

EFFECTO DE LA RADIACIÓN X SOBRE CRISTALES DE PROTEÍNA

APLICACIONES EN SISTEMAS REDOX



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Eugenio De la Mora Lugo

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Director de Tesis:
Dr. Enrique Rudiño Piñera



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al Dr. Enrique Rudiño Piñera por su incomparable asesoría.

A la Biól. Sonia Patricia Rojas Trejo por su asistencia técnica.

A la Prof. Elspeth Garman por su incansable motivación y ejemplo.

A la Dra. Janet Lovett por su valiosa colaboración en los experimentos de EPR.

Al Dr. Christopher Blanford por mostrarme la magia de la electroquímica.

A la Dra. Liliana Quintanar Vera y al Dr. Rafael Vazquez Duhalt, integrantes de mi comité tutorial, por sus valiosas críticas constructivas, sugerencias y múltiples aportaciones a este proyecto.

A los miembros del jurado Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Isabel Gómez, Adelaida Díaz, Dr. Jean Luis Charli Casalonga, Dr. Abel Moreno Cárcamo, por la revisión exhaustiva de este trabajo.

A los integrantes del laboratorio de Cristalografía de Rayos X del IBt por su ayuda y colaboración en cada momento.

Publicaciones derivadas de este trabajo

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., Blanford, C., 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 D* **68**, 564-577.

Índice

Capítulo 1 Introducción	1
1.1 Daño por radiación	3
1.2 Utilización del daño	5
Capítulo 2 Bases químicas del daño por radiación	5
2.1 Introducción	9
2.1.1 Interacción radiación ionizante-materia	9
2.1.2 Difracción a temperaturas criogénicas	12
2.1.3 Intensidades como indicadores del decaimiento	14
2.1.4 Mitigando el daño por radiación	17
2.2 Materiales y Métodos	20
2.2.1 Microespectrofotometría en línea	20
2.2.2 Cristalización	21
2.2.3 Análisis del decaimiento de las intensidades	22
2.3 Resultados	24
2.3.1 Microespectrofotometría	24
2.3.2 Análisis de intensidades globales	27
2.3.3 Factor R de decaimiento (R_d)	29
2.3.4 Daño específico a nivel de densidad electrónica	30
2.4 Discusión	35
2.5 Conclusiones	39
Capítulo 3 Caracterización de CgL	40
3.1 Introducción	40
3.1.1 Espectroscopía de sitios metálicos	43
3.1.2 Propiedades electrónicas del T1 Cu asociadas a la transferencia electrónica	45
3.1.3 Voltametría en película de proteína	47
3.2 Materiales y métodos	51
3.2.1 Purificación	51
3.2.2 Cuantificación de cobre	52

3.2.3 UV-Vis	53
3.2.4 Resonancia paramagnética electrónica (EPR)	53
3.2.5 Espectroscopía de absorción de rayos X	54
3.2.6 Actividad	55
3.2.7 Electroquímica	55
3.3 Resultados	57
3.3.1 Purificación	57
3.3.2 concentración de cobre	58
3.3.3 UV-Visible	60
3.3.4 EPR	62
3.3.5 Actividad	65
3.3.6 Electroquímica	66
3.4 Discusión	69
Capítulo 4 Reacciones redox en cristales de Cg L	71
4.1 Introducción	71
4.1.1 Consecuencias de pH sobre Cg L	75
4.2 Materiales y métodos	78
4.2.1 Cristalización	78
4.2.2 Colecta de datos	80
4.2.3 Procesamiento de datos	81
4.3 Resultados	83
4.3.1 Espectroscopía Visible en línea	83
4.3.2 Baja dosis	84
4.3.3 Absorción de rayos X	86
4.3.4 Alta dosis	87
4.3.5 Data sets compuestos	89
4.4 Discusión	92
4.5 Conclusiones	94
Capítulo 5 Conclusiones finales	96
5.1 Efecto de la producción de radicales libres sobre cristales de HEWL	97
5.2 Efecto de la producción de radicales libres sobre cristales de Cg L	98

5.3 Perspectivas	102
6 Referencias	103

Resumen

El desarrollo de fuentes de rayos X cada vez más intensas, ha convertido al daño por radiación en una de las principales limitantes de la cristalografía de rayos X para determinar estructuras tridimensionales de biomoléculas. Además de dificultar la determinación de fases, el daño por radiación provoca alteraciones químicas en la matriz proteica que pueden ser malinterpretadas durante el análisis estructural. Los sitios más susceptibles al daño son los metales, por lo que es necesario estudiar con mayor detalle el efecto que tiene la exposición a la radiación X sobre los cristales de metaloproteínas. Una mayor comprensión de los mecanismos que subyacen al daño hará posible utilizar estos fenómenos para desencadenar reacciones redox en el interior de los cristales de proteínas y permitirá describir con mayor detalle los mecanismos de acción de estas enzimas.

Este trabajo se divide en dos partes. En la primera, estudiamos las bases químicas del daño por radiación utilizando como modelo a la lisozima (*HEWL*). Demostramos que es posible reducir el daño por radiación mediante el uso de moléculas que neutralizan radicales libres e identificamos dos mecanismos de daño distintos: una vía oxidativa y una reductiva.

En la segunda parte analizamos el efecto de la cascada de reacciones químicas que se producen durante la irradiación, sobre la lacasa de *Coriolopsis gallica*, una enzima de la familia de las multicobre oxidasas azules (MCO). Entre otras consecuencias, la cascada de reacciones desencadenadas en el interior de los cristales reduce los sitios metálicos y provoca modificaciones en los sitios activos.

Abstract

The development of increasingly intense X-ray sources has converted radiation damage in one of the major limiting steps during the determination of three-dimensional structures of biomolecules by X-ray crystallography. Radiation damage is an obstacle during phase determination by anomalous methods and causes chemical modifications over the protein matrix that can be misinterpreted during the structure-function analysis. Because metal sites are the most susceptible atoms to radiation effects, it is necessary to study in greater detail the consequences of the exposure to X-radiation of metalloprotein crystals. A deeper understanding of the mechanisms underlying radiation damage will allow us to trigger and control redox reactions within the protein crystals in order to describe at atomic detail the mechanisms of action of these enzymes.

This thesis is divided into two parts. In the first, we studied the chemical basis of radiation damage using as a model hen egg white lysozyme (HEWL). We demonstrate that it is possible to reduce radiation damage by using two different scavengers. This method allowed us to identify two different mechanisms of damage: an oxidative and a reductive pathway.

In the second part, we analysed the effect of the cascade of chemical reactions that occur during irradiation, over *Coriolopsis gallica* laccase, an enzyme of the family of blue multicopper oxidases (MCO). The most relevant consequences of the cascade of reactions, triggered inside *C. gallica* crystals, is the reduction of metal sites together with modifications over the active sites.

Abreviaciones

$A_{||}$ - desdoblamiento hiperfino.

ADPs – parámetros de desplazamiento atómico (siglas en inglés).

Borde K – el borde K (*K-edge*, en inglés) describe un aumento en el coeficiente de absorción de fotones. El aumento repentino de la absorción se debe al efecto fotoeléctrico. Para que esta interacción se lleve a cabo, la energía del fotón debe ser superior a la energía de unión del electrón de capa K del átomo que interacciona con los fotones.

Borde L – es el equivalente al borde K, pero en este caso la energía de los fotones debe ser superior a la energía de enlace de los electrones de capa L.

Cg L- lacasa del basidiomiceto *Corioloopsis gallica*.

ε - coeficiente de extinción.

e^-_{aq} - electrones solvatados o acuosos.

EPR- resonancia Paramagnética de Electrones

ET- transferencia electrónica

H_{DA} - elemento de acoplamiento de la matriz electrónica

HEWL- lisozima

λ - longitud de onda, o en el contexto de transferencia electrónica, energía de reasociación.

MES- ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico.

$Mn(I_{mean})$ – intensidad media o sumatoria de las intensidades.

MicroPIXE- emisión de rayos X inducida por protones.

$NaNO_3$ - nitrato de sodio.

$\cdot OH$ - radical hidroxilo.

PDB – banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank*).

PEG – polietilenglicol.

QM/MM- mecánica cuántica/mecánica molecular.

R_d – factor de decaimiento de intensidades equivalentes.

T1 Cu – cobre tipo 1

T2 Cu – cobre tipo 2

T3 Cu – cobre tipo 3

TA– temperatura ambiente

XAS – espectroscopía de absorción de rayos X

La cristalografía de rayos X es la herramienta que ha dado forma a nuestras nociones fundamentales sobre la relación estructura-función en biomoléculas. La determinación de estructuras tridimensionales, ha hecho posible la comprensión, a nivel atómico, de los mecanismos que subyacen la función de las proteínas y de los ácidos nucleicos.

El comienzo del desarrollo de esta técnica revolucionaria se remonta a la mitad del siglo XX, posterior al descubrimiento realizado por Max Von Laue, en el cual observó que la interacción rayos X–cristales¹, producía difracción. Su posterior aplicación para determinar la estructura de moléculas inorgánicas fue una contribución de William Henry Bragg y William Lawrence Bragg, padre e hijo. Pasaron más de cuatro décadas para que pudiera determinarse la primera estructura de una proteína, la mioglobina (Kendrew *et al.*, 1958), y fue desde entonces cuando el poder de la cristalografía se hizo evidente y desencadenó su desarrollo de manera exponencial.

En gran parte, el *boom* de la cristalografía comenzó hace cuatro décadas como consecuencia de la identificación de las propiedades de la radiación sincrotrón (Rosenbaum *et al.*, 1971). Entre ellas se encuentran el brillo² y la posibilidad de sintonizar la longitud de onda. Estas características incrementaron su accesibilidad para la determinación de estructuras de biomoléculas. No hay que olvidar que el empleo de la radiación sincrotrón para determinar estructuras de biomoléculas

¹ En ese entonces cristales de sustancias inorgánicas

² fotones s⁻¹ mm²

comenzó como un uso *parasítico* de las instalaciones dedicadas, originalmente, para estudios de física teórica.

En particular, la modulación de la longitud de onda permitió la determinación de fases por métodos anómalos novedosos, que utilizaron a la biología molecular, para insertar Se-Met como dispersor anómalo en la secuencia primaria de la proteína sin alterar el isomorfismo de los cristales. Tan exitosa fue la inclusión de Se-Met que incluso ahora cerca del 90% de las estructuras *de novo* depositadas en el PDB³ (Berman *et al.*, 2000) emplearon este método. En la primera década del presente siglo el desarrollo se enfocó en la automatización de la determinación de estructuras, fomentada por la explosión de la genómica estructural. A pesar del reciente desarrollo de técnicas como la resonancia magnética nuclear y la microscopía electrónica, la cristalografía de rayos X sigue siendo, por mucho, la técnica más exitosa para determinar estructuras atómicas de biomoléculas, a tal grado que en la actualidad, más del 87 % de las estructuras depositadas en el PDB fueron determinadas con esta técnica.

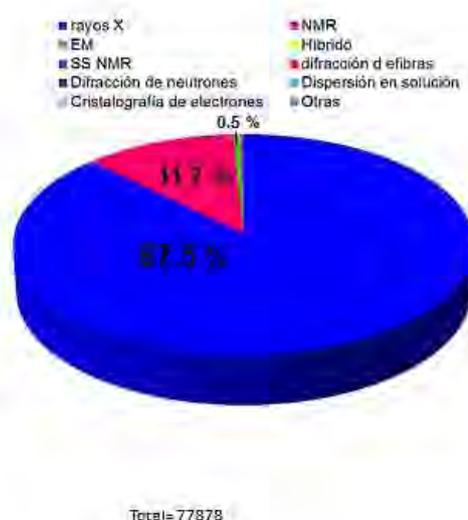


Figura 1.1 Distribución de los depósitos de PDB de acuerdo a la técnica empleada para su determinación.

³ Protein Data Bank (Berman, *et al.*, 2000)

1.1. Daño por radiación

Acompañando el éxito de la radiación sincrotrón, llegaron problemas técnicos como la falta de líneas de uso exclusivo para la biología estructural; la necesidad de detectores más sensibles; el desarrollo de programas computacionales para facilitar el procesamiento de datos y experimentales como el daño por radiación. Actualmente, el daño por radiación, junto con la cristalización y la determinación de fases, sigue siendo uno de los cuellos de botella en la determinación de estructuras de proteínas por difracción de rayos X.

El daño por radiación es consecuencia de la interacción radiación ionizante-materia y por lo tanto es inevitable. Del total del haz de rayos X incidente, solamente 2 % interacciona con el cristal, mientras que el 98 % continúa su camino sin interferencia alguna. Del 2 % que interacciona con el cristal, la mayor parte, un 92 %, corresponde al efecto fotoeléctrico. Este tipo de interacción, causa la ionización de los átomos de la muestra, ocasionando cambios químicos en las moléculas que constituyen al cristal y como consecuencia la desestabilización de la red cristalina. Este último aspecto dificulta la obtención de datos experimentales de buena calidad, puesto que el orden del arreglo cristalino determina las propiedades de difracción. Por lo tanto, durante la colecta de datos existe un compromiso entre obtener los mejores datos (mayor resolución, relación I/σ , redundancia, integridad, etc.) y minimizar los efectos del daño por radiación, que alteran todos los indicadores mencionados. En contraste con el efecto fotoeléctrico, la dispersión elástica, aquella que da lugar al patrón de difracción, constituye únicamente el 0.08 % del haz incidente.

Extrapolando observaciones basadas en la dosis que causaba pérdida de la mitad del poder de difracción en experimentos de microscopía electrónica a 77 K,

se estimó un límite de dosis de 20 MGy para cristales de proteínas irradiados con rayos X (Henderson, 1990). Posteriormente, utilizando cristales de apo y holoferritina se determinó experimentalmente una dosis máxima de 35 MGy (Owen *et al.*, 2006). Este valor es un límite superior, puesto que se ha observado que daños específicos o a nivel local ocurren a diferentes valores de dosis. Con el desarrollo de sincrotrones de 3^{era} generación y más recientemente de *lasers* de rayos X (*X-FEL*) las dosis absorbidas por los cristales de proteína se han incrementado entre 10 y 1000 veces en comparación con los ánodos rotatorios, conduciendo a dosis absorbidas comúnmente mayores a los límites tolerados por la mayoría de los cristales.

Por ello, el estudio de las causas del daño por radiación y el desarrollo de estrategias que lo mitiguen han tomado mucha relevancia en años recientes. Existen varios métodos empleados para aminorar los efectos del daño por radiación. El más eficiente de ellos es la difracción a temperaturas criogénicas (≤ 100 K), la cual incrementa el tiempo de vida media, o la dosis que un cristal puede recibir sin sufrir alteraciones químicas, entre 27-70 veces (Nave & Garman, 2005; Kmetko *et al.*, 2011). Las bajas temperaturas disminuyen la movilidad de los radicales generados durante la colecta de datos, mas no eliminan su formación. Por ello se han tratado de desarrollar otros métodos como la adición de radioprotectores o *scavengers* y la difracción a altas energías en donde la contribución del efecto fotoeléctrico es minimizada de forma significativa.

En ese contexto, el segundo capítulo de la presente tesis estudia las bases químicas del daño por radiación y su efecto sobre cristales de proteína. Para ello utilizamos como modelo la proteína más estudiada en este campo: la lisozima

(HEWL)⁴. En combinación con la adición, por separado, de dos *scavengers* con propiedades distintas, tratamos de diferenciar el efecto de dos de los radicales predominantes generados durante la irradiación: electrones solvatados (e_{aq}^-) y radicales hidroxilo ($\cdot OH$). Para separar el efecto de ambos, empleamos a uno de los más eficientes aceptores de electrones solvatados descritos (nitrato, NO_3^-) y alternativamente, una molécula con mayor afinidad por los radicales $\cdot OH$ (ascorbato).

1.2. Utilización del daño por radiación

Puesto que el daño por radiación es inevitable, varios enfoques han tratado de aprovechar la formación de especies radicales para estudiar los mecanismos catalíticos de enzimas. Una de las consecuencias del daño por radiación es la reducción gradual de los sitios metálicos (Carugo & Carugo, 2005), por lo que los modelos finales son, en realidad, un promedio de los diferentes estados de oxidación, distintos al inicial, explorados durante la colecta de datos. La idea de utilizar la reducción inducida por la irradiación, ha sido puesta en práctica en metalo-proteínas como la peroxidasa de rábano blanco (Berglund *et al.*, 2002) y como la superóxido dismutasa (SOD) (Wuerges *et al.*, 2004). En estos sistemas, se asume que los electrones generados durante la irradiación del cristal son aceptados preferencialmente por los sitios metálicos que en consecuencia son reducidos, simulando la reacción que catalizan al oxidar un sustrato. Es decir, los metales redox activos actúan como mínimos energéticos para los e_{aq}^- . Generalmente estas reacciones de transferencia de electrones están acopladas a transferencia de

⁴ HEWL del inglés *Hen Egg White Lysozyme*.

protones por lo que la progresión de la reacción depende de la presencia y estado de protonación de residuos ácidos ubicados en la vecindad al sitio activo.

En el caso de la peroxidasa, *Berglund y colaboradores (2002)* lograron determinar la estructura de cinco intermediarios catalíticos (Figura 1.1). Para ello, los autores utilizaron *data-sets* compuestos, correspondientes a diferentes dosis de radiación. Puesto que la generación de radicales es proporcional al tiempo de exposición o dosis absorbida, cada *data-set* compuesto correspondió a diferentes estados de oxidación. Los *data-sets* compuestos, fueron generados difractando varios cristales de peroxidasa de rábano blanco y fusionando los intervalos de cada cristal correspondientes a la misma dosis absorbida.

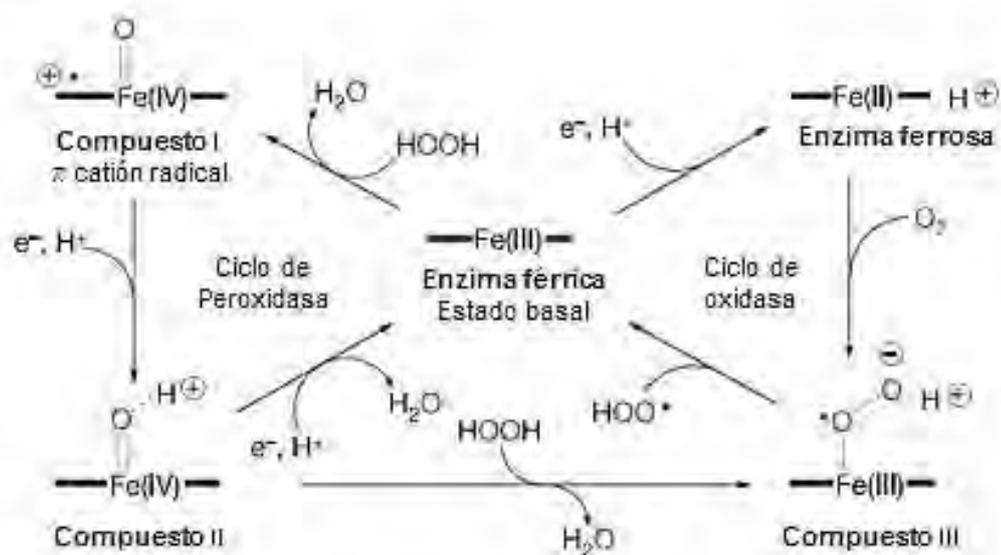


Figura 1.1 Intermediarios catalíticos identificados mediante la formación de *data-sets* compuestos de cristales de peroxidasa de rábano blanco. Modificado de Berglund, et al., 2002.

A pesar de lo novedoso del trabajo, el estudio no consideró variables como la cuantificación de la dosis absorbida por cada cristal, ni el decaimiento de las intensidades durante la colecta de datos. Esto es relevante porque a dosis recibida por una muestra difractada en la misma línea, aun sin cambiar parámetros

experimentales⁵, puede variar en un factor de 10. Es decir, si no se cuantifica la dosis es posible que se fusionen *data-sets* correspondientes a dosis distintas y por lo tanto el resultado es un artificio cristalográfico.

En este contexto, utilizamos los radicales generados durante la irradiación de cristales de proteína, en un sistema redox para abordar su mecanismo de reacción. Para ello, en el Capítulo 3, caracterizamos nuestro modelo: la lacasa de *Corioloropsis gallica*⁶. La caracterización fue necesaria para confirmar que la enzima se encontraba en el estado oxidado y así reducirla gradualmente durante la irradiación de cristales.

Una vez confirmado el estado de oxidación de la enzima, en el capítulo 4 probamos que durante la difracción de cristales de *Cg L* ocurre la reducción de los sitios de cobre. Por medio de este acercamiento encontramos cambios en la conformación de los sitios activos, que relacionamos tanto con la dosis absorbida como con el grado de reducción de la proteína que constituye los cristales.

Por último, en el capítulo 5, sintetizamos los resultados, discutimos su relación y presentamos las conclusiones finales junto con las perspectivas derivadas de esta tesis.

Decidimos presentar los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis en capítulos separados para hacerla de lectura más amena. Esto no significa que no haya un objetivo común entre los capítulos. Ese objetivo general es el recalcar la importancia del daño por radiación durante la difracción de rayos X, y dentro de él, se encuentran englobados varios objetivos particulares como comprender las bases químicas del daño, sus consecuencias sobre las estructuras determinadas por este medio, así como el desarrollo e implementación de métodos

⁵ Área del haz, longitud de onda, tiempo de exposición, etcétera.

⁶ A partir de este punto denominada *Cg L*.

que atenúen sus efectos y por último, mostrar que se pueden diseñar estrategias para aprovechar las reacciones desencadenadas durante la irradiación en el estudio de proteínas redox.

Capítulo 2 Bases químicas del daño por radiación

2.1. Introducción

El daño que sufren los cristales de proteína al exponerlos a radiación ionizante⁷, como lo son los rayos X, es inevitable y se manifiesta con el desorden progresivo del cristal y cambios específicos en los residuos de aminoácidos y los cofactores. El desorden, o degradación cristalina, se evidencia experimentalmente como una disminución gradual de las propiedades de difracción del cristal: pérdida de intensidad y resolución, ambas directamente relacionadas con el aumento en los parámetros de celda unitaria, de los PDAs y mosaicismo.

2.1.1. Interacción radiación ionizante-materia

El daño por radiación es inevitable porque es consecuencia de la interacción radiación ionizante-materia. Durante la irradiación de un cristal de proteína con rayos X ocurren tres fenómenos físicos: el efecto fotoeléctrico, la dispersión inelástica (también llamada dispersión de Compton) y la dispersión elástica (o dispersión de Rayleigh).

El efecto fotoeléctrico consiste en la absorción de la energía del fotón incidente por parte de los electrones de la muestra y la consecuente liberación de electrones de las capas internas de los átomos afectados. El electrón liberado pierde rápidamente su energía, pero es capaz de recorrer varios nm a temperaturas > 77 K. La vacante es ocupada por un electrón de capa externa y dependiendo de la energía del fotón incidente, grosor y composición de la muestra, el exceso de energía es

⁷ Rayos X, rayos alfa, beta y gama.

liberado en forma de fluorescencia, o transferido a un segundo electrón quien a su vez puede ser liberado del átomo (electrón de Auger). Este fenómeno causa la ionización atómica, produciendo radicales libres que reaccionan con la proteína y modifican las interacciones intra e intermoleculares. Un radical libre es cualquier especie química que contiene uno o más electrones desapareados y es capaz de existir de forma independiente durante un periodo de tiempo definido (Halliwell & Gutteridge, 1999). Estas especies son muy inestables y por tanto reactivas. Las reacciones que producen los radicales libres se pueden dividir en dos tipos: 1) reacción en cadena; que da origen a la neutralización del radical⁸ junto con la formación de una nueva especie radical y 2) reacción de terminación; que ocurre entre dos radicales libres y da lugar a un par completo.

La dispersión inelástica o de *Compton*, es la interacción en la que una parte de la energía del fotón es transmitida a los electrones de la muestra. La transferencia de energía del fotón causa que el electrón recule, produciendo energía cinética que es absorbida por el cristal y que contribuye a la dosis absorbida. Como consecuencia de la pérdida de energía, el fotón dispersado es de menor energía que el incidente.

Por último, la dispersión elástica consiste en la dispersión del fotón incidente sin transferencia de energía a la muestra y por lo tanto sin cambios en la longitud de onda del fotón dispersado. Este tipo de interacción es la que da origen al patrón de difracción.

Si bien, la determinación de estructuras tridimensionales de proteínas por difracción de rayos X es posible gracias a la dispersión elástica, ésta representa

⁸ El radical libre original que ha perdido su electrón desapareado.

solamente el 0.08 % del haz incidente⁹. Mientras que la dispersión inelástica representa un porcentaje similar a la elástica, la mayor parte del haz que interacciona con la muestra, ~ 1.92 %¹⁰, es absorbido por el efecto fotoeléctrico. Al ser el tipo de interacción predominante y a la vez la causal de la producción de especies reactivas, el efecto fotoeléctrico es responsable del daño por radiación ([Swartz & Swartz, 1983](#)).

La interacción de los rayos X con el solvente produce varias especies reactivas con rendimiento conocido¹¹: $\cdot\text{OH}$ (2.4), e_{aq}^- (2.8), H^+ , H^\bullet (0.4) y $\text{H}_2(\text{g})$ (0.4) (Figura 2.1). Por ello, la gran cantidad de solvente que contienen los cristales de proteína (entre 20-80%) juega un papel esencial en la progresión del daño. Por ejemplo, el radical $\cdot\text{OH}$ es extremadamente inestable, reacciona con la mayoría de las moléculas orgánicas a una tasa de reacción limitada sólo por la difusión. Su reacción más favorecida es la abstracción de un H^+ de las amidas del esqueleto proteico.

