



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

“MECANISMO DE TRANSFERENCIA DE PROTONES DE LA ENZIMA OXIDASA  
MULTICOBRE DE *Thermus thermophilus* HB27 POR CRISTALOGRAFÍA DE  
RAYOS X”

**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

**M. en C. HUGO JAVIER SERRANO POSADA**



**TUTOR: Dr. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA**

AÑO: 2012

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

<b>CONACyT</b>	Proyecto	102370
<b>DGAPA-UNAM</b>	Proyecto PAPIIT	IN204611

Y parte de los resultados se presentaron en forma de CARTEL:

- Present and Future Methods for Biomolecular Crystallography. International School of Crystallography-45<sup>th</sup> Course. Erice, Italia. Mayo 31-10 Junio, 2012.
- NSLS/CFS Joint Users' Meeting. National Synchrotron Light Source (NSLS), Brookhaven National Laboratory. Nueva York, EE.UU. Mayo 22-26, 2011.
- International School on Fundamental Crystallography-Workshop day on the Representation Theory of Space Groups. International Union of Crystallography-Commission on Mathematical and Theoretical Crystallography. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Noviembre 29-4 Diciembre, 2010.

Así como también en forma ORAL:

- Seventh International Workshop on X-ray Radiation Damage to Biological Crystalline Samples. Diamond Light Source. Didcot, Reino Unido. Marzo 14-16, 2012.
- Tercer congreso de la rama de fisicoquímica, diseño y estructura de proteínas de la sociedad mexicana de bioquímica. UNAM. Ciudad de México, México. Marzo 21-23, 2011.

El M. en C. Hugo Javier Serrano Posada recibió una beca de Doctorado del CONACyT.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mis padres, Josué y Lindelia, a mis hermanos, Néstor y Laura, y a mis sobrinos Fabián y Dayana.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi señor Jesucristo, hijo de mi Dios Santo, Señor Todopoderoso, Creador del cielo y también Creador de la tierra.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA de MÉXICO (**UNAM**).

Al Instituto de Biotecnología (**IBT**).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**), por otorgarme una beca de Doctorado durante un periodo de tiempo de cuatro años y una beca mixta durante un periodo de tiempo de cuatro meses para realizar una estancia de investigación en el sincrotrón de Nueva York, EE. UU.

Al Dr. Enrique Rudiño Piñera, por su amistad y por permitirme tener el privilegio de aprender del mejor cristalógrafo de proteínas de México.

Al National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory, Nueva York, EE.UU. A todo el personal de la línea X6A y en mayor medida a la Dra. Vivian Stojanoff.

- A los miembros del examen de candidatura:

Dr. Mario Soberón, Dr. Xavier Soberón, Dra. Rosario A. Muñoz Clares, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Marcela Ayala y Dra. Gloria Saab.

- A los integrantes del comité tutorial:

Dr. Alfredo Torres Larios y Dr. Rafael Vázquez Duhalt.

- A los miembros del comité tutorial ampliado:

Dr. Alfredo Torres Larios, Dr. Rafael Vázquez Duhalt, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Liliana Quintanar y Dra. Marcela Ayala.

- A los miembros del jurado:

Dra. Rosario A. Muñoz Clares, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dr. Abel Moreno Cárcamo, Dra. Liliana Quintanar y Dra. Marcela Ayala.

A mis compañeros del Grupo de Investigación de Cristalografía de Proteínas del IBT y en especial a la Bióloga Sonia Patricia Rojas Trejos por la asistencia técnica para desarrollar esta tesis.

Al personal de docencia y de la unidad de cómputo del IBT.

***Cree y verás la gloria de Dios.***

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. ABSTRACT</b>	2
<b>III. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>IV. ANTECEDENTES</b>	
IV.1. <i>Thermus thermophilus</i> HB27	4
IV.2. Oxidasas multicobre	4
IV.3. Oxidasa multicobre CueO de <i>Escherichia coli</i> , CotA de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Tth</i> -MCO de <i>Thermus thermophilus</i> HB27	6
IV.4. Mecanismo de reducción del O <sub>2</sub> a 2 H <sub>2</sub> O en las oxidasas multicobre	8
IV.5. Residuos ácidos que participan en el mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del O <sub>2</sub> a 2 H <sub>2</sub> O en las oxidasas multicobre	10
IV.6. Reducción inducida por rayos X de sitios metálicos en metaloenzimas	12
<b>V. JUSTIFICACIÓN</b>	16
<b>VI. HIPÓTESIS</b>	17
<b>VII. OBJETIVOS</b>	18
<b>VIII. SECCIÓN EXPERIMENTAL</b>	
VIII.1. Clonación, sobreexpresión y purificación de la <i>Tth</i> -MCO y apo- <i>Tth</i> -MCO	19
VIII.2. Determinación cualitativa y cuantitativa de los átomos de cobre por molécula de la <i>Tth</i> -MCO y apo- <i>Tth</i> -MCO	20
VIII.3. Cristalización de la holo- y apo- <i>Tth</i> -MCO. Obtención de las formas Hg- <i>Tth</i> -MCO y Hg- <i>Tth</i> -MCO-2h por remojo	22
VIII.4. Colecta de datos, solución estructural y afinamiento de la <i>Tth</i> -MCO, apo- <i>Tth</i> -MCO, Hg- <i>Tth</i> -MCO y Hg- <i>Tth</i> -MCO-2h	23
VIII.5. Colecta de datos, solución estructural y afinamiento de ocho estructuras compuestas de la <i>Tth</i> -MCO con diferentes dosis de radiación absorbida	25
VIII.6. Cálculo de la dosis de radiación absorbida de ocho estructuras compuestas de la <i>Tth</i> -MCO	28
VIII.7. Estimación teórica del pK <sub>a</sub> para las estructuras cristalográficas de la <i>Tth</i> -MCO, apo- <i>Tth</i> -MCO, Hg- <i>Tth</i> -MCO y Hg- <i>Tth</i> -MCO-2h	29

---

<b>IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
IX.1. Sobreexpresión y purificación de la <i>Tth</i> -MCO y apo- <i>Tth</i> -MCO	30
IX.2. Determinación cualitativa y cuantitativa de los átomos de cobre por molécula de la <i>Tth</i> -MCO y apo- <i>Tth</i> -MCO	33
IX.3. Cristalización de la <i>Tth</i> -MCO y apo- <i>Tth</i> -MCO. Obtención de las formas Hg- <i>Tth</i> -MCO y Hg- <i>Tth</i> -MCO-2h por remojo	35
IX.4. Estructuras tridimensionales determinadas por difracción de rayos X de la <i>Tth</i> -MCO, apo- <i>Tth</i> -MCO, Hg- <i>Tth</i> -MCO y Hg- <i>Tth</i> -MCO-2h	40
IX.5. Estructuras compuestas determinadas por difracción de rayos X de la <i>Tth</i> -MCO con diferentes dosis de radiación absorbida	59
IX.6. Mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del O <sub>2</sub> a 2 H <sub>2</sub> O en la <i>Tth</i> -MCO	73
<b>X. CONCLUSIONES</b>	87
<b>XI. PERSPECTIVAS</b>	88
<b>XII. REFERENCIAS</b>	90
<b>ANEXO I.</b> Índice de figuras y tablas	97
<b>ANEXO II.</b> Serrano-Posada, H., Valderrama, B., Stojanoff, V., and Rudiño-Piñera, E. <b>2011</b> . <i>Acta Cryst.</i> <b>F67</b> , 1595–1598	104
<b>ANEXO III.</b> Bello, M., Valderrama, B., Serrano-Posada, H., and Rudiño-Piñera, E. <b>2012</b> . <i>PLoS ONE</i> . Aceptado.	108
<b>ANEXO IV.</b> Serrano-Posada, H., and Rudiño-Piñera. <b>2012</b> . En proceso de escritura.	109

## I. RESUMEN

La enzima oxidasa multicobre de *Thermus thermophilus* HB27 (*Tth*-MCO) cataliza la reducción del oxígeno molecular ( $O_2$ ) a 2 moléculas de  $H_2O$ , previa oxidación de 4 moléculas de sustrato. Para catalizar estas dos reacciones, la *Tth*-MCO cuenta con 4 átomos de cobre distribuidos en dos sitios activos: un sitio de cobre tipo 1 (T1Cu) y un centro trinuclear de cobre (CTC<sup>1</sup>) compuesto por un sitio de cobre tipo 2 (T2Cu) y un centro binuclear de cobre tipo 3 (T3Cu-T3'Cu). El CTC es el sitio activo en donde el  $O_2$  se coordina, activa y reduce a 2  $H_2O$ . Durante la colecta de datos de un cristal de proteína por difracción de rayos X se liberan electrones de la muestra irradiada. Por lo tanto, existen dos fenómenos que tienen lugar cuando se expone a los rayos X un cristal de una enzima oxidasa multicobre: (i) la reducción de los centros de Cu y (ii) la reducción inducida por rayos X del  $O_2$  a 2  $H_2O$  en el CTC. De hecho, la estructura cristalográfica final de una oxidasa multicobre es un promedio de los distintos estados de oxidación de los átomos de Cu y de los intermediarios y estados de reducción del  $O_2$ . En este trabajo se utilizaron dos estrategias cristalográficas diferentes con el objetivo de estudiar el mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del  $O_2$  inducida por rayos X y el papel que desempeñan en este mecanismo los residuos Glu<sup>451</sup> y Asp<sup>106</sup> de la *Tth*-MCO. En la primera estrategia se utilizó cristalografía clásica para determinar la estructura tridimensional de la *Tth*-MCO a 1.5 Å de resolución (código PDB 2XU9) y las estructuras de tres formas inactivas de la enzima a 1.7 Å de resolución: apo-*Tth*-MCO (código PDB 2XUW), Hg-*Tth*-MCO (código PDB 2XVB) y Hg-*Tth*-MCO-2h (código PDB 4AI7). En la segunda estrategia se determinaron ocho estructuras cristalográficas compuestas de la *Tth*-MCO a 1.8 Å de resolución, con distinta dosis de radiación absorbida, obtenidas a partir de la combinación de datos cristalográficos de ocho cristales diferentes de la *Tth*-MCO. De esta forma se obtuvo una película tridimensional de la reducción del  $O_2$  a 2  $H_2O$ , inducida por rayos X y se atraparon diferentes estados de reacción:  $O_2$  (código PDB 2YAE), ER<sup>2</sup> (códigos PDB 2YAF, 2YAH, 2YAM, 2YAO, 2YAQ y 2YAR) y ETR<sup>3</sup> (código PDB 2YAP). Los datos cristalográficos sugieren que el Glu<sup>451</sup> proporciona los protones necesarios para esta reacción de reducción, mientras que el Asp<sup>106</sup> estabiliza las especies OH<sup>-</sup>/ $H_2O$ , las cuales están coordinadas al T2Cu e interaccionan con la cadena lateral del Asp<sup>106</sup> vía puentes de hidrógeno con una molécula de  $H_2O$  estructural. Finalmente se observó la alta susceptibilidad del T2Cu a los rayos X y se demostró que a una dosis de radiación absorbida de 2.5 MGy<sup>4</sup> este átomo se elimina completamente de la estructura (código PDB 2YAF).

<sup>1</sup> También conocido como TNC por sus siglas en inglés: *trinuclear Cu cluster*.

<sup>2</sup> ER: estado relajado. También conocido como RS por sus siglas en inglés: *resting state*.

<sup>3</sup> ETR: estado totalmente reducido. También conocido como FR por sus siglas en inglés: *full Cu reduced*.

<sup>4</sup> 1 MGy =  $1 \times 10^6$  gray (Gy). El Gy es una unidad derivada del Sistema Internacional (SI) para indicar la dosis de radiación ionizante absorbida y está definida como la absorción de un julio (J) de radiación ionizante (rayos X) por kilogramo de materia:  $1\text{Gy} = 1\text{J Kg}^{-1}$ .

## II. ABSTRACT

*Thermus thermophilus* multicopper oxidase (*Tth*-MCO) catalyzes the oxidation of substrates coupled to the reduction of O<sub>2</sub> to 2 H<sub>2</sub>O. During X-ray data collection of a multicopper oxidase crystal, electrons are released and photoreduction of copper atoms seems to take place leading to reduction of the bound O<sub>2</sub> molecule. Indeed, the final crystallographic structure is a mixture of several oxidation states of copper atoms and neighboring residues, as well as of several intermediates of the reduction of O<sub>2</sub>. In this work we used two different crystallographic strategies in order to study the proton-relay mechanism involved in the reductive cleavage of O<sub>2</sub>, and the role of Glu<sup>451</sup> and Asp<sup>106</sup> residues in the *Tth*-MCO catalytic mechanism. First, we determined the structure of the *Tth*-MCO at 1.5 Å resolution, and of three inactive forms of the enzyme at 1.7 Å resolution: apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO and Hg-*Tth*-MCO-2h. Second, we used a multocrystal data collection strategy that gives a three-dimensional movie of the X-ray-induced O<sub>2</sub> reduction. This method consisted in combining data from eight *Tth*-MCO crystals to obtain eight composite structures of the *Tth*-MCO, determined at 1.8 Å resolution and with different X-ray absorbed doses. The composite data sets allowed the observation of different states of the O<sub>2</sub> reduction to 2 H<sub>2</sub>O. Furthermore, the previous evidence of the role of Glu<sup>451</sup> residue providing protons at the trinuclear copper cluster of the enzyme was confirmed. In contrast, the Asp<sup>106</sup> residue appears to play an important role in stabilizing the OH<sup>•</sup>/H<sub>2</sub>O species, which are simultaneously coordinated to T2Cu and Asp<sup>106</sup> through a structural water molecule. Finally, we observed a total depletion of T2Cu at radiation doses higher than 2.5 MGy, proving the high susceptibility of this metal atom to radiation damage.

### III. INTRODUCCIÓN

Las oxidasas multicobre son un tipo de metaloenzimas oxidoreductasas que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas superiores, hongos, bacterias e insectos. Acoplan la oxidación de cuatro moléculas de sustrato con la reducción de una molécula de  $O_2$  a 2 moléculas de  $H_2O$  usando como mínimo cuatro átomos de Cu distribuidos en dos sitios activos. La *Tth*-MCO se identificó previamente (Miyazaki, 2005) en el genoma de la bacteria termófila extrema *Thermus thermophilus* HB27 (Henne *et al.*, 2004). Esta enzima presenta actividad de lacasa (E.C. 1.10.3.2) (Miyazaki, 2005; Liu *et al.*, 2011) y es una de las oxidasas multicobre con mayor potencial en aplicaciones biotecnológicas en la actualidad (Zheng *et al.*, 2012), debido a la elevada resistencia que presenta a la desnaturalización térmica, así como a la capacidad que posee de oxidar distintos sustratos orgánicos.

Por otro lado, la reducción inducida por rayos X de sitios metálicos en metaloenzimas es un proceso ampliamente estudiado y típicamente tiene lugar en los primeros segundos de irradiación con un haz intenso de rayos X (Macedo *et al.*, 2009). Este proceso se observa durante la colecta de datos de un cristal de proteína ya que los rayos X inducen la liberación de electrones al medio debido principalmente a la radiólisis de las moléculas de  $H_2O$  del cristal (Garman, 2010). Así, durante la colecta de datos de un cristal de una oxidasa multicobre, el daño causado por la dosis de radiación absorbida se concentra principalmente en los cuatro átomos de Cu de la enzima, especialmente en aquellos que por su ubicación estructural interaccionan en mayor medida con los electrones hidratados producto de la radiólisis de las moléculas de  $H_2O$  del cristal. A pesar de esto, la reducción inducida por rayos X en las oxidasas multicobre presenta la ventaja de poder estudiar y reproducir en estado cristalino la reducción del  $O_2$  a 2  $H_2O$  inducida por los rayos X (Hakulinen *et al.*, 2006) y el mecanismo de transporte de protones asociado a esta reacción enzimática, ya que los electrones liberados al sistema generan cambios en los estados de oxidación de los cuatro átomos de Cu y por lo tanto inducen la reacción:  $O_2 + 4 H^+ + 4 e^- \rightarrow 2 H_2O$ .

En este trabajo se utilizó a la *Tth*-MCO como enzima modelo para estudiar tanto la reducción inducida por los rayos X del oxígeno molecular al agua en el CTC, como el mecanismo de transporte de protones asociado a esta reacción enzimática. De esta manera se obtuvieron doce estructuras cristalográficas de la *Tth*-MCO activas e inactivas y con distinta dosis de radiación absorbida y se establecieron las bases estructurales del mecanismo de transferencia de protones en la familia de las oxidasas multicobre.

## IV. ANTECEDENTES

En esta sección se sintetizarán los conocimientos previos sobre la *Tth*-MCO y las oxidasas multicobre en general, con el fin de establecer un lenguaje común que será utilizado durante esta tesis. De la misma manera se destacarán las estrategias cristalográficas más importantes previamente utilizadas para describir mecanismos de reacción de metaloenzimas.

### IV.1. *Thermus thermophilus* HB27

*Thermus thermophilus* HB27 es una bacteria termófila extrema y halotolerante que se aisló originalmente de una fuente termal en Japón (Oshima *et al.*, 1974). Esta bacteria es considerada un organismo modelo en biología estructural debido a la estabilidad intrínseca de las enzimas termoestables que posee y a la resistencia que presentan a la desnaturalización física y química (Henne *et al.*, 2004). Entre las enzimas más útiles del género *Thermus* en el campo de la biotecnología se encuentra la ADN polimerasa, una enzima indispensable en las técnicas de PCR<sup>5</sup>. Las xilanasas,  $\alpha$ -amilasas, glucosa isomerasas, estererasas, lipasas y proteasas también encontradas en el género *Thermus* son comúnmente utilizadas en la manufactura del papel, procesamiento del almidón y síntesis orgánica (Niehaus *et al.*, 1999; Pantazaki *et al.*, 2002), entre otros procesos industriales.

El genoma de *T. thermophilus* HB27 está compuesto de un cromosoma de 1,894,877 pb y un megaplásmido de 232,605 pb designado pTT27 (Henne *et al.*, 2004). La bacteria tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas mayores a 85 °C, aunque la temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 65 y 72 °C, mientras que la mínima es de 47 °C (Oshima *et al.*, 1974).

### IV.2. Oxidasas multicobre

Las oxidasas multicobre acoplan la oxidación de 4 moléculas de sustrato con la reducción de una molécula de O<sub>2</sub> a 2 moléculas de H<sub>2</sub>O usando como mínimo 4 átomos de cobre (Solomon *et al.*, 2008). Estas proteínas conforman una gran familia de enzimas constituidas por lacasas (E.C. 1.10.3.2), ferroxidasas (EC 1.16.3.1), ascorbato oxidasa (EC 1.10.3.3) y ceruloplasmina (Hoegger *et al.*, 2006). Las oxidasas multicobre se encuentran en plantas superiores, hongos, bacterias e insectos y participan en la síntesis y degradación de lignina, en la respuesta a heridas de plantas, en la destoxificación, pigmentación y resistencia al cobre (Mayer *et al.*, 2002; Morozova *et al.*,

<sup>5</sup> PCR por sus siglas en inglés: *Polymerase Chain Reaction*.

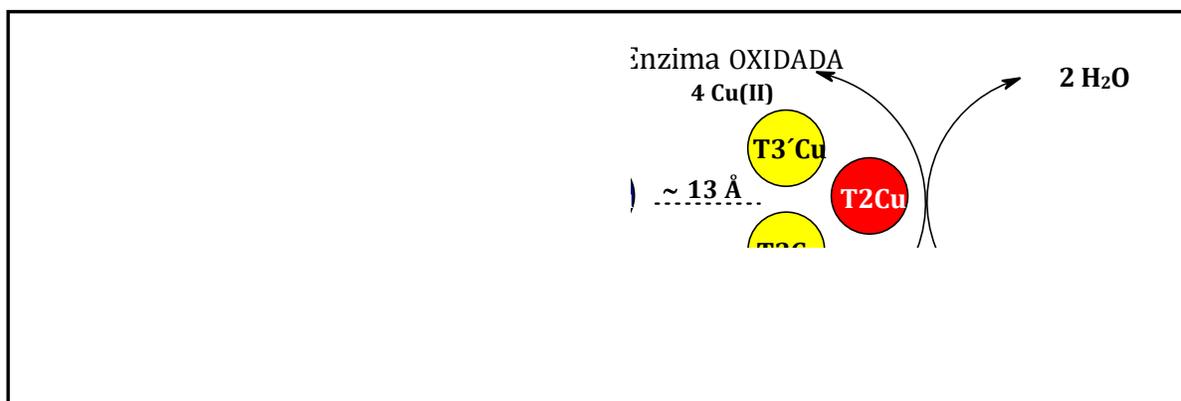
2007), entre otros procesos fisiológicos. Algunas de las aplicaciones biotecnológicas de esta familia de enzimas se han hecho en la industria de los textiles, en la biorremediación, en la fabricación de biosensores y celdas de biocombustible y en síntesis orgánica (Willner, 2002; Wang *et al.*, 2004; Vincent *et al.*, 2005; Gulloto *et al.*, 2008; Kunamneni *et al.*, 2008).

Los 4 átomos de Cu de las oxidasas multicobre se clasificaron como T1, T2 y T3 de acuerdo a las propiedades espectroscópicas que presentan (**Tabla 1**) (Rodríguez *et al.*, 2006).

**Tabla 1.** Clasificación de los 4 átomos de Cu de las oxidasas multicobre.

Tipo de Cu	Átomos de Cu / molécula de proteína	Absorción UV-visible	Señal de EPR <sup>6</sup>
T1 <sup>7</sup> "Cobre azul"	1	Máximo de absorción a $\lambda \sim 610$ nm	Paramagnética (señal presente)
T2	1	Absorción indetectable	Paramagnética (señal presente)
T3	2	Máximo de absorción a $\lambda \sim 330$ nm	Diamagnética (señal ausente)

Como se puede ver en la **Figura 1**, los 4 átomos de Cu están distribuidos en dos sitios activos: un sitio T1, en donde el T1Cu oxida los sustratos orgánicos y/o inorgánicos, y un centro trinuclear de cobre (CTC) compuesto por un T2Cu y un centro binuclear T3Cu-T3'Cu en donde se reduce la molécula de O<sub>2</sub> a 2 moléculas de H<sub>2</sub>O (Solomon *et al.*, 1996).



**Figura 1.** Reacción general catalizada por una lacasa. Oxidación de *p*-difenol acoplada a la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O. El O<sub>2</sub> es usado para regenerar la forma oxidada de la enzima y la actividad lacasa es característica de la *Tth*-MCO (Miyazaki, 2005).

<sup>6</sup> EPR por sus siglas en inglés: *electron paramagnetic resonance*.

<sup>7</sup> Se pueden encontrar oxidasas multicobre con más de un T1Cu. Por ejemplo, la ceruloplasmina presenta 6 átomos de Cu, 3 de los cuales son T1Cu.

El T1Cu es paramagnético y está coordinado por dos residuos de His, uno de Cys y en la mayoría de las oxidasas multicobre bacterianas, una Met como vecino axial muy conservado (Sharma *et al.*, 2007; Zhukhlistova *et al.*, 2008). El T1Cu forma un enlace covalente muy fuerte Cu-S con una banda intensa de transferencia de carga  $S_{Cys} \rightarrow Cu(II)$  a  $\lambda \sim 610$  nm, la cual proporciona el color azul característico de esta familia de enzimas. El T2Cu también es paramagnético y está coordinado por dos residuos de His. Este T2Cu no presenta características de absorción detectables en el UV-visible. Los dos T3Cu están coordinados por tres residuos de His cada uno y están antiferromagnéticamente acoplados por un hidroxilo (OH<sup>-</sup>). Como consecuencia, los dos T3Cu no presentan señal de EPR pero sí una banda de absorción a  $\lambda \sim 330$  nm (Solomon *et al.*, 2008). La función principal del T1Cu es oxidar sustratos y enviar los electrones producto de esta oxidación al CTC que se encuentra a una distancia de  $\sim 13$  Å (Figura 1), utilizando la ruta de transferencia electrónica T1Cu(II)-Cys-His-T3Cu(II) (Augustine *et al.*, 2010).

#### **IV.3. Oxidasa multicobre CueO de *Escherichia coli*, CotA de *Bacillus subtilis* y Tth-MCO de *Thermus thermophilus* HB27**

Los análisis de los genomas bacterianos sugieren que las oxidasas multicobre están ampliamente distribuidas en bacterias (Sharma *et al.*, 2007). A pesar de esto se conoce poco acerca de estas enzimas bacterianas y no existe un consenso generalizado sobre el papel exacto que desempeñan en procariotes. Por ejemplo, la oxidasa multicobre CueO forma parte del operón *cue* en *E. coli*, el cual es responsable del mecanismo de regulación de cobre bajo condiciones aeróbicas (Roberts *et al.*, 2002). Vale la pena resaltar que el cobre es un cofactor esencial para el metabolismo aeróbico pero es tóxico incluso a bajas concentraciones ya que puede generar especies reactivas de oxígeno que dañan lípidos, proteínas y ADN (Roberts *et al.*, 2003). Así, el operón *cue* se expresa bajo condiciones de estrés por cobre y codifica para dos proteínas: CueO y CopA. La proteína CopA es una ATPasa tipo P de eflujo de cobre y CueO es una oxidasa multicobre que se ubica en el espacio periplasmático de la bacteria y es capaz de oxidar distintos sustratos *in vitro*, incluso Cu(I) (Grass *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004).

Por otro lado, CotA es una oxidasa multicobre que participa en la síntesis de melanina de la espora de *B. subtilis*. La melanina es un polímero de color café que protege a la espora contra la radiación ultravioleta (Hullo *et al.*, 2001). Las endosporas bacterianas son estructuras celulares diseñadas para resistir condiciones fisicoquímicas extremas, tales como calor, desecación, radiación UV y agentes químicos nocivos (Martins *et al.*, 2002). En general, el saco protector de la espora de *B. subtilis* contiene al menos 25 polipéptidos diferentes. Se demostró que la ausencia de

CotA no tiene efecto sobre el mecanismo de resistencia de la espora pero sí ocasiona la pérdida de la pigmentación café característica de las colonias (Hullo *et al.*, 2001). CotA es considerada una de las oxidasas multicobre con mayor potencial industrial y biotecnológico de las conocidas a la fecha, ya que presenta actividad de lacasa y bilirrubina oxidasa (EC 1.3.3.5) (Hoegger *et al.*, 2006; Sakasegawa *et al.*, 2006), oxida distintos sustratos *in vitro* y es termoestable, con un  $t_{1/2}$  de 2 horas a 80 °C y una temperatura óptima de 75 °C para la oxidación de ABTS<sup>8</sup> (Martins *et al.*, 2002).

El locus TT\_C1370 de la cepa HB27 de la bacteria *T. thermophilus* codifica para la única oxidasa multicobre en este organismo (Henne *et al.*, 2004). La proteína codificada por este gen se identificó, clonó y caracterizó previamente por Miyazaki (2005). La enzima *Tth*-MCO (también conocida como *Tth*-lacasa) posee 462 residuos y presenta el color azul característico de la transferencia de carga  $S_{Cys-T1Cu}$ . Los primeros 22 residuos Met<sup>1</sup>-Ala<sup>22</sup> de la *Tth*-MCO corresponden al péptido señal, necesario para que la enzima sea exportada al periplasma de *T. thermophilus*, con el residuo Gln<sup>23</sup> del extremo N-terminal modificado a piroglutamato en la forma madura (Gln<sup>23</sup>-Gly<sup>462</sup>) de la enzima (Miyazaki, 2005). Esta forma madura de la *Tth*-MCO tiene un punto isoeléctrico (pI) teórico de 9.6<sup>9</sup> y un peso molecular calculado de 48.7 kDa, con una banda que migra a ~ 50 kDa en un gel SDS-PAGE<sup>10</sup> (Serrano-Posada *et al.*, 2011). Se demostró que a 90 °C y en presencia de 0.1 mM CuSO<sub>4</sub>, la *Tth*-MCO presenta actividad oxidasa con ABTS ( $K_m = 0.90$  mM;  $k_{cat} = 24.6$  s<sup>-1</sup>) y SGZ<sup>11</sup> ( $K_m = 1.88$  mM;  $k_{cat} = 6.47$  s<sup>-1</sup>), con un pH óptimo para estos dos sustratos de 4.5 y 5.5, respectivamente (Miyazaki, 2005). Sin embargo, Liu *et al.* (2011) demostraron que la *Tth*-MCO también oxida ABTS en ausencia de suplemento de Cu(II) a temperatura ambiente (~ 25 °C), con los siguientes parámetros cinéticos:  $K_m = 0.88$  mM;  $k_{cat}/K_m = 1.86$  min<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>, y 61.5 °C, con los siguientes parámetros cinéticos:  $K_m = 0.16$  mM;  $k_{cat}/K_m = 15.1$  min<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>. Adicionalmente, Miyazaki (2005) demostró que la temperatura óptima de la enzima para la oxidación de ABTS es de 92 °C, con un  $t_{1/2}$  de ~ 14 h a 80 °C, lo que la convierte en la oxidasa multicobre más termofílica a la fecha. Debido a la elevada resistencia a la desnaturalización térmica, la *Tth*-MCO presenta un gran potencial en aplicaciones biotecnológicas. De hecho, Zheng *et al.* (2012) demostraron que a 90 °C y pH 4.5, la *Tth*-MCO aumenta considerablemente el grado de deslignificación de la pulpa en el proceso industrial de la manufactura del papel, independientemente de la presencia o ausencia de ABTS como mediador en la oxidación de la lignina, demostrando de esta manera la sorprendente

<sup>8</sup> ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico.

<sup>9</sup> pI calculado en el servidor web H++: <http://biophysics.cs.vt.edu/index.php>

<sup>10</sup> SDS-PAGE por sus siglas en inglés: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*.

<sup>11</sup> Siringaldazina: 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído azina.

resistencia de la enzima a la desnaturalización física y/o química y el posible uso que presenta en diversos procesos industriales.

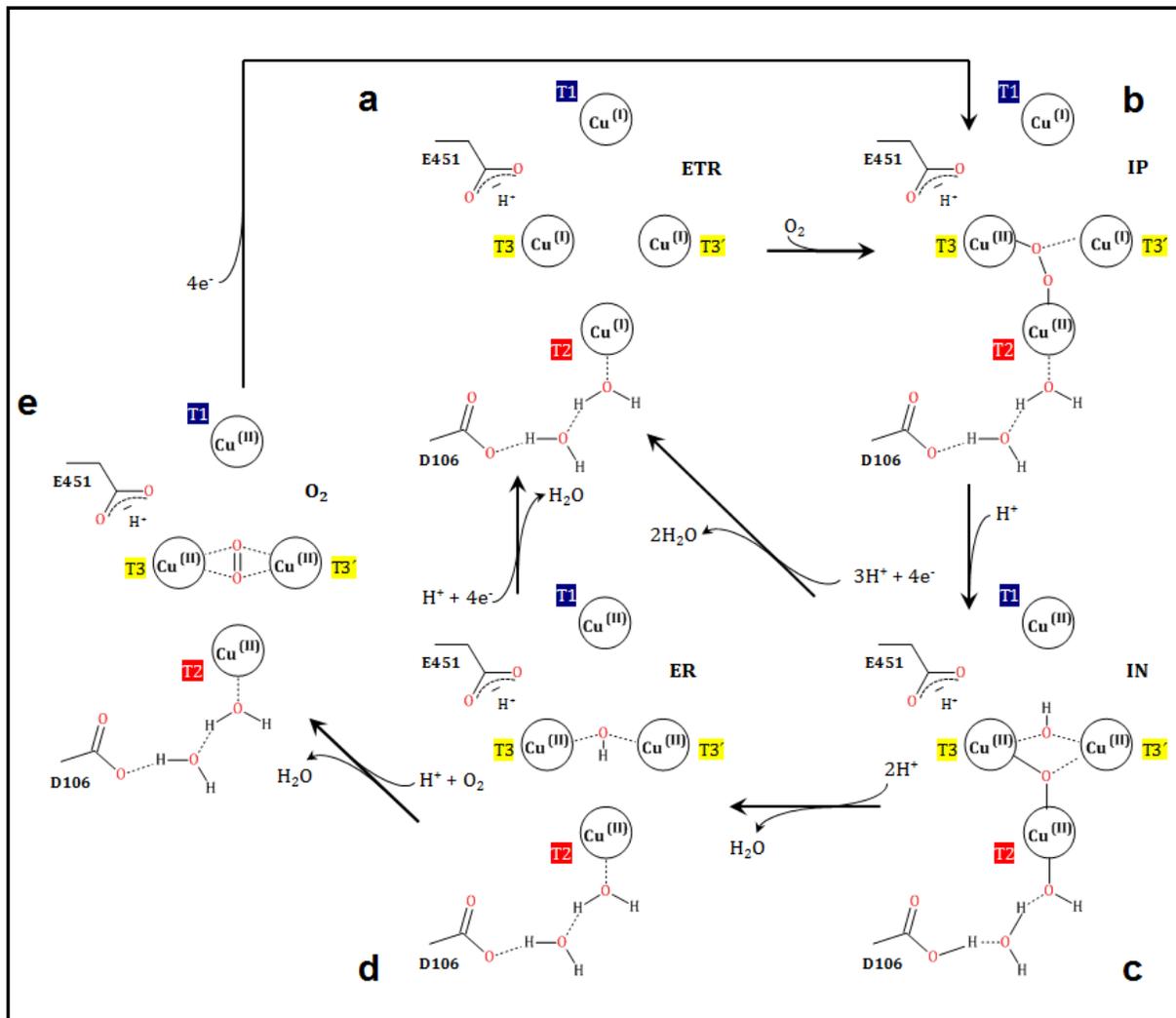
#### IV.4. Mecanismo de reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O en las oxidasas multicobre

Se han utilizado diversos métodos espectroscópicos, cinéticos y teóricos para estudiar el mecanismo de reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O en las oxidasas multicobre (**Figura 2**) (Solomon *et al.*, 2008). Inicialmente el O<sub>2</sub> se reduce en dos etapas de 2 e<sup>-</sup> cada una: la primera de ellas genera el intermediario peróxido (IP<sup>12</sup>) (**Figura 2b**; Yoon *et al.*, 2007) y la segunda genera el intermediario nativo (IN<sup>13</sup>) (**Figura 2c**; Lee *et al.*, 2002). Mientras que la formación del IP es la etapa limitante de la velocidad de la reacción, el decaimiento del IP al IN es bastante rápido en la holoenzima. Como resultado el IP no puede ser atrapado en la forma silvestre de la holoenzima y por lo tanto es difícil detectarlo bajo condiciones normales de reacción. Sin embargo, la caracterización espectroscópica del IP fue posible en la oxidasa multicobre Fet3p de *Saccharomyces cerevisiae* cuando se eliminó la coordinación Cys-T1Cu en la enzima mutante Cys/Ser (Palmer *et al.*, 2002) o cuando se reemplazó el Cu por Hg en el sitio T1 (generando un estado redox inactivo) en la lacasa de *Rhus Vernicifera* (Quintanar *et al.*, 2005b). Estructuralmente, en el IP un átomo de oxígeno del peróxido está coordinado al T3Cu, mientras el otro átomo de oxígeno se coordina al T2Cu y al mismo tiempo interactúa con el T3'Cu (Figura 2b). En la reacción del O<sub>2</sub> en el CTC no hay H<sup>+</sup> involucrados y por lo tanto la formación del IP es independiente del pH (Yoon *et al.*, 2007). Por el contrario, en la conversión del IP al IN hay H<sup>+</sup> involucrados y por lo tanto la reacción de ruptura del enlace -O-O- es dependiente del pH (Palmer *et al.*, 2002). En el CTC, un átomo de oxígeno del IN está en la mitad del centro trinuclear de cobre y el otro átomo de oxígeno (OH<sup>-</sup>) está simétricamente ubicado entre los 2 T3Cu (Augustine *et al.*, 2010). Adicionalmente, el IN es precursor del ER con un OH<sup>-</sup> coordinado entre los 2 T3Cu y una molécula de H<sub>2</sub>O coordinada al T2Cu (**Figura 2d**; Solomon *et al.*, 2008). Sin embargo, el decaimiento del IN al ER no es catalíticamente relevante porque únicamente ocurre en ausencia de electrones (Yoon *et al.*, 2007). Por lo tanto, bajo condiciones catalíticas, el IN no se detecta porque reacciona rápidamente con el sustrato o agente reductor para formar el ETR (**Figura 2a**) que inicia el siguiente ciclo catalítico, evitando así formar el ER (Augustine *et al.*, 2010). Sin embargo, el ER es el estado más común en las estructuras cristalográficas de las oxidasas multicobre determinadas a la fecha, porque el ciclo catalítico de reducción del O<sub>2</sub> (**Figura 2e**), inducida por rayos X, no es eficiente en el estado cristalino y es precisamente esta

<sup>12</sup> También conocido como PI por sus siglas en inglés: *peroxide intermediate*.

<sup>13</sup> También conocido como NI por sus siglas en inglés: *native intermediate*.

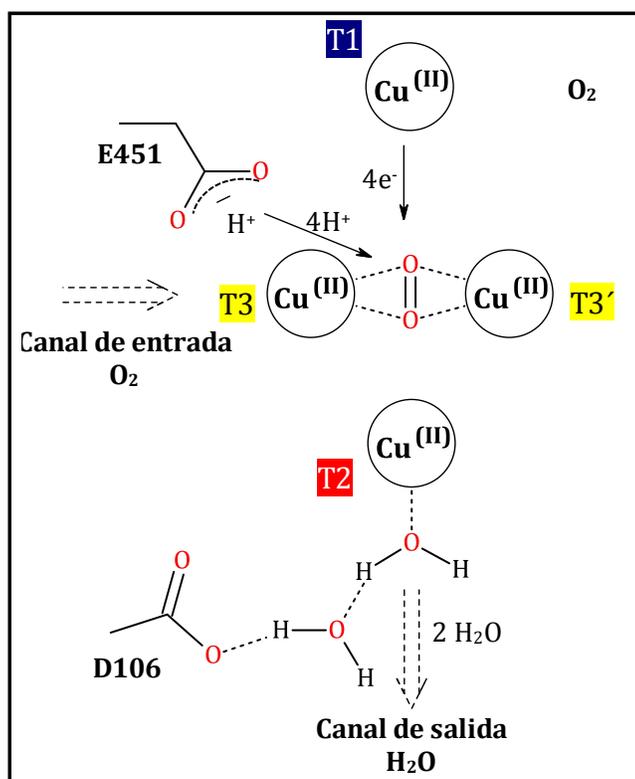
característica la que de hecho permite que este mecanismo pueda ser estudiado por cristalografía de rayos X (Hakulinen *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Mecanismo de reducción del  $O_2$  a  $2 H_2O$  en las oxidasas multicobre. Los residuos Glu<sup>451</sup> y Asp<sup>106</sup> de la *Tth*-MCO se encuentran en la segunda esfera de coordinación del CTC. El residuo Glu<sup>451</sup> es el encargado de donar los protones necesarios en el ciclo catalítico, mientras que el residuo Asp<sup>106</sup> estabiliza las especies  $OH^-/H_2O$  coordinadas al T2Cu. Figura tomada y modificada de Bento *et al.*, 2005 y Augustine *et al.*, 2010.

#### IV.5. Residuos ácidos que participan en el mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del $O_2$ a $2 H_2O$ en las oxidasas multicobre

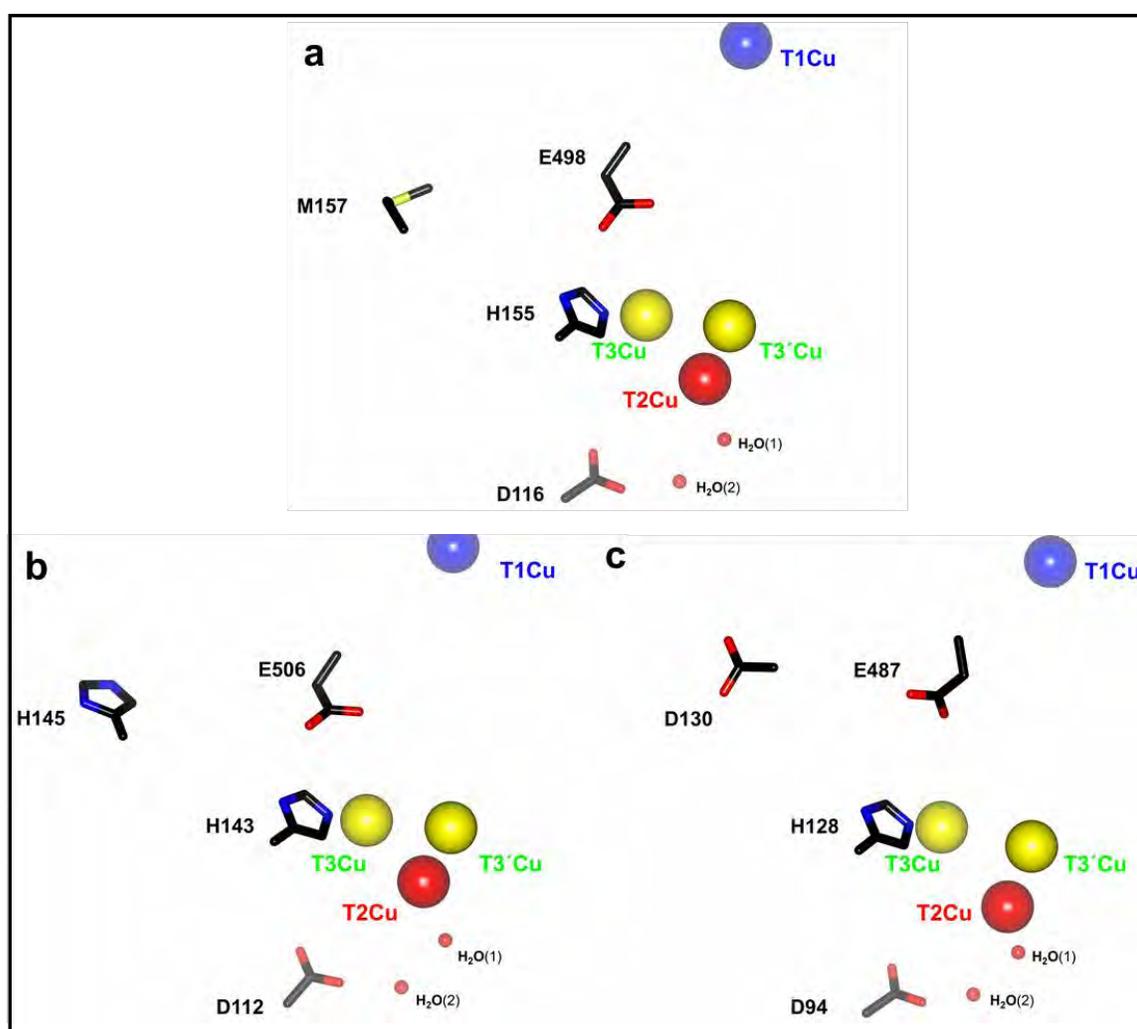
Diversos análisis estructurales demostraron que la familia de las oxidasas multicobre posee un par de residuos ácidos altamente conservados en la segunda esfera de coordinación del CTC (Quintanar *et al.*, 2005a; Augustine *et al.*, 2007; Kataoka *et al.*, 2009; Bento *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010b). Específicamente, un ácido glutámico o aspártico vecino a uno de los dos cobres del sitio T3 o en la mitad del CTC, en el canal de entrada del  $O_2$ , y un ácido aspártico cerca al T2Cu en el canal de salida de las moléculas de  $H_2O$  (**Figura 3**).



**Figura 3.** Residuos ácidos que participan en el mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del  $O_2$  a  $2 H_2O$  catalizada por una oxidasa multicobre. El residuo Glu<sup>451</sup> en el canal de entrada del  $O_2$  y el residuo Asp<sup>106</sup> en el canal de salida de las moléculas de  $H_2O$  pertenecen a la *Tth*-MCO (código PDB 2XU9). El estado  $O_2$  se caracterizó por cristalografía (Bento *et al.*, 2005 (código PDB 1W6L); Hakulinen *et al.*, 2006 (código PDB 2IH8)).

La *Tth*-MCO posee estos dos residuos ácidos conservados en la segunda esfera de coordinación: Glu<sup>451</sup> y Asp<sup>106</sup> (Glu<sup>498</sup>/Asp<sup>116</sup> en CotA de *B. subtilis* (Bento *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010b), Glu<sup>506</sup>/Asp<sup>112</sup> en CueO de *E. coli* (Kataoka *et al.*, 2009) y Glu<sup>487</sup>/Asp<sup>94</sup> en Fet3p de *S.*

*cerevisiae* (Quintanar *et al.*, 2005a; Augustine *et al.*, 2007) (**Figura 4**). Se demostró que los residuos Glu<sup>498</sup>, Glu<sup>506</sup> y Glu<sup>487</sup> en CotA, CueO y Fet3p, respectivamente, desempeñan un papel significativo en el paso de protonación que ocurre en el CTC, proporcionando los H<sup>+</sup> necesarios para la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O, específicamente en el decaimiento del IP al IN y del IN a 2 H<sub>2</sub>O. Los residuos Asp<sup>116</sup>, Asp<sup>112</sup> y Asp<sup>94</sup> en CotA, CueO y Fet3p, respectivamente, no están implicados en la transferencia de H<sup>+</sup> al CTC, pero sí desempeñan un papel importante en la estabilización de las especies OH<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O(1); Figura 4), las cuales se observan en distintos intermediarios y estados de la reducción del O<sub>2</sub>. Estas especies están coordinadas al T2Cu e interaccionan con el residuo de Asp vía puentes de hidrógeno con una molécula de H<sub>2</sub>O estructural (H<sub>2</sub>O(2); Figura 4) (Augustine *et al.*, 2007; Kataoka *et al.*, 2009; Bento *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010b).



