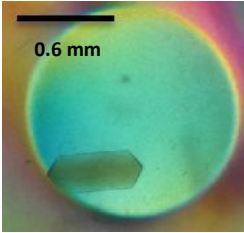
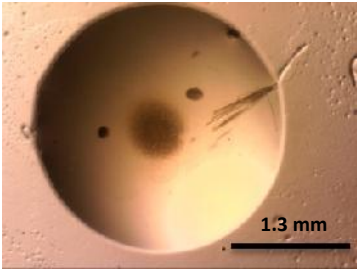


12.5 mg/mL de proteína. 0.01 M de HEPES pH 7, 200 mM de NaCl. PEG-ION (condiciones 2, 8, 10, 11). 20 % de PEG 3350. 0.2 M de KCl, 0.2 M de NaI, 0.2 M de KI. Método de *microbatch*. Gota de 8  $\mu$ L. 18  $^{\circ}$ C

G)

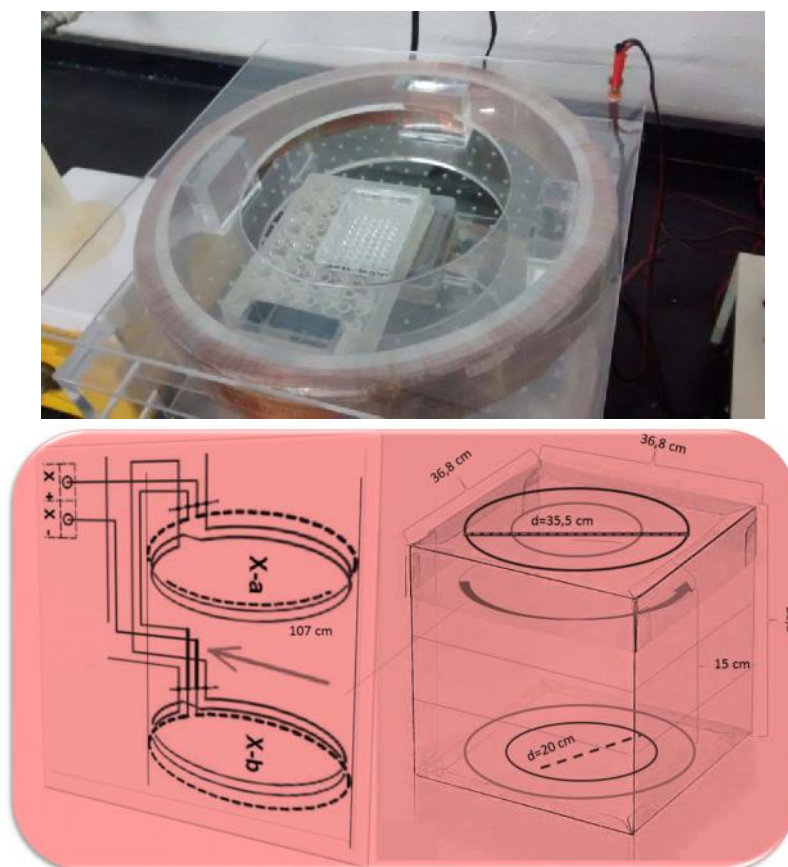


12.5 mg/mL de proteína. 0.01 M de HEPES pH 7. PEG-ION (Condición 1). 0.2 M de NaF. 20 % de PEG 3350. Método de *microbatch*. Gota de 8  $\mu$ L. 18  $^{\circ}$ C

H)		8.5 mg/mL de proteína. 15 % de PEG 4000. 0.1 M amortiguador de fosfatos pH 6.6. Método de gota sedente. Gota de 4 $\mu$ L. 18 °C
I)		40 mg/mL de proteína. 0.1 M de Hepes pH 7. 8 % de PEG 4000. Método de <i>microbatch</i> . Gota de proteína de 2 $\mu$ L + 1 $\mu$ L de agente precipitante . 18 °C
J)		40 mg/mL de proteína. 8 % de PEG 4000. 0.1 M amortiguador de fosfatos pH 6.6. Método de gota colgante. Gota de 4 $\mu$ L. 18 °C. Campo magnético de 20 Gauss. 2 semanas.
K)		40 mg/mL de proteína. 8 % de PEG 4000. 0.1 M de Hepes pH 7. Método de <i>microbatch</i> . Gota de 2 $\mu$ L de proteína + 1 $\mu$ L de agente precipitante. 18 °C. Campo magnético de 20 Gauss. 2-3 semanas.
L)		40 mg/mL de proteína. Hepes 10 mM pH 7.5. 8% de PEG 4000. 100 mM amortiguador de fosfatos pH 6.6. Método de <i>microbatch</i> . 2 meses a 4 °C y 40-60 Gauss + un mes a 18 °C en ausencia de campo magnético.
M)		<b>Catalasa de eritrocitos humanos.</b> 40 mg/mL de proteína. 6 % de PEG 4000. 50 mM de Tris pH 7.5. Método de gota colgante. 18 °C. 9 meses.

**Tabla 7.\_** Morfología de los cristales de catalasa de hígado bovino crecidos en diferentes condiciones. Los últimos cristales (M) corresponden a la catalasa de eritrocitos humanos.

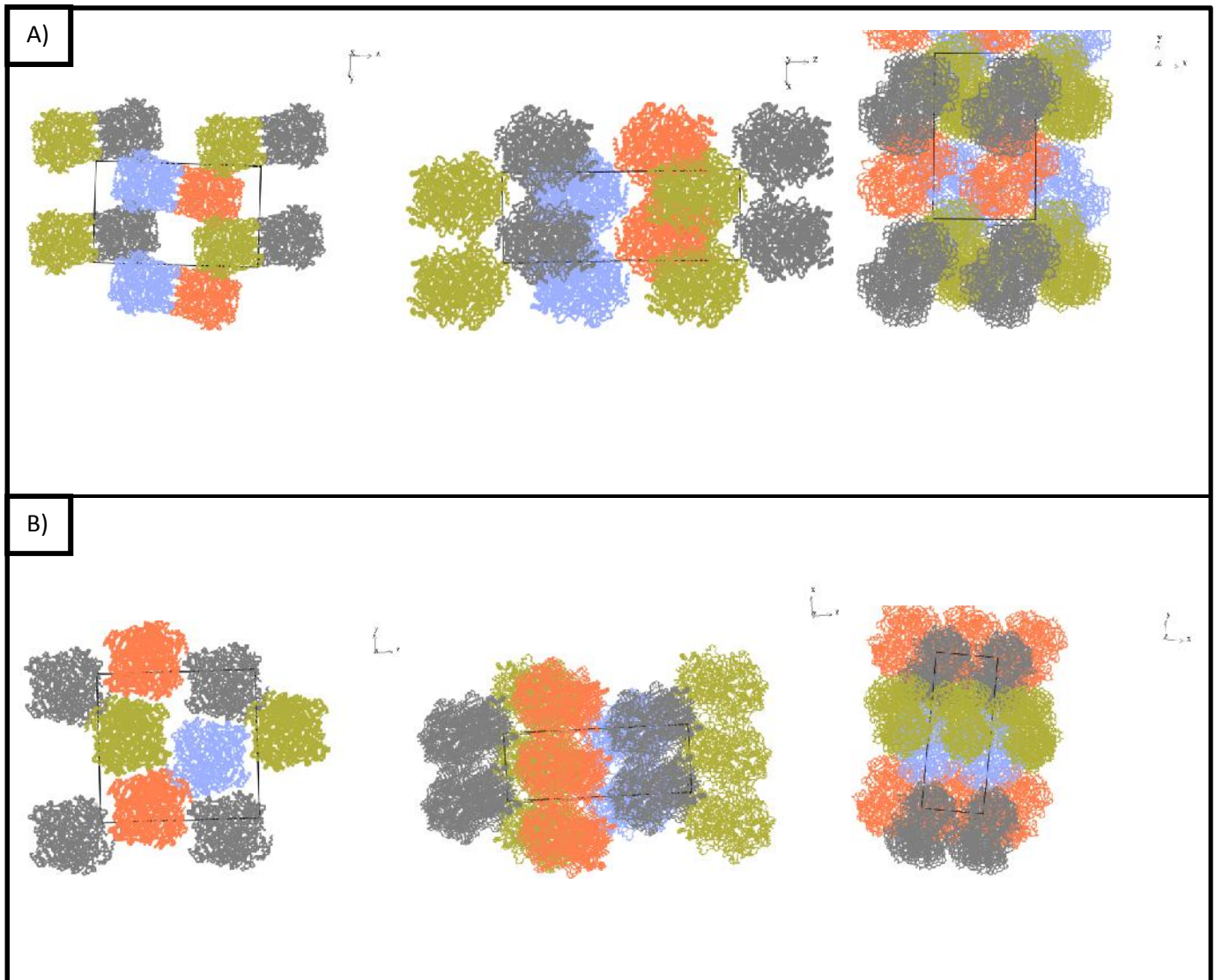
Para intentar obtener cristales que difractaran a una mejor resolución, se montaron nuevas pruebas de cristalización en presencia de un campo magnético radial creado por una bobina (Figura 28), este equipo fue proporcionado al laboratorio por la Dra. Georgina Ponce Romero del IBT-UNAM. Se esperaba que con ayuda del campo magnético, los cristales pudieran quedar orientados y mejorar su orden interno<sup>40</sup>. Mediante este método, se obtuvieron los cristales J, K y L de la tabla 7.



**Figura 28.** Equipo utilizado para las pruebas de cristalización en presencia de campos magnéticos. La bobina crea un campo magnético radial en donde la mayor intensidad se detecta en el centro de la circunferencia. Diagrama elaborado por la Dra. Rayana Ruiz Arellano.

- Procesamiento de los datos:

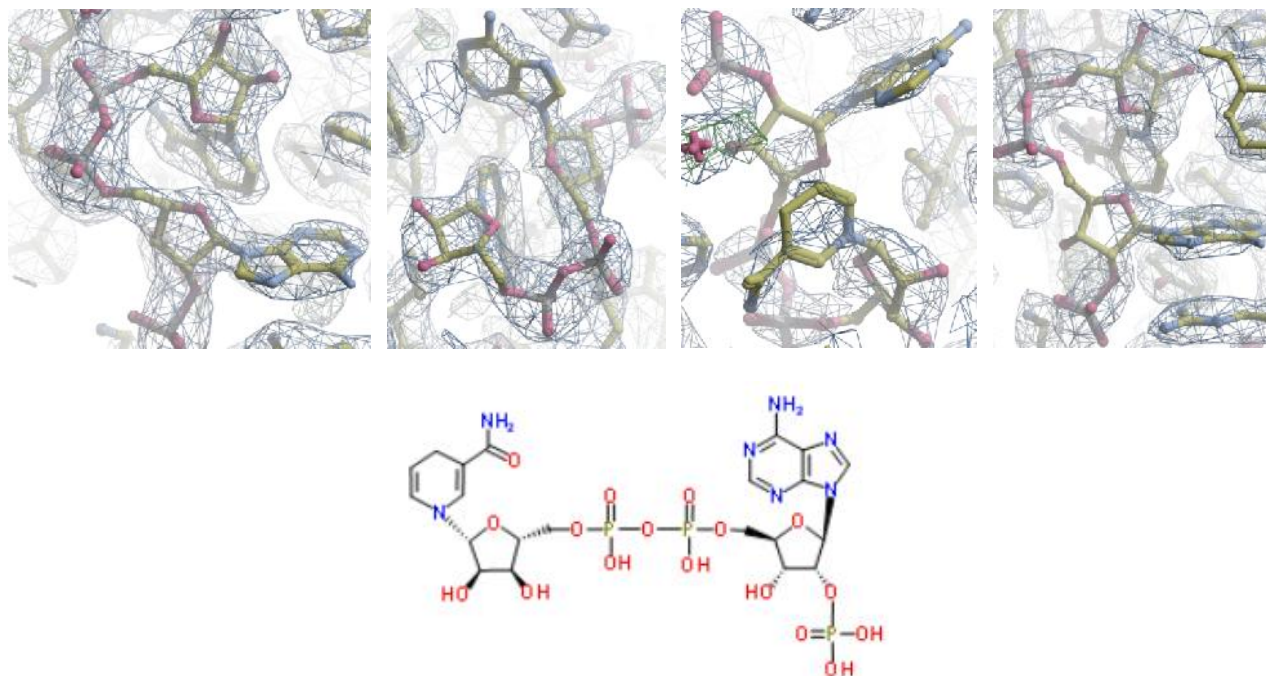
Para el análisis de los datos de difracción y obtención de las estructuras cristalográficas se utilizaron los programas mencionados en la sección metodológica. Todos los cristales difractados poseían la forma II, con excepción de las láminas delgadas (Figura C de la tabla 7) que se obtuvieron con 8.5 mg/mL de proteína, 15 % de PEG 4000 y 0.1 M amortiguador de fosfatos pH 6.6 por el método de gota sedente a 18 °C, los cuales presentaron la forma III ya reportada y caracterizada anteriormente mediante difracción de electrones por otros grupos y utilizando polímeros que facilitan la formación de esta forma cristalina<sup>41,42</sup> (Figura 29).



**Figura 29.** Formas II (A) y III (B) de cristales de catalasa de hígado bovino.

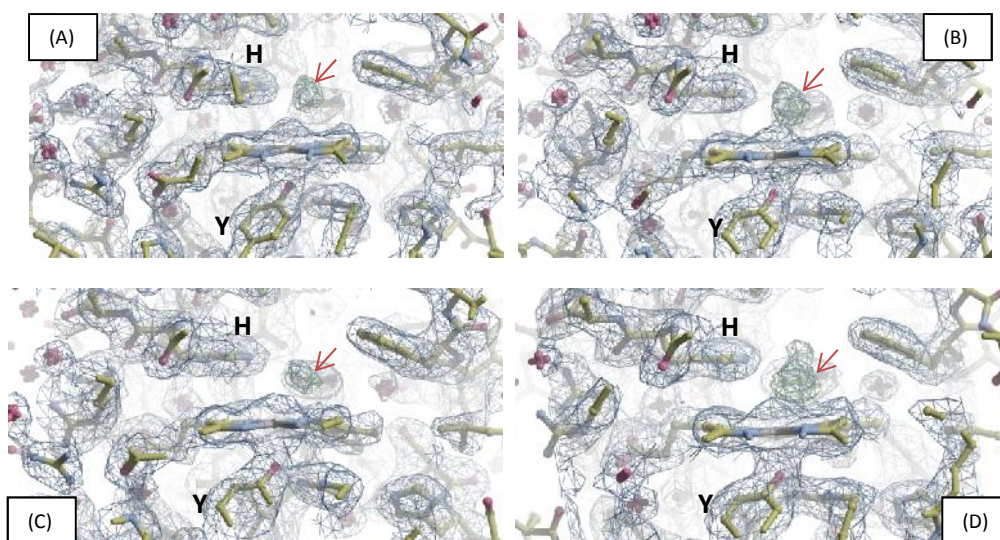
Al analizar con detenimiento las estructuras obtenidas en las fases iniciales de afinamiento, se apreció una gran cantidad de densidad electrónica positiva que se encontraba cerca de la superficie de cada uno de los monómeros de la enzima, la cual coincidía con el NADP(H). Al parecer el primer lote de catalasa de hígado bovino de Sigma utilizado venía con este cofactor unido a la enzima (Figura 30).





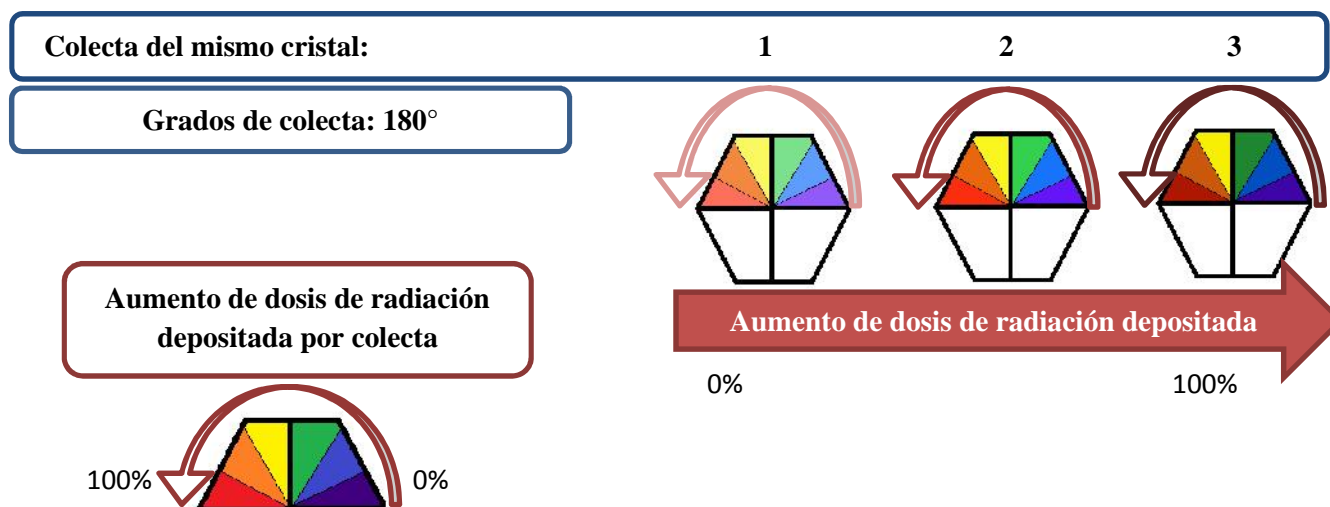
**Figura 30.-** Se observó que el primer liofilizado de BLC de Sigma con el cual se trabajó, contenía NADP(H) unido a la enzima. En esta imagen se puede apreciar que el dinucleótido encaja adecuadamente con el mapa de densidad electrónica. Las ocupaciones correspondientes para cada monómero son: 0.91 para los monómeros A y B, 0.77 para el monómero C y 0.82 para el monómero D. El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1  $\sigma$  y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5  $\sigma$ .