Además del solvente, la radiación actúa directamente sobre la proteína. Una de las consecuencias de esta interacción, es la formación de *agujeros positivos* que se producen cuando la energía del fotón es suficiente para expulsar electrones de los átomos. En consecuencia, se forman radicales amino en el esqueleto de la proteína ([Rao & Hayon, 1974](#)).

En lo que a movilidad respecta, a 100 K los *agujeros positivos* están completamente inmovilizados. Sin embargo, los e_{aq}^- pueden migrar a temperaturas ≥ 77 K ([Jones et al., 1987](#)). Éstos últimos son móviles incluso a 5 K mediante *tunneling* ([Dick et al., 1998](#)). La migración de los electrones culmina al encontrar un

⁹ Este porcentaje depende de la energía de los rayos X, sin embargo se mantiene sin cambios significativos en el intervalo de energía comúnmente empleado para difractar cristales de proteína (5000-25000 keV).

¹⁰ Como mencionamos en la introducción, solo el 2 % del haz incidente interacciona con el cristal.

¹¹ Los números en paréntesis, que siguen a cada especie, corresponden a los valores G, definidos como el número de moléculas producidas por cada 100 eV absorbidos (Ward 1988).

enlace S–S u otro grupo con alta afinidad electrónica. Por otra parte, los protones sólo son móviles a temperaturas ≥ 115 K. Aunque el $H_2(g)$ permanece atrapado a temperaturas criogénicas, se ha demostrado que su acumulación es la responsable de la expansión de la celda unitaria (Meents *et al.*, 2010).

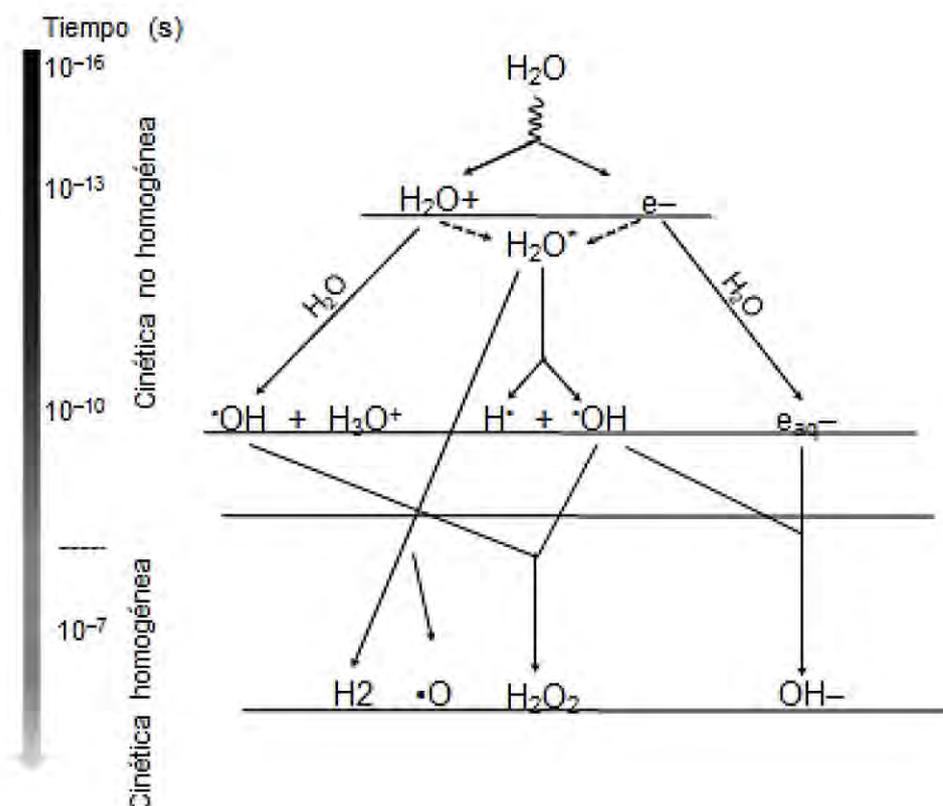


Figura 2.1 Cascada de reacción producida por la radiólisis. Las diferentes especies reactivas se muestran a sus respectivos tiempos de aparición. Modificado de Buxton 2008 (Buxton, 2008).

2.1.2. Difracción a temperaturas criogénicas

El diseño de un asa de rayón¹², que sostiene a los cristales por tensión superficial (Teng, 1990), hizo más accesible la técnica de crio–enfriamiento para la difracción de rayos X. Las ventajas de difractar a temperaturas de 100 K o menores

¹² Anteriormente los cristales se difractaban a temperatura ambiente en capilares sellados para evitar su deshidratación.

son: una mayor tolerancia a la radiación (los cristales toleran una mayor dosis absorbida que a temperatura ambiente), una mayor resolución de los datos finales porque el orden cristalino se mantiene durante mayor tiempo y es posible coleccionar múltiples *data-sets* a partir de un único cristal, lo cual facilita la determinación de fases por métodos anómalos. Tan relevante fue la implementación de este método que en la actualidad más del 90 % de las estructuras determinadas por rayos X se obtienen a temperaturas criogénicas.

A nivel local o específico, las especies reactivas generadas durante la irradiación con rayos X, causan, en orden reproducible, la reducción ([Adam et al., 2004](#); [Yano et al., 2005](#)) y radiólisis de metales ([Rice et al., 2000](#); [Evans et al., 2003](#); [Ramagopal et al., 2005](#); [Oliéric et al., 2007](#)), la ruptura de puentes disulfuro ([Ravelli & McSweeney, 2000](#); [Weik et al., 2000](#)), la descarboxilación de aspartatos y glutamatos ([Burmeister, 2000](#); [Fioravanti et al., 2007](#)), así como la deshidroxilación de tirosinas ([Burmeister, 2000](#)). Estas reacciones, además de causar modificaciones químicas, dan lugar a la desestabilización de la red cristalina y en consecuencia, la disminución de las intensidades de las difracciones y la pérdida de resolución. Tradicionalmente las intensidades se analizan al concluir la colecta de los datos por lo que los efectos del daño no son evidentes hasta el procesamiento de los datos.

En conclusión, la implementación de temperaturas criogénicas (100 K) durante la difracción de cristales disminuye la difusión, mas no evita la formación de especies reactivas. Dependiendo de la referencia que se considere, la criocristalografía incrementa entre 27-70 veces el tiempo de vida media, o la dosis que puede absorber un cristal de proteína difractado a temperatura ambiente (TA) ([Nave & Garman, 2005](#); [Kmetko et al., 2011](#)).

2.1.3. Intensidades como indicador del decaimiento

Desde el primer estudio de daño por radiación a cristales de proteína, se utilizaron las intensidades como parámetro del decaimiento de los cristales ([Blake & Phillips, 1962](#)). Se utiliza como parámetro la intensidad porque es un indicador experimental de la integridad de la red cristalina. Blake y Phillips compararon el comportamiento de las intensidades obtenidas al difractar un cristal de mioglobina durante 300 h¹³. Colectaron siete *data-sets*, irradiando el mismo intervalo de rotación del mismo cristal, y concluyeron que la pérdida de intensidad de las difracciones era directamente proporcional al tiempo de irradiación y por tanto proporcional a la dosis absorbida. Determinaron que un fotón de 8 keV ($\lambda=1.54 \text{ \AA}$) es capaz de alterar cerca de setenta moléculas de proteína y desordenar otras noventa. Modelando el comportamiento de la intensidad con el aumento de la dosis, encontraron que, a temperatura ambiente, el decaimiento de las intensidades era exponencial y se ajustaba a una función de primer orden descrita por la siguiente ecuación:

$$\frac{I_t}{I_0} = A_1 + A_2 \exp \left[- \left(\frac{B_2 \sin^2 \theta}{\lambda^2} \right) \right],$$

en donde I_t es la intensidad medida a un tiempo particular, I_0 la intensidad inicial, B es una medida del desorden, θ el ángulo de la difracción y λ la longitud de onda del haz incidente. De acuerdo a este modelo, tras la irradiación, el cristal se puede dividir en tres componentes:

¹³ Equivalentes a una dosis estimada de 0.6 MGy, aunque los autores utilizaron originalmente como unidad los Mrad (un MGy equivale a 100 Mrad).

- i. Una fracción, A_1 , que permanece sin dañarse y que es responsable de las difracciones de mayor resolución.
- ii. Otra fracción desordenada, A_2 , que contribuye únicamente a las difracciones de baja resolución.
- iii. Una porción altamente desordenada, $A_3 = 1 - (A_1 + A_2)$, que no contribuye a la difracción.

Al aumentar la dosis absorbida, la proporción de los componentes descritos por Blake y Phillips, van cambiando gradualmente hacia una población en la que predominará A_3 , la porción desordenada. Durante la difracción a TA era una práctica común y recomendada medir la intensidad de una difracción de alta intensidad al inicio (I_0) y seguir su decaimiento durante la colecta de datos. En ese entonces, se recomendaba desechar el cristal un vez que el valor de la intensidad de la difracción estaba en el intervalo $0.85-0.70I_0$ ([Blundell & Johnson, 1976](#)).

A TA, el decaimiento de la intensidad con respecto a la dosis es exponencial o de primer orden (Figura 2.2, círculos negros). Este comportamiento es el resultado de la combinación de procesos de daño primario y secundario: las especies radicales producidas *in situ* por la absorción del haz (daño primario) son móviles a TA y migran a lo largo del cristal siendo capaces de acceder a moléculas intactas o no afectadas aún por la radiación (daño secundario). En cambio, durante la difracción a 100 K, la dependencia de las intensidades con la dosis absorbida es de orden cero, debido a que se disminuye la difusión de los radicales libres. El mismo comportamiento se ha descrito a TA tras la adición de *radioprotectores* o *scavengers* (Figura 2.4, triángulos), quienes interceptan y neutralizan a las especies reactivas y producen un efecto análogo al de la difracción a temperaturas criogénicas ([Barker et al., 2009](#)).

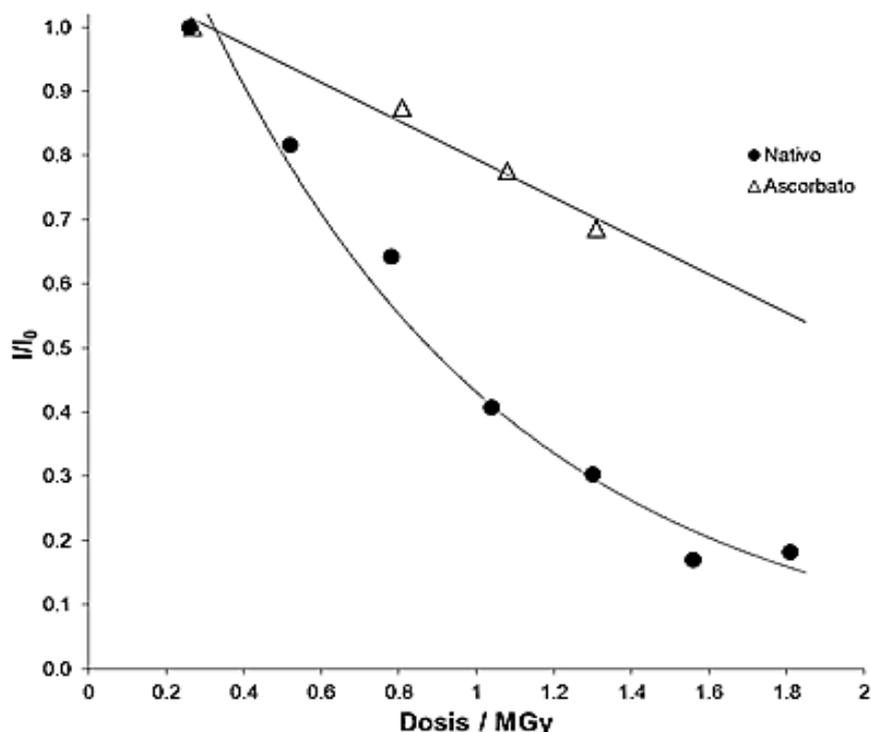


Figura 2.2 Dependencia de las intensidades con el aumento de la dosis y el efecto de la co-cristalización de HEWL con ascorbato de sodio 1 M sobre las mismas. Modificado de Barker, A. *et al.* 2008.

Hasta hace pocos años se consideraba que mientras mayor fuera el flujo y la intensidad del haz incidente, mejor sería la calidad de los datos, ignorando la cantidad de dosis depositada sobre el cristal. Sin embargo, el desarrollo de fuentes más brillantes de rayos X que depositan dosis mucho mayores sobre los cristales, ha convertido a este último aspecto en una parte esencial durante la colecta de datos. Para poner en contexto este trabajo, un cristal del cual se colecta un *data-set* de 90 °, con un $\Delta\phi^{14} = 1^\circ$; 90 imágenes colectadas en un ánodo rotatorio¹⁵, absorbería una dosis aproximada de 0.07 MGy (Barker *et al.*, 2009). En cambio, un *data-set* idéntico obtenido del mismo cristal pero colectado en la línea ID 14-4 del ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), una de las líneas más intensas en el

¹⁴ El $\Delta\phi$ son los grados de rotación por cada imagen que se colecta.

¹⁵ En específico un *Microstar* de Bruker.

mundo, resultaría en una dosis absorbida de hasta 25 MGy. Si tomamos en cuenta que la dosis media que puede recibir un cristal de HEWL es de unos 12 MGy ([De La Mora et al., 2011](#)) y que en algunas circunstancias (grupo espacial, método para determinar fases, etc.) es necesario coleccionar más de 90 imágenes, la dosis absorbida estaría por encima de la dosis tolerable.

En la actualidad el daño por radiación es un aspecto esencial de la colecta de datos y debe ser tomado en cuenta durante la determinación de estructuras de biomoléculas por el método de difracción de rayos X.

2.1.4. Mitigando el daño por radiación

Por todo lo anterior, diferentes esfuerzos se han abocado en desarrollar métodos que mitiguen el daño por radiación a temperaturas criogénicas. Los más promisorios son tres: difracción a temperaturas ≤ 77 K (utilizando He(I)), difracción a altas energías y el empleo de *radioprotectores* o *scavengers* de especies radicales.

En el intervalo de temperatura de 5-50 K la movilidad de las especies radicales es aún menor que a 100 K. En particular, se ha observado que a 50 K el daño específico a puentes disulfuro se reduce en un factor de cuatro en comparación con el observado a 100 K ([Meents et al., 2007](#)). En cuanto al daño global, las muestras pueden tolerar entre 2.6–3.9 veces una mayor dosis¹⁶ ([Meents et al., 2010](#)). Por lo tanto, se ha sugerido que la difracción a 100 K no es la condición óptima para disminuir los efectos de la radiación en experimentos de difracción de cristales de proteína.

La difracción a altas energías tiene como fundamento la disminución en la contribución del efecto fotoeléctrico (Figura 2.3). Incluso antes de conocerse la

¹⁶ Esto es tomando como parámetro el valor R_{freeze} de cristales de la elastasa y la insulina cúbica.

dependencia de la energía sobre el daño por radiación se propuso que la irradiación a altas energías (longitudes de onda más cortas) pudiera ofrecer beneficios como:

- i. una disminución considerable de la absorción de la radiación que se manifestaría como una disminución de los PDAs.
- ii. disminuir la variabilidad entre datos de distintos cristales, conduciendo a una mayor precisión de las diferencias isomorfas y anómalas.
- iii. ensanchamiento de la conicidad del patrón de difracción, permitiendo mayores distancias cristal-detector y por lo tanto un aumento en la proporción señal/ruido.
- iv. mayores posibilidades para estimar las fases en los límites K y L de elementos pesados.
- v. un aumento en el 'tiempo de vida de las muestras' ([Arndt, 1984](#)).

Aunque en la actualidad no existen líneas experimentales de alta energía diseñadas para cristalografía de proteínas, se ha mostrado que a 55.6 keV es posible obtener tasas de daño por radiación menores a las observadas a 12 keV ([Jakoncic et al., 2006](#)).

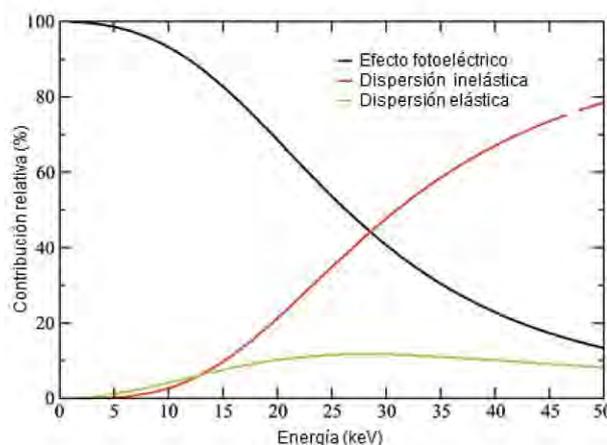


Figura 2.3 Contribución relativa de los tres tipos de interacción radiación–materia que ocurren durante irradiación de cristales de proteína con rayos X. Modificado a partir de Paithankar & Garman 2010.

El tercer enfoque es el uso de sustancias radioprotectoras que pueden incorporarse a los cristales por medio del remojado o la co-cristalización. La adición de estas especies químicas mitiga las reacciones desencadenadas por los radicales sobre la red cristalina. Junto con su eficiencia a temperatura ambiente (triángulos en la Figura 2.2), se ha demostrado que, dependiendo de las características de la molécula, es decir, si es un eficiente captor de e_{aq}^- o de $\cdot OH$, incrementan en mayor o menor medida la dosis media ($D_{1/2}$)¹⁷ tolerable por un cristal de proteína ([Barker et al., 2009](#)).

Aunque cada uno de los tres métodos descritos anteriormente se basa en fundamentos distintos, el mejoramiento de los mismos depende del nivel de comprensión que tengamos sobre las bases físico-químicas que subyacen al daño por radiación. En ese sentido este segundo capítulo explora las causales químicas del daño y sus efectos sobre cristales de lisozima, a través del uso de dos *scavengers* que actúan de manera distinta: nitrato (NO_3^-), un eficiente aceptor de electrones y ascorbato, una molécula con mayor afinidad por los radicales $\cdot OH$. Las distintas propiedades de los *radioprotectores* utilizados, nos permitirán describir, de manera independiente, el efecto de los radicales $\cdot OH$ y el de los $e_{(aq)}^-$ sobre cristales de lisozima.

El capítulo se divide en dos partes: en la primera, analizamos el efecto de la adición de nitrato de sodio a HEWL tanto en solución como en los cristales. Con ello, pretendemos demostrar que el nitrato es un eficiente captor de e_{aq}^- . En la segunda parte, el analizamos el decaimiento de las intensidades de las difracciones en un cristal nativo y el efecto de la adición de ascorbato de sodio y nitrato. Este

¹⁷ La dosis media se define como la energía por unidad de masa ($Gy=J\cdot kg^{-1}$) a la cual la intensidad global es la mitad de la intensidad observada a la dosis cero.

último acercamiento para comprender a mayor detalle las bases químicas del daño por radiación.

2.2. Materiales y métodos

Todos los reactivos utilizados, incluyendo la HEWL monomérica (129 residuos, ~ 14.3 kDa) fueron de grado ultrapuro y adquiridos de Sigma a menos que se especifique lo contrario.

2.2.1. Microespectrofotómetro en línea

Los espectros UV-Visible de soluciones y cristales de HEWL acoplados a la irradiación con rayos X fueron colectados a 100 K con el microespectrofotómetro (en línea) de la línea ID-14-4 del sincrotrón europeo (ESRF) ([McGeehan et al., 2009](#)). Los espectros de HEWL en solución se colectaron de soluciones crioenfriadas a 100 K conformadas por lisozima a 35 mg ml⁻¹ y 30 % glicerol y solución amortiguadora de acetato de sodio 100 mM pH 4.7. El efecto del nitrato de sodio fue probado en una solución 35 mg ml⁻¹, 0.5 M de nitrato de sodio y 30 % glicerol en 100 mM de acetatos pH 4.7.

La orientación del asa de rayón fue seleccionada de tal manera que al inicio de la colecta se obtuviera el máximo valor de absorbancia en la región de los 280 nm. Para grabar los espectros se utilizó el software *OOIbase32* (Ocean Optics). Los espectros se colectaron en el intervalo 200-1100nm. Los barridos fueron colectados cada 307 ms durante un período de 260 s (4 min 20 s). Previo a la irradiación con rayos X, se colectaron espectros durante 20 s para establecer un blanco. Tras los 20 s de estabilización se expuso la muestra a 30 irradiaciones de 1s, con 3 s entre cada irradiación, correspondientes al tiempo de lectura del detector

(120 s en total) y tras la última irradiación se colectaron barridos durante 120 s con el obturador cerrado. El asa conteniendo la solución de proteína, o los cristales, se rotó con un $\Delta\phi = 1^\circ$ durante cada una de las irradiaciones. El haz incidido sobre la muestra fue de dimensiones $50 \times 100 \mu\text{m}$, con $\lambda = 0.939$ (13.2 keV), a una transmisión del 100 %. Tres cristales, uno nativo y dos remojados en NaNO_3 , obtenidos como se describe a continuación, fueron utilizados para obtener espectros UV-Vis durante la difracción.

2.2.2. Cristalización

La HEWL fue cristalizada en el grupo espacial $P4_32_12$ con dimensiones de celda $a = b = 77.78 \text{ \AA}$, $c = 38.45 \text{ \AA}$, $a = b = c = 90^\circ$ y con 38% de solvente. Los cristales se obtuvieron por el método de gota colgante mezclando $4 \mu\text{l} + 4 \mu\text{l}$ de proteína 50 mg ml^{-1} en una solución amortiguadora 100 mM acetato de sodio a pH 4.7 y una solución precipitante compuesta por 100 mM acetato de sodio pH 4.7 y NaCl al 10 % (p/v). Previo a la difracción, los cristales se remojaron durante 1 minuto en soluciones crio-preservadoras, en las que reemplazó H_2O de la solución precipitante original por 30 % glicerol (v/v). Los cristales de HEWL conteniendo ascorbato se obtuvieron por co-cristalización, sustituyendo, de nueva cuenta, en la solución precipitante H_2O por 1.0 M de ascorbato de sodio. Los cristales de NaNO_3 se obtuvieron remojando los cristales en la misma solución crio-protectora descrita anteriormente, pero en este caso reemplazando solvente por 0.5 M nitrato de sodio (NaNO_3).

Se difractaron cinco cristales: uno *nativo* (*nat*) crecido en solución precipitante y en ausencia de *radioprotector*, uno co-cristalizado con ascorbato (*asc*) y tres remojados en nitrato, de los cuales, dos fueron remojados durante 4

minutos (denominados *nitI4* y *nitII4*) y el restante remojado durante 8 minutos (*nitIII8*).

2.2.3. Análisis del decaimiento de intensidades

Para el método de intensidades globales, los *data sets* secuenciales fueron integrados en *MOSFLM* ([Leslie, 2006](#)). Las difracciones integradas fueron ordenadas, escaladas y convertidas en amplitudes con los programas *SORT*, *SCALA* y *TRUNCATE* respectivamente ([Evans, 2006](#)). Diez ciclos de afinamiento y minimización de cuerpos rígidos, seguidos por varios ciclos de afinamiento restringido fueron realizados para los primeros seis *data sets* de cada cristal, excepto para *nit I4* del cual sólo fue posible afinar los primeros cinco. Puesto que el grupo espacial y dimensiones de celda fueron idénticas a las del modelo empleado (depósito PDB 2W1L), no fue necesario realizar remplazo molecular. Ambos tipos de afinamiento, tanto el de cuerpos rígidos como el restringido, fueron realizados en el programa *REFMAC5* ([Murshudov et al., 1997](#)), que, al igual que los programas *SORT*, *SCALA* y *TRUNCATE*, es parte del paquete *CCP4* ([The CCP4 suite: Programs for protein crystallography, 1994](#)). Para la construcción y ajuste manual del modelo, así como la adición de aguas se utilizó el programa *COOT* ([Emsley et al., 2010](#)). Por la pérdida de resolución causada por el daño por radiación, los *data sets* colectados a 1.7 Å, fueron afinados y comparados entre sí a una resolución de 2.0 Å, seleccionada por ser la franja de mayor resolución en la que los valores de $I/\sigma(I)$ se mantuvieron ≥ 2.0 durante todo el intervalo de dosis absorbida explorado. El afinamiento restringido se continuó hasta alcanzar valores de $R \leq 0.20$ y $R_{\text{free}} \leq 0.25$. La intensidad 'global', $Mn(I_{\text{mean}})$, es calculada en *SCALA* y representa el promedio de todas las intensidades contenidas en cada *data set*.

Alternativamente, comparamos el comportamiento de las intensidades equivalentes con respecto a la dosis, mediante el factor de decaimiento (R_d). Este valor R_d , es la diferencia en intensidad de difracciones únicas $h k l$ presentes en imágenes separadas por una diferencia de dosis (ΔD). Este método es más fino que el de intensidades globales, porque compara las intensidades de difracciones equivalentes en lugar de comparar únicamente el promedio de todas ellas. El procesamiento de datos fue totalmente distinto para este método. Los *data sets* secuenciales fueron integrados y escalados con *XDS* y *XSCALE* ([Kabsch, 2010](#)). Tras el escalamiento, el programa *XDSSTAT* calcula el factor de decaimiento R_d ([Diederichs, 2006](#)).