**Figura 4.** Residuos ácidos que participan en el mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O catalizada por una oxidasa multicobre. **a)** CotA (código PDB 1W6L), **b)** CueO (código PDB 1KV7), **c)** Fet3p (código PDB 1ZPU).

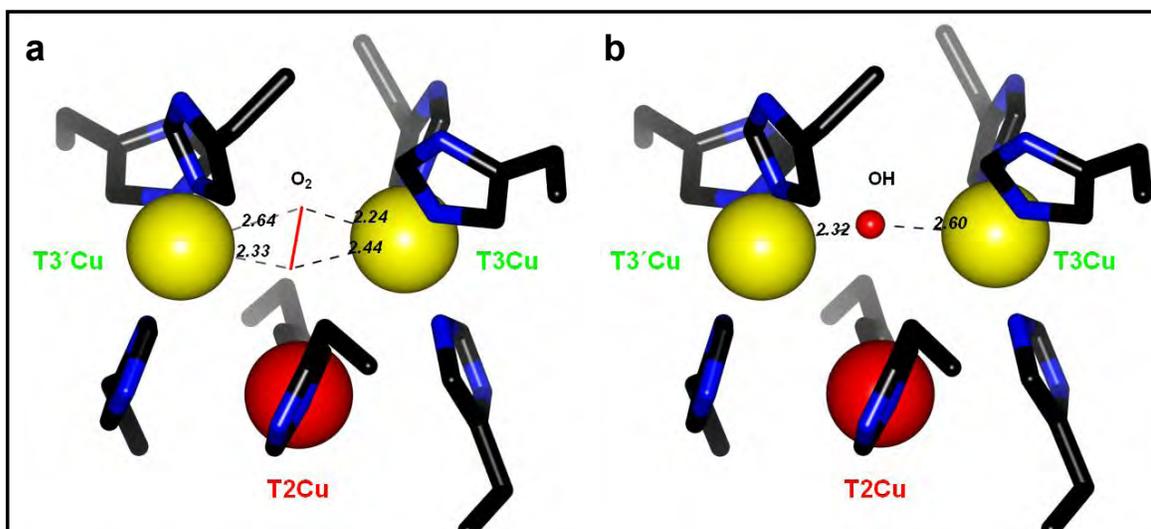
La ausencia de estos dos residuos ácidos en la segunda esfera de coordinación del CTC, como se observó en distintos mutantes para CotA, CueO y Fet3p, produce una importante pérdida de la velocidad de reducción del  $O_2$  a  $2 H_2O$ , confirmando la importancia de los mismos en el mecanismo catalítico de esta familia de enzimas. En CotA, la enzima mutante Glu<sup>498</sup>/Asp conservó una actividad del 10%, mientras que las mutantes Glu<sup>498</sup>/Thr y Glu<sup>498</sup>/Leu perdieron un 99% de la actividad para la oxidación de sustratos fenólicos y no-fenólicos debido a la falta de afinidad del CTC por el  $O_2$  (Chen *et al.*, 2010b). De hecho, en las estructuras cristalográficas de los mutantes Asp<sup>116</sup>/Ala y Asp<sup>116</sup>/Asn en CotA, el ciclo catalítico se detuvo en el IP, demostrando la importancia de este residuo en el decaimiento de este intermediario (Figura 2; Silva *et al.*, 2012). Igualmente, la enzima mutante Asp<sup>112</sup>/Asn en CueO (Kataoka *et al.*, 2009) y las mutantes Asp<sup>94</sup>/Ala y Asp<sup>94</sup>/Asn en Fet3p (Quintanar *et al.*, 2005a) también se detuvieron en el IP.

#### IV.6. Reducción inducida por rayos X de sitios metálicos en metaloenzimas

En los primeros segundos de irradiación de un cristal de proteína con un haz intenso de rayos X se liberan electrones al sistema como resultado del proceso de radiólisis de las moléculas de  $H_2O$  del cristal (Garman, 2010). Así, la función principal del T1Cu de oxidar sustratos y enviar los electrones producto de esta oxidación al CTC para la reducción del  $O_2$  a  $2 H_2O$  se puede realizar y reproducir en estado cristalino, en ausencia de sustratos, durante la colecta de datos de difracción de rayos X de un cristal de proteína. En consecuencia, la estructura cristalográfica final de una oxidasa multicobre es un promedio de los distintos estados de oxidación de los átomos de Cu y de los intermediarios y estados de reducción del  $O_2$  (Hakulinen *et al.*, 2006; Macedo *et al.*, 2009). En principio, este proceso es un problema inherente e inevitable en la determinación tridimensional de estructuras cristalográficas de proteínas. Sin embargo, también es un fenómeno que se puede utilizar para estudiar los mecanismos redox de metaloenzimas por cristalografía de rayos X.

Hakulinen *et al.* (2006) determinaron dos estructuras cristalográficas de la lacasa de *Melanocarpus albomyces* a alta y baja dosis de radiación. En este estudio se demostró que la reducción del  $O_2$  inducida por rayos X tiene lugar durante la colecta de datos y se observaron distintos estados de reacción, dependiendo de la dosis de radiación absorbida que se utilizó para la determinación estructural. A alta dosis de radiación absorbida se obtuvo el ER, mientras que la estructura a baja dosis de radiación absorbida presentó el  $O_2$  ubicado entre el centro binuclear T3Cu-T3'Cu en el CTC (**Figura 5**). Este estudio demostró que se puede reproducir la reducción inducida del  $O_2$  a  $2 H_2O$  al obtener una serie de estructuras cristalográficas con diferente dosis de

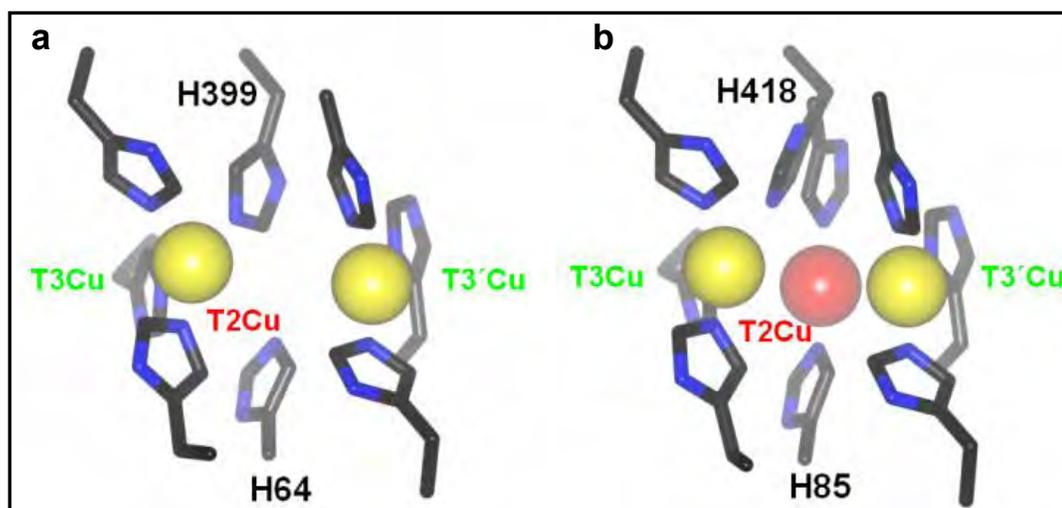
radiación absorbida, y por lo tanto estudiar esta reacción en el estado cristalino. Una estructura cristalográfica normalmente es un promedio de todos los estados de reducción de la proteína, ya que para obtener un *data set* completo se combinan los datos obtenidos desde el inicio de la colecta de datos, cuando la dosis es baja, hasta el final de la colecta, cuando la dosis es alta. Para evitar este inconveniente y obtener estructuras cristalográficas con distinta dosis de radiación absorbida, Berglund *et al.* (2002) desarrollaron una metodología novedosa para estudiar el mecanismo de reacción de metaloenzimas por cristalografía de rayos X. En este método se describió una estrategia multicristal de colecta de datos, basada en la distribución sistemática de la dosis de radiación absorbida sobre un grupo de cristales. Para lograr esto se difracta un grupo de cristales de la misma enzima bajo las mismas condiciones y se combinan los datos procedentes de las mismas regiones de cada uno de los cristales, generando estructuras cristalográficas compuestas con diferente dosis de radiación absorbida. Así, Berglund *et al.* (2002) construyeron una película tridimensional de la reducción del O<sub>2</sub> inducida por rayos X usando una peroxidasa de rábano blanco.



**Figura 5.** Geometría del CTC de dos estructuras cristalográficas de la lacasa de *M. albomyces*. **a)** Estado O<sub>2</sub> presente en la estructura a baja dosis de radiación (código PDB 2IH8). **b)** ER con el OH- modelado como un oxígeno atómico en la estructura a alta dosis de radiación (código PDB 2IH9) (Hakulinen *et al.*, 2006). Las distancias mostradas en la figura están en Å.

Por otro lado, en la familia de las oxidasas multicobre el T2Cu es considerado el átomo de Cu más lábil (Fraterrigo *et al.*, 1999; Ducros *et al.*, 2001), comparado con el T1Cu y el centro binuclear T3Cu-T3'Cu. Esto quedó en evidencia en las estructuras cristalográficas de las lacasas de *Coprinus cinereus* (Ducros *et al.*, 1998) (**Figura 6a**) y *Trametes hirsuta* (código PDB 3PXL), en las que el

T2Cu no se encontró. Es innegable que el T2Cu es el átomo con la coordinación más débil, ya que está coordinado únicamente por dos residuos de His, mientras que los restantes átomos de Cu en las oxidasas multicobre tienen tres enlaces de coordinación. Para explicar la ausencia del T2Cu en las estructuras cristalográficas, los autores de este estudio (Ducros *et al.*, 1998), utilizaron esta última justificación, así como también el uso del agente quelante EDTA<sup>14</sup> previamente a la cristalización de la enzima. Sin embargo, cada vez se acepta más ampliamente que la labilidad del T2Cu se debe principalmente a la susceptibilidad de este átomo a los rayos X, debido a que el mismo se encuentra en el canal de salida de las moléculas de H<sub>2</sub>O (Figura 3), producto del ciclo catalítico de la reducción del O<sub>2</sub> y por lo tanto está más expuesto al daño por dosis de radiación absorbida por causa de los electrones hidratados que se generan como resultado de la radiólisis de las moléculas de H<sub>2</sub>O del cristal (Garman, 2010). Así, y con el objetivo de determinar la dosis de radiación mínima requerida para la eliminación completa del T2Cu en la estructura de la lacasa de *Corioloopsis gallica* (Cg L), De la Mora *et al.* (2012) obtuvieron distintas estructuras a alta y baja dosis de radiación absorbida y demostraron que el T2Cu se elimina de las estructuras cristalográficas a una dosis de radiación absorbida entre 0.6-4 MGy (Figura 6b).



**Figura 6.** Geometría del CTC. **a)** Estructura de la lacasa de *C. cinereus* con el T2Cu eliminado. Las His<sup>64</sup>-His<sup>399</sup> coordinan al T2Cu y se observa una conformación de la His<sup>399</sup> alejada del sitio T2 debido a la ausencia de este átomo en la estructura (código PDB 1A65; Ducros *et al.*, 1998). **b)** CTC completo en la estructura de la lacasa de *C. gallica* a baja dosis de radiación (0.6 MGy; código PDB 4A2E). Las His<sup>85</sup>-His<sup>418</sup> coordinan al T2Cu. La His<sup>418</sup>, equivalente a la His<sup>399</sup> en (a), se observa en dos conformaciones pero la baja dosis de radiación evita que el T2Cu se elimine por completo de la estructura cristalográfica (De la Mora *et al.*, 2012).

<sup>14</sup> EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

Con base en estos antecedentes y debido a que los residuos ácidos equivalentes al Glu<sup>451</sup> y Asp<sup>106</sup> de la *Tth*-MCO están conservados en toda la familia de las oxidasas multicobre, las doce estructuras tridimensionales por difracción de rayos X determinadas en este trabajo aportan las bases estructurales del mecanismo de transferencia de protones en esta familia de enzimas. Por otro lado, la *Tth*-MCO también es un objetivo interesante para estudios de reducción inducida por rayos X, ya que la presencia de los cuatro átomos de Cu en los dos sitios activos de la enzima concentra el daño por dosis de radiación absorbida y/o los efectos de radiólisis en los alrededores, por lo que es posible estudiar el mecanismo de reducción del O<sub>2</sub> en estado cristalino. Así, utilizando la técnica de Berglund *et al.* (2002) se generó una película tridimensional de la reducción del O<sub>2</sub> en el CTC de la *Tth*-MCO inducida por rayos X, y se demostró que el T2Cu se elimina de la estructura cristalográfica de la *Tth*-MCO a una dosis de radiación de al menos 2.5 MGy, valor que se encuentra en el intervalo establecido por De la Mora *et al.* (2012).

## V. JUSTIFICACIÓN

La determinación de la estructura cristalográfica de la *Tth*-MCO, aunada a la conocida resistencia que esta enzima presenta frente a la desnaturalización térmica (Miyazaki, 2005), permiten predecir para esta proteína un gran potencial en futuras aplicaciones biotecnológicas. El estudio cristalográfico de formas estructurales activas e inactivas para investigar mecanismos catalíticos en estado cristalino de metaloenzimas es un método novedoso que se aplica por primera vez a algún miembro de la familia de las oxidasas multicobre para entender el mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del O<sub>2</sub>. El hecho de que los residuos ácidos implicados en este mecanismo y ubicados en la segunda esfera de coordinación del CTC de la *Tth*-MCO se encuentren conservados en toda la familia de las oxidasas multicobre, extiende a esta familia el estudio particular de esta enzima, así como también establece una estrategia cristalográfica novedosa que podrá ser utilizada en el futuro para estudiar mecanismos redox de metaloenzimas. Para profundizar en el estudio del mecanismo de transferencia de protones se pretende utilizar por primera vez la metodología de Berglund *et al.* (2002) aplicada a la *Tth*-MCO y así generar una película cristalográfica tridimensional de la reducción del O<sub>2</sub>, por medio de la determinación de suficientes estructuras cristalográficas con distinta dosis de radiación absorbida. De esta manera se intentará reproducir sistemáticamente la reducción del O<sub>2</sub> en estado cristalino y atrapar distintos intermediarios y/o estados de reacción, y demostrar que los residuos ácidos que participan en el mecanismo de transferencia de protones actúan coordinadamente para generar parte de la fuerza motriz necesaria de esta reacción enzimática. Con este trabajo también se pretende establecer el daño en los centros de Cu de la *Tth*-MCO por la dosis de radiación absorbida y conocer por qué el T2Cu es considerado el átomo más lábil en esta familia de enzimas. La determinación de la dosis exacta para su eliminación de la estructura cristalográfica de la *Tth*-MCO establecerá un precedente en el que se advertirá a futuros autores sobre el cuidado que se debe tener durante la colecta de datos de cristales de oxidasas multicobre. Así, cuando los experimentos bioquímicos demuestren experimentalmente un CTC completo en una oxidasa multicobre y en la estructura cristalográfica se observe un CTC incompleto con el T2Cu eliminado u otro átomo de cobre, un cálculo simple de la dosis de radiación absorbida durante la colecta de datos podrá demostrar que el(los) átomo(s) eliminado(s) de la estructura cristalográfica no contradice(n) los experimentos bioquímicos, sino que estos átomos sufrieron daño por dosis de radiación absorbida y se eliminaron de la estructura cristalográfica final a pesar de estar presentes en el cristal.

## VI. HIPÓTESIS

A través de la determinación tridimensional de distintas estructuras cristalográficas activas e inactivas y con distinta dosis de radiación absorbida en cristales irradiados de la *Tth*-MCO será posible reproducir en estado cristalino la reducción inducida por rayos X de una molécula de O<sub>2</sub> a dos moléculas de H<sub>2</sub>O, así como el mecanismo de transporte de protones asociado a esta reacción enzimática.

## VII. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Establecer las bases estructurales del mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del  $O_2$  a  $2 H_2O$  en la familia de las oxidasas multicobre, mediante la determinación de diferentes estructuras cristalográficas activas e inactivas y con distinta dosis de radiación absorbida de la *Tth*-MCO. Con los datos generados se espera al mismo tiempo reproducir el mecanismo de reducción del  $O_2$  en estado cristalino y determinar el daño por dosis de radiación absorbida en los centros metálicos de la enzima, así como establecer una estrategia cristalográfica novedosa que podrá ser utilizada en el futuro para estudiar mecanismos redox de metaloenzimas por cristalografía de rayos X.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Sobreexpresar, purificar, cristalizar y determinar la estructura tridimensional de la *Tth*-MCO por cristalografía de rayos X.
- Cristalizar y determinar la estructura tridimensional de la forma inactiva apo-*Tth*-MCO, así como también de otras dos formas inactivas enzima-mercurio: Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h.
- Generar una película cristalográfica mediante la determinación de suficientes estructuras tridimensionales de la *Tth*-MCO, con diferente dosis de radiación absorbida, por medio de la técnica multicristal de colecta de datos. Reproducir la reducción del  $O_2$  inducida por rayos y atrapar distintos intermediarios y/o estados de reacción.
- Determinar las bases estructurales del mecanismo de transferencia de protones por los residuos ácidos ubicados en la segunda esfera de coordinación del CTC, involucrados en la reducción del  $O_2$  a  $2 H_2O$ , mediante la comparación de las formas activas e inactivas y con distinta dosis de radiación absorbida de la *Tth*-MCO.
- Determinar el daño por dosis de radiación absorbida en los centros metálicos de la *Tth*-MCO y establecer el orden de labilidad de los mismos por la interacción con los rayos X.

## VIII. SECCIÓN EXPERIMENTAL

### VIII.1. Clonación, sobreexpresión y purificación de la *Tth*-MCO y apo-*Tth*-MCO

El proceso de clonación y sobreexpresión (Serrano-Posada *et al.*, 2011) se implementó originalmente en el laboratorio del Dr. Enrique Rudiño Piñera durante la tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas de José David Ruiz Aguilar, estudiante de la Dra. Brenda Valderrama Blanco (IBT-UNAM), siguiendo el protocolo descrito por Miyazaki (2005).

De manera general, la cepa de *T. thermophilus* HB27 (DSM 7039, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen<sup>15</sup>; Oshima *et al.*, 1974) se creció como lo describieron Domínguez *et al.* (2010) y el ADN genómico se aisló utilizando el kit *Ultra Clean Microbial DNA-isolation* (MO BIO). El gen codificado por el locus TT\_C1370 se obtuvo por amplificación del ADN genómico utilizando los cebadores 5'-CATATGCAAGGCCCTTCCTTCCCC-3' y 5'-CGAATTCCCCACC-TCGAGGACTCCCAT-3'. El fragmento amplificado se clonó en el vector pGEM-T *Easy Vector* (Promega) y se confirmó por secuenciación. Uno de los plásmidos con la secuencia correcta se digirió con *NdeI* (New England Biolabs) y *EcoRI* (New England Biolabs) y el fragmento liberado de ~ 1.5 kb se clonó en el plásmido pET32a(+) (Novagen), generando el plásmido p*Th1*. Se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) con el p*Th1* y se crecieron en platos de agar con el medio Luria-Bertani (LB) [1% (w/v) triptona (BD), 0.5% (w/v) extracto de levadura (BD), 1% (w/v) NaCl (J.T. Baker)] con 200 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina (Sigma) y 20 µg mL<sup>-1</sup> de tetraciclina (Research Organics) a 37 °C. Una muestra del cultivo BL21 (DE3)/p*Th1* crecido exponencialmente se colectó por centrifugación, se resuspendió en solución estéril 50% (v/v) de glicerol (Sigma) y se conservó a -80 °C. Para la sobreexpresión de la *Tth*-MCO, una alícuota del *stock* de células a -80 °C se descongeló y se inoculó en 30 mL de LB con 200 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina y 20 µg mL<sup>-1</sup> de tetraciclina (O/N<sup>16</sup> (12 horas), agitación, 30 °C). Se inocularon 2 L de LB con 10 mL del preinóculo cada uno y se adicionaron 200 µg mL<sup>-1</sup> ampicilina y 20 µg mL<sup>-1</sup> de tetraciclina (agitación, 30 °C). Tres horas después se realizó la inducción de los 2 L de LB inoculado con 0.1 mM de IPTG<sup>17</sup> (Fermentas), cuando la densidad óptica a 600 nm alcanzó 0.5, y se incubaron por 24 h (agitación, 30 °C). Se cosecharon las células por centrifugación (7500 *g*, 30 min, 4 °C) y se resuspendieron en 50 mL de amortiguador 20 mM Tris (BIO-RAD) pH 8.0, con una pastilla de *complete* (cóctel de inhibidor

<sup>15</sup> Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares. Organización sin ánimo de lucro dedicada a la adquisición, caracterización, identificación, preservación y distribución de bacterias, arqueas, hongos, plásmidos, bacteriófagos, líneas celulares de animales y humanas y cultivos celulares y virus de plantas.

<sup>16</sup> O/N (Overnight).

<sup>17</sup> IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.

de proteasas; Roche Molecular Biochemicals) y DNAasa ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Sigma). Se *sonicaron* las células en hielo y el producto de células rotas y extracto crudo se calentó en un baño maría a  $65^\circ\text{C}$  durante 20 min para precipitar la mayoría de proteínas termolábiles de *E. coli* y facilitar el proceso de purificación de la enzima. La mezcla resultante se centrifugó ( $15300 g$ , 45 min,  $4^\circ\text{C}$ ) y se desechó el botón. El sobrenadante se dializó 5 veces contra 10 volúmenes de  $20 \text{ mM}$  Tris pH 8.0, a  $4^\circ\text{C}$  y  $0.1 \text{ mM}$  de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) (Sigma) para obtener a la *Tth*-MCO y sin  $\text{CuSO}_4$  para obtener a la apo-*Tth*-MCO<sup>18</sup>. Las siguientes etapas de purificación se realizaron a temperatura ambiente.

El sobrenadante se aplicó en una columna de intercambio catiónico (SP Sepharose™ Fast Flow, 25 mL de fase estacionaria, diámetro interno de 2.5 mm, 45-165  $\mu\text{m}$ ; GE Healthcare) pre-equilibrada con  $20 \text{ mM}$  Tris pH 8.0. Se pasaron seis volúmenes de columna de solución amortiguadora y la *Tth*-MCO se eluyó posteriormente con un gradiente lineal de NaCl (Research Organics) de 0-1 M en la solución amortiguadora de equilibrio a un flujo de  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Las fracciones de la *Tth*-MCO con actividad oxidasa<sup>19</sup> se concentraron a un volumen final de 1.5 mL por ultrafiltración (Amicon Ultra-15; Millipore) con una membrana de corte molecular de 30 kDa. Este volumen se inyectó en una columna de exclusión molecular (Sephacryl 300 HR, 140 mL de fase estacionaria, 400 mm longitud, diámetro interno de 2.6 mm, 25-75  $\mu\text{m}$ ; Sigma) pre-equilibrada con  $20 \text{ mM}$  Tris pH 8.0,  $50 \text{ mM}$  NaCl y la *Tth*-MCO se eluyó con un flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .

Después de cada cromatografía se realizaron electroforesis desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12% para detectar el pico correspondiente de la *Tth*-MCO. La proteína se cuantificó por el método de Bradford (BIO-RAD; Bradford, 1976) utilizando un espectrofotómetro Helios Gamma UV-Visible (Thermo). Se determinó el punto isoeléctrico de la *Tth*-MCO utilizando un gel previamente hidratado *phastgel* (Amersham biosciences) con un intervalo de pH entre 3-9 y corriente eléctrica entre 75-500 A en un equipo *PhastSystem* (Pharmacia). En todos los casos los geles fueron teñidos con azul de *coomassie* (Sigma).

## VIII.2. Determinación cualitativa y cuantitativa de los átomos de cobre por molécula de la *Tth*-MCO y apo-*Tth*-MCO

Antes de iniciar los ensayos de cristalización se determinó la presencia o ausencia de los cuatro átomos de Cu por molécula de holo- y apo-*Tth*-MCO. En un primer experimento se prepararon soluciones  $400 \mu\text{M}$  de la *Tth*-MCO y  $500 \mu\text{M}$  de la apo-*Tth*-MCO en  $20 \text{ mM}$  Tris pH 8.0 y

<sup>18</sup> De aquí en adelante y en todos los procesos se usó agua desionizada-tetradestilada para evitar contaminantes en la solución de proteína antes de realizar las pruebas de cristalización.

<sup>19</sup> En general, después de cada etapa de purificación se tomaron alícuotas de 1-2  $\mu\text{L}$  de cada uno de los tubos de ensayo y se les midió cualitativamente actividad oxidasa con diferentes sustratos.

se determinó cualitativamente la presencia de los picos de absorción del T1Cu ( $\lambda \sim 610$  nm) y el centro binuclear T3Cu-T3'Cu ( $\lambda \sim 330$  nm) en la *Tth*-MCO y la ausencia de los mismos en la apo-*Tth*-MCO por medio de un barrido de longitudes de onda en el UV-visible utilizando un equipo Helios Gamma UV-Visible.

Para determinar cuantitativamente la cantidad de átomos de Cu por molécula de proteína se utilizó el método de la 2,2-biquinolina. El agente quelante 2,2-biquinolina reacciona con Cu(I) y forma un compuesto organometálico de color violeta que presenta un máximo de absorción a  $\lambda = 546$  nm (Felsenfeld, 1960). Antes de realizar la reacción con 2,2-biquinolina se utilizó un exceso de ácido ascórbico (8 mM) (Sigma) para reducir todos los átomos de Cu(II) de la *Tth*-MCO a Cu(I). Se construyó una curva de calibración de absorbancia (546 nm) versus [Cu] ( $\mu\text{M}$ ), utilizando 6 soluciones patrón de 100  $\mu\text{L}$  cada una, con concentraciones: 20, 40, 50, 60, 80 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  y una concentración final de 8 mM de ácido ascórbico. Se incubaron las soluciones patrón por 10 minutos a temperatura ambiente para garantizar la completa reducción de todos los átomos de Cu(II) a Cu(I) y se formó el compuesto organometálico por la adición de 100  $\mu\text{L}$  de solución de 2,2-biquinolina (Sigma), a una concentración de 0.5 mg mL<sup>-1</sup> en ácido acético glacial (Sigma), a cada uno de los 100  $\mu\text{L}$  de las soluciones patrón.

Después de construir la curva de calibración se prepararon 100  $\mu\text{L}$  de solución proteína con una concentración final de 25  $\mu\text{M}$  de la *Tth*-MCO. Se calentó la solución de proteína en un recipiente sellado por 20 minutos a 110 °C para preparar el compuesto organometálico Cu(I)-[2,2-biquinolina] con los átomos de Cu de la *Tth*-MCO. Así, los cuatro átomos de Cu(II) por molécula de enzima desnaturalizada se liberaron a la solución y se redujeron a Cu(I) por la adición de ácido ascórbico a una concentración final de 8 mM. La solución se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente para garantizar la completa reducción todos los átomos de Cu(II) a Cu(I). A esta solución se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de 2,2-biquinolina a una concentración de 0.5 mg mL<sup>-1</sup> en ácido acético glacial. Se determinó la absorbancia a 546 nm y se calculó la cantidad de átomos de cobre por molécula de proteína de acuerdo a la curva de calibración.

El mismo proceso se realizó con la apo-*Tth*-MCO. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

### VIII.3. Cristalización de la holo- y apo-*Tth*-MCO. Obtención de las formas Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h por remojo<sup>20</sup>

Las pruebas de cristalización se realizaron con el método de difusión en fase vapor bajo la modalidad de gota colgante y gota sedente<sup>21</sup>, utilizando el *Crystal Screen I y II* (Hampton Research). Los cristales de la *Tth*-MCO con dimensiones de  $\sim 25 \times 100 \times 250 \mu\text{m}$  se obtuvieron después de 10 meses utilizando la técnica de gota colgante en la condición de cristalización No. 35 del *Crystal Screen II* (Hampton Research), la cual está compuesta de 0.1 M Hepes pH 7.5 y 70% (v/v) ( $\pm$ )-2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), y concentración de proteína de 19.5 mg mL<sup>-1</sup> en 20 mM Tris pH 8.0. Para optimizar el tiempo de cristalización se diseñaron diferentes matrices variando el porcentaje de MPD: 60, 65, 70, 75, 80, 85 y 90% (v/v) y la concentración de proteína: 20, 30, 40 y 50 mg mL<sup>-1</sup>. Después de este proceso de optimización, el tiempo de cristalización se redujo de 10 a 3 meses y se obtuvieron cristales con dimensiones de  $\sim 25 \times 50 \times 100 \mu\text{m}$  bajo la modalidad de gota colgante, gota sedente y micropuentes, en solución de reservorio de 0.1 M Hepes pH 7.5 y 60, 65 y 70% (v/v) MPD y concentración de proteína de 30 mg mL<sup>-1</sup> en 20 mM Tris pH 8.0. Estos cristales se utilizaron tanto para experimentos de difracción de rayos X, como fuente de núcleos cristalinos en la técnica de microsembrado<sup>22</sup>. Utilizando esta última técnica se transfirieron una gran cantidad de núcleos cristalinos a gotas nuevas con solución de proteína y solución de reservorio utilizando una fibra natural<sup>23</sup> (Hampton Research). Se observaron cristales pequeños después de una semana pero necesitaron entre 1-2 meses para crecer y tener las dimensiones de  $\sim 25 \times 50 \times 100 \mu\text{m}$  y poder ser usados en experimentos de difracción de rayos X<sup>24</sup>.

Se obtuvieron cristales de la apo-*Tth*-MCO con dimensiones de  $\sim 25 \times 100 \times 250 \mu\text{m}$  en 3 meses, bajo la modalidad de gota colgante en solución de reservorio compuesta de 0.1 M Hepes pH 7.5 y 65 y 70% (v/v) MPD y concentración de proteína de 30 mg mL<sup>-1</sup> en 20 mM Tris pH 8.0. Estos cristales crecieron como placas superpuestas y tuvieron que ser separados con una aguja de acupuntura antes de ser difractados.

<sup>20</sup> Método mejor conocido como *soaking*.

<sup>21</sup> Para observar los efectos que tenía la difusión en fase vapor sobre el tiempo de cristalización de la proteína en la modalidad de gota sedente se utilizaron: (i) cajas clásicas de gota sedente y (ii) cajas de gota colgante adaptadas con micropuentes dentro del reservorio. De aquí en adelante le llamaré a (ii): micropuentes.

<sup>22</sup> Método mejor conocido como *microseeding*.

<sup>23</sup> Hampton Research no especifica qué tipo de fibra natural utilizan, aunque generalmente es un pelo de cola de caballo, bigote de gato o conejo, ya que la parte final de este tipo de pelos contiene numerosas ramificaciones laterales, útiles para atrapar núcleos cristalinos.

<sup>24</sup> La línea X6A donde se colectaron todos los datos cristalográficos de este proyecto está instalada a partir de un *bending magnet*. Sólo se pueden usar cristales para experimentos de difracción de rayos X con dimensiones menores a las mencionadas en este manuscrito en líneas que poseen un *undulator o wiggler* y un monocromador específico para enfocar al haz.

Los dos derivados enzima-mercurio: Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h se obtuvieron por remojo de dos cristales de apo-*Tth*-MCO por 5 min y 2 h, respectivamente, con 5 mM de cloruro de mercurio (II) (HgCl<sub>2</sub>) (Hampton Research).

El volumen dentro del reservorio en la modalidad de gota colgante fue de 1 mL y en la modalidad de gota sedente y micropuentes de 0.5 mL. Todas las gotas tenían un volumen final de 2 µL, con proporciones iguales de solución de proteína y solución del reservorio (1 + 1 µL). La cristalización se realizó a 4 °C y se utilizó agua tetradestilada en todos los casos.

#### **VIII.4. Colecta de datos, solución estructural y afinamiento de la *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h**

Los datos de difracción de la *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h se colectaron en la línea X6A del *National Synchrotron Light Source* (NSLS), *Brookhaven National Laboratory* (BNL), Upton, Nueva York, EE.UU., utilizando un detector ADSC Quantum 270. Todas las colectas se realizaron a 100 K (-173 °C) y se utilizó un crioprotector compuesto de 0.1 M HEPES pH 7.5 y 45% (v/v) MPD para la *Tth*-MCO y apo-*Tth*-MCO. Esta misma solución crioprotectora con 5 mM de HgCl<sub>2</sub> se utilizó para la colecta de datos de difracción de rayos X de las formas estructurales Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h.

Se colectó un espectro de fluorescencia de un cristal de la *Tth*-MCO y se identificó la  $\lambda = 1.3767 \text{ \AA}$  como el pico de fluorescencia de los átomos de cobre nativos de la enzima. Así, se colectaron datos de difracción a dos longitudes de onda diferentes:  $\lambda = 0.9795 \text{ \AA}$  (12660 eV) y  $\lambda = 1.3767 \text{ \AA}$  (9003 eV) para el mismo cristal de la *Tth*-MCO y se utilizó la última longitud de onda para la técnica de dispersión anómala (SAD<sup>25</sup>). Los espectros de absorción de rayos X se colectaron en el modo de fluorescencia en la línea X6A utilizando un monocromador de Si con un canal de corte Si(111) y un detector de fluorescencia hecho en casa, ubicado a 90° del haz de rayos X. La distancia cristal-detector se mantuvo en 180 mm con un intervalo de oscilación ( $\Delta\phi$ ) por imagen de 0.5°. La determinación del grupo espacial, parámetros de celda unidad, estimación del mosaicismo y la integración de los datos se realizó con el programa *XDS* (Kabsch, 2010). El ordenamiento y escalamiento de los datos se realizó en *SCALA*, programa que funciona en la *suite CCP4* versión 6.1.1 (Winn *et al.*, 2011). Todos los cristales de la *Tth*-MCO pertenecieron al sistema cristalino ortorrómbico, grupo espacial *C222*<sub>1</sub> centrado en la cara C, con parámetros de celda unidad de  $a =$

<sup>25</sup> SAD por sus siglas en inglés: *Single-Wavelength Anomalous Dispersion*.

93.6 Å,  $b = 110.3$  Å,  $c = 96.3$  Å,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . Un total de 899414 reflexiones se integraron a una resolución de 1.5 Å y se combinaron para obtener 78896 reflexiones únicas con un  $R_{merge}$  global de 0.086 e integridad de 94.7%. El cálculo del coeficiente de Matthews demostró la presencia de un monómero en la unidad asimétrica ( $V_M = 2.60$  Å<sup>3</sup> Da<sup>-1</sup>, 53% contenido de solvente).

Se colectó un *data set* a  $\lambda = 1.3747$  Å para un cristal de la apo-*Tth*-MCO a 1.7 Å de resolución, con parámetros de celda unidad de  $a = 93.0$  Å,  $b = 110.1$  Å,  $c = 96.3$  Å,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ .

Para el cristal de la forma Hg-*Tth*-MCO se colectó un *data set* ( $\lambda = 0.8321$  Å) a 1.7 Å de resolución, con parámetros de celda unidad de  $a = 93.5$  Å,  $b = 110.2$  Å,  $c = 96.3$  Å,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  y para el cristal de la Hg-*Tth*-MCO-2h se colectó un *data set* ( $\lambda = 0.9795$  Å) a 1.7 Å de resolución, con parámetros de celda unidad de  $a = 93.3$  Å,  $b = 110.1$  Å,  $c = 96.2$  Å,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ .

En todos los casos anteriores el grupo espacial fue  $C222_1$ . Asumiendo un grupo espacial  $C222$  el  $R_{merge}$  global para el *data set* de la *Tth*-MCO, con límites de resolución entre 23.0-1.5 Å, fue de 0.093 y de 0.668 en la última faja de resolución. Sin embargo, cuando este *data set* con los mismos límites de resolución se integró en el grupo espacial  $C222_1$  el valor de  $R_{merge}$  global fue de 0.086 y de 0.395 en la última faja de resolución. Además, cuando todos los *data sets* se integraron en el grupo espacial  $C222$ , un eje tornillo se observó en la gráfica de reflexión axial  $I/\sigma(I)$  versus  $00l$ , la cual es una condición de reflexión general ( $00l: l = 2n$ ) indicativa del grupo  $C222_1$ . Adicionalmente *POINTLESS* (Evans, 2006) claramente escogió al grupo espacial  $C222_1$  con una probabilidad del 97.5%.

Se utilizó la oxidasa multicobre CueO de *E. coli* (código PDB 1KV7; Roberts *et al.*, 2002) para determinar las fases de la *Tth*-MCO por reemplazo molecular (MR<sup>26</sup>), en vista de que esta enzima presenta la mayor identidad con la *Tth*-MCO: 31.5%. A pesar de esto, las fases obtenidas utilizando *Phaser\_MR* (McCoy *et al.*, 2007) no fueron suficientes para la determinación estructural de la *Tth*-MCO y la función de probabilidad no fue significativa. Sin embargo, un segundo intento para determinar las fases de la *Tth*-MCO combinando este resultado de MR con SAD para la *Tth*-MCO en *Phaser\_MR-SAD* (McCoy *et al.*, 2007) fue exitoso y se encontraron dos sitios de Cu totalmente ocupados y uno parcialmente ocupado. La construcción inicial del modelo de la *Tth*-MCO se realizó con *ARP/wARP* (Langer *et al.*, 2008). Por otro lado, las estructuras de la apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h se determinaron por MR en *Phaser\_MR* (McCoy *et al.*, 2007), utilizando las coordenadas atómicas de la *Tth*-MCO (código PDB 2XU9) como templatado.

<sup>26</sup> MR por sus siglas en inglés: *Molecular Replacement*.

Todas las estructuras se afinaron en *PHENIX* versión 1.6 (Adams *et al.*, 2010) hasta valores de  $R_{\text{work}}$  y  $R_{\text{free}}$  menores a 0.20 y con desviaciones (r.m.s.d<sup>27</sup>) satisfactorias de los ángulos y longitudes de enlace ideales. El afinamiento de todas las estructuras fue isotrópico y se alternó con la construcción manual y afinamiento en *Coot* (Emsley *et al.*, 2010). Un 5% de los datos se escogieron aleatoriamente y se conservaron durante todo el proceso de afinamiento para determinar el valor de  $R_{\text{free}}$ . Las moléculas de agua se adicionaron automáticamente en *PHENIX* y después se validaron en *Coot*, mientras que las moléculas de MPD y los átomos metálicos encontrados en las estructuras cristalográficas se adicionaron manualmente en *Coot* y después se afinaron en *PHENIX*. Las ocupaciones de todos los átomos se afinaron automáticamente en *PHENIX*. Sin embargo, las ocupaciones de los átomos metálicos se modificaron manualmente en los últimos ciclos de afinamiento hasta que el valor de desplazamiento térmico isotrópico de cada uno de los átomos metálicos se aproximó al valor de desplazamiento térmico isotrópico de los átomos vecinos. Para realizar esto se restringió la posibilidad de que *PHENIX* modificara las ocupaciones de los átomos metálicos automáticamente y se alternó la modificación manual de las mismas con ciclos de afinamiento en *PHENIX*. Todos los modelos estructurales determinados contienen 439 de los 462 residuos totales de la *Tth*-MCO en vista de que se clonó la forma madura de la proteína sin los residuos Met<sup>1</sup>-Ala<sup>22</sup> correspondientes al péptido señal y no se encontró densidad electrónica para el residuo Gln<sup>23</sup>. De acuerdo a la secuencia de aminoácidos, en la posición 53 se esperaba una Leu pero la densidad electrónica demostró la presencia de una Ile en dos conformaciones. La estereoquímica de todos los modelos estructurales se analizó y validó con *MolProbity* (Chen *et al.*, 2010a). Todas las representaciones gráficas se realizaron con *CCP4mg* versión 2.5.2 (McNicholas *et al.*, 2011).

### **VIII.5. Colecta de datos, solución estructural y afinamiento de ocho estructuras compuestas de la *Tth*-MCO con diferente dosis de radiación absorbida**

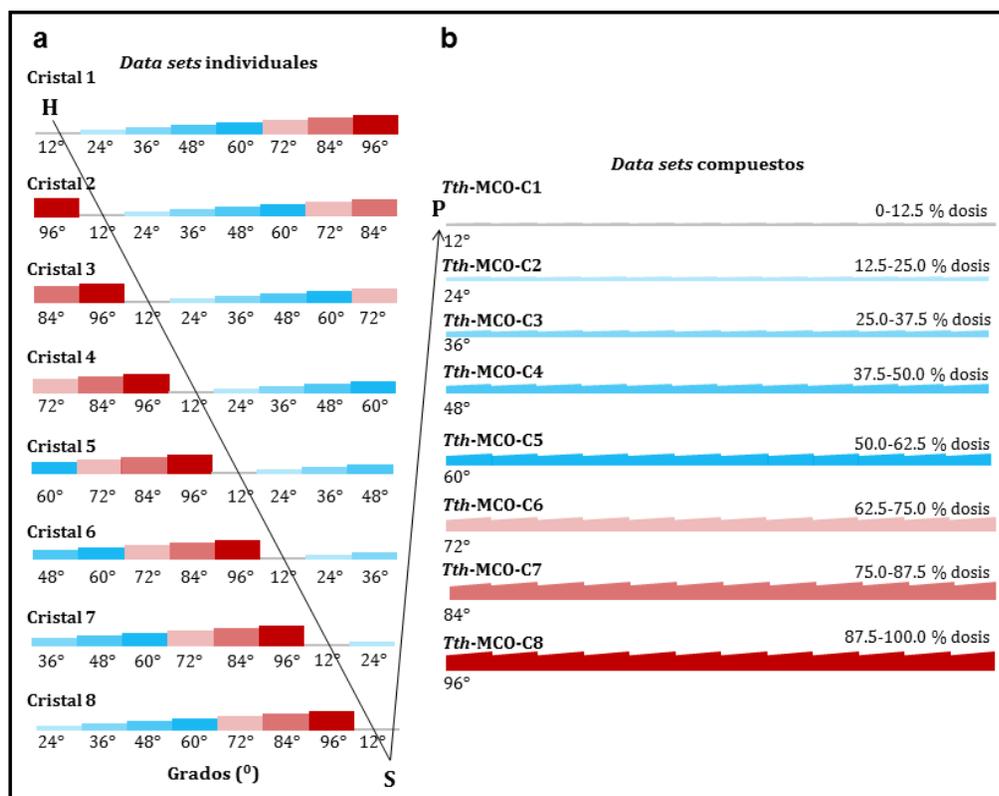
Se colectaron datos de difracción de rayos X de ocho cristales de la *Tth*-MCO en la línea X6A (NSLS, BNL, EE.UU.) utilizando un detector ADSC Quantum 270, para construir una película tridimensional de la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O, inducida por rayos X. Todos los datos de difracción de los ocho cristales de la *Tth*-MCO se colectaron bajo las mismas condiciones:  $\lambda = 0.9795 \text{ \AA}$  (12660 eV); distancia cristal-detector = 200 mm;  $\Delta\phi = 1.0^\circ$ ; tiempo de exposición ( $t_{\text{exp}}$ ) por imagen = 30 s; dimensión del haz de rayos X = 100 x 100  $\mu\text{m}$ . Todos los cristales de la *Tth*-MCO utilizados en este experimento multicristal de colecta de datos se obtuvieron por microsembrado y tenían unas dimensiones promedio de  $\sim 25 \times 50 \times 100 \mu\text{m}$ . Se colectaron 96 imágenes por cristal de la *Tth*-MCO

<sup>27</sup> r.m.s.d por sus siglas en inglés: *root mean square deviation*.

debido a que todos los cristales pertenecieron al grupo espacial  $C222_1$ <sup>28</sup>, con un monómero por unidad asimétrica. Cada uno de los ocho *data sets* se dividió en bloques secuenciales de 12 imágenes y cada bloque procedente de cada uno de los ocho cristales (pero teniendo en común la dosis de radiación absorbida) se integró separadamente a 1.8 Å de resolución en *XDS* (Kabsch, 2010). Para obtener la estructura compuesta *Tth*-MCO-C1 con la dosis de radiación absorbida más baja (0-12.5%; 1.3 MGy) se procedió a cambiar el formato de cada uno de los ocho archivos *XDS\_ASCII.HKL* de los bloques de 0-12° a archivos *.mtz* con el programa *COMBAT* de la *suite CCP4* versión 6.1.1 (Winn *et al.*, 2011) (**Figura 7a**). Los ocho archivos *.mtz* resultantes de los bloques de 0-12° se combinaron con el programa *SORTMTZ* que funciona también en la *suite CCP4* versión 6.1.1 (Winn *et al.*, 2011) y se obtuvo como resultado un archivo *.mtz* correspondiente a 96° de datos para la *Tth*-MCO-C1. Las demás estructuras compuestas *Tth*-MCO-C(2-8) (12.5-100%; 2.5-9.9 MGy) con diferente dosis creciente de radiación absorbida se generaron por la combinación de los siguientes bloques de cada uno de los cristales de la *Tth*-MCO (**Figura 7b**).