Los primeros cristales fueron crecidos y difractados en el NSLS en Nueva York, utilizando la solución crioprotectora que no contenía ácido peracético (condición en estado de reposo). En la Figura 31 se puede apreciar el sitio activo de cada uno de los monómeros de la enzima. La densidad electrónica positiva (verde) que se encuentra entre el hierro del grupo hemo y la histidina 74 en la parte distal, correspondería a una molécula de agua. Para fines de comparación con el sitio activo en condiciones oxidantes, se ha omitido dicha molécula en el modelo. Nótese que aparece una densidad electrónica indeterminada en uno de los extremos del grupo hemo del monómero D. Se desconoce la razón de la aparición de esta densidad electrónica, pero intrigantemente se encuentra en varias estructuras analizadas durante el desarrollo del presente trabajo.



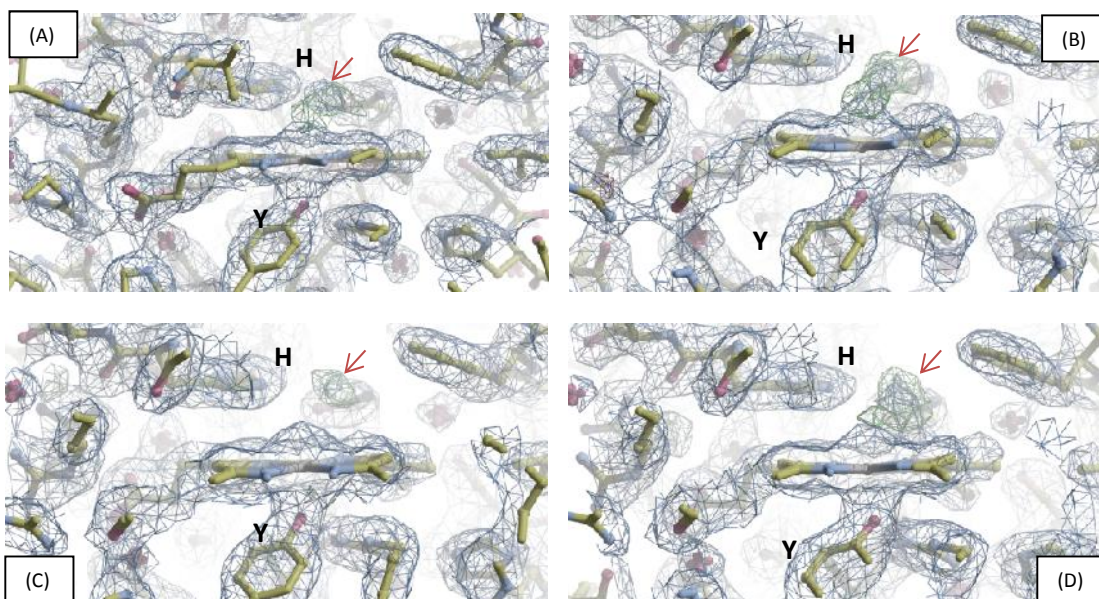
**Figura 31.-** Sitios activos de cristales de BLC en estado de reposo a 2.29 Å de resolución. El mapa  $2F_{obs} - F_{calc}$  se encuentra a  $1\sigma$  y el mapa  $F_{obs} - F_{calc}$  a  $3.5\sigma$ . Y=Tirosina357 y H=Histidina74. Código de estadísticas de la tabla 8: **BLC-R-1,200**.

Posteriormente se obtuvieron las estructuras cristalográficas de cristales remojados en ácido peracético (para obtener el Compuesto I). La estrategia de colecta consistió en girar el cristal con un rango de oscilación de 0.5 hasta obtener 180 grados. Dicho proceso se repitió en tres ocasiones, obteniendo de esta manera tres conjuntos de datos del mismo cristal, pero con una dosis de rayos X absorbida cada vez mayor, lo que propiciaría una reducción cada vez mayor del sistema (Figura 32).



**Figura 32 . \_** Diagrama de la estrategia de colecta utilizada.

La Figura 33 muestra el sitio activo de los cuatro monómeros en estado oxidado, utilizando los 180 grados totales de la primera colecta para el análisis de los datos. Como se puede apreciar (al menos de manera más clara en los monómeros A y B), existe la presencia de densidad electrónica positiva (verde) que inicia en el hierro de grupo hemo y se extiende hacia la histidina 74 en la parte distal del sitio activo. La presencia de este flujo de electrones podría ser un indicativo de que algún proceso se está llevando a cabo en el sitio activo de la enzima, a diferencia de lo observado en cristales en condiciones nativas. En el monómero C no se aprecia algún cambio significativo y el monómero D nuevamente presenta una densidad electrónica cuyo comportamiento que no se puede explicar.

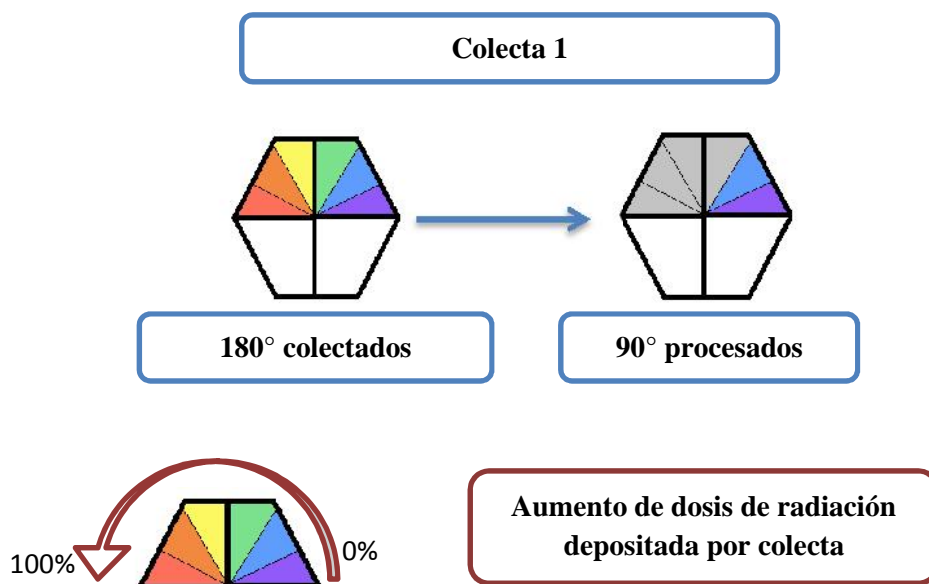


**Figura 33.-** Sitios activos de cristales de BLC remojados en ácido peracético a 2.3 Å de resolución. Para obtener esta estructura se utilizaron los 180 grados totales de la primera colecta. El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1  $\sigma$  y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5  $\sigma$ . Y=Tirosina357 y H=Histidina74.

Al utilizar los 180 grados de colecta para el análisis de datos, estamos observando un promedio de todo el proceso de reducción del sitio activo, es por este motivo que se tiene que reducir el número de imágenes de difracción para poder capturar el estado que estamos buscando. Al tratarse de una proteína que cristaliza en un grupo espacial ortorrómbico (al menos las formas II y III), el número mínimo de imágenes de difracción a analizar debe contener noventa grados de colecta del cristal. Se obtuvieron estructuras en las cuales se probaron diferente número de grados y segmento de cristal, esto con la finalidad de seleccionar aquella estructura que tuviera los mejores parámetros estadísticos de colecta de datos y de afinamiento, sin comprometer la visualización el compuesto I. En el ANEXO A se muestran imágenes de los sitios activos de estas estructuras con mapas de omisión a 1  $\sigma$  en las cuales se intentó visualizar el compuesto I. A partir de estas pruebas se apreció que ligeros cambios en el número y segmento de imágenes de difracción utilizadas, así como en resolución e integridad, propiciaban que el compuesto I se visualizara o no en un monómero u otro.

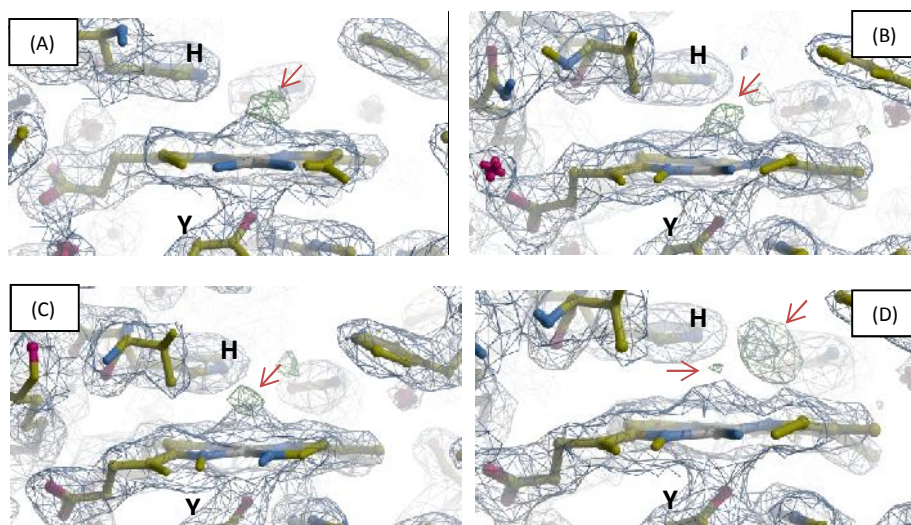
Al ser la resolución un aspecto fundamental en la visualización del compuesto I y al no poder mejorarla mediante pruebas de cristalización, se probaron nuevos criterios para el corte de resolución de los datos. Se obtuvieron nuevas estructuras a mejor resolución, ya que no se tomó en cuenta el  $R_{\text{Merge}}$  como criterio de corte de resolución y en su lugar se dio mayor importancia al  $CC1/2$ , como ya se mencionó en la sección de materiales y métodos (Ver Glosario).

En la Figura 35 se muestran los sitios activos de los mismos datos tratados anteriormente, utilizando solamente 90 grados de colecta (ver Figura 34). Al calcular la dosis de rayos X absorbida por el cristal mediante el programa RADDPOSE-3D (ANEXO B), se obtuvo una dosis depositada de 0.02 MGy para dicha estructura.



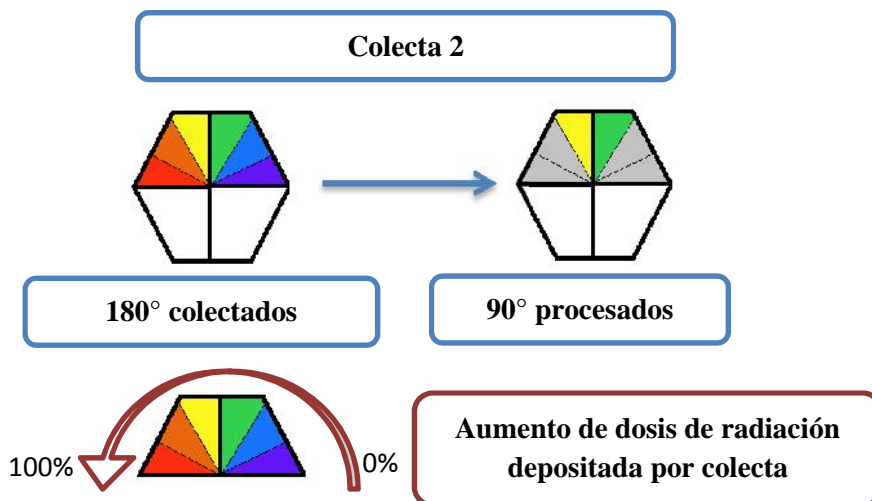
**Figura 34.-** Esquema que representa los grados y segmento del cristal procesado para lograr estructuras con la menor dosis de radiación depositada posible. Ver Figura 35.

En esta estructura se puede observar la presencia de una densidad positiva esférica (verde) en los monómeros A, B y C; la cual, se encuentra a una distancia de 1.7 Å del hierro. Dicha densidad electrónica parece corresponder a un oxígeno enlazado covalentemente con el hierro, tal como se esperaría para el compuesto I. Para el caso del monómero D, se observa una densidad electrónica que no puede ser asignada, ya que en ningún reporte (ya sea de cristalografía, resonancia paramagnética electrónica, etc.) se ha descrito algo así hasta el momento.



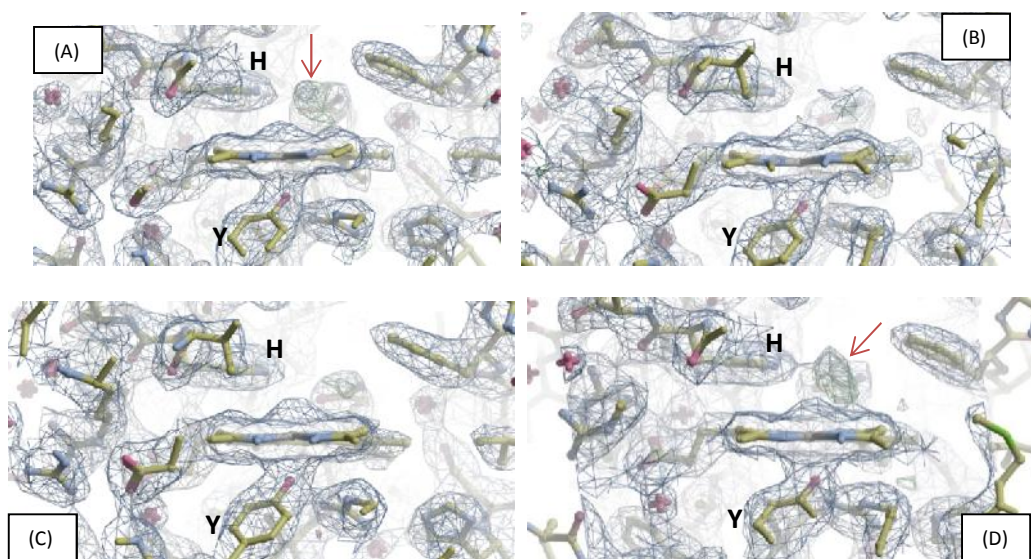
**Figura 35.-** Sitios activos de cristales de BLC remojados en ácido peracético a 2.34 Å de resolución. Para obtener esta estructura se utilizaron solamente 90 grados de la primera colecta del mismo cristal. El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1  $\sigma$  y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5  $\sigma$ . La dosis acumulada en el cristal fue de 0.02 MGy. Y=Tirosina357 y H=Histidina74. Código de estadísticas de la tabla 8: **BLC-APA1-1,193**.

Al utilizar noventa grados de un segmento diferente del cristal colectado dos veces (dosis de radiación absorbida calculada de 0.09 MGy), se observa la desaparición del compuesto I (Figura 36 y 37).



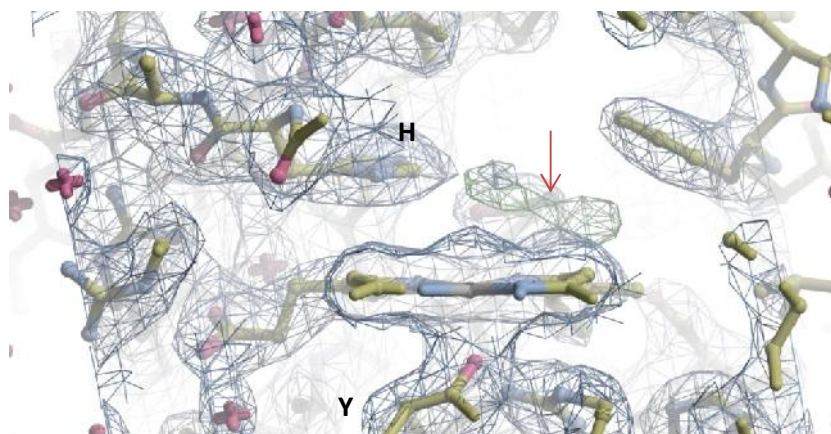
**Figura 36.-** Esquema que representa los grados y segmento procesados en la segunda colecta del mismo cristal para la obtención de estructuras con una dosis de radiación depositada mayor. Ver Figura 37.