El cálculo de la dosis se realizó con el programa *RADDDOSE* ([Murray et al., 2004](#); [Paithankar et al., 2009](#); [Paithankar & Garman, 2010](#)). Éste calcula la dosis a partir de los parámetros del haz de rayos X incidente y de las propiedades del cristal. Entre los parámetros del haz se encuentran: energía, perfil (meseta o gaussiana), tamaño o área y flujo, este último calculado mediante diodos de silicón ([Owen et al., 2009](#)) acoplados a la estación terminal de la línea *ID 14-4* ([McCarthy et al., 2009](#)). Las propiedades del cristal tomadas en cuenta son: volumen, celda unitaria, grupo espacial, número de monómeros por celda y composición. Además de la composición de la proteína (composición por residuo= $5C + 1.35N + 1.5O + 8H$), se tomó en cuenta la concentración de sodio (Na) en la solución precipitante y en los cristales sumergidos en NaNO_3 para considerar el efecto del sodio sobre la dosis.

Se utilizó un haz de $50 \times 100 \mu\text{m}$ con perfil de gaussiana. El tamaño del cristal fue medido con el microscopio integrado en la línea *ID 14-4* rotando el cristal en las tres direcciones x y z (Tabla 1).

Tabla 1 Parámetros de la colecta de datos. Los cinco cristales difractaron originalmente (dosis cero) más allá del límite de resolución determinado por el detector (1.7 Å).

	<i>nat</i>	<i>asc</i>	<i>nitl4</i>	<i>nitll4</i>	<i>nitlll8</i>
Dimensiones del cristal (µm)	50 × 40 × 25	60 × 50 × 20	50 × 50 × 25	55 × 50 × 30	60 × 40 × 30
Tasa de dosis (kGy s ⁻¹)	15.60	26.34	30.00	26.80	8.60

2.3. Resultados

2.3.1. Microespectrofotometría

Utilizamos microespectrofotometría UV-Visible acoplada a la difracción de rayos X, porque permite observar en tiempo real la formación de las dos especies reactivas predominantes que se generan durante la irradiación de cristales de proteína: e_{aq}^- y $\cdot OH$. La formación de los primeros, se observa por la aparición de un pico con absorción máxima a ~ 580 nm, mientras que la formación de radicales $RS\cdot$ se caracteriza por la aparición de un pico a ~ 400 nm ([Southworth-Davies & Garman, 2007](#); [McGeehan et al., 2009](#)). Estas dos especies radicales aparecen durante la difracción de cristales de proteína y se cree son los principales responsables del decaimiento de las propiedades de difracción del cristal.

Durante la irradiación de la solución *nativa* de proteína observamos cambios en dos regiones del espectro UV-Visible, un incremento en la región de los 500-650 nm con un máximo en 580 nm y otro aumento en la región < 450 nm que se observa como un hombro con un máximo a los 400 nm. La señal con máximo de absorbancia de 580 nm, atribuible a la producción de electrones solvatados, aparece durante los primeros ms de irradiación hasta alcanzar un máximo tras concluir la exposición a los rayos X (alrededor de los 50 s). Tras el cierre del

obturador, la absorbancia en esta región, comienza a decaer gradualmente hasta alcanzar un valor cercano al nivel basal al inicio de la lectura (Figura 2.4 a). Simultáneo al aumento de absorción observado a los 580 nm, se observa un incremento en la región cercana a los 400 nm, atribuible a la formación de aniones radicales disulfuro ($RS-SR'^{\bullet-}$). Después de los 140 s, el pico de 400 nm decae ligeramente pero sin acercarse siquiera a la absorbancia original. Esta observación es congruente con el mayor tiempo de vida que tiene el radical disulfuro con respecto a los electrones acuosos ([McGeehan et al., 2009](#)). En conjunto, la disminución y aumento de la absorbancia observados en las regiones de los 580 nm y a 400nm, a partir de los 50 s y coincidentes con el cierre del obturador, sugieren que una fracción de los electrones solvatados reaccionan con la población restante de disulfuros, disminuyendo así la concentración de los primeros y aumentando la de los radicales $RS-SR'^{\bullet-}$. La absorbancia a 400 nm debe estabilizarse cuando la concentración de e_{aq}^- en la solución, no es suficiente para continuar reduciendo los disulfuros.

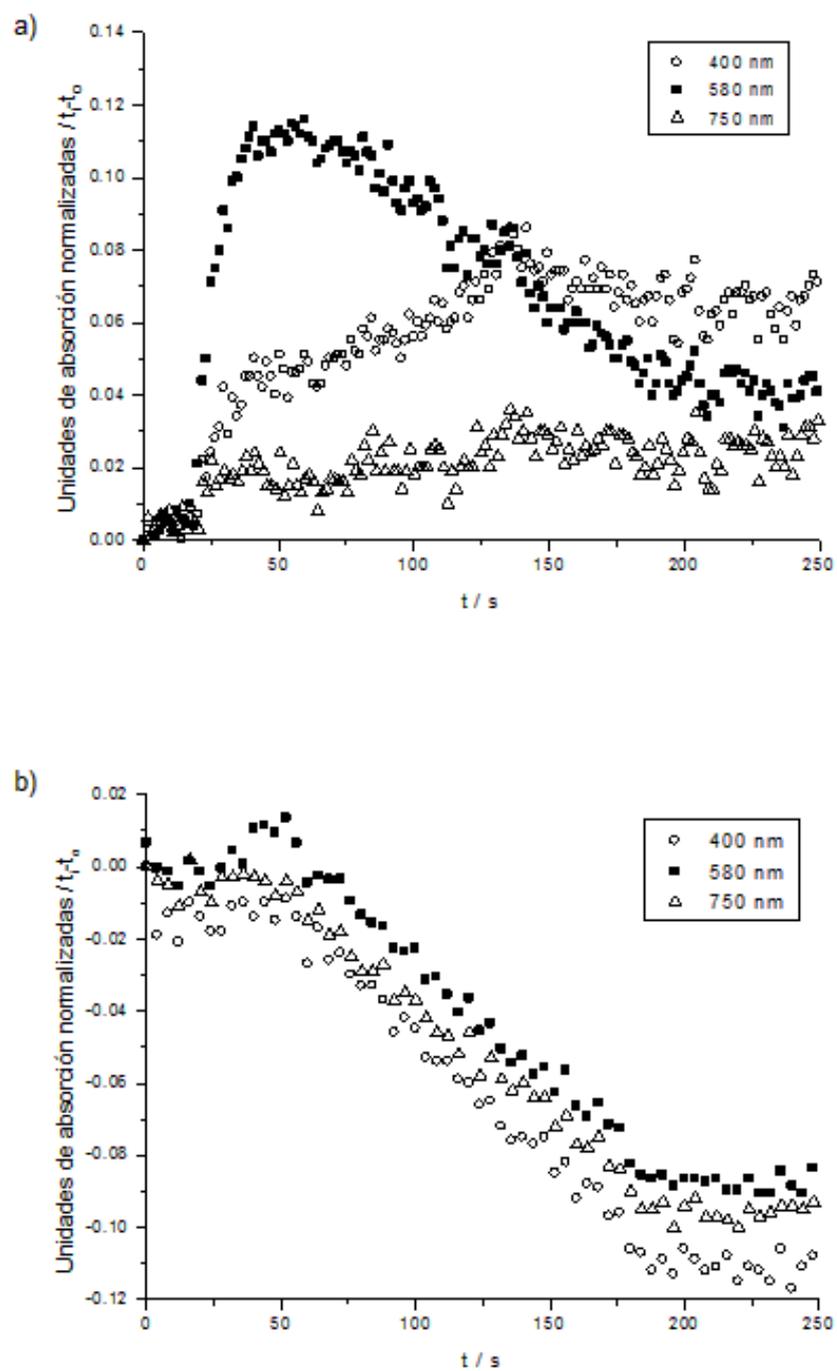


Figura 2.4 Formación e_{aq}^- a 580 nm y de radicales RS-SR $^{\cdot-}$ a 400 nm en a) una solución 30 mg · ml $^{-1}$ de HEWL y b) la misma solución con 0.5 M de NaNO $_3$.

Para probar la eficiencia del nitrato como *scavenger* de electrones en la misma solución de lisozima colectamos espectros UV-Visible durante la irradiación con

rayos X de una solución de HEWL a la cual añadimos 0.5 M de NaNO_3 . Como puede apreciarse en el inciso *b*) de la Figura 2.4, ninguna de las dos señales, ni 400 ni 580 nm, observadas en la solución nativa de HEWL, aparecen en presencia de NaNO_3 . La disminución de la absorbancia, en todo el intervalo del espectro, es consecuencia de la rotación de la muestra con respecto al haz de rayos X. El control a 750 nm confirma esa observación.

En cristales de HEWL, los resultados siguen la lógica de lo observado en solución: la presencia de nitrato eliminó la aparición de e_{aq}^- (Figura 2.5).

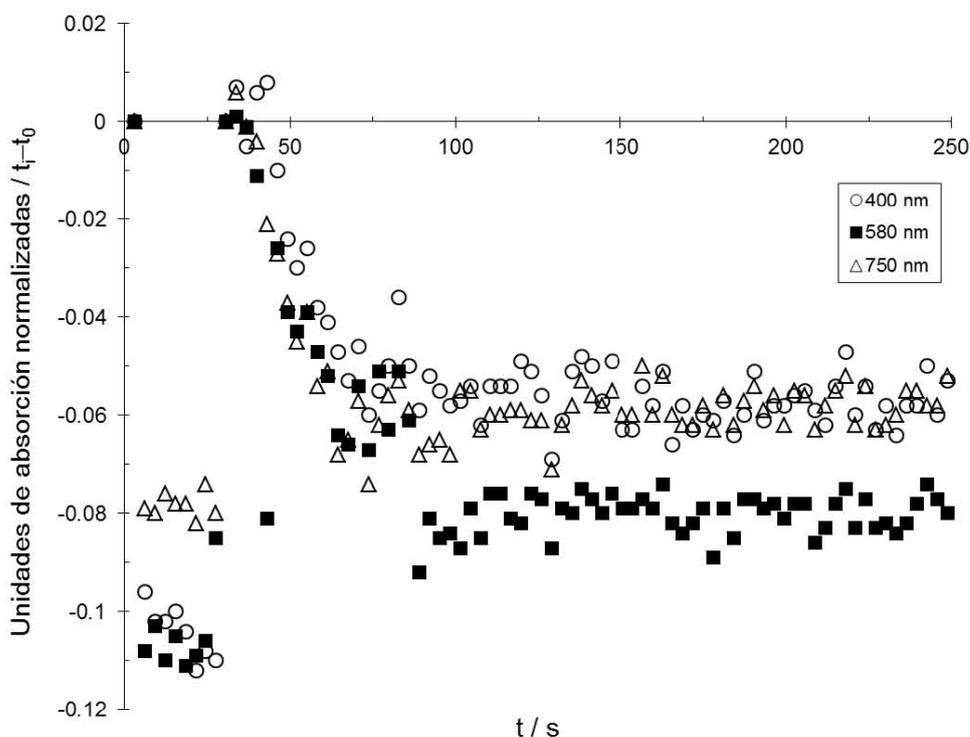


Figura 2.5 Espectro de un cristal de proteína remojado en 0.5 M de nitrato de sodio.

2.3.2. Análisis de intensidades globales

Para mostrar el efecto de los *scavengers* sobre la dosis media ($D_{1/2}$) tolerada por los cristales de HEWL, analizamos el comportamiento de las intensidades de las

difracciones con respecto al aumento de la dosis absorbida, por dos métodos independientes.

Primero, analizamos el decaimiento de las intensidades globales, relacionadas con la disrupción de la red cristalina, graficando la pérdida de intensidad¹⁸ contra la dosis absorbida (Figura 2.6). El parámetro elegido para la comparación de los cinco cristales difractados fue la dosis media ($D_{1/2}$), que designa la dosis a la que el valor de las intensidades globales equivale al 50 % del valor inicial ([Barker et al., 2009](#)). Como se puede observar en la Figura 2.6, la adición tanto de ascorbato como de nitrato aumenta en un factor de dos la $D_{1/2}$ en cristales de HEWL. Mientras que para el cristal nativo (*nat*) se calculó una $D_{1/2} = 12.5$ MGy, la adición de nitrato incrementó el valor de $D_{1/2}$ a 22.0 MGy en el cristal *nit14* y a 19.1 MGy para el cristal *nit14*. De igual forma, la presencia de ascorbato aumentó el valor $D_{1/2}$ a 22.2 MGy para el cristal *asc*. El cristal *nit118* tiene un comportamiento muy similar al *nativo*, con una $D_{1/2} = 10.8$ MGy. Esta aparente contradicción, se puede explicar porque el mayor tiempo de remojado empleado en este cristal pudo desestabilizar la red cristalina.

¹⁸ Obtenida al dividir la intensidad media del data set ' I_n ' sobre la intensidad media el data set inicial (I_0).

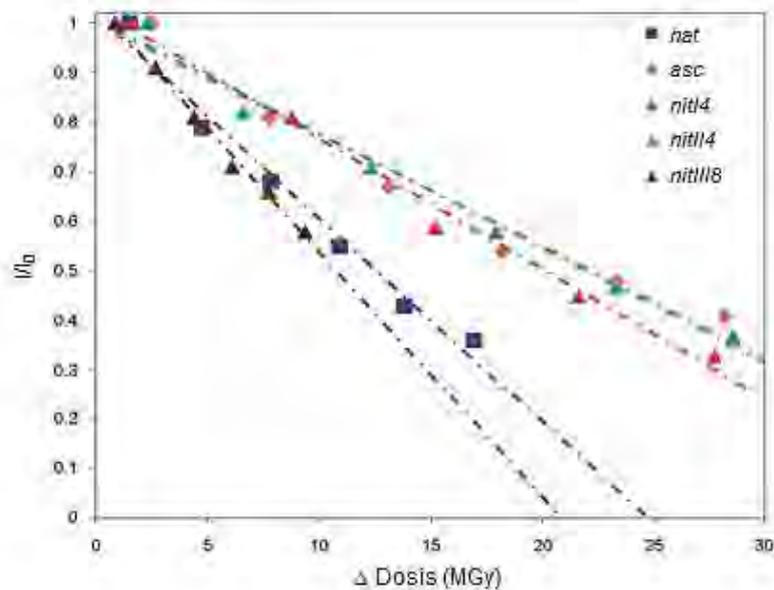


Figura 2.6 Comparación de la tolerancia de cristales de lisozima a la dosis de radiación y efecto de captores de radicales. Análisis por el método de intensidades globales.

2.3.3. Factor R de decaimiento (R_d)

Alternativamente, comparamos el decaimiento de las intensidades de las difracciones equivalentes a lo largo de todo el periodo de irradiación por medio del factor R_d . El análisis del factor de decaimiento, R_d , mostró algunas diferencias con los derivados de la comparación de intensidades globales. A diferencia de la gráfica anterior, el aumento de R_d indica una menor tolerancia a la dosis absorbida (Figura 2.7). En congruencia con el análisis de intensidades globales, los cristales *ascorbato* y *nitrato 14* muestran mayor tolerancia a la pérdida de intensidad entre reflexiones equivalentes. Aunque no hay un valor equivalente a la dosis media ($D_{1/2}$), utilizamos como punto de comparación la dosis a la cual R_d alcanza un valor de 0.3. Tanto en el cristal *ascorbato* (26 MGy) como en dos de los sumergidos en nitrato (23 MGy para *nit/14* y >25 MGy para *nit/18*), la dosis a la que $R_d = 0.3$, equivale casi al doble de la observada en el cristal *nat* (13 MGy). Mediante este método, el cristal *nit/14* tiene un

comportamiento muy similar al cristal *nat*, en contraste con lo observado anteriormente mediante el análisis de intensidades globales, en el cual el cristal que se comportó de manera similar al nativo fue el cristal *nitIII8*. Estas diferencias indican que, al menos para algunos cristales, los resultados son susceptibles al procesamiento de datos y que el tiempo de remojado puede tener efectos distintos en diferentes cristales sobre la tolerancia a la dosis. Vale recalcar que ninguno de los cristales tuvo una tolerancia significativa menor a la del cristal nativo.

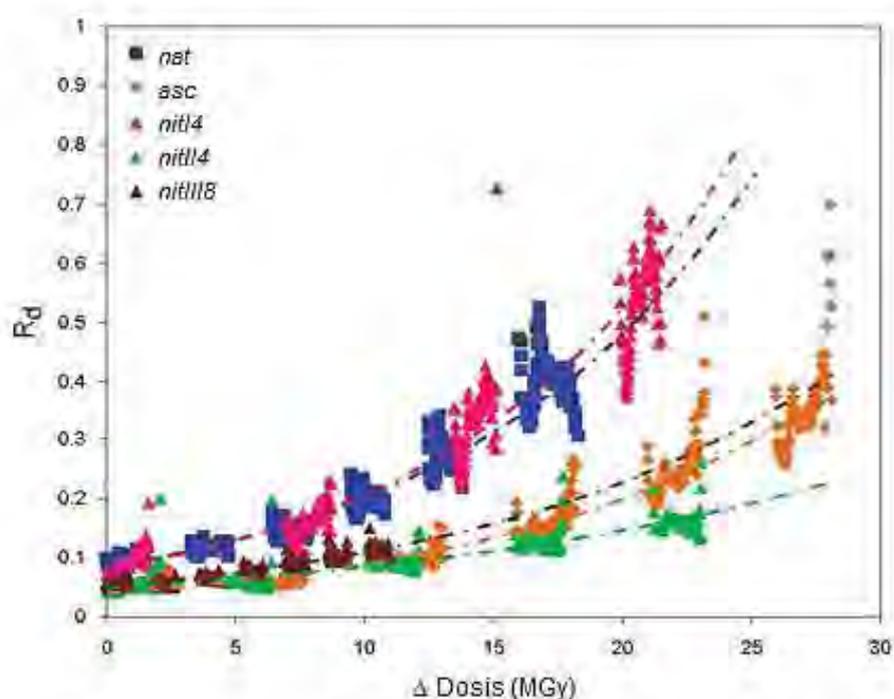


Figura 2.7 Comparación de la tolerancia de cristales de lisozima a la dosis de radiación y efecto de captores de radicales. Análisis por el método de factor de decaimiento de intensidades equivalentes.

2.3.4. Daño específico a nivel de densidad electrónica

Antes de comparar el efecto de los radioprotectores, fue muy interesante observar la presencia de moléculas de ascorbato y de nitrato en los cristales utilizados durante este trabajo. Como se puede observar en la Figura 2.7 a, en el cristal *asc* observamos densidad electrónica en la que ajustó correctamente una

molécula de ascorbato estabilizada por un ion sodio. De igual forma, en los mapas $2F_o - F_c$ calculados para los tres cristales remojados en NaNO_3 , observamos cuatro regiones, ausentes en el cristal nativo, con densidad electrónica a un nivel de 1.2σ , en las que se ajustaron correctamente aniones nitrato (NO_3^-). Los cuatro NO_3^- están localizadas en: i) la capa de hidratación de la proteína y a distancia de puente de H, de los grupos amida de los residuos Asp68 y Thr69, ii) en la vecindad del puente disulfuro Cys6–Cys127 (Figura 2.7 b), iii) a distancia de puente de H del grupo amida de la Ile88 y iv) a distancia de puente de H de Leu25 y Gly26.

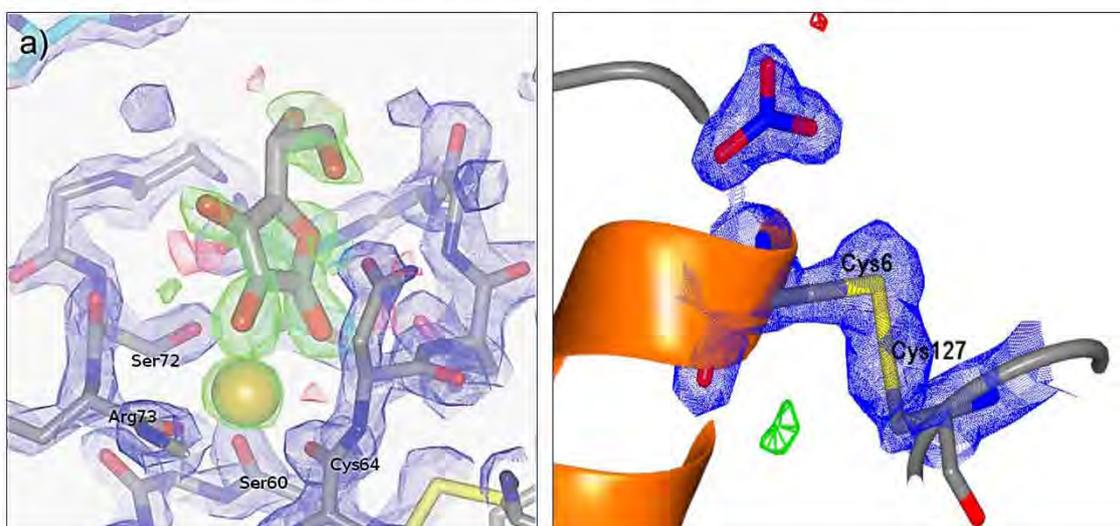


Figura 2.7 Densidad electrónica correspondiente a a) ascorbato de sodio y b) nitrato en los cristales co-cristalizados y remojados respectivamente en los *scavengers*.

Comparamos entonces la densidad electrónica de las estructuras a diferentes dosis mediante mapas de diferencia o de sustracción. Al sustraer la densidad electrónica del *data set* a menor dosis (d_1) de la densidad electrónica de los *data sets* a dosis crecientes (d_2, d_3, d_4, d_5 y d_6) se obtienen densidades electrónicas positivas que indican la presencia de átomos¹⁹ que no se encontraban en el *data set* original. Lo más común, sin embargo, es encontrar regiones o sitios en

¹⁹ Siendo estrictos de electrones.

los que se observa densidad electrónica negativa, es decir, la desaparición de densidad electrónica con el aumento de la dosis absorbida.

Aunque a nivel global, tanto ascorbato como nitrato protegen en a misma magnitud contra el daño por radiación, a nivel de la densidad electrónica se observan diferencias sobre la protección específica de residuos de aminoácido. En los mapas de densidad electrónica derivados de los cristales difractados a dosis crecientes notamos que en el cristal *asc* hay una tendencia a proteger contra la descarboxilación de los residuos Asp y Glu con respecto al cristal nativo y a aquellos remojados en NaNO_3 . El mejor ejemplo de ello es lo ocurrido en el residuo Asp52. Mientras que en el cristal nativo, el daño al Asp52 ocurre desde los 7.8 MGy, un daño equiparable sobre el grupo carboxilo de observa a 12.3 MGy en el cristal sumergido en nitrato, pero hasta los 18.2 MGy en la proteína co cristalizada con ascorbato (**Figura 2.8**).

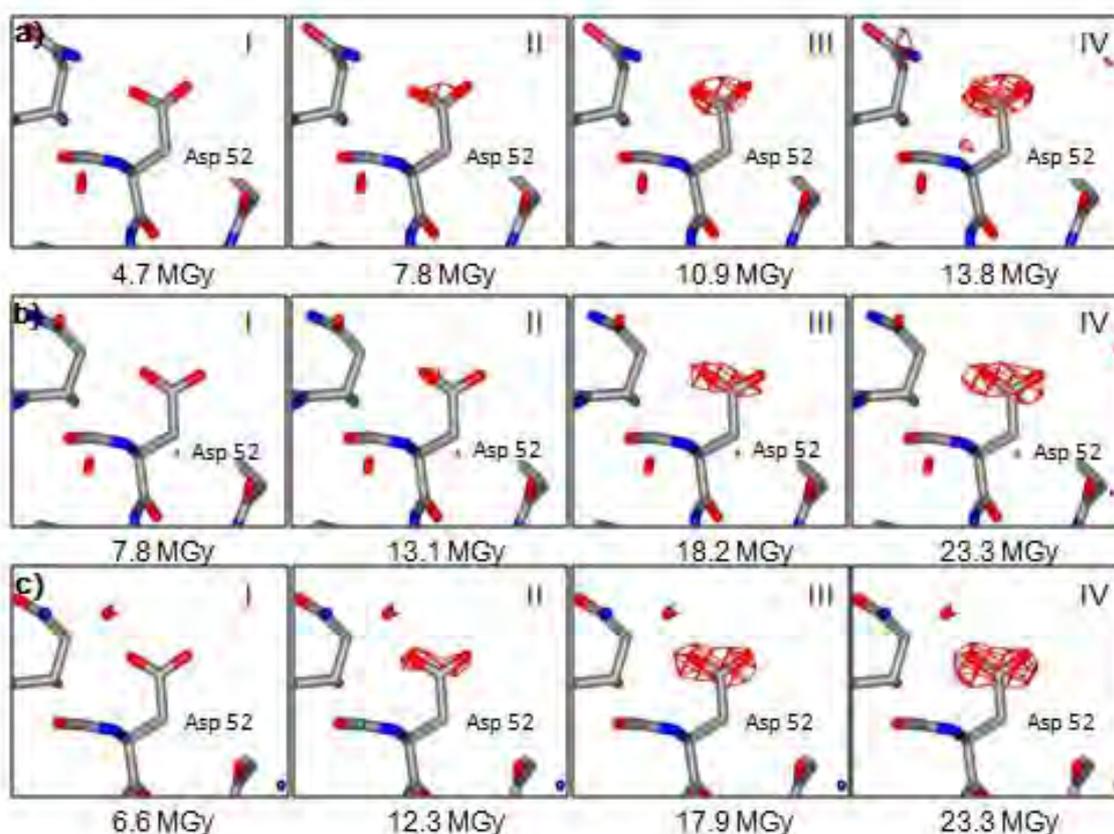


Figura 2.8 Descarboxilación del residuo Asp52 en a) cristal es de HEWL nat'vo, b) co-cristalización con ascorbato y c) remojado en nitrato.