---

<sup>28</sup> Se necesitan mínimo 90° de datos para determinar una estructura cristalográfica que pertenezca al sistema cristalino ortorrómbico.



**Figura 7.** Estrategia multicristal de colecta de datos de 8 cristales de la *Tth*-MCO para construir *data sets* compuestos. La dosis de radiación absorbida es creciente entre  $0^\circ \rightarrow 96^\circ$  para cada uno de los ocho cristales. **a)** Cada cristal (1  $\rightarrow$  8) se rota  $12^\circ$  con relación al anterior antes de colectar los datos de difracción de rayos X para garantizar que cada bloque corresponda a una región distinta de cada uno de los cristales y de esta manera mejorar los valores estadísticos al combinar los datos. Para obtener la estructura *Tth*-MCO-C1 se integraron por separado cada uno de los bloques de  $0-12^\circ$  entre H-S para obtener ocho archivos .mtz. **b)** Ocho estructuras compuestas *Tth*-MCO-C(1-8) con distinta dosis de radiación absorbida. Los ocho archivos .mtz entre H-S se combinan entre S-P para obtener un único archivo .mtz de  $96^\circ$  y así tener datos suficientes para determinar la estructura cristalográfica de la *Tth*-MCO-C1 en el grupo espacial  $C222_1$ .

El ordenamiento y escalamiento de los datos de cada uno de los *data sets* compuestos se realizó en *SCALA* de la suite *CCP4* versión 6.1.1 (Winn *et al.*, 2011) y las fases se determinaron por MR en *Phaser\_MR* (McCoy *et al.*, 2007), utilizando como templatado las coordenadas atómicas (sin moléculas de agua, átomos de cobres o moléculas de MPD) de la *Tth*-MCO (código PDB 2XU9).

Todas las estructuras compuestas se afinaron en *PHENIX* versión 1.6 (Adams *et al.*, 2010) siguiendo el mismo protocolo mencionado en el apartado VIII.4. para la *Tth*-MCO. Sin embargo, para

la *Tth*-MCO-C1 se encontró adicionalmente un pico positivo de densidad electrónica aproximadamente simétrico y alargado entre el centro binuclear T3Cu-T3'Cu, similar al descrito previamente por Hakulinen *et al.* (2006) y el cual se modeló como un O<sub>2</sub>, restringiendo la distancia de enlace :Ö=Ö: al valor teórico de 1.21 Å. Se realizó un afinamiento de TLS<sup>29</sup> en *PHENIX* para la His<sup>95</sup> de las estructuras compuestas *Tth*-MCO-C(2-8). La estereoquímica de todas las estructuras compuestas se analizó y validó con *MolProbity* (Chen *et al.*, 2010a).

De esta manera se generó una película tridimensional de la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O y se observaron los cambios en la densidad electrónica de cada una de las estructuras compuestas, los daños específicos y la disminución de la ocupación de cada uno de los átomos de Cu por los rayos X. Estos cambios se analizaron en función de la dosis de radiación absorbida.

## VIII.6. Cálculo de la dosis de radiación absorbida de ocho estructuras compuestas de la

### *Tth*-MCO

El cálculo de la dosis de radiación absorbida de las estructuras compuestas *Tth*-MCO-C(1-8) en MGy se realizó con *RADDOSE* versión 2 (Murray *et al.*, 2004; Paithankar *et al.*, 2009). Para calcular la dosis de radiación absorbida se usaron los siguientes parámetros: flujo<sup>30</sup>: 1 x 10<sup>10</sup> fotones s<sup>-1</sup>; valor Z<sup>31</sup>: 4; número de residuos: 439; número de átomos de azufre (S) en la enzima: 14 (13 Met + 1 Cys); número de átomos de Cu: 4 (*Tth*-MCO-C1) y 3 (*Tth*-MCO-C(2-8)); concentración (mM) del amortiguador (Hepes pH 7.5) presente en la condición de cristalización para corregir la absorción por los átomos de S: 100 mM; *t*<sub>expo</sub> creciente con cada estructura compuesta: 30 s para la *Tth*-MCO-C1, 60 s para la *Tth*-MCO-C2, etc.; número de imágenes: 96; parámetros de celda unidad (Å); dimensiones (mm) promedio de los 8 cristales: ~ 0.025 x 0.05 x 0.1 mm; λ = 0.9795 Å (12660 eV) y dimensión (mm) del haz de rayos X: 0.100 x 0.100 mm. El flujo en fotones s<sup>-1</sup> se calculó con un fotodiodo de silicio como lo describieron previamente Owen *et al.* (2009). Las dimensiones de los ocho cristales de la *Tth*-MCO producto del microsemebrado se escogieron de tal forma que el tamaño de los mismos fuera ≤ a la dimensión del haz de rayos X y así todos absorbieran una dosis de radiación uniforme.

<sup>29</sup> TLS por sus siglas en inglés: *translation/libration/screw*.

<sup>30</sup> Flujo estimado para la línea X6A.

<sup>31</sup> Valor Z: número de monómeros en la celda unidad. El valor Z para la *Tth*-MCO es equivalente al producto entre los cuatro operadores de simetría para el grupo espacial C222<sub>1</sub> y la cantidad de monómeros en la unidad asimétrica: 1, es decir: Z = 4 x 1 = 4. Hay 4 moléculas de la *Tth*-MCO en la celda unidad.

### VIII.7. Estimación teórica del $pK_a$ para las estructuras cristalográficas de la *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h

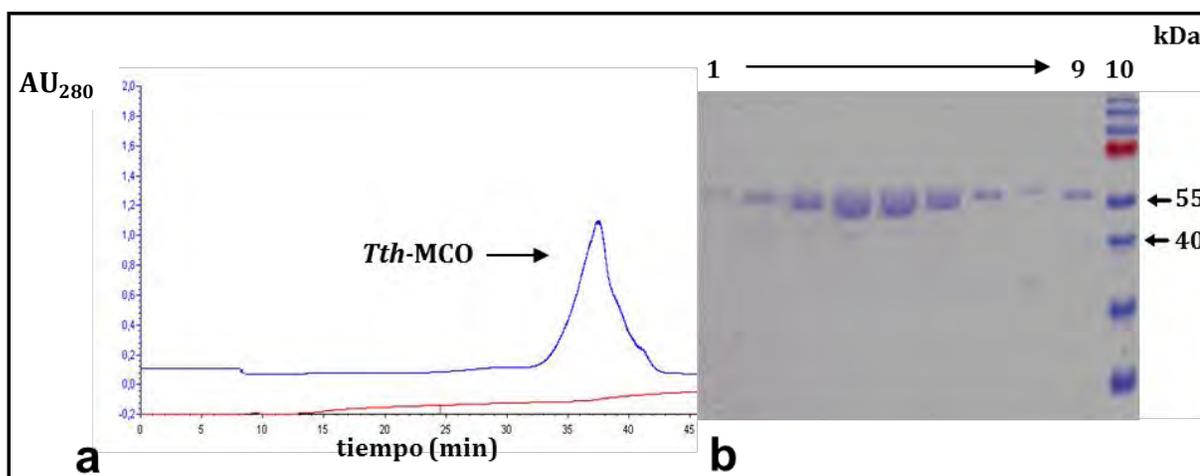
La estimación teórica del  $pK_a$  para todos los grupos protonables y desprotonables de las estructuras cristalográficas de la *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h se realizó en el servidor web **H++**: <http://biophysics.cs.vt.edu/index.php> (Gordon *et al.*, 2005), utilizando el campo de fuerza AMBER.

## IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IX.1. Sobreexpresión y purificación de la *Tth*-MCO y apo-*Tth*-MCO

Con el objetivo de obtener una proteína de alto grado de pureza, la metodología que se utilizó para la sobreexpresión y purificación de la *Tth*-MCO consistió en algunas modificaciones del protocolo descrito originalmente por José David Ruiz Aguilar. Las células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido p*Th*1 se crecieron en ausencia de Cu para evitar la expresión de la oxidasa multicobre CueO endógena de *E. coli* (Roberts *et al.*, 2002), que es homóloga a la *Tth*-MCO y se expresa cuando se somete a la bacteria a estrés por Cu. La forma madura de la enzima recombinante sobreexpresada como apo-*Tth*-MCO se dializó en presencia de CuSO<sub>4</sub> para obtener a la *Tth*-MCO, con un rendimiento final de 6.0 mg de holoenzima por litro de cultivo.

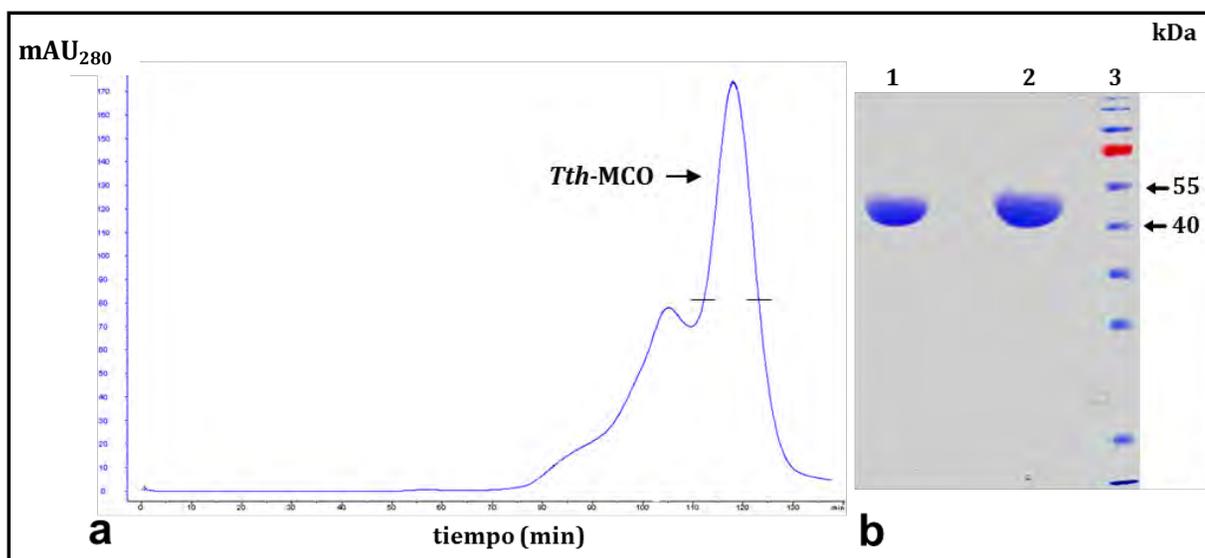
Para facilitar el proceso de purificación se calentó el extracto bacteriano a 65 °C por 20 min, con lo que se logró la precipitación de la mayoría de proteínas termolábiles de *E. coli*. Después de esto se purificó a homogeneidad la *Tth*-MCO por medio de dos cromatografías: intercambio catiónico y exclusión molecular. El comportamiento electroforético en SDS-PAGE e isoelectroenfoque fueron los criterios empleados para evaluar el grado de pureza de las enzimas usadas en este trabajo. En la cromatografía de intercambio catiónico se observó un pico con tiempo de retención ( $t_R$ ) de 37.3 min (**Figura 8a**).



**Figura 8. a)** Cromatograma del extracto bacteriano usando una columna de intercambio catiónico y gradiente lineal de 0-1 M NaCl (línea roja) en 46 min a un flujo de 2 mL min<sup>-1</sup>. **b)** SDS-PAGE de las fracciones obtenidas. Carriles 1-9: fracciones que migraron al peso molecular aproximado de la *Tth*-MCO a lo largo del pico cromatográfico. Carril 10: marcador de peso molecular (Fermentas).

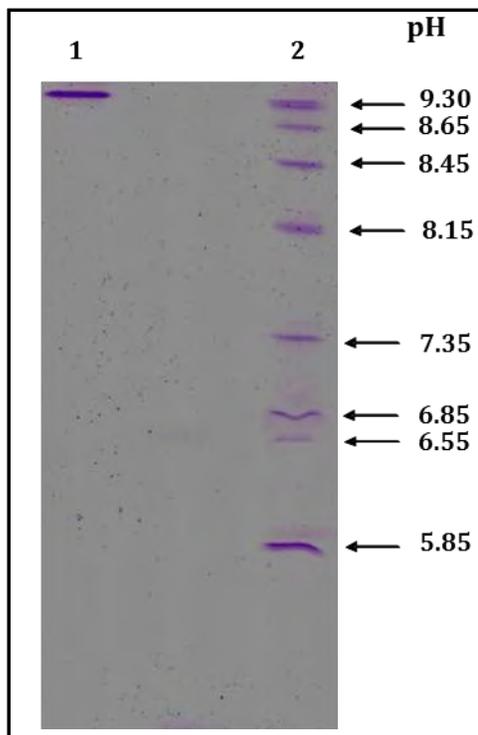
Se colectaron las fracciones correspondientes a este pico y por análisis electroforético se observó una banda de proteína que migró de acuerdo al peso molecular ( $\sim 50$  kDa) esperado para la forma madura de la *Tth*-MCO (**Figura 8b**).

Antes de realizar los ensayos de cristalización de la *Tth*-MCO se eliminaron los contaminantes observados en la Figura 8b por medio de una cromatografía de exclusión molecular. En esta cromatografía se observó un pico con  $t_R$  de 118.5 min (**Figura 9a**). Se colectaron y concentraron las fracciones correspondientes a este pico y por análisis electroforético se observó una banda de proteína que migró de acuerdo al peso molecular esperado para la *Tth*-MCO (**Figura 9b**). La *Tth*-MCO purificada exhibió el color azul común en otras oxidasas multicobre, característico de la transferencia de carga  $S_{Cys}^{445}$ -T1Cu.



**Figura 9. a)** Cromatograma de la *Tth*-MCO usando una columna de exclusión molecular y un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. **b)** SDS-PAGE de las fracciones obtenidas. Carriles 1 y 2 (30 y 40  $\mu$ g de la *Tth*-MCO, respectivamente): fracciones del mismo pico en (a) que migraron al peso molecular aproximado de la *Tth*-MCO. Carril 3: marcador de peso molecular (Fermentas).

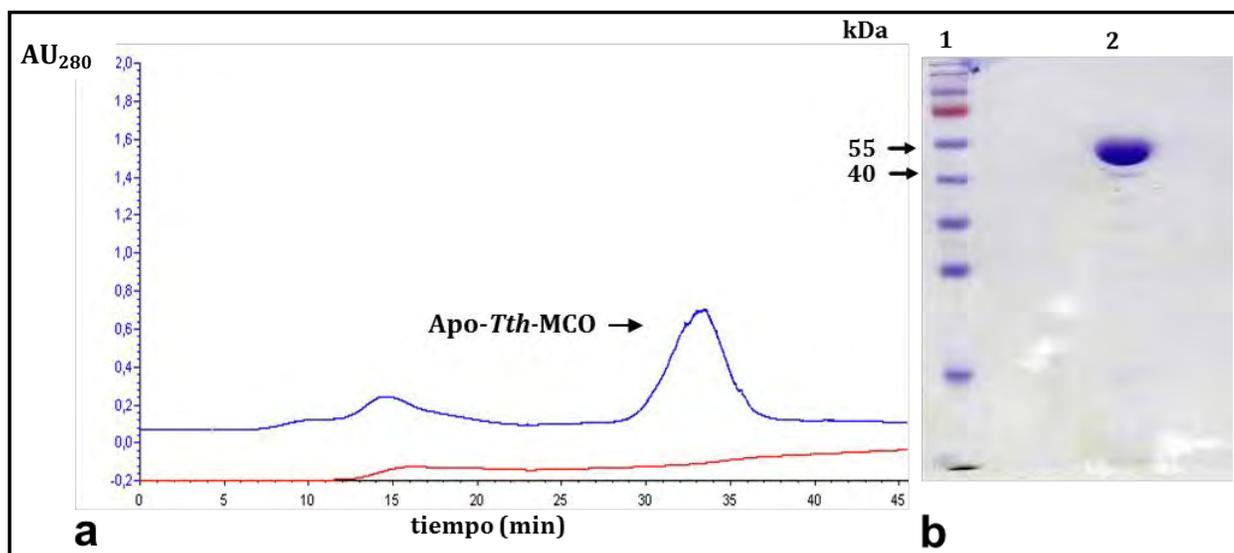
El punto isoeléctrico ( $pI$ ) teórico de la *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h se calculó en el servidor web H++, utilizando el campo de fuerza AMBER, a partir de las coordenadas cristalográficas respectivas. El  $pI$  teórico de la *Tth*-MCO fue de 9.6. Este valor de  $pI$  elevado se debe principalmente a los residuos con valor de  $pK_a$  alto en la enzima: 32 residuos de Arg, 15 de Lys y 9 de Tyr de los 439 residuos totales en la estructura primaria de la *Tth*-MCO, los cuales presentaron en términos generales un  $pK_a$  teórico  $\sim 12.0$ . Así, el valor teórico del  $pI$  de la *Tth*-MCO correlaciona con el  $pI$  experimental  $\geq 9.3$ , determinado por isoelectroenfoque (**Figura 10**).



**Figura 10.** Gel de isoelectroenfoque. Carril 1: 4  $\mu$ g de la *Tth*-MCO. Carril 2: marcadores de *pI* (Pharmacia).

En un proceso relativamente diferente se sobreexpresó y purificó la apo-*Tth*-MCO con el objetivo de obtener una forma inactiva de la enzima que no pudiera llevar a cabo la reducción del  $O_2$  a  $2 H_2O$ , inducida por rayos X. Para la purificación de la apo-*Tth*-MCO sólo se utilizó la cromatografía de intercambio catiónico<sup>32</sup>. En esta cromatografía se observó un pico con  $t_R$  de 33.1 min (**Figura 11a**). Se colectaron y concentraron las fracciones correspondientes a este pico y por análisis electroforético se observó una banda de proteína que migró de acuerdo al peso molecular esperado para la apo-*Tth*-MCO (**Figura 11b**). Más adelante se notará que a pesar de los contaminantes que se observan en la Figura 11b, la cristalización y difracción de la apo-*Tth*-MCO fue exitosa. Como era de esperarse, la apo-*Tth*-MCO purificada no exhibió ningún color, debido a la ausencia de la transferencia de carga  $S_{Cys}^{445}$ -T1Cu.

<sup>32</sup> Esto se hizo porque las resinas de exclusión molecular que se tienen en el laboratorio se utilizaron previamente en cromatografías con  $CuSO_4$  (otros proyectos) y después de varios intentos un porcentaje de la población de la apo-*Tth*-MCO se cargaba con trazas de cobre de la resina y esto impedía obtener una forma apo homogénea.



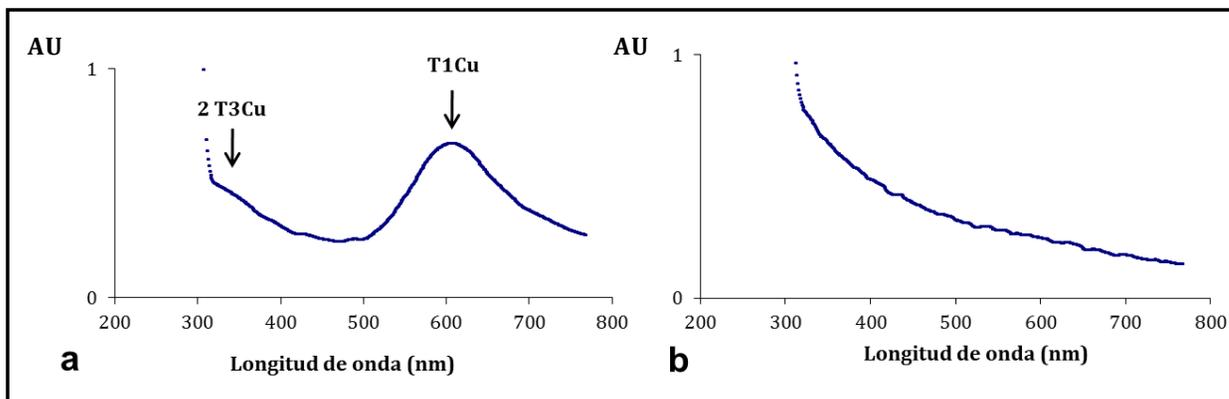
**Figura 11. a)** Cromatograma del extracto bacteriano usando una columna de intercambio catiónico y gradiente lineal de 0-1 M NaCl (línea roja) en 46 min a un flujo de 2 mL min<sup>-1</sup>. **b)** SDS-PAGE de las fracciones obtenidas. Carril 1: marcador de peso molecular (Fermentas). Carril 2 (30 µg de la apo-*Tth*-MCO): banda que migró al peso molecular esperado para la apo-*Tth*-MCO.

## IX.2. Determinación cualitativa y cuantitativa de los átomos de cobre por molécula de la *Tth*-MCO y apo-*Tth*-MCO

Antes de realizar los ensayos de cristalización se determinó la presencia de los 4 átomos de Cu en la *Tth*-MCO debido a que el proceso de incorporación de los mismos se realizó después de la sobreexpresión de la apoenzima por medio de una diálisis en presencia de CuSO<sub>4</sub>. Así mismo se determinó la ausencia de los 4 átomos de Cu en la apo-*Tth*-MCO para garantizar que esta forma de la enzima fuera apo para todos los átomos de Cu y por lo tanto inactiva en la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O, inducida por rayos X.<sup>33</sup>

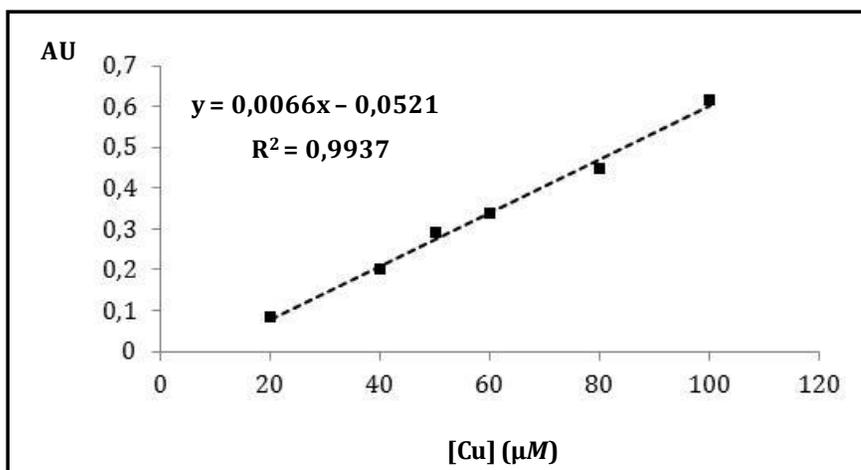
Inicialmente se determinó cualitativamente la presencia de los átomos de T1Cu y 2 T3Cu de la *Tth*-MCO por medio de un espectro de UV-Visible. Se observó el pico característico de absorción a  $\lambda \sim 610$  nm correspondiente al T1Cu y un pequeño hombro a  $\lambda \sim 330$  nm correspondiente a los 2 T3Cu (**Figura 12a**). Por otro lado, en el espectro UV-Visible de la apo-*Tth*-MCO se observó cualitativamente que la apoenzima no poseía el T1Cu y así como tampoco los 2 T3Cu, ya que no se observaron los picos característicos de absorción a 610 y 330 nm, respectivamente (**Figura 12b**).

<sup>33</sup> Se utilizó en todos los casos agua desionizada-tetradestilada.



**Figura 12.** Espectro de UV-Visible de la oxidasa multicobre recombinante de *T. thermophilus* HB27 en 20 mM Tris pH 8.0. **a)** *Tth*-MCO (450  $\mu$ M), **b)** apo-*Tth*-MCO (500  $\mu$ M).

Sin embargo, por este método no se puede determinar la presencia o ausencia del T2Cu en la holo y apoenzima, ya que la absorción de este átomo en particular no es apreciable en la región UV-Visible. Debido a esto se utilizó el método de la 2,2-biquinolina para determinar cuantitativamente los átomos cobre (incluido el T2Cu) por molécula de proteína. Inicialmente se construyó una curva de calibración utilizando soluciones patrón de diferente concentración de  $\text{CuSO}_4$  (**Figura 13**).



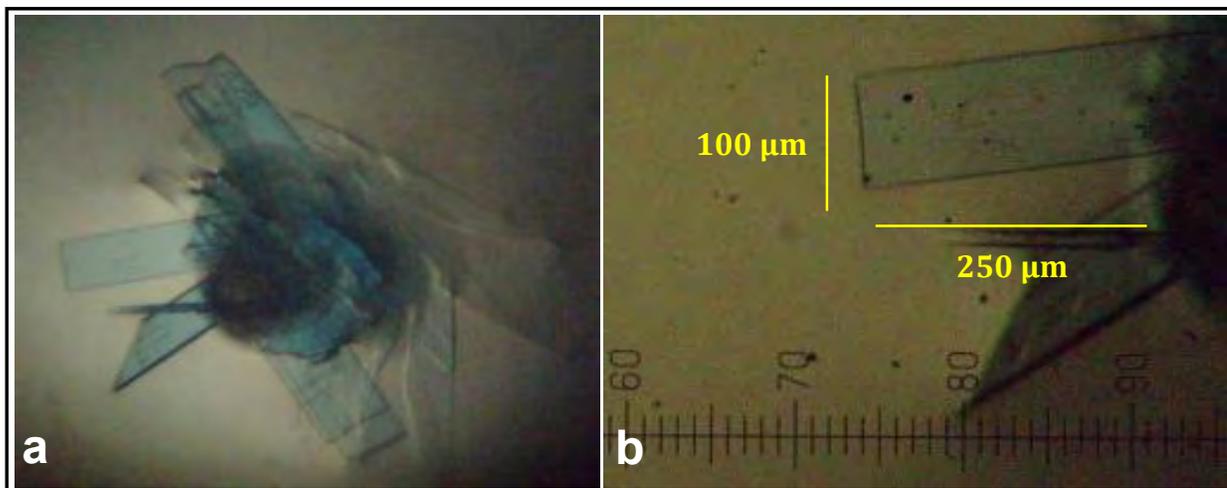
**Figura 13.** Curva de calibración de absorbancia (AU) vs [Cu] ( $\mu$ M), utilizando  $\text{CuSO}_4$  como sustancia patrón y 2,2-biquinolina como agente quelante. El complejo organometálico Cu(I)-[2,2-biquinolina] absorbe a  $\lambda = 546$  nm.

Así, se determinó que la absorbancia a  $\lambda = 546$  nm para el complejo organometálico Cu(I)-[2,2-biquinolina] formado con los átomos de Cu de una solución 25  $\mu$ M de la *Tth*-MCO fue de 0.621, por lo que reemplazando este valor en la ecuación de la recta:  $y = 0.0066x - 0.0521$  se obtiene como resultado final que la proteína contiene  $4.1 \pm 0.1$  átomos de Cu/molécula de la *Tth*-MCO, lo que

indica que los dos sitios activos están completos en la holoenzima. De la misma manera, la absorbancia para una solución 25  $\mu\text{M}$  de la apo-*Tth*-MCO fue de 0.014, por lo que la cantidad de átomos de cobre por molécula de apoenzima es  $0.4 \pm 0.1$  átomos de Cu/molécula de la apo-*Tth*-MCO. Esto indica que la apoenzima carece completamente de los 4 cobres típicos de las oxidasas multicobre, incluido el T2Cu. Más adelante se demostrará la correlación entre estos valores en solución y los mapas de densidad electrónica de la *Tth*-MCO y apo-*Tth*-MCO, en donde se observa la presencia de los 4 átomos de Cu para la *Tth*-MCO y la ausencia de los mismos en la apo-*Tth*-MCO.

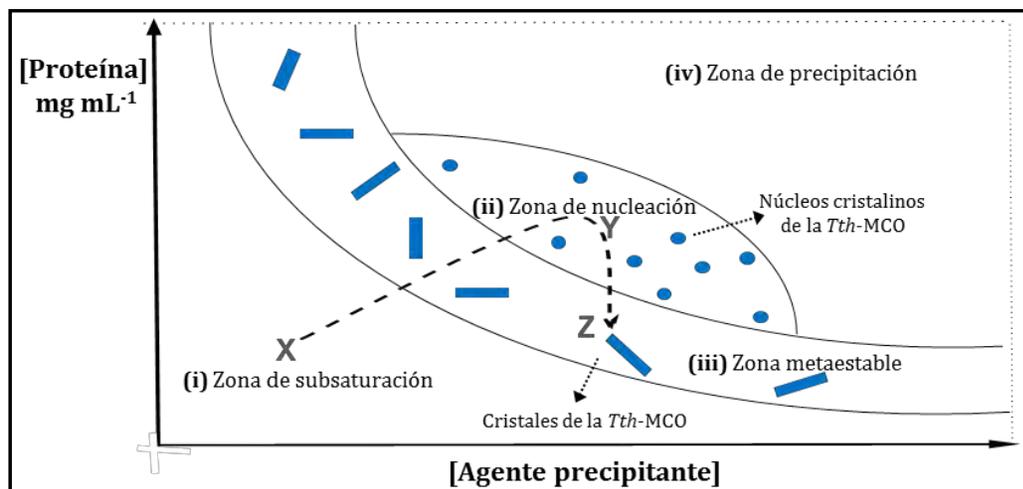
### IX.3. Cristalización de la *Tth*-MCO y apo-*Tth*-MCO. Obtención de las formas Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h por remojo

Se realizaron los primeros ensayos de cristalización de la *Tth*-MCO después de purificarla a homogeneidad y demostrar que la enzima recombinante contenía en solución los 4 átomos de Cu distribuidos en los dos sitios activos. Los primeros cristales de la *Tth*-MCO se obtuvieron en la prueba de cristalización No 35 del *Crystal Screen II*, con el método de difusión en fase vapor bajo la modalidad de gota colgante. Esta condición de cristalización 35 está compuesta de 0.1 M HEPES pH 7.5 y 70% (v/v) MPD. Los cristales presentaron gran tamaño, buen hábito cristalino, color azul y se formaron a partir de una zona de precipitación central que por el exceso local de concentración de la *Tth*-MCO probablemente favoreció el proceso de nucleación de la proteína (**Figura 14**).



**Figura 14.** a) Cristales de la *Tth*-MCO crecidos a 4 °C y concentración de proteína de 19.5 mg mL<sup>-1</sup>. b) dimensiones de ~ 25 x 100 x 250  $\mu\text{m}$  de uno de los cristales en (a). Las fotografías se tomaron sin polarizador para observar el color real de los cristales.

Sin embargo, el tiempo de cristalización de la *Tth*-MCO fue de 10 meses. Para entender el largo tiempo de cristalización de la *Tth*-MCO es importante resaltar que este proceso es un fenómeno de transición de fase que puede ser ilustrado por un diagrama de fase de [Proteína] vs [agente precipitante]<sup>34</sup> compuesto de cuatro zonas básicas: (i) zona de subsaturación (donde la proteína siempre está soluble); (ii) zona de nucleación (donde se forman núcleos cristalinos de proteína pero no cristales); (iii) zona metaestable (donde se forman cristales de proteína pero no núcleos cristalinos) y (iv) zona de sobresaturación (donde siempre precipita la proteína) (Moreno, 2005; Chayen *et al.*, 2008) (Figura 15).



**Figura 15.** Diagrama de solubilidad de Ostwald-Miers para proteínas.

Este diagrama de fase o curva de solubilidad, también se conoce como diagrama de Ostwald-Miers y es un gráfico particularmente útil para entender el proceso de cristalización de la mayoría de macromoléculas biológicas (Moreno, 2005). Así, el proceso de cristalización de una proteína debe pasar por las zonas (i), (ii) y (iii), viajando en el tiempo por rutas diferentes, dependiendo del método de cristalización empleado. Específicamente, en el método de difusión en fase vapor, empleado para cristalizar a la *Tth*-MCO, la condición de cristalización compuesta de solución de la *Tth*-MCO y agente precipitante (MDP) de la Figura 14 se encontraba al inicio del proceso de cristalización en X (Figura 15), una zona en la que la proteína permanece soluble y no hay cristalización. A medida que transcurrió el tiempo se evaporó agua de la gota de cristalización y la concentración de la *Tth*-MCO, así como también la concentración de MPD aumentó hasta llegar a Y, zona en la que se formaron los primeros núcleos cristalinos, probablemente a partir de la zona de precipitación central que se observa en la Figura 14a. Sin embargo, para obtener cristales el sistema

<sup>34</sup> También se puede tener en el eje de abscisas el pH o la temperatura del sistema.

debió viajar de Y a Z, ya que únicamente en Z tiene lugar el crecimiento cristalino. Esto sucedió porque los núcleos cristalinos incorporaron proteína de la solución en (ii) y por lo tanto la concentración de proteína disminuyó en la gota de cristalización hasta que el sistema llegó a (iii).

El método comúnmente utilizado para optimizar una condición de cristalización implica variar la concentración de proteína y agente precipitante, construyendo matrices de cristalización, de tal forma que se encuentre al azar una combinación de concentración de proteína y agente precipitante tal que, el sistema se desplace a una región más cercana a (ii). De esta forma se reduce la distancia entre X y Y en la Figura 15 y se supera en menor tiempo la barrera energética que permite al sistema trasladarse del desorden de la solución al orden de un núcleo cristalino. Sin embargo, este proceso sólo permite obtener cristales con buen hábito cristalino siempre y cuando el crecimiento se lleve a una velocidad constante y temperatura controlada. Así, y con el objetivo de optimizar el tiempo de cristalización de la Figura 14 se diseñaron diferentes matrices variando la concentración de MPD: 60, 65, 70, 75, 80, 85 y 90% (v/v) y concentración de la *Tth*-MCO: 20, 30, 40 y 50 mg mL<sup>-1</sup>. Con este procedimiento se esperaba desplazar el sistema a una región cercana a la zona de nucleación. Después del proceso de optimización se obtuvieron cristales de la *Tth*-MCO en porcentajes de MPD de 60, 65 y 70% (v/v) y concentración de la *Tth*-MCO de 30 mg mL<sup>-1</sup> en las modalidades de gota colgante, gota sedente y micropuentes (**Figura 16**). De esta manera se optimizó el tiempo de cristalización de 10 a 3 meses, desplazando el sistema en el eje de ordenadas y alcanzando una región tal que permitió disminuir la distancia entre X y Y en la Figura 15.

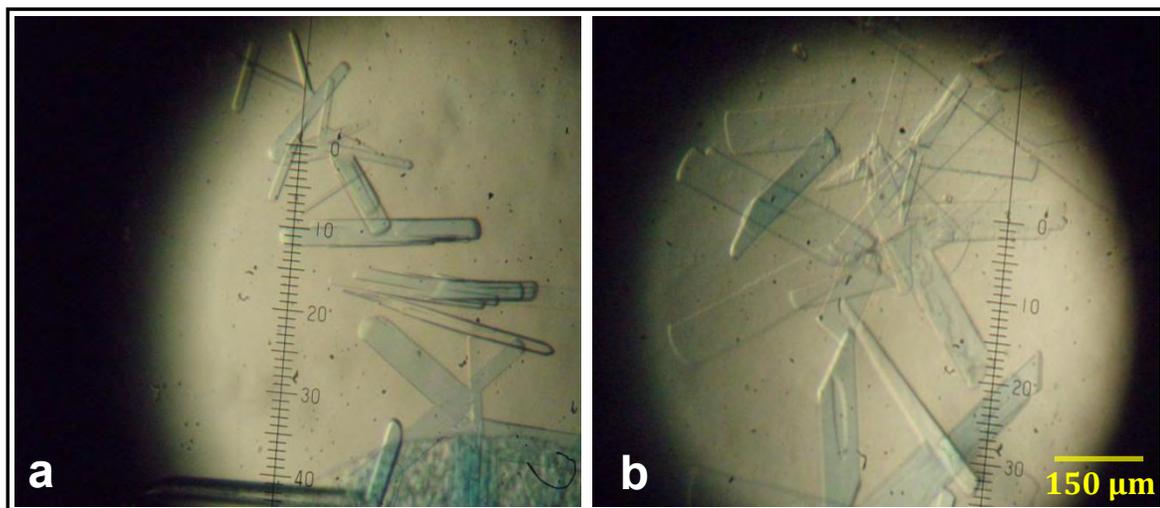


**Figura 16.** Cristales de la *Tth*-MCO crecidos a 4 °C en 0.1 M HEPES pH 7.5, concentración de proteína de 30 mg mL<sup>-1</sup> y diferentes porcentajes de MPD. **a)** Gota sedente, 60% (v/v) MPD, **b)** Gota colgante, 65% (v/v) MPD, **c)** Gota sedente, 70% (v/v) MPD, **d)** Micropuentes, 70% (v/v) MPD. Todas las fotografías se tomaron con la misma magnificación y sin polarizador para observar el color real de los cristales.

Los cristales de la Figura 16a resultaron muy delgados y frágiles y no se difractaron, mientras que los cristales de la Figura 16b crecieron como placas superpuestas y no fue posible separarlas en monocristales para realizar experimentos de difracción de rayos X. Sin embargo, en las técnicas de gota sedente y micropuentes en 70% (v/v) de MPD y 30 mg mL<sup>-1</sup> de la *Tth*-MCO (Figura 16c-d) se obtuvieron los cristales con mejor hábito cristalino, muy similares en morfología externa a los cristales de la Figura 14. Estos últimos presentaron una difracción aceptable con un intervalo de resolución entre 1.5-1.9 Å y se utilizaron en el resto del proyecto.

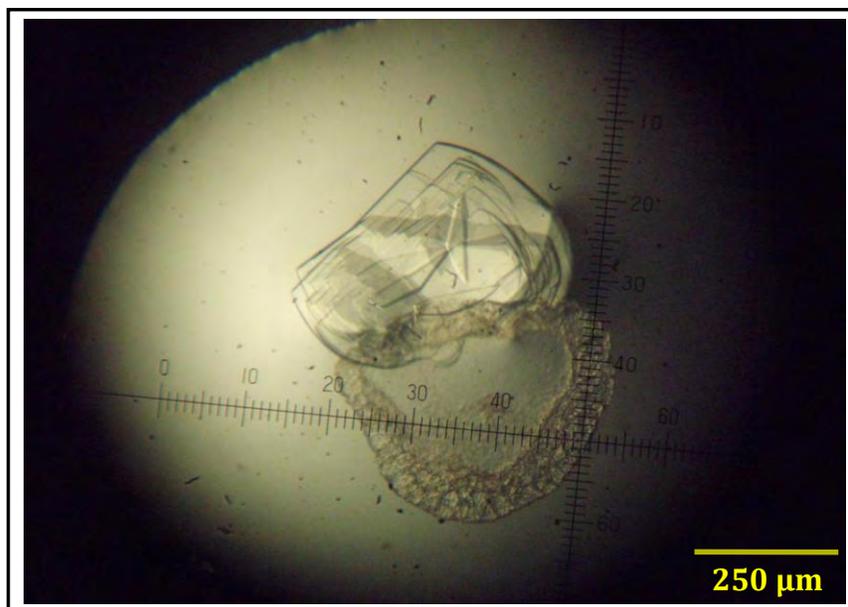
Por otro lado, los cristales de las Figuras 14 y 16 también se utilizaron como semillas en la técnica de microsemebrado. Utilizando esta técnica, una gran cantidad de núcleos cristalinos se

transfirieron a gotas frescas de solución de proteína y solución de reservorio utilizando una fibra natural. De esta manera se alcanzó de forma rápida la zona (ii) de la Figura 15, disminuyendo el tiempo de cristalización de la *Tth*-MCO. Se observaron cristales pequeños después de una semana pero necesitaron entre 1-2 meses para tener dimensiones mayores a 50  $\mu\text{m}$  (**Figura 17**). Por medio de esta técnica se obtuvieron cristales de tamaño y hábito cristalino relativamente similar, que como se verá más adelante fueron esenciales para la construcción de *data sets* compuestos, necesarios en la obtención de las ocho estructuras cristalográficas de la *Tth*-MCO-C(1-8) con distinta dosis de radiación absorbida.



**Figura 17.** Cristales de la *Tth*-MCO obtenidos por la técnica de microsebrado en 0.1 M HEPES pH 7.5, 70% (v/v) MPD y concentración de proteína de 30 mg mL<sup>-1</sup> a 4 °C. **a)** Gota colgante, **b)** Gota sedente. Las fotografías se tomaron con la misma magnificación y sin polarizador para observar el color real de los cristales.

Con el objetivo de obtener una estructura cristalográfica de la enzima inactiva se cristalizó la apo-*Tth*-MCO utilizando las mismas condiciones de la *Tth*-MCO. Así, después de un tiempo de 3 meses se obtuvieron cristales de la apo-*Tth*-MCO en solución de reservorio de 0.1 M HEPES pH 7.5, 70% (v/v) MPD y concentración de apoenzima de 30 mg mL<sup>-1</sup>, bajo la modalidad de gota colgante (**Figura 18**).



**Figura 18.** Cristales de la apo-*Tth*-MCO crecidos a 4 °C en 0.1 M HEPES pH 7.5, 70% (v/v) MPD y concentración de proteína de 30 mg mL<sup>-1</sup> en la modalidad de gota colgante. La fotografía se tomó sin polarizador para observar el color real de los cristales.

Al igual que algunos cristales de la *Tth*-MCO, los cristales de la apo-*Tth*-MCO crecieron como placas superpuestas a partir de una zona de precipitación central. Sin embargo, el gran tamaño de las mismas permitió la separación en diversos fragmentos por medio del uso de una aguja de acupuntura. De esta manera se obtuvieron una serie de monocristales de la apo-*Tth*-MCO para los experimentos de difracción de rayos X.

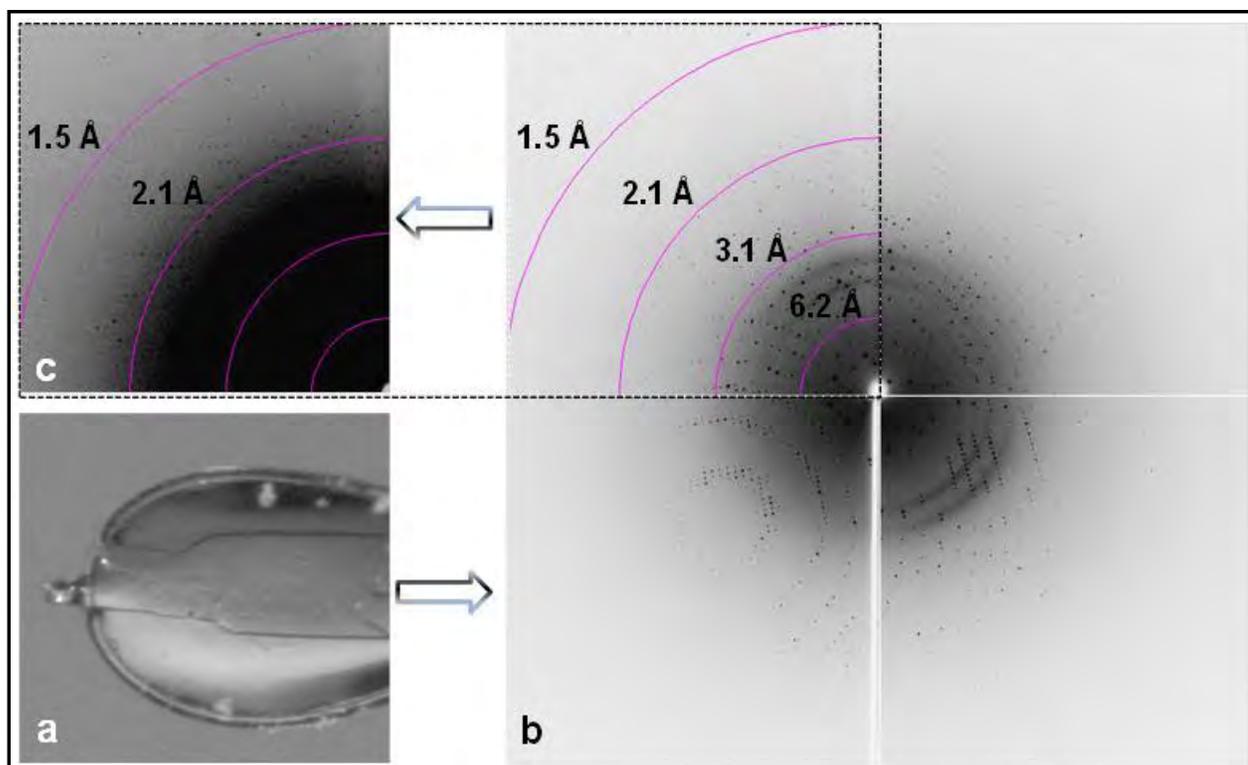
Adicionalmente se remojaron dos cristales de la apo-*Tth*-MCO por 5 min y 2h con 5 mM de HgCl<sub>2</sub> y se obtuvieron dos derivados de mercurio: Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h, respectivamente. Esto permitió obtener otras dos formas inactivas de la *Tth*-MCO con Hg en lugar Cu.