En la Figura 37 se puede apreciar que ya no se encuentra la densidad electrónica que sugería la presencia del compuesto I. En los monómeros B y C no existe densidad electrónica en la cercanía del hemo, mientras que en los monómeros A y D ahora se observa densidad electrónica en uno de los extremos del grupo hemo que se prolonga hacia la histidina 74 en la parte distal.



**Figura 37.-** Sitios activos de cristales de BLC remojados en ácido peracético a 2.48 Å de resolución. Para obtener esta estructura se utilizaron solamente 90 grados de la segunda colecta del mismo cristal. El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1  $\sigma$  y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5  $\sigma$ . La dosis acumulada en el cristal fue de 0.09 MGy. Y=Tirosina357 y H=Histidina74. Código de estadísticas de la tabla 8: **BLC-APA2-89,276**.

De igual manera, se difractaron cristales en el SSRL, en Stanford, siguiendo la misma estrategia de colecta que en el caso anterior. Al ser esta línea más intensa que la del NSLS, la dosis absorbida calculada fue de 0.25 MGy (para la primera de las tres colectas del mismo cristal). Tal vez este efecto propició de que no se pudiera observar ningún cambio en los monómeros A, B y C; sin embargo, continúa observándose la densidad electrónica que se prolonga desde un extremo del grupo hemo hacia la histidina 74 para el caso del monómero D (Figura 38).



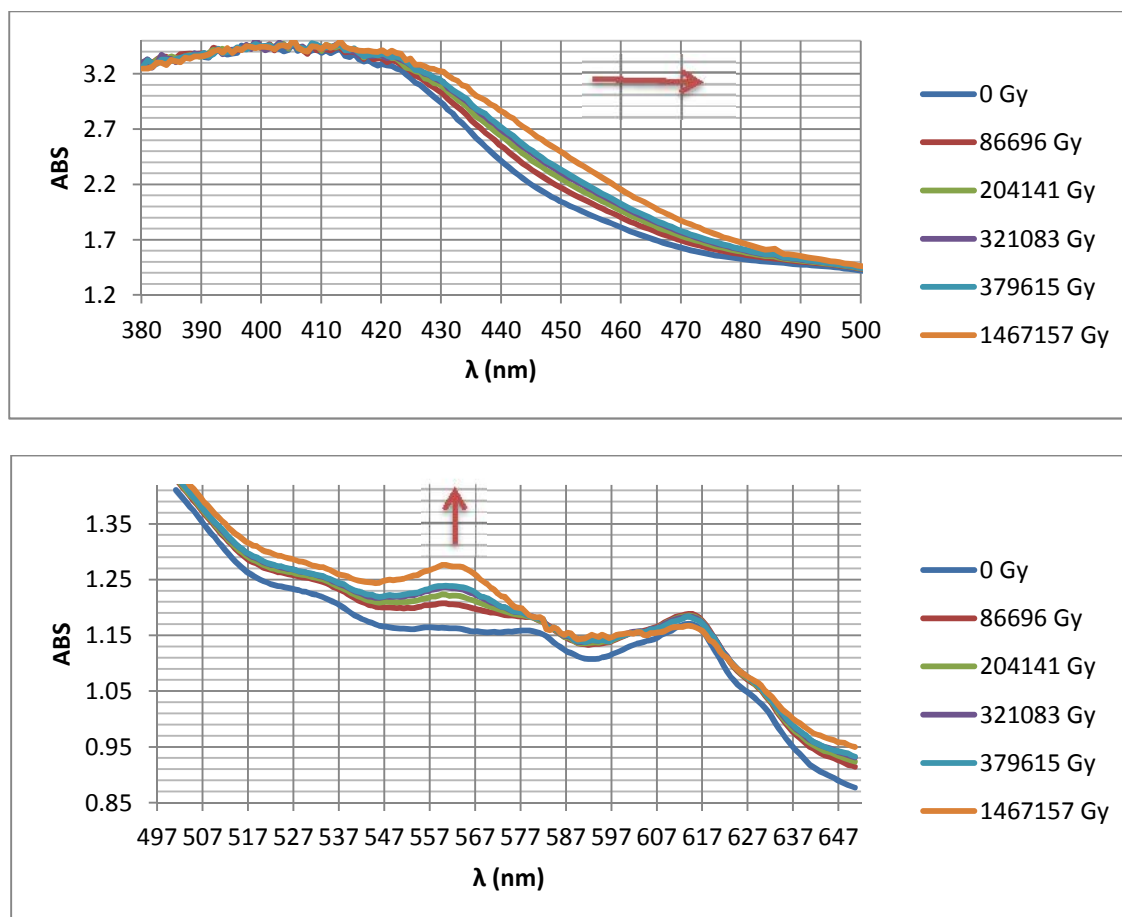
**Figura 38.**-Cambios observados en el sitio activo de la enzima en el monómero D a una resolución de 2.5 Å. El mapa  $2F_{obs} - F_{calc}$  se encuentra a 1  $\sigma$  y el mapa  $F_{obs} - F_{calc}$  a 3.5  $\sigma$ . La dosis acumulada en el cristal fue de 0.25 MGy. Y=Tirosina357 y H=Histidina74.

PARÁMETROS	BLC-APA1-1,193	BLC-APA2-89,276	BLC-R-1,200
<b>Estadísticas de la colección de datos</b>			
Grupo espacial	19 - P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	19 - P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	19 - P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Parámetros de la celda unitaria a,b,c (Å) $\alpha, \beta, \gamma$ (°)	83.37, 140.36, 228.41 90.0, 90.0, 90.0	83.48, 140.50, 228.62 90.0, 90.0, 90.0	83.14, 140.05, 228.24 90.0, 90.0, 90.0
Rango de resolución (Å)	140.36 – 2.34	50-2.48 10-2.48	119.37 – 2.29
Número de reflexiones totales	442089 (4209)	284788 (29397)	492186 (4859)
Número de reflexiones únicas	106860 (1098)	67210 (7056)	114691 (1182)
Integridad (%)	94.4 (96.1)	89.9 (92.2)	95.4 (97.0)
CC1/2 (%)	99.2 (65.1)	99.2 (82.6)	99.1 (64.4)
Robs (%)	12 (71)	14 (81)	13.4 (69.6)
Rexp (%)	12.6 (71)	14 (81)	15.0 (77.6)
I/ (I)	11.3 (2.0)	11.1 (2.0)	10.6 (2.0)
Multiplicidad	4.1 (3.8)	4.0 (4.1)	4.3 (4.1)
Monómeros por unidad asimétrica	4	4	4
<b>Estadísticas del afinamiento</b>			
Rwork	0.1814	0.1664	0.1948
Rfree	0.2148	0.2263	0.2536
Error en enlace (Å)	0.008	0.008	0.008
Error en ángulo (°)	1.216	1.201	1.029

**Tabla 8.** Estadísticas de colecta de datos y afinamiento de las estructuras de catalasa de hígado bovino en estado de reposo y remojado en ácido peracético. Los datos en paréntesis corresponden a la faja de mayor resolución en cada caso.

- Microespectrofotometría UV-Vis.

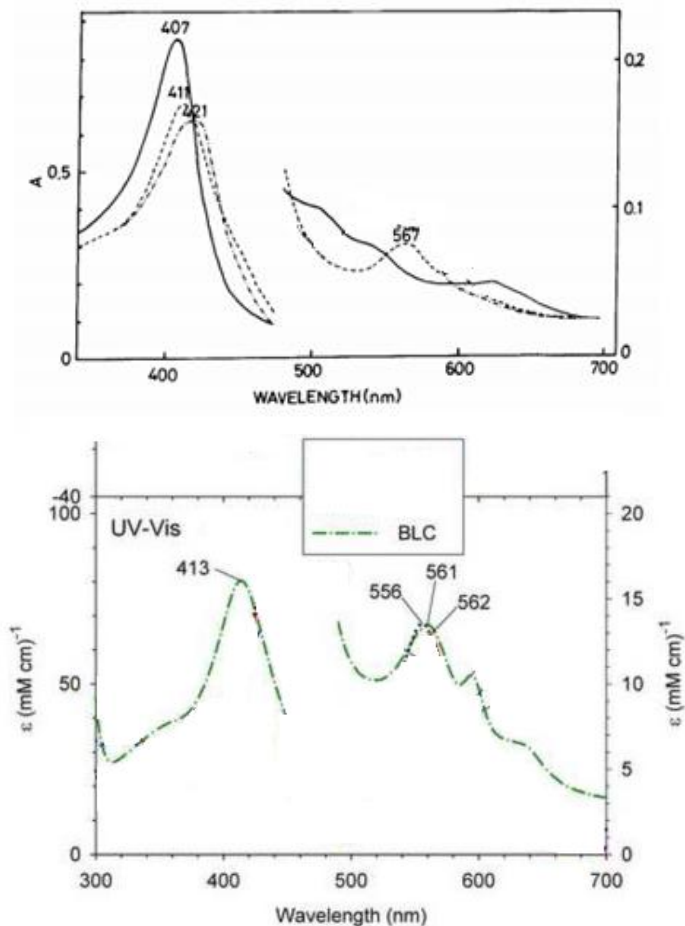
Para observar la susceptibilidad de los centros metálicos de cristales de la enzima frente a los rayos X, se colectaron espectros UV-Visible en la línea 11-1 de SSRL, en Stanford (ANEXO C). En la Figura 39 se muestra la Banda de Soret, un pico de absorción que se localiza a aproximadamente a 410 nanómetros y que es característico en hemoproteínas. A dosis mayores de radiación, este pico presenta un efecto batocrómico, lo cual nos indica cambios en los sitios activos de la catalasa de hígado bovino. Además de la Banda de Soret, otra región característica de las hemoproteínas en el espectro UV-Visible corresponde a la región localizada entre 500 y 650 nanómetros aproximadamente. Como se puede observar en el segundo espectro de la Figura 39, conforme aumenta la dosis absorbida de rayos X, se observa la aparición de un pico entre los 557 y 567 nm. Este pico indica la reducción del hierro del grupo hemo, el cual se reduce a su estado ferroso. Esta aseveración se hace a partir de la comparación de los espectros obtenidos del cristal de nuestra proteína, con espectros de la proteína en solución o de espectros de otras catalasas de subunidades pequeñas a las cuales se le hicieron experimentos similares en estado cristalino<sup>44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54</sup>.



**Figura 39.-** Cambios en el espectro UV-Vis de cristales de la catalasa de hígado bovino a dosis crecientes de rayos X (de 0 MGy a 1.467157 MGy).



A manera de ejemplo, se muestran dos espectros en los cuales también se ve la aparición del pico en aproximadamente 560 nm de catalasa en solución. En estos experimentos, la reducción se llevó a cabo mediante procedimientos físicos y químicos.



**Figura 40.-** Espectros de catalasa en solución reducidos con ditionita o por fotorreducción con lámpara de tungsteno. (Modificado de 48 y 49). El primer espectro muestra la reducción del hierro a un estado de oxidación de +2 mediante fotorreducción de la catalasa en solución mediante una lámpara de tungsteno y el segundo ejemplo muestra el proceso de reducción inducido por ditionita.

- Consideraciones generales:

Podemos resaltar dos aspectos importantes en cuanto al análisis de datos de difracción durante la obtención de las estructuras mostradas durante el presente trabajo. En primer lugar, el incorporar reflexiones débiles en la faja de mayor resolución nos permitió trabajar las estructuras a una mejor resolución, no detectando alteraciones importantes en los mapas de densidad electrónica. Al parecer no es necesario dar tanto peso al estadístico  $R_{\text{Merge}}$  para el corte de resolución si se cuentan con valores apropiados de integridad (al menos del 90%),  $I/\sigma(I)$  (cercano a 2),  $CC1/2$  (al menos entre 50-60 %).

En segundo lugar, al no contar con datos de difracción suficientes para realizar los paquetes de datos compuestos (como hicieron Berglund y colaboradores), tuvimos que buscar un equilibrio entre estadísticos de colecta de datos y afinamiento, así como visualización del compuesto I en el sitio activo. Al ser este intermediario catalítico fácilmente afectado por la radiación, utilizar un amplio rango de grados de difracción propiciaría no poder detectarlo. Por otro lado, el no utilizar el rango de grados de difracción suficientes afectaría las estadísticas (integridad principalmente, pero también se debería utilizar una resolución menor para compensar los otros estadísticos).

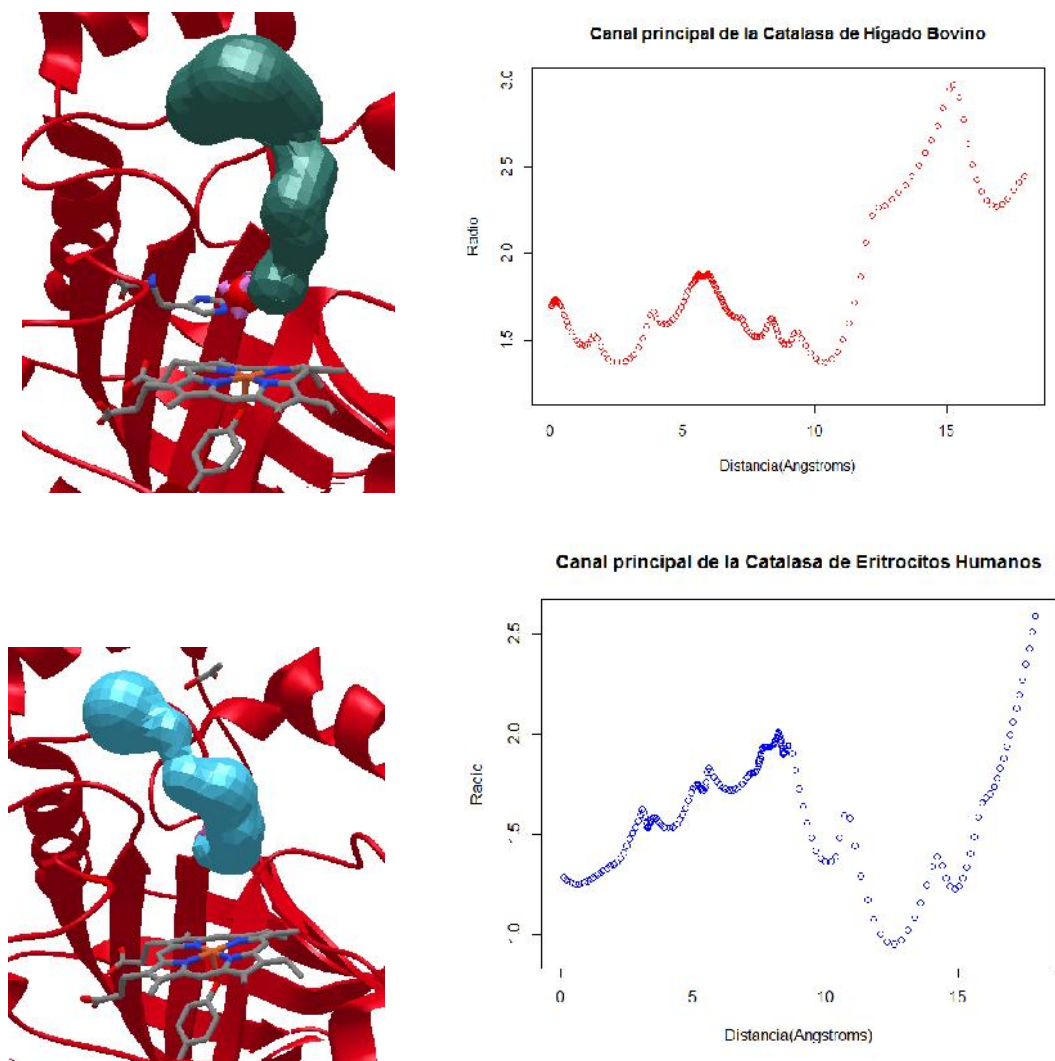
La combinación de todos los aspectos anteriores nos permitió obtener estructuras con las características suficientes para visualizar lo que parece ser el compuesto I en tres de los cuatro monómeros de la BLC con la distancia entre el oxígeno y el hierro del grupo hemo esperada (aproximadamente 1.7 Å). El compuesto I se pierde fácilmente en todos los monómeros a dosis mayores de radiación y en algunos casos aparece una densidad electrónica que se proyecta desde uno de los extremos del grupo hemo. Se desconoce a qué se deba la aparición de esta densidad electrónica, pero es más frecuentemente observada en el monómero D.