A diferencia del ascorbato, que mostró una mayor protección contra la descarboxilación, el nitrato es un mejor atenuador de la ruptura de puentes disulfuro. A nivel de densidad electrónica el daño observado en el cristal *nat* a una dosis de 4.7 MGy es comparable al observado a 17.9 MGy en el cristal *nit/4*, lo que resulta en una protección a la ruptura de disulfuros en un factor cercano a cuatro (Figura 2.9 a y c). En el cristal *asc*, un nivel de daño comparable, es observado a 13.1 MGy, resultando en un factor de protección de 2.8 con respecto al cristal *nat* (Figura 2.9 a y b). Este aumento en la protección contra la ruptura de disulfuros fue observada en los tres cristales remojados en nitrato, aunque con algunas diferencias en la magnitud de la protección.

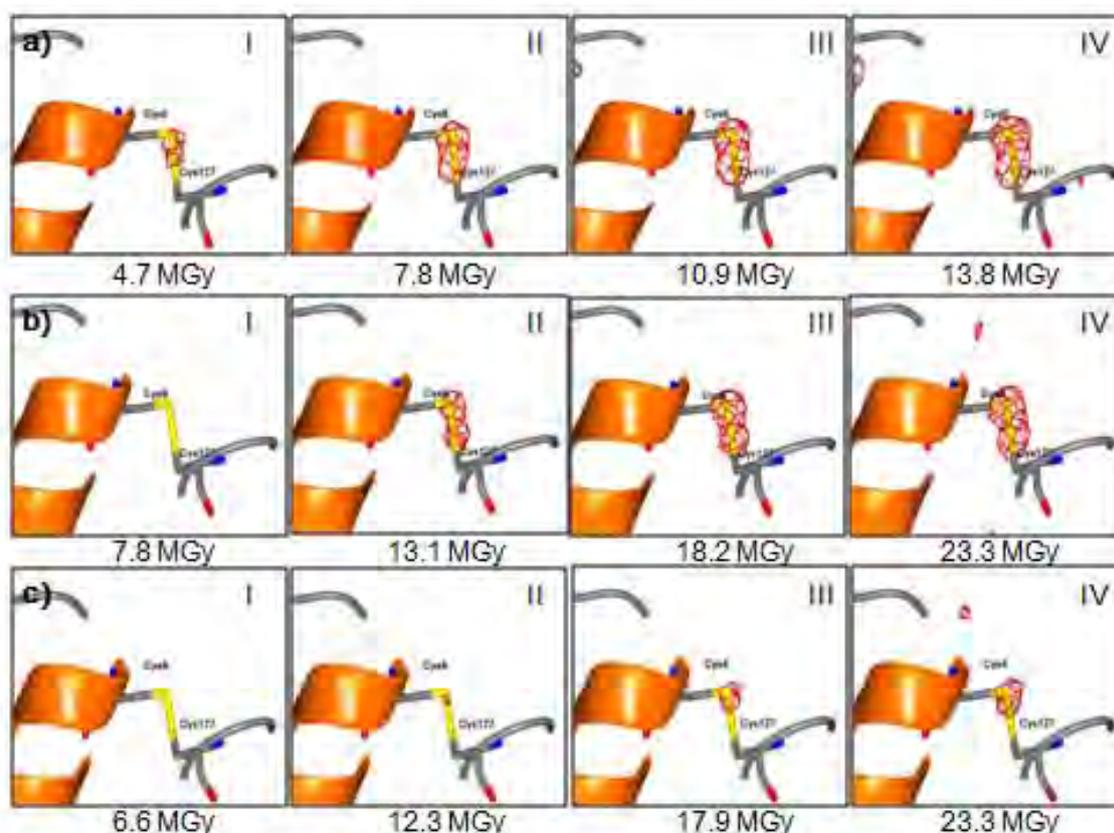


Figura 2.9 Ruptura del puente disulfuro Cys6–Cys127 en un cristal de a) isozima nativo, b) isozima + ascorbato y c) isozima + nitrato.

En todos ellos, sin embargo, la protección ante la ruptura de los enlaces S–S se mantiene a dosis mayores que la $D_{1/2}$, lo cual sugiere que, el decaimiento de la intensidad o el desorden cristalino ocurre por vías diferentes a la desestabilización causada por la ruptura de puentes disulfuro. En particular, en el cristal *nitIII8* que tuvo una $D_{1/2}$ y tasa de irradiación (Gy s^{-1}) muy similar al nativo, no observamos la ruptura de ninguno de los cuatro puentes disulfuro.

Aún más interesante, fue el observar que la densidad electrónica de los nitratos disminuye conforme aumenta la dosis, indicando que, durante el transcurso de la irradiación, los aniones NO_3^- se transforman en NO_2^- y luego en NO. Como ejemplo, mostramos la reducción del nitrato localizado en la vecindad del puente disulfuro Cys6–Cys127. Durante la reducción del nitrato, evidenciada por la pérdida de un O a una dosis de 6.6 MGy (Figura 2.10 b) la densidad electrónica del puente disulfuro permanece intacta. En contraste, en el cristal nativo, a 4.7 MGy, ya se observa daño en el mismo puente disulfuro (Figura 2.9 a). A una dosis mucho mayor, 23.3 MGy, la densidad electrónica del NO_2 resultante, desaparece y junto con ello comienza a observarse daño en el enlace disulfuro, mostrado como densidad electrónica negativa en el mapa F_o-F_c (Figura 2.10 f en color rojo).

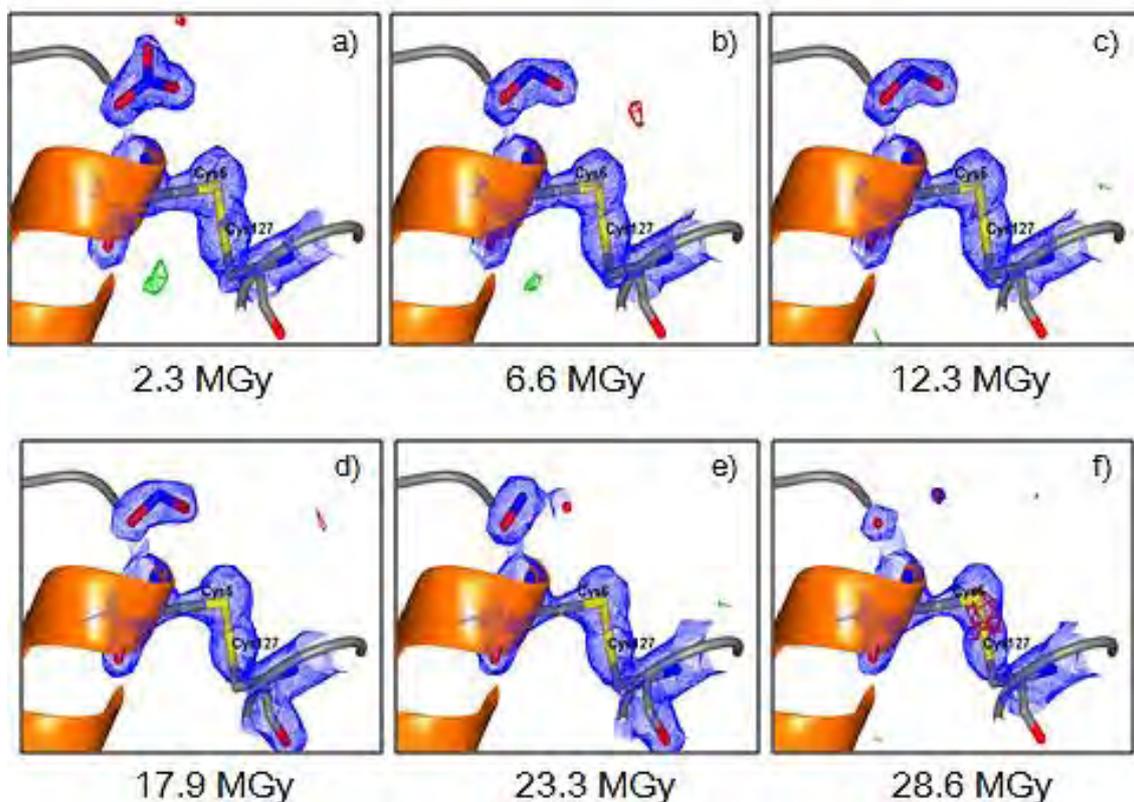


Figura 2.10 Reducción de la densidad electrónica en el nitrato adyacente al puente disulfuro formado entre los residuos Cys6–Cys127.

2.4. Discusión

Nuestros resultados demuestran que si bien hay una relación clara entre el daño específico, en particular ruptura de disulfuros y descarboxilación de residuos ácidos, y el daño global (pérdida de poder de difracción), ambos deben ser considerados por separado.

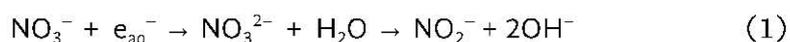
La adición de *scavengers* muestra un incremento en un factor de dos, de la $D_{1/2}$ tolerada por los cristales de HEWL, pasando de 12.5 MGy en el cristal nativo a 22.2 MGy y 22.0 MGy para *nitII4* y *asc*, respectivamente. A su vez, la co-cristalización con ascorbato, aumenta la tolerancia de los Asp y Glu a la descarboxilación. En el caso más extremo, el daño observado a 10.9 MGy en el

crystal nativo, corresponde al observado a 18.2 MGy en el cristal *ascorbato* (Figura 2.8 a y b). En cambio, la presencia de nitrato en los cristales solo incrementa la tolerancia a la descarboxilación en unos 4.5 MGy (de 7.8 a 12.3 MGy en los cristales *nat* y *nitII4* respectivamente).

La presencia de nitrato en los cristales, protege de forma más eficiente contra la ruptura de disulfuros que contra la descarboxilación. En los tres cristales remojados en nitrato, la densidad electrónica de los enlaces S-S se mantienen intacta, aun cuando la dosis absorbida haya superado el valor de $D_{1/2}$. Esto sugiere que otros factores como descarboxilación y modificación de la red de aguas (o puentes de H) son quienes conducen a la pérdida del orden cristalino, reflejado experimentalmente como la disminución de la intensidad de las difracciones.

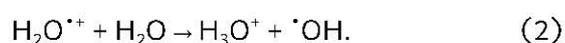
La variabilidad observada entre cristales de nitrato, es común en este tipo de trabajos porque la concentración final de la molécula al interior del cristal es muy variable (Nowak et al. 2009), pues depende de la difusión, tamaño del cristal, temperatura y se ha demostrado que puede ser determinante en el efecto neto de los *scavengers* sobre la tolerancia a la dosis (Thorne et al. 2011).

En base a las observaciones anteriores postulamos que el mecanismo de ambos *scavengers* es el siguiente. A temperatura ambiente (TA) el nitrato ha probado ser un muy eficiente *scavenger* de exceso de electrones (Anbar et al. 1967). La reacción nitrato + electrones es exotérmica y ocurre a una tasa cercana al límite de difusión, e_{aq}^- , $k(e_{aq}^-) = 9.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, de acuerdo a la ecuación:



Durante la difracción, realizada a temperaturas de 100 K, los fotoelectrones liberados durante la irradiación de los cristales de lisozima inducen una cascada de electrones secundarios que interaccionan fuertemente con el ambiente, causando subsecuentes ionizaciones. Durante este proceso, varios electrones (e^-) quedan atrapados en el medio (e_{aq}^-) dando lugar a la banda de absorción en la región visible con máximo de 580 nm, característica de sistemas crio-enfriados. La abolición del ancho de banda producido por los electrones muestra que el nitrato funciona como un mínimo energético para los e_{aq}^- . En ausencia de nitrato, una vía termodinámicamente favorecida concluye en los enlaces S–S de la proteína en el cristal nativo, lo cual provoca la reducción y posterior ruptura de los enlaces, explicando la alta susceptibilidad de los mismos a la dosis de radiación. La eficiencia del nitrato como neutralizador de electrones es evidente en la Figura 2.10, donde se observa que el enlace S–S permanece intacto mientras que el NO_3^- se reduce gradualmente. Este trabajo es la primera evidencia clara de la química involucrada en la acción de *scavenging*.

El ascorbato en cambio, aunque es también es un buen *scavenger* de electrones, es menos eficiente que el nitrato, pero en cambio, es un mejor antioxidante o *scavenger* de radicales $\cdot OH$. En solución y a TA, el ascorbato capta rápidamente los *agujeros positivos* producidos radiolíticamente. En diluciones acuosas el agujero formado en un inicio ($H_2O^{+\cdot}$), se convierte en el radical hidroxilo $\cdot OH$, reacción (2). En presencia de ascorbato (AH^-), éste reacciona con el radical a una tasa de $k(\cdot OH) = 8 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ (Schuler et al. 1974), limitada únicamente por la difusión como se observa en la reacción (3).



Una vez libre, el radical $\cdot\text{OH}$ es un fuerte oxidante que puede remover electrones de los aminoácidos provocando su inmediata descarboxilación (Hug et al. 2000; Wisniowsky et al. 2002). En concentraciones suficientemente elevadas el ascorbato puede donar electrones para llenar los agujeros positivos de manera competitiva. Esto explica la observación de una mayor tolerancia de estos residuos a la descarboxilación (Figura 2.10). A diferencia de lo observado en los cristales remojados en nitrato, no se observa reducción de la densidad electrónica correspondiente a la molécula de ascorbato. Esto se explica porque el núcleo ascorbil que resulta de la oxidación permanece sin cambios perceptibles en los mapas de densidad electrónica (Laroff et al. 1972).

Además del notable aumento en el tiempo de vida de los cristales causada por la adición de *scavengers*, otra aportación de nuestro trabajo es proponer una métrica universal para cuantificar el daño por radiación. A lo largo de los últimos años se han empleado como indicadores del daño, el aumento de las dimensiones de celda unitaria, el aumento de los PADs o valores B, el aumento en R_{merge} o $I/\sigma(I)$ y varios más. Si bien todos estos parámetros están relacionados con el aumento de desorden, existen ejemplos en donde el aumento de celda no tiene un comportamiento predecible con el aumento de la dosis de radiación (Ravelli et al., 2002). Lo mismo ocurre con los valores de desplazamiento atómico que no aumentan uniformemente, sino que dependen del empaquetamiento particular de la red y pueden ser muy variable entre cristales con diferente empaquetamiento. La intensidad, en cambio, está directamente relacionada con la pérdida de orden en la red cristalina y por tanto puede ser una métrica global del daño por radiación.

Por ello, proponemos el análisis del decaimiento de las intensidades globales y/o el análisis de intensidades equivalentes (R_d , factor de decaimiento) como parámetros universales cuando se trate de daño por radiación.

2.5. Conclusiones

En conclusión el uso de los *scavengers* es una estrategia que permite, de forma eficiente, mitigar los efectos del daño por radiación tanto a nivel global, en un factor de dos, como a nivel de daño específico, en un factor cercano a seis ante la ruptura de puentes disulfuro. Su aplicación es simple y a la vez generalizable para la mayoría de los cristales de proteína y sus beneficios comparables con otros acercamientos como la difracción a temperaturas de 15 K ([Meents et al., 2007](#)), en donde un 23 % más de tolerancia a la radiación se ha reportado, o al de un factor de cuatro observado en la protección de enlaces S–S, a 50 K ([Meents et al., 2010](#)).

La adición de *scavengers* es efectiva cuando se considera la química que subyace las causales del daño. En este capítulo mostramos que las dos moléculas empelados son eficientes aunque actúan por mecanismos distintos: el nitrato por un mecanismo reductivo, y el ascorbato por la vía oxidativa. Las diferencias están basadas en las propiedades de estas moléculas para inactivar radicales; el ascorbato es más eficiente para las radicales $\cdot\text{OH}$ ($k_{e^-}(\text{asc}) = 3 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k(\cdot\text{OH}) = 8 \times 10^{-9}$), mientras que el nitrato es más eficiente como aceptor de electrones con una $k_{e^-}(\text{nit}) = 9 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ([Buxton, 2008](#)).

3.1 Introducción

La presencia de cofactores incrementa y regula una amplia variedad de funciones en las proteínas. La relevancia de los metales en los procesos biológicos radica en que alrededor del 40% de las reacciones catalizadas por enzimas²⁰ requieren de su presencia ([Andreini et al., 2008](#)). Los sitios metálicos en las proteínas pueden ser estructurales o desempeñar papeles activos en la catálisis de enzimas, participando en procesos biológicos tan relevantes como la fotosíntesis, la respiración, la oxidación del agua, la reducción molecular del O₂ y la fijación de nitrógeno. Desde el punto de vista de la biología estructural es indispensable comprender las bases estructurales que determinan las propiedades únicas de los metales que fungen como cofactores, así como la forma en que son ensamblados e introducidos en su proteína blanco.

Los metales más abundantes en proteínas, son aquellos cuya afinidad oscila entre débil y moderada, Na, K, Ca y Mg, lo que les permite tener alta movilidad. Ambas características, abundancia y afinidad, están relacionadas con sus funciones como acarreadores de carga y transductores de señales. Por otra parte, Fe, Cu, Mo y Co, son elementos traza con baja movilidad pero una alta afinidad. Estos elementos son redox activos, es decir, pueden encontrarse en más de un estado de oxidación, característica esencial en catálisis redox (Tabla 3.1).

²⁰ Proteínas con estructura 3 D conocida y depositadas en el PDB,

Tabla 3.1 Características de los metales más abundantes en los sistemas vivos.

Ion	Unión	Movilidad	Función
Na ⁺ , K ⁺	Débil	Alta	Acarreadores de carga
Mg ²⁺ , Ca ²⁺	Moderada	Semi-móvil	Transducción de señales y estructural
Zn ²⁺	Moderada-fuerte	Intermedia	Estructural
Fe, Cu, Mn, Mo	Fuerte	Baja	Catálisis redox, química del oxígeno

En particular, el Cu desempeña un rol esencial en reacciones biológicas de óxido-reducción: uniendo, activando y reduciendo oxígeno molecular (O₂) mediante transferencia de electrones de capa exterior o interior (Solomon, Jones, et al., 1993). Los centros de cobre se clasifican de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas, íntimamente relacionadas con el tipo de ligando y configuración electrónica de los complejos metal-proteína y por el papel que desempeñan en las reacciones que catalizan. De esta forma encontramos centros que modulan la transferencia de electrones y aquéllos O₂-reactivos, en donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno molecular. Mientras que los primeros suelen ser mononucleares, los de la segunda clase pueden ser mono-, di- o trinucleares.

Sus propiedades espectroscópicas los agrupan en tres tipos:

Tipo 1 o 'azul' (T1 Cu).- detectable alrededor de los 610 nm por la intensa transferencia de carga entre el SCys→Cu²⁺, que le confiere su característica coloración azul. También es distinguible en el espectro de EPR por presentar un desdoblamiento hiperfino paralelo estrecho ($A_{||} = 40-95 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$).

Tipo 2 o normal (T2 Cu).- se caracteriza por un desdoblamiento hiperfino paralelo amplio ($A_{||} = 140-200 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) en el espectro de EPR, mas no es detectable en el UV-Visible.

Tipo 3 o binuclear (T3 Cu).- se observa como un hombro a una banda de absorción de 330 nm. La presencia de un par Cu^{2+} antiferromagnético unido a través de un hidroxilo provoca la ausencia de señal en el espectro de EPR ([Machonkin et al., 2001](#)).

Las Multicobre Oxidasas Azules (*BMCO* por sus siglas en inglés) son una familia de eficientes catalizadores de la reducción de O_2 . Las enzimas de este grupo, realizan una reducción de cuatro electrones, que acoplada a la transferencia de protones (H^+), convierte el O_2 en dos moléculas de H_2O a baja sobretensión²¹ y con la ventaja, sobre otras enzimas, de que no liberan intermediarios reactivos (superóxido, peróxido, etc.). Las proteínas de esta familia poseen propiedades bioquímicas y electrónicas²² que las convierten en un blanco atractivo para la biotecnología en campos como la biorremediación y diseño y desarrollo de sensores y celdas de combustión ([Tye et al., 2005](#); [Cracknell et al., 2008](#); [Kunamneni et al., 2008](#)).

Entre las *BMCO*, destacan las lacasas (E.C 1.10.3.2, bencenodiol:oxígeno oxidoreductasas). Estas enzimas son ubicuas y se distinguen de otras proteínas de cobre (azurina, plastocianina y tirosinasas) por poseer al menos cuatro átomos de cobre divididos en tres tipos: T1 Cu, T2 Cu y un T3 Cu binuclear ([Solomon et al., 1996](#)). Su nombre se deriva del árbol de laca (*Rhus vernicifera*), el organismo del que fue aislada por primera vez y que la convirtió en una de las primeras enzimas descritas en 1883). La lacasas fúngicas, las mejor caracterizadas en número y profundidad, son glicoproteínas²³ monoméricas que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos,

²¹ En electroquímica, sobretensión se refiere a la diferencia de potencial entre una [semi-reacción](#) determinada termodinámicamente por su [potencial de reducción](#) y el potencial en que se observa experimentalmente el proceso.

²² Promiscuidad de sustratos, no liberación de especies reactivas, eficientes transportadores de e^- , altos potenciales en comparación con compuestos inorgánicos.

²³ Entre 10-45% de su masa corresponde a glicosilaciones.

predominantemente de naturaleza fenólica. Su alta promiscuidad, permite que participen en procesos biológicos tan diversos como degradación de lignina, pigmentación de esporas y detoxificación ([Claus, 2003](#)).

3.1.1. Espectroscopia de sitios metálicos

El Cu^{2+} tiene nueve electrones de valencia en la subcapa d , por lo que el orbital dx^2-y^2 está desapareado en el estado fundamental. Una forma de perturbar este electrón desapareado es aplicando un campo magnético. Métodos magnéticos²⁴, como Mössbauer magnético y EPR, permiten estudiar, a baja y alta resolución, propiedades de los metales susceptibles al magnetismo como el estado de oxidación y espín (Tabla 1).

A mayor energía, en la región infrarrojo-visible, se excitan electrones de los orbitales d apareados hacia orbitales d parcialmente ocupados o desapareados. Este tipo de transiciones $d \rightarrow d$ son sensibles al campo del ligando en el centro metálico y por lo tanto proporcionan información sobre la geometría y estructura electrónica del sitio activo. Puesto que las transiciones $d \rightarrow d$ están prohibidas por paridad²⁵, su señal en el espectro de absorción es muy débil, pero puede detectarse mediante técnicas como dicroísmo circular (CD) y CD magnético (MCD).

En la región UV-Visible, 190–1000 nm, los electrones son excitados desde los orbitales apareados y centrados de los ligandos²⁶ hacia los orbitales d parcialmente ocupados del metal. Este estímulo da origen a transiciones del tipo transferencia de carga (CT) ligando-metal. Las transiciones de CT son claves para entender la naturaleza del enlace ligando-metal, porque la alta covalencia está asociada con

²⁴ En la región de energía de 10^4 - 10^1 cm^{-1} .

²⁵ *Parity forbidden*

²⁶ *Ligand-centered orbitals*

intensas transiciones de transferencia de carga más intensas, que se observan experimentalmente como una mayor absorbancia en los espectros (Solomon, Lowery, *et al.*, 1993).

Tabla 3.2 Métodos espectroscópicos aplicados al estudio de metaloproteínas y el tipo de información que proporcionan.

	Longitud de onda(m)	Frecuencia (HZ)	Información
Rayos X	10^{-12} – 10^{-8}	10^{20} - 10^{16}	Geometría y estructura atómica
Ultravioleta (UV)	10^{-8} – 10^{-7}	10^{16} - 7.5×10^{14}	Estructura electrónica molecular
Visible	4×10^{-7} – 7.5×10^{-7}	7.5×10^{14} – 4×10^{14}	Estructura electrónica molecular
Infrarrojo (IR)	7.5×10^{-7} – 10^{-3}	4×10^{14} – 10^{11}	Rotación y vibración molecular
Microondas (EPR)	1×10^{-3} –1	10^{11} – 10^8	Espectros rotacionales
Ondas de radio	1– 10^3	10^8 – 10^5	Resonancia magnética nuclear (NMR)

A energías aún mayores, rayos X (Tabla 3.2), los electrones excitados son los de capas más internas. Los electrones del orbital *1s* del metal son excitados al continuo; liberados hacia los átomos adyacentes y produciendo interferencia constructiva y destructiva con la onda electrónica. En esta región energética, los métodos más utilizados de absorción de rayos X (XAS) son: XANES (del inglés *X-ray Absorption Near Edge Structure*) y EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*). A partir de las propiedades de la onda electrónica se puede inferir el estado de oxidación (XANES) y las distancias de coordinación y número e identidad de los ligandos (EXAFS). Los espectros de absorción en estas regiones, para el caso particular del Cu el *borde K* ~ 8980 eV y el *borde L* ~930 eV, son evidencia del estado de oxidación (Figura 3.1) y de la geometría del sitio.