Así, para la determinación de las doce estructuras cristalográficas presentadas en las dos secciones siguientes se colectaron, en términos generales, alrededor de 50 *data sets*, producto de la difracción de ~ 40 cristales.

#### **IX.4. Estructuras tridimensionales determinadas por difracción de rayos X de la *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h**

Se determinaron las estructuras cristalográficas de la forma activa de la enzima: *Tth*-MCO, y tres formas inactivas: apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h. El mejor cristal de la *Tth*-MCO (**Figura 19a**) crecido en 0.1 M HEPES pH 7.5 y 70% (v/v) MPD, bajo la modalidad de gota sedente,

difractó a 1.5 Å de resolución (**Figura 19b-c**). Al inicio del proceso de cristalización de la *Tth*-MCO se tenía 35% (v/v) MPD, ya que las gotas de cristalización estaban compuestas de solución de proteína y solución de reservorio en proporción 1 + 1 µL. Por lo tanto, previo a la difracción se hicieron experimentos de crioprotección utilizando diferentes porcentajes de MPD y se encontró como mejor solución crioprotectora: 45% (v/v) MPD, 0.1 M Hepes pH 7.5 (Figura 19a).

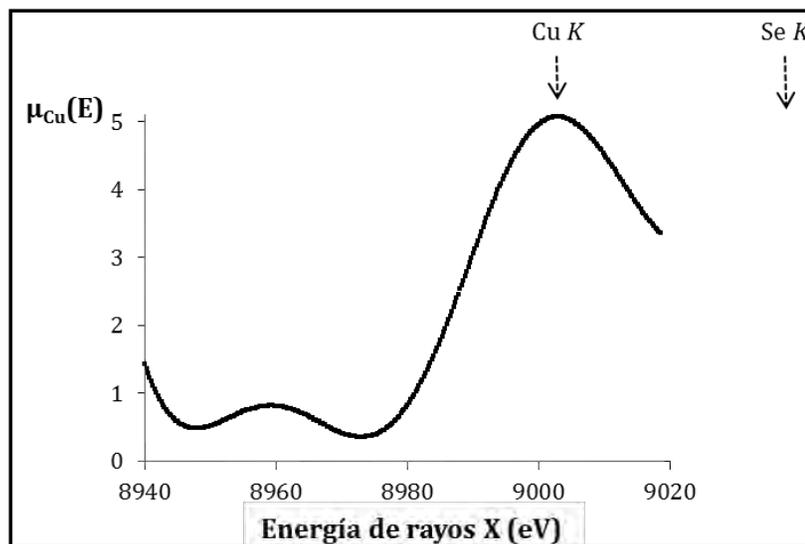


**Figura 19. a)** Imagen en blanco y negro tomada en la línea X6A del cristal de la *Tth*-MCO que difractó a 1.5 Å de resolución. **b)** Patrón de difracción a 1.5 Å de resolución de la *Tth*-MCO. **c)** Cambio de contraste de una parte de (b) para observar algunos puntos de difracción a alta resolución.

Antes de iniciar la colecta de los datos de difracción de rayos X se tomó un espectro de fluorescencia (**Figura 20**) del cristal de la *Tth*-MCO (Figura 19a) para identificar el máximo de fluorescencia (Cu *K*) de los átomos de Cu nativos de la enzima e intentar determinar las fases por SAD. El valor teórico<sup>35</sup> para el borde de absorción Cu *K* es  $\lambda = 1.3808 \text{ \AA}$  (8979 eV), sin embargo se sabe que este valor presenta pequeños desplazamientos del valor teórico de un átomo de cobre

<sup>35</sup> Los valores teóricos de los bordes de absorción Cu *K* y Hg *L*<sub>III</sub> para los distintos metales se calcularon en el servidor web: <http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/>

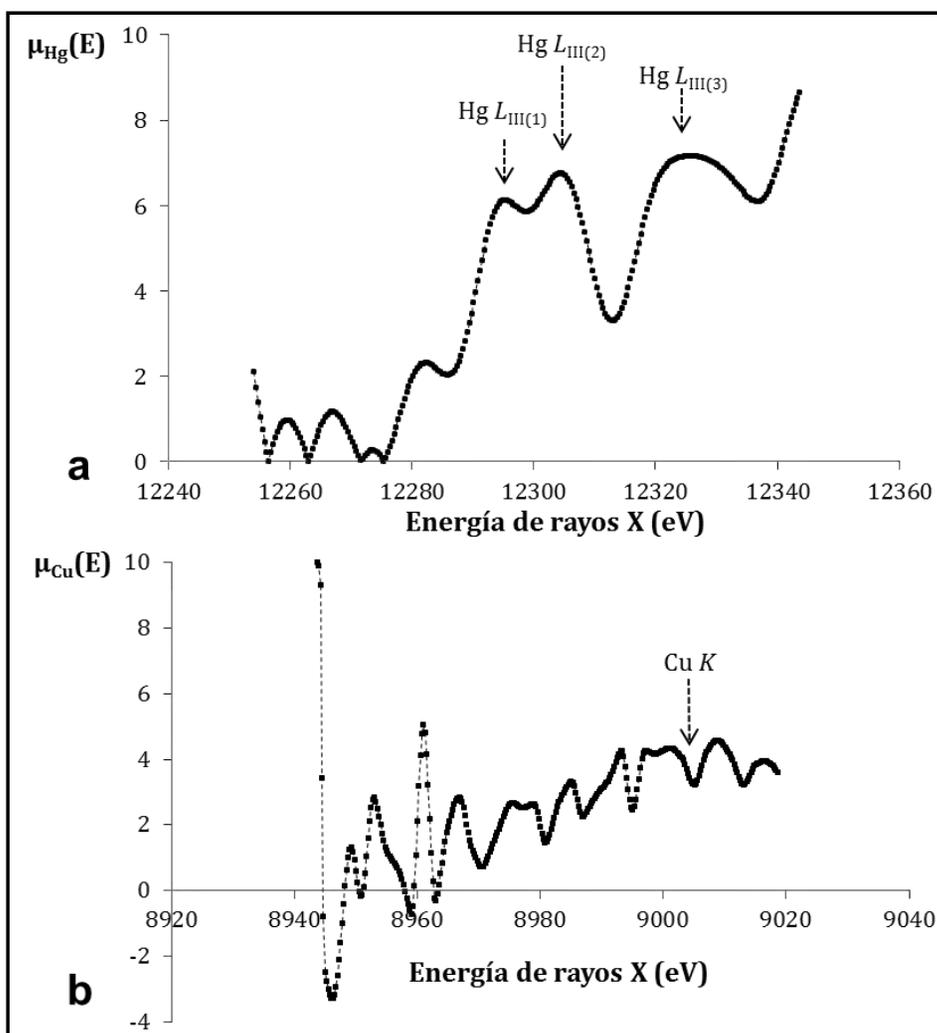
dependiendo del ambiente químico en el que se encuentre en la proteína. Por lo tanto, es importante calcular el valor experimental del borde de absorción Cu *K* en el momento de coleccionar datos de difracción de rayos X en el máximo del pico de fluorescencia del Cu.



**Figura 20.** Espectro de fluorescencia del coeficiente de absorción lineal ( $\mu_{\text{Cu}}(E)$ ) vs energía de rayos X (eV) coleccionado en la línea X6A. Se determinó experimentalmente el pico de fluorescencia (Cu *K*) a  $\lambda = 1.3767 \text{ \AA}$  (9003 eV) para los átomos de Cu nativos de la *Tth*-MCO.

Así, se coleccionaron dos *data sets* para el mismo cristal de la *Tth*-MCO (Figura 19a) a dos longitudes de onda diferentes: [Se *K*:  $\lambda = 0.9795 \text{ \AA}$  (12660 eV) y Cu *K*:  $\lambda = 1.3767 \text{ \AA}$  (9003 eV) (*data set* para SAD: *Tth*-MCO-SAD)]. Esto permitió determinar las fases para la *Tth*-MCO por la combinación de los métodos de MR y SAD, utilizando las longitudes de onda Se *K* y Cu *K*, respectivamente.

Se coleccionaron también datos de difracción para la apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h a 1.7  $\text{\AA}$  de resolución. Antes de coleccionar el *data set* de la Hg-*Tth*-MCO se tomó un espectro de fluorescencia para identificar el borde de absorción Hg *L*<sub>III</sub> de los átomos de Hg de la enzima (**Figura 21a**), producto de remojar un cristal de la apo-*Tth*-MCO con HgCl<sub>2</sub>. El espectro de fluorescencia en el borde de absorción Cu *K* demuestra la ausencia de estos átomos en el cristal de la Hg-*Tth*-MCO (**Figura 21b**).

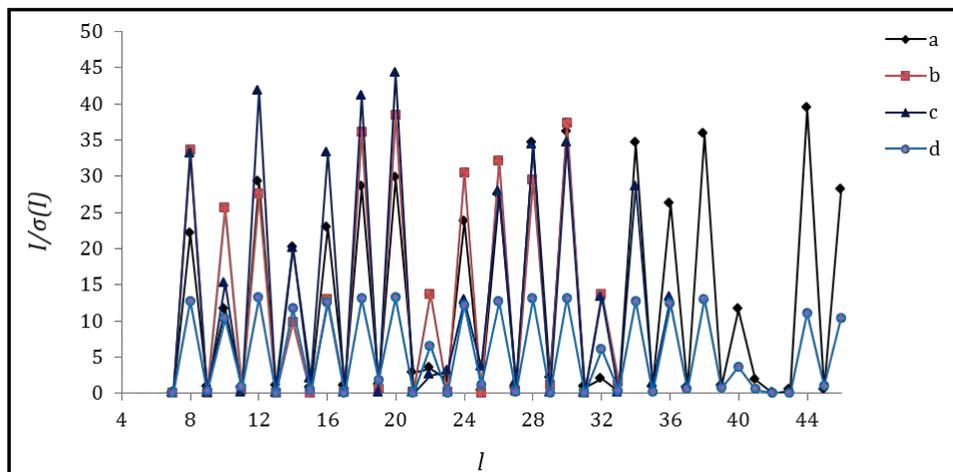


**Figura 21.** Espectros de fluorescencia del coeficiente de absorción lineal ( $\mu(E)$ ) vs energía de rayos X (eV) colectados en la línea X6A para el cristal de la Hg-*Tth*-MCO. **a)** Se observan los tres bordes de absorción: [ $\text{Hg } L_{\text{III}}(1)$ :  $\lambda = 1.0085 \text{ \AA}$  (12295 eV),  $\text{Hg } L_{\text{III}}(2)$ :  $\lambda = 1.0078 \text{ \AA}$  (12304 eV) y  $\text{Hg } L_{\text{III}}(3)$ :  $\lambda = 1.0061 \text{ \AA}$  (12325 eV)]. **b)** Se observa la ausencia del borde  $\text{Cu } K$  en el cristal de la Hg-*Tth*-MCO.

Los tres máximos de absorción  $\text{Hg } L_{\text{III}}(1-3)$  de la Hg-*Tth*-MCO de la Figura 21a correlacionan con los bordes experimentales  $\text{Hg } L_{\text{III}}(1-3)$  del Hg coordinado a una serie de proteínas modelo, obtenidos por Ji *et al.* (2001): [ $\text{Hg } L_{\text{III}}(1)$ :  $\lambda = 1.0087 \text{ \AA}$  (12291 eV),  $\text{Hg } L_{\text{III}}(2)$ :  $\lambda = 1.0084 \text{ \AA}$  (12295 eV) y  $\text{Hg } L_{\text{III}}(3)$ :  $\lambda = 1.0064 \text{ \AA}$  (12320 eV)].

El grupo espacial de todas las estructuras cristalográficas determinadas en este trabajo fue  $C222_1$ . De hecho cuando se integraron los *data sets* de la *Tth*-MCO, *Tth*-MCO-SAD (**Tabla 2**), apo-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO en el grupo espacial  $C222$ , un eje tornillo se observó en la gráfica de

reflexión axial en  $l$ :  $I/\sigma(I)$  vs  $00l$ , la cual es una condición de reflexión general  $00l$ :  $l = 2n$ , indicativa del grupo espacial  $C222_1$  (Serrano-Posada *et al.*, 2011) (Figura 22).



**Figura 22.** Gráficas de reflexión axial  $I/\sigma(I)$  vs  $00l$  de cuatro *data sets*. **a)** *Tth*-MCO. **b)** *Tth*-MCO-SAD. **c)** *apo-Tth*-MCO. **d)** Hg-*Tth*-MCO. Todos los *data sets* se integraron en el grupo espacial  $C222_1$  con el objetivo de observar la reflexión axial en  $l$  ( $00l$ :  $l = 2n$ ). La presencia de un eje tornillo  $2_1$  se observa claramente en la gráfica y sustenta la selección del grupo espacial  $C222_1$ .

**Tabla 2.** Datos estadísticos de la colecta de datos de la *Tth*-MCO-SAD.

Los valores en paréntesis corresponden a la última faja de resolución

Parámetros	<i>Tth</i> -MCO-SAD
<b>Colecta de datos</b>	
Grupo espacial	$C222_1$
Celda unidad	
$a, b, c$ (Å)	93.6, 110.3, 96.7
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 90.0, 90.0
Resolución (Å)	35.0–2.00 (2.10–2.00)
No. de reflexiones	493015
No. de reflexiones únicas	34001 (4858)
Integridad (%)	99.6 (98.6)
$R_{merge}$ (%)	8.1 (34.7)
$I/\sigma(I)$	23.6 (8.5)
Multiplicidad	14.5 (14.1)

Los datos estadísticos de las estructuras cristalográficas de la *Tth*-MCO, *apo-Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h están resumidos en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Datos estadísticos de la colecta de datos y afinamiento de la *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h.

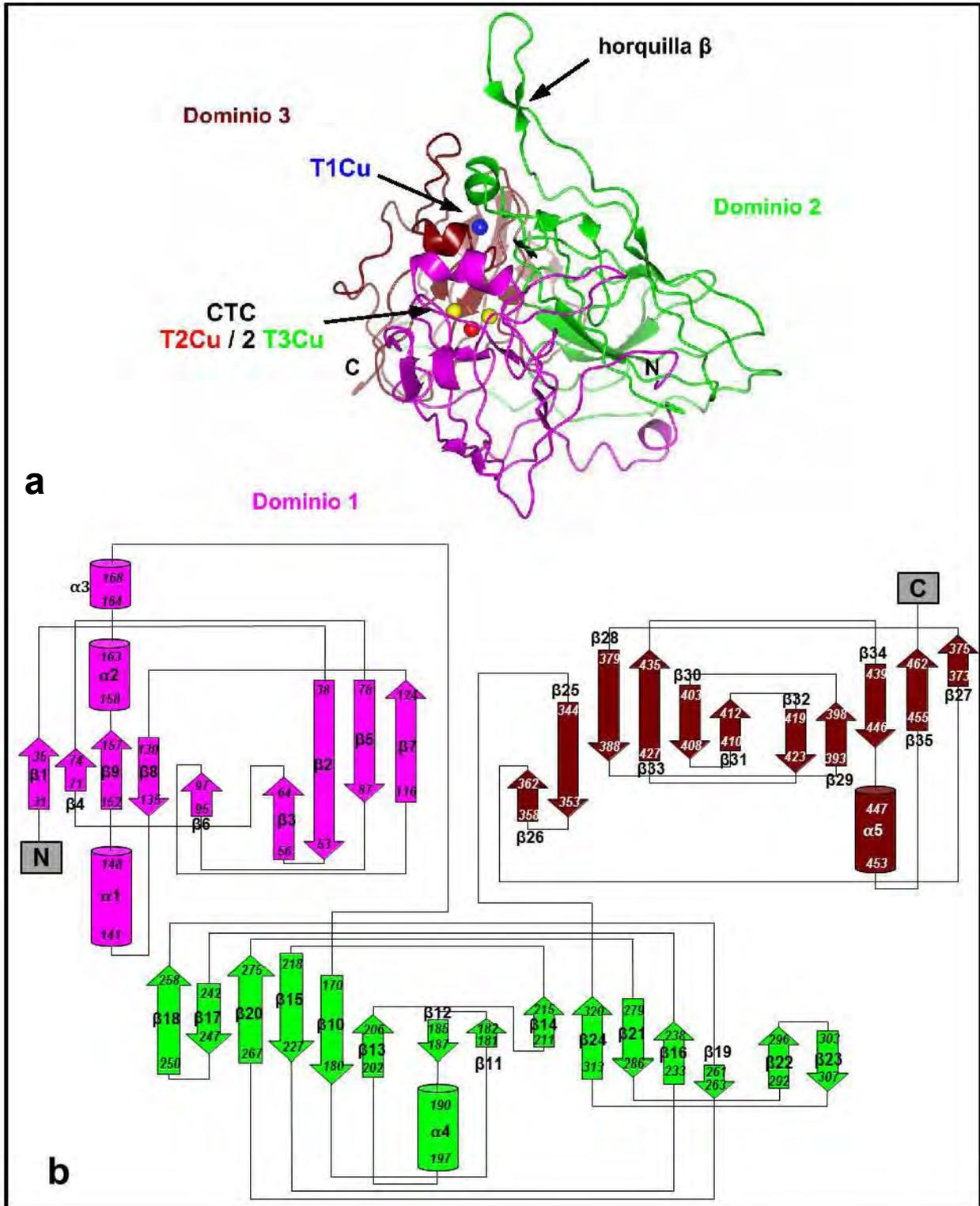
Los valores en paréntesis corresponden a la última faja de resolución

Parámetros	<i>Tth</i> -MCO	Apo- <i>Tth</i> -MCO
<b>Colecta de datos</b>		
Grupo espacial	<i>C</i> 222 <sub>1</sub>	<i>C</i> 222 <sub>1</sub>
Celda unidad		
<i>a, b, c</i> (Å)	93.6, 110.3, 96.3	93.0, 110.1, 96.3
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
Resolución (Å)	23.0–1.50 (1.60–1.50)	26.0–1.70 (1.80–1.70)
No. de reflexiones	899414	435926
No. de reflexiones únicas	78896 (10654)	53818 (7154)
Integridad (%)	94.7 (83.9)	98.9 (82.1)
$R_{merge}$ (%)	8.6 (39.5)	9.0 (45.0)
$I/\sigma(I)$	19.4 (4.1)	18.5 (3.8)
Multiplicidad	11.4 (9.9)	8.1 (6.6)
Unidad asimétrica	Un monómero	Un monómero
<b>Afinamiento</b>		
Resolución (Å)	23.0–1.50	26.0–1.70
$R_{work}/R_{free}$ (%)	15.5/17.8	15.1/18.5
No. de átomos		
Proteína	4259	4045
Ion/Ligando	134	128
Agua	549	525
Valores B (Å <sup>2</sup> )		
Proteína	13.7	16.5
Ion/Ligando	33.1	37.8
Agua	31.5	33.2
Total	16.2	18.9
Wilson <i>plot</i>	12.5	16.3
RMSD de la estereoquímica ideal		
Enlaces (Å)	0.01	0.02
Ángulos (°)	1.51	1.99
Error en las coordenadas cristalográficas (Å, <i>Maximum-Likelihood</i> )	0.19	0.18
Ramachandran (%)		
Regiones más favorecidas	97.3	97.5
Regiones permitidas	2.4	2.2
Regiones no permitidas	0.3	0.3

**Tabla 3.** Continuación.

<b>Parámetros</b>	<b>Hg-<i>Tth</i>-MCO</b>	<b>Hg-<i>Tth</i>-MCO-2h</b>
<b>Colecta de datos</b>		
Grupo espacial	C222 <sub>1</sub>	C222 <sub>1</sub>
Celda unidad		
<i>a, b, c</i> (Å)	93.5, 110.2, 96.3	93.3, 110.1, 96.2
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
Resolución (Å)	20.0-1.70 (1.80-1.70)	28.0-1.70 (1.80-1.70)
No. de reflexiones	542926	245055
No. de reflexiones únicas	54841 (8585)	53273 (7694)
Integridad (%)	94.6 (91.4)	97.9 (97.5)
<i>R<sub>merge</sub></i> (%)	13.3 (35.3)	5.5 (27.9)
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )	9.1 (3.7)	18.4 (5.1)
Multiplicidad	9.9 (10.3)	4.6 (4.7)
Unidad asimétrica	Un monómero	Un monómero
<b>Afinamiento</b>		
Resolución (Å)	20.0-1.70	28.0-1.70
<i>R<sub>work</sub></i> / <i>R<sub>free</sub></i> (%)	15.3/17.8	15.2/17.0
No. de átomos		
Proteína	3837	3799
Ion/Ligando	141	133
Agua	455	504
Valores B (Å <sup>2</sup> )		
Proteína	17.2	15.8
Ion/Ligando	38.3	34.8
Agua	31.5	31.7
Total	19.0	18.2
Wilson <i>plot</i>	15.8	14.1
RMSD de la estereoquímica ideal		
Enlaces (Å)	0.02	0.01
Ángulos (°)	1.98	2.32
Error en las coordenadas cristalográficas (Å, <i>Maximum-Likelihood</i> )	0.17	0.17
Gráfico de Ramachandran (%)		
Regiones más favorecidas	97.7	97.8
Regiones permitidas	1.9	2.2
Regiones no permitidas	0.4	0.0

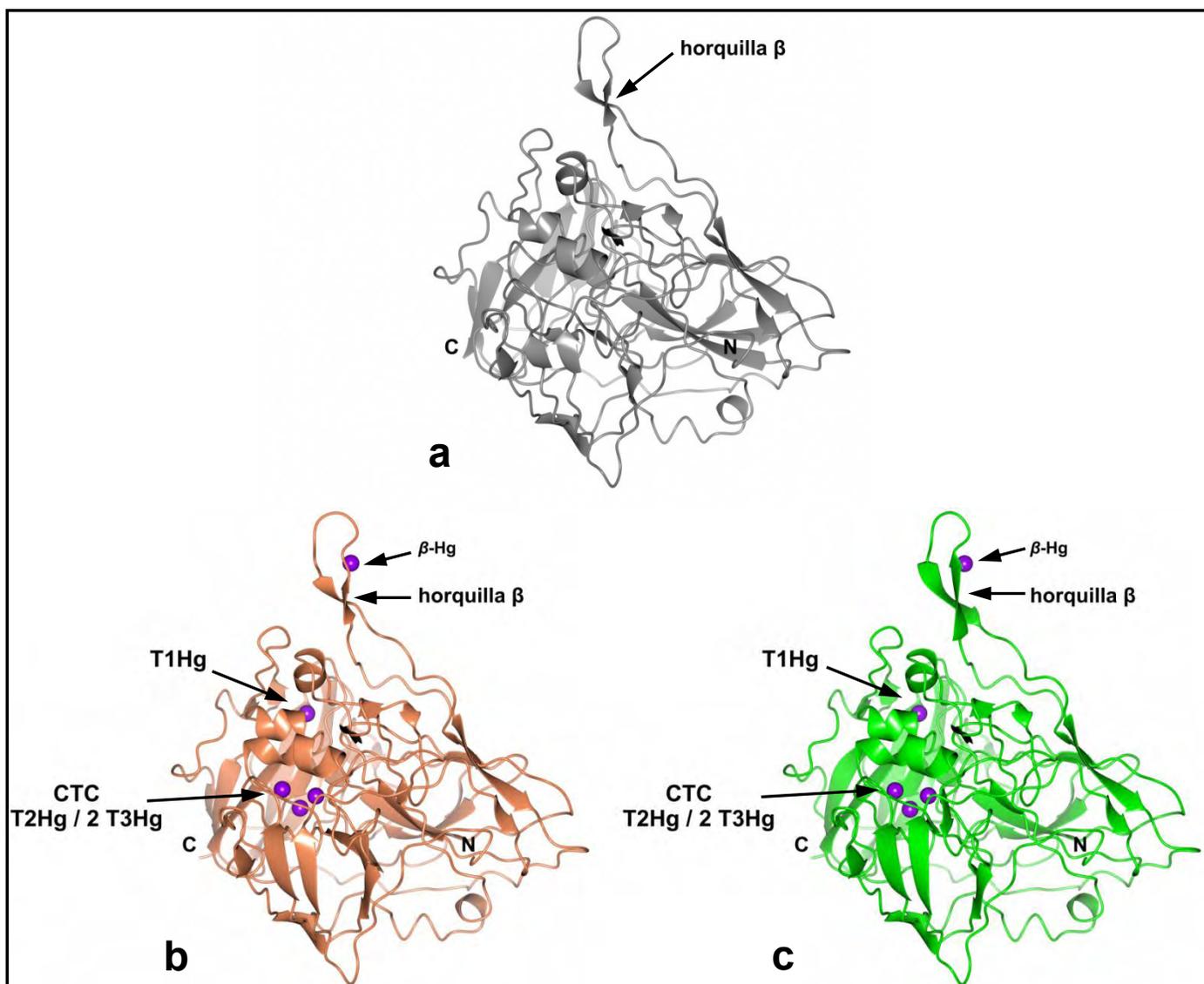
La estructura cristalográfica de la *Tth*-MCO (código PDB 2XU9) consistió en tres dominios globulares secuenciales tipo cupredoxina: Dominio 1 (N-terminal): Gly<sup>24</sup>-Ala<sup>169</sup>; Dominio 2: Glu<sup>170</sup>-Val<sup>343</sup>; y Dominio 3 (C-terminal): Val<sup>344</sup>-Gly<sup>462</sup>. Existen 35 hebras  $\beta$  y 5 hélices  $\alpha$  distribuidas en los tres dominios (**Figura 23**). El plegamiento tipo cupredoxina es bastante común en la familia de las oxidasas multicobre y está formado principalmente por ocho hebras  $\beta$  con un motivo de llave griega, las cuales se pliegan en dos láminas  $\beta$  de cuatro hebras cada una, empacadas una sobre la otra, para formar un sándwich  $\beta$  (Enguita *et al.*, 2003).



**Figura 23. a)** Estructura tridimensional por difracción de rayos X de la *Tth*-MCO a 1.5 Å de resolución (código PDB 2XU9). **b)** Diagrama topológico de la *Tth*-MCO (tomado y modificado de PDBsum). La escala de colores es la misma para los tres dominios en ambas figuras.

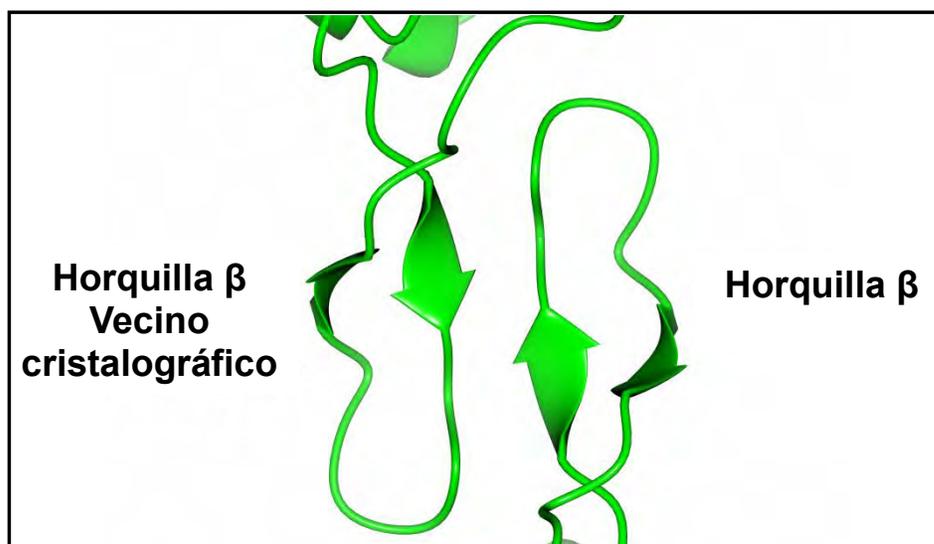
El Dominio 3 contiene los residuos encargados de coordinar al T1Cu, mientras que la interfase entre el Dominio 1 y el 3 contiene los residuos que coordinan al CTC. El Dominio 2, sin embargo, ensambla estructuralmente a los Dominios 1 y 3 pero no coordina a ninguno de los 4 átomos de Cu de la *Tth*-MCO.

Por otro lado, el plegamiento de las tres estructuras cristalográficas inactivas: apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h (**Figura 24**) fue similar al de la *Tth*-MCO. De hecho, la superposición de las cuatro estructuras cristalográficas demuestra la ausencia de cambios conformacionales significativos entre ellas, con un r.m.s.d de 0.16 Å para los 439 carbonos alfa ( $C_{\alpha}$ ).



**Figura 24.** Estructuras tridimensionales determinadas por difracción de rayos X a 1.7 Å de resolución. **a)** apo-*Tth*-MCO (código PDB 2XUW). **b)** Hg-*Tth*-MCO (código PDB 2XVB). **c)** Hg-*Tth*-MCO-2h (código PDB 4AI7).

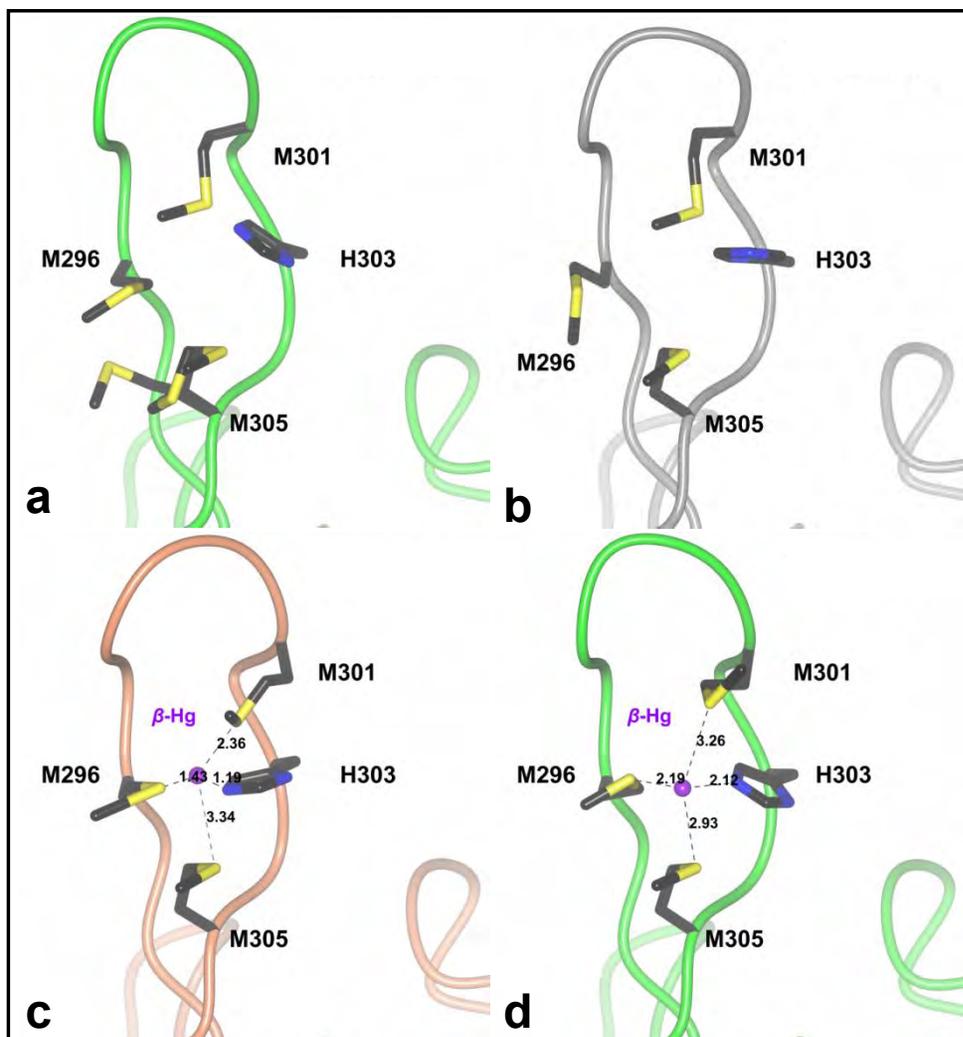
Sin embargo, en las cuatro estructuras cristalográficas se observó una horquilla  $\beta$  (Figuras 23-24) compuesta por 16 residuos (de Ala<sup>292</sup> a Gln<sup>307</sup>), de los cuales seis son metioninas: Met<sup>293</sup>, Met<sup>295</sup>, Met<sup>296</sup>, Met<sup>298</sup>, Met<sup>301</sup> y Met<sup>305</sup>. En este motivo de estructura secundaria participan dos hebras  $\beta$  antiparalelas ( $\uparrow\beta 22$ : Ala<sup>292</sup>-Met<sup>293</sup>-Gly<sup>294</sup>-Met<sup>295</sup>-Met<sup>296</sup> y  $\downarrow\beta 23$ : His<sup>303</sup>-Ala<sup>304</sup>-Met<sup>305</sup>-Pro<sup>306</sup>-Gln<sup>307</sup>) unidas por un lazo de 6 residuos: Asp<sup>297</sup>-Met<sup>298</sup>-Gly<sup>299</sup>-Gly<sup>300</sup>-Met<sup>301</sup>-Ala<sup>302</sup>, con las glicinas: Gly<sup>299</sup>-Gly<sup>300</sup> en el giro máximo del lazo (Figura 23b). La horquilla  $\beta$  está ubicada sobre el lugar de entrada al sitio T1, zona específica donde se oxidan 4 moléculas de sustrato por el T1Cu en la *Tth*-MCO para generar los 4 e<sup>-</sup> necesarios en la reducción del O<sub>2</sub> en el CTC (Figura 1). Aunque otras oxidasas multicobre, como McoP de la arquea *Pyrobaculum aerophilum* (código PDB 3AW5; Sakuraba *et al.*, 2011), McoC de la bacteria patogénica *Campylobacter jejuni* (código PDB 3ZX1; Silva *et al.*, 2012) y CueO (código PDB 1KV7; Roberts *et al.*, 2002), mostraron también un motivo estructural similar sobre el T1Cu, este motivo específico de horquilla  $\beta$  de la *Tth*-MCO es la primera vez que se observa en la estructura tridimensional de alguna oxidasa multicobre a la fecha. Es difícil establecer el grado de movilidad de la horquilla  $\beta$  en las cuatro estructuras determinadas, ya que este motivo estructural está estabilizado por la horquilla  $\beta$  del vecino cristalográfico (**Figura 25**). Los residuos: Met<sup>295</sup>-Met<sup>296</sup>-Asp<sup>297</sup>-Met<sup>298</sup> son los encargados de estabilizar vía puentes de hidrógeno, principalmente, a las cadenas principales de ambas horquillas.



**Figura 25.** Horquilla  $\beta$  sobre el sitio del T1Cu de la *Tth*-MCO estabilizada por el mismo motivo estructural del vecino cristalográfico

La Met<sup>305</sup> presentó tres conformaciones en la estructura de la *Tth*-MCO, mientras que en las estructuras inactivas de la apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h se observó una sola

conformación para este residuo. Específicamente, en la Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h, la Met<sup>305</sup> se estabilizó y coordinó junto con la Met<sup>296</sup>, Met<sup>301</sup> e His<sup>303</sup> a un quinto átomo de Hg ( $\beta$ -Hg). La presencia de este  $\beta$ -Hg tiene sentido químico bajo las condiciones experimentales utilizadas, debido a la ausencia de densidad electrónica en esta misma región para la *Tth*-MCO y apo-*Tth*-MCO (**Figura 26**).



**Figura 26.** Horquilla  $\beta$  sobre el sitio del T1Cu. **a)** *Tth*-MCO. **b)** apo-*Tth*-MCO. **c)** Hg-*Tth*-MCO. **d)** Hg-*Tth*-MCO-2h. Las distancias mostradas en la figura están en Å.

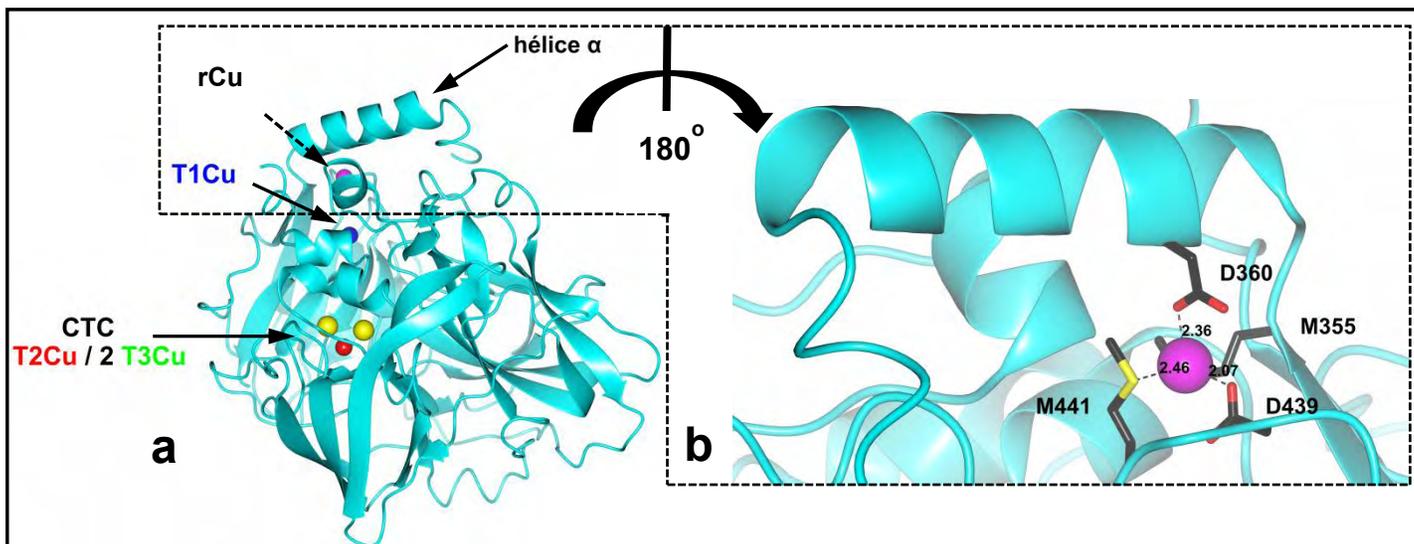
Sin embargo, el  $\beta$ -Hg de la Hg-*Tth*-MCO fue especialmente difícil de modelar, ya que debido al poco tiempo de remojo (5 min) con HgCl<sub>2</sub> se encontró poca densidad electrónica, con una ocupación de 0.1, valor B de 83.4 Å<sup>2</sup> y fue necesario forzar las distancias de enlace S<sub>Met</sub><sup>296</sup>-Hg y N<sub>ε</sub>His<sup>303</sup>-Hg a 1.43 y 1.19 Å, respectivamente (Figura 26c). Sin embargo, este valor B del  $\beta$ -Hg tiene sentido ya que

la zona de coordinación es bastante móvil con un valor B promedio de 77.2 Å<sup>2</sup> para los cuatro residuos que lo coordinan. Debido a esto se remojó un segundo cristal de la apo-*Tth*-MCO por 2 horas para obtener a la Hg-*Tth*-MCO-2h. Efectivamente se observó de nuevo densidad electrónica en esta misma región y el tiempo de remojo aumentó la ocupación del β-Hg a 0.2 y el valor B disminuyó 58.6 Å<sup>2</sup>, sustentando la presencia de un quinto átomo de Hg en esta dos estructuras, con distancias de enlace de coordinación aceptables para la última (Figura 26d). De hecho, el valor B promedio de los cuatro residuos que coordinan al β-Hg de la Hg-*Tth*-MCO-2h disminuyó a 68.2 Å<sup>2</sup>.

Debido al contacto cristalino de la horquilla β es probable que la estructura secundaria de este motivo sea un artefacto cristalográfico, que se generó en el cristal sólo en presencia del contacto proteína-proteína. En otras palabras, es posible que la *Tth*-MCO activa, como monómero, no conserve este motivo de estructura secundaria en solución. De hecho, en la estructura de la oxidasa multicobre McoP (código PDB 3AW5; Sakuraba *et al.*, 2011) se encontró precisamente en esta misma región, sobre el T1Cu, un motivo similar desestructurado de 19 residuos: Pro<sup>289</sup>-Glu<sup>307</sup>. Por lo tanto, debido esta limitación técnica particular de la cristalografía de rayos X, la función biológica de la horquilla β en la *Tth*-MCO no se puede determinar con exactitud. Sin embargo, en CueO se encontró una hélice α sobre el T1Cu (Roberts *et al.*, 2002), en la misma posición estructural de la horquilla β en la *Tth*-MCO. Interesantemente, cuando Roberts *et al.* (2003) remojaron un cristal de CueO con CuCl<sub>2</sub>, encontraron en esta hélice α un quinto átomo de Cu coordinado (rCu o sCu<sup>36</sup>) por los residuos Met<sup>355</sup>, Asp<sup>360</sup>, Asp<sup>439</sup> y Met<sup>441</sup> (**Figura 27**), al igual que se encontró un quinto átomo de Hg (β-Hg) en la horquilla β de las estructuras de la Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h.

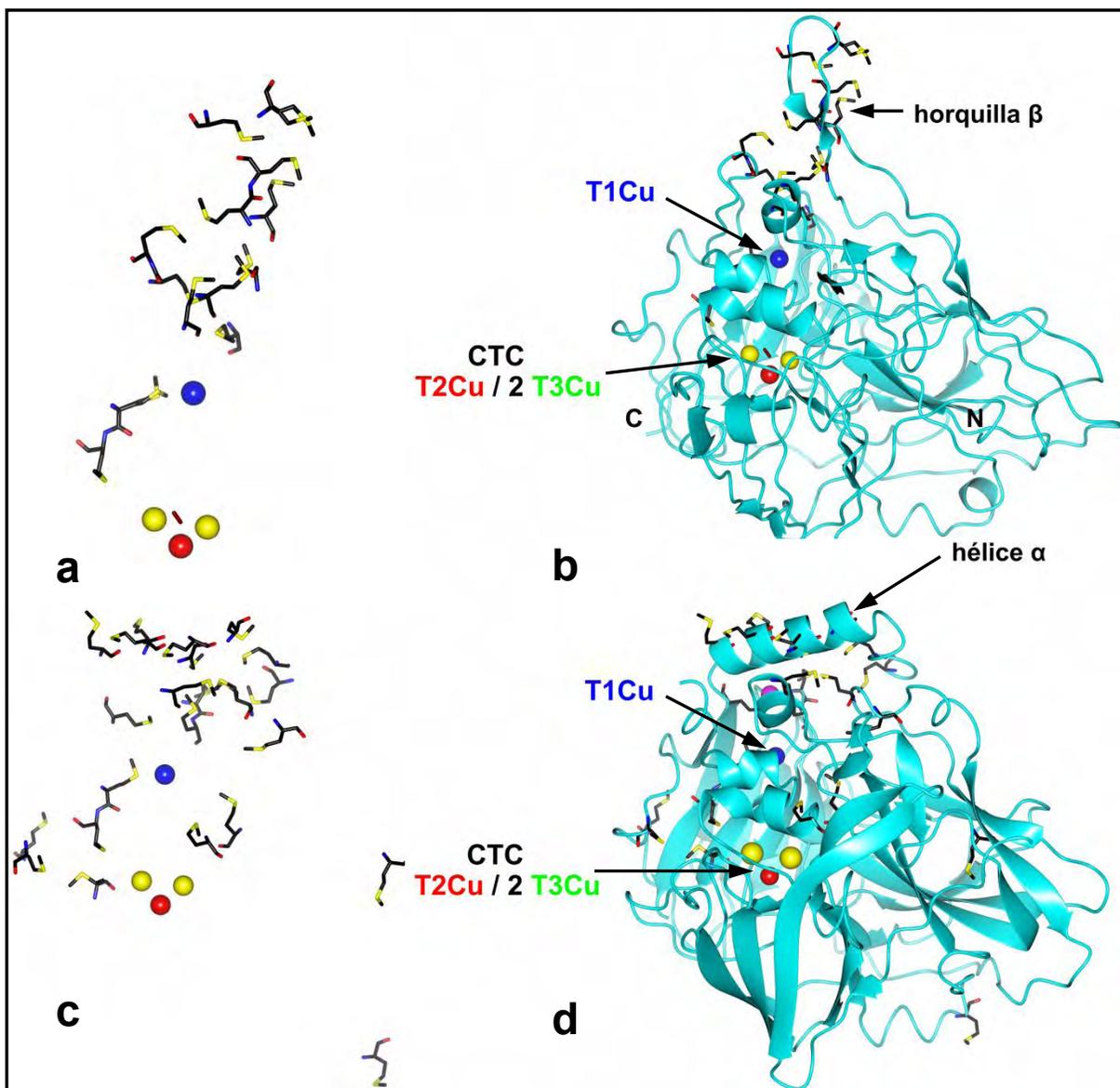
---

<sup>36</sup> rCu o sCu por sus siglas en inglés: *regulatory copper site* o *substrate copper site*, respectivamente. Estos nombre derivaron de la importancia de este sitio de Cu para la oxidación específica de Cu(I) en *E. coli*.



**Figura 27.** Estructura cristalográfica de CueO a 1.7 Å de resolución (código PDB 1N68; Roberts *et al.*, 2003). **a)** Hélice  $\alpha$  sobre el T1Cu en CueO, equivalente a la región estructural de la horquilla  $\beta$  en la *Tth*-MCO. **b)** Quinto átomo de Cu (rCu) coordinado en CueO. Las distancias mostradas en la figura están en Å.