Otros aspectos que parecerían importantes considerar, son la anisotropía de los cristales de proteína y la manera en que se colectan, ya que eso podría influenciar que un(os) monómero(s) de la proteína o segmento del cristal en general se vea más afectado por la radiación.

- Pruebas preliminares de la catalasa de eritrocitos humanos:

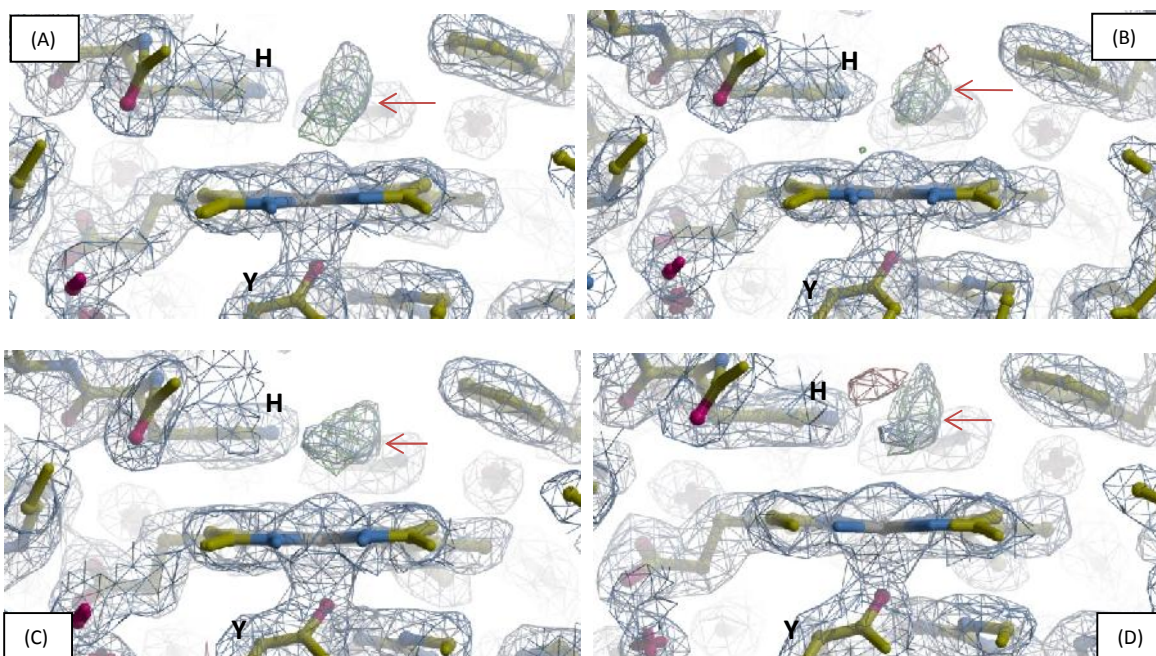
Además de la idea original de este trabajo, se decidió explorar los cambios en el sitio activo de otra catalasa de subunidades pequeñas. Para este propósito, se seleccionó a la catalasa de eritrocitos humanos, ya que se puede obtener comercialmente de Sigma a una alta pureza y además se cuenta con la estructura cristalográfica a una muy buena resolución ( $1.5 \text{ \AA}$ )<sup>23</sup>.

En la Figura 41 se hace una comparación entre el canal de acceso de la catalasa de hígado bovino y la catalasa de eritrocitos humanos con ayuda del programa MOLE 2.0. Las dos catalasas muestran, según este programa, un canal de acceso al sitio activo de la enzima con la misma longitud (aproximadamente  $20 \text{ \AA}$ ) y pequeñas diferencias en su radio (en el ANEXO D se muestra un alineamiento de secuencia y una superposición de las estructuras tridimensionales de ambas catalasas de subunidades pequeñas, contando con un 92% de identidad y un RMSD de 0.33).

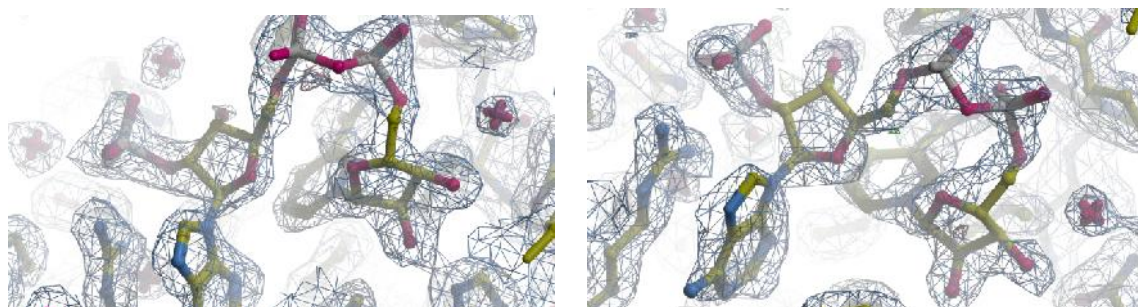


**Figura 41.-** Túnel principal de las catalasas de hígado bovino y eritrocitos humanos obtenidos mediante el programa MOLE 2.0. La gráfica de la derecha muestra la longitud y el radio de cada túnel.

En la Figura 42 se muestra el sitio activo de la catalasa de eritrocitos humanos en estado de reposo a 2.0 Å de resolución. En la parte distal del grupo hemo se puede apreciar la existencia de densidad electrónica positiva (verde), la cual puede corresponder a una molécula de agua. También se detectó la presencia de dos moléculas de NADP(H) (una en el monómero A y otra en el monómero C), ambos con una ocupación de 1 (Figura 43).



**Figura 42.-** Sitios activos de la catalasa de eritrocitos humanos en condiciones nativas a 2.0 Å de resolución. El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1 y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5 . Y=Tirosina358 y H=Histidina75. Estadísticas en la tabla 9.



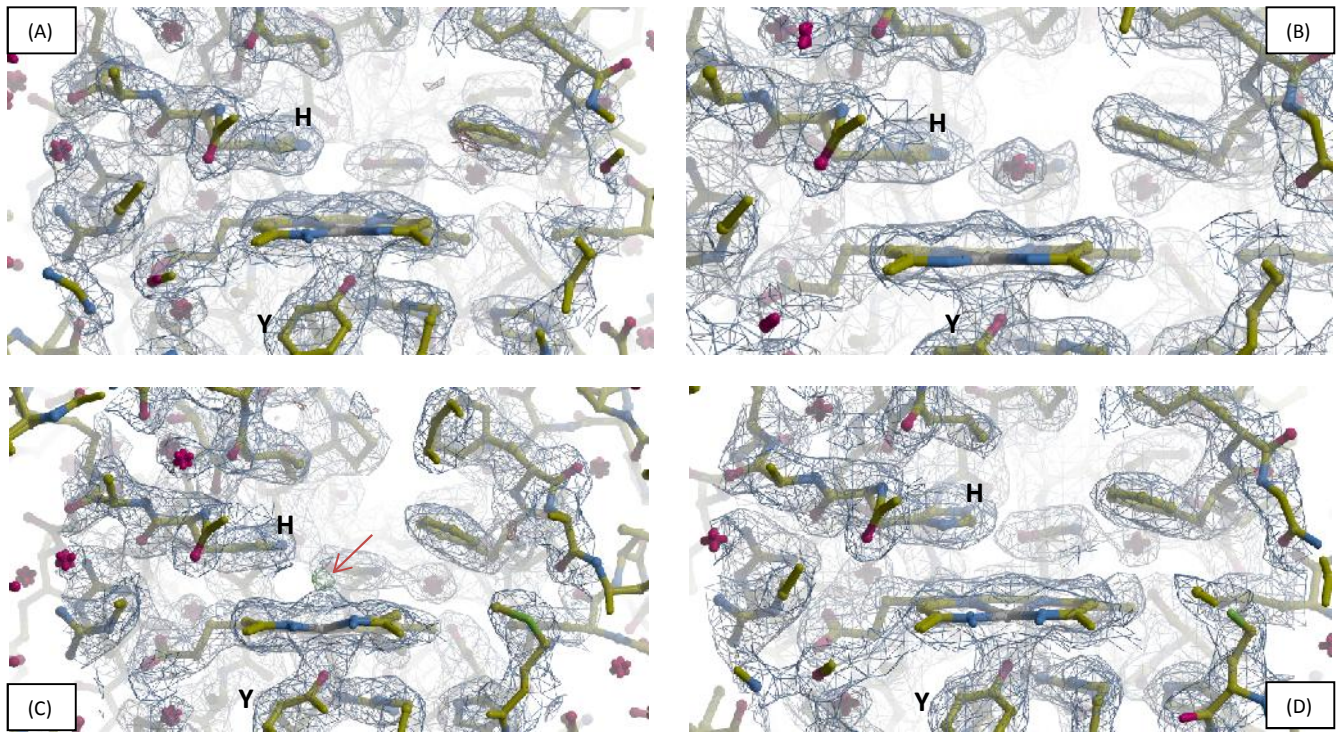
**Figura 43.-** La catalasa de eritrocitos humanos presentaba NADP(H) unido a los monómeros A y C con ocupaciones de 1. Estructura a 2.0 Å de resolución. El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1 y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5 .

PARÁMETROS	HEC
<b>Estadísticas de la colección de datos</b>	
Grupo espacial	19 - P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Parámetros de la celda unitaria a,b,c (Å) , , (°)	83.78, 139.87, 228.76 90.0, 90.0, 90.0
Rango de resolución (Å)	19.764-2.0
Número de reflexiones totales	1737108 (182246)
Número de reflexiones únicas	181391 (24452)
Integridad (%)	99.9 (100.0)
CC1/2 (%)	98.7 (64.5)
Robs (%)	25.3 (85.7)
Rexp (%)	25.3 (83.7)
I/ (I)	9.87 (2.48)
Multiplicidad	9.576(7.45)
Monómeros por unidad asimétrica	4
<b>Estadísticas del afinamiento</b>	
Rwork	0.2005
Rfree	0.2409
Error en enlace (Å)	0.008
Error en ángulo (°)	0.924

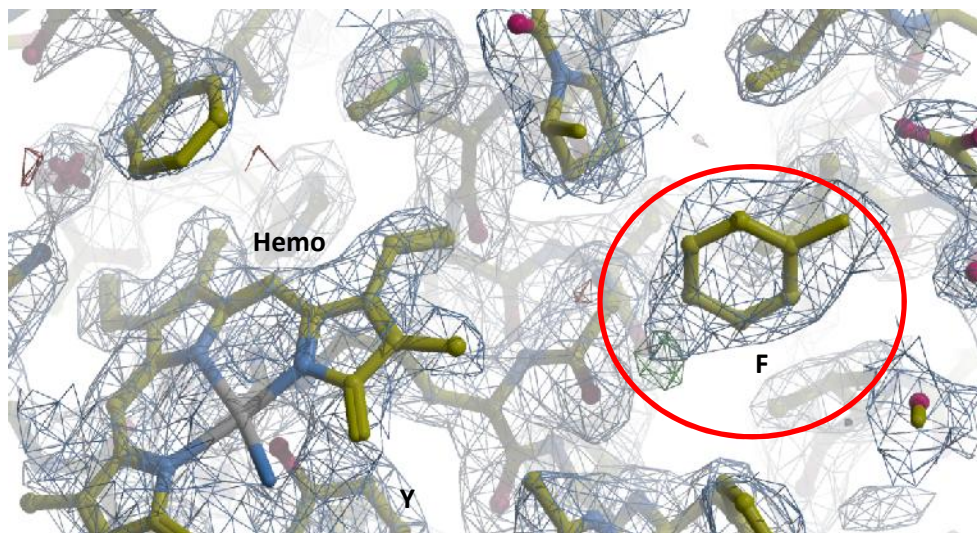
**Tabla 9.**\_ Estadísticas de colecta de datos y afinamiento de la estructura de catalasa de eritrocitos humanos. Los datos en paréntesis corresponden a la faja de mayor resolución en cada caso.

Asimismo, se difractaron cristales que habían sido remojados en solución de ácido peracético 100 mM. Aunque se observó el cambio de coloración de café a verde de los cristales, no fue posible apreciar el compuesto I en el sitio activo de la enzima, posiblemente debido a que dichos cristales se mantuvieron criopreservados en este estado durante seis meses o a la intensidad de la línea empleada en el SSRL. Al revisar los sitios activos de la estructura obtenida, no se observa la presencia de la densidad electrónica positiva en la parte distal del grupo hemo como sucedía en el estado de reposo. En su lugar, apareció una densidad electrónica esférica y continua cerca del hierro del grupo hemo del monómero C (a 2.4 Å de distancia aproximadamente), el cual podría ser indicativo de un compuesto I que se está perdiendo. Otro aspecto que cabe resaltar, es que existieron ligeros cambios en la geometría del grupo hemo, hecho que se apreció de manera un poco más clara en los monómeros C y D. Es debido a todos estos cambios en los sitios activos que se piensa que la reacción ya había concluido (Figura 44).

Otra diferencia observada en esta estructura, fue la aparición de una densidad electrónica positiva en la fenilalanina 57 de la cadena C que se encuentra cercana al grupo prostético hemo de la cadena A. Dicha densidad electrónica podría deberse a alguna alteración de este aminoácido, ya sea producto del ácido peracético o por el mecanismo de reacción de la enzima. Cabe mencionar que la fenilalanina se encuentra a 5.5 Å de distancia de uno de los vinilos del grupo hemo (Figura 45).

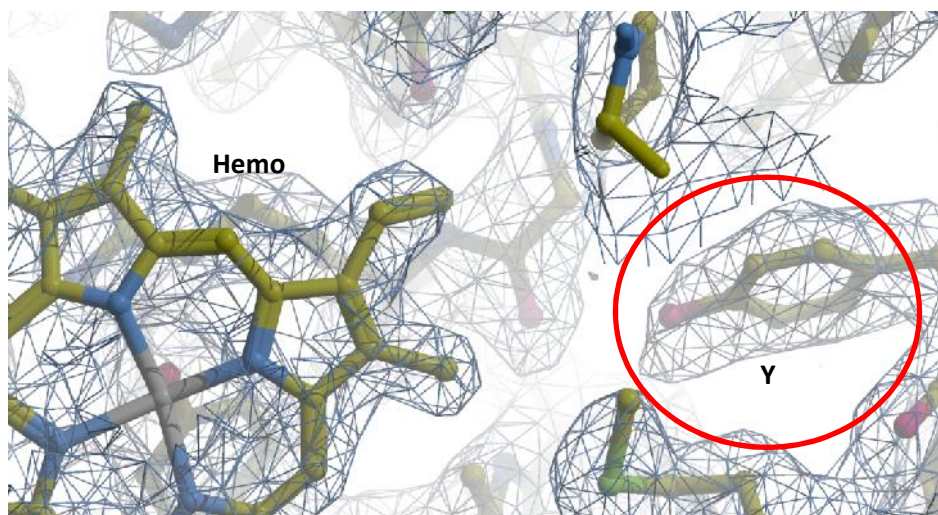


**Figura 44.-** Sitios activos de la catalasa de eritrocitos humanos luego del remojo de los cristales en la solución de ácido peracético a 2.29 Å de resolución. El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1 y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5 . Y=Tirosina358 y H=Histidina75. Estadísticas en la tabla 10.



**Figura 45.-** Densidad positiva que aparece en una de las fenilalaninas cercanas al grupo hemo (marcada con rojo) en cristales de catalasa de eritrocitos humanos que han sido remojados en solución de ácido peracético a 2.29 Å de resolución. El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1 y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5 . F=Fenilalanina57. Estadísticas en la tabla 10.

Debido a que pensamos que posiblemente el ácido peracético pudo haber oxidado la fenilalanina 57, se cambió este aminoácido por una tirosina y se observó que la densidad electrónica ajustaba adecuadamente con el nuevo aminoácido (Figura 46). Aunque no hay otras estructuras de catalasas depositadas en el PDB que reporten este fenómeno, consideramos que la oxidación de fenilalanina en tirosina podría ser factible, ya que existen trabajos en los cuales se describe la oxidación de triptófanos, fenilalaninas, tirosinas, etc. de diferentes proteínas al ser expuestas a agentes oxidantes<sup>22,55,56,57</sup>.



**Figura 46.-** Al cambiar la fenilalanina del modelo original por una tirosina, se puede apreciar que el mapa de densidad electrónica se ajusta adecuadamente (marcado con rojo). El mapa  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  se encuentra a 1 y el mapa  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  a 3.5 . Y=Tirosina57. Estadísticas en la tabla 10.