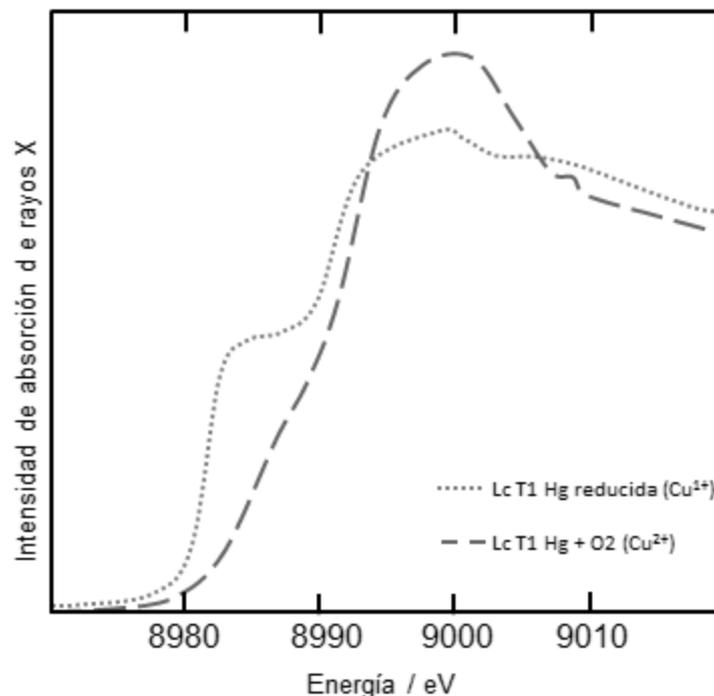


Figura 3.1 Espectro XAS de los sitios T2 y T3 Cu en la lacasa de *R. vernicifera*. La línea discontinua muestra el perfil de la población en estado Cu^{2+} , con un máximo de absorción a ~ 9000 eV. La línea punteada corresponde a una población en estado reducido o Cu^{1+} , caracterizada por la disminución a 9000 eV y la presencia de un hombro a ~ 8982 eV. Modificado de Solomon, E. I. *et al.* 1996.

En resumen, en el campo de metaloproteínas, la espectroscopía permite determinar la geometría y estructura electrónicas de los sitios metálicos. Luego, a partir de dichas propiedades es posible desarrollar correlaciones estructura–función y/o probar mecanismos de reacción a nivel molecular.

3.1.2. Propiedades electrónicas del T1 Cu asociadas a la transferencia electrónica

Las características espectroscópicas inusuales de los sitios T1 Cu, que los convierte en máquinas eficientes para la transferencia de electrones (ET), están vinculadas a su particular geometría y estructura electrónica.

En contraste con la débil transición $d \rightarrow d$ de los complejos tetragonales de cobre Cu^{2+} -comunes en complejos inorgánicos- que se caracterizan por $\epsilon \sim 40 \text{ M}^{-1}$

cm^{-1} a $\sim 610 \text{ nm}$, el T1 Cu presenta una intensa absorción a 610 nm con $\epsilon \sim 5000 \text{ cm}^{-1}$. En lo que a EPR respecta, el estado fundamental del Cu^{2+} , presenta un desdoblamiento hiperfino (A_{\parallel}) del espín electrónico menor en un factor de dos en comparación con los sitios *normales* ($40-95 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ vs. $40-95 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$). El origen de estas propiedades únicas refleja una novel función de onda que es esencial comprender, porque es el orbital molecular redox-activo (RAMO) el que desempeña un rol clave en funciones biológicas como la ET rápida a largas distancias²⁷.

En el caso del espectro de EPR del sitio T1 Cu, se pensaba que la causa de la disminución en el A_{\parallel} era una mezcla de los orbitales Cu $4p_z$ y Cu dx^2-z^2 , favorecida por la geometría tetraédrica distorsionada. Sin embargo, por medio de XAS y validado por QM/MM se ha mostrado que la disminución es consecuencia de la alta covalencia del sitio T1 Cu: en el que 40 % del electrón desapareado es de carácter Cu dx^2-y^2 y 35% de carácter Cys S $3p$. Dicho de otra forma, el electrón desapareado se distribuye 40 % en el orbital Cu dx^2-y^2 y 35 % en el Cys S $3p \pi$ ([Penfield et al., 1985](#)).

Estas propiedades electrónicas otorgan a estos sitios una mayor eficiencia en la ET. De acuerdo a la teoría de Marcus ([Marcus & Sutin, 1985](#)), son tres los factores que determinan la eficiencia de la transferencia de electrones (ET): la fuerza conductora (ΔG°), la energía de reorganización (λ) y el acoplamiento electrónico reactante-producto (H_{DA}). En las BMCO la rápida y direccionada transferencia electrónica desde el T1 Cu hacia el aceptor final (O_2), unido al centro trinuclear (TNC), es activada por la alta covalencia anisotrópica del enlace Cu-S. Es

²⁷ Largas distancias se consideran aquéllas mayores a los 20 \AA .

decir, las propiedades necesarias para una eficiente y rápida ET (una H_{DA} alta y una λ baja), han sido seleccionadas en los sitios T1 Cu.

3.1.3. Voltametría en película de proteína (PFV)

La voltametría en película de proteína (PFV, por sus siglas en inglés) es un método electroquímico de reciente desarrollo que permite estudiar las propiedades electrónicas y catalíticas de enzimas redox. Una película delgada, monocapa idealmente, de proteína es adsorbida sobre la superficie de un electrodo. La unión proteína-electrodo hace posible la transferencia de electrones y la retención completa de las propiedades de los centros activos. Al modular el potencial del electrodo es posible controlar el movimiento de los electrones en cualquiera de las dos direcciones (electrodo→enzima, enzima→electrodo). El flujo de electrones, es detectado como una corriente (I) cuyas características reflejan las propiedades del centro de control electroquímico, es decir, el sitio redox activo cuyo intercambio electrónico con el electrodo es rápido y reversible. Para la mayoría de las enzimas, la transferencia electrónica intermolecular es rápida y el centro de control corresponde al sitio catalítico, aunque hay excepciones en las que el paso limitante es una transferencia electrónica intermolecular.

En PFV, la tasa de intercambio²⁸ responde de manera característica a variaciones en el potencial del electrodo, revelando una *dimensión potencial* en la cinética enzimática y proporcionando un método poderoso para investigar enzimas con múltiples centros redox. El flujo de electrones a través de la enzima está unido, en serie, a la tasa de transporte del sustrato (Ω_{trans}) y a la tasa de intercambio electrónico en la interfase electrodo-enzima (Ω_E , Figura 3.2). Ambas etapas

²⁸ Turnover rate

asemejan una serie de resistores, cada uno con una conductancia igualada a un tiempo de tránsito,

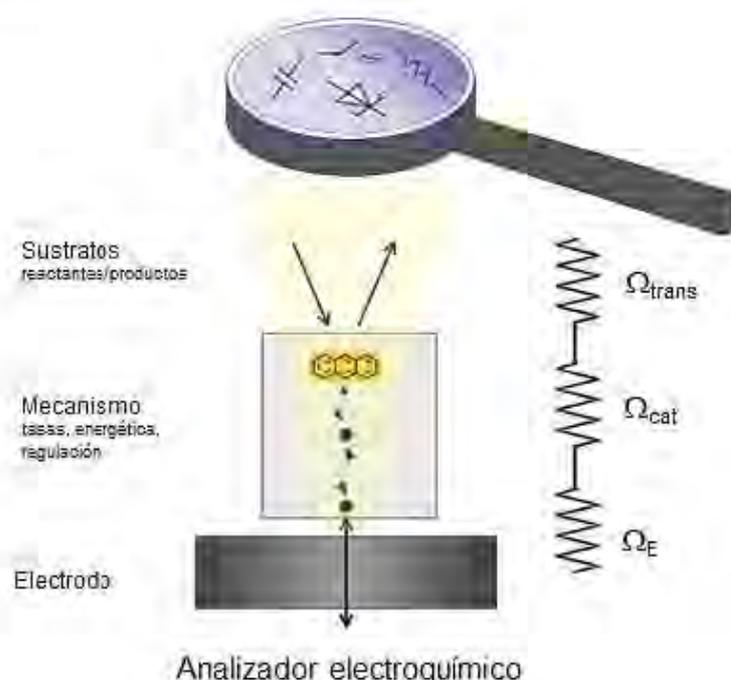


Figura 3.2 Diagrama de representación de una enzima redox unida a un electrodo y en contacto con un sustrato aromático. Las etapas catalíticas se representan como resistencias en serie. Modificado de Léger, C. *et al.*, 2003.

Existen dos tipos de voltametría: no catalítica y catalítica. La primera se mide la respuesta corriente-potencial, producto del intercambio electrónico entre el electrodo y los sitios redox activos de la proteína bajo condiciones donde no hay catálisis. Estas condiciones se alcanzan en ausencia de sustrato, utilizando inhibidores o modulando el potencial a una tasa en la que el ciclo catalítico no pueda completarse. La corriente observada en el intervalo de potencial definido, consiste de dos picos: oxidación, en dirección positiva y reducción en negativa, cuyo promedio equivale al potencial redox ($E^{o'}$) de la reacción.

La voltametría catalítica, en cambio, produce un perfil de corriente con forma sigmoidea. La magnitud es mucho mayor que la observada en voltametría no catalítica, lo que permite trabajar aun cuando la cobertura de la enzima en el

electrodo sea baja. En este tipo de voltametría, la corriente es producida por la oxidación-reducción de los sustratos contenidos en la solución o directamente de los sitios metálicos. Por lo tanto, la corriente es una medida directa de la tasa de intercambio ([Armstrong, 2005](#)). El principal interés de este tipo de estudios es el determinar cómo es que la corriente se comporta con las variaciones en el potencial del electrodo o fuerza conductora que facilita que la reacción ocurra. Esta variante de voltametría, permite determinar el potencial al cual se desencadena la actividad catalítica, E_{cat} , o el potencial en el que la pendiente de la corriente (dl/dE) es máxima (Figura 3.3 a). E_{cat} está relacionada con el centro de control de la enzima, mientras que la corriente máxima proporciona la tasa de intercambio a la cual la transferencia electrónica no es más un factor de control. Otro de los parámetros cinéticos que se pueden estimar mediante voltametría catalítica es la k_{cat} . Para ello es necesario conocer la cobertura electroactiva (moléculas activas por unidad de superficie del electrodo) y variar la concentración de sustrato. La mayor dificultad en estos experimentos consiste en garantizar que la enzima unida al electrodo presente la misma actividad que la enzima estudiada por otro tipo de métodos.

La catálisis bidireccional se observa porque el centro de control puede ser oxidado o reducido por el electrodo. En este caso, la corriente-potencial que corta el eje del potencial (x , abscisas) es el potencial de reposo y equivale al potencial en que la proporción de la población oxidada y reducida de los centros metálicos es la misma. Las magnitudes relativas de las corrientes de oxidación y reducción proporcionan entonces una idea de la propensión de la enzima a funcionar en alguna de las direcciones. La tendencia debe ser en una sola dirección, de tal manera que solo se observe oxidación o reducción. En este caso el valor de E_{cat} será muy distinto de aquel del potencial de reposo del sustrato (Figura 3.3 b).

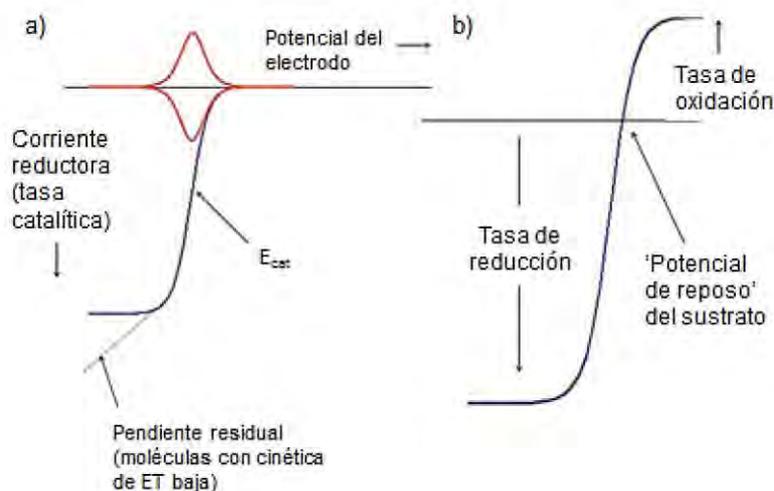


Figura 3.3 Voltamogramas correspondientes a PFV catalítica a) mono y b) bi-direccional. Modificado de Armstrong, F.A. 2005.

El uso de *BMCOs* como electrocatalizadores ha sido abordado por tres métodos:

- i) Uniendo la enzima a metales preciosos (Au) modificados ([Vincent et al., 2005](#)).
Inmovilizando a la enzima en una red de mediadores de electrones de alto potencial, tipo ABTS o complejos de Os-piridina ([Palmore & Kim, 1999](#); [Vincent et al., 2006](#)).
- ii) Por adsorción simple y directa en materiales de carbono ([Gupta et al., 2003](#)).
- iii) Unión específica a electrodos de carbono modificados ([Blanford et al., 2007](#)).

La última, proporciona la ventaja de una unión específica, lo cual es muy útil en enzimas con múltiples sitios metálicos, pues de esa forma se puede determinar el circuito que seguirán los electrones.

En este capítulo utilizamos varias técnicas de espectroscopía junto con PFV para caracterizar a *Cg L* con miras al estudio presentado en el capítulo 4.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Purificación

Cg L, obtenida directamente del Basidiomiceto *Corioloropsis gallica*, fue adquirida de *IBMol México*. Los primeros 21 residuos del N-terminal, de los 517 residuos de aminoácidos que componen a *Cg L*, conforman un péptido señal removido tras la exportación de la proteína al espacio extracelular. Como resultado, se obtiene un polipéptido de 496 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 52.7 kDa ($\epsilon_{280} \sim 60.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)²⁹.

En base a SDS-PAGE determinamos que la muestra contenía alrededor de un 30 % de impurezas. entonces, la solución de proteína, compuesta por fosfato de potasio pH 6.0 y glicerol al 20 % (v/v), fue dializada, en dos pasos de 12 y 6 horas en MES 50 mM pH 5.5 utilizando una membrana de 14 kDa (MWCO) para eliminar glicerol y otras impurezas. Posteriormente, la solución fue dializada y concentrada en tubos Amicon-Ultra (30 kDa MWCO, Millipore) hasta alcanzar una concentración de proteína de $\sim 2 \text{ mg ml}^{-1}$. Tras el paso de concentración la proteína fue aplicada en una columna Hi-Load 26/60 Superdex 200 (*GE lifesciences*), previamente equilibrada en 50 mM MES pH 5.5 y 50 mM NaCl. Tras la exclusión molecular determinamos la pureza de la muestra por SDS-PAGE y geles de isoelectroenfoque (IEF).

La solución de proteína fue dializada en solución amortiguadora MES 10 mM pH 5.5 y 0.5 mM CuSO_4 , para ocupar todos los sitios de cobre de la proteína susceptibles a ser desocupados durante la diálisis. Finalmente, se realizó una última

²⁹ Calculado con el programa *Protein Calculator v3.3* (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>)

diálisis y concentración (también en tubos Amicon-Ultra) en MES 10 mM pH 5.5 para eliminar el cobre en solución.

3.2.2 Cuantificación de cobre

Dos métodos fueron utilizados para la cuantificación de cobre en Cg L: reacción con 2,2'-biquinolina y MicroPIXE. El primero consiste en desnaturalizar la proteína para extraer los metales y posteriormente reducirlos a Cu^{+1} . De la reacción $\text{Cu}^{+1} + 2,2\text{-biquinolina}$ se forma un complejo con un máximo de absorción a 548 nm y con $\epsilon_{548} \sim 6.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ([Felsenfeld, 1960](#); [Hanna et al., 1988](#)), que se distingue a simple vista por su coloración magenta. La solución de 2,2'-biquinolina consistió en 0.5 mg ml^{-1} de 2,2'-biquinolina en ácido acético glacial. Para evitar la oxidación de los Cu^{+1} todas las soluciones se saturaron con $\text{N}_2(\text{g})$ para desplazar el O_2 . La curva de calibración se realizó con soluciones de CuSO_4 a concentraciones variables. Conociendo la concentración de proteína de la muestra, es posible determinar la proporción Cu:proteína, que en Cg L debe ser 4:1 por la presencia de los cobres T1, T2 y el T3 binuclear.

Alternativamente, dos muestras distintas fueron analizadas por MicroPIXE ([Garman & Grime, 2005](#)). Este método consiste en irradiar una gota deshidratada, originalmente de 0.2 μl de solución concentrada de proteína, con un haz de protones de alta energía (2-4 MeV). El haz de protones ioniza los átomos, cuyas vacantes electrónicas son ocupados por electrones de capas superiores que decaen liberando rayos X, en forma de fluorescencia, en un amplio espectro. Este espectro de rayos X contiene la firma de todos los átomos, de número atómico mayor al Na, que componen la solución. Si conocemos el contenido de átomos de azufre por la secuencia primaria, se puede utilizar este valor como medida interna de la

concentración de proteína y a partir de ella determinar la proporción de los demás elementos, en particular metales, con respecto a la proteína.

3.2.3 UV-Vis

Los espectros UV-Visible fueron colectados en un espectrofotómetro Evolution 1000 (*Thermo Scientific*) utilizando celdas de cuarzo con un paso de luz de 1 cm. Los barridos, 260-900 nm, se obtuvieron a partir de soluciones de proteína en diferentes soluciones amortiguadoras: 50 mM MES pH 5.5 y pH 4.0³⁰, 50 mM Tris-HCl pH 7 y solución amortiguadora de McIlvaine 50 mM pH 4.0, pH 5.5 y pH 7.0, esta última compuesta por citrato de sodio y fosfato de sodio dibásico ([McIlvaine, 1921](#)).

Para mostrar que todos los sitios de cobre se encontraban en estado oxidado, se incubó la muestra en concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y se colectaron barridos en el mismo intervalo de luz descrito anteriormente.

3.2.4 Resonancia paramagnética electrónica (EPR)

Los espectros de EPR fueron colectados en las bandas X y W³¹ a partir de soluciones 20 mg ml⁻¹ de Cg L a tres diferentes pH: 50 mM MES/ McIlvaine pH 4.0, 50 mM MES pH 5.5 y Tris-HCl pH 7.0. Los espectros obtenidos en banda W, se colectaron en modo de onda continua (CW), utilizando un espectrómetro *Bruker EMX* con un criostato de helio (*Oxford Cryosystems*) a 30 o 40 K bajo condiciones no saturantes. Los espectros en banda X se obtuvieron con un espectrómetro

³⁰ Aunque el MES no amortigua a este pH, el espectro se colectó como un control para analizar el efecto de diferentes soluciones sobre los centros de cobre.

³¹ Las frecuencias de las bandas X y W son ~ 10 GHz y ~ 95 GHz respectivamente.

Bruker E680 a 12.5 K y fueron utilizados como referencia durante la simulación de los espectros CW en banda X. La proporción relativa de los diferentes sitios de cobre fueron determinadas a partir de las áreas de los espectros tipo absorción³². Las simulaciones se llevaron a cabo en el programa EasySpin ([Stoll & Schweiger, 2006](#)).

Todos los espectros, de banda X y W, se colectaron en las instalaciones del Centro Avanzado para Resonancia de Espín Electrónico (CAESR por sus siglas en inglés) del departamento de Química de la Universidad de Oxford, UK, como parte de una colaboración con la Dra. Janet Lovett.

3.2.5 Espectroscopía de absorción de rayos X (XAS)

Los espectros de XAS, en el intervalo de energía 8950-9130 eV, fueron colectados en modo de fluorescencia en la línea X6A del NSLS, utilizando un monocromador de Si(111) (paso de banda 1.9×10^{-1} eV) y un detector de fluorescencia, localizado verticalmente a un ángulo de 90° con relación al haz incidente. Los espectros se obtuvieron a partir de cristales de Cg L, previos a la colecta de datos, para caracterizar el estado de oxidación de los sitios de cobre y a la menor dosis de radiación asequible. La dosis estimada por cada barrido fue de 0.2 MGy. Los cristales probados se obtuvieron en dos condiciones: 5 % PEG 1000, 5 % PEG 8000, 100 mM MES pH 4.5 y 10 % PEG 1000, 10 % PEG 8000 7.0, 100 mM Tris-HCl pH 7.0.

Los barridos fueron sujetos a extracción del ruido de fondo y normalizados en el programa *Athena* ([Ravel & Newville, 2005](#)). La estimación de la dosis absorbida se realizó con el programa *RADDOSE* ([Murray et al., 2004](#); [Paithankar et](#)

³² 0th harmonic.

[al., 2009; Paithankar & Garman, 2010](#)). Para hacer un cálculo de la dosis absorbida es necesario proporcionar al programa los parámetros del haz incidente (energía, perfil, tamaño o área y flujo) y las características del cristal irradiado (celda unitaria, grupo espacial, número de moléculas por unidad asimétrica, dimensiones y composición). El flujo del haz, en fotones s^{-1} , se determinó utilizando un diodo de Si diseñado para calibrar la intensidad del haz ([Owen et al., 2009](#)).

3.2.6 Actividad

Las reacciones se realizaron en volúmenes de 1 ml en celdas con paso de luz de 1 cm. Las mediciones se realizaron en solución amortiguadora de McIlvaine 50 mM, en el intervalo de pH 3-6.5 a una temperatura controlada de 294 K. La concentración final de enzima en dicho volumen fue de 52 ng ml^{-1} (1 nM). Se emplearon dos tipos de sustrato, uno fenólico (2,6-DMP) y uno no fenólico (ABTS) para analizar la dependencia de la actividad con la naturaleza de los mismos. La concentración adecuada de los sustratos en saturación se determinó como 10 veces el valor de K_M . La conversión de sustrato a producto se siguió a 468 nm para 2,6-DMP y a 436 nm para ABTS durante 120 s. Para comparar los resultados los datos se convirtieron a unidades de actividad (U).

Finalmente, el efecto de tres inhibidores (Cl^- , F^- y N_3^-) sobre la actividad enzimática fue analizado a diferentes concentraciones y en el mismo intervalo de pH mencionado anteriormente.

3.2.7 Electroquímica

El potencial catalítico (E_{cat}) de Cg L y su comportamiento a lo largo del intervalo de pH 3-7 fueron analizados mediante PFV. Los experimentos se

realizaron en una celda de vidrio sellada y con temperatura controlada, utilizando un electrodo de trabajo con punta de grafito pirolítico (PGE), área $\approx 3 \text{ mm}^2$, acoplado a un rotor de electrodo Princeton Applied Research 636, un cable de platino como contra-electrodo y un electrodo de referencia conformado por Ag|AgCl|3M NaCl. El electrodo de referencia permaneció en una solución 0.1 M Na_2SO_4 almacenada en un brazo lateral y conectado a la celda por capilar de Luggin. El potencial de referencia fue corregido al del electrodo estándar de hidrógeno (SHE) mediante la fórmula $E_{SHE} = E_{Ag|AgCl} + 0.206 \text{ V}$, a 298 K. Los cambios de potencial fueron controlados con un *CompactStat* (Ivium Technologies). La superficie de grafito del electrodo de trabajo fue modificada con antraceno para simular un sustrato y facilitar la unión específica proteína–electrodo en la región hidrofóbica que rodea al sitio T1 Cu. La modificación se logró ciclando una vez el potencial del electrodo giratorio entre 0.3 y -0.5 V (vs. SCE) en una solución ácida conteniendo 0.19 M de antraceno-2-diazonio, para formar la amina correspondiente. La temperatura se mantuvo a 273 K. Tras la modificación del electrodo se formó una película de proteína al agregar 2 μl de una solución 18 mg ml^{-1} de Cg L en 50 mM Mcllvaine pH 5.5. Las mediciones electrocatalíticas se realizaron, a 298 K, en soluciones amortiguadoras de Mcllvaine 50 mM en el intervalo de pH 3-6.5. Para trabajar con soluciones equilibradas en 100 % de O_2 , se burbujeó el gas a través de la celda de vidrio. El electrodo giratorio se rotó a una velocidad de 4000 rpm. Cada voltametría catalítica consistió de cuatro barridos en el intervalo 0.9-0.2-0.9 V durante. El potencial catalítico, E_{cat} , se determinó como el máximo de la primera derivada (dl/dE) del tercer barrido de las voltametrías cíclicas. Los datos se procesaron con el programa SOAS ([Fourmond et al., 2009](#)).

3.3 Resultados

3.3.1 Purificación

Un pico mayoritario fue observado tras la cromatografía de exclusión molecular (línea punteada Figura 3.5 a). Tras eliminar las impurezas, se observó un único pico (línea continua Figura 3.5 a) correspondiente a un peso molecular de ~ 60 kDa, cercano a los 52 kDa estimados para *Cg L*. La pureza de la proteína se probó mediante *SDS-PAGE* y geles *IEF*, en los que se observó una única banda a ~ 55 kDa y un *pI* ~ 3.5 (Figura 3.5 b).

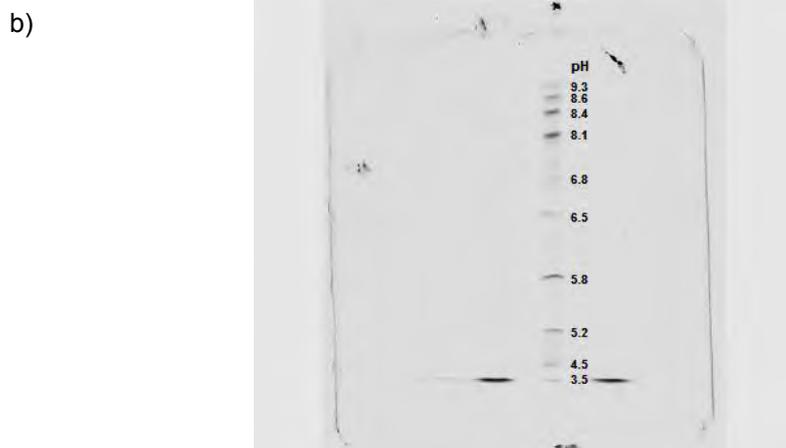
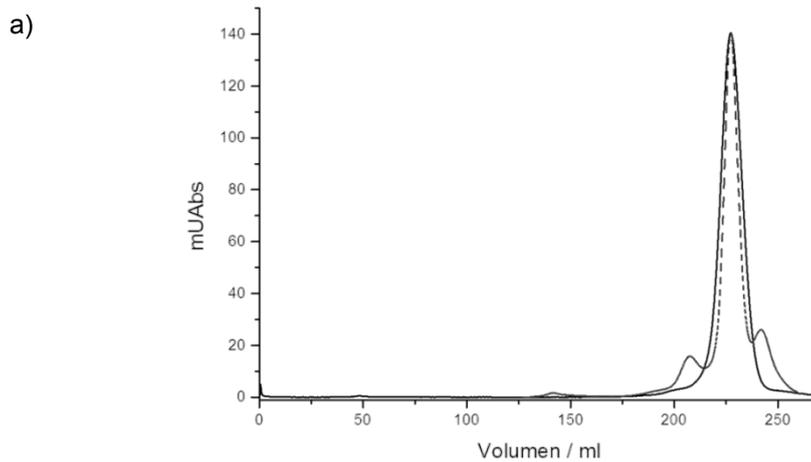


Figura 3.4 a) Cromatograma de exclusión molecular en una columna *Superdex 200*. Se muestran el paso de purificación inicial (línea punteada) y tras la eliminación de los contaminantes (línea negra continua). En b) se presenta el gel *IEF* con una sola banda, a ambos lados del marcador, correspondiente a un *pI* de 3.5.