El análisis detallado de las estructuras de la *Tth*-MCO y CueO demuestra que en esta región se encuentra una alta concentración de metioninas. De hecho, la *Tth*-MCO posee 13 metioninas en la estructura primaria, las cuales interesantemente se encuentran en su totalidad entre el punto máximo (Gly<sup>299</sup>-Gly<sup>300</sup>) de la horquilla  $\beta$  y el T1Cu (**Figura 28a-b**). Adicionalmente, CueO también presenta una alta concentración de metioninas en esta misma región (**Figura 28c-d**), 9 de las cuales pertenecen a la hélice  $\alpha$ .



**Figura 28. a-b)** Distribución de las metioninas en la *Tth*-MCO entre el punto máximo de la horquilla  $\beta$  y el T1Cu. **b-c)** Distribución de las metioninas entre la hélice  $\alpha$  y los alrededores del T1Cu en CueO (código PDB 1N68).

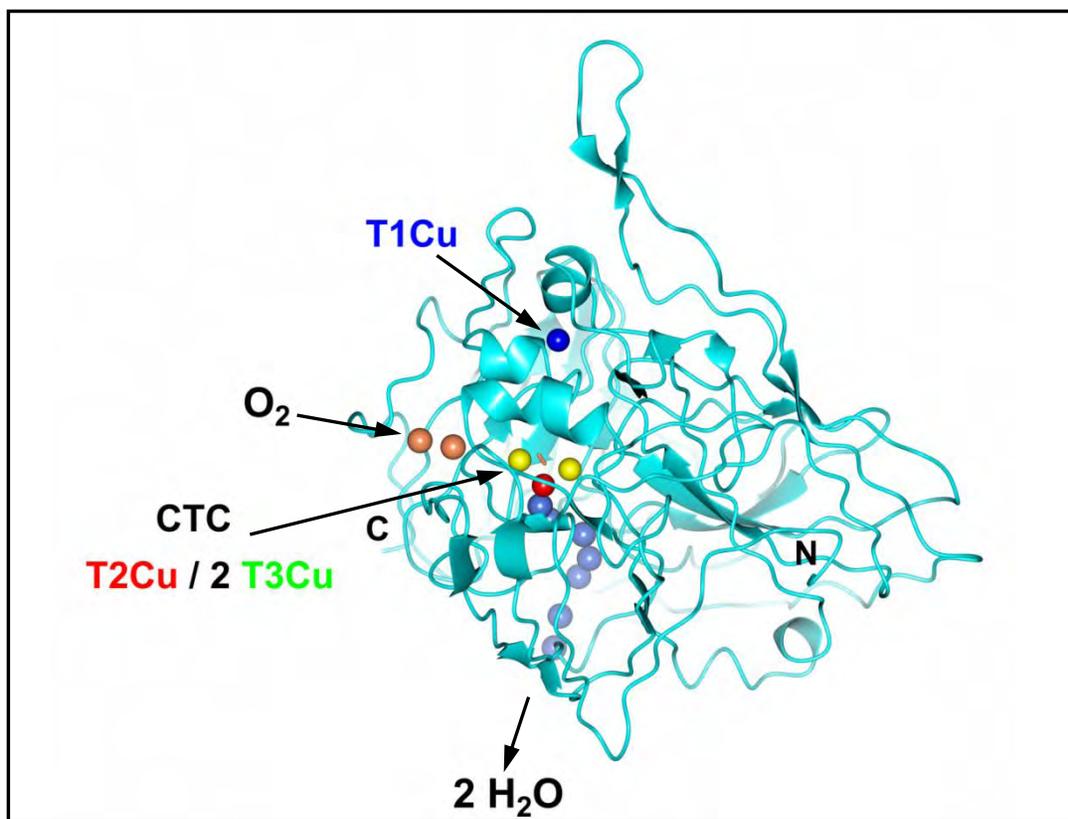
Existen distintas hipótesis respecto al papel que desempeñan estas metioninas ubicadas en este lugar en particular, algunos autores (Jacob *et al.*, 2003) afirman que las enzimas redox que producen radicales libres, como la reacción catalizada por el T1Cu en las oxidasas multicobre, tienen una alta concentración de metioninas alrededor del sitio activo para protegerse de la autooxidación por productos (radicales libres) que se generan después de la reacción enzimática (Figura 1). Así, las metioninas actúan como residuos antioxidantes en este tipo de proteínas, oxidando el grupo tioéter ( $R^1-S-R^2$ ) a cualquiera de los dos grupos funcionales: sulfóxido o sulfona,

protegiendo de esta manera residuos vitales para la actividad enzimática. Sin embargo, en ninguna de las estructuras de la *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h se encontró alguna de las 13 metioninas oxidadas, aunque esto no significa que el proceso no pueda ocurrir *in vivo* o *in vitro*. Por otro lado, una de las ideas más aceptadas es que esta alta concentración de metioninas en las oxidasas multicobre está relacionada con la coordinación de sitios adicionales de Cu (Figura 27), para aumentar la especificidad de sustrato, específicamente, respecto a la oxidación de átomos metálicos sobre compuestos orgánicos y por lo tanto, incrementar la capacidad de oxidar al tóxico Cu(I) a Cu(II) (menos tóxico) por medio de estos sitios adicionales de Cu (Roberts *et al.*, 2003). Recientemente, Singh *et al.* (2011) remojaron cristales de CueO con Cu(I) y encontraron dos sitios adicionales de Cu: Cu6 y Cu7, en la hélice  $\alpha$  de CueO (código PDB 3NT0), coordinados por los residuos: Met<sup>358</sup>, Met<sup>362</sup> y Met<sup>364</sup>, Met<sup>368</sup>, Met<sup>376</sup>, respectivamente. Estos sitios Cu6 y Cu7 se encuentran espacialmente cerca al rCu (Figura 27), coordinado en esta misma hélice  $\alpha$ . Así, Singh *et al.* (2011) propusieron la ruta de transferencia electrónica: [Cu6, Cu7]  $\rightarrow$  rCu  $\rightarrow$  T1Cu  $\rightarrow$  CTC, demostrando al mismo tiempo que las mutaciones de las metioninas encargadas de coordinar a los Cu6 y Cu7 por serinas resultaba en la pérdida de actividad de la enzima por Cu(I). Por otro lado, la eliminación completa de la hélice rica en metioninas de CueO aumentó la capacidad de la enzima de oxidar sustratos orgánicos, ya que el T1Cu de alto potencial redox positivo, oculto estructuralmente por la hélice  $\alpha$ , quedó expuesto al solvente y la enzima perdió especificidad por Cu(I) (Kataoka *et al.*, 2007). Es probable que la *Tth*-MCO también utilice esta zona rica en metioninas para coordinar átomos adicionales de Cu, que oculten al T1Cu y permitan aumentar la especificidad de la enzima por iones metálicos en lugar de compuestos orgánicos. Sin embargo, cuando se remojaron cristales de la *Tth*-MCO con Cu(II), no se encontraron sitios adicionales de coordinación de Cu en la zona rica en metioninas.<sup>37</sup> Finalmente, a pesar de que la *Tth*-MCO y CueO conservan esta alta concentración de metioninas en esta región en particular (Figura 28), vale la pena resaltar que las mismas no están conservadas en la familia de las oxidasas multicobre. Por lo tanto, es una incógnita por qué estas dos enzimas las conservan, mientras que las otras enzimas de la misma familia no las necesitan o no las conservan. El mismo análisis estructural demuestra, por ejemplo, que CotA y Fe3tp no poseen una alta concentración de metioninas en esta región.

Por otro lado, en la estructura de la *Tth*-MCO se encontraron los 4 átomos de Cu: T1Cu, T2Cu y 2 T3Cu, distribuidos en los dos sitios activos y un OH<sup>-</sup> entre el centro binuclear T3Cu-T3'Cu, característico del ER. En la *Tth*-MCO, el T1Cu está coordinado por los residuos His<sup>393</sup>, His<sup>450</sup> y Cys<sup>445</sup>.

<sup>37</sup> En este trabajo de Doctorado no se remojaron cristales de la *Tth*-MCO con Cu(I), por lo que es necesario realizar este tipo de experimentos en el futuro para encontrar sitios adicionales de Cu en la zona rica en metioninas.

El vecino axial conservado y característico de las oxidasas multicobre bacterianas, Met<sup>455</sup>, se encontró en doble conformación. El T3Cu, el cual se encuentra al final del canal de entrada del O<sub>2</sub> (Figura 3 y **Figura 29**), está coordinado por los residuos: His<sup>137</sup> (dos conformaciones), His<sup>398</sup> e His<sup>444</sup>, mientras que el T3'Cu está coordinado por los residuos His<sup>97</sup>, His<sup>135</sup> e His<sup>446</sup>. Por su parte, el T2Cu, el cual se encuentra al inicio del canal de salida de las moléculas de H<sub>2</sub>O, producto de la reducción del O<sub>2</sub> (Figura 3 y Figura 29), está coordinado por los residuos His<sup>95</sup> e His<sup>396</sup> (**Figura 30a-b**).



**Figura 29.** Canal de entrada del O<sub>2</sub> (diámetro promedio de  $\sim 3.2 \text{ \AA}$ )<sup>38</sup> hacia el T3Cu (amarillo) y canal de salida (diámetro promedio de  $\sim 3.4 \text{ \AA}$ ) de las 2 H<sub>2</sub>O a partir del T2Cu (rojo) en la estructura de la *Tth*-MCO. Las esferas que se observan en cada uno de los canales corresponden a moléculas de H<sub>2</sub>O observadas en la estructura cristalográfica.

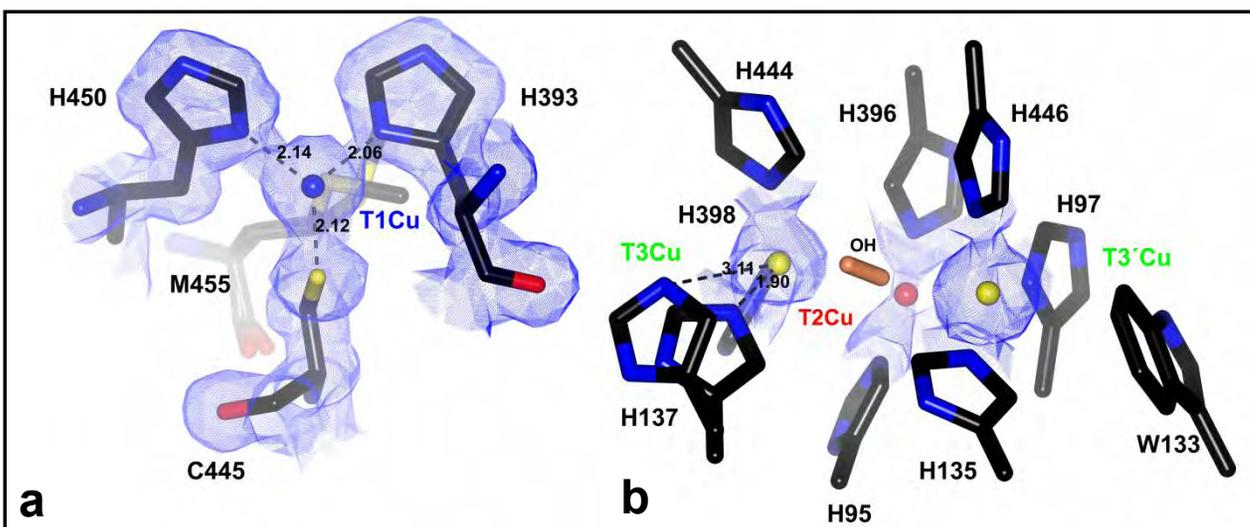
La ausencia de densidad electrónica para el T1Cu, el centro binuclear T3Cu-T3'Cu y el T2Cu en la apo-*Tth*-MCO, demostró que el proceso de sobreexpresión y purificación no le incorporó ningún átomo de Cu a esta forma inactiva de la enzima y ratificó los estudios bioquímicos en solución previos a la cristalización de la misma (**Figura 30c-d**). Se observa que todos los residuos

<sup>38</sup> El diámetro de los canales se calculó con MOLE versión 2.0 en el servidor web: <http://mole.upol.cz/>

encargados de la coordinación de los átomos de Cu en la *Tth*-MCO, están en una sola conformación en la estructura de la apo-*Tth*-MCO. Esto demuestra que es la enzima la que estabiliza a los átomos de Cu y no al contrario; es decir, éstos no son necesarios para el correcto plegamiento de la forma apo. Incluso, la His<sup>137</sup> en la apo-*Tth*-MCO se encontró en una sola conformación, en la posición equivalente a la conformación 2 alejada del T3Cu observada en la *Tth*-MCO.

Las estructuras de la Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h demostraron que los átomos de Hg se coordinaron sin distinción en todos los sitios de coordinación vacantes de la apo-*Tth*-MCO, en los cuales se coordinan originalmente los átomos de Cu en la *Tth*-MCO (**Figura 30e-f y 30g-h**). Como se dijo previamente, también se encontró un quinto átomo de Hg coordinado en la horquilla  $\beta$  de ambas estructuras cristalográficas (Figura 26). A pesar de que se encontraron todos los átomos de Hg con ocupaciones parciales en ambas estructuras, los átomos de Hg en la estructura de la Hg-*Tth*-MCO-2h, como era de esperarse, presentaron ocupaciones parciales más altas.

Interesantemente se observa una molécula de H<sub>2</sub>O entre los 2 T3Cu en las tres estructuras cristalográficas inactivas, las cuales no pueden realizar la reducción del O<sub>2</sub> inducida por rayos X (Figura 30c-h). Esto demuestra la importancia estructural del sitio de reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O entre los 2 T3Cu, en donde se ubican distintos estados e intermediarios del ciclo catalítico.



**Figura 30.** Geometría del sitio T1 y el CTC. **a-b)** *Tth*-MCO. **c-d)** apo-*Tth*-MCO. **e-f)** Hg-*Tth*-MCO. **g-h)** Hg-*Tth*-MCO-2h. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

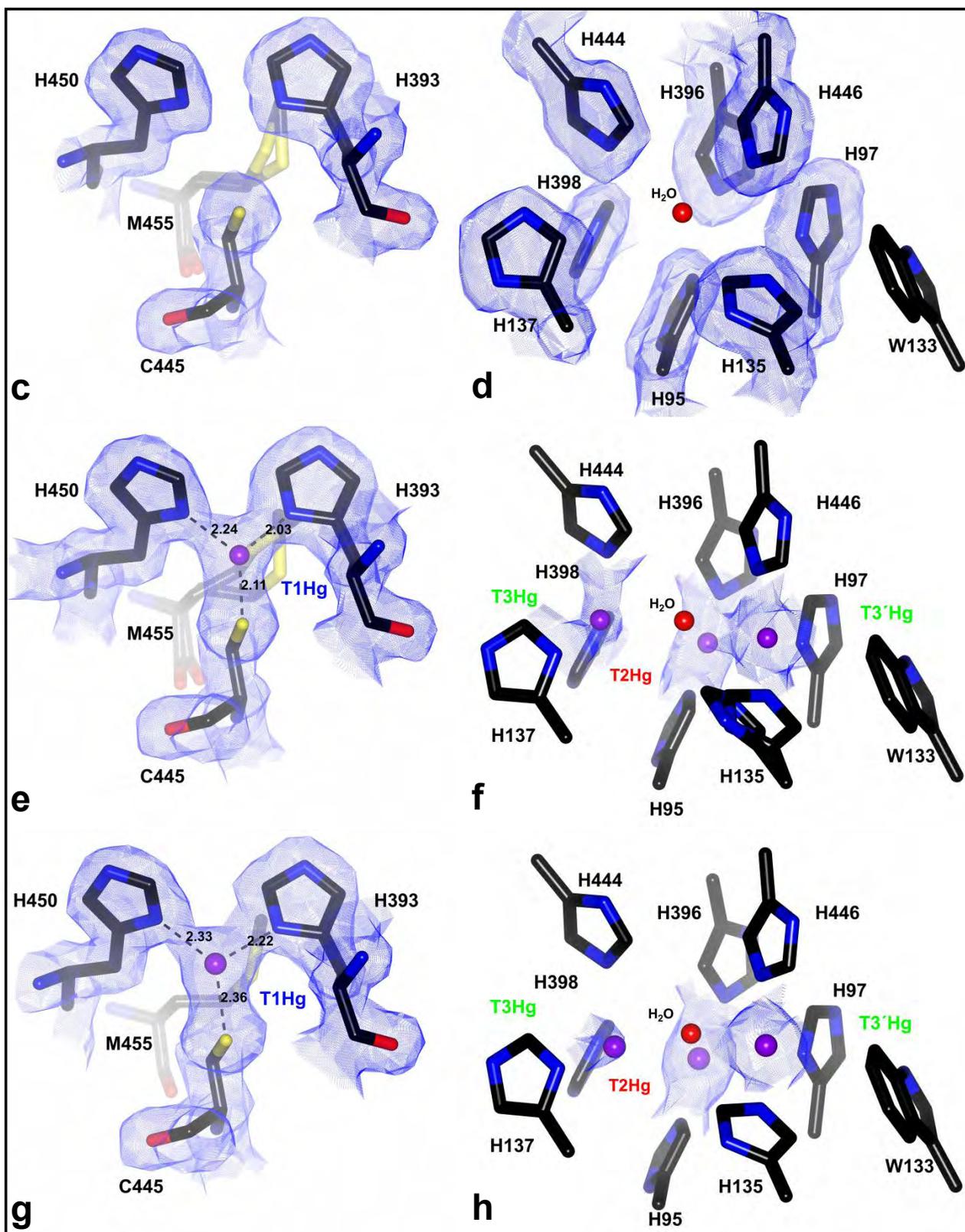
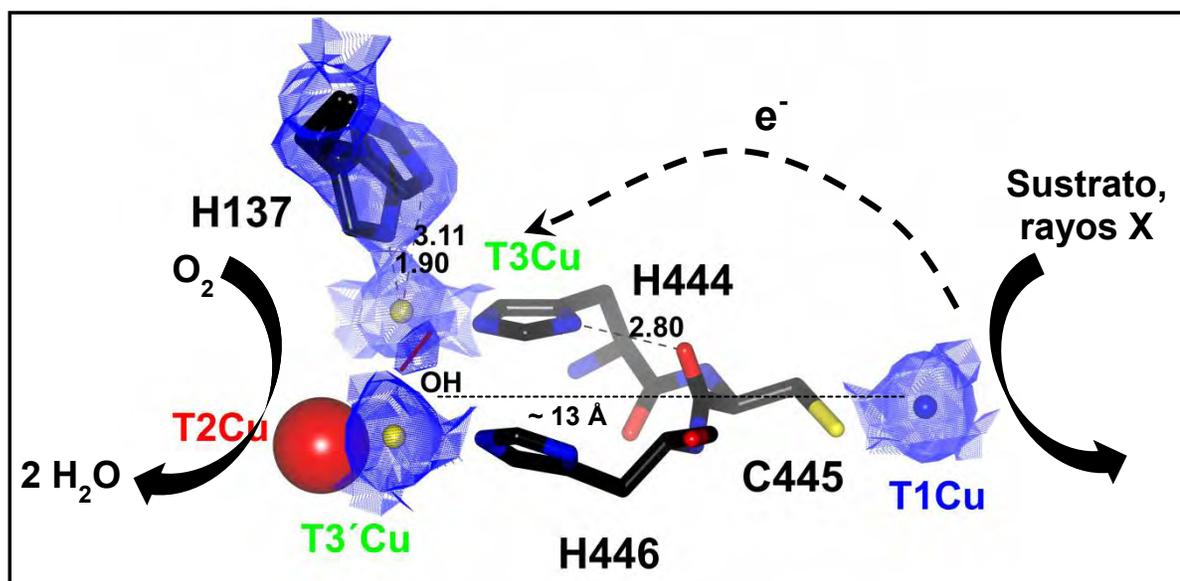


Figura 30. Continuación.

Sin embargo, mientras que el T1Cu demostró ser un átomo bastante estable en la estructura cristalográfica de la *Tth*-MCO, con una ocupación de 0.87, la ocupación del T2Cu fue de 0.13. Esto hace pensar que el T2Cu, por su ubicación estructural en el canal de salida de las moléculas de H<sub>2</sub>O, sufrió el mayor daño por dosis de radiación absorbida, principalmente por los electrones hidratados, y se eliminó progresivamente de la estructura durante la colecta de datos de difracción de rayos X (Garman, 2010; De la Mora *et al.*, 2012). A diferencia del T3Cu (ocupación de 0.43), el T3'Cu (ocupación de 0.90) flanqueado por el Trp<sup>133</sup>, demostró ser un átomo bastante estable, en particular frente a la dosis absorbida, en la estructura cristalográfica de la *Tth*-MCO. La ruta de transferencia electrónica desde el T1Cu al CTC se da por la ruta preferida T1Cu-Cys<sup>445</sup>-His<sup>444</sup>-T3Cu (Augustine *et al.*, 2010), entre el oxígeno del grupo C=O de la Cys<sup>445</sup> y el N<sub>δ</sub>His<sup>444</sup>, el cual tiene una distancia de 2.80 Å en la *Tth*-MCO. La ocupación parcial del T3Cu indica que este átomo sufrió un mayor daño por dosis de radiación absorbida que el T3'Cu, porque se encuentra al final de la ruta de transferencia electrónica: T1Cu-Cys<sup>445</sup>-His<sup>444</sup>-T3Cu. Todo esto aunado a la doble conformación de la His<sup>137</sup> que coordina al T3Cu, con una distancia de enlace N<sub>ε</sub>His<sup>137</sup>-T3Cu = 1.90 Å en la conformación 1 (ocupación de 0.44), y que se aleja del mismo con una distancia de enlace N<sub>ε</sub>His<sup>137</sup>-T3Cu = 3.11 Å en la conformación 2 (ocupación de 0.56) (Figura 30b y Figura 31).



**Figura 31.** Transferencia electrónica desde el T1Cu al CTC en la *Tth*-MCO, por la ruta T1Cu-Cys<sup>445</sup>-His<sup>444</sup>-T3Cu entre el oxígeno del grupo C=O de la Cys<sup>445</sup> y el N<sub>δ</sub>His<sup>444</sup>. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1\sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

De esta manera se determinaron por cristalografía clásica las estructuras tridimensionales de la *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h. Éstas son un promedio de todos los

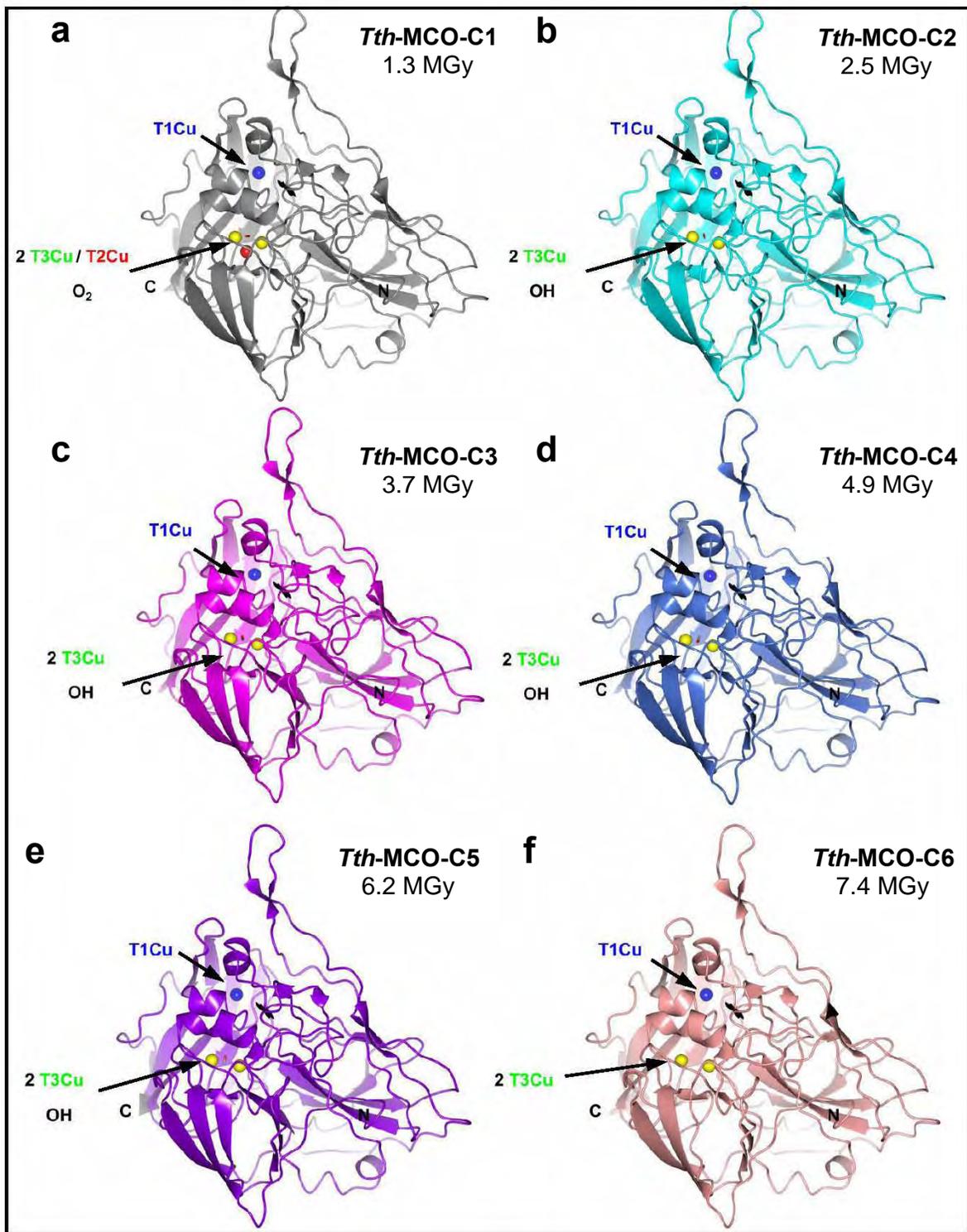
estados de reducción de cada uno de los cristales, desde el inicio de la colecta de datos, cuando la dosis de radiación absorbida era baja y por lo tanto los procesos de reducción dentro del cristal eran mínimos, hasta el final de la colecta de datos, cuando la dosis de radiación aumentó y por lo tanto se incrementaron los procesos de reducción y el daño por dosis de radiación dentro de cada uno de los cristales.

A pesar de esto, con esta metodología cristalográfica se obtienen, en términos generales, excelentes modelos tridimensionales que describen el plegamiento de las proteínas y otras características importantes de la mayoría de los sistemas. Sin embargo, en el caso específico de las enzimas redox, como la *Tth*-MCO, se pierde también información valiosa sobre los estados e intermediarios de la reducción del  $O_2$  a  $2 H_2O$ , ya que debido a la fuente constante de  $e^-$  que proporcionan los rayos X durante la colecta de datos, la enzima es capaz de realizar este ciclo catalítico una y otra vez en estado cristalino. Así, se determinó la estructura de la *Tth*-MCO en el ER, el cual fue el estado más poblado dentro del cristal, pero se perdió información valiosa sobre los otros estados e intermediarios de la reducción del  $O_2$  inducida por rayos X.

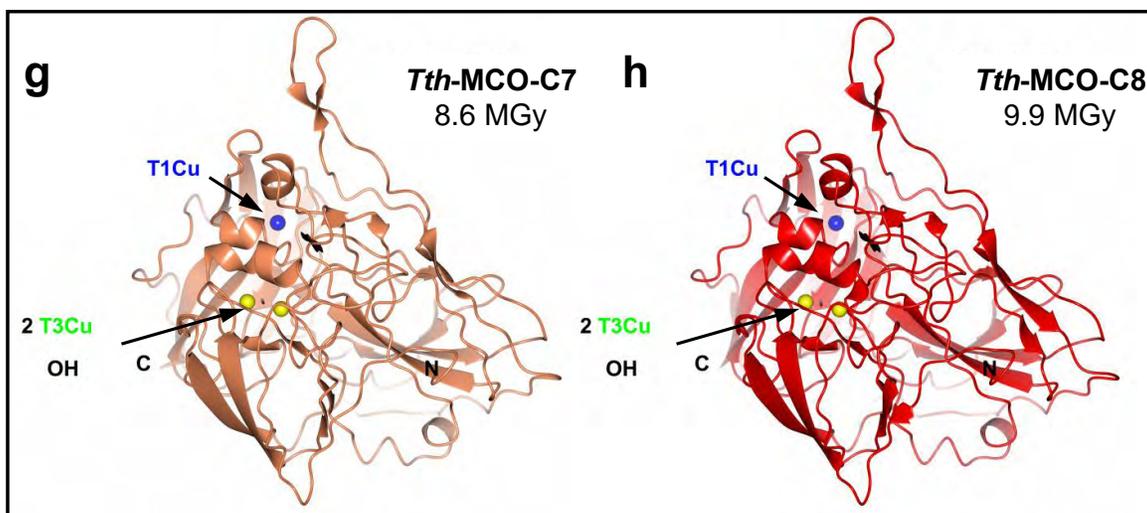
Sin embargo, en la siguiente sección se describirá una estrategia cristalográfica diferente, con la que es posible evitar este tipo de inconvenientes y por lo tanto se pueden estudiar mecanismos catalíticos de metaloenzimas por cristalografía de rayos X. Así, se observará una película tridimensional de la reducción del  $O_2$ , construida a partir de ocho estructuras de la *Tth*-MCO con diferente dosis de radiación absorbida: *Tth*-MCO-C(1-8) (1.3-9.9 MGy), y se observará el valor mínimo de dosis de radiación absorbida con el que se elimina al T2Cu de la estructura cristalográfica de la enzima, así como el daño por dosis de radiación en los otros centros de Cu.

#### **IX.5. Estructuras compuestas determinadas por difracción de rayos X de la *Tth*-MCO con diferente dosis de radiación absorbida**

La técnica del microsebrado permitió obtener ocho cristales de la *Tth*-MCO de tamaño similar y buen hábito cristalino. Cada uno de los cristales difractó, con buenos parámetros estadísticos, hasta  $\sim 1.6 \text{ \AA}$  de resolución. Sin embargo, en lugar de integrar los datos de difracción de cada uno de los cristales, como se hizo en la sección previa, se combinaron bloques de  $12^\circ$  de cada *data set*, provenientes de cada uno de los cristales pero teniendo en común la dosis de radiación absorbida, y se obtuvieron ocho estructuras compuestas *Tth*-MCO-C(1-8) a  $1.8 \text{ \AA}$  de resolución. Así, con la obtención de estas ocho estructuras compuestas con distinta dosis de radiación absorbida: *Tth*-MCO-C1 (1.3 MGy)  $\rightarrow$  *Tth*-MCO-C8 (9.9 MGy) se generó una película tridimensional de la reducción del  $O_2$  a  $2 H_2O$  en el CTC de la *Tth*-MCO (**Figura 32**).



**Figura 32. a-h)** Estructuras cristalográficas *Tth-MCO-C(1-8)* a 1.8 Å de resolución con diferente dosis de radiación absorbida (1.3-9.9 MGy), obtenidas por la estrategia multicristal de colecta de datos.

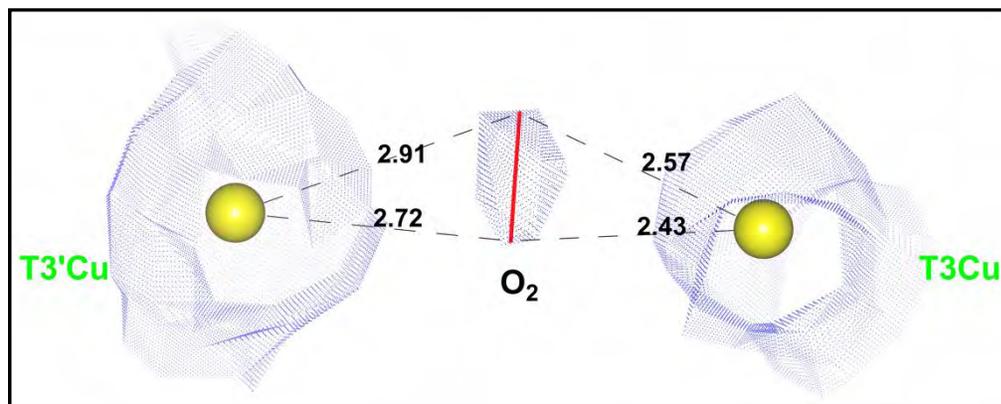


**Figura 32. a-h) Continuación.**

Como se dijo anteriormente (Figura 2), se han caracterizado distintos estados e intermedios de la reducción del  $O_2$  en el CTC, dependiendo de las condiciones de reacción, en solución o en estado cristalino (Hakulinen *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2008). En solución, el CTC tiene una fuente constante de  $e^-$  producto de la continua oxidación de moléculas de sustrato en el T1Cu, mientras que en estado cristalino el sistema está sujeto a una fuente deficiente de  $e^-$  al inicio de la colecta de datos cristalográficos, cuando la dosis de radiación absorbida es baja. Sin embargo, la dosis de radiación absorbida se incrementa progresivamente durante la colecta de datos de difracción de rayos X y por lo tanto, la reducción del  $O_2$  inducida por rayos X, tiene lugar. Consecuentemente, la holoenzima en solución oxida 4 moléculas de sustrato en el T1Cu y reduce los 4 átomos de Cu(II) a Cu(I) formando el ETR, primer estado de reacción. El ETR con los 4 átomos de Cu(I), reacciona inmediatamente con el  $O_2$  y produce el IP, por lo que el estado  $O_2$  no se observa en solución bajo condiciones catalíticas. Sin embargo, la reducción inducida por rayos X de los 4 átomos de Cu(II) a Cu(I) en la holoenzima para generar el ETR no es eficiente en el estado cristalino y ante la ausencia del cambio en el estado de oxidación de los 4 átomos de Cu(II), el estado  $O_2$  se estabiliza en el CTC antes de reaccionar y producir el IP (Hakulinen *et al.*, 2006).

Efectivamente, en el primer paso de la película tridimensional de la reducción del  $O_2$  en el CTC, la Tth-MCO-C1 (1.3 MGy) se encontró en el estado  $O_2$ , con un oxígeno molecular ubicado casi simétricamente entre el centro binuclear T3Cu-T3'Cu (**Figura 33**), estructuralmente similar al estado  $O_2$  reportado previamente para la lacasa de *M. albomyces* con baja dosis de radiación absorbida (Figura 5a; Hakulinen *et al.*, 2006) y CotA de *B. subtilis* (código PDB 1W6L; Bento *et al.*, 2005). La obtención del estado  $O_2$  en la estructura compuesta Tth-MCO-C1, con la dosis de radiación

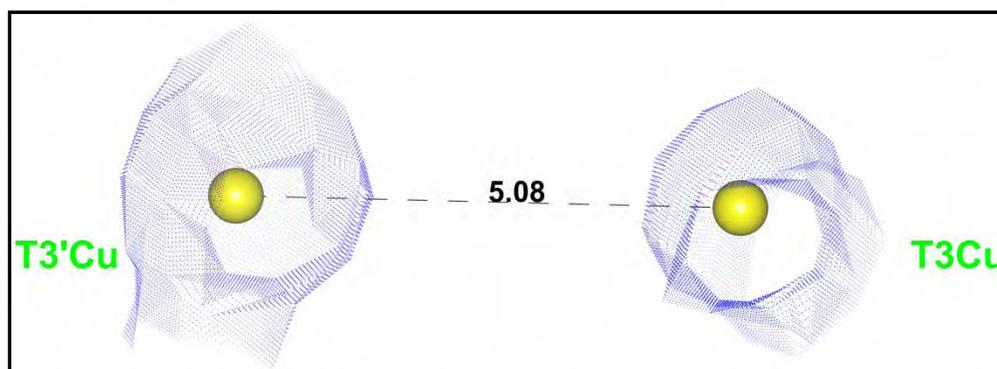
absorbida más baja, indica que la población de  $e^-$  por la radiólisis de las moléculas de  $H_2O$  dentro del cristal es bastante deficiente en este momento de la colecta de datos cristalográficos y que la ausencia en el cambio del estado de oxidación de los 4 átomos de Cu(II) a Cu(I) permite que el estado  $O_2$  se estabilice en el CTC.



**Figura 33.** Estado  $O_2$  obtenido en la *Tth*-MCO-C1 con una dosis de radiación absorbida de 1.3 MGy. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

En la segunda etapa de la película tridimensional de la reducción del  $O_2$  en el CTC, la *Tth*-MCO-C2 con una dosis de radiación absorbida de 2.5 MGy se encontró en el ER, con un grupo  $OH^-$  ubicado entre el centro binuclear  $T3Cu-T3'Cu$ . Es decir, con esta dosis de radiación absorbida la población de  $e^-$  dentro del cristal aumentó rápidamente y la velocidad de decaimiento del IP y el IN impidió la caracterización cristalográfica de los mismos. Así, de acuerdo a la Figura 2 se generaron las siguientes etapas de reacción entre la *Tth*-MCO-C1 y -C2: *Tth*-MCO-C1 (estado  $O_2$ )  $\rightarrow$  IP  $\rightarrow$  IN  $\rightarrow$  *Tth*-MCO-C2 (ER). Sin embargo, a pesar del aumento de la población de  $e^-$  dentro del cristal, ésta no fue suficiente para que el IN se redujera al ETR con todos los átomos de Cu(I). Al contrario de esto, el IN decayó al ER perdiendo una molécula de  $H_2O$ . De hecho, el ER es un estado bastante estable en la mayoría de estructuras cristalográficas de oxidasas multicobre y ante la ausencia de moléculas de sustrato para oxidar, el ER se mantiene estable incluso en solución. Justamente es el  $OH^-$  del ER, ubicado entre el centro binuclear  $T3Cu-T3'Cu$ , el grupo funcional que acopla antiferromagnéticamente a los 2  $T3Cu$  y como consecuencia, estos átomos no presentan señal de EPR. Sin embargo, la transferencia de carga  $T3Cu \leftarrow OH^- (ER) \rightarrow T3'Cu$  es la que genera la banda de absorción a  $\lambda \sim 330$  nm, característica de los 2  $T3Cu$  (Figura 12a). La estabilidad de este estado se reflejó en las siguientes etapas de la película tridimensional de la reducción del  $O_2$  en el CTC, en donde las estructuras compuestas desde la *Tth*-MCO-C2 (2.5 MGy)  $\rightarrow$  *Tth*-MCO-C5 (6.2 MGy) se

estancaron en el ER (Figura 32). Solamente cuando se alcanzó una dosis de radiación absorbida de 7.4 MGy en la *Tth*-MCO-C6, la población de e<sup>-</sup> dentro del cristal fue suficientemente alta para que el ER se redujera al ETR (Figura 2 y 32). Vale la pena resaltar que la caracterización del ETR en la *Tth*-MCO-C6 fue bastante difícil, ya que a una resolución de 1.8 Å no es posible discriminar entre las especies Cu(I) y Cu(II), y en este tipo de experimentos donde se combinan datos cristalográficos de diferentes cristales no es posible acoplar experimentos espectroscópicos para diferenciar entre estos dos estados de oxidación del Cu. Sin embargo, la *Tth*-MCO-C6 fue la única estructura cristalográfica determinada en este trabajo que no presentó ninguna especie o intermediario de reacción ubicado en el CTC, haciendo pensar que este estado es probablemente el ETR. De hecho, Bento *et al.* (2005) transfirieron un cristal de CotA a una cámara libre de oxígeno por dos días y antes de la colecta de datos cristalográficos redujeron los átomos de Cu(II) a Cu(I) remojando el cristal durante 5 h con un exceso de ditionita de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) y caracterizaron al ETR por cristalografía. Así, en la estructura de CotA en el ETR (código PDB 2BHF) no se observaron especies químicas en el CTC y además presentó una distancia de enlace de 5.10 Å entre los 2 T3Cu. Este valor correlaciona con el valor esperado en solución, ya que el ETR es el único estado de la reducción del O<sub>2</sub> que presenta una distancia de enlace > 5 Å entre el centro binuclear T3Cu-T3'Cu (Augustine *et al.*, 2010). Interesantemente, la distancia de enlace entre los 2 T3Cu en la *Tth*-MCO-C6 en el ETR fue de 5.08 Å (Figura 34).



**Figura 34.** ETR obtenido en la *Tth*-MCO-C6 con una dosis de radiación absorbida de 7.4 MGy. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

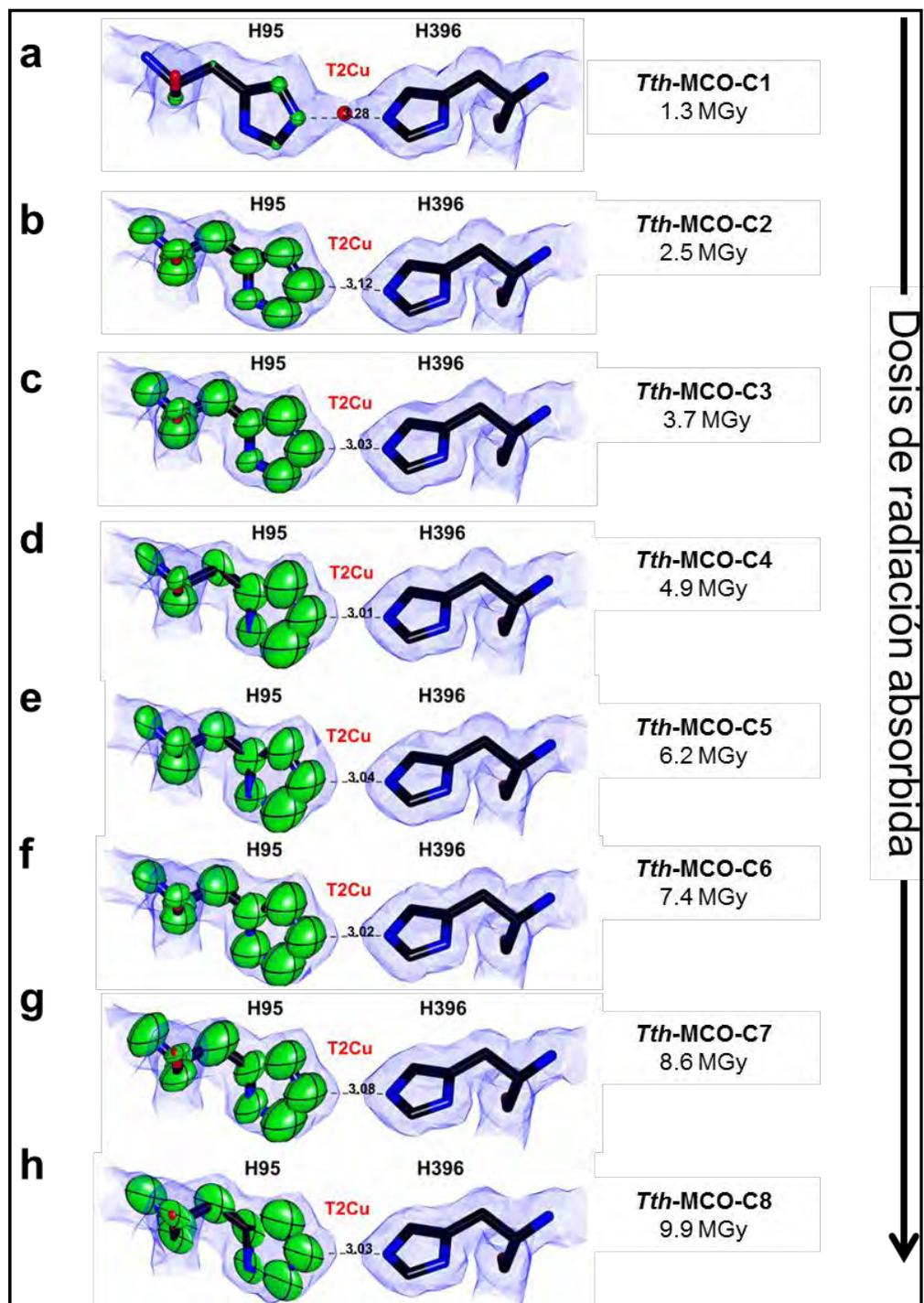
Las dos últimas estructuras *Tth*-MCO-C7 y -C8 de la película tridimensional se encontraron nuevamente en el ER. Así, de acuerdo a la Figura 2 se generaron las siguientes etapas de reacción entre la *Tth*-MCO-C6 y -C7: *Tth*-MCO-C6 (ETR) → IP → IN → *Tth*-MCO-C7 (ER). Es decir, el exceso de dosis de radiación absorbida en esta etapa del experimento permitió que el O<sub>2</sub> reaccionara

rápidamente para generar al IP, que decayó posteriormente en las siguientes especies de reacción. Para este momento el exceso de  $e^-$  dentro de los cristales hace que la reducción del  $O_2$  en el CTC sea relativamente similar a la que se observa en solución, en donde el primer estado es el ETR como se observa en la *Tth*-MCO-C6, con todos los átomos de Cu(I). Sin embargo, la estructura *Tth*-MCO-C7 se estancó nuevamente en el ER, es decir, el IN no se redujo al ETR sino que perdió nuevamente una molécula de agua para generar el ER. Este último estado, bastante estable, se observó nuevamente en la última estructura compuesta *Tth*-MCO-C8 con la mayor dosis de radiación absorbida, 9.9 MGy.