PARÁMETROS	HEC-APA
<b>Estadísticas de la colección de datos</b>	
Grupo espacial	19 - P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Parámetros de la celda unitaria a,b,c (Å) , , (°)	83.66, 142.65, 232.2179 90.0, 90.0, 90.0
Rango de resolución (Å)	121.55 – 2.29
Número de reflexiones totales	1841970 (18939)
Número de reflexiones únicas	123687 (1257)
Integridad (%)	98.3 (98.0)
CC1/2 (%)	98.7(48.1)
Robs (%)	32.2(172.8)
Rexp (%)	34.5 (184.9)
I/ (I)	10.9 (2.0)
Multiplicidad	14.9 (15.1)
Monómeros por unidad asimétrica	4
<b>Estadísticas del afinamiento</b>	
Rwork	0.2281
Rfree	0.2794
Error en enlace (Å)	0.009
Error en ángulo (°)	1.009

**Tabla 10.\_** Estadísticas de colecta de datos y afinamiento de las estructuras de catalasa de eritrocitos humanos de cristales remojados en solución de ácido peracético. Los datos en paréntesis corresponden a la faja de mayor resolución en cada caso.

## CONCLUSIONES

- Los rayos X redujeron los sitios activos de la catalasa de hígado bovino, ocurriendo este fenómeno de manera diferencial para cada monómero, tal como ya se había reportado anteriormente en el grupo con la catalasa 3 de *N. crassa*.
- Las imágenes del sitio activo durante el proceso de óxido – reducción son muy sensibles a los cambios de resolución, integridad, segmento del cristal analizado, etc. ya que al cambiar estos parámetros durante el tratamiento de los datos para la posterior obtención de la estructura cristalográfica se observó que había diferencias en cada uno de los sitios activos de la BLC, principalmente en cuanto a la apreciación o no del compuesto I en cada uno de los monómeros.
- En la región del espectro UV-Visible correspondiente a 557-567 nm se observó la aparición de un pico que sufría efecto hipercrómico conforme aumentaba la dosis de radiación X depositada en el cristal, indicando la reducción del hierro del grupo hemo. Este pico también se aprecia en los espectros UV-Visible obtenidos para el proceso de reducción inducido por rayos X en la catalasa 3 *N. crassa*.
- En todas las estructuras obtenidas de la BLC, el monómero D presentó una densidad electrónica que se encontraba entre un extremo del grupo hemo y la histidina 74 en la parte distal. Se desconoce a qué pueda corresponder dicha densidad electrónica, ya que no se ha reportado nada similar en otros trabajos.
- Si bien no se logró visualizar el compuesto I de la catalasa de eritrocitos humanos, se detectó la oxidación de la fenilalanina 57 en tirosina en cristales que habían sido remojados en solución 100 mM de ácido peracético durante un minuto.

## PERSPECTIVAS

- Colectar más espectros UV-Visible de cristales de BLC correspondientes a los otros estados del ciclo catalítico de la enzima.
- Obtener las estructuras de la BLC mediante datos compuestos.
- Realizar más pruebas de cristalización y de solución crioprotectora para intentar mejorar la resolución de los cristales de catalasa de eritrocitos humanos.
- Colectar el número suficiente de cristales de catalasa de eritrocitos humanos remojados en solución de ácido peracético para formar los paquetes de datos de difracción con diferente dosis de radiación absorbida y de esta manera, asegurar la visualización del compuesto I y los otros cambios que pudieran ocurrir durante el proceso de óxido - reducción. Se recomienda colectar cristales de dimensiones similares y en la misma línea de sincrotrón, como una manera de disminuir el número de variables en el experimento.
- Obtener espectros UV-Visible del proceso de reducción de la HEC.



## GLOSARIO

De manera muy breve, se presentan a continuación algunas definiciones de términos comúnmente utilizados en el análisis de la calidad de los datos y del modelo cristalográfico. También se definen los principios de algunos programas empleados para el análisis de datos y además algunas técnicas manejadas a lo largo del presente trabajo<sup>58,59,60,61,62,63,64,65</sup>.

### Análisis de la calidad de los datos y del modelo cristalográfico

1. **Valor - B:** También llamado Valor Debye-Waller o Factor de Temperatura. Es proporcional a las variaciones de las posiciones atómicas en el cristal. Estos movimientos atómicos reducen las intensidades de las reflexiones en el patrón de difracción, debido a que crean estructuras instantáneas del cristal que varían de una celda unitaria a la siguiente. Átomos con Valor - B alto tienen por ende menor probabilidad de localizarse en las coordenadas dadas en el modelo. También es llamado Parámetro de Desplazamiento Atómico “ADP” y sus unidades se expresan en  $\text{Å}^2$ , cuyo valor debe encontrarse entre 2 y 100.
2. **I/ (I):** Es la relación promedio de la intensidad de las reflexiones a su error estimado. La máxima resolución es estimada a partir de la resolución en la cual  $I/ (I)$  cae debajo de 2.0.
3. **R<sub>Merge</sub> o R<sub>Sym</sub> o R<sub>int</sub>:** Concordancia en intensidades del mismo punto medido múltiples veces. Debe tener un valor de aproximadamente 25% en la última faja y ser menor al 10% total. Mide la propagación del número de mediciones independientes de la intensidad de la reflexión  $I(hkl)$  y de su promedio  $\bar{I}(hkl)$ . Tiende a aumentar conforme aumenta la multiplicidad. Las observaciones múltiples de la misma reflexión aportan un promedio para identificar y rechazar valores atípicos.
4. **Integridad:** Proporciona el porcentaje de los posibles puntos que pueden ser medidos y que de hecho se miden. Debe tener valores mayores a 90% tanto en la faja final como en la global. Este parámetro depende del tiempo de exposición del cristal a los rayos X, su capacidad de difracción, la fuente de rayos X y las características del detector utilizado para el experimento.
5. **Multiplicidad o redundancia:** Número promedio de mediciones por reflexiones simétricamente únicas. Si la redundancia es alta, más precisa es la estimación final del promedio de las intensidades.
6. **R<sub>Meas</sub>:** Reporta la consistencia de las medidas individuales. Este valor debe encontrarse por debajo de aproximadamente 0.6-0.8. Toma en cuenta la multiplicidad, al contrario del R<sub>Merge</sub>.
7. **R<sub>Pim</sub>:** Indicador que mide la calidad de los datos luego de promediar múltiples mediciones.
8. **RMS:** Desviación de las distancias de enlaces y ángulos obtenidos con respecto a los esperados. Para distancias, este valor debe ser menor a 0.02 Å y menor a 3.0° para los ángulos.
9. **R<sub>Free</sub>:** R's de un pequeño grupo de reflexiones no usadas durante el afinamiento. Es un indicador independiente que encaja las amplitudes observadas y calculadas. Su desviación es proporcional a su valor dividido por la raíz cuadrada del número de reflexiones excluidas. Útil para detectar sobreajuste.
10. **R<sub>Work</sub>:** R's para un largo número de reflexiones trabajadas.

11.  **$R_{\text{factor}}/R_{\text{free}}$** : Indicadores de qué tan bien el modelo predice los datos observados. Es el porcentaje de error entre datos observados y calculados en el modelo. Debe procurarse que la diferencia entre estos dos valores no supere el 5% aproximadamente. El  $R_{\text{Factor}}$  está en función de la resolución e integridad de los datos experimentales.
12. **CC\***: reporta la calidad de los datos y el modelo en la misma escala. Revela cuando la calidad de los datos limita la mejora del modelo. Este parámetro de consistencia depende menos de la distribución de los datos a diferencia de los valores R.
13. **CC1/2**: Coeficiente de correlación de Pearson entre dos conjuntos de datos generados al azar al dividir los datos a la mitad. Es una medida de la consistencia interna. Este valor es cercano a 1 a baja resolución y se acerca a 0 conforme aumenta la resolución.
14. **Resolución**: Espacio mínimo en los planos de la red cristalina que proveen difracción medible de los rayos X. Define el nivel de detalle, la distancia mínima entre estructuras que se pueden distinguir en el mapa de densidad electrónica.
15. **LLG (Log-Likelihood-Gain)**: Mide la probabilidad de un modelo ( $H_j$ ) en comparación con la probabilidad de una hipótesis nula ( $H_0$ ). Una hipótesis nula típica podría ser un modelo en el cual los átomos están distribuidos de una manera físicamente realista pero al azar en la celda unitaria.

#### Fenómenos físicos

16. **Ley de Bragg**: Un conjunto de planos paralelos con índices hkl y espacio interplanar  $d_{\text{hkl}}$  produce un rayo difractado cuando los rayos X de longitud de onda  $\lambda$  que incide sobre los planos a un ángulo  $\Theta$  y son reflejados con el mismo ángulo al cumplir la siguiente condición:
 
$$2 d_{\text{hkl}} \sin \Theta = n \lambda$$
17. **Factor de estructura**: Describe un rayo X difractado que produce una reflexión. Es la suma de todas las pequeñas contribuciones atómicas. Puede describirse como una suma de Fourier. Al obtener la fase de un factor estructura podemos conocer la dirección del vector en un origen arbitrario.
18. **Dispersión de Compton**: Dispersión inelástica de un fotón de rayos X por un electrón. Los rayos X transfieren parte de su energía a los electrones y los fotones dispersados tienen longitudes de onda menores que los fotones incidentes.
19. **Dispersión de Rayleigh**: Dispersión elástica en la cual los rayos X no transfieren parte de su energía a los electrones y los fotones dispersados tienen la misma longitud de onda de los rayos X incidentes.

## Programas

20. **XDS (X-ray Detector Software):** Es un paquete de programas de procesamiento de datos de difracción de cristales. Procesa la secuencia de imágenes de rotación colectadas a una longitud de onda de rayos X determinada y entrega una lista de intensidades integradas y reflexiones corregidas. Cuenta con los siguientes programas:
- XYCORR. Entrega las tablas de correcciones espaciales para cada pixel del detector.
  - INIT. Determina los datos requeridos para subsecuentes procesos de clasificación de pixeles.
  - COLSPOT. Localiza los puntos de difracción intensos y guarda sus centros en el archivo SPOT.XDS.
  - IDXREF. Encuentra la orientación, medidas y simetría de la red cristalina.
  - DEFPIX. Marca y elimina los pixeles fuera del rango de resolución especificados por el usuario.
  - XPLAN. Apoya la planificación de la colección de datos.
  - INTEGRATE. Determina la intensidad de cada reflexión predicha.
  - CORRECT. Aplica los factores de corrección para las intensidades y desviaciones estándar de todas las reflexiones encontradas, determina el grupo espacial y afina las constantes de la celda unitaria. También reporta la calidad de los datos y la integridad de los mismos.
21. **XSCALE:** Pasa los archivos obtenidos de XDS a una escala común y reporta la calidad de los datos.
22. **XDSCONV:** Convierte los archivos obtenidos por XDS o XSCALE en varios formatos requeridos para CCP4, CNS (X-PLOR) o SHELX. Usa estimaciones bayesianas para estimar los factores estructura.
23. **F2MTZ:** Convierte el archivo formateado de reflexiones y lo pasa a un formato MTZ. Puede ser usado en datos fusionados en etapas avanzadas de la determinación de estructuras.
24. **PHASER-CCP4:** Permite el análisis de máximas certidumbres y el ajuste de las fases.
25. **PHENIX.REFINE:** Permite el afinamiento de coordenadas y ocupaciones. Ejecuta por defecto 3 macrociclos (consistiendo en correcciones del volumen del solvente, escalamiento anisotrópico de los datos, etc).
26. **PHENIX.COMPOSITE\_OMIT\_MAP:** Produce un mapa que cubre el contenido entero de la celda unitaria y se genera al computar un número de mapas de omisión de regiones específicas. Esto permite un mapa relativamente libre de sesgo sin comprometer la calidad de los datos.
27. **AFINAMIENTO DE CUERPO RÍGIDO:** Se hace al calcular el patrón de difracción esperado basado en el modelo de coordenadas y rotándolo y trasladándolo, pero sin afectar otros parámetros, para minimizar la diferencia entre el patrón calculado y el que fue medido.

## Técnica

28. **Dispersión dinámica de luz (DLS):** Mediante esta técnica, se irradia una solución de proteína con un haz monocromático de luz y se analizan las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada por el analito en función del tiempo. El equipo también permite analizar la estabilidad de la muestra en función de la temperatura.

El equipo de DLS proporciona información acerca del diámetro hidrodinámico de las proteínas, pudiéndose observar la monodispersidad de la muestra (esto es, que existan en solución partículas de tamaño uniforme) o la formación de agregados de proteína.

Las variaciones en el campo eléctrico total de dispersión total se deben al movimiento Browniano y a la difusión traslacional de las proteínas dispersantes en solución. De esta manera se correlacionan los distintos campos eléctricos dispersados por las proteínas en solución en escala de tiempo y se construye una función de correlación.

La correlación entre las distintas señales para la misma proteína o agregados de éstas se reducirá con el tiempo y finalmente llegará a cero. Debido al movimiento Browniano, la velocidad de decaimiento de la función de correlación está relacionada con el tamaño de la partícula, así, la velocidad de decaimiento es mucho mayor para partículas pequeñas que para partículas grandes, ya que las primeras se mueven más rápido que las grandes.

### Algunos conceptos de cristalografía

29. **Celda unitaria:** unidad mínima que al repetirse puede generar el cristal utilizando solamente operadores de traslación.
30. **Unidad asimétrica:** En una celda unitaria, el agregado de moléculas más grande que no posee elementos de simetría interna, pero que pueda yuxtaponerse en otras unidades idénticas por operaciones de simetría presentes en el grupo espacial para dar lugar a la celda unitaria.
31. **Simetría:** En cristalografía de proteínas hace referencia a la manera en la cual la unidad asimétrica se arregla en la celda unitaria por rotación, traslación o combinación de ambas.
32. **Operadores de simetría:** Son traslación, rotación y reflexión. Su combinación puede incluir centros de simetría, ejes de rotación o deslizamiento de planos.

## ANEXO A

- Imágenes del sitio activo de la catalasa de hígado bovino probando diferentes parámetros para la obtención de dichas estructuras. Los mapas de densidad electrónica mostrados son mapas de omisión a  $1 \text{ \AA}$ . También se muestran las estadísticas de la colecta de datos y afinamiento de cada una de ellas.

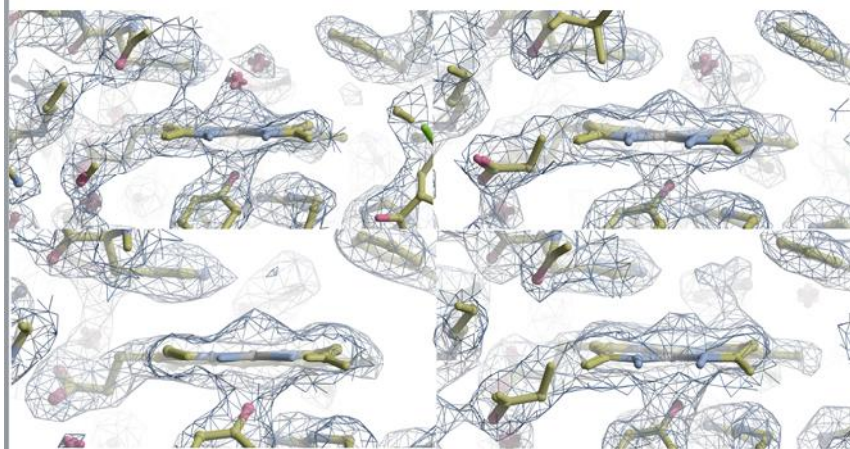
Cabe resaltar que la distancia promedio entre el oxígeno y el hierro del grupo hemo en estas estructuras es de aproximadamente  $2.3 \text{ \AA}$ .

La máxima resolución a la que se pudo llegar en estas pruebas fue de  $2.5 \text{ \AA}$ .

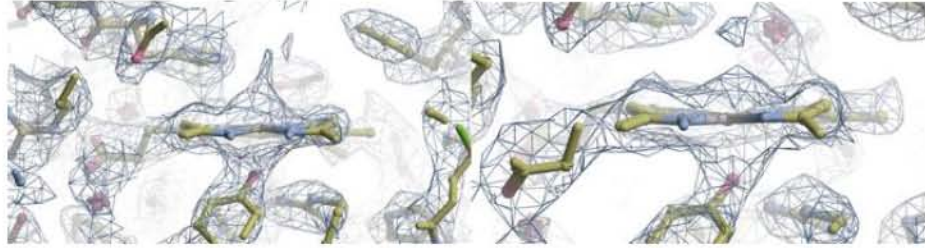
En la parte superior de cada imagen se presenta el número de colecta del cristal, número de imágenes (grados de rotación) utilizadas para la obtención de las estructuras y monómero.

Principalmente se muestran aquellas en las estructuras en las que se puede observar densidad electrónica que pudiera corresponder al Compuesto I.