3.3.2 Concentración de cobre

A partir de la curva de calibración, se determinó un $\epsilon_{548} = 6.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el complejo 2,2'-biquinolina- Cu^{1+} , congruente con el reportado anteriormente ([Felsenfeld, 1960](#)). La cuantificación de Cu en Cg L, mediante este método resultó en una proporción Cu:proteína de $3.8 \pm 0.4:1.0$, dentro del intervalo de error de los 4.0:1.0 esperados.

Posteriormente, utilizamos MicroPIXE para confirmar los resultados anteriores. Antes de estimar la proporción Cu:proteína en la muestra realizamos un barrido en un área de 1 mm^2 , para detectar las regiones de mayor concentración de proteína a partir del espectro del S. Como se puede observar en los mapas de la Figura 3.6 a) y b), hay una superposición de las regiones con mayor concentración de azufre y cobre. En esas regiones se irradia con un haz de protones de $3 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro para disminuir el ruido en el espectro de rayos X. La Figura 3.6 c) demuestra que no hay ningún elemento con número atómico mayor que el Na diferente del cobre. La presencia de P y Cl se explica porque son componentes o impurezas acarreadas durante la preparación de las soluciones amortiguadores. A partir de los espectros de rayos X se determinó una proporción Cu:proteína de $4.2 \pm 0.2:1.0$.

Este resultado confirma que la enzima contiene el complemento completo de cobres, es decir, que tanto el sitio T1 Cu, T2 Cu y T3 Cu están ocupados en su totalidad. Cabe resaltar que ambos resultados se obtuvieron a partir de muestras en que la enzima fue concentrada en presencia de los precipitantes PEG 1000 y PEG

8000, los reactivos empleados durante la cristalización, lo cual descarta que los precipitantes causen la liberación de los átomos de cobre de la proteína³³.

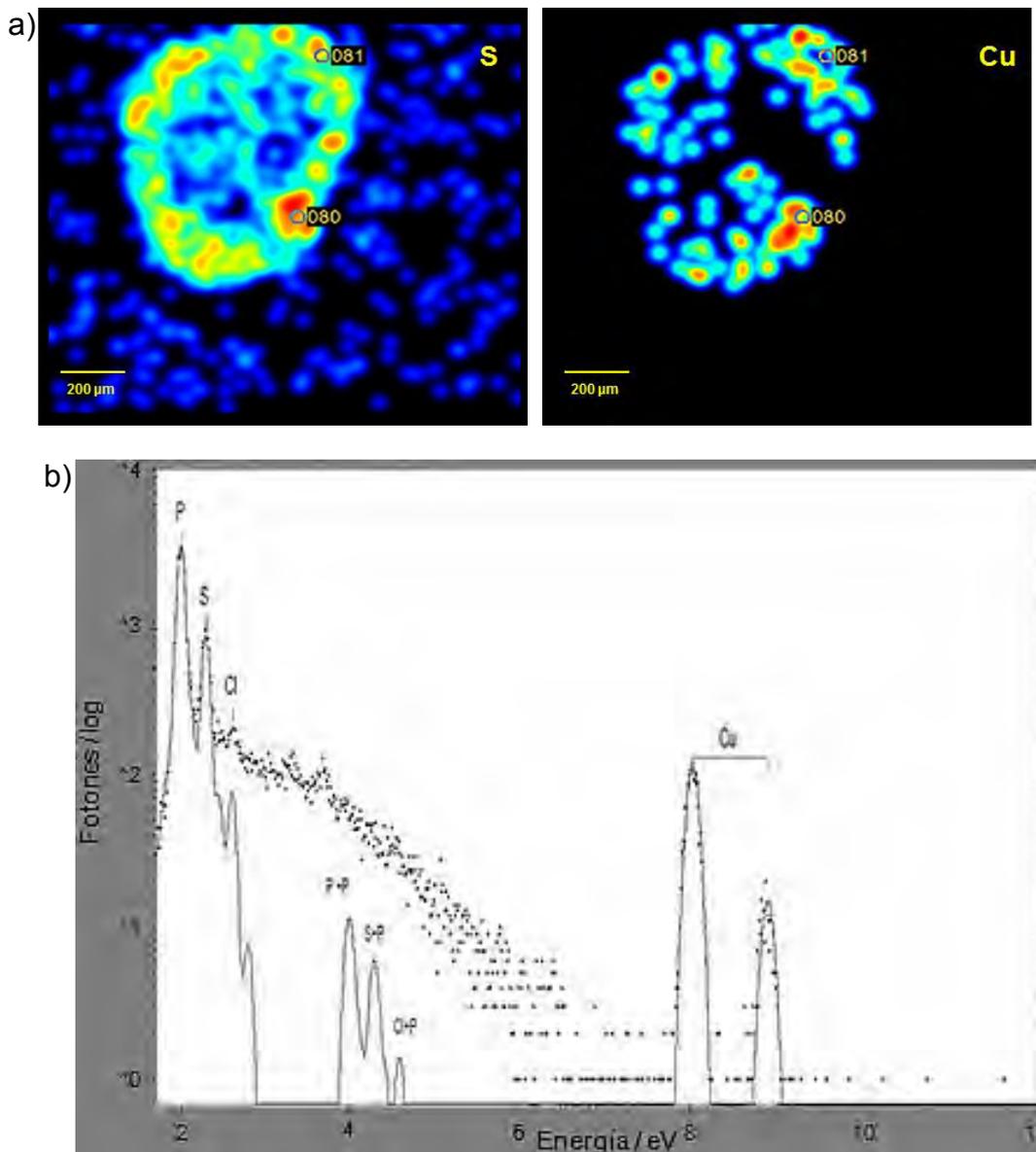


Figura 3.5 a) Mapas de absorción de los elementos S y Cu derivados del barrido de 1 mm² de superficie de la muestra con el haz de protones de alta energía. Espectro de rayos X derivado del bombardeo de la muestra con el haz de protones de alta energía. El cobre es el único elemento presente de mayor número atómico que Cl.

³³ Esta aclaración será relevante en el capítulo 4 cuando discutamos el efecto de los rayos X sobre los sitios metálicos.

3.3.3 UV-Visible

Una vez confirmada la presencia y alta ocupación de los sitios de cobre, obtuvimos barridos en la región UV-Visible utilizando soluciones concentradas de Cg L. Esto para determinar el estado de oxidación de los sitios T1 Cu y T3 Cu, así como información sobre sus propiedades electrónicas.

La Figura 3.7 muestra el espectro UV-Visible de Cg L en solución, en él se pueden observar las señales características de las lacasas: el máximo a 608 nm, correspondiente a la CT entre SCys-T1Cu y la banda a 330 nm, que se asigna a los dos T3 Cu unidos por un hidroxilo. En lo que a los coeficientes de absorción respecta, el sitio T1 Cu presenta un coeficiente bajo ($\epsilon_{T1} = 4.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), comparado con el de *R. vernicifera* ($\epsilon_{T1} = 5.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). En cambio, la región del T3 Cu, muestra un ϵ_{T3} alto ($\epsilon_{T3} = 10.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) con respecto al descrito para *R. vernicifera* ($\epsilon_{T3} = 5.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). En lo referente a cambios en el pH de las soluciones amortiguadoras, no se encontraron diferencias entre los espectros colectados a pH 4.0, 5.5 y pH 7.0.

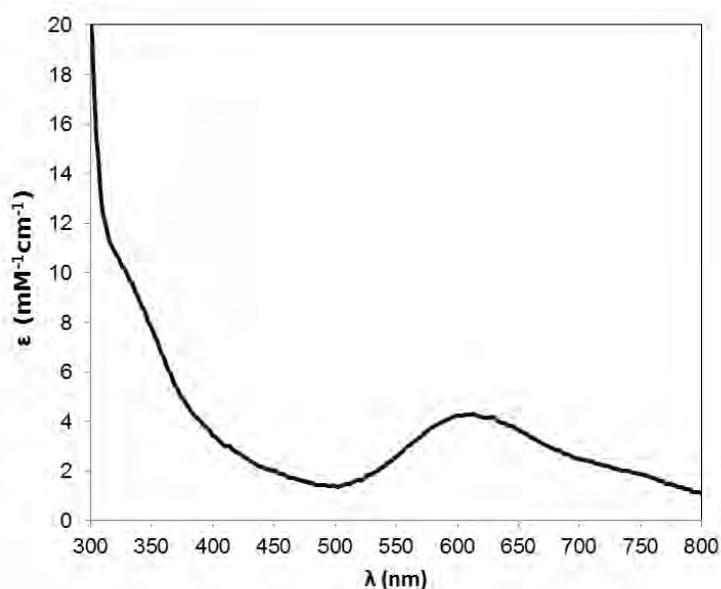


Figura 3.6 Espectro UV-Visible de Cg L en MES 50 mM pH 5.5.

El valor de ϵ_{T1} podría aumentar si un porcentaje de los sitios se encontrara reducido. Para descartar que hubiera una subpoblación de Cu^{1+} en la muestra, colectamos barridos en el UV-Visible agregando concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno. A pesar de alcanzar una concentración final de diez veces la concentración de cobre esperada en la solución, ningún cambio fue observado en ϵ_{T1} . Aunque la ocupación de parcial de los sitios fue descartada previamente por la cuantificación, incubamos la enzima en soluciones con CuSO_4 , en condiciones oxidante (Cu^{2+}) y reductora (Cu^{+1}), la última lograda al incubar la solución de CuSO_4 en ácido ascórbico y saturada con $\text{N}_2(\text{g})$ para desplazar el O_2 disuelto en la muestra. Este tratamiento tampoco modificó los valores de ϵ_{T1} ni de ϵ_{T3} .

Por otra parte, *Cg L* sí es susceptible a la reducción. Con concentraciones crecientes de ascorbato de sodio³⁴ observamos que la señal de 330 y 608 nm, correspondiente a las especies oxidadas de los T1 y T3 Cu, disminuye gradualmente como consecuencia de la reducción química. Al oxidar nuevamente, añadiendo gradualmente peróxido, se puede observar la formación de dos intermediarios a ~ 310 y 370 nm (Figura 3.8 b).

³⁴ También se probó ditionita de sodio y es igual de efectiva pero la reacción es más lenta.

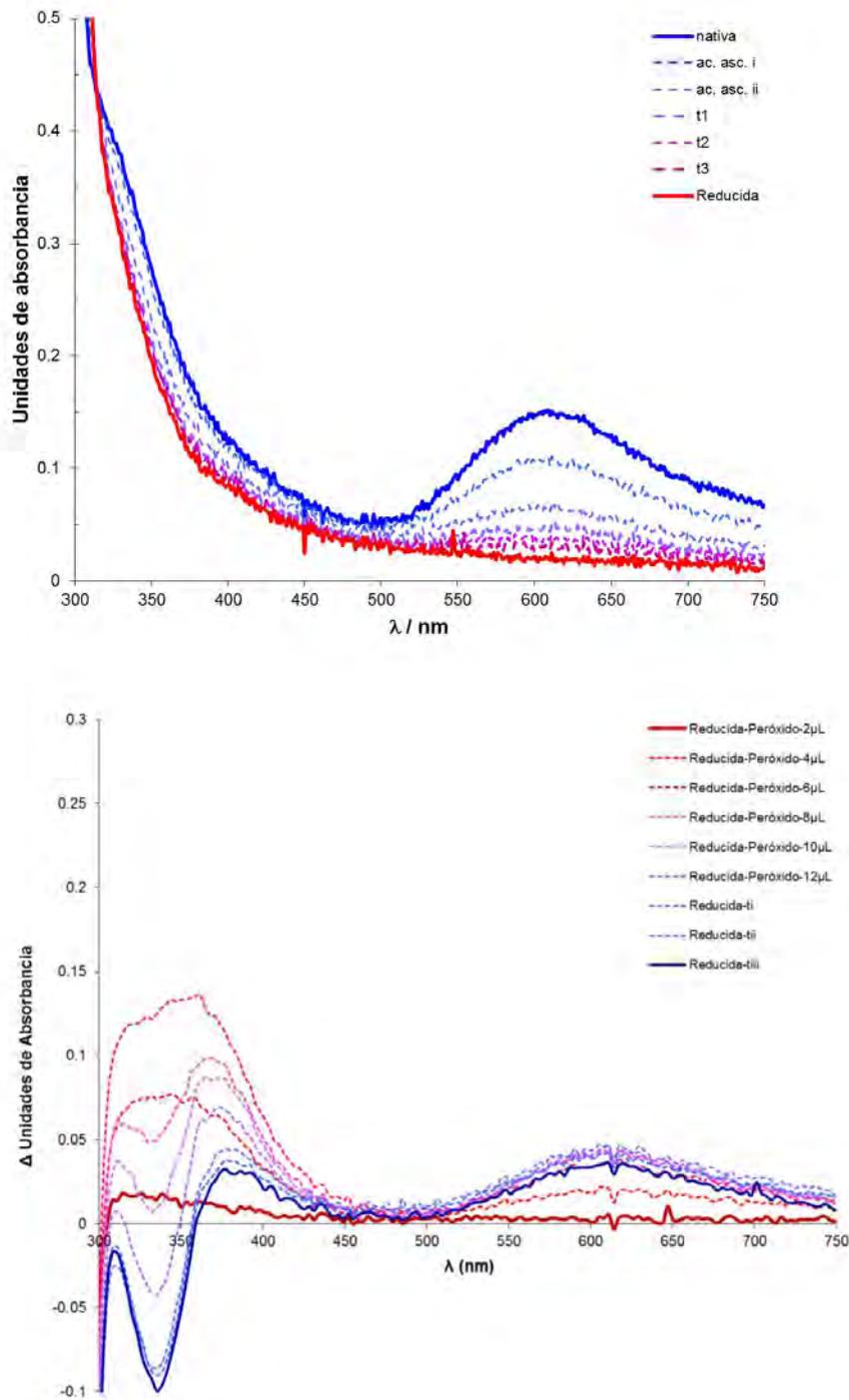


Figura 3.7 a) Reducción de Cg L con ácido ascórbico y b) reoxidación de los sitios de cobre al agregar peróxido a la solución.

3.3.4 EPR

Confirmamos la presencia del sitio T2, su alta ocupación y su estado oxidado, a través de espectros de EPR en banda X. La Figura 3.8 muestra la presencia de los

dos tipos de cobres paramagnéticos (Tabla 1). A pH neutro, 7.0, el espectro fue simulado con una proporción 1:1 dos señales distintas, la primera con $A_{||} = 93 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ y por lo tanto asignada como T1 Cu y la segunda con $A_{||} = 170 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a un T2 Cu (Tabla 3.3, Figura 3.9 línea azul).

Tabla 3.3 Parámetros de EPR de Cg L soluciones a diferentes valores de pH. Los datos en paréntesis corresponden a la población alternativa del T2 Cu (T2' Cu), observada en las condiciones ácidas.

Cu	Parámetro	pH 4.0	pH 5.5	pH 7.0
T1	g_x	2.045	2.05	2.06
	g_y	2.05	2.035	2.05
	g_z	2.192	2.188	2.192
	A (cm^{-1})	10×10^{-4}	10×10^{-4}	10×10^{-4}
	$A_{ }$ (cm^{-1})	93×10^{-4}	90×10^{-4}	93×10^{-4}
T2 (T2')	g_x	2.05 (2.08)	2.05 (2.075)	2.05
	g_y	2.03 (2.08)	2.03 (2.075)	2.03
	g_z	2.26 (2.365)	2.26 (2.260)	2.263
	A (cm^{-1})	10×10^{-4}	10×10^{-4}	10×10^{-4}
	$A_{ }$ (cm^{-1})	177×10^{-4} (153×10^{-4})	177×10^{-4} (153×10^{-4})	170×10^{-4}

Posteriormente, probamos si cambios en el pH causaban alteraciones sobre los sitios paramagnéticos. Para simular correctamente los espectros de las soluciones de Cg L a pH 5.5 y 4.0, fue necesario incluir una señal adicional, correspondiente a un centro de cobre con ligeras variaciones en los parámetros descritos anteriormente. El mejor ajuste de la simulación de dicha señal, se obtuvo con un valor de $A_{||} = 153 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, por lo que se designó a este sitio adicional como T2' Cu, es decir, como una población de T2 con propiedades ligeramente alteradas. A pH 5.5 esta señal fue modelada como $\frac{1}{8}$ de la señal total, correspondiendo $\frac{3}{8}$ ala señal del T2 *normal* y el $\frac{1}{2}$ restante al T1 Cu. Al acidificar

más la solución, a pH 4.0, no sólo se mantuvo la señal del T2' Cu sino que su proporción fue mayor 2:1:1, correspondientes a los sitios T1Cu:T2Cu:T2'Cu; es decir, la señal del sitio T2'Cu aumento a $\frac{1}{4}$ de la señal total.

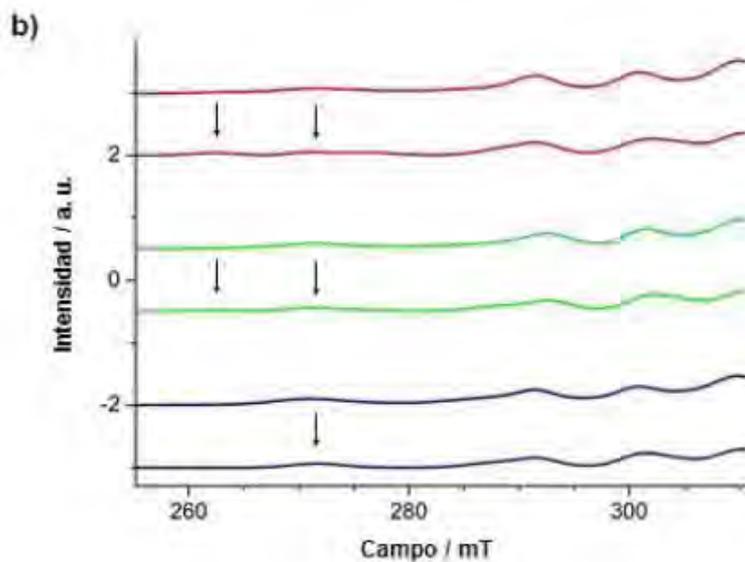
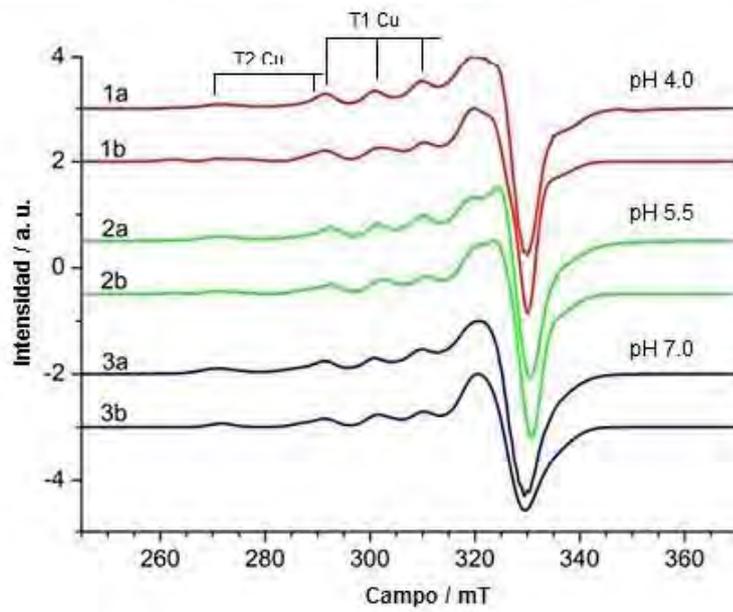


Figura 3.8 en el inciso a) se muestran los espectros de EPR de banda X de soluciones de Cg L a diferentes valores de pH. En b) se presenta un aumento a la región del T2 Cu.

Los parámetros del T1 Cu se mantuvieron sin cambios significativos entre las muestras analizadas. Por lo tanto, los cambios observados se observan el sitio T2 Cu y pueden explicarse como una configuración alterna del mismo que aumenta en concentración conforme se acidifica el medio. Por último, los datos de EPR mostraron que no hay ocupación parcial en ninguno de los sitios puesto que la proporción de T1Cu:T2Cu es constante (1:1) en el intervalo de pH explorado. Los parámetros derivados de la simulación de los espectros correspondientes a cada uno de ellos se encuentran en la Tabla 3.3.

3.3.5 Actividad

Las pruebas de actividad realizadas en el intervalo de pH 3-7 mostraron perfiles idénticos para los sustratos de naturaleza fenólica y no fenólica (Figura 3.10 barras rojas y azules respectivamente). El máximo de actividad se observó a pH 3.0 a partir del cual la actividad disminuye gradualmente conforme se alcaliniza el medio.

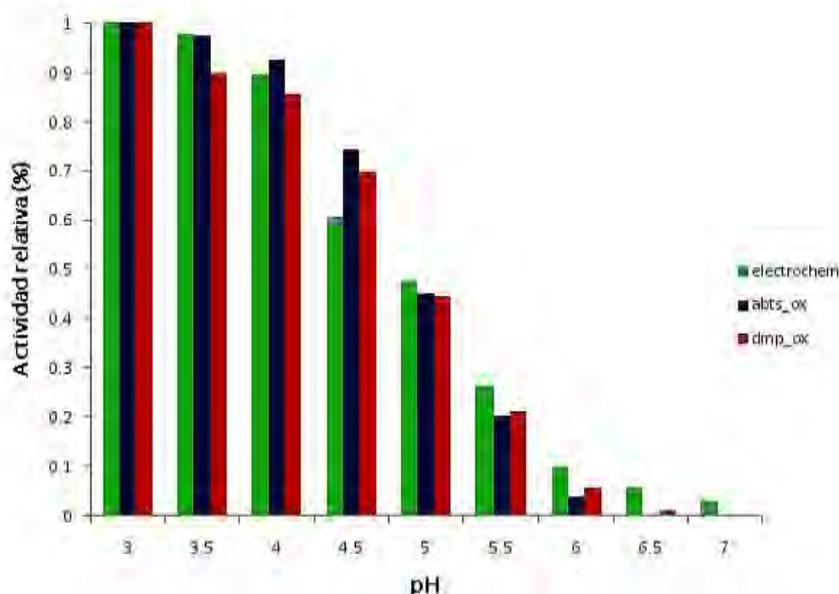


Figura 3.10 Variación de la actividad relativa de Cg L en el intervalo de pH 3-7. Se muestra la actividad obtenida a partir de un sustrato fenólico (DMP, rojo), uno no fenólico (ABTS, azul) y la actividad obtenida por electroquímica (verde).

El efecto de los inhibidores Cl^- , F^- y N_3^- , ensayado en el mismo intervalo de pH, mostró que la inhibición por F^- y N_3^- no es susceptible al pH (se mantiene constante el parámetro I_{50}), pero la realizada por Cl^- sí depende significativamente del grado de alcalinidad del medio. El parámetro I_{50} aumenta drásticamente de 2 mM observado a pH 3 a 318 mM a pH 5 (Figura 3.11).

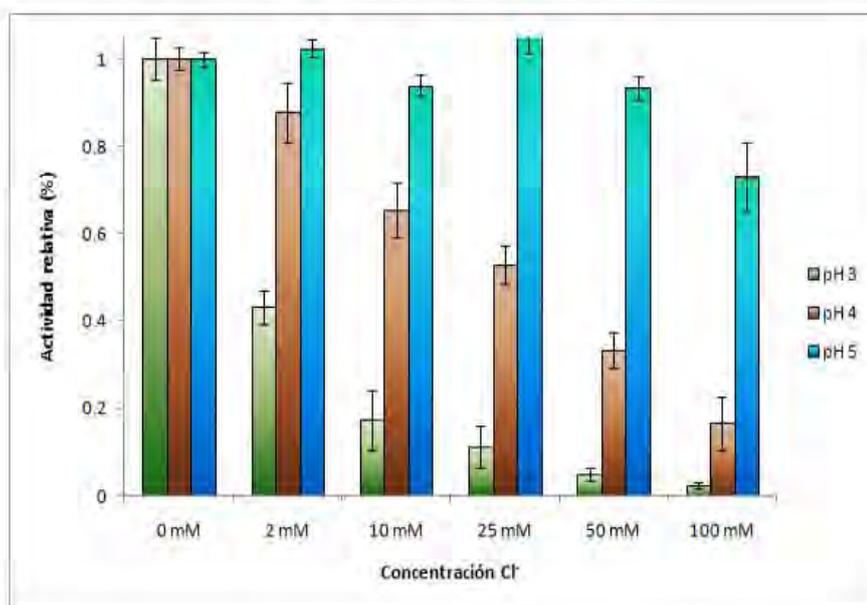


Figura 3.11 Variación de la actividad relativa de Cg L en el intervalo de pH 3-5. Se muestra la actividad obtenida a partir de un sustrato fenólico (DMP) en presencia de concentraciones de Cl^- .