A pesar de que la dosis por radiación absorbida de la *Tth*-MCO-C8 sólo corresponde a  $\sim 33\%$  del límite experimental de Garman<sup>39</sup> (Owen *et al.*, 2006), los efectos en los centros metálicos, especialmente en el T2Cu fueron considerables. De la Mora *et al.* (2012) encontraron que el T2Cu se elimina de la Cg L a una dosis de radiación absorbida entre 0.6-4.0 MGy. Incluso, en la estructura de la Cg L con una dosis de radiación absorbida de 0.6 MGy (código PDB 4A2E), el T2Cu ya presenta una ocupación de 0.46, lo que indica la rápida eliminación de este átomo en la Cg L por la interacción con los rayos X. Aquí, la *Tth*-MCO-C1 (1.3 MGy), con una dosis de radiación absorbida de aproximadamente el doble, presentó también un T2Cu considerablemente eliminado de la estructura cristalográfica, con una ocupación de 0.16. Interesantemente, en la *Tth*-MCO-C2 con una dosis de radiación absorbida de 2.5 MGy, este T2Cu se eliminó completamente de la estructura cristalográfica. Al mismo tiempo y debido a la eliminación del T2Cu se observó un movimiento anisotrópico de la His<sup>95</sup> en las estructuras *Tth*-MCO-C(2-8). Este movimiento se explicó con un afinamiento de TLS<sup>40</sup> para este residuo en particular. Los elipsoides generados sobre cada uno de los átomos de la His<sup>95</sup> por el afinamiento de TLS, demuestran el movimiento anisotrópico de este residuo cuando pierde la coordinación con el T2Cu. La distancia entre la His<sup>95</sup>-His<sup>396</sup> en la *Tth*-MCO-C1 fue de 3.28 Å, sin embargo, a partir de la *Tth*-MCO-C2, cuando el T2Cu se elimina de la estructura cristalográfica y no es necesario conservar el espacio de coordinación para este átomo, la distancia se reduce desde 3.12 Å (*Tth*-MCO-C2) a 3.03 Å (*Tth*-MCO-C8) (**Figura 35**).

<sup>39</sup> El límite experimental de Garman indica que a una dosis de radiación absorbida  $> 30$  MGy, la intensidad de la difracción de cristales crioprottegidos de proteína se reduce a la mitad y por lo tanto la estructura cristalográfica generada a partir de estos datos cristalográficos contiene información biológica menos significativa debido al daño por dosis de radiación absorbida.

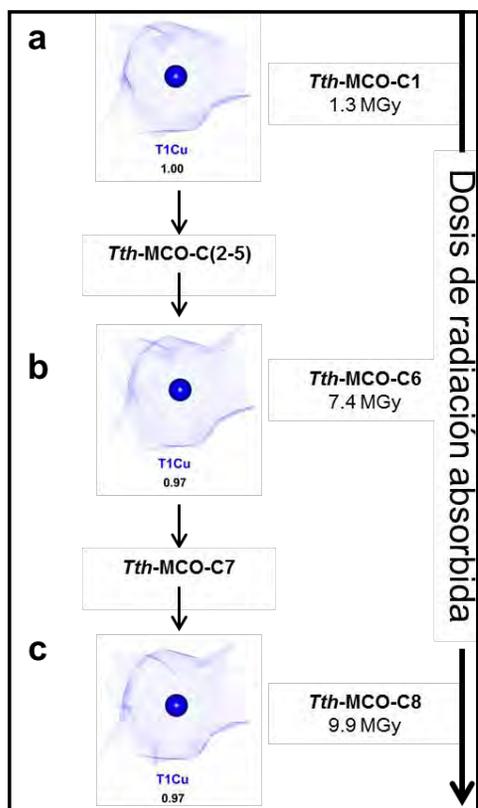
<sup>40</sup> En una estructura cristalográfica cada átomo contenido en la unidad asimétrica y afinado isotrópicamente está descrito por 5 parámetros: (i) 3 parámetros que indican la posición en el espacio: X, Y y Z, (ii) ocupación y (iii) incertidumbre en la posición (factor de temperatura o valor B). Sin embargo, es posible obtener información anisotrópica utilizando un afinamiento de TLS en el que se considera al sistema como un cuerpo rígido, produciendo tensores TLS que describen desplazamientos anisotrópicos pero que se pueden realizar a resoluciones moderadas (3.0-1.5 Å) con una relación datos/parámetros menos exigente que el afinamiento anisotrópico normal.



**Figura 35.** Efecto de la dosis de radiación absorbida sobre el T2Cu en la *Tth-MCO*. **a)** Afinamiento isotrópico de la His<sup>95</sup>. **b-h)** Afinamiento de TLS de la His<sup>95</sup> para observar el movimiento anisotrópico de este residuo cuando pierde la coordinación del T2Cu. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1\sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

Es bastante probable que el T2Cu de la *Tth*-MCO, por estar ubicado al inicio del canal de salida de las moléculas de H<sub>2</sub>O (Figura 29), producto de la reducción del O<sub>2</sub>, sufra un mayor daño por dosis de radiación absorbida por los electrones hidratados que continuamente están interaccionando con este átomo en cada uno de los ciclos catalíticos que tienen lugar durante la colecta de datos cristalográficos. En otras palabras, este átomo está ubicado en una posición estructural tal que las moléculas de H<sub>2</sub>O colisionan constantemente contra él, las cuales, bajo las condiciones de colecta de datos de difracción, podrían ser en la mayoría de los casos electrones hidratados (Garman, 2010).

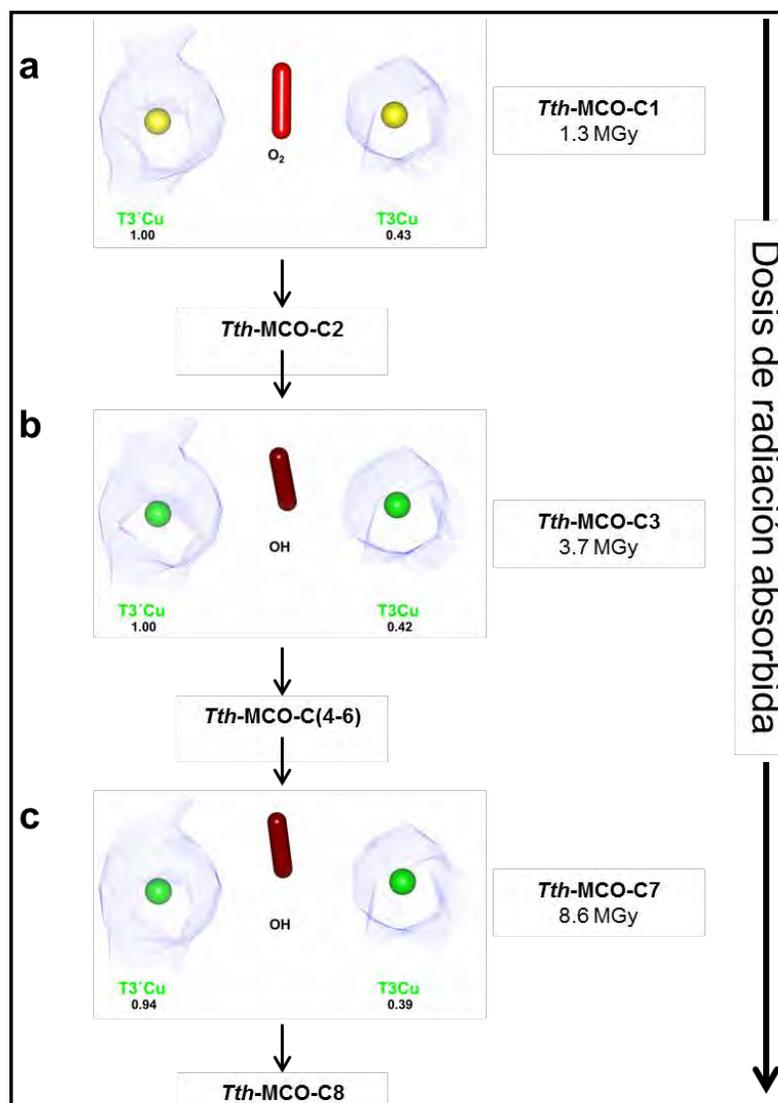
Es importante resaltar a diferencia del T2Cu, el T1Cu y los 2 T3Cu están ubicados en posiciones alejadas del canal de salida de las moléculas de H<sub>2</sub>O y por lo tanto interaccionan en menor proporción con los electrones hidratados (Figura 29). De hecho, el T1Cu no presentó un daño considerable por dosis de radiación absorbida, ya que el cambio en la ocupación fue mínimo, desde 1.00 (*Tth*-MCO-C1) a 0.97 (*Tth*-MCO-C8) (Figura 36).



**Figura 36. a-c)** Efecto de la dosis de radiación absorbida sobre el T1Cu en la *Tth*-MCO. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$ .

Por otro lado, el daño por dosis de radiación absorbida en el T3'Cu también fue mínimo y la ocupación varió desde 1.00 (*Tth*-MCO-C1) a 0.94 (*Tth*-MCO-C8). Sin embargo, el daño por dosis de

radiación absorbida en el T3Cu fue considerable, incluso, la ocupación de este átomo fue de 0.43 en la *Tth*-MCO-C1, la mitad de la ocupación del T3'Cu para la misma dosis (**Figura 37**). Esta susceptibilidad del T3Cu tiene sentido, ya que como se observó en la Figura 31, este átomo está al final de la ruta de transferencia electrónica desde el T1Cu-Cys<sup>445</sup>-His<sup>444</sup>-T3Cu, por lo que el daño por dosis de radiación absorbida no es equivalente al daño que sufre el T3'Cu, átomo que no está implicado en esta ruta de transferencia desde el T1Cu al CTC.



**Figura 37. a-c)** Efecto de la dosis de radiación absorbida sobre el centro binuclear T3Cu-T3'Cu en la *Tth*-MCO. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$ .

Interesantemente, el T2Cu ubicado en el inicio del canal de salida de las moléculas de H<sub>2</sub>O, producto de la reducción del O<sub>2</sub> en el CTC, así como el T3Cu ubicado al final de la ruta de

transferencia electrónica desde el T1Cu al CTC, sufrieron el mayor daño por dosis de radiación absorbida, lo cual se reflejó en la eliminación del primero de la estructura cristalográfica y la disminución considerable de la ocupación del segundo. Vale la pena resaltar a futuros autores, que un cálculo simple de la dosis de radiación absorbida durante la colecta de datos de difracción de oxidasas multicobre, evitaría ambigüedades respecto a los resultados bioquímicos, los cuales generalmente demuestran una holoenzima completa con todos los átomos de Cu distribuidos en los dos sitios activos y en contraste, la estructura cristalográfica final en algunas ocasiones presenta uno o más átomos de Cu eliminados o con ocupaciones parciales. Con un cálculo de dosis de radiación absorbida es posible determinar si estos átomos sufrieron daño durante la colecta de datos de difracción y se eliminaron de la estructura cristalográfica final, a pesar de estar presentes en el cristal.

Los datos estadísticos de las ocho estructuras compuestas *Tth*-MCO-C(1-8) están resumidos en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Datos estadísticos de la colecta de datos y afinamiento de las estructuras *Tth*-MCO-C(1-8) con diferente dosis de radiación absorbida.

Los valores en paréntesis corresponden a la última faja de resolución

Parámetros	<i>Tth</i> -MCO-C1	<i>Tth</i> -MCO-C2
<b>Colecta de datos</b>		
Grupo espacial	$C222_1$	$C222_1$
Celda unidad		
$a, b, c$ (Å)	93.6, 110.3, 96.3	93.7, 110.3, 96.3
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
Resolución (Å)	30.0-1.80 (1.90-1.80)	29.0-1.80 (1.90-1.80)
No. de reflexiones	174732	176253
No. de reflexiones únicas	44803 (6341)	45193 (6600)
Integridad (%)	96.5 (95.2)	97.7 (98.7)
$R_{merge}$ (%)	13.0 (28.0)	27.6 (40.1)
$I/\sigma(I)$	7.6 (4.2)	6.8 (3.5)
Multiplicidad	3.9 (4.0)	3.9 (3.8)
Unidad asimétrica	Un monómero	Un monómero
<b>Afinamiento</b>		
Resolución (Å)	30.0-1.80	29.0-1.80
$R_{work}/R_{free}$ (%)	14.7/17.4	15.4/18.9
No. de átomos		
Proteína	3798	3786
Ion/Ligando	134	125
Agua	500	516
Valores B (Å <sup>2</sup> )		
Proteína	12.1	12.0
Ion/Ligando	31.8	30.6
Agua	28.3	28.6
Total	14.6	14.5
Wilson <i>plot</i>	11.2	11.3
RMSD de la estereoquímica ideal		
Enlaces (Å)	0.01	0.01
Ángulos (°)	1.57	1.43
Error en las coordenadas cristalográficas (Å, <i>Maximum-Likelihood</i> )	0.17	0.18
Ramachandran (%)		
Regiones más favorecidas	97.6	96.9
Regiones permitidas	2.2	3.1
Regiones no permitidas	0.2	0.0

**Tabla 4.** Continuación

<b>Parámetros</b>	<b><i>Tth</i>-MCO-C3</b>	<b><i>Tth</i>-MCO-C4</b>
<b>Colecta de datos</b>		
Grupo espacial	<i>C</i> 222 <sub>1</sub>	<i>C</i> 222 <sub>1</sub>
Celda unidad		
<i>a, b, c</i> (Å)	93.6, 110.3, 96.3	93.5, 110.2, 96.3
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
Resolución (Å)	29.0-1.80 (1.90-1.80)	28.0-1.80 (1.90-1.80)
No. de reflexiones	151457	175957
No. de reflexiones únicas	44546 (6378)	45117 (6463)
Integridad (%)	96.9 (95.5)	97.6 (96.6)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	12.4 (29.6)	12.6 (30.0)
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )	7.8 (4.2)	8.1 (4.2)
Multiplicidad	3.4 (3.4)	3.9 (3.9)
Unidad asimétrica	Un monómero	Un monómero
<b>Afinamiento</b>		
Resolución (Å)	29.0-1.80	28.0-1.80
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	14.8/17.9	14.7/17.2
No. de átomos		
Proteína	3770	3763
Ion/Ligando	133	133
Agua	509	498
Valores B (Å <sup>2</sup> )		
Proteína	12.0	11.9
Ion/Ligando	31.3	31.3
Agua	28.8	28.2
Total	14.6	14.3
Wilson <i>plot</i>	11.2	11.2
RMSD de la estereoquímica ideal		
Enlaces (Å)	0.01	0.01
Ángulos (°)	1.39	1.40
Error en las coordenadas cristalográficas (Å, <i>Maximum-Likelihood</i> )	0.15	0.15
Ramachandran (%)		
Regiones más favorecidas	97.8	97.8
Regiones permitidas	2.2	2.2
Regiones no permitidas	0.0	0.0

Tabla 4. Continuación

Parámetros	<i>Tth-MCO-C5</i>	<i>Tth-MCO-C6</i>
<b>Colecta de datos</b>		
Grupo espacial	<i>C222</i> <sub>1</sub>	<i>C222</i> <sub>1</sub>
Celda unidad		
<i>a, b, c</i> (Å)	93.5, 110.2, 96.3	93.5, 110.2, 96.2
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
Resolución (Å)	30.0-1.80 (1.90-1.80)	29.0-1.80 (1.90-1.80)
No. de reflexiones	153500	173277
No. de reflexiones únicas	43857 (6385)	44430 (6520)
Integridad (%)	95.4 (95.5)	96.7 (97.8)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	13.6 (32.6)	13.4 (32.9)
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )	7.4 (4.0)	8.0 (4.1)
Multiplicidad	3.5 (3.5)	3.9 (3.9)
Unidad asimétrica	Un monómero	Un monómero
<b>Afinamiento</b>		
Resolución (Å)	30.0-1.80	29.0-1.80
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	14.8/18.2	14.9/17.9
No. de átomos		
Proteína	3746	3790
Ion/Ligando	133	131
Agua	543	512
Valores B (Å <sup>2</sup> )		
Proteína	11.9	12.5
Ion/Ligando	31.3	32.0
Agua	29.7	30.0
Total	14.7	15.1
Wilson <i>plot</i>	11.1	12.2
RMSD de la estereoquímica ideal		
Enlaces (Å)	0.01	0.01
Ángulos (°)	1.42	1.42
Error en las coordenadas cristalográficas (Å, <i>Maximum-Likelihood</i> )	0.17	0.18
Ramachandran (%)		
Regiones más favorecidas	97.8	97.5
Regiones permitidas	1.8	2.1
Regiones no permitidas	0.4	0.4

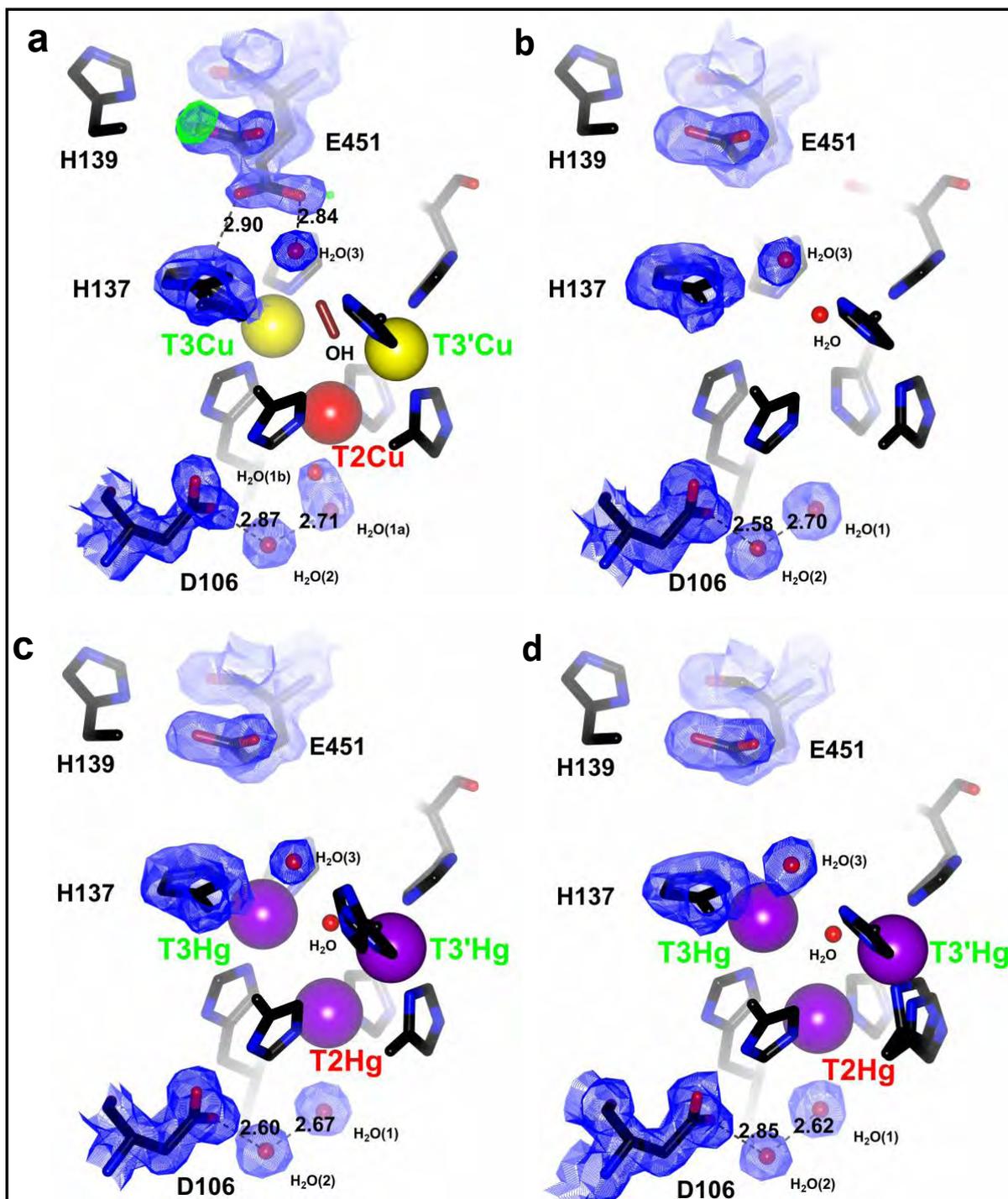
Tabla 4. Continuación

Parámetros	<i>Tth-MCO-C7</i>	<i>Tth-MCO-C8</i>
<b>Colecta de datos</b>		
Grupo espacial	<i>C</i> 222 <sub>1</sub>	<i>C</i> 222 <sub>1</sub>
Celda unidad		
<i>a, b, c</i> (Å)	93.7, 110.4, 96.4	93.7, 110.4, 96.5
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
Resolución (Å)	29.0-1.80 (1.90-1.80)	29.0-1.80 (1.90-1.80)
No. de reflexiones	175181	172277
No. de reflexiones únicas	44918 (6345)	45336 (6589)
Integridad (%)	97.2 (95.8)	97.9 (98.4)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	13.1 (32.4)	13.5 (31.2)
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )	8.1 (4.1)	7.9 (4.0)
Multiplicidad	3.9 (4.0)	3.8 (3.8)
Unidad asimétrica	Un monómero	Un monómero
<b>Afinamiento</b>		
Resolución (Å)	29.0-1.80	29.0-1.80
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	14.6/16.8	15.0/18.3
No. de átomos		
Proteína	3786	3762
Ion/Ligando	133	117
Agua	508	501
Valores B (Å <sup>2</sup> )		
Proteína	13.0	12.4
Ion/Ligando	32.5	31.1
Agua	31.0	29.4
Total	15.7	14.8
Wilson <i>plot</i>	12.9	11.9
RMSD de la estereoquímica ideal		
Enlaces (Å)	0.01	0.01
Ángulos (°)	1.41	1.43
Error en las coordenadas cristalográficas (Å, <i>Maximum-Likelihood</i> )	0.17	0.19
Ramachandran (%)		
Regiones más favorecidas	97.6	97.4
Regiones permitidas	2.0	2.2
Regiones no permitidas	0.4	0.4

## IX.6. Mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O en la *Tth*-MCO

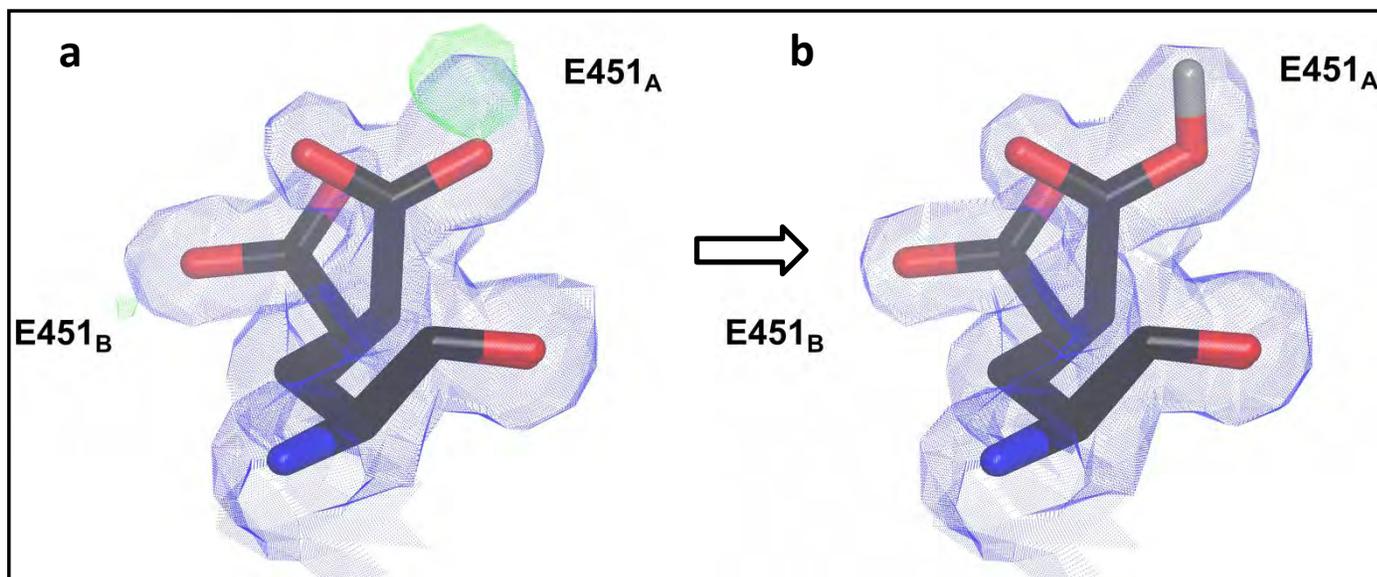
Para que tenga lugar la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O se necesita del trabajo conjunto de dos residuos ácidos ubicados estructuralmente en la segunda esfera de coordinación del CTC de la *Tth*-MCO: Glu<sup>451</sup> y Asp<sup>106</sup>, equivalentes a los residuos ácidos reportados previamente como responsables del mecanismo de transferencia de protones al CTC en las oxidasas multicobre CotA (Glu<sup>498</sup>/Asp<sup>116</sup>), CueO (Glu<sup>506</sup>/Asp<sup>112</sup>) y Fet3p (Glu<sup>487</sup>/Asp<sup>94</sup>) (Bento *et al.*, 2005; Augustine *et al.*, 2007; Kataoka *et al.*, 2009; Bento *et al.*, 2010; Figura 4).

En estado cristalino, tanto protones como electrones se generan principalmente por la radiólisis de las moléculas de H<sub>2</sub>O del cristal durante la colecta de datos de difracción de rayos X (Garman, 2010). Sin embargo, mientras que los 4 e<sup>-</sup> necesarios para la reacción en el CTC de la *Tth*-MCO: O<sub>2</sub> + 4 H<sup>+</sup> + 4 e<sup>-</sup> → 2 H<sub>2</sub>O se transportan por la ruta de transferencia electrónica: T1Cu-Cys<sup>445</sup>-His<sup>444</sup>-T3Cu (Figura 31), los 4 H<sup>+</sup> estequiométricamente necesarios en la reacción se transfieren con la asistencia de un único residuo: el Glu<sup>451</sup>. Por otro lado, a pesar de que el residuo Asp<sup>106</sup> no está implicado en la transferencia de H<sup>+</sup> al CTC, está demostrado que desempeña un papel importante en la estabilización de las especies OH<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O coordinadas al T2Cu, las cuales se observan en distintos estados e intermediarios de reducción del O<sub>2</sub> (Bento *et al.*, 2005; Augustine *et al.*, 2007; Kataoka *et al.*, 2009; Bento *et al.*, 2010; Figura 2). Estas especies OH<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O interactúan con el Asp<sup>106</sup> vía puentes de hidrógeno con una molécula de H<sub>2</sub>O estructural (Figuras 2-4). Interesantemente, el Glu<sup>451</sup> en la estructura de la *Tth*-MCO se observó en dos conformaciones con un pico positivo de densidad electrónica (**Figura 38a**) que se explica al modelar un átomo de hidrógeno (H), pasando del grupo funcional carboxilato (R-COO<sup>-</sup>) (**Figura 39a**) al grupo funcional carboxilo (R-COOH) (**Figura 39b**) en la cadena lateral de la conformación Glu<sup>451</sup><sub>A</sub> (ocupación de 0.56; Figura 39a) alejada del CTC. De hecho, ésta es la primera evidencia estructural que se tiene a la fecha del mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del O<sub>2</sub>. Por su parte, la conformación Glu<sup>451</sup><sub>B</sub> (ocupación de 0.44; Figura 39a), cercana al CTC y encargada de entregar los H<sup>+</sup> necesarios para la reducción del O<sub>2</sub>, sólo conserva un pico positivo de densidad electrónica ínfimo (Figura 38a y 39a), lo que indica que gran parte de la población de H<sup>+</sup> en la conformación Glu<sup>451</sup><sub>A</sub> se entregaron al CTC en la conformación Glu<sup>451</sup><sub>B</sub>, así: R-COOH (Glu<sup>451</sup><sub>A</sub>) → R-COO<sup>-</sup> (Glu<sup>451</sup><sub>B</sub>) + H<sup>+</sup>. De hecho, el pico positivo de densidad electrónica en la conformación Glu<sup>451</sup><sub>B</sub> fue tan sutil, que no se observó nuevamente después de modelar el grupo R-COOH en la conformación Glu<sup>451</sup><sub>A</sub> (Figura 39b), confirmando la hipótesis anterior.



**Figura 38.** Mecanismo de transferencia de protones entre el Glu<sup>451</sup> y el CTC. **a)** *Tth*-MCO, **b)** apo-*Tth*-MCO, **c)** Hg-*Tth*-MCO y **d)** Hg-*Tth*-MCO-2h. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a 1  $\sigma$  y el mapa  $F_o - F_c$  a 3.5  $\sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

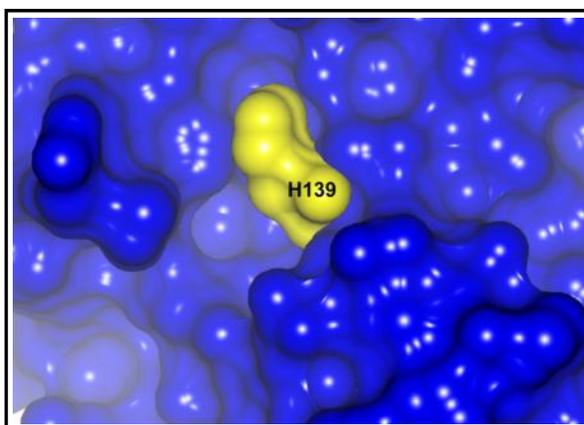
La determinación tridimensional de las estructuras inactivas para la reducción del  $O_2$ , apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h, fue determinante en el planteamiento del mecanismo de transferencia de protones de la *Tth*-MCO. De hecho, el residuo Glu<sup>451</sup> en estas tres estructuras inactivas está desprotonado y se observó en una sola conformación, sin picos positivos de densidad electrónica (**Figura 38b-d**), lo que indica naturalmente que sólo cuando la enzima activa *Tth*-MCO contiene los 4 átomos de Cu, el mecanismo de transferencia de protones tiene lugar.



**Figura 39.** Dos conformaciones (Glu<sup>451A</sup> y Glu<sup>451B</sup>) del residuo Glu<sup>451</sup> que participa en el mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del  $O_2$  en el CTC de la *Tth*-MCO. **a)** Pico positivo de densidad electrónica en la conformación Glu<sup>451A</sup>, alejada del CTC, sobre el grupo funcional carboxilato ( $R-COO^-$ ) de la cadena lateral. **b)** Interpretación del pico positivo de densidad electrónica en (a) al modelar un grupo funcional carboxilo ( $R-COOH$ ) en la cadena lateral de la conformación Glu<sup>451A</sup>. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$  y el mapa  $F_o - F_c$  a  $3.5 \sigma$ .

En la Figura 38a se observa que la conformación Glu<sup>451B</sup> transfiere probablemente los  $H^+$  al CTC vía dos rutas: (i) His<sup>137</sup> (dos conformaciones) o (ii) molécula  $H_2O$  (representada como  $H_2O(3)$ ). Sin embargo, las distancias de enlace:  $[His^{137} \leftarrow (2.90 \text{ \AA}) Glu^{451B} (2.84 \text{ \AA}) \rightarrow H_2O(3)]$  no indican una ruta preferida de transferencia de  $H^+$ . A pesar de esto, está reportado que la vía más probable es por medio de la molécula de  $H_2O(3)$  (Bento *et al.*, 2005; Augustine *et al.*, 2007; Kataoka *et al.*, 2009; Bento *et al.*, 2010) (Figura 38a), interpretación natural, ya que en trabajos previos con otras oxidasas multicobre no se observó la doble conformación en los residuos equivalentes al Glu<sup>451</sup> e His<sup>137</sup>.

Por otro lado, es probable que la conformación Glu<sup>451</sup><sub>A</sub> (Figura 39b), alejada del CTC, reciba los H<sup>+</sup> para la reducción del O<sub>2</sub> en el CTC vía: (i) gradiente de protones desde el T1Cu generado por la oxidación de moléculas de sustrato (en solución); (ii) gradiente de protones formado por radiólisis de las moléculas de H<sub>2</sub>O del cristal durante la colecta de datos cristalográficos (estado cristalino) o (iii) His<sup>139</sup> expuesta al solvente. La última vía es estructuralmente interesante ya que la His<sup>139</sup> está completamente expuesta al solvente (**Figura 40**), a una distancia de puente de hidrógeno (2.81 Å) en la *Tth*-MCO, con el oxígeno del grupo carboxilo que presenta el pico positivo de densidad electrónica en la conformación Glu<sup>451</sup><sub>A</sub> y por lo tanto, podría intervenir en la ruta de transferencia de protones: His<sup>139</sup> → Glu<sup>451</sup><sub>A</sub> → Glu<sup>451</sup><sub>B</sub> → His<sup>137</sup> / H<sub>2</sub>O(3) → CTC.



**Figura 40.** Diagrama de superficie molecular de la *Tth*-MCO en donde se observa el residuo His<sup>139</sup> expuesto al solvente.

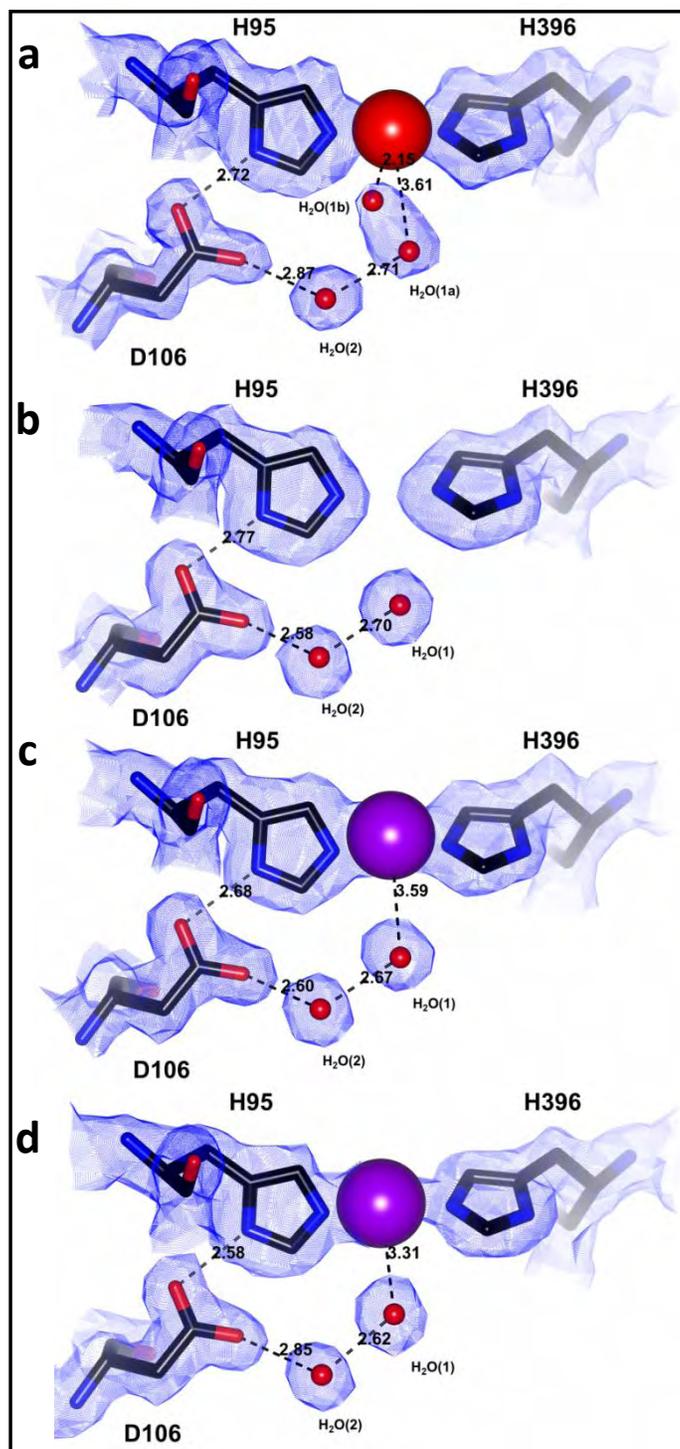
Sin embargo, la His<sup>139</sup> no está conservada en la familia de las oxidasas multicobre. Por ejemplo, se conserva en CueO con la His<sup>145</sup> equivalente, pero no en CotA y Fet3p, las cuales tienen los residuos Met<sup>157</sup> y Asp<sup>130</sup> en esta misma posición, respectivamente (Figura 4). Por lo que la ruta de protonación del Glu<sup>451</sup> en la conformación Glu<sup>451</sup><sub>A</sub> es realmente difícil de determinar con base únicamente en estos experimentos cristalográficos.

Aunque la mayoría de estados e intermediarios de la reducción del O<sub>2</sub> presentan una molécula de H<sub>2</sub>O coordinada al T2Cu, entre ellos el ER, particularmente estable en solución y el cual se mantiene sin problema en ausencia de sustrato, es importante resaltar que el IN presenta un OH<sup>-</sup> en esta misma posición (Figura 2). Sin embargo, la alta velocidad de decaimiento del IN al ER o de reducción al ETR en el ciclo catalítico, tanto en solución como en estado cristalino, limita las posibilidades de obtener una estructura cristalográfica con el OH<sup>-</sup> coordinado al T2Cu y hace que este intermediario sea particularmente difícil de caracterizar. Interesantemente, cuando se modeló

una molécula de H<sub>2</sub>O (**Figura 41a**; H<sub>2</sub>O(1a)) coordinada al T2Cu en la estructura cristalográfica de la *Tth*-MCO se observó adicionalmente un pico positivo de densidad electrónica en la posición adyacente, que se modeló como una segunda molécula de H<sub>2</sub>O (Figura 41a; H<sub>2</sub>O(1b)) a una distancia de 1.81 Å. La primera molécula de H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O(1a)) presenta una distancia de enlace de coordinación H<sub>2</sub>O-T2Cu de 3.61 Å en la *Tth*-MCO, mientras que la segunda molécula de H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O(1b)) presenta una distancia de enlace de coordinación OH-T2Cu de 2.15 Å.

Este resultado indica que la estructura de la *Tth*-MCO presenta una combinación de poblaciones de OH/H<sub>2</sub>O coordinadas al T2Cu, generadas a partir de cada uno de los ciclos catalíticos de reducción del O<sub>2</sub> durante la colecta de datos de difracción de rayos X. Es importante notar en la Figura 41, que el residuo Asp<sup>106</sup> estabiliza las especies OH/H<sub>2</sub>O coordinadas al T2Cu vía puentes de hidrógeno con una molécula de H<sub>2</sub>O estructural (H<sub>2</sub>O(2)).

Por lo tanto, a pesar de que no se encontró una estructura cristalográfica con un OH coordinado al T2Cu como único ligando, correspondiente al IN, la evidencia estructural de la combinación de poblaciones OH/H<sub>2</sub>O coordinadas al T2Cu en la *Tth*-MCO demuestran el decaimiento en estado cristalino del IP al IN en la reducción del O<sub>2</sub> en el CTC durante la colecta de datos cristalográficos. También es interesante observar que en la misma posición sólo se observó una molécula de H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O(1)) en las estructuras inactivas para la reducción del O<sub>2</sub>: apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h (**Figura 41b-d**), lo cual es normal, ya que el decaimiento del IP al IN no se observa en estas formas estructurales, porque son totalmente inactivas tanto en solución, como en estado cristalino.



**Figura 41.** Residuo Asp<sup>106</sup> estabilizando las especies OH<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O coordinadas al T2Cu vía una molécula de H<sub>2</sub>O estructural. **a)** *Tth*-MCO, **b)** apo-*Tth*-MCO, **c)** Hg-*Tth*-MCO y **d)** Hg-*Tth*-MCO-2h. Las distancias mostradas en la figura están en Å. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1\sigma$ .

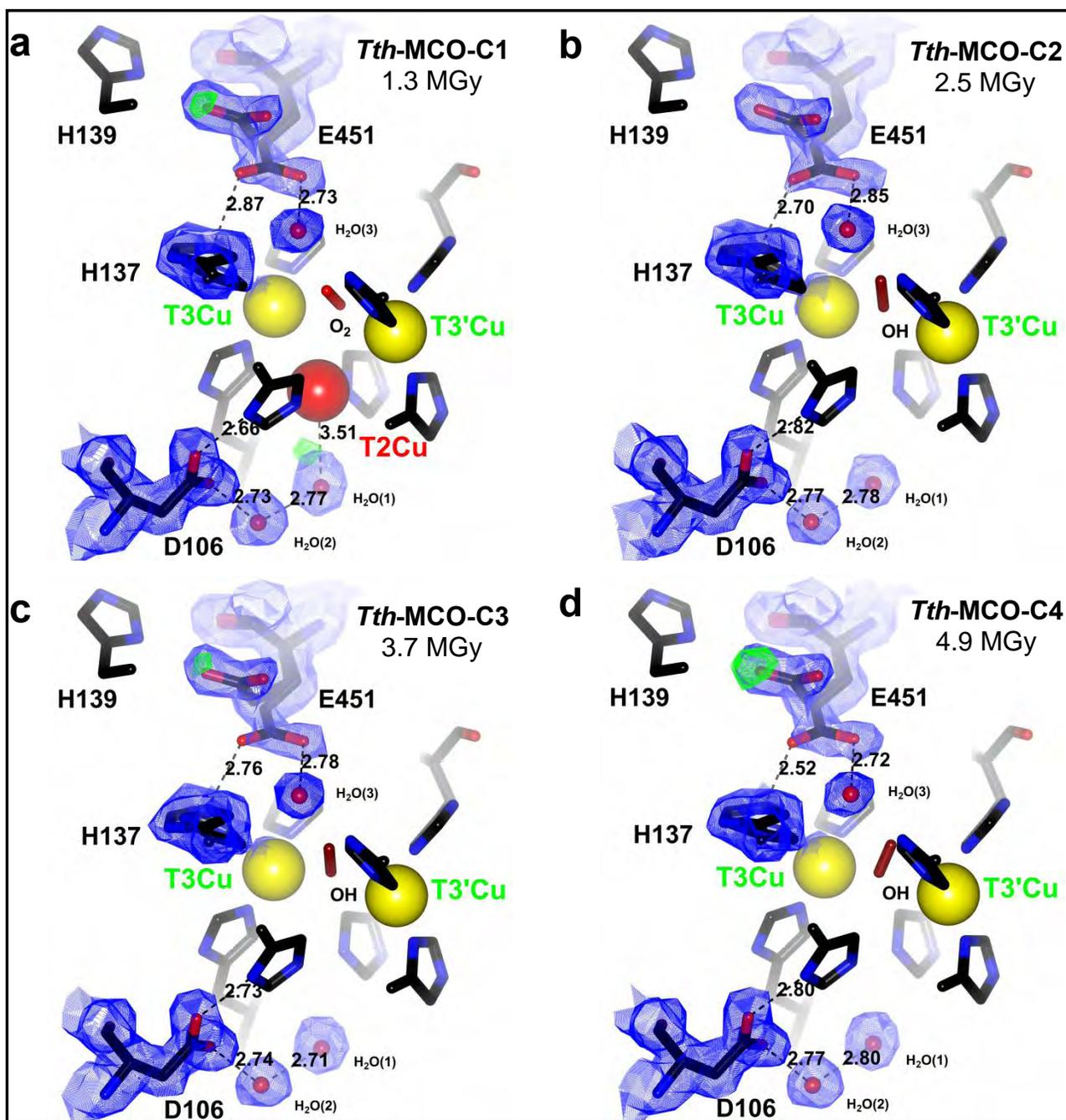
Adicionalmente, estas observaciones correlacionan con las estimaciones teóricas de  $pK_a$  para los residuos Glu<sup>451</sup> y Asp<sup>106</sup> de las estructuras cristalográficas: *Tth*-MCO<sup>41</sup>, apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h (**Tabla 5**). Estas estimaciones teóricas indican que al pH de 7.5 en el que se obtuvieron todos los cristales, el Glu<sup>451</sup> está totalmente protonado en la *Tth*-MCO y desprotonado en la apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h. Los mismos cálculos indican que el Asp<sup>106</sup> está desprotonado en todas las estructuras cristalográficas, y que por lo tanto no está involucrado en la transferencia de H<sup>+</sup> al CTC. Estas estimaciones teóricas correlacionan con los valores computacionales obtenidos recientemente por Bello *et. al.*, (2012), en donde se demostró que el Glu<sup>451</sup> de la *Tth*-MCO presenta un  $pK_a$  de 9.9.

**Tabla 5.** Estimación teórica del  $pK_a$  para los residuos Glu<sup>451</sup> y Asp<sup>106</sup> de las estructuras *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h.