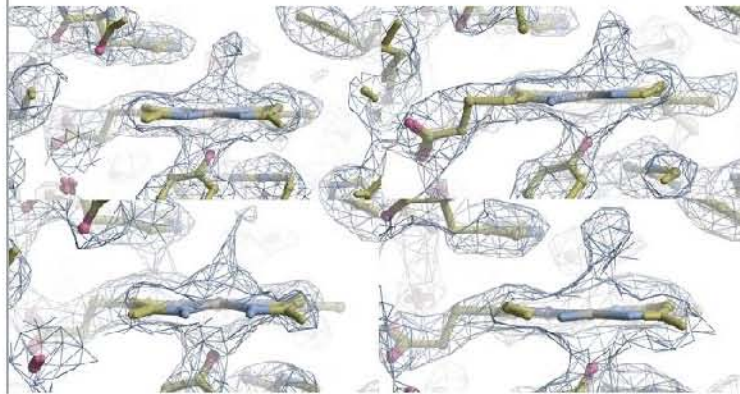
### COLECTA 1. 1-360



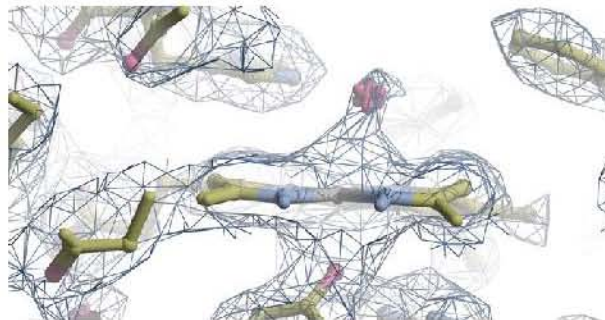
## COLECTA 1. 1-180 (A+D)



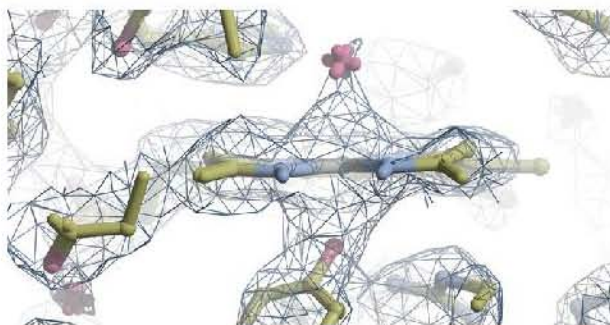
## COLECTA 1. 1-180



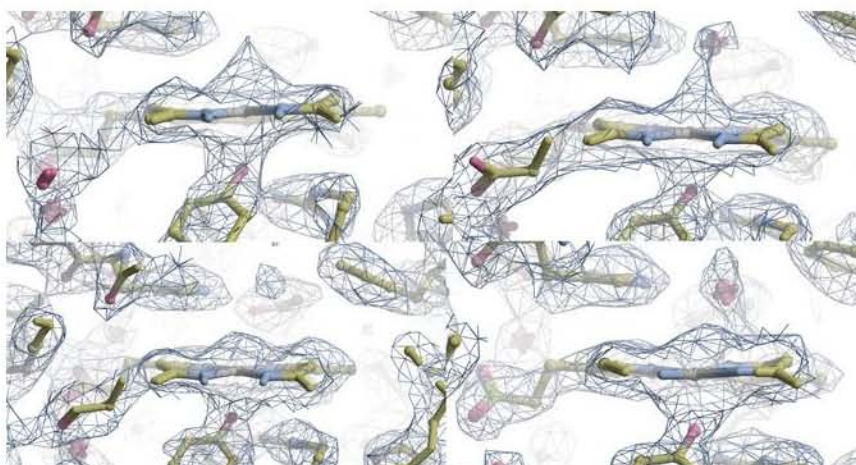
## COLECTA 1. 1-360. (D)



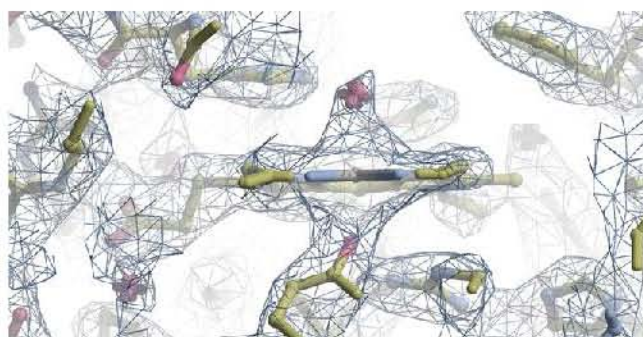
COLECTA 1. 2-187 (C)



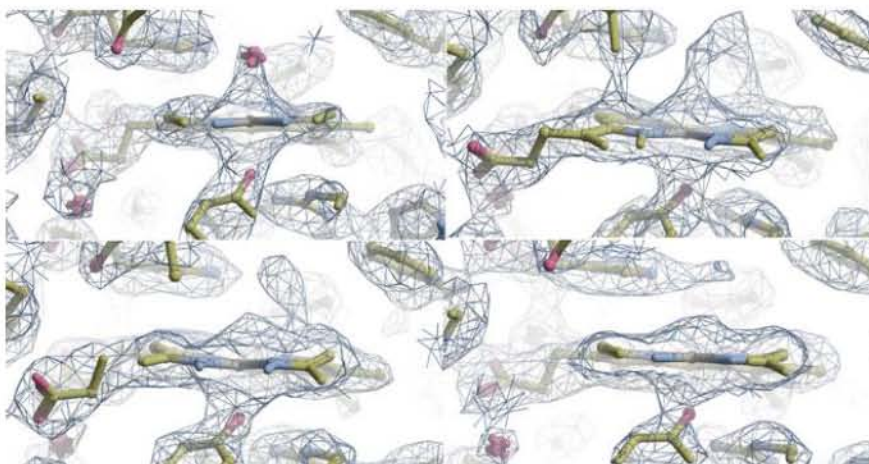
COLECTA 1. 5-190



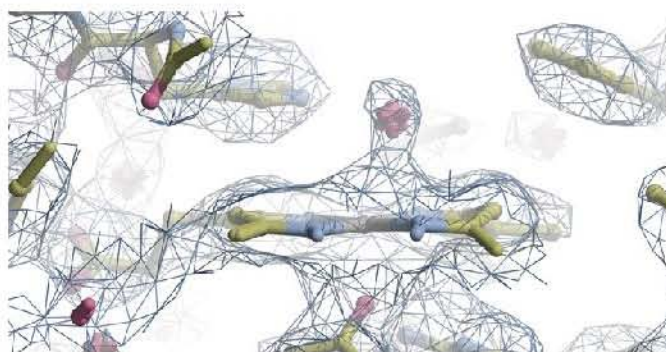
COLECTA 1. 1-180 (B)



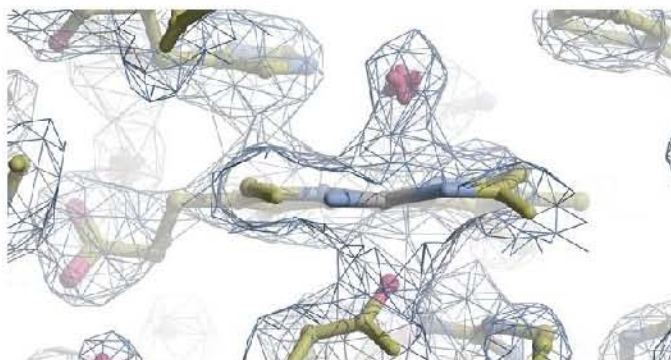
## COLECTA 1. 1-180



## COLECTA 2. 1-360 (B)



## COLECTA 2. 6-270 (A)





PARÁMETROS	BLC1-2 1-250	BLC.A.1-360 1-360	BLC.A.1-360.N 1-260	BLC.A.XDS.1-180 1-180
<b>Estadísticas de la colección de datos</b>				
Grupo espacial	19 - P <sub>2</sub> 1 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub>	19 - P <sub>2</sub> 1 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub>	19 - P <sub>2</sub> 1 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub>	19 - P <sub>2</sub> 1 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub>
Parámetros de la celda unitaria a,b,c (Å) , , (°)	83.81, 140.70, 230.36 90.0, 90.0, 90.0	83.50, 140.52, 228.70 90.0, 90.0, 90.0	83.50, 140.52, 228.70 90.0, 90.0, 90.0	83.36, 140.35, 228.41 90.0, 90.0, 90.0
Rango de resolución (Å)	40-2.5 10-2.6	40-2.5 10-2.5	40-2.65 10-2.7	40-2.5 10-2.5
Número de reflexiones totales	488681 (22908)	693604 (73272)	284788 (29397)	345815 (36768)
Número de reflexiones únicas	93145 (4534)	10294 (9914)	74460 (7568)	83820 (9101)
Integridad (%)	97.7 (99.5)	99.5 (96.3)	99.9 (100)	89.6 (88.6)
CC1/2 (%)	98.7 (87.8)	99.5 (84)	99.4 (89.8)	99.3 (81.2)
Robs (%)	14.9 (40.3)	14.5 (63.9)	10.7 (37.5)	11.3 (46.4)
Rexp (%)	15 (40.2)	14.5 (63.1)	10.7 (37.5)	11.2 (46.5)
I/ (I)	10.32 (4.13)	15.32 (3.6)	16.49 (4.85)	15.53 (3.09)
Multiplicidad	5.1 (5.2)	7.4 (7.3)	5.36 (5.44)	4 (4)
Monómeros por unidad asimétrica	4	4	4	4
<b>Estadísticas del afinamiento</b>				
Rwork	0.1663	0.1738	0.1704	0.1803
Rfree	0.2195	0.2224	0.2286	0.2314
Error en enlace (Å)	0.008	0.009	0.009	0.008
Error en ángulos (°)	1.172	1.224	1.216	1.244

PARÁMETROS	BLC.A.2-186.N 2-186	BLC.A.2-187.N 2-187	BLC.A.5-190.N 5-190	BLC.A.1-180.N.I 1-190
<b>Estadísticas de la colección de datos</b>				
Grupo espacial	19 - P <sub>2</sub> 1 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub>	19 - P <sub>2</sub> 1 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub>	19 - P <sub>2</sub> 1 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub>	19 - P <sub>2</sub> 1 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub>
Parámetros de la celda unitaria a,b,c (Å) , , (°)	83.37, 140.35, 228.42 90.0., 90.0, 90.0	83.37, 140.35, 228.42 90.0, 90.0, 90.0	83.37, 140.35, 228.42 90.0, 90.0, 90.0	83.37, 140.35, 228.42 90.0, 90.0, 90.0
Rango de resolución (Å)	50-2.54 10-2.54	50-2.54 10-2.54	50-2.55 10-2.55	50-2.55 10-2.6
Número de reflexiones totales	339335 (55705)	341140 (55980)	337126 (51913)	326438 (35042)
Número de reflexiones únicas	82149 (13637)	82453 (13664)	82439 (12816)	78048 (8425)
Integridad (%)	92 (92.2)	92.3 (92.4)	93.4 (93.3)	93.7 (95.7)
CC1/2 (%)	99.3 (83.9)	99.3 (83.6)	99.3 (83.1)	99.3 (84.5)
Robs (%)	10.9 (41)	10.9 (41)	10.8 (40.7)	10.4 (38.8)
Rexp (%)	10.9 (40.8)	10.9 (40.8)	10.8 (40.4)	10.4 (38.6)
I/ (I)	13 (3.53)	13 (3.53)	13.06 (3.53)	13.77 (3.76)
Multiplicidad			4 (4)	4.18 (4.15)
Monómeros por unidad asimétrica	4	4	4	4
<b>Estadísticas del afinamiento</b>				
Rwork	0.1707	0.1721	0.1736	0.1762
Rfree	0.2269	0.2277	0.2293	0.2322
Error en enlace (Å)	0.009	0.009	0.009	0.009
Error en ángulos (°)	1.201	1.202	1.211	1.251

PARÁMETROS	BLC.A.XDS.1 180.N.F 1-185	BLC.A.A-180.N.S 1-180	BLC.B.1-360.N 1-300	BLC.B.91-275.N.F 91-275
<b>Estadísticas de la colección de datos</b>				
Grupo espacial	19 - P <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	19 - P <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	19 - P <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	19 - P <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Parámetros de la celda unitaria a,b,c (Å) , , (°)	83.37, 140.35, 228.42 90.0., 90.0, 90.0	83.37, 140.35, 228.42 90.0, 90.0, 90.0	83.50, 140.52, 228.70 90.0, 90.0, 90.0	83.48, 140.50, 228.62 90.0, 90.0, 90.0
Rango de resolución (Å)	50-2.53 10-2.53	40-2.6 10-2.7	50-2.75 10-2.77	50-2.67 10-2.7
Número de reflexiones totales	343457 (59812)	275953 (28409)	428569 (13539)	284788 (29397)
Número de reflexiones únicas	82771 (14562)	66617 (6944)	69345 (2156)	67210 (7056)
Integridad (%)	91.7 (92.3)	89.4 (91.9)	99.9 (100)	89.9 (92.9)
CC1/2 (%)	99.3 (83.8)	83.9 (99.3)	99.5 (90.3)	99.2 (82.6)
Robs (%)	11.0 (41.4)	9.5 (33)	11.8 (43.4)	12.2 (47.8)
Rexp (%)	11.0 (41.3)	9.5 (33.1)	11.7 (43.7)	12.2 (47.8)
I/ (I)	12.92 (3.50)	13 (3.53)	17.2 (4.63)	13.15 (3.54)
Multiplidad	4.1 (4.1)	4.2 (4.1)	5 (5)	4 (4)
Monómeros por unidad asimétrica	4	4	4	4
<b>Estadísticas del afinamiento</b>				
Rwork	0.1736	0.1721	0.1727	0.1659
Rfree	0.2313	0.2337	0.2266	0.2255
Error en enlace (Å)	0.009	0.009	0.009	0.009
Error en ángulos (°)	1.221	1.242	1.244	1.231

PARÁMETROS	BLC.B.86- 270.N.F 86-270	BLC.B.XDS.B.96- 276.N.I 96-282	BLC.C.1-300.N 1-300	BLC.C.181- 360.N.F 110-360
<b>Estadísticas de la colección de datos</b>				
Grupo espacial	19 - P <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	19 - P <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	19 - P <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	19 - P <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Parámetros de la celda unitaria a,b,c (Å) , , (°)	83.48, 140.50, 228.61 90.0., 90.0, 90.0	83.48, 140.50, 228.64 90.0, 90.0, 90.0	83.59, 140.64, 228.89 90.0, 90.0, 90.0	83.61, 140.68, 228.99 90.0, 90.0, 90.0
Rango de resolución (Å)	50-2.67 10-2.7	50-2.7 10-2.77	50-2.85 10-2.85	50-2.83 10-2.85
Número de reflexiones totales	284743 (29394)	284743 (29394)	392472 (54352)	330352 (47386)
Número de reflexiones únicas	69012 (7231)	60609 (1932)	63657 (8734)	60460 (8706)
Integridad (%)	92.3 (95.2)	87.5 (90)	99.5 (97.2)	94.4 (96.5)
CC1/2 (%)	99.2 (82.6)	99.2 (85.9)	99.4 (89.1)	99.2 (87)
Robs (%)	12.1 (47.1)	11.8 (43.5)	12.5 (44.6)	14.1 (51.3)
Rexp (%)	12 (47.2)	11.8 (43.7)	12.4 (44.6)	14 (51.4)
I/ (I)	13.05 (3.31)	14.06 (3.71)	16.4 (4.54)	13.99 (3.75)
Multiplidad	4 (4)	4.2 (4.2)	5 (5)	5.4 (5.4)
Monómeros por unidad asimétrica	4	4	4	4
<b>Estadísticas del afinamiento</b>				
Rwork	0.1682	0.1661	0.1750	0.1714
Rfree	0.2204	0.2283	0.2394	0.2353
Error en enlace (Å)	0.009	0.009	0.010	0.010
Error en ángulos (°)	1.249	1.239	1.317	1.289

## ANEXO B

- Parámetros utilizados para el cálculo de dosis de radiación absorbida por los cristales de proteína mediante el programa RADDOSE-3D.