3.3.6 Electroquímica

Para obtener una magnitud de corriente útil durante las pruebas de voltametría catalítica, modificamos el electrodo con 2-aminoantraceno como se describió en Materiales y Métodos. La modificación del electrodo con una solución de antraceno-2-diazonio resulta en un voltamograma con cuatro características particulares (Figura 3.12 a). La parte reductiva del voltamograma consiste de un pico definido de reducción a 0.31 V, seguido por un segundo pico más ancho a 0.22 V. Si se hace un segundo barrido, el área de estos dos picos disminuye en un 75 %,

indicando que la superficie del PGE ha sido cubierta por el antraceno. Dependiendo de la superficie del electrodo, un tercer pico puede aparecer a 0.38 V. En la dirección oxidativa se observa un pico asimétrico con un máximo a 0.39 V y un segundo pico centrado a 0.61-0.62 V.

El efecto de la modificación del electrodo se puede ver claramente en la figura 3.12 b, en la que la corriente del electrodo modificado es más de cinco veces mayor a la presente en el electrodo no modificado.

Una vez modificado el electrodo, utilizamos la PFV catalítica para analizar dos aspectos de la catálisis: el perfil actividad vs pH y el comportamiento del potencial catalítico (E_{cat}) en el intervalo de pH 2.5-7.0, así como el efecto de concentraciones crecientes de los inhibidores Cl^- , F^- y N_3^- .

Como se observa en la Figura 3.10 (barras verdes) el perfil de la actividad vs pH es idéntico al observado mediante la conversión de sustratos fenólicos y no fenólicos en las pruebas realizadas en solución. Entonces, podemos asegurar que la unión de la enzima con el electrodo no modifica por tanto la actividad de Cg L, en este caso la reducción de O_2 .

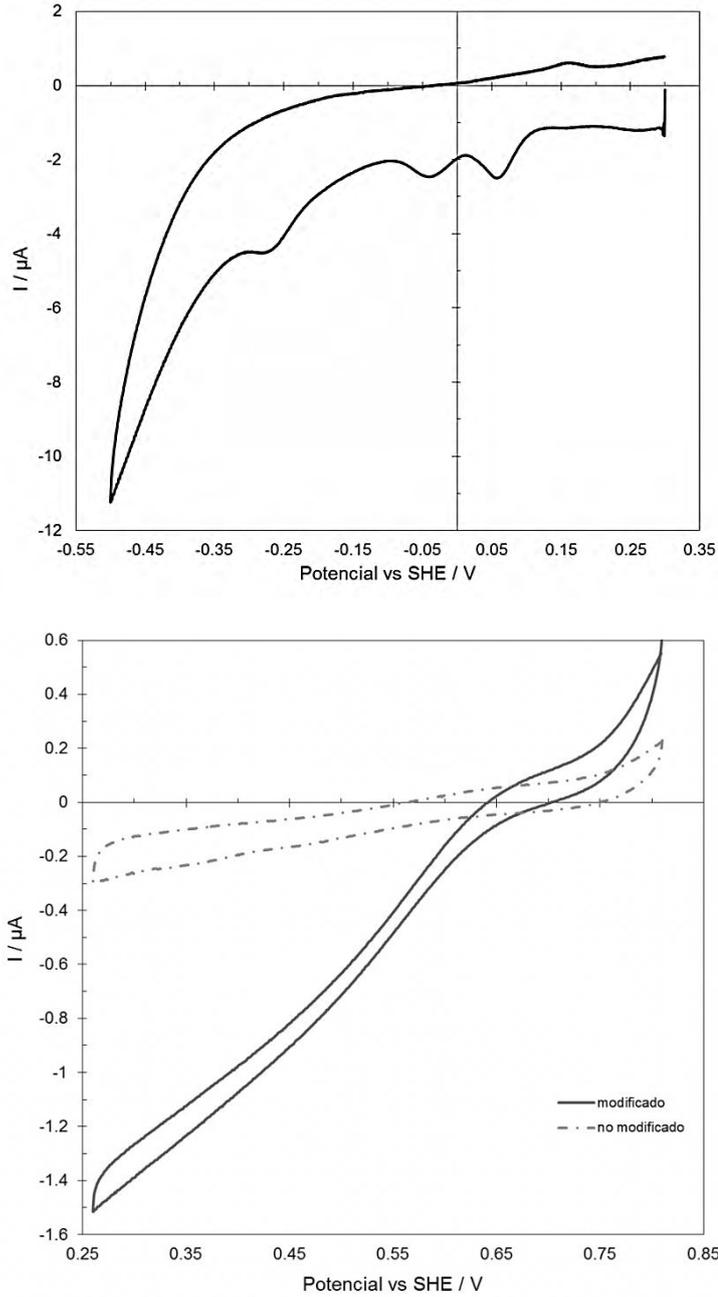


Figura 3.12 a) Voltamograma derivado de la modificación del electrodo con antraceno. b) Voltamograma catalítico de electrodos con Cg L, la comparación muestra la mayor corriente observada tras la modificación química del electrodo.

La determinación de E_{cat} mostró una fuerte dependencia con el pH del medio. El mayor potencial catalítico (0.80 V) se observó a pH 3.0 y decae con un perfil tipo sigmoidea al alcalinizar el medio. El perfil se sobrepone con el de la actividad

enzimática (Figura 3.10), lo que sugiere la participación de los residuos Asp o Glu (pka ~ 4.0-4.5) tanto en la actividad como en la determinación del potencial.

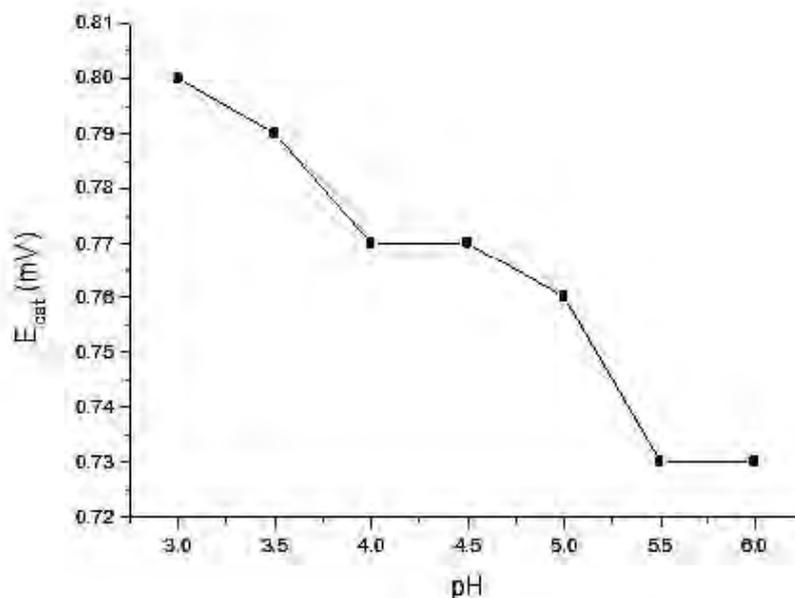


Figura 3.13. Dependencia del potencial catalítico (E_{cat}) con el pH.

3.4 Discusión

La cuantificación de cobre, junto con los resultados derivados de UV-Visible, EPR y XAS, confirmaron que las muestras de Cg L utilizadas durante esta tesis, contienen todos los cobres a una alta ocupación, cercana a 1.0, y que todos ellos se encuentran en estado oxidado. Este resultado es indispensable para el desarrollo del capítulo siguiente de esta tesis, que versa sobre la reducción de los sitios de cobre en cristales de Cg L inducida por los productos radiolíticos derivados de la irradiación con rayos X.

Aunque los valores de ϵ_{T1} y ϵ_{T2} son menor y mayor respectivamente a los descritos para la lacasa de *R. vernicifera*³⁵, éstos se encuentran en el intervalo

³⁵ Utilizamos esta lacasa como referencia porque es la mejor estudiada.

descrito para otras lacasas fúngicas, por ejemplo *Coprinus cinereus* $\epsilon_{T1} = 4.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{T3} = 4.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ([Bukh & Bjerrum, 2010](#)), *Melanocarpus albomyces* $\epsilon_{T1} = 6.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{T3} = 10.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ([Hakulinen et al., 2002](#)) o la bacteriana de *Bacillus subtilis* $\epsilon_{T1} = 4.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{T3} = 4.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ([Durão et al., 2008](#)). Aunque se han determinado varias estructuras de lacasas y otras BMCO por rayos X, es difícil encontrar en la literatura sus valores de ϵ_{T1} y ϵ_{T3} , por lo que es difícil establecer una correlación entre la configuración de los sitios³⁶ y los espectros UV-Visible.

Los perfiles de actividad en el intervalo de pH mostraron que la enzima es activa en el intervalo 3.0-6.5 y que la actividad tiene un perfil de curva sigmoidea en el intervalo estudiado, sin importar la naturaleza del sustrato empleado. La actividad máxima se observó a pH 3.0, siguiendo un decaimiento gradual hasta inactivarse a pH 7.0.

El mismo comportamiento se observó para E_{cat} , cuyo valor oscila entre 0.80 V y 0.73 V. La superposición de los perfiles de actividad y de E_{cat} vs pH, sugieren la participación de residuos ácidos en la determinación de los perfiles de actividad y del potencial catalítico.

La dependencia pH-inhibición de la actividad enzimática por Cl^- , sugiere un mecanismo de inhibición distinto al de los otros dos inhibidores probados (F^- y N_3^-), así como la participación de la protonación de algún residuo cercano a los centros de cobre involucrado en la unión del Cl^- .

³⁶ Con conformación me refiero principalmente a número e identidad de ligandos, los cuales están directamente relacionados con el potencial redox de los sitios y con el nivel de covalencia de los enlaces.

Capítulo 4 Reacciones redox en cristales de Cg L

4.1 Introducción

Este cuarto capítulo comprende un estudio sobre cómo aprovechar la generación de radicales, producidos durante la irradiación de cristales de proteína con rayos X, como herramienta para estudiar mecanismos catalíticos de sistemas redox a nivel atómico. Para ello utilizamos como modelo a Cg L.

Como describimos en el capítulo anterior, las lacasas poseen cuatro sitios de cobre, clasificados en tres tipos de acuerdo a sus características espectroscópicas. El T1 Cu, o cobre azul, el más cercano a la superficie de la proteína (Figura 4.1), funciona como aceptor primario de electrones. Está coordinado por dos histidinas y una cisteína. El residuo Met que en algunas lacasas funge como ligando axial en Cg L corresponde a Ile. La intensa transición de transferencia de carga (CT) SCys→Cu²⁺ hace a este sitio detectable en la región visible del espectro, con un máximo de absorción a 608 nm y en EPR por un desdoblamiento hiperfino estrecho. El T2 Cu o cobre *normal*, coordinado por dos histidinas y una molécula de OH⁻, sólo es identificable por EPR y se caracteriza por un desdoblamiento hiperfino amplio. En el sitio binuclear T3 Cu, cada uno de los cobres es coordinado por tres histidinas. Su estado oxidado, en el que ambos T3 se encuentran unidos por medio de un OH⁻, se observa como un hombro a 330 nm.

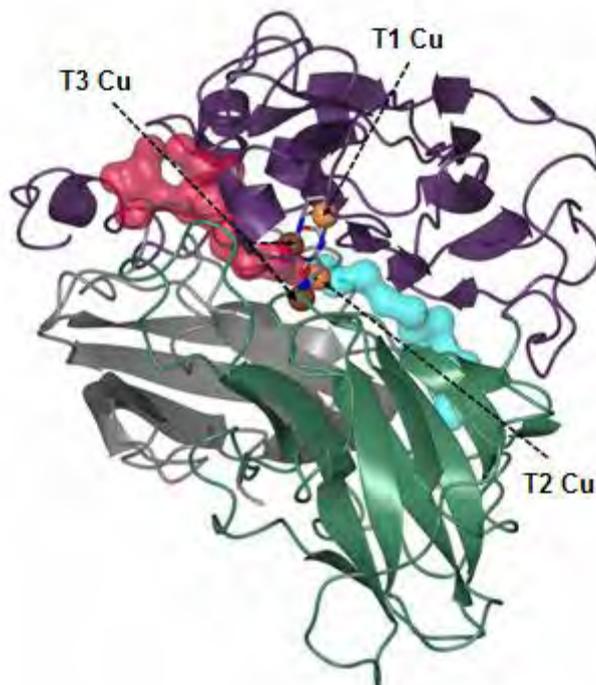


Figura 4.1 Estructura tridimensional de *Cg L* señalando la ubicación de los sitios metálicos y los canales de acceso del O₂ (magenta) y de salida de H₂O (cian).

El enfoque empleado en este capítulo combina la producción de especies radicales, primordialmente e_{aq}^- y $\cdot OH$, generadas durante la irradiación de rayos X^{37} y un sistema redox como lo es *Cg L*. Bajo nuestra propuesta, los electrones requeridos para la reducción de oxígeno, que originalmente provienen de la oxidación de un sustrato en el sitio T1 Cu, serían generados durante la irradiación de los cristales y en específico por la radiólisis del solvente (Figura 2.1, Capítulo 2). Puesto que los cristales de *Cg L* contienen más de 60 % de solvente, la generación de radicales $\cdot OH$ y de e_{aq}^- es relevante en este estudio. La reducción y radiólisis de sitios metálicos, junto con el daño sufrido por ciertos residuos de aminoácidos ha sido demostrada ampliamente en diversas proteínas y en elementos como Br ([Oliéric et al., 2007](#)), Hg ([Ramagopal et al., 2005](#)), I ([Evans et al., 2003](#)) y Se ([Rice et al., 2000](#)).

³⁷ Descrito en el capítulo 2.

Lo anterior nos permite hipotetizar que observaremos cambios de estado de oxidación en los centros de cobre inducidos por los radicales generados durante la irradiación de los cristales de *Cg L*. En caso de ocurrir una reducción gradual, ésta causaría la reducción del O_2 a $2H_2O$ en las moléculas de *Cg L* al interior del cristal, simulando así la catálisis enzimática (Figura 4.2). Siendo que la proporción de sitios metálicos reducidos depende directamente de la dosis, al manipular la dosis absorbida podremos obtener estructuras en diferentes niveles o estados de reducción, las cuales podrán ser extrapolables a los intermediarios catalíticos de la reducción de O_2 . Junto con la reducción de $Cu^{2+} \rightarrow Cu^{1+}$, los sitios metálicos serán sujeto de radiólisis: la ruptura del enlace metal-proteína. Por ello, esperamos que la ocupación de los sitios metálicos sea también proporcional a la dosis absorbida por el cristal.

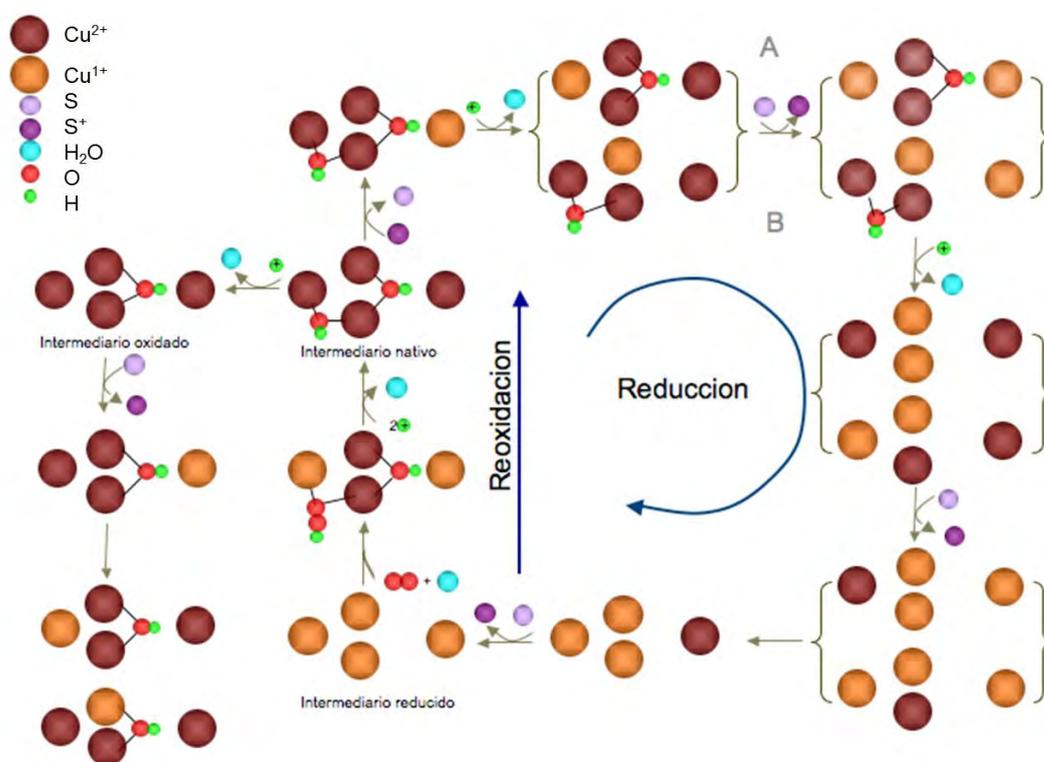


Figura 4.2 Ciclo catalítico de la reducción de O_2 a $2H_2O$ en las *BMCO*. (Modificado de Solomon, E. I. *et al.*, 1996).

Para aplicar este enfoque, es obligatorio partir de una forma oxidada de la enzima para, a partir de ella, reducirla gradualmente y tratar de obtener intermediarios de la reducción del O₂ (intermediario nativo, Figura 4.2). Esto puede realizarse mediante dos métodos distintos: determinación de estructuras a dosis variables y formación de *data-sets* compuestos ([Berglund et al., 2002](#)). Mientras que el primero se basa en la colecta de datos de diferentes cristales a dosis variables, el segundo fusiona datos de cristales colectados bajo los mismos regímenes de dosis (Figura 4.3).

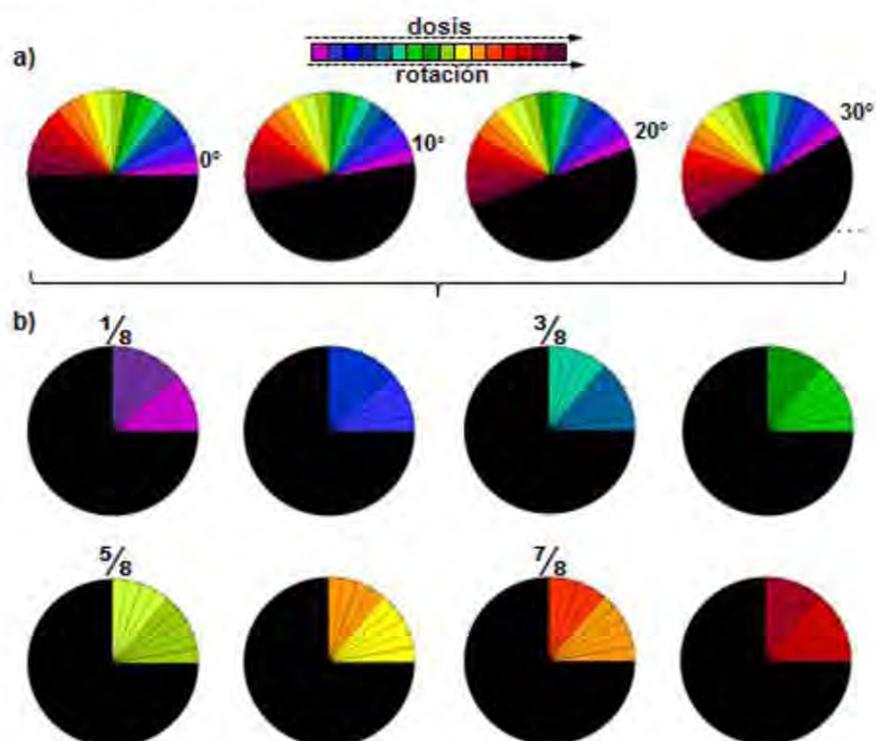


Figura 4.3 Formación de *data-sets* compuestos a partir de *data-sets* con un origen distinto.

Se han determinado estructuras tridimensionales de *BMCOs* de diferentes fuentes, las cuales han proporcionado información muy valiosa sobre la unión del sustrato ([Kallio et al., 2009](#); [Matera et al., 2008](#)), configuración de intermediarios

([Bento et al., 2005](#)), donadores de protones ([Taylor et al., 2005](#)) y sobre las determinantes del potencial redox ([Hall et al., 1999](#); [Piontek et al., 2002](#); [Cracknell et al., 2011](#)). Sin embargo, el efecto de la radiación ionizante sobre esta familia de enzimas ha sido vagamente abordado.

En el caso específico de las lacasas, diferentes intermediarios de la reducción de O₂ han sido descritos en estructuras de diferentes fuentes ([Piontek et al., 2002](#); [Bento et al., 2005](#); [Polyakov et al., 2009](#)), distintos monómeros de la unidad asimétrica ([Ferraroni et al., 2007](#)) y en cristales expuestos a diferentes dosis de radiación ([Hakulinen et al., 2006](#)). *Hakulinen y colaboradores* (2006) mostraron que a mayores dosis de radiación el sitio T1 Cu es reducido³⁸. Junto con ello observaron la formación de intermediarios de reducción de O₂, a 320 y 420 nm. Estas evidencias demuestran que los rayos X modifican las estructuras de *BMCOs* y que sus efectos deben ser tomados en cuenta a la hora de abordar estos sistemas y de desarrollar interpretaciones estructurales.

4.1.1 Consecuencia de cambios de pH sobre Cg L

Durante mi trabajo de maestría determinamos la estructura de Cg L a tres diferentes valores de pH ([De la Mora, 2008](#)). El objetivo del proyecto era encontrar las determinantes estructurales de la inhibición enzimática por pH, la cual se proponía que ocurría por acumulación de iones OH⁻.

De manera inesperada, encontramos diferencias entre los sitios de cobre de la enzima cristalizada a diferentes valores de pH, mas no indicadores de la acumulación de OH⁻ como se proponía anteriormente. Aunque debemos reconocer

³⁸ Observado como una disminución en la absorbancia a 610 nm

que la cristalografía³⁹ no es la mejor técnica para determinar el estado de protonación de los residuos ácidos, que fungen como donadores de protones, cuya desprotonación podría interpretarse como acumulación de iones OH⁻.

En resumen, los cambios más notables se observaron en los sitios de cobre y en la primera esfera de coordinación⁴⁰. Entre ellos, destaca destacó la ausencia del T2 Cu en las condiciones de mayor acidez y/o disponibilidad de protones (pH 4.0). Aunque es común encontrar ocupaciones parciales del sitio T2 Cu en las estructuras depositadas en el PDB, sólo dos depósitos del PDB (1a65 y 1hfu, ambos de *C. cinereus*) presentan ausencia de densidad electrónica en dicho sitio. Además, encontramos diferencias en la ocupación de los sitios T1 Cu dependientes del pH del medio (Tabla 4.3) y cambios en las distancias de coordinación de los sitios T1 Cu y T3 Cu. Mientras que en el T1 Cu hay un aumento significativo en la distancia del enlace Cu-His476 de 0.4 Å, en el sitio binuclear T3 Cu hay una disminución de 0.5 Å en la distancia que separa a los dos T3 Cu. Ambas observaciones derivadas de la comparación de las estructuras determinadas a pH 4 y pH 5.5/7.0⁴¹ (Tabla 4.1, Figura 4.5).

Las observaciones anteriores, sugieren que las diferencias observadas anteriormente en los sitios metálicos son consecuencia de la reducción inducida por rayos X. Estos fenómenos han sido ampliamente caracterizados durante los últimos diez años, en los que se ha concluido que los sitios metálicos son susceptibles a la reducción y la radiólisis inducidas por los rayos X ([Carugo & Carugo, 2005](#)). Ambas

³⁹ Salvo a resoluciones > 1.6 Å.

⁴⁰ La primera esfera es coordinación está definida por los residuos de aminoácidos que coordinan directamente a los metales.

⁴¹ Las estructuras determinadas a pH 5.5 y 7.0 resultaron ser prácticamente idénticas en las distancias de coordinación. La única diferencia observada fue una conformación alterna en la His418 observada a pH 5.5 mas no a pH 7.0.

a su vez son dependientes de la cantidad de dosis absorbida durante la colecta de datos.