	Glu <sup>451</sup> ( $pK_a$ )	Asp <sup>106</sup> ( $pK_a$ )
<b><i>Tth</i>-MCO</b>	~ 12.0	5.8
<b>Apo-<i>Tth</i>-MCO</b>	~ 0.0	6.9
<b>Hg-<i>Tth</i>-MCO</b>	~ 0.0	4.2
<b>Hg-<i>Tth</i>-MCO-2h</b>	~ 0.0	4.6

Por otro lado, el mecanismo de transferencia de protones también se observó en las estructuras compuestas *Tth*-MCO-C(1-8) (**Figura 42**), todas activas en estado cristalino. De hecho, en esta película tridimensional de la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O se observó sistemáticamente el mecanismo de transferencia de protones en cada uno de los estados de reacción.

<sup>41</sup> El valor teórico del  $pK_a$  para el residuo His<sup>139</sup> de la *Tth*-MCO discutido previamente es 4.0.



**Figura 42.** Mecanismo de transferencia de protones entre el Glu<sup>451</sup> y el CTC. **a-h)** Estructuras compuestas *Tth*-MCO-C(1-8) con diferente dosis de radiación absorbida (indicadas en cada panel).

El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$  y el mapa  $F_o - F_c$  a  $3.5 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

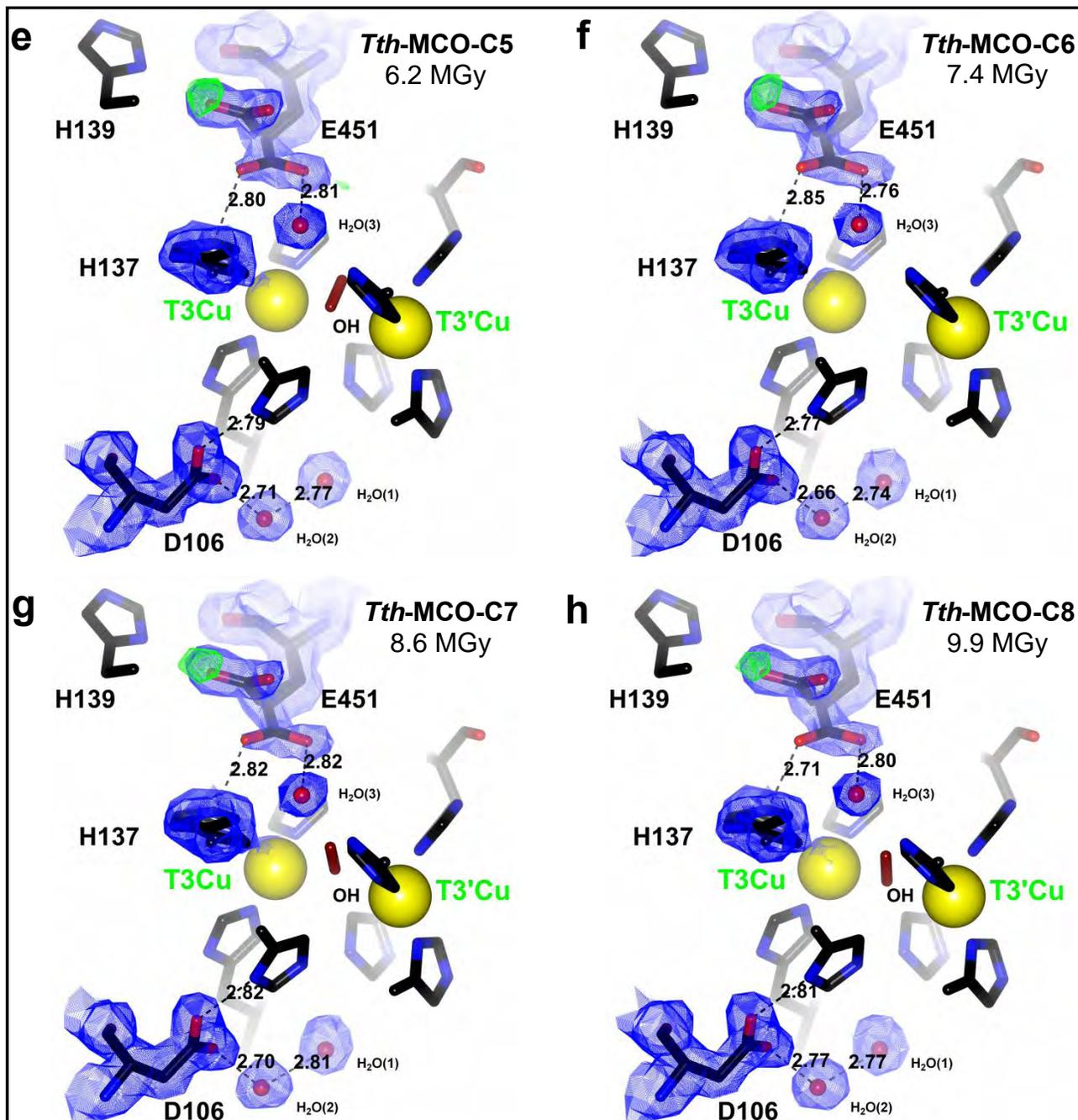


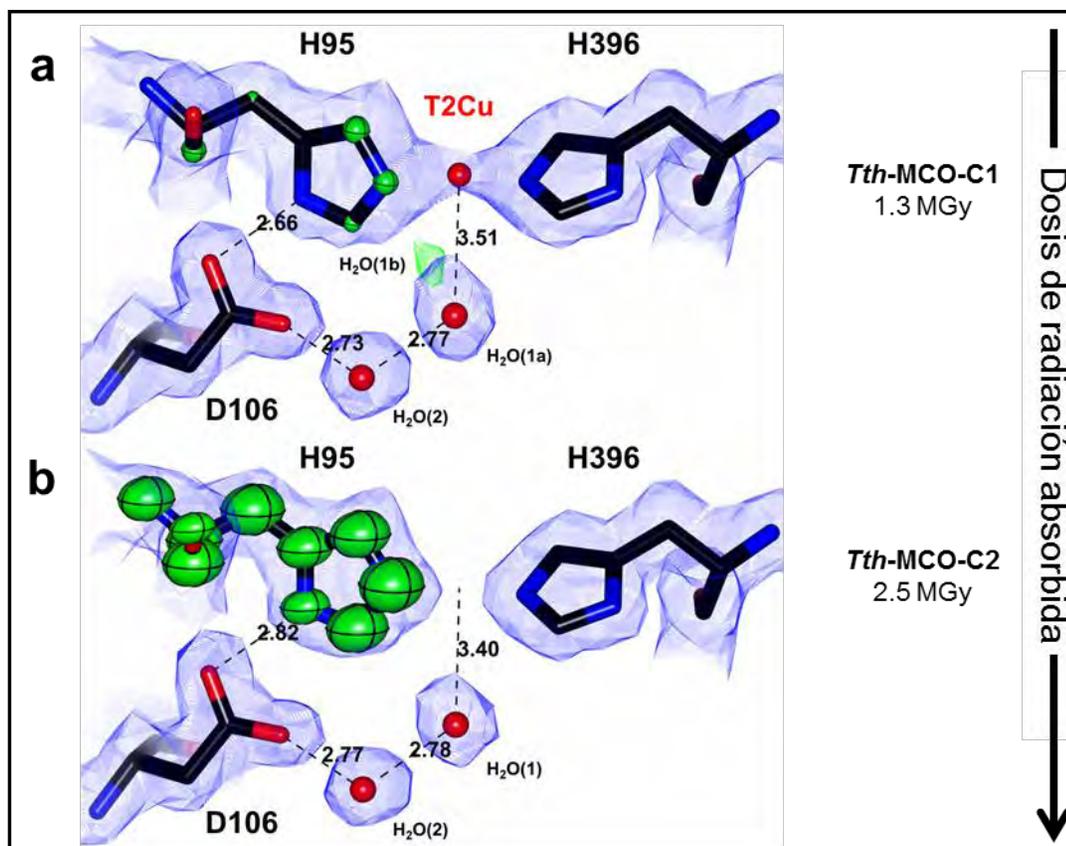
Figura 42. Continuación.

En la *Tth-MCO-C1* (1.3 MGy; estado O<sub>2</sub>) con la dosis de radiación absorbida más baja se observó nuevamente el pico positivo de densidad electrónica sobre el grupo funcional R-COOH en la conformación Glu<sup>451</sup><sub>A</sub>, alejada del CTC (Figura 42a). Nuevamente, las distancias de enlace en la *Tth-MCO-C1*: [His<sup>137</sup> ← (2.87 Å) Glu<sup>451</sup><sub>B</sub> (2.73 Å) → H<sub>2</sub>O(3)] no indican una ruta preferida de transferencia de protones entre el Glu<sup>451</sup><sub>B</sub> → CTC. Sin embargo, vale la pena resaltar que el estado O<sub>2</sub>

es el primer estado de reacción del ciclo catalítico en estado cristalino, por lo que para este momento de la colecta de datos de difracción, y a esta dosis de radiación absorbida, no se ha transferido una población de protones estadísticamente significativa al CTC, por lo que las distancias de enlace:  $[\text{His}^{137} \leftarrow (2.87 \text{ \AA}) \text{Glu}^{451\text{B}} (2.73 \text{ \AA}) \rightarrow \text{H}_2\text{O}(3)]$  no son relevantes en la determinación de la ruta preferida de transferencia de protones al CTC. Interesantemente, la distancia de enlace entre el  $\text{Glu}^{451\text{B}} - \text{N}_\epsilon\text{His}^{137}$  (conformación 2, alejada del T3Cu; Figura 31) se redujo de 2.87 Å en la *Tth*-MCO-C1 a 2.70 Å en la *Tth*-MCO-C2 (2.5 MGy; ER; Figura 42b), mientras que la distancia de enlace  $\text{Glu}^{451\text{B}} - \text{H}_2\text{O}(3)$  aumentó de 2.73 Å en la *Tth*-MCO-C1 a 2.85 Å en la *Tth*-MCO-C2, indicando que probablemente la ruta de transferencia de protones  $\text{Glu}^{451\text{B}} \rightarrow \text{CTC}$  en la *Tth*-MCO presente como vía preferida la  $\text{His}^{137} \rightarrow \text{CTC}$ . La ausencia del pico positivo de densidad electrónica en la conformación  $\text{Glu}^{451\text{A}}$  de la *Tth*-MCO-C2, alejada del CTC, indica que probablemente toda la población de protones de la *Tth*-MCO-C1 se transfirió al CTC para llevar a cabo la reducción del  $\text{O}_2$ , así: estado  $\text{O}_2$  (*Tth*-MCO-C1)  $\rightarrow$  IP  $\rightarrow$  IN  $\rightarrow$  ER (*Tth*-MCO-C2). Vale la pena resaltar que la *Tth*-MCO-C2 fue la única estructura cristalográfica determinada en este trabajo que presentó el residuo  $\text{Glu}^{451}$  con el grupo funcional R-COO<sup>-</sup> en la cadena lateral de ambas conformaciones, es decir, no protonado.

Por otro lado, el pico positivo de densidad electrónica en la conformación  $\text{Glu}^{451\text{A}}$  se observó nuevamente en las demás estructuras compuestas: *Tth*-MCO-C(3-8) (Figura 42c-h), y vale la pena resaltar que a excepción de la *Tth*-MCO-C6 (Figura 42f) y *Tth*-MCO-C7 (Figura 42g), la distancia de enlace entre la conformación  $\text{Glu}^{451\text{B}} - \text{N}_\epsilon\text{His}^{137}$  fue siempre menor que la distancia de enlace entre la conformación  $\text{Glu}^{451\text{B}} - \text{H}_2\text{O}(3)$ , indicando una vez más que la ruta de transferencia de protones  $\text{Glu}^{451\text{B}} \rightarrow \text{CTC}$  en la *Tth*-MCO probablemente presente como vía preferida la  $\text{His}^{137} \rightarrow \text{CTC}$ .

En relación a la región estructural correspondiente al residuo  $\text{Asp}^{106}$ , en la *Tth*-MCO-C1 se observó nuevamente un pico positivo de densidad electrónica ( $\text{H}_2\text{O}(1\text{b})$ ) adyacente a la molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{H}_2\text{O}(1\text{a})$ ) coordinada al T2Cu y estabilizada por el  $\text{Asp}^{106}$  vía puentes de hidrógeno con la molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  estructural ( $\text{H}_2\text{O}(2)$ ) (**Figura 43a**). Esto confirma los resultados observados para la *Tth*-MCO (Figura 41a), en donde se encontró una combinación de poblaciones OH<sup>-</sup>/ $\text{H}_2\text{O}$  coordinadas al T2Cu, demostrando el decaimiento del IP al IN. Interesantemente, a partir de la *Tth*-MCO-C2, en la que el T2Cu se eliminó por el exceso de dosis de radiación absorbida, este pico positivo de densidad electrónica no se observó nuevamente (Figura 43b-h). Este resultado tiene sentido ya que, como se dijo anteriormente, las estructuras compuestas *Tth*-MCO-C6 (ETR) y *Tth*-MCO-C(2-5, 7-8) (ER) presentan como característica estructural una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  coordinada al T2Cu (Figura 2).



**Figura 43.** Residuo Asp<sup>106</sup> estabilizando las especies OH/H<sub>2</sub>O coordinadas al T2Cu vía una molécula de H<sub>2</sub>O estructural. **a-h)** Estructuras compuestas *Tth*-MCO-C(1-8) con diferente dosis de radiación absorbida. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$  y el mapa  $F_o - F_c$  a  $3.5 \sigma$ .

Las distancias mostradas en la figura están en Å.

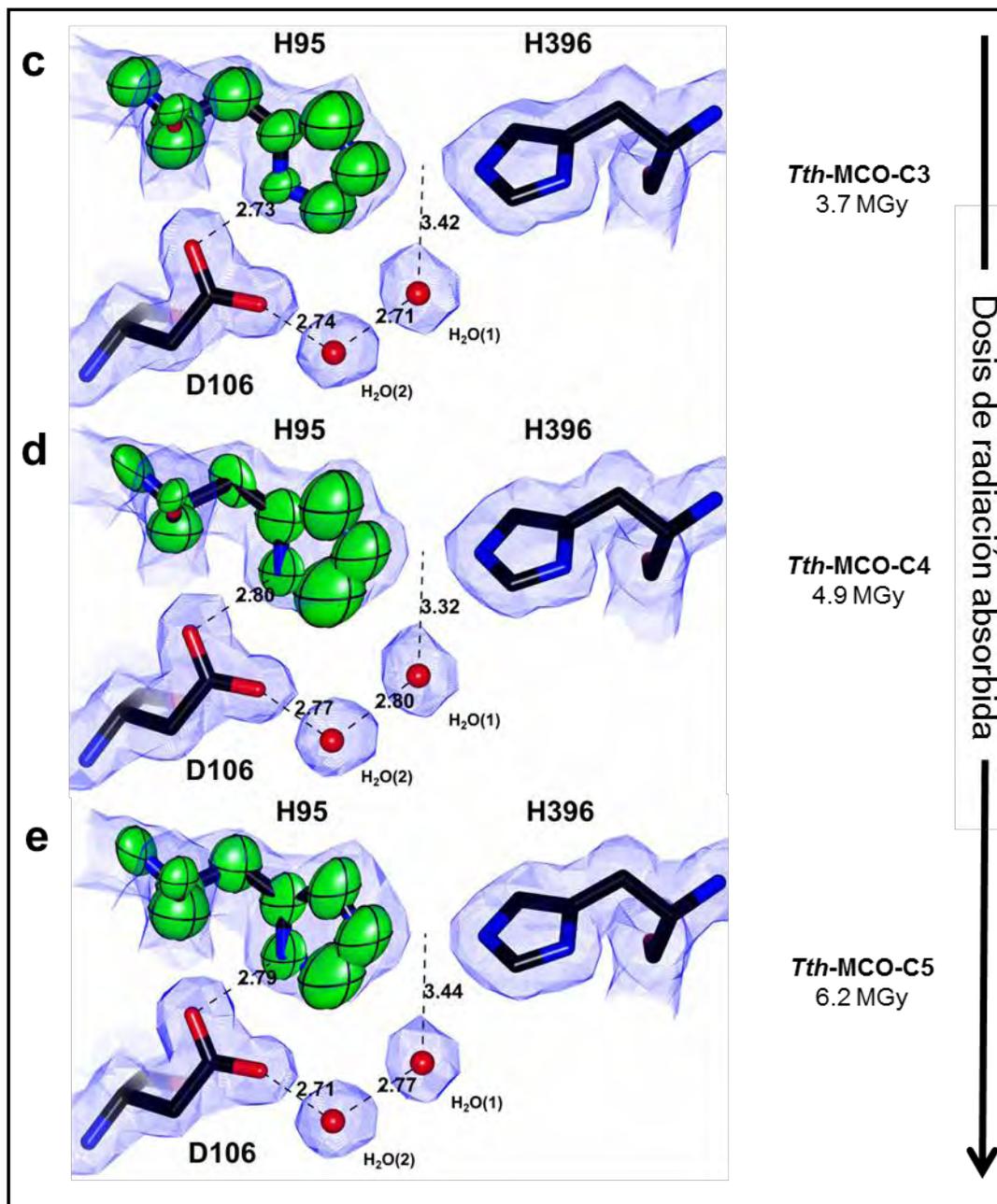
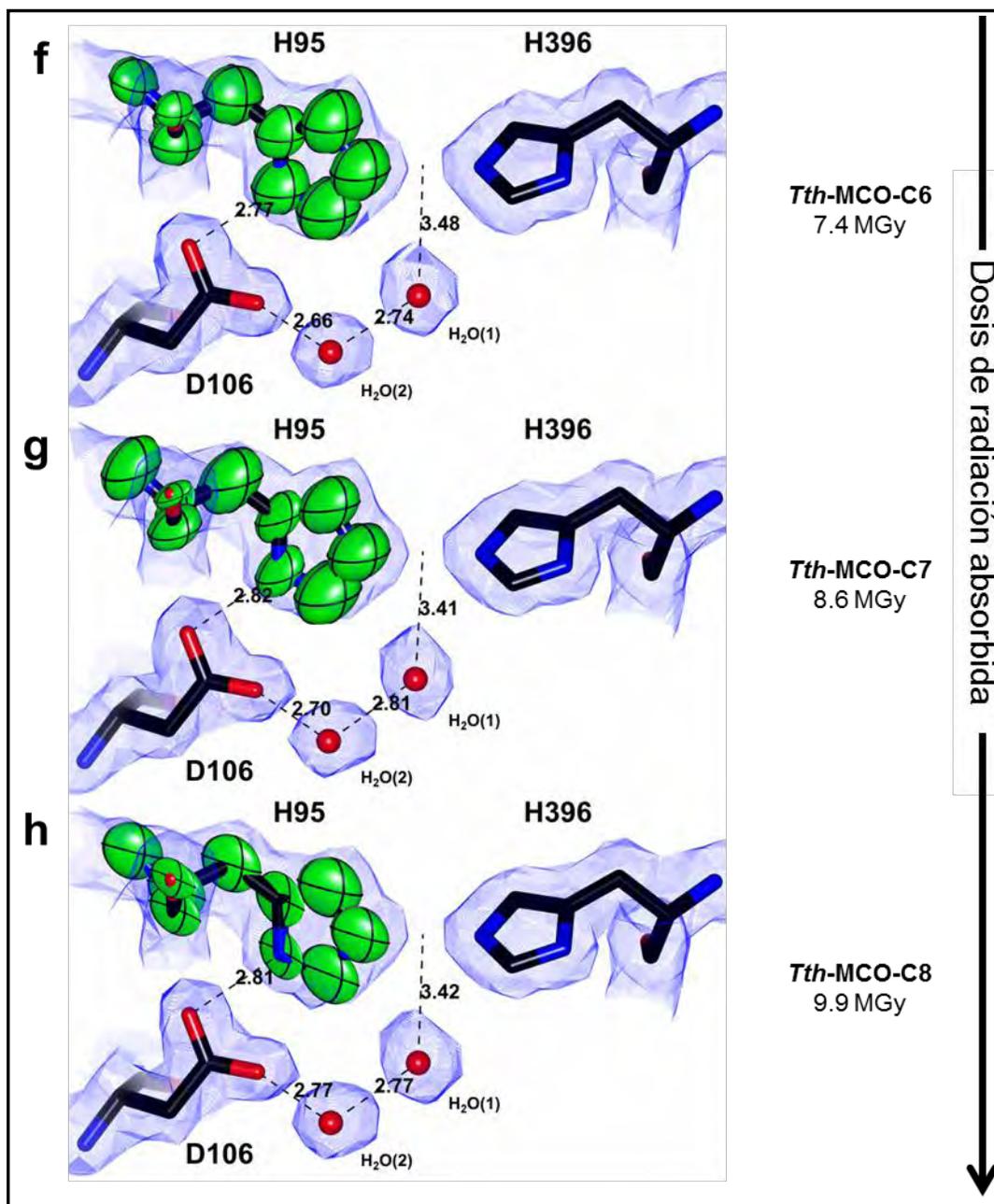


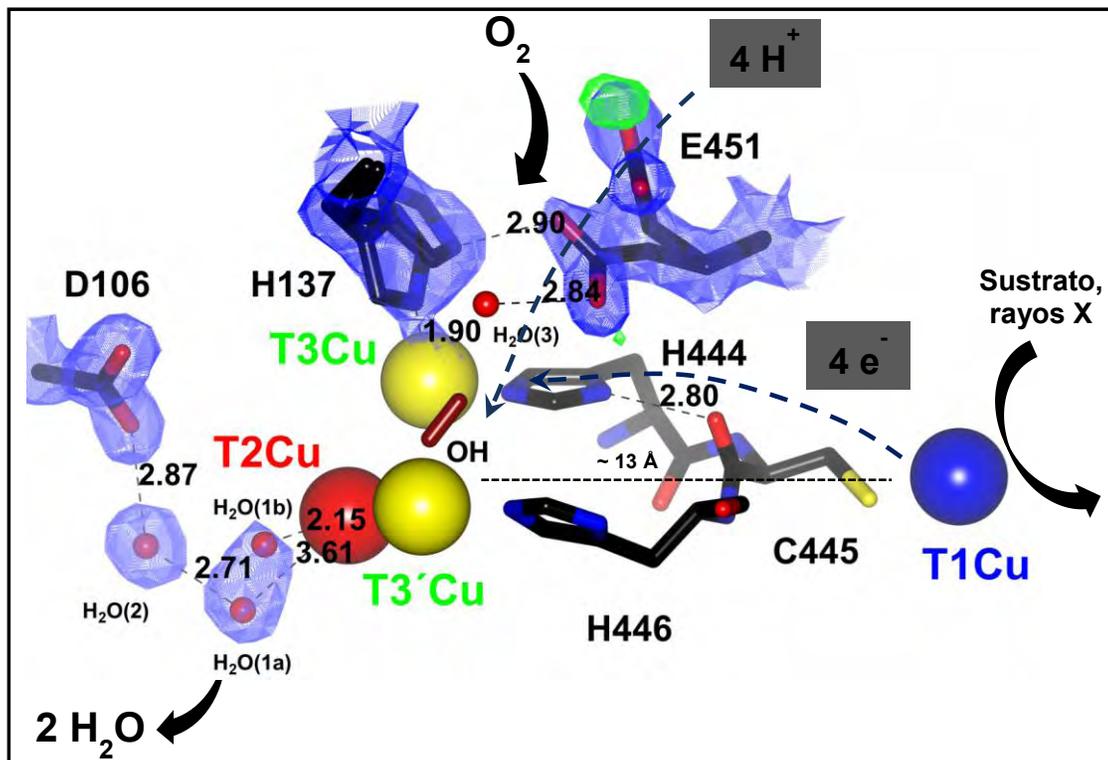
Figura 43. Continuación.



**Figura 43.** Continuación.

Así, con base en todos los resultados discutidos anteriormente, se propone la posible ruta de transferencia de electrones (vía T1Cu-Cys<sup>445</sup>-His<sup>444</sup>-T3Cu) y protones (vía Glu<sup>451</sup>) al CTC de la *Tth*-MCO para la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O (**Figura 44**). En esta propuesta también se incluyen algunas características estructurales como el canal de entrada del O<sub>2</sub> y el canal de salida de las moléculas de H<sub>2</sub>O producto del ciclo catalítico, así como también el papel que desempeña el residuo Asp<sup>106</sup>

estabilizando las especies OH-/H<sub>2</sub>O coordinadas al T2Cu por medio de puentes de hidrógeno con una molécula de H<sub>2</sub>O estructural.



**Figura 44.** Posible ruta de transferencia de electrones desde el T1Cu y protones desde el Glu<sup>451</sup> para la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O en el CTC de la *Tth*-MCO. Se observa el papel del Asp<sup>106</sup> estabilizando las especies OH-/H<sub>2</sub>O (representadas como H<sub>2</sub>O(1b)/(H<sub>2</sub>O(1a), respectivamente) coordinadas al T2Cu vía puentes de hidrógeno con una molécula de H<sub>2</sub>O estructural (H<sub>2</sub>O(2)). El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$  y el mapa  $F_o - F_c$  a  $3.5 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

## X. CONCLUSIONES

- Se purificó con alto grado de homogeneidad y cristalizó la oxidasa multicobre de *Thermus thermophilus* HB27: *Tth*-MCO, así como también tres formas inactivas de la enzima: apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h. Se determinaron las cuatro estructuras cristalográficas a alta resolución y se demostró que el plegamiento de la apo-*Tth*-MCO es independiente de la presencia de átomos de cobre en el medio.
- Se observó un motivo de horquilla  $\beta$  sobre el T1Cu en las cuatro estructuras cristalográficas: *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h, que podría estar implicado en la especificidad de sustrato en el sitio de oxidación, por analogía con el  $\beta$ -Hg coordinado en la horquilla  $\beta$  de las estructuras Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h.
- Por primera vez se generó una película cristalográfica de la reacción:  $O_2 + 4 H^+ + 4 e^- \rightarrow 2 H_2O$  en algún miembro de la familia de las oxidasas multicobre, mediante la determinación de ocho estructuras tridimensionales de la *Tth*-MCO, con diferente dosis de radiación absorbida. De esta manera se estudió sistemáticamente la reducción del  $O_2$  en estado cristalino, así como también el mecanismo de transferencia de protones asociado a esta reacción enzimática y se atraparon distintos estados de reacción:  $O_2$ , ER y ETR.
- Se observó el efecto coordinado de los residuos Glu<sup>451</sup> y Asp<sup>106</sup> al mecanismo de transporte de protones involucrado en la reducción del  $O_2$  a  $2 H_2O$  en el CTC de la *Tth*-MCO. Se demostró que el Glu<sup>451</sup> proporciona los protones necesarios para esta reacción enzimática, mientras que el Asp<sup>106</sup> estabiliza vía puentes de hidrógeno con una molécula de  $H_2O$  estructural a las especies OH<sup>-</sup>/ $H_2O$  coordinadas al T2Cu. El hecho de que los residuos ácidos implicados en este mecanismo se encuentren conservados en toda la familia de las oxidasas multicobre, extiende a esta familia el estudio particular de la *Tth*-MCO.
- Finalmente, se demostró el efecto que tiene la dosis de radiación absorbida sobre los centros de cobre de la *Tth*-MCO y se observó que el T2Cu es el átomo más lábil de todos, eliminándose completamente de la estructura cristalográfica a una dosis de radiación absorbida de 2.5 MGy. De esta manera se estableció el orden de labilidad de los átomos de cobre en la *Tth*-MCO: T2Cu > T3Cu > T3'Cu > T1Cu, y se demostró que algunos átomos de cobre pueden eliminarse de la estructura cristalográfica a pesar de estar presentes en el cristal.

## XI. PERSPECTIVAS

- **Determinar la movilidad de la horquilla  $\beta$  en solución y las implicaciones biológicas de este motivo estructural en la *Tth*-MCO:**

Para determinar la movilidad de la horquilla  $\beta$  de la *Tth*-MCO, el grupo de investigación del Dr. Enrique Rudiño Piñera está abordando el problema vía estudios de dinámica molecular de la *Tth*-MCO y apo-*Tth*-MCO. Interesantemente, el comportamiento de la horquilla  $\beta$  es diferente en la holo y apoenzima. En la primera, la presencia de los cuatro átomos de cobre distribuidos en los dos sitios activos estabiliza el motivo estructural, aumentando el tamaño del sitio de entrada del sustrato al T1Cu, mientras que en la segunda, inactiva, el motivo estructural de horquilla  $\beta$  se cierra sobre el sitio de T1Cu, demostrando la importancia de los átomos de cobre en el comportamiento de este motivo y demostrando que la horquilla  $\beta$  no bloquea en solución, la entrada del sustrato al sitio de oxidación en la holoenzima. Los resultados de esta investigación fueron aceptados en la revista PLoS ONE: "Molecular dynamics of a thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: Structural differences between the apo and holo forms" por: Martiniano Bello, Brenda Valderrama, Hugo Serrano-Posada and Enrique Rudiño-Piñera.

Sin embargo, estos resultados no son suficientes y es necesario demostrar este comportamiento experimentalmente, quizás vía RMN.

También sería interesante realizar experimentos bioquímicos respecto a la actividad de la *Tth*-MCO por Cu(I), con y sin horquilla  $\beta$ , eliminándola por mutación, así como también demostrar si la ausencia de la horquilla  $\beta$  aumenta la especificidad por sustratos orgánicos. También sería interesante mutar las 13 metioninas de la *Tth*-MCO, sin eliminar la horquilla  $\beta$ , y demostrar si la actividad por iones metálicos disminuye al no poder coordinar átomos adicionales de cobre.

- **Utilizar compuestos radioprotectores<sup>42</sup> para proteger a los sitios de cobre de la *Tth*-MCO durante la colecta de datos de difracción de rayos X:**

Se conoce ampliamente que el uso de radioprotectores como ascorbato o nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>), protege a los cristales de proteína del daño por dosis de radiación absorbida durante la colecta de datos cristalográficos. Así, estos compuestos atrapan a los productos de la radiólisis de las moléculas de agua, evitando que dañen regiones importantes de las proteínas, incluidos los centros metálicos (De la Mora *et al.*, 2011).

---

<sup>42</sup> También se les conoce como *scavengers*.

Sería interesante co-cristalizar a la *Tth*-MCO en presencia de radioprotectores o remojar cristales de la holoenzima con estos compuestos para disminuir el daño por dosis de radiación absorbida en los centros de cobre, específicamente en el lábil T2Cu. Así, este estudio se podría extender a otras metaloenzimas para proteger centros metálicos y aumentar la calidad de la información biológica obtenida a partir de las estructuras cristalográficas.

▪ **Determinar la vía por la que el residuo Glu<sup>451</sup> se protona en la conformación Glu<sup>451A</sup>.**

En este trabajo se demostró la protonación del Glu<sup>451</sup> y la importancia del mismo en el mecanismo de transferencia de protones al CTC, para la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O. Sin embargo, sería interesante determinar la ruta de protonación más probable del residuo Glu<sup>451</sup> desde el T1Cu, tanto en solución, como a partir de los protones producto de la radiólisis de las moléculas de agua durante la colecta de datos cristalográficos.

En este trabajo también se propuso la ruta: Glu<sup>451B</sup> → His<sup>137</sup> → CTC, sobre la ruta: Glu<sup>451B</sup> → H<sub>2</sub>O(3) → CTC, como la más probable para la transferencia de protones al CTC. Sin embargo, es necesario realizar otro tipo de experimentos para confirmar esta propuesta y determinar la ruta energéticamente favorable en la *Tth*-MCO. En una primera instancia, este punto podría abordarse por mutagénesis sitio dirigida o por estudios teóricos.

Desde un punto de vista cristalográfico, este problema también se puede abordar por medio de cristalografía de neutrones. Así, la estructura tridimensional de la *Tth*-MCO proporcionaría información de todos los hidrógenos de la estructura, incluidos los hidrógenos de las moléculas de agua del cristal. Sin embargo, existen muy pocas líneas de colecta alrededor del mundo, se necesitan cristales de la *Tth*-MCO con tamaño  $\geq 1 \text{ mm}^3$  y tiempos de colecta prolongados, entre otras especificaciones técnicas.

**XII. REFERENCIAS**

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. **2010**. *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallographica. D66*, 213-221.
- Augustine, A. J., Kjaergaard, C., Qayyum, M., Ziegler, L., Kosman, D. J., Hodgson, K. O., Hedman, B., and Solomon, E. I. **2010**. Systematic perturbation of the trinuclear copper cluster in the multicopper oxidases: the role of active site asymmetry in its reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O. *Journal of the American Chemical Society. 132*, 6057-6067.
- Augustine, A. J., Quintanar, L., Stoj, C. S., Kosman, D. J., and Solomon, E. I. **2007**. Spectroscopic and kinetic studies of perturbed trinuclear copper clusters: the role of protons in reductive cleavage of the O-O bond in the multicopper oxidase Fet3p. *Journal of the American Chemical Society. 129*, 13118-13126.
- Bello, M., Valderrama, B., Serrano-Posada, H., and Rudiño-Piñera, E. **2012**. Molecular dynamics of a thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: structural differences between the apo and holo forms. *PLoS ONE*. Aceptado.
- Bento, I., Martins, L., Lopes, G., Carrondo, M., and Lindley, P. **2005**. Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Transactions. 4*, 3507-3513.
- Bento, I., Silva, C. S., Chen, Z., Martins, L. O., Lindley, P. F., and Soares, C. M. **2010**. Mechanisms underlying dioxygen reduction in laccases. Structural and modelling studies focusing on proton transfer. *BMC Structural Biology. 10*, 1-14.
- Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szöke, H., Henriksen, A., and Hajdu, J. **2002**. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature. 417*, 463-468.
- Bradford, M. M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry. 72*, 248-254.
- Chayen, N. E., and Saridakis, E. **2008**. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature Methods. 5*, 147-153.
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. **2010a**. *MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallographica. D66*, 12-21.

- Chen, Z., Durão, P., Silva, C., Pereira, M., Todorovic, S., Hildebrandt, P., Bento, I., Lindley, P., and Martins, L. **2010b**. The role of Glu498 in the dioxygen reactivity of CotA-laccase from *Bacillus subtilis*. *Dalton Transactions*. **39**, 2875-2882.
- De la Mora, E., Carmichael, I., and Garman, E. F. **2011**. Effective scavenging at cryotemperatures: further increasing the dose tolerance of protein crystals. *Journal of Synchrotron Radiation*. **18**, 346-357.
- De la Mora, E., Lovett, J. E., Blanford, C. F., Garman, E. F., Valderrama, B., and Rudiño-Piñera, E. **2012**. Structural changes caused by radiation-induced reduction and radiolysis: the effect of X-ray absorbed dose in a fungal multicopper oxidase. *Acta Crystallographica*. **D68**, 564-577.
- Domínguez, A., Deive, F. J., Pastrana, L., Rúa, M. L., Longo, M. A., and Sanroman, M. A. **2010**. Thermostable lipolytic enzymes production in batch and continuous cultures of *Thermus thermophilus* HB27. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **33**, 347-354.
- Ducros, V., Brzozowski, A. M., Wilson, K. S., Brown, S. H., Østergaard, P., Schneider, P., Yaver, D. S., Pedersen, A. H., and Davies, G. J. **1998**. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Structural Biology*. **5**, 310-316.
- Ducros, V., Brzozowski, A. M., Wilson, K. S., Østergaard, P., Schneider, P., Svendsen, A., and Davies, G. J. **2001**. Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different 'type 2 Cu-depleted' isoforms. *Acta Crystallographica*. **D57**, 333-336.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. **2010**. Features and development of Coot. *Acta Crystallographica*. **D66**, 486-501.
- Enguita, F. J., Martins, L. O., Henriques, A. O., and Carrondo, M. A. **2003**. Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component. *Journal of Biological Chemistry*. **278**, 19416-19425.
- Evans, P. **2006**. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallographica*. **D62**, 72-82.
- Felsenfeld, G. **1960**. The determination of cuprous ion in copper proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **87**, 247-251.
- Fraterrigo, T. L., Miller, C., Reinhammar, B., and McMillin, D. R. **1999**. Which copper is paramagnetic in the type 2/type 3 cluster of laccase? *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. **4**, 183-187.
- Garman, E. F. **2010**. Radiation damage in macromolecular crystallography: what is it and why should we care? *Acta Crystallographica*. **D66**, 339-351.

- Gordon, J. C., Myers, J. B., Folta, T., Shoja, V., Heath, L. S., and Onufriev, A. **2005**. H<sup>++</sup>: a server for estimating pK<sub>a</sub>s and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Research*. **33**, W368-W371.
- Grass, G., and Rensing, C. **2001**. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **286**, 902-908.
- Gulloto, A., Branciamore, S., Duchi, I., Pareja, M. F., Randazzo, D., Tilli, S., Giardina, P., Sannia, G., Scozzafava, A. and Briganti, F. **2008**. Combined action of a bacterial monooxygenase and a fungal laccase for the biodegradation of mono- and poly-aromatic hydrocarbons. *Bioresource Technology*. **99**, 8353-8359.
- Hakulinen, N., Kruus, K., Koivula, A., and Rouvinen, J. **2006**. A crystallographic and spectroscopic study on the effect of X-ray radiation on the crystal structure of *Melanocarpus albomyces* laccase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **350**, 929-934.
- Henne, A., Brüggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R., Jacobi, C., Starkuviene, V., Schlenczeck, S., Dencker, S., Huber, R., Klenk, H-P., Kramer, W., Merkl, R., Gottschalk, G., and Fritz, H-J. **2004**. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nature Biotechnology*. **22**, 547-553.
- Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R., and Kües, U. **2006**. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *The FEBS Journal*. **273**, 2308-2326.
- Hullo, M.-F., Moszer, I., Danchin, A., and Martin-Verstraete, I. **2001**. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Journal of Bacteriology*. **183**, 5426-5430.
- Jacob, C., Giles, G. I., Giles, N. M., and Sies, H. **2003**. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angewandte Chemie*. **42**, 4742-4758.
- Kabsch, W. **2010**. XDS. *Acta Crystallographica*. **D66**, 125-132.
- Kataoka, K., Komori, H., Ueki, Y., Konno, Y., Kamitaka, Y., Kurose, S., Tsujimura, S., Higuchi, Y., Kano, K., Seo, D., and Sakurai, T. **2007**. Structure and function of the engineered multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli*-deletion of the methionine-rich helical region covering the substrate-binding site. *Journal of Molecular Biology*. **373**, 141-152.
- Kataoka, K., Sugiyama, R., Hirota, S., Inoue, M., Urata, K., Minagawa, Y., Seo, D., and Sakurai, T. **2009**. Four-electron reduction of dioxygen by a multicopper oxidase, CueO, and roles of

- Asp<sup>112</sup> and Glu<sup>506</sup> located adjacent to the trinuclear copper center. *Journal of Biological Chemistry*. **284**, 14405-14413.
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., and Alcalde, M. **2008**. Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*. **7**, 1-17.
  - Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S., and Perrakis, A. **2008**. Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using *ARP/wARP* version 7. *Nature Protocols*. **3**, 1171-1179.
  - Lee, S.-K., George, S. D., Antholine, W. E., Hedman, B., Hodgson, K. O., and Solomon, E. I. **2002**. Nature of the intermediate formed in the reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. *Journal of the American Chemical Society*. **124**, 6180-6193.
  - Liu, X., Gillespie, M., Ozel, A. D., Dikici, E., Daunert, S., and Bachas, L. G. **2011**. Electrochemical properties and temperature dependence of a recombinant laccase from *Thermus thermophilus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **399**, 361-366.
  - Macedo, S., Pechlaner, M., Schmid, W., Weik, M., Sato, K., Dennison, C., and Djinović-Carugo, K. **2009**. Can soaked-in scavengers protect metalloprotein active sites from reduction during data collection? *Journal of Synchrotron Radiation*. **16**, 191-204.
  - Martins, L. O., Soares, C. M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H., and Henriques, A. O. **2002**. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biological Chemistry*. **277**, 18849-18859.
  - Mayer, A. F, and Staples, R. C. **2002**. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. **60**, 551-565.
  - McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. **2007**. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*. **40**, 658-674.
  - McNicholas, S., Potterton, E., Wilson, K. S., and Noble, M. E. M. **2011**. Presenting your structures: the *CCP4mg* molecular-graphics software. *Acta Crystallographica*. **D67**, 386-394.
  - Miyazaki, K. **2005**. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles*. **9**, 415-425.
  - Moreno, A. **2005**. Crecimiento de cristales de biomoléculas. *Sociedad Mexicana de Cristalografía*, A. C. México, 1-70.

- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., and Yaropolov, A. I. **2007**. "Blue" laccases. *Biochemistry (Moscow)*. **72**, 1136-1150.
- Murray, J. W., Garman, E. F., and Ravelli, R. B. G. **2004**. X-ray absorption by macromolecular crystals: the effects of wavelength and crystal composition on absorbed dose. *Journal of Applied Crystallography*. **37**, 513-522.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., and Antranikian, G. **1999**. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **51**, 711-729.
- Oshima, T., and Imahori, K. **1974**. Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **24**, 102-112.
- Owen, R. L., Holton, J. M., Schulze-Briese, C., and Garman, E. F. **2009**. Determination of X-ray flux using silicon pin diodes. *Journal of Synchrotron Radiation*. **16**, 143-151.
- Owen, R. L., Rudiño-Piñera, E., and Garman, E. F. **2006**. Experimental determination of the radiation dose limit for cryocooled protein crystals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**, 4912-4917.
- Paithankar, K. S., Owen, R. L., and Garman, E. F. **2009**. Absorbed dose calculations for macromolecular crystals: improvements to *RADDOSE*. *Journal of Synchrotron Radiation*. **16**, 152-162.
- Palmer, A. E., Quintanar, L., Severance, S., Wang, T.-P., Kosman, D. J., and Solomon, E. I. **2002**. Spectroscopic characterization and O<sub>2</sub> reactivity of the trinuclear Cu cluster of mutants of the multicopper oxidase Fet3p. *Biochemistry*. **41**, 6438-6448.
- Pantazaki, A. A., Pritsa, A. A., and Kyriakidis, D. A. **2002**. Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **58**, 1-12.
- Quintanar, L., Stoj, C., Wang, T.-P., Kosman, D. J., and Solomon, E. I. **2005a**. Role of aspartate 94 in the decay of the peroxide intermediate in the multicopper oxidase Fet3p. *Biochemistry*. **44**, 6081-6091.
- Quintanar, L., Yoon, J., Aznar, C. P., Palmer, A. E., Andersson, K. K., Britt, R. D., Solomon, E. I. **2005b**. Spectroscopic and electronic structure studies of the trinuclear Cu cluster active site of the multicopper oxidase laccase: Nature of its coordination unsaturation. *Journal of the American Chemical Society*. **127**, 13832-13845.
- Roberts, S., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J., Tollin, G., Rensing, C., and Montfort, W. **2002**. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper

- oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**, 2766-2771.
- Roberts, S. A., Wildner, G. F., Grass, G., Weichsel, A., Ambrus, A., Rensing, C., and Montfort, W. R. **2003**. A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. *Journal of Biological Chemistry*. **278**, 31958-31963.
  - Rodríguez, S., and Toca, J. L. **2006**. Laccases in the textile industry. *Biotechnology Molecular Biology Review*. **1**, 115-120.
  - Sakasegawa, S.-I., Ishikawa, H., Imamura, S., Sakuraba, H., Goda, S., and Ohshima, T. **2006**. Bilirubin oxidase activity of *Bacillus subtilis* CotA. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**, 972-975.
  - Sakuraba, H., Koga, K., Yoneda, K., Kashima, Y., and Ohshima, T. **2011**. Structure of a multicopper oxidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Acta Crystallographica*. **F67**, 753-757.
  - Serrano-Posada, H., Valderrama, B., Stojanoff, V., and Rudiño-Piñera, E. **2011**. Thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of apo and holo forms. *Acta Crystallographica*. **F67**, 1595-1598.
  - Sharma, P., Goel, R., and Capalash, N. **2007**. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **23**, 823-832.
  - Silva, C. S., Damas, J. M., Chen, Z., Brissos, V., Martins, L. O., Soares, C. M., Lindley, P. F., and Bento, I. **2012**. The role of Asp116 in the reductive cleavage of dioxygen to water in CotA laccase: assistance during the proton-transfer mechanism. *Acta Crystallographica*. **D68**, 186-193.
  - Silva, C. S., Durão, P., Fillat, A., Lindley, P. F., Martins, L. O., and Bento, I. **2012**. Crystal structure of the multicopper oxidase from the pathogenic bacterium *Campylobacter jejuni* CGUG11284: characterization of a metallo-oxidase. *Metallomics*. **4**, 37-47.
  - Singh, S. K., Grass, G., Rensing, C., and Montfort, W. R. **2004**. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **186**, 7815-7817.
  - Singh, S. K., Roberts, S. A., McDevitt, S. F., Weichsel, A., Wildner, G. F., Grass, G. B., Rensing, C., and Montfort, W. R. **2011**. Crystal structures of multicopper oxidase CueO bound to copper(I) and silver(I): functional role of a methionine-rich sequence. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**, 37849-37857.
  - Solomon, E. I., Augustine, A. J., and Yoon, J. **2008**. O<sub>2</sub> reduction to H<sub>2</sub>O by the multicopper oxidases. *Dalton Transactions*. **9226**, 3921-3932.