Tipo de cristal	Cuboide	Cuboide	Cuboide
Dimensiones ( $\mu\text{m}$ )	20, 200, 20	20, 200, 20	20, 200, 20
Píxeles por micrón (vóxeles/ $\mu\text{m}$ )	0.5	0.5	0.5
Celda unitaria ( $\text{Å}$ , °)	83, 140, 228 90, 90, 90	83, 140, 228 90, 90, 90	83, 140, 228 90, 90, 90
Número de monómeros	16	16	16
Número de residuos	506	506	506
Átomos pesados	Fe 1	Fe 1	Fe 1
Fracción de solvente (g/mL)	1.35	1.35	1.35
Tipo de haz	Gaussiano	Gaussiano	Gaussiano
Anchura a la altura media del pico ( $\mu\text{m}$ )	250, 50	250, 50	250, 50
Flujo (fotones/seg)	$1.88 \times 10^{10}$	$1.88 \times 10^{10}$	$1.88 \times 10^{10}$
Energía (keV)	13.2	13.2	13.2
Segmento	1-93	89-276	180-360
Tiempo de exposición (seg)	93	536	1080
Dosis (MGy)	<b>0.02</b>	<b>0.09</b>	<b>0.18</b>

Tipo de cristal	Cuboide	Cuboide	Cuboide
Dimensiones ( $\mu\text{m}$ )	266, 90, 19	266, 90, 19	266, 90, 19
Píxeles por micrón (vóxeles/ $\mu\text{m}$ )	0.3	0.3	0.3
Celda unitaria ( $\text{Å}$ , °)	83, 140, 229 90, 90, 90	83, 140, 229 90, 90, 90	83, 140, 229 90, 90, 90
Número de monómeros	16	16	16
Número de residuos	506	506	506
Átomos pesados	Fe 1	Fe 1	Fe 1
Fracción de solvente (g/mL)	1.35	1.35	1.35
Tipo de haz	Gaussiano	Gaussiano	Gaussiano
Anchura a la altura media del pico ( $\mu\text{m}$ )	250, 50	250, 50	250, 50
Flujo (fotones/seg)	$1.3 \times 10^{11}$	$1.3 \times 10^{11}$	$1.3 \times 10^{11}$
Energía (keV)	10.5	10.5	10.5
Segmento	1-140	1-140	1-140
Tiempo de exposición (seg)	140	280	410
Dosis (MGy)	<b>0.25</b>	<b>0.50</b>	<b>0.73</b>

## ANEXO C

- Características del equipo de microespectrofotometría UV-Vis de la línea 11-1 del SSRL. Diseñado para analizar la fotorreducción de centros metálicos de enzimas, reacciones enzimáticas o caracterización de complejos enzimáticos proteína-ligando que contengan cromóforos intrínsecos. Esta es una herramienta útil para la identificación de las características ópticas de cristales de proteínas y para monitorear su sensibilidad al haz de rayos X, para de esta manera, diseñar la mejor estrategia de colecta. Este sistema utiliza una fuente de luz con lámparas de deuterio y halógeno. La absorbancia es calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$A = \log_{10} [(R - D) / (S - D)]$$

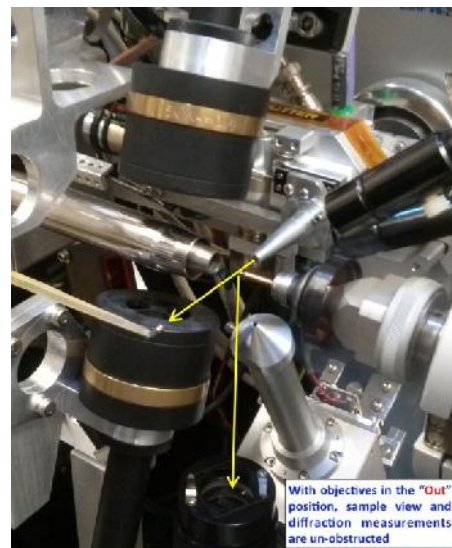
A=Absorbancia calculada a una longitud de onda dada (AU)

S=Intensidad transmitida de la muestra

D=Intensidad de fondo

R=Intensidad incidente de referencia

Los objetivos del sistema pueden cambiar para medir absorbancia (modo “in”) o difracción (modo “out”). En la siguiente imagen podemos ver el modo de medición de absorbancia (a la izquierda) y el modo de medición de difracción (a la derecha).



Imágenes tomadas de: [http://smb.slac.stanford.edu/facilities/software/blu-ice/microspec\\_tab.html](http://smb.slac.stanford.edu/facilities/software/blu-ice/microspec_tab.html) (6-12-2015).

## ANEXO D

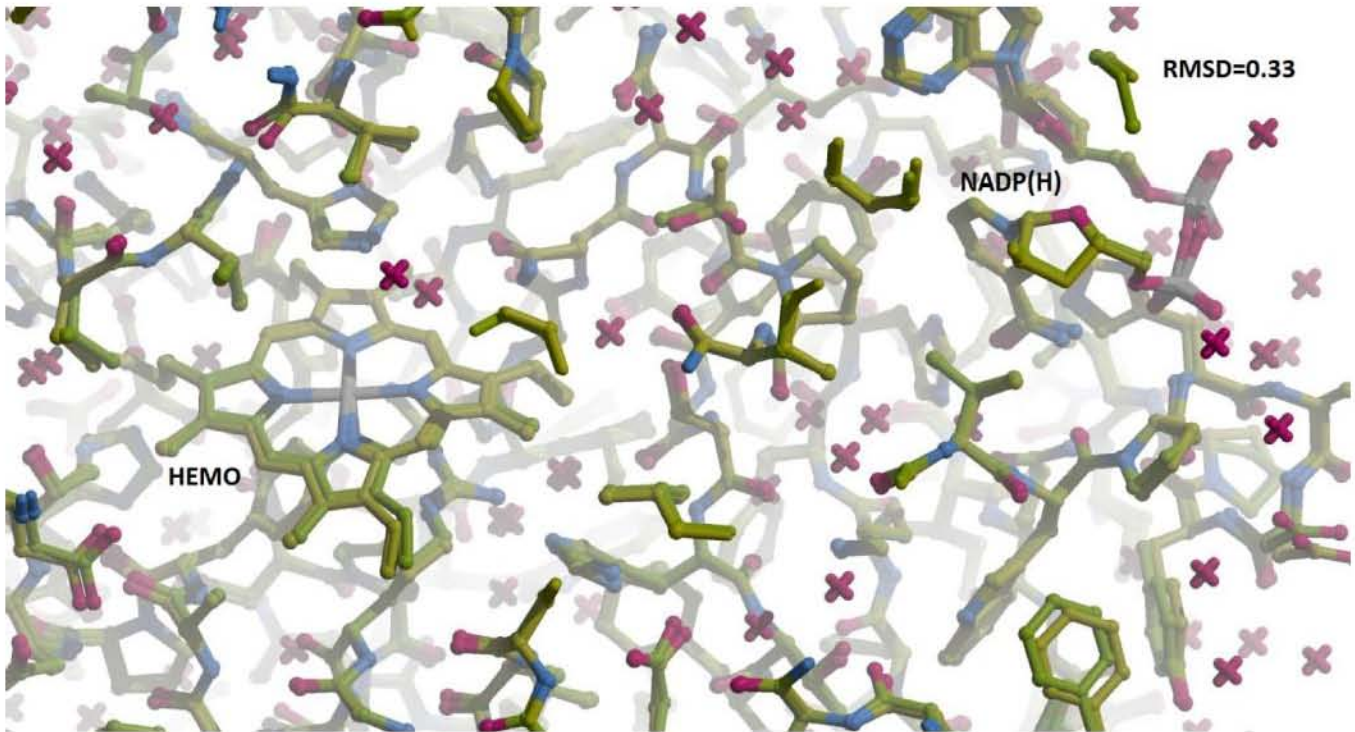
### Alineamiento de secuencias entre la catalasa de hígado bovino y la catalasa de eritrocitos humanos

Se marcan la histidina, asparagina y tirosina; aminoácidos importantes para la catálisis.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
<b>977 bits(2525)</b>	0.0	Compositional matrix adjust.	458/498(92%)	478/498(95%)	0/498(0%)

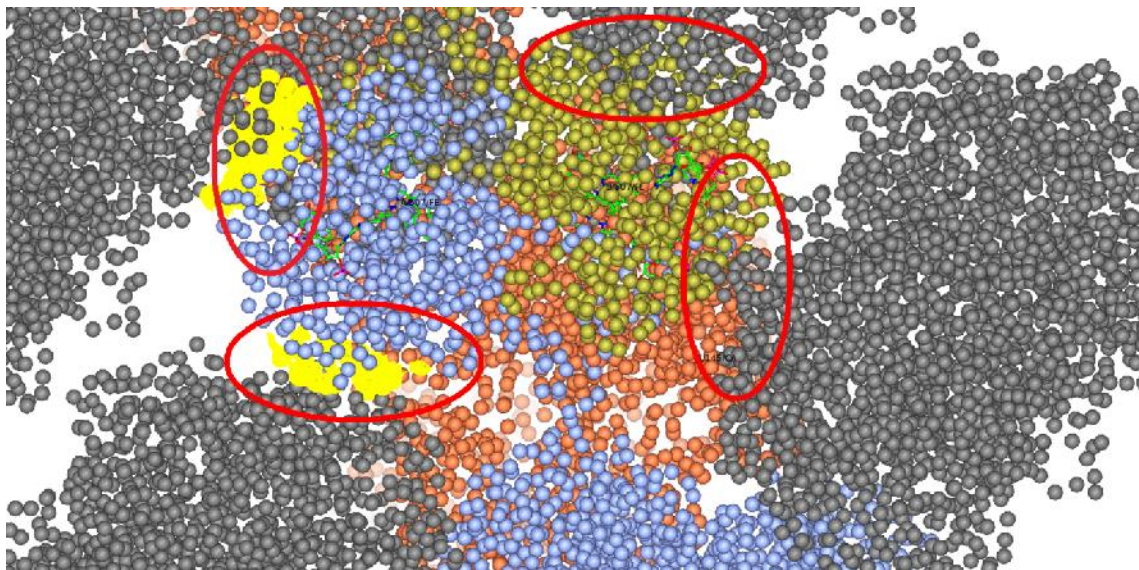
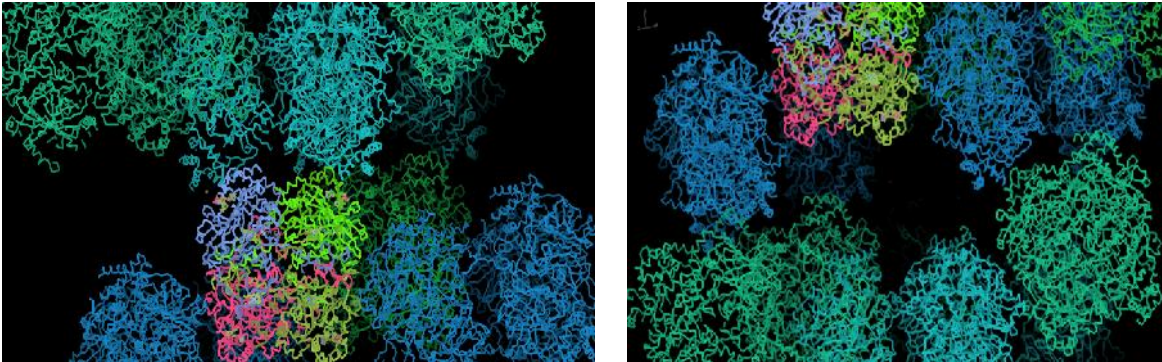
Query	1	NRDPASDQMKHWKEQRAAQKPDVLTGGGNPVGDKLNSLTVGPRGPLLVDVVFTEDEMAH	60
		+RDPASDQM+HWKEQRAAQK DVLTTG GNPVGDKLN +TVGPRGPLLVDVVFTEDEMAH	
Sbjct	4	SRDPASDQMQHWKEQRAAQKADVLTGAGNPVGDKLNVITVGPRGPLLVDVVFTEDEMAH	63
Query	61	FDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYSKAKVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGESGSA	120
		FDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDIT+YSKAKVFEHIGK+TPIAVRFSTVAGESGSA	
Sbjct	64	FDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAKVFEHIGKKTPIAVRFSTVAGESGSA	123
Query	121	DTVRDPRGFAVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDALLFSPFIHSQKRNPQTHLKDPDMVW	180
		DTVRDPRGFAVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRD +LFSPFIHSQKRNPQTHLKDPDMVW	
Sbjct	124	DTVRDPRGFAVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDPIILFSPFIHSQKRNPQTHLKDPDMVW	183
Query	181	DFWSLRPESLHQVSFLFSDRGIPDGHHRMNGYGSHTFKLVNANGEAVYCKFHYKTDQGIK	240
		DFWSLRPESLHQVSFLFSDRGIPDGHHRMNGYGSHTFKLVNANGEAVYCKFHYKTDQGIK	
Sbjct	184	DFWSLRPESLHQVSFLFSDRGIPDGHHRMNGYGSHTFKLVNANGEAVYCKFHYKTDQGIK	243
Query	241	NLSVEDAARLAHEDPDYGLRDLFNAIATGNYSWTLYIQVMTFSEAEIFPNPFDLTKVW	300
		NLSVEDAARL+ EDPDYG+RDLFNAIATG YPSWT YIQVMTF++AE FPNPFDLTKVW	
Sbjct	244	NLSVEDAARLSQEDPDYGIRDLFNAIATGKYSWTFYIQVMTFNQAETFPNPFDLTKVW	303
Query	301	PHGDYPLIPVGKLVLRNRPVNYFAEVEQLAFDPSNMPPGIEPSDKMLQGRLFAYPDTHR	360
		PH DYPLIPVGKLVLRNRPVNYFAEVEQ+AFDPSNMPPGIE SPDKMLQGRLFAYPDTHR	
Sbjct	304	PHKDYPLIPVGKLVLRNRPVNYFAEVEQIAFDPSNMPPGIEASPDKMLQGRLFAYPDTHR	363
Query	361	HRLGPNYLQIPVNCYPYRARVANYQRDGPMMMDNQGAPNYYPNSFSAPEHQPSALEHRT	420
		HRLGPNYL IPVNCYPYRARVANYQRDGPMM DNQGAPNYYPNSF APE QPSALEH	
Sbjct	364	HRLGPNYLHIPVNCYPYRARVANYQRDGPMMQDNQGAPNYYPNSFSAPEQQPSALEHSI	423
Query	421	HFGSDVQRFSANSANDNVTVQVRFYLVNNEEQRKRLCENIAGHLKDAQLFIQKKAVKNFS	480
		+SG+V+RFN+ANDNVTVQVR FY+ VLNEEQRKRLCENIAGHLKDAQ+FIQKKAVKNF+	
Sbjct	424	QYSGEVRRFNTANDNVTVQVRFYVNVNNEEQRKRLCENIAGHLKDAQIFIQKKAVKNFT	483
Query	481	DVHPEYGSRIQALLDKYN	498
		+VHP+YGS IQALLDKYN	
Sbjct	484	EVHPDYGSHIQALLDKYN	501

Superposición de estructuras de BLC y HEC. En la imagen se resalta el grupo hemo y el NADP(H) de las dos enzimas. También se pueden apreciar los aminoácidos presentes en esa zona, observándose que se encuentran altamente conservados. El RMSD calculado por COOT fue de 0.33.



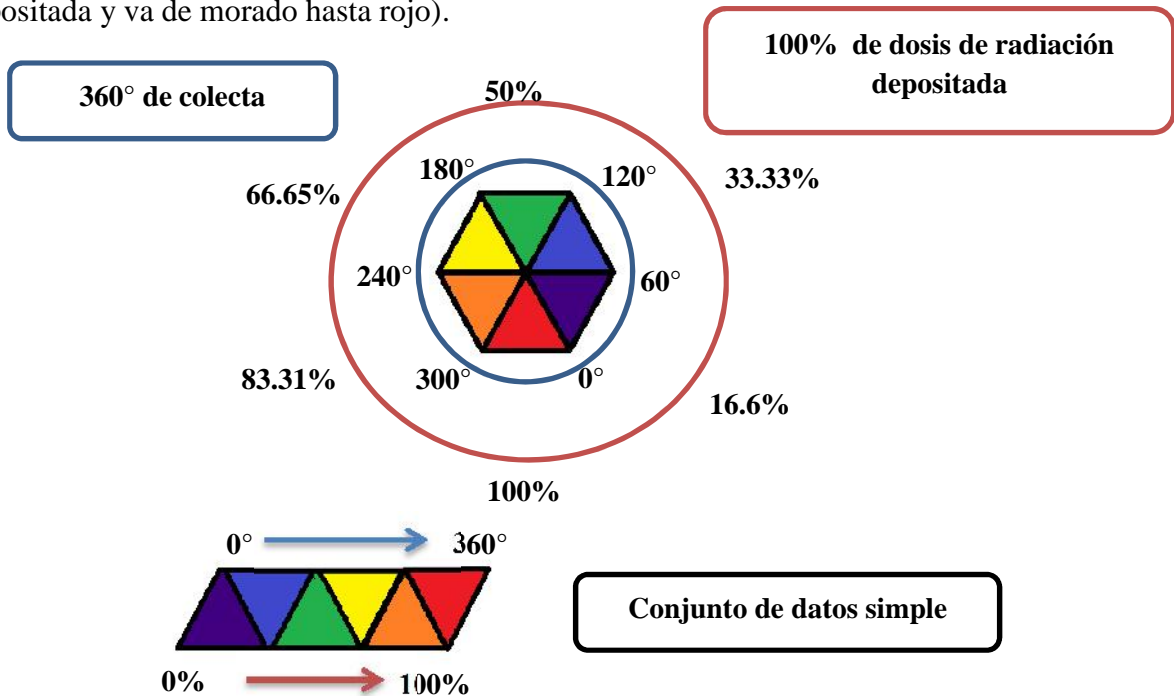
## ANEXO E

- Contactos cristalográficos de la catalasa de hígado bovino calculados mediante PISA de CCP4 y observados mediante COOT. En las dos imágenes superiores se puede apreciar que los monómeros A y B (imagen de la derecha) tienen un canal que los separa de los monómeros de la catalasa vecina. En cuanto a los monómeros C y D (imágenes de la izquierda), se muestra que estos dos monómeros se encuentran muy cercanos a los monómeros de la catalasa vecina en el cristal. En la imagen inferior se muestran los contactos laterales de los monómeros A y B con sus vecinos cristalográficos. Este análisis se realizó debido a que el empaquetamiento cristalino puede tener efectos en la difusión del sustrato hacia cada uno de los sitios activos de la enzima.