Tabla 4.1 Distancias de coordinación y ocupación de los sitios de Cu en *Cg L* a diferentes valores de pH.

pH	CuT1 (Å)	CuT1 (ocupación)	Cu T2 (ocupación)	CuT3 (CuA-CuB) (Å)	Cu T3 (ocupación)
4.0	NHis415-Cu= 2.11	0.3	--	4.5	A =0.8 B=0.7
	NHis4762-Cu= 2.50				
	S γ Cys-Cu= 2.54				
5.5	NHis415-Cu= 2.12	0.7	0.46	5.0	A =0.8 B = 0.8
	NHis476-Cu= 2.11				
	S γ Cys-Cu= 2.21				
7.0	NHis415-Cu= 2.2	0.6	0.31	4.8	A =0.8 B = 0.7
	NHis476-Cu= 2.3				
	S γ Cys-Cu= 2.31				

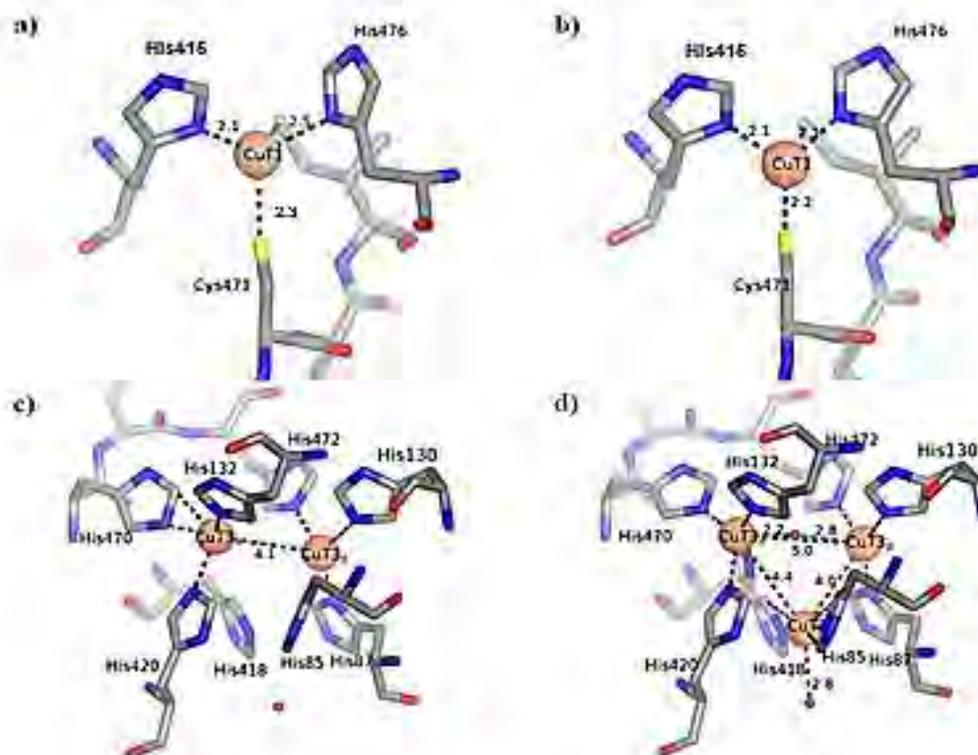


Figura 4.4 Diferencias geométricas observadas entre los sitios de cobre T1 (Cu_{T1}) y T2 (Cu_{T2}) de cristales de Cg L. En los incisos a) y b) se muestran las estructuras determinadas a pH 4.0 y en c) y d) aquella determinada a pH 5.5.

En este capítulo presentamos estructuras de Cg L determinadas a distintas

dosis absorbidas y demostramos que la reducción y radiólisis de los sitios metálicos ocurre durante la colecta de datos.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Cristalización

Previo a las pruebas de cristalización, la enzima purificada¹² fue dializada en solución amortiguadora 10 mM MES pH 5.5 para eliminar el NaCl así como el exceso de CuSO₄ de la solución.

¹² La purificación es descrita en el Capítulo 3.

Tras la diálisis, la proteína se concentró a 15 mg ml^{-1} en tubos *Amicon* con un MWCO de 30 kDa. Las condiciones de cristalización se optimizaron a partir de los resultados obtenidos con los kits de cristalización *Crystal Screen 1 (CS1)* y *Crystal Screen 2 (CS2)* de *Hampton Research* (Aliso viejo, EE.UU.). Todas las pruebas se realizaron bajo el método de gota colgante (difusión de vapor), mezclando $1 \mu\text{l}$ de solución proteína + $1 \mu\text{l}$ de solución precipitante. Se obtuvieron microcristales en la condición número 7 del CS2, conformada por 10% (p/v) PEG 1000, 10% (p/v) PEG 8000. Tras la optimización se obtuvieron cristales en dos condiciones, ambas a 277 K: 100 mM MES, 5% PEG 1000, 5% PEG 8000, pH 4.5⁴³ y 10% PEG 1000, 10% PEG 8000 en Tris pH 7.2. Se realizaron varias matrices de optimización para remplazar el MES por acetatos, citratos y una solución de McIlvaine, sin embargo, todos ellos fueron infructuosos.

Todos los valores de pH fueron verificados con tiras de papel pH (*pHydrion*) en los intervalos 0-13 y 4.0-6.9, o alternativamente con un potenciómetro (*Oakton Benchtop Meter 510*) tras escalar las soluciones a un volumen de 10 ml.

Anterior a la colecta de datos, los cristales fueron transferidos, durante 2 minutos, a una solución crio-protectora conformada por 25% (p/v) PEG 1000, 15% (p/v) PEG 4000, 5% (p/v) PEG 8000 y 100 mM Tris pH 7.2⁴⁴. Los cristales se montaron en un asa de rayón y fueron enfriados a 100 K en un flujo de $\text{N}_2(\text{g})$.

Para incrementar la ocupación de los sitios de cobre, los cristales crecidos a pH 4.5 y 7.2 fueron remojados en la solución crio-protectora descrita anteriormente pero con 2-10 mM de CuSO_4 adicional ([Bento et al., 2005](#)). La incubación se realizó en el intervalo de 2-10 minutos. A tiempos de incubación

⁴³ Puesto que este pH está fuera del intervalo de amortiguamiento del MES no se considera una solución amortiguadora o *buffer*.

⁴⁴ Alternativamente en 100 mM MES pH 4.5

mayores a 10 minutos se observaron cuarteaduras en el cristal así como pérdida de poder de difracción.

4.2.2 Colecta de datos

Los datos a baja dosis fueron colectados en del Instituto de Biotecnología de la UNAM, utilizando el generador de rayos X (ánodo rotatorio) *Rigaku RU- 200H* equipado con espejos *Yale* y operado a 90 kV y 50 mA a una $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ y un criostato *Oxford Cryosystems 600-series* con un detector *R-AXIS IV*. Estos datos fueron parte de mi tesis de maestría, pero los incluimos porque las estructuras derivadas de ese trabajo fueron afinadas nuevamente en el programa *PHENIX* ([Adams et al., 2010](#)) y los resultados presentados y discutidos en la presente tesis.

Los datos a altas dosis se colectaron en la línea X6A del NSLS de Brookhaven, NY a longitudes de onda de 0.9795 (12659 eV) y 1.3778 (8999 eV) \AA , utilizando un sistema de enfriamiento *Oxford Cryosystems 700 series* y un detector CCD ADSC Q270.

El estado de oxidación de los sitios de cobre fue probado por XAS en modo de fluorescencia ([Oliéric et al., 2007](#)). Los espectros fueron colectados en la línea X6A del NSLS, en el intervalo de energía de 8950-9130 eV, utilizando un monocromador de Si(111) (paso de banda = $1.9 \times 10^{-1} \text{ eV}$) y con un detector de fluorescencia, orientado en posición vertical a un ángulo de 90° relativo al eje del haz de rayos X. Los espectros se colectaron antes de iniciar la colecta de datos –a la menor dosis asequible- y después de colectar un *data-set* completo para comparar los estados de oxidación del cobre a distintas dosis absorbidas. La dosis estimada por cada barrido fue de 0.2 MGy.

Otro método empleado para determinar estado de oxidación y la posible formación de intermediarios fue la espectroscopía con luz visible. Estos experimentos se llevaron a cabo en la línea X10SA del sincrotrón suizo (SLS) en colaboración con el Dr. Robin L. Owen. Los espectros obtenidos en la región visible fueron colectados en el sincrotrón suizo utilizando un espectrofotómetro en línea ([Owen, Pearson, et al., 2009](#)). Los espectros fueron colectados a partir de una solución 20 mg ml⁻¹ de Cg L conteniendo 25 % PEG 1000, 15 % PEG 400 y 5 % PEG 8000 en 100 mM MES pH 5.5 en un asa de rayón a 100 K. Para establecer el blanco se colectó un espectro de la solución crio-protectora sin proteína. Se colectaron mil espectros en el intervalo 430-700 nm, correspondientes a un tiempo de exposición total de 19 s y una dosis aproximada de 0.3 MGy.

4.2.3 Procesamiento de datos

Los espectros de fluorescencia fueron sujetos a sustracción de fondo y normalizados mediante el programa *Athena* ([Ravel & Newville, 2005](#)).

Los espectros colectados en la región visible, en la línea X010SA del SLS, fueron sujetos a sustracción del blanco utilizando como referencia el espectro de la muestra de la solución crio-protectora sin proteína.

El cálculo de la dosis absorbida fue realizada en RADDPOSE v.2 ([Murray et al., 2004](#); [Paithankar et al., 2009](#); [Paithankar & Garman, 2010](#)). Para determinar la dosis absorbida es necesario conocer los parámetros del haz: energía, perfil, tamaño o área y flujo, junto con las propiedades del cristal: celda unitaria, grupo espacial, número de moléculas por unidad asimétrica, composición y dimensiones. La estimación del flujo del haz, en fotones por segundo (ph s⁻¹) fue obtenida mediante el uso de diodos de silicio ([Owen, Holton, et al., 2009](#)).

El indexado e integración de los datos se realizó en *MOSFLM* ([Leslie, 2006](#)). Las reflexiones integradas fueron ordenadas, escaladas y convertidas en amplitudes con *SORTMTZ*, *SCALA* y *TRUNCATE* respectivamente ([Evans, 2006](#)). El remplazo molecular se realizó en *MOLREP* ([Vagin & Teplyakov, 1997](#)), utilizando como modelo la estructura a pH 5.5 determinada durante la maestría (4a2d). El modelo resultante fue sujeto a afinamiento de cuerpo rígido seguido de afinamiento restringido, ambos en el programa *REFMAC* ([Murshudov et al., 1997](#)). El ajuste y construcción manual se llevaron a cabo en el programa *COOT* ([Emsley et al., 2010](#)). Tras el afinamiento restringido, los glicanos, iones de cobre y moléculas de agua fueron incluidas en el modelo. Durante el afinamiento, los factores de desplazamiento atómico (PDAs) de los sitios de cobre fueron calculados con la ocupación fija a 1.0. Los ciclos de afinamiento en *REFMAC* concluyeron una vez alcanzada la convergencia de los parámetros R_{work} y R_{free} y cuando sus valores fueran menores a 0.20 y 0.25 respectivamente. Finalmente, las ocupaciones de los sitios de cobre fueron calculadas iterativamente en *PHENIX v.1.5* (Adams et al., 2010). Los valores de error de las coordenadas reportados corresponden al error estándar estimado (e.s.u) de las posiciones atómicas calculadas por *REFMAC*, a partir de los parámetros R_{work} y R_{free} . Considerando que los valores e.s.u. representan un promedio de la certidumbre para cada estructura, se espera que las distancias cobre-ligando tengan una mayor precisión por su menor PDA relativo al conjunto atómico ([Vaguine et al., 1999](#)). La validación del modelo se realizó con *PROCHECK* ([Laskowski et al., 1993](#)). Los mapas de diferencia $F_o - F_c$ se calcularon utilizando *SORTMTZ*, *SCALEIT* y *FFT* en dicho orden. Excepto *PHENIX* y *COOT*, todos los programas forman parte de la suite *CCP4* ([The CCP4 suite: Programs for protein crystallography, 1994](#)).

Para generar los modelos correspondientes a dosis absorbidas intermedias, se formaron *data-sets* compuestos utilizando el método descrito previamente ([Berglund et al., 2002](#)). En resumen, se colectaron *data-sets* completos (240 imágenes, $\Delta\varphi=0.5^\circ$) de cuatro cristales de Cg L a diferentes ángulos φ iniciales (φ_{start}). A partir de ellos se formaron el mismo número de *data-sets* compuestos tomando 80 imágenes de cada *data-set* original, en los que cada intervalo fusionado correspondió a la misma dosis absorbida (Figura 4.4). Los *data-sets* compuestos fueron fusionados utilizando *SORTMTZ* y posteriormente procesados como se describió anteriormente.

4.3 Resultados

4.3.1 Espectroscopía Visible en línea

Los espectros de luz visible acoplados a la difracción mostraron la reducción gradual de la señal de 608 nm correspondiente al sitio T1 Cu (Figura 4.5a). Aunque, en realidad se observa una disminución en toda la región de 500-700 nm la comparación entre 450 y 608 nm muestra que la diferencia de los barridos presenta un mínimo a ~ 608 nm (Figura 4.5 b). La absorbancia en la región de $350 < \lambda > 700$ nm no se obtuvo debido al que el equipo empleado no registraba este intervalo. Esto impidió observar cambios en la banda de absorción de 330 nm, correspondiente a los sitios T3 Cu. Sin embargo, la reducción de la absorbancia observada en la región del sitio T1 Cu sugiere la reducción y/o la radiólisis del mismo.

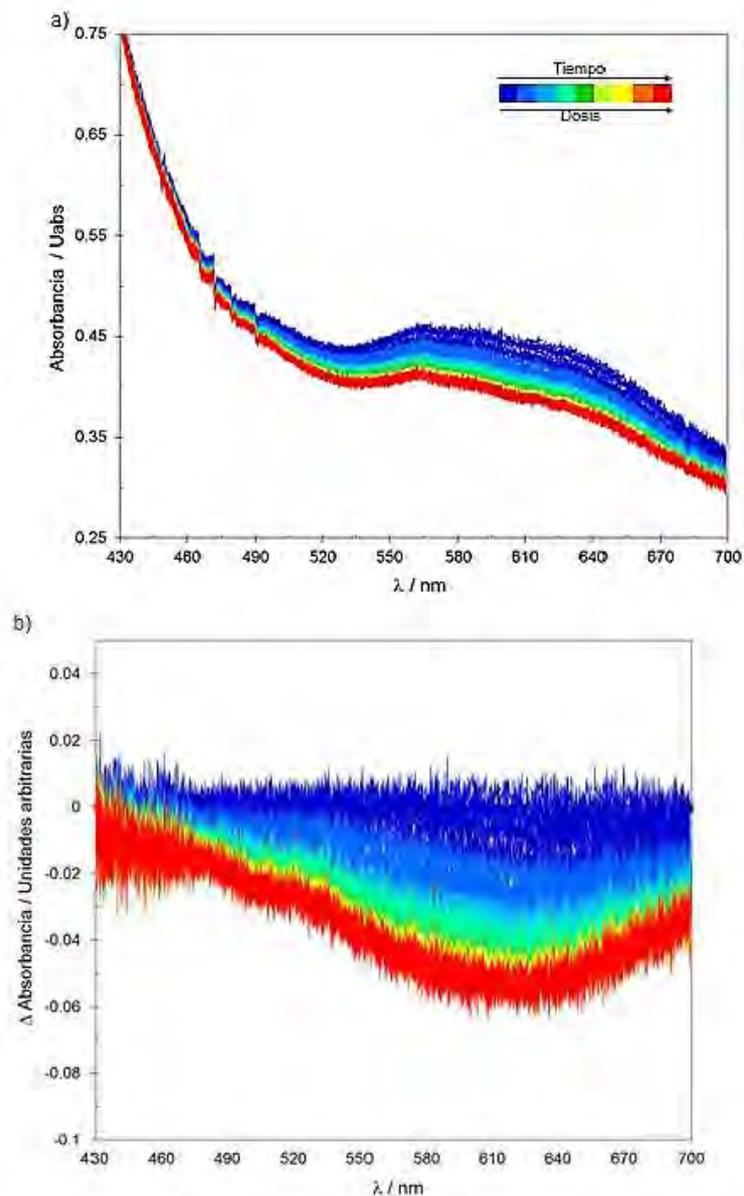


Figura 4.6 Espectros en el intervalo visible de 430-700 nm de una solución de Cg L a 218 K expuesta a un haz de rayos X de $50 \times 50 \mu\text{m}$ y 12.4 keV. El tiempo total de irradiación fue de 19 s equivalentes a una dosis de 0.3 MGy. Esta cantidad de dosis es similar a la absorbida por los cristales difractados en ánodo rotatorio, en los que observamos ocupaciones parciales de varios sitios de cobre.

4.3.2 Baja dosis

Las estructuras determinadas a baja dosis, en el ánodo rotatorio del *IBt*, durante la tesis de maestría fueron sujetas de nueva cuenta al afinamiento de ocupaciones descrito en la sección Materiales y Métodos. El sustento de someter las

estructuras nuevamente al proceso de afinamiento fue el de determinar por un método automático y único para todas las estructuras, la ocupación de cada uno de los sitios metálicos.

En lo que respecta a las ocupaciones, no se observaron diferencias significativas con respecto a los valores asignados manualmente durante la tesis de maestría (Tabla 4.2). Aunque las dosis absorbidas son muy similares, las ocupaciones de los sitios T2 y T1 Cu son variables y parecen depender del pH del medio en el que se cristalizaron y difractaron los cristales de Cg L. El sitio T2 Cu es el más lábil de los cuatro, ausente a pH 4.0 y a ocupaciones menores a 0.5 en los cristales a pH más alcalino. La ocupación del T1 es susceptible sólo al pH más ácido, en el que su ocupación es de 0.3, la mitad de la observada a pH 5.5 y 7.0. En cambio, la ocupación calculada para los dos T3 Cu es prácticamente la misma en los tres modelos. Aunque el afinamiento en *PHENIX* modificó las ocupaciones determinadas originalmente para justar los valores de PDA de los sitios metálicos con los de su entrono (residuos de aminoácidos y moléculas de agua), las nuevas ocupaciones estuvieron dentro de un intervalo de error aceptable. Por otra parte, el remojado en una solución crio-protectora con sales de cobre (CuSO_4) no aumentó la ocupación de ninguno de los sitios, independientemente del pH del medio.

El afinamiento automático no modificó tampoco las diferencias observadas en la geometría de los centros de cobre de las tres estructuras determinadas a baja dosis (Tabla 4.1, Figura 4.5).

Tabla 4.2 Comparación de las ocupaciones de los sitios de cobre determinadas por el método manual y mediante afinamiento de ocupaciones en Phenix en cristales de Cg L.

pH	Dosis (MGy)	Ocupación T1Cu (manual / phenix)	Ocupación T3 Cu (manual / phenix)	Ocupación T2 (manual / phenix)
4.0	0.2	0.2 / 0.3	A=0.9 B=0.9 / A=0.8 B= 0.7	0 / 0

5.5	*0.4*	0.7 / 0.7	A=0.8 B=0.8 / A=0.8 B= 0.8	0.5/ 0.5
7.0	0.3	0.8 / 0.6	A=0.9 B=0.7 / A=0.8 B= 0.6	0.5 / 0.3

4.3.3 Absorción de rayos X

A continuación, realizamos XAS para darle mayor sustento a los resultados obtenido de los barridos en el visible, que sugieren la reducción del sitio T1 Cu como consecuencia de las reacciones químicas desencadenadas durante la irradiación.

El espectro obtenido del cristal de *Cg L* a la menor dosis asequible (0.2 MGy), mostró el perfil característico de cobres en estado oxidado o cúprico (Cu^{2+}) con un máximo de absorbancia a 8998 eV (Figura 4.7, línea continua). El espectro del cristal obtenido tras una colecta completa de datos, con una dosis aproximada de 8 MGy muestra una menor absorbancia a 8998 eV, acompañada por la aparición o incremento de un hombro a menor energía a 8984 eV. Este perfil es característico del estado reducido o cuproso (Cu^{1+}) y demuestra que durante la irradiación con rayos X los sitios de cobre contenidos en cristales de *Cg L* se reducen. El hombro a 8984 eV se observa, aunque a menor magnitud, desde el espectro a 0.2 MGy y se explica porque la dosis para reducir estos sitios metálicos es menor a ese valor. Por lo tanto, el incremento en la absorbancia del hombro a 8984 eV es dependiente de la dosis absorbida.

Ahora, a diferencia de los resultados derivados del espectro visible, que nos permiten afirmar que el T1 Cu es el que se reduce, los espectros de XAS no permiten discriminar la identidad de los sitios reducidos, sino simplemente concluir que hay un aumento de Cu^{+1} con respecto al Cu^{2+} en la población contenida en el cristal.

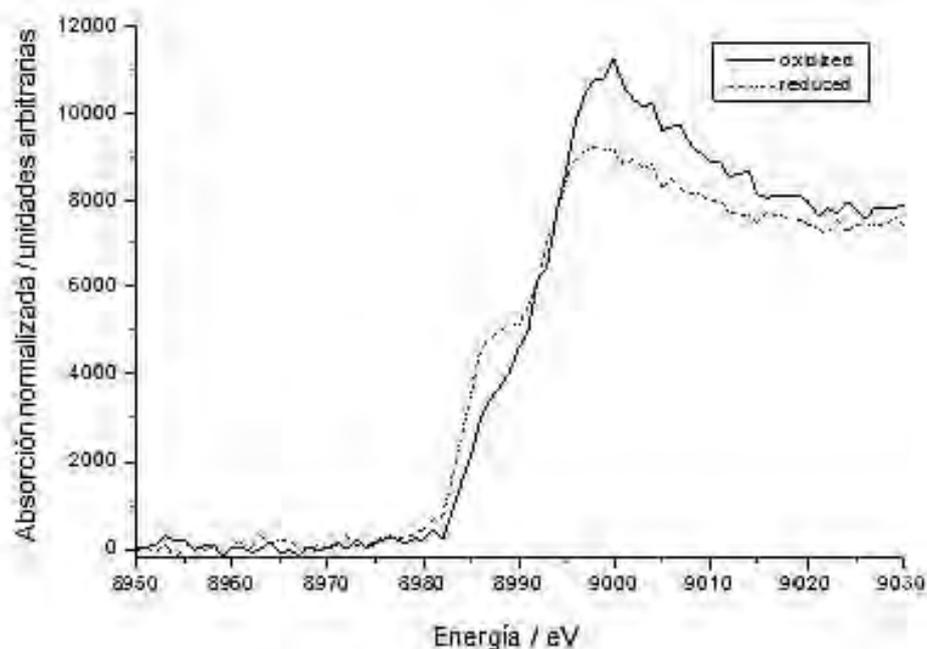


Figura 4.7 Espectros de XAS colectados a partir de un cristal de Cg L. Los espectros se colectaron en modo de fluorescencia en la línea X6A del NSLS.

4.3.4 Alta dosis

Para determinar el efecto de dosis mayores difractamos varios cristales de Cg L, tanto a pH 4.5 como a pH 7.2 y determinamos las estructuras mediante el mismo tratamiento descrito para los cristales a baja dosis. Probamos tres diferentes longitudes de onda: 0.9798 Å, 1.1271 Å y 1.3778 Å, para evaluar si junto con la dosis pudiera haber algún efecto de la longitud de onda sobre la ocupación de los sitios metálicos.

Sin importar el pH al cual se cristalizó Cg L, todos los cristales difractados mostraron vacío, ocupación 0.0, el sitio correspondiente al T2 Cu, es decir, en ninguno de los modelos determinados se observó densidad electrónica que

justificara la inclusión de un átomo de cobre en los modelos en ese sitio particular. En lo que al T1 Cu respecta se observó, también en todos los cristales empleados, una ocupación menor a 0.2, aunque en la mayoría de ellos el valor tiende a 0.0. Puesto que los resultados fueron prácticamente iguales para los más de 15 cristales difractados, en la Tabla 4.3 sólo se presentan los resultados de tres cristales representativos.

Tabla 4.3 Ocupación de los sitios de cobre en los cristales de Cg L difractados a altas dosis.

λ (Å)	Dosis (MGy)	Ocupación T1Cu (manual / phenix)	Ocupación T3 Cu (manual / phenix)	Ocupación T2 (manual / phenix)
0.9798	16	0.0	A = 0.5 B = 0.5	0.0
1.1271	8.2	0.0	A = 0.5 B = 0.5	0.0
1.3778	5.9	0.0	A = 0.5 B = 0.5	0.0

Una ventaja de utilizar $\lambda = 1.38$ Å es que nos permitió calcular mapas de densidad anómala para identificar los cobres de manera inequívoca y descartar que la baja ocupación se debiera a una relocalización de los sitios metálicos. En congruencia con los modelos descritos anteriormente, el único sitio que mostró densidad anómala fue el T3 binuclear (Figura 4.7). Las regiones correspondientes a los sitios T2 y T1 y sus alrededores no mostraron ningún indicio de la presencia de cobre. Una característica interesante del mapa mostrado en la Figura 4.7 es que la magnitud de la señal anómala de ambos sitios T3 es distinta, aun cuando su ocupación es la misma (Tabla 4.3).

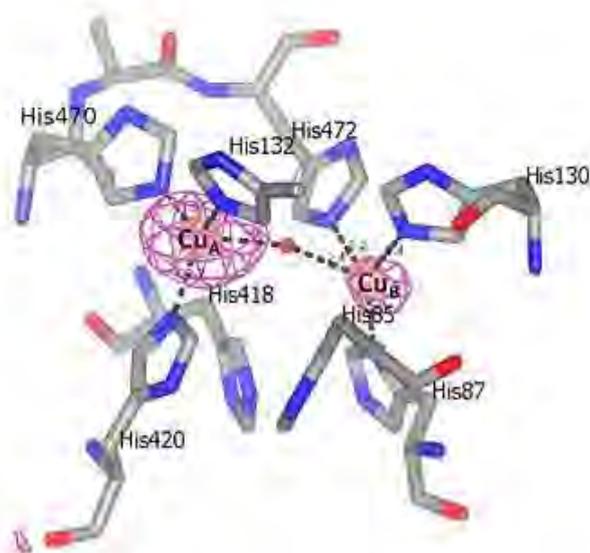


Figura 4.7 Mapa de densidad anómala calculada a partir de los datos colectados a 1.3778 Å. La densidad electrónica del mapa (magenta) está representada a 0.7 e Å⁻².

4.3.5 *Data-sets* compuestos

Tratamos