- Solomon, E. I., Chen, P., Metz, M., Lee, S.-K., and Palmer, A. E. **2001**. Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. *Angewandte Chemie*. **40**, 4570-4590.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., and Machonkin, T. E. **1996**. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews*. **96**, 2563-2606.
- Vincent, K. A., Cracknell, J. A., Lenz, O., Zebger, I., Friedrich, B., and Armstrong, F. A. **2005**. Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**, 16951-16954.
- Wang, G-D., Li, Q-J., Luo, B., and Chen, X-Y. **2004**. *Ex planta* phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase. *Nature Biotechnology*. **22**, 893 – 897.
- Willner, I. **2002**. Biomaterials for sensors, fuel cells, and circuitry. *Science*. **298**, 2407-2408.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., and Wilson, K. S. **2011**. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica*. **D67**, 235–242.
- Yoon, J., Liboiron, B. D., Sarangi, R., Hodgson, K. O., Hedman, B., and Solomon, E. I. **2007**. The two oxidized forms of the trinuclear Cu cluster in the multicopper oxidases and mechanism for the decay of the native intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**. 13609-13614.
- Yoon, J., and Solomon, E. I. **2007**. Electronic structure of the peroxy intermediate and its correlation to the native intermediate in the multicopper oxidases: insights into the reductive cleavage of the O-O bond. *Journal of the American Chemical Society*. **129**, 13127-13136.
- Zheng, Z., Li, H., Li, L., and Shao, W. **2012**. Biobleaching of wheat straw pulp with recombinant laccase from the hyperthermophilic *Thermus thermophilus*. *Biotechnology Letters*. **34**, 541-547.
- Zhukhlistova, N. E., Zhukova, Yu. N., Lyashenko, A. V., Zaitsev, V. N., and Mikhaïlov, A. M. **2008**. Three-dimensional organization of three-domain copper oxidases: A review. *Crystallography Reports*. **53**, 92-109.

- ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Reacción general catalizada por una lacasa. Oxidación de *p*-difenoil acoplada a la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O. El O<sub>2</sub> es usado para regenerar la forma oxidada de la enzima y la actividad lacasa es característica de la *Tth*-MCO (Miyazaki, 2005).

**Figura 2.** Mecanismo de reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O en las oxidasas multicobre. Los residuos Glu<sup>451</sup> y Asp<sup>106</sup> de la *Tth*-MCO se encuentran en la segunda esfera de coordinación del CTC. El residuo Glu<sup>451</sup> es el encargado de donar los protones necesarios en el ciclo catalítico, mientras que el residuo Asp<sup>106</sup> estabiliza las especies OH-/H<sub>2</sub>O coordinadas al T2Cu. Figura tomada y modificada de Bento *et al.*, 2005 y Augustine *et al.*, 2010.

**Figura 3.** Residuos ácidos que participan en el mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O catalizada por una oxidasa multicobre. El residuo Glu<sup>451</sup> en el canal de entrada del O<sub>2</sub> y el residuo Asp<sup>106</sup> en el canal de salida de las moléculas de H<sub>2</sub>O pertenecen a la *Tth*-MCO (código PDB 2XU9). El estado O<sub>2</sub> se caracterizó por cristalografía (Bento *et al.*, 2005 (código PDB 1W6L); Hakulinen *et al.*, 2006 (código PDB 2IH8)).

**Figura 4.** Residuos ácidos que participan en el mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O catalizada por una oxidasa multicobre. **a)** CotA (código PDB 1W6L), **b)** CueO (código PDB 1KV7), **c)** Fet3p (código PDB 1ZPU).

**Figura 5.** Geometría del CTC de dos estructuras cristalográficas de la lacasa de *M. albomyces*. **a)** Estado O<sub>2</sub> presente en la estructura a baja dosis de radiación (código PDB 2IH8). **b)** ER con el OH- modelado como un oxígeno atómico en la estructura a alta dosis de radiación (código PDB 2IH9) (Hakulinen *et al.*, 2006). Las distancias mostradas en la figura están en Å.

**Figura 6.** Geometría del CTC. **a)** Estructura de la lacasa de *C. cinereus* con el T2Cu eliminado. Las His<sup>64</sup>-His<sup>399</sup> coordinan al T2Cu y se observa una conformación de la His<sup>399</sup> alejada del sitio T2 debido a la ausencia de este átomo en la estructura (código PDB 1A65; Ducros *et al.*, 1998). **b)** CTC completo en la estructura de la lacasa de *C. gallica* a baja dosis de radiación (0.6 MGy; código PDB 4A2E). Las His<sup>85</sup>-His<sup>418</sup> coordinan al T2Cu. La His<sup>418</sup>, equivalente a la His<sup>399</sup> en (a), se observa en dos conformaciones pero la baja dosis de radiación evita que el T2Cu se elimine por completo de la estructura cristalográfica (De la Mora *et al.*, 2012).

**Figura 7.** Estrategia multicristal de colecta de datos de 8 cristales de la *Tth*-MCO para construir *data sets* compuestos. La dosis de radiación absorbida es creciente entre  $0^\circ \rightarrow 96^\circ$  para cada uno de los ocho cristales. **a)** Cada cristal (1  $\rightarrow$  8) se rota  $12^\circ$  con relación al anterior antes de colectar los datos de difracción de rayos X para garantizar que cada bloque corresponda a una región distinta de cada uno de los cristales y de esta manera mejorar los valores estadísticos al combinar los datos. Para obtener la estructura *Tth*-MCO-C1 se integraron por separado cada uno de los bloques de  $0$ - $12^\circ$  entre H-S para obtener ocho archivos .mtz. **b)** Ocho estructuras compuestas *Tth*-MCO-C(1-8) con distinta dosis de radiación absorbida. Los ocho archivos .mtz entre H-S se combinan entre S-P para obtener un único archivo .mtz de  $96^\circ$  y así tener datos suficientes para determinar la estructura cristalográfica de la *Tth*-MCO-C1 en el grupo espacial  $C222_1$ .

**Figura 8. a)** Cromatograma del extracto bacteriano usando una columna de intercambio catiónico y gradiente lineal de  $0$ - $1\ M$  NaCl (línea roja) en 46 min a un flujo de  $2\ \text{mL}\ \text{min}^{-1}$ . **b)** SDS-PAGE de las fracciones obtenidas. Carriles 1-9: fracciones que migraron al peso molecular aproximado de la *Tth*-MCO a lo largo del pico cromatográfico. Carril 10: marcador de peso molecular (Fermentas).

**Figura 9. a)** Cromatograma de la *Tth*-MCO usando una columna de exclusión molecular y un flujo de  $1\ \text{mL}\ \text{min}^{-1}$ . **b)** SDS-PAGE de las fracciones obtenidas. Carriles 1 y 2 (30 y 40  $\mu\text{g}$  de la *Tth*-MCO, respectivamente): fracciones del mismo pico en (a) que migraron al peso molecular aproximado de la *Tth*-MCO. Carril 3: marcador de peso molecular (Fermentas).

**Figura 10.** Gel de isoelectroenfoque. Carril 1: 4  $\mu\text{g}$  de la *Tth*-MCO. Carril 2: marcadores de  $pI$  (Pharmacia).

**Figura 11. a)** Cromatograma del extracto bacteriano usando una columna de intercambio catiónico y gradiente lineal de  $0$ - $1\ M$  NaCl (línea roja) en 46 min a un flujo de  $2\ \text{mL}\ \text{min}^{-1}$ . **b)** SDS-PAGE de las fracciones obtenidas. Carril 1: marcador de peso molecular (Fermentas). Carril 2 (30  $\mu\text{g}$  de la apo-*Tth*-MCO): banda que migró al peso molecular esperado para la apo-*Tth*-MCO.

**Figura 12.** Espectro de UV-Visible de la oxidasa multicobre recombinante de *T. thermophilus* HB27 en  $20\ \text{mM}$  Tris pH 8.0. **a)** *Tth*-MCO ( $450\ \mu\text{M}$ ), **b)** apo-*Tth*-MCO ( $500\ \mu\text{M}$ ).

**Figura 13.** Curva de calibración de absorbancia (AU) vs [Cu] ( $\mu\text{M}$ ), utilizando  $\text{CuSO}_4$  como sustancia patrón y 2,2-biquinolina como agente quelante. El complejo organometálico Cu(I)-[2,2-biquinolina] absorbe a  $\lambda = 546\ \text{nm}$ .

**Figura 14. a)** Cristales de la *Tth*-MCO crecidos a 4 °C y concentración de proteína de 19.5 mg mL<sup>-1</sup>. **b)** dimensiones de ~ 25 x 100 x 250 μm de uno de los cristales en (a). Las fotografías se tomaron sin polarizador para observar el color real de los cristales

**Figura 15.** Diagrama de solubilidad de Ostwald-Miers para proteínas.

**Figura 16.** Cristales de la *Tth*-MCO crecidos a 4 °C en 0.1 M Hepes pH 7.5, concentración de proteína de 30 mg mL<sup>-1</sup> y diferentes porcentajes de MPD. **a)** Gota sedente, 60% (v/v) MPD, **b)** Gota colgante, 65% (v/v) MPD, **c)** Gota sedente, 70% (v/v) MPD, **d)** Micropuentes, 70% (v/v) MPD. Todas las fotografías se tomaron con la misma magnificación y sin polarizador para observar el color real de los cristales.

**Figura 17.** Cristales de la *Tth*-MCO obtenidos por la técnica de microsembrado en 0.1 M Hepes pH 7.5, 70% (v/v) MPD y concentración de proteína de 30 mg mL<sup>-1</sup> a 4 °C. **a)** Gota colgante, **b)** Gota sedente. Las fotografías se tomaron con la misma magnificación y sin polarizador para observar el color real de los cristales.

**Figura 18.** Cristales de la apo-*Tth*-MCO crecidos a 4 °C en 0.1 M Hepes pH 7.5, 70% (v/v) MPD y concentración de proteína de 30 mg mL<sup>-1</sup> en la modalidad de gota colgante. La fotografía se tomó sin polarizador para observar el color real de los cristales.

**Figura 19. a)** Imagen en blanco y negro tomada en la línea X6A del cristal de la *Tth*-MCO que difractó a 1.5 Å de resolución. **b)** Patrón de difracción a 1.5 Å de resolución de la *Tth*-MCO. **c)** Cambio de contraste de una parte de (b) para observar algunos puntos de difracción a alta resolución.

**Figura 20.** Espectro de fluorescencia del coeficiente de absorción lineal ( $\mu_{Cu}(E)$ ) vs energía de rayos X (eV) colectado en la línea X6A. Se determinó experimentalmente el pico de fluorescencia (Cu K) a  $\lambda = 1.3767$  Å (9003 eV) para los átomos de Cu nativos de la *Tth*-MCO.

**Figura 21.** Espectros de fluorescencia del coeficiente de absorción lineal ( $\mu(E)$ ) vs energía de rayos X (eV) colectados en la línea X6A para el cristal de la Hg-*Tth*-MCO. **a)** Se observan los tres bordes de absorción: [Hg  $L_{III}(1)$ :  $\lambda = 1.0085$  Å (12295 eV), Hg  $L_{III}(2)$ :  $\lambda = 1.0078$  Å (12304 eV) y Hg  $L_{III}(3)$ :  $\lambda = 1.0061$  Å (12325 eV)]. **b)** Se observa la ausencia del borde Cu K en el cristal de la Hg-*Tth*-MCO.

**Figura 22.** Gráficas de reflexión axial  $I/\sigma$  ( $I$ ) vs  $00l$  de cuatro *data sets*. **a)** *Tth*-MCO. **b)** *Tth*-MCO-SAD. **c)** apo-*Tth*-MCO. **d)** Hg-*Tth*-MCO. Todos los *data sets* se integraron en el grupo espacial  $C222$  con el objetivo de observar la reflexión axial en  $l$  ( $00l$ :  $l = 2n$ ). La presencia de un eje tornillo  $2_1$  se observa claramente en la gráfica y sustenta la selección del grupo espacial  $C222_1$ .

**Figura 23. a)** Estructura tridimensional por difracción de rayos X de la *Tth*-MCO a 1.5 Å de resolución (código PDB 2XU9). **b)** Diagrama topológico de la *Tth*-MCO (tomado y modificado de PDBsum). La escala de colores es la misma para los tres dominios en ambas figuras.

**Figura 24.** Estructuras tridimensionales determinadas por difracción de rayos X a 1.7 Å de resolución. **a)** apo-*Tth*-MCO (código PDB 2XUW). **b)** Hg-*Tth*-MCO (código PDB 2XVB). **c)** Hg-*Tth*-MCO-2h (código PDB 4AI7).

**Figura 25.** Horquilla  $\beta$  sobre el sitio del T1Cu de la *Tth*-MCO estabilizada por el mismo motivo estructural del vecino cristalográfico

**Figura 26.** Horquilla  $\beta$  sobre el sitio del T1Cu. **a)** *Tth*-MCO. **b)** apo-*Tth*-MCO. **c)** Hg-*Tth*-MCO. **d)** Hg-*Tth*-MCO-2h.

**Figura 27.** Estructura cristalográfica de CueO a 1.7 Å de resolución (código PDB 1N68; Roberts *et al.*, 2003). **a)** Hélice  $\alpha$  sobre el T1Cu en CueO, equivalente a la región estructural de la horquilla  $\beta$  en la *Tth*-MCO. **b)** Quinto átomo de Cu (rCu) coordinado en CueO. Las distancias mostradas en la figura están en Å.

**Figura 28. a-b)** Distribución de las metioninas en la *Tth*-MCO entre el punto máximo de la horquilla  $\beta$  y el T1Cu. **b-c)** Distribución de las metioninas entre la hélice  $\alpha$  y los alrededores del T1Cu en CueO (código PDB 1N68).

**Figura 29.** Canal de entrada del  $O_2$  (diámetro promedio de  $\sim 3.2$  Å) hacia el T3Cu (amarillo) y canal de salida (diámetro promedio de  $\sim 3.4$  Å) de las 2  $H_2O$  a partir del T2Cu (rojo) en la estructura de la *Tth*-MCO. Las esferas que se observan en cada uno de los canales corresponden a moléculas de  $H_2O$  observadas en la estructura cristalográfica.

**Figura 30.** Geometría del sitio T1 y el CTC. **a-b)** *Tth*-MCO. **c-d)** apo-*Tth*-MCO. **e-f)** Hg-*Tth*-MCO. **g-h)** Hg-*Tth*-MCO-2h. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

**Figura 31.** Transferencia electrónica desde el T1Cu al CTC en la *Tth*-MCO, por la ruta T1Cu-Cys<sup>445</sup>-His<sup>444</sup>-T3Cu entre el oxígeno del grupo C=O de la Cys<sup>445</sup> y el N<sub>δ</sub>His<sup>444</sup>. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

**Figura 32. a-h)** Estructuras cristalográficas *Tth*-MCO-C(1-8) a 1.8 Å de resolución con diferente dosis de radiación absorbida (1.3-9.9 MGy), obtenidas por la estrategia multicristal de colecta de datos.

**Figura 33.** Estado O<sub>2</sub> obtenido en la *Tth*-MCO-C1 con una dosis de radiación absorbida de 1.3 MGy. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

**Figura 34.** ETR obtenido en la *Tth*-MCO-C6 con una dosis de radiación absorbida de 7.4 MGy. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

**Figura 35.** Efecto de la dosis de radiación absorbida sobre el T2Cu en la *Tth*-MCO. **a)** Afinamiento isotrópico de la His<sup>95</sup>. **b-h)** Afinamiento de TLS de la His<sup>95</sup> para observar el movimiento anisotrópico de este residuo cuando pierde la coordinación del T2Cu. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

**Figura 36. a-c)** Efecto de la dosis de radiación absorbida sobre el T1Cu en la *Tth*-MCO. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$ .

**Figura 37. a-c)** Efecto de la dosis de radiación absorbida sobre el centro binuclear T3Cu-T3'Cu en la *Tth*-MCO. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

**Figura 38.** Mecanismo de transferencia de protones entre el Glu<sup>451</sup> y el CTC. **a)** *Tth*-MCO, **b)** apo-*Tth*-MCO, **c)** Hg-*Tth*-MCO y **d)** Hg-*Tth*-MCO-2h. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$  y el mapa  $F_o - F_c$  a  $3.5 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

**Figura 39.** Dos conformaciones (Glu<sup>451</sup><sub>A</sub> y Glu<sup>451</sup><sub>B</sub>) del residuo Glu<sup>451</sup> que participa en el mecanismo de transferencia de protones involucrado en la reducción del O<sub>2</sub> en el CTC de la *Tth*-MCO. **a)** Pico positivo de densidad electrónica en la conformación Glu<sup>451</sup><sub>A</sub>, alejada del CTC, sobre el grupo funcional carboxilato (R-COO<sup>-</sup>) de la cadena lateral. **b)** Interpretación del pico positivo de densidad

electrónica en (a) al modelar un grupo funcional carboxilo (R-COOH) en la cadena lateral de la conformación Glu<sup>451</sup><sub>A</sub>. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$  y el mapa  $F_o - F_c$  a  $3.5 \sigma$ .

**Figura 40.** Diagrama de superficie molecular de la *Tth*-MCO en donde se observa el residuo His<sup>139</sup> expuesto al solvente.

**Figura 41.** Residuo Asp<sup>106</sup> estabilizando las especies OH/H<sub>2</sub>O coordinadas al T2Cu vía una molécula de H<sub>2</sub>O estructural. **a)** *Tth*-MCO, **b)** apo-*Tth*-MCO, **c)** Hg-*Tth*-MCO y **d)** Hg-*Tth*-MCO-2h. Las distancias mostradas en la figura están en Å. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$ .

**Figura 42.** Mecanismo de transferencia de protones entre el Glu<sup>451</sup> y el CTC. **a-h)** Estructuras compuestas *Tth*-MCO-C(1-8) con diferente dosis de radiación absorbida (indicadas en cada panel). El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$  y el mapa  $F_o - F_c$  a  $3.5 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

**Figura 43.** Residuo Asp<sup>106</sup> estabilizando las especies OH/H<sub>2</sub>O coordinadas al T2Cu vía una molécula de H<sub>2</sub>O estructural. **a-h)** Estructuras compuestas *Tth*-MCO-C(1-8) con diferente dosis de radiación absorbida. El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$  y el mapa  $F_o - F_c$  a  $3.5 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

**Figura 44.** Posible ruta de transferencia de electrones desde el T1Cu y protones desde el Glu<sup>451</sup> para la reducción del O<sub>2</sub> a 2 H<sub>2</sub>O en el CTC de la *Tth*-MCO. Se observa el papel del Asp<sup>106</sup> estabilizando las especies OH/H<sub>2</sub>O (representadas como H<sub>2</sub>O(1b)/(H<sub>2</sub>O(1a), respectivamente) coordinadas al T2Cu vía puentes de hidrógeno con una molécula de H<sub>2</sub>O estructural (H<sub>2</sub>O(2)). El mapa de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  está representado a  $1 \sigma$  y el mapa  $F_o - F_c$  a  $3.5 \sigma$ . Las distancias mostradas en la figura están en Å.

- ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Clasificación de los 4 átomos de Cu de las oxidasas multicobre.

**Tabla 2.** Datos estadísticos de la colecta de datos de la *Tth*-MCO-SAD.

**Tabla 3.** Datos estadísticos de la colecta de datos y afinamiento de la *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO,

Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h.

**Tabla 4.** Datos estadísticos de la colecta de datos y afinamiento de las estructuras *Tth*-MCO-C(1-8) con diferente dosis de radiación absorbida.

**Tabla 5.** Estimación teórica del  $pK_a$  para los residuos Glu<sup>451</sup> y Asp<sup>106</sup> de las estructuras *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO, Hg-*Tth*-MCO y Hg-*Tth*-MCO-2h.

Hugo Serrano-Posada,<sup>a\*</sup> Brenda Valderrama,<sup>a</sup> Vivian Stojanoff<sup>b</sup> and Enrique Rudiño-Piñera<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM, Avenida Universidad 2001, Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico, and <sup>b</sup>NSLS, Brookhaven National Laboratory, 75 Brookhaven Avenue, Building 725D, Upton, New York 11973-5000, USA

Correspondence e-mail: serrano@ibt.unam.mx, rudino@ibt.unam.mx

Received 22 August 2011  
Accepted 17 September 2011



© 2011 International Union of Crystallography  
All rights reserved

## Thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of apo and holo forms

A thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27 (*Tth*-MCO) was successfully crystallized using the sitting-drop and hanging-drop vapour-diffusion methods. Crystallization conditions and preliminary X-ray diffraction data to 1.5 Å resolution obtained using synchrotron radiation at 100 K are reported. The crystals belonged to space group  $C222_1$ , with unit-cell parameters  $a = 93.6$ ,  $b = 110.3$ ,  $c = 96.3$  Å. A monomer in the asymmetric unit yielded a Matthews coefficient ( $V_M$ ) of  $2.60 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  and a solvent content of 53%. An inactive enzyme form, apo-*Tth*-MCO, was also crystallized and diffraction data were collected to 1.7 Å resolution. In addition, a second inactive form of the enzyme, Hg-*Tth*-MCO, was obtained by soaking apo-*Tth*-MCO crystals with mercury(II) chloride and data were collected to a resolution of 1.7 Å.

### 1. Introduction

Multicopper oxidases (MCOs) catalyze four one-electron oxidations of reducing substrates coupled to the four-electron reduction of molecular oxygen to water. MCOs are a family of enzymes comprising laccases (EC 1.10.3.2), ferroxidases (EC 1.16.3.1), ascorbate oxidase (EC 1.10.3.3) and ceruloplasmin (Hoegger *et al.*, 2006). The catalytic motif in these proteins includes at least four Cu atoms, which are classified into three types of sites: type 1 copper (T1Cu), type 2 copper (T2Cu) and the type 3 binuclear T3'Cu–T3Cu cluster. The type 2 and type 3 sites form a trinuclear Cu cluster (TNC) where molecular oxygen is reduced to water (Quintanar *et al.*, 2007). These enzymes have been found and described in several fungi, plants and bacteria (Mayer & Staples, 2002; Valderrama *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2007); however, in the case of thermophilic bacterial MCOs little is known about their functional properties (Hildén *et al.*, 2009). MCOs present low substrate specificity and have been used in a variety of biotechnological applications, including organic synthesis (Bernini *et al.*, 2011), biofuel cells (Service, 2002; Vincent *et al.*, 2005), textile dye bleaching (Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006) and bioremediation (Gullotto *et al.*, 2008). The most thoroughly studied thermoactive bacterial MCO is CotA from *Bacillus subtilis*. CotA is an enzyme with optimum ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] oxidation activity at 348 K and a  $T_{1/2}$  of almost 2 h at 353 K (Martins *et al.*, 2002). *Thermus thermophilus* strain HB27 locus TT\_C1370 encodes the only MCO in this organism (Henne *et al.*, 2004). The protein encoded by this gene has been isolated and found to present oxidase activity with an optimal temperature for ABTS oxidation at 365 K and a  $T_{1/2}$  of over 14 h at 353 K (Miyazaki, 2005). Owing to this remarkable resistance to thermal denaturation, *T. thermophilus* HB27 multicopper oxidase (*Tth*-MCO), also named *T. thermophilus* HB27 laccase (EC 1.10.3.2; *Tth*-laccase; Miyazaki, 2005), may have potential in biotechnological applications and is an attractive target for protein engineering. Additionally, the presence of Cu atoms in the active sites of MCOs concentrates radiation damage and/or radiolysis effects in the vicinity, making them targets for radiation-dose X-ray-induced reduction studies.

When a crystal of a copper-containing protein is exposed to X-ray radiation, one of the first events to occur is photoreduction of the

## crystallization communications

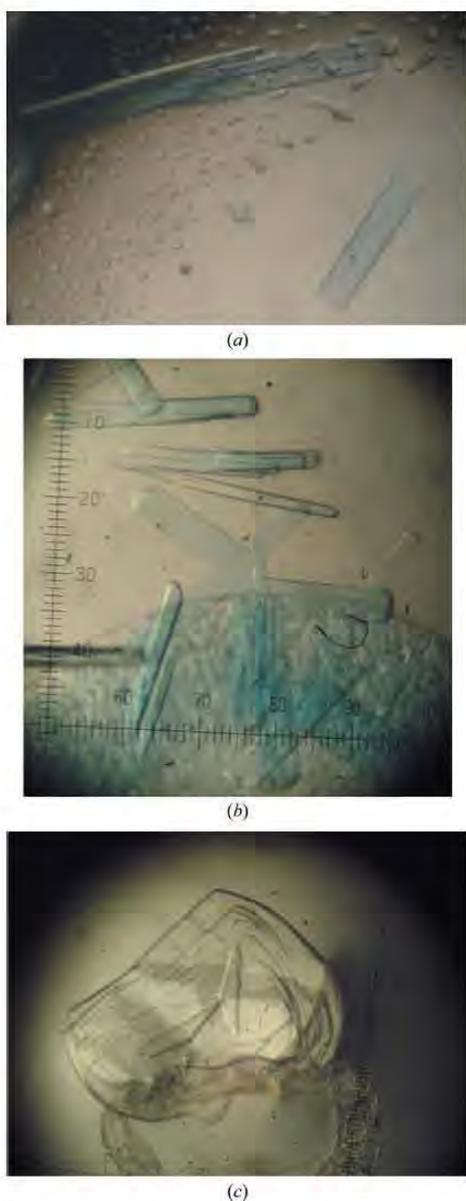
metal atoms. This effect can be seen in the final crystallographic structure as a mixture of copper oxidation states (Macedo *et al.*, 2009). In addition, it has been suggested that the electrons generated during X-ray data collection are able to lead to the reduction of bound molecular oxygen to water in MCOs (Hakulinen *et al.*, 2006). Therefore, structural study of *T. thermophilus* multicopper oxidase in its apo, holo and apo loaded with mercury forms (*Tth*-MCO, apo-*Tth*-

MCO and Hg-*Tth*-MCO, respectively) offers an opportunity to obtain insights into the redox mechanism of this particular family of enzymes guided by their crystalline structures and the interaction of metal atoms with X-ray radiation.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Gene cloning, protein expression and purification

*T. thermophilus* strain HB27 (Oshima & Imahori, 1974; DSM 7039, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) was grown as described elsewhere (Dominguez *et al.*, 2010) and genomic DNA was isolated using an UltraClean Microbial DNA-isolation kit (MO BIO). The gene encoded by locus TT\_C1370 was obtained by amplification of genomic DNA using the primers 5'-CATATGCAAGGCCCTTCCTTCCCC-3' and 5'-CGAATTCCC-CACCTCGAGGACTCCCAT-3'. The amplified fragment was cloned into pGEM-T Easy vector (Promega) for sequence confirmation. One of the plasmids with the correct sequence was digested with *Nde*I and *Eco*RI and the released fragment of ~1.5 kb was cloned into the corresponding sites of pET32a(+) (Novagen), resulting in plasmid p*Tth*1. Electrocompetent *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells were transformed with p*Tth*1 and grown on Luria-Bertani (LB) [1% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) NaCl] agar plates containing 200 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin and 20 µg ml<sup>-1</sup> tetracycline at 310 K. A single colony was picked and grown for plasmid isolation and insert verification by sequencing. Once validated, a sample of a liquid culture of exponentially growing BL21 (DE3)/p*Tth*1 was collected by centrifugation, resuspended in a sterile solution of 50% glycerol and maintained at 193 K. Aliquots of the frozen cell stock were thawed and inoculated into 30 ml LB medium containing 200 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin and 20 µg ml<sup>-1</sup> tetracycline and incubated for 12 h at 303 K. Part of the culture (10 ml) was used to inoculate 1 l LB medium with 200 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin and 20 µg ml<sup>-1</sup> tetracycline at 303 K until the optical density at 600 nm reached 0.5. Expression of *Tth*-MCO was then induced by adding IPTG (final concentration 0.1 mM) to the medium and incubating for 24 h at 303 K. Cells were concentrated by centrifugation (7500g, 30 min, 277 K) and resuspended in 50 ml 20 mM Tris pH 8.0 containing Complete protease-inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals) and DNase (1 µg ml<sup>-1</sup>). The cell suspension was sonicated on ice and the resulting lysate was heated at 338 K for 20 min. Cell debris was removed by centrifugation (15 300g, 35 min, 277 K) and the supernatant was dialyzed five times at 278 K against ten volumes of 20 mM Tris pH 8.0 with 0.1 mM CuSO<sub>4</sub> to obtain *Tth*-MCO and without CuSO<sub>4</sub> to obtain apo-*Tth*-MCO. Subsequent protein purifications were performed at room temperature and under the same conditions for the apoenzyme and the holoenzyme unless stated otherwise. The supernatant was loaded onto 25 ml SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) pre-equilibrated with 20 mM Tris pH 8.0 and washed with several volumes of the same buffer. Bound proteins were eluted with a linear gradient of NaCl (0–1 M) in the equilibration buffer at a flow rate of 2.0 ml min<sup>-1</sup>. Fractions with oxidase activity were pooled and concentrated in an ultrafiltration cell (Amicon cellulose filter, 30 kDa molecular-weight cutoff). This pool was loaded onto a Sephacryl 300-HR column (140 ml, 25–75 µm, Sigma) pre-equilibrated with 20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, and *Tth*-MCO was eluted with the same buffer at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. Fractions with oxidase activity were concentrated and dialyzed by ultrafiltration. Purified recombinant *Tth*-MCO showed a molecular mass of ~50 kDa on SDS-PAGE. Protein concentration was determined by the Bradford assay (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as a



**Figure 1**  
Crystals of *Tth*-MCO obtained by (a) the sitting-drop vapour-diffusion method and (b) the hanging-drop vapour-diffusion method (microseeding technique); (c) crystals of apo-*Tth*-MCO obtained by the hanging-drop vapour-diffusion method. All photographs were taken without a polarizer in order to obtain real colour images and all of the images were obtained at the same magnification. In the case of the plate-like crystals observed in (c) an acupuncture needle was used to separate and cut the crystals before mounting.

## crystallization communications

**Table 1**  
Summary of crystallographic data.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

	<i>Tth</i> -MCO	<i>Tth</i> -MCO-SAD	Apo- <i>Tth</i> -MCO	Hg- <i>Tth</i> -MCO
Source	BNL NSLS beamline X6A			
Wavelength (Å)	0.9795	1.3767	1.3747	0.8321
Space group	C222 <sub>1</sub>	C222 <sub>1</sub>	C222 <sub>1</sub>	C222 <sub>1</sub>
Unit-cell parameters (Å)	$a = 93.6, b = 110.3, c = 96.3$	$a = 93.6, b = 110.3, c = 96.7$	$a = 93.0, b = 110.1, c = 96.3$	$a = 93.5, b = 110.2, c = 96.3$
Resolution (Å)	23.0–1.50 (1.60–1.50)	35.0–2.00 (2.10–2.00)	26.0–1.70 (1.80–1.70)	20.0–1.70 (1.80–1.70)
No. of observed reflections	899414	493015	435926	542926
No. of unique reflections	78896 (10654)	34001 (4848)	53818 (7154)	54841 (8585)
Completeness (%)	94.7 (83.9)	99.6 (98.6)	98.9 (82.1)	94.6 (91.4)
Multiplicity	11.4 (9.9)	14.5 (14.1)	8.1 (6.6)	9.9 (10.3)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	19.4 (4.1)	23.6 (8.5)	18.5 (3.8)	9.1 (3.7)
$R_{\text{merge}} \dagger$ (%)	8.6 (39.5)	8.1 (34.7)	9.0 (45.0)	13.3 (35.3)

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ , where  $I_i(hkl)$  and  $\langle I(hkl) \rangle$  represent the diffraction-intensity values of the individual measurements and the corresponding mean values. The summation is over all unique measurements.

standard. The purification yield was approximately 6 mg purified protein from 1 l culture.

## 2.2. Protein crystallization

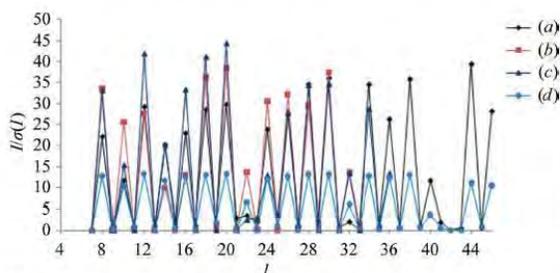
Initial crystallization conditions were obtained by the hanging-drop vapour-diffusion method using Crystal Screen and Crystal Screen 2 (Hampton Research). Protein droplets consisting of 1  $\mu\text{l}$  *Tth*-MCO (19.5 mg ml<sup>-1</sup> in 20 mM Tris pH 8.0) and 1  $\mu\text{l}$  reservoir solution (0.1 M HEPES pH 7.5, 70% MPD; condition No. 35 of Crystal Screen 2) were equilibrated against 1 ml reservoir solution at 278 K. Plate-like crystals appeared and grew to approximate dimensions of around 0.025  $\times$  0.1  $\times$  0.25 mm after ten months. After optimization, protein crystals with approximate dimensions of 0.025  $\times$  0.05  $\times$  0.1 mm were obtained by the sitting-drop vapour-diffusion method with a protein concentration of 30 mg ml<sup>-1</sup> in 20 mM Tris pH 8.0 using 1 + 1  $\mu\text{l}$  drops and 0.5 ml reservoir solution (0.1 M HEPES pH 7.5, 70% MPD) at a temperature of 278 K, with a growth time of two to three months (Fig. 1*a*). These crystals were suitable for X-ray analysis; however, they were also used as seeds. Using the microseeding technique, a large number of crystal nuclei were transferred using a horse hair into droplets consisting of 1  $\mu\text{l}$  protein solution (30 mg ml<sup>-1</sup> in 20 mM Tris pH 8.0) and 1  $\mu\text{l}$  reservoir solution (0.1 M HEPES pH 7.5, 70% MPD), which were equilibrated against 0.5 ml reservoir solution using the sitting-drop vapour-diffusion method or against 1 ml reservoir solution using the hanging-drop vapour-diffusion method. After a week small crystals of *Tth*-MCO were observed, but they required one to two months to reach approximate dimensions

of 0.025  $\times$  0.05  $\times$  0.1 mm (Fig. 1*b*). Apo-*Tth*-MCO crystals were obtained with a protein concentration of 30 mg ml<sup>-1</sup> in 20 mM Tris pH 8.0 using a reservoir solution consisting of 0.1 M HEPES pH 7.5, 70% MPD. Plate-like crystals appeared and grew to approximate dimensions of around 0.025  $\times$  0.1  $\times$  0.25 mm within three months (Fig. 1*c*). These apo-*Tth*-MCO crystals were separated using an acupuncture needle before mounting.

## 2.3. Data collection and crystallographic analysis

Data collection from the *Tth*-MCO, apo-*Tth*-MCO and Hg-*Tth*-MCO crystals was performed on beamline X6A of the National Synchrotron Light Source (NSLS), Brookhaven National Laboratory (BNL), USA using an ADSC Quantum 270 detector. X-ray diffraction data for *Tth*-MCO were collected from a single crystal at two different wavelengths,  $\lambda = 0.9795$  and 1.3767 Å, with the latter being used for the single-wavelength anomalous dispersion (SAD) technique (*Tth*-MCO-SAD data set). Before choosing the wavelengths, an energy scan was performed on the sample in order to identify the energy of the anomalous peak for Cu in *Tth*-MCO (9.003 keV, 1.3767 Å). The crystal-to-detector distance was maintained at 180 mm with an oscillation range per image of 0.5°. For data collection under cryogenic conditions, crystals were soaked for a few seconds in a solution consisting of 0.1 M HEPES pH 7.5, 45% MPD. Crystals were loop-mounted and flash-cooled in a 100 K dry nitrogen stream. Diffraction images were integrated using *XDS* (Kabsch, 2010) and scaling was performed with *SCALA* from the *CCP4* suite (Winn *et al.*, 2011). All of the *Tth*-MCO crystals belonged to a C-centred orthorhombic space group, with unit-cell parameters  $a = 93.6$ ,  $b = 110.3$ ,  $c = 96.3$  Å,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . A total of 899 414 reflections were integrated to a resolution of 1.5 Å and were merged to obtain 78 896 unique reflections with an overall  $R_{\text{merge}}$  of 0.086 and a completeness of 94.7%. Matthews coefficient calculations suggested that there was one molecule per asymmetric unit ( $V_M = 2.60$  Å<sup>3</sup> Da<sup>-1</sup>, 53% solvent content). A data set ( $\lambda = 1.3747$  Å) was collected to a resolution of 1.7 Å for the apo-*Tth*-MCO crystal; its unit-cell parameters were  $a = 93.0$ ,  $b = 110.1$ ,  $c = 96.3$  Å,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . The derivative Hg-*Tth*-MCO was obtained by soaking an apo-*Tth*-MCO crystal for 5 min in 5 mM HgCl<sub>2</sub> at 278 K and a data set ( $\lambda = 0.8321$  Å) was collected to a resolution of 1.7 Å; the unit-cell parameters of the crystal were  $a = 93.5$ ,  $b = 110.2$ ,  $c = 96.3$  Å,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . Data-collection statistics are summarized in Table 1.

The most probable space group for all of the crystals analyzed was a C-centred orthorhombic space group. Assuming space group C222, the overall  $R_{\text{merge}}$  for the *Tth*-MCO data set (resolution limits 23.0–1.5 Å) was 0.093 (0.668 in the highest resolution bin). However, when



**Figure 2**  
 $I/\sigma(I)$  versus  $00l$  reflection plots for the (a) *Tth*-MCO, (b) *Tth*-MCO-SAD, (c) apo-*Tth*-MCO and (d) Hg-*Tth*-MCO data sets. All data sets were integrated in space group C222 in order to test the presence of axial reflections in  $l(00l; l = 2n)$ . The presence of a  $2_1$  screw-rotation axis is clearly visible in the plot, supporting space group C222<sub>1</sub>.

## crystallization communications

the same data set with the same resolution limits was integrated in space group  $C222_1$ , the corresponding value of  $R_{\text{merge}}$  was 0.086 (0.395 in the highest resolution bin). When all data sets were integrated in space group  $C222$ , one screw-rotation axis was clearly present in the  $I/\sigma(I)$  versus axial reflection plot on  $l$  ( $00l$ :  $l = 2n$ ); this general reflection condition is indicative of space group  $C222_1$  (Fig. 2). Additionally, *POINTLESS* (Evans, 2006) clearly chose space group  $C222_1$  with a probability of 97.5%.

The structure of *Tth*-MCO was determined by a combination of molecular replacement and single-wavelength anomalous dispersion (SAD) techniques using the Cu signal and assuming space group  $C222_1$ . Molecular-replacement trials were performed in *Phaser* (McCoy *et al.*, 2007) using the structure of CueO from *E. coli* (Roberts *et al.*, 2002; PDB entry 1kv7) as a model; this structure has a sequence identity of 31.5% to *Tth*-MCO. The phases obtained from molecular replacement were not sufficient for structure determination, but an attempt to solve the phase problem using a combination of molecular replacement and single-wavelength anomalous dispersion (SAD) was successful and two fully occupied and one partially occupied copper-ion positions were found using *Phaser* in MR-SAD mode (McCoy *et al.*, 2007). Initial construction of the protein model was carried out using *ARP/wARP* (Langer *et al.*, 2008). The apo-*Tth*-MCO and Hg-*Tth*-MCO structures were determined by molecular replacement using *Phaser* (McCoy *et al.*, 2007) with the *Tth*-MCO atomic coordinates as a template. Refinement is currently under way using the programs *PHENIX* (Adams *et al.*, 2010) and *Coot* (Emsley *et al.*, 2010).

HSP was supported by a PhD fellowship from CONACyT. ERP and BV acknowledge financial support from CONACyT projects 102370 and 128156, respectively. ERP gratefully acknowledges financial support of PAPIIT project IN204611. We thank the staff at BNL NSLS beamline X6A for data-collection facilities. Beamline X6A is funded by NIGMS (GM-0080) and the US Department of Energy (No. DE-AC02-98CH10886). The authors thank Biol. Sonia P. Rojas-Trejo, Biol. Guadalupe Paredes-Valdéz and Dr Hector Ayala-Castro for technical assistance.

## References

- Adams, P. D. *et al.* (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 213–221.
- Bernini, R., Crisante, F., Gentili, P., Morana, F., Pierini, M. & Piras, M. (2011). *J. Org. Chem.* **76**, 820–832.
- Bradford, M. M. (1976). *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Domínguez, A., Deive, F. J., Pastrana, L., Rúa, M. L., Longo, M. A. & Sanroman, M. A. (2010). *Bioprocess Biosyst. Eng.* **33**, 347–354.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 486–501.
- Evans, P. (2006). *Acta Cryst.* **D62**, 72–82.
- Gulotto, A., Branciamore, S., Duchì, I., Caño, M. F., Randazzo, D., Tili, S., Giardina, P., Sannia, G., Scozzafava, A. & Briganti, F. (2008). *Bioresour. Technol.* **99**, 8353–8359.
- Hakulinen, N., Kruus, K., Koivula, A. & Rouvinen, J. (2006). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 929–934.
- Henne, A. *et al.* (2004). *Nature Biotechnol.* **22**, 547–553.
- Hildén, K., Hakala, T. K. & Lundell, T. (2009). *Biotechnol. Lett.* **31**, 1117–1128.
- Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R. & Kües, U. (2006). *FEBS J.* **273**, 2308–2326.
- Kabsch, W. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 125–132.
- Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S. & Perrakis, A. (2008). *Nature Protoc.* **3**, 1171–1179.
- Macedo, S., Pechlaner, M., Schmid, W., Weik, M., Sato, K., Dennison, C. & Djinović-Carugo, K. (2009). *J. Synchrotron Rad.* **16**, 191–204.
- Martins, L. O., Soares, C. M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H. & Henriques, A. O. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 18849–18859.
- Mayer, A. M. & Staples, R. C. (2002). *Phytochemistry*, **60**, 551–565.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). *J. Appl. Cryst.* **40**, 658–674.
- Miyazaki, K. (2005). *Extremophiles*, **9**, 415–425.
- Oshima, T. & Imahori, K. (1974). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **24**, 102–112.
- Quintanar, L., Stoj, C., Taylor, A. B., Hart, P. J., Kosman, D. J. & Solomon, E. I. (2007). *Acc. Chem. Res.* **40**, 445–452.
- Roberts, S. A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J. T., Tollin, G., Rensing, C. & Montfort, W. R. (2002). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 2766–2771.
- Rodríguez Couto, S. & Toca Herrera, J. L. (2006). *Biotechnol. Adv.* **24**, 500–513.
- Service, R. F. (2002). *Science*, **296**, 1223.
- Sharma, P., Goel, R. & Capalash, N. (2007). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 823–832.
- Valderrama, B., Oliver, P., Medrano-Soto, A. & Vazquez-Duhalt, R. (2003). *Antonie Van Leeuwenhoek*, **84**, 289–299.
- Vincent, K. A., Cracknell, J. A., Lenz, O., Zebger, I., Friedrich, B. & Armstrong, F. A. (2005). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 16951–16954.
- Winn, M. D. *et al.* (2011). *Acta Cryst.* **D67**, 235–242.

## **Molecular dynamics of a thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: Structural differences between the apo and holo forms**

Martiniano Bello, Brenda Valderrama, Hugo Serrano-Posada and Enrique Rudiño-Piñera

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México

**ABSTRACT.** Molecular dynamic (MD) simulations have been performed on *Tth*-MCO, a hyperthermophilic multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27, in the apo as well as the holo form, with the aim of exploring the structural dynamic properties common to the two conformational states. According to structural comparison between this enzyme and other MCOs, the substrate in process to electron transfer in an outer-sphere event seems to transiently occupy a shallow and overall hydrophobic cavity near the Cu type 1 (T1Cu). The linker connecting the  $\beta$ -strands 21 and 24 of the second domain (loop ( $\beta$ 21-  $\beta$ 24)<sub>D2</sub>) has the same conformation in both states, forming a flexible lid at the entrance of the electron-transfer cavity. Loop ( $\beta$ 21-  $\beta$ 24)<sub>D2</sub> has been tentatively assigned a role occluding the access to the electron-transfer site. The dynamic of the loop ( $\beta$ 21-  $\beta$ 24)<sub>D2</sub> has been investigated by MD simulation, and results show that the structures of both species have the same secondary and tertiary structure during almost all the MD simulations. In the simulation, loop ( $\beta$ 21-  $\beta$ 24)<sub>D2</sub> of the holo form undergoes a higher mobility than in the apo form. In fact, loop ( $\beta$ 21-  $\beta$ 24)<sub>D2</sub> of the holo form experiences a conformational change which enables exposure to the electron-transfer site (open conformation), while in the apo form the opposite effect takes place (closed conformation). To confirm the hypothesis that the open conformation might facilitate the transient electron-donor molecule occupation of the site, the simulation was extended another 40 ns with the electron-donor molecule docked into the protein cavity. Upon electron-donor molecule stabilization, loops near the cavity reduce their mobility. These findings show that coordination between the copper and the protein might play an important role in the general mobility of the enzyme, and that the open conformation seems to be required for the electron transfer process to T1Cu.

ARTÍCULO EN PROCESO DE ESCRITURA

**“Crystallographic Evidence for Proton-Relay Mechanism in the X-ray-induced O<sub>2</sub> Reduction to 2 H<sub>2</sub>O by a multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27”**

Hugo Serrano-Posada and Enrique Rudiño-Piñera

From the †Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62210,  
México