## ANEXO F

Supongamos que colectamos un cristal de proteína con una fuente de rayos X. Este cristal se rotará hasta tener 360° de colecta. Conforme se rota y colecta el cristal, va aumentando la dosis de radiación depositada en éste. Al final obtendremos un conjunto de datos individuales que podríamos utilizar para el posterior procesamiento y obtención de estructura de la proteína en cuestión (Los colores utilizados representan un aumento creciente de dosis de radiación depositada y va de morado hasta rojo).



El problema con esta estrategia experimental, es que la estructura resultante podría presentar alteraciones o superposición de imágenes de diferentes estados de algún proceso que pudiese llevarse en la proteína. Esta situación supondría una complicación para el correcto modelamiento de la proteína, ya que los mapas de densidad electrónica producidos podrían ser difíciles de interpretar.

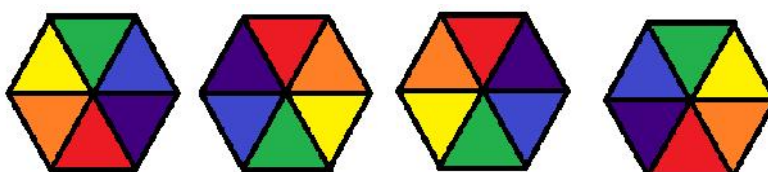
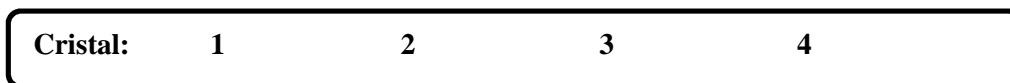
Aterrizando en el caso particular de la enzima estudiada en el presente trabajo, si intentásemos visualizar el grupo hemo de las catalasas (el cual tiene un átomo metálico muy sensible a los daños por radiación), veríamos un promedio de estados de óxido-reducción diferentes superpuestos en una sola imagen.



Un método ingenioso para diferenciar y capturar los diferentes estados de óxido-reducción de una enzima con centros metálicos, es mediante la “Colecta de datos de múltiples cristales”, desarrollado por Berglund y colaboradores.

Como su nombre lo indica, se procede a coleccionar un número significativo de cristales de la misma proteína en las mismas condiciones. De esta manera obtenemos varios conjuntos de datos simples con una dosis de radiación diferente en cada segmento del cristal.

En este ejemplo, colectaremos solamente cuatro cristales de proteína:



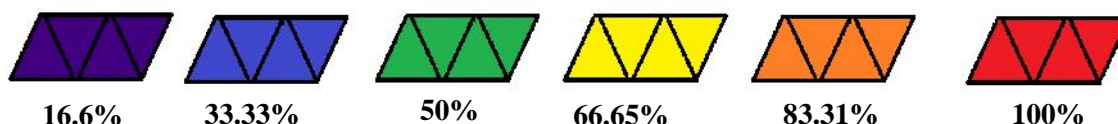
**Conjuntos de datos simples**



Posteriormente se generarán los datos compuestos. Diferentes segmentos del cristal con un número de grados definido serán clasificados a partir de la dosis de radiación absorbida.

A partir de los conjuntos de datos simples del ejemplo, se generaron seis grupos de datos compuestos. Mediante un conjunto de datos compuesto, podremos observar el centro metálico de la enzima con un 16.6% de radiación absorbida, con otro veremos el centro con un 33.33%, con otro 50%, 66.65%, 83.31% y 100% de radiación absorbida. Conforme aumentamos la dosis absorbida de radiación, observaríamos un centro metálico más reducido.

**Conjunto de datos compuestos**



## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Henry N. Kirkman and Gian F. Gaetani. "Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries". *TRENDS in Biochemical Sciences*. Vol. 32. No. 1. 2006.
2. Anna M. Vetrano et al. "Enzyme catalysis and Regulation: Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase". *J. Biol. Chem.* 2005. 280:35372-35381.
3. T. H. Yosca *et al.* "Iron (IV) hydroxide pka and the role of thiolato ligation in C-H bond activation by cytochrome P450". *Science*. 342. 825. 2013.
4. Cecilia M. Casadei et al. "Neutron cryo-crystallography captures the protonation state of ferryl heme in a peroxidase". *Science*. 345. 193. 2014.
5. Willi Sicking, Hans-Gert Korth, Herbert de Groot and Reiner Sustmann. "On The Functional Role of a Water Molecule in Clade 3 Catalases: A Proposal for the Mechanism by Which NADPH Prevents the Formation of Compound II". *J. AM. CHEM. SOC.* (2008). 130. 7345-7356.
6. Marcel Zámocký, Paul G. Furtmuller and Christian Obinger. "Two distinct groups of fungal catalase/oxidase". *Biochem Soc Trans.* (2009). 37(Pt 4): 772-777
7. Vladimir V. Barynin, May. M. Wittaker, Svetlana V. Antonyuk, et al. "Crystal Structure Of Manganese Catalase from *Lactobacillus Plantarum*". *Structure*. Vol. 9. 725-738
8. Adelaida Díaz, Peter C. Loewen, Ignacio Fita, Xavi Carpena. "Thirty years of heme catalase structural biology". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 525. 2012. 102-110.
9. M. Zámocký *et al.* "Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 525. 2012. 131-144.
10. Dominique Bourgeois and Antoine Royant. "Advances in kinetic protein crystallography". *Current Opinion in Structural Biology*. 2005. 15:358-547.
11. Piotr Sliz, Stephen C. Harrison, and Gerd Rosenbaum. "How does Radiation Damage in Protein Crystals Depend on X-Ray Dose?" *Structure*. Vol. 11. 13-19. 2003.
12. Raimond B. G. Ravelli and Elspeth F. Garman. "Radiation damage in macromolecular cryocrystallography". *Current Opinion in Structural Biology*. 2006. 16:624-629.
13. Elspeth Garman. "Cool crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage". *Current Opinion in Structural Biology*. 2003. 13:545-551.
14. James W. Murray, Enrique Rudiño-Piñera, Robin Leslie Owen, Martin Grininger, Raimond B. G. Ravelli and Elspeth F. Garman. "Parameters affecting the X-ray dose absorbed by macromolecular crystals". *J. Synchrotron Rad.* 2005. 12, 268-275.
15. Keiji Takamoto and Mark R. Chance. "Radiolytic Protein Footprinting with Mass Spectrometry to Probe the Structure of Macromolecular Complexes". *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2006. 35:251-76.

16. Gunnar I. Berglund, Gunilla H. Carlsson, Andrew T. Smith, Hanna Szoke, Anette Henriksen & Janos Hajdu. "The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution". NATURE. VOL. 417. 23 MAY 2002.
17. Andrés Zárate Romero. "Reducción inducida por rayos X en el sitio activo de la catalasa 3 de *Neurospora crassa*". Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología. UNAM. 2013.
18. Adelaida Díaz. "La Estructura De Las Catalasas". REB 22 (2): 76-84. 2003.
19. Ignacio Fita and Michael G. Rossmann. "The NADPH binding site on beef liver catalase". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 82. 1604-1608.1985.
20. James B. Sumner, and Alexander L. Dounce. "Crystalline Catalase". J. Biol. Chem. 1937. 121:417-424.
21. Leila M. Foroughi, You-Na Kang and Adam J. Matzger. "Sixty years from discovery to solution: crystal structure of bovine liver catalase form III". Acta Cryst. 2011. D67, 756-732.
22. Anabella Ivancich. "EPR Investigation of Compound I in *Proteus mirabilis* and Bovine Liver Catalases: Formation of Porphyrin and Tyrosyl Radical Intermediates". Biochemistry. 1997. 36, 9356-9364.
23. Christopher D. Putnam *et al.* "Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism". J. Mol. Biol. 2000. 296, 295-309.
24. Tzu-Ping Ko *et al.* "Structure of orthorhombic crystals of beef liver catalase". Acta Cryst. 1999. D55, 1383-1394
25. Mercedes Alfonso-Prieto, *et al.* "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". J. AM. CHEM. SOC. 2007. 129. 4193-4205.
26. Kabsch. "XDS". Acta Cryst. 2010. D66. 125-132.
27. M. D. Winn *et al.* "Overview of the CCP4 suite and current developments". Acta Cryst. 2011. D67. 235-242.
28. McCoy *et al.* "Phaser Crystallographic Software". 2007. J. Appl. Cryst. 40. 658-674.
29. G.N. Murshudov *et al.* "REFMAC for refinement of macromolecular crystal structures". 2011. Acta Cryst. D67. 355-367.
30. G.N. Mursudov *et al.* "Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method".1997. Acta Cryst. D53. 240-255.
31. P. D. Adams *et al.* "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution". Acta Cryst. 2010. D66. 213-221.
32. P. Emsley *et al.* "Features and Development of Coot". Acta Cryst. 2010. D66. 486-501.
33. Vonrhein *et al.* "Data processing and analysis with autoPROC toolbox". Acta Cryst. 2011. D67. 293-302.
34. P. Andrew Karplus and Kay Diederichs. "Linking crystallographic model and data quality". Science. 2012. 25. 336(6084): 1030-1033.
35. K. Diederichs and P. A. Karplus. "Better models by discarding data?". Acta Cryst. 2013. D69. 1215-1222.

36. Philip R. Evans and Garib N. Murshudov. "How good are my data and what it is the resolution?". *Acta Cryst.* 2013. D69. 1204-1214.
37. Zeldin, Gerstel and E. F. Garman. "RADDPOSE-3D: time- and space-resolved modelling of dose in macromolecular crystallography". *J. Appl. Cryst.* 2013. 46. 1225-1230.
38. Sehna David et. Al. "MOLE 2.0: advanced approach for analysis of biomacromolecular channels". *Journal of Cheminformatics.* 2013. 5-39.
39. Prakash et al. "Unique oligomeric intermediates of bovine liver catalase". *Protein science.* 2002. 11:46-57
40. Shigeru Sakurazawa, Tomomi Kubota, Mitsuo Ataka. "Orientation of protein crystals grown in a magnetic field". *Journal of Crystal Growth.* 196. 1999. 325-331
41. Brent L. Nannenga, Dan Shi, Johan Hattne, Francis E. Reyes, Tamir Gonen. "Structure of catalase determined by MicroED". *eLife.* 2014. 3:e03600.
42. Foroughi et al. "Polymer-Induced Heteronucleation for Protein Single Crystal Growth: Structural Elucidation of Bovine Liver Catalase and Concanavalin A Forms". *Cryst. Growth Des.* 2011, 11, 1294-1298
43. Elspeth F. Garman. "Radiation damage in macromolecular crystallography: what is it and why should we care?". *Acta Cryst.* 2010. D66. 339-351.
44. Alfonso-Prieto et al. "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". *J. AM. CHEM. SOC.* 2007. 129. 4193-4205.
45. Andreoletti et al. "Structural studies of *Proteus mirabilis* catalase in its ground state, oxidized state and in complex with formic acid". *Acta Cryst.* 2003. D59. 2163-2168.
46. Namrta Purwar et al. "Interaction of Nitric Oxide with Catalase: Structural and Kinetic Analysis". *Biochemistry.* 2011. 50. 4491-4503.
47. H. M. Jouve, P. Andreoletti et al. "Structural analysis of compound I in hemoproteins: Study on *Proteus mirabilis* catalase". *Biochimic.* 1997. 79. 667-671.
48. D. M. Indika Bandara et al. "Coordination modes of tyrosinate-ligated catalase-type heme enzymes: Magnetic circular dichroism studies of *Plexaura homomalla* allene oxide synthase, *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* protein-2744c, and bovine liver catalase in their ferric and ferrous states". *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2011. 105. 1786-1794.
49. Norihide Shimizu et al. "Studies on the Equilibria and Kinetics of the Reaction of Ferrous Catalase with Ligands". *J. Biochem.* 1988. 104. 136-140.
50. Goldbeck et al. "Optical Detection of Disordered Water within a Protein Cavity". *J. AM. CHEM. SOC.* 2009. 131. 12265-12272.
51. Bingjun Yang et al. "Binding of chrysoidine to catalase: Spectroscopy, isothermal titration calorimetry and molecular docking studies". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2013. 128. 35-42.
52. Thorsten Beitelich et al. "Cryoradiolytic reduction of crystalline heme proteins: analysis by UV-Vis spectroscopy and X-ray crystallography". *J. Synchrotron Rad.* 2007. 14. 11-23.

53. Morten Kocks Lykkegaard et al. "A Soret Marker Band for Four-Coordinate Ferric Heme Proteins from Absorption Spectra of Isolated Fe(III)-Heme+ and Fe(III)-Heme+(His) Ions in Vacuo". *J. AM. CHEM. SOC.* 2008. 130. 11856-11857.
54. Woei-Jer Chuang, Janina Heldt, and Harold E. Van Wart. "Resonance Raman Spectra of Bovine Liver Catalase Compound II. Similarity of the heme environment to horseradish peroxidase compound II. 1989. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 264. No. 24. 14209-14215.
55. Marcela Ayala, César V. Batista, Rafael Vázquez-Duhalt. "Heme destruction, the main molecular event during the peroxide-mediated inactivation of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*". *J. Biol. Inorg. Chem.* 2011. 16:63-68.
56. Roger T. Dean, Shanlin Fu, Roland Stocker and Michael J. Davies. "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation". *Biochem. J.* 1997. 324. 1-18.
57. Thomas G. Huggins et al. "Formation of o-Tyrosine and Dityrosine in Proteins during Radiolytic and Metal-catalyzed Oxidation". *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 268. Pp. 12341-12347. 1993.
58. Manfred S. Weiss. "Global indicators of X-Ray data quality". *Journal of Applied Crystallography.* 2001. 34, 130-135.
59. Phil Evans. "Resolving some old problems in protein crystallography". *Science.* 336, 986. 2012.
60. Gale Rhodes. "Crystallography Made Crystal Clear. Third Edition: A Guide For Users Of Macromolecular Models".
61. Zbigniew Dauter. "Data-Collection Strategies". *Acta Cryst.* 1999. D55, 1703-1717.
62. Alexander Wlodawer, Wladek Minor, Zbigniew Dauter and Mariusz Jaskolski. "Protein Crystallography for non-crystallographers or how to get the best (but no more) from published macromolecular structures. *FEBS Journal.* 275. 2008. 1-21.
63. Alexander Wlodawer, Wladek Minor, Zbigniew Dauter and Mariusz askolski. "Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination". 2013. *FEBS Journal.* 280. 5705-5736.
64. Philip R. Evans and Garib N. Murshudov. "How good are my data and what is the resolution?". 2013. *Acta Cryst.* D69. 1204-1214.
65. John E. McGeehan *et al.* "Raman-assisted crystallography of biomolecules at the synchrotron instrumentation, methods and applications". *Biochimica et biophysica Acta.* 1814. 2011. 750-759.
66. [http://smb.slac.stanford.edu/facilities/software/blu-ice/microspec\\_tab.html](http://smb.slac.stanford.edu/facilities/software/blu-ice/microspec_tab.html) (6-12-2015).
67. Prashen Chelikani, et al. "Characterization of a Large Subunit Catalase Truncated by Proteolytic Cleavage". *Biochemistry.* 2005. 44. 5597-5605.
68. Prashen Chelikani, et al. "Catalase: Repertoire of unusual features". *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 2005. 20. 2. 131-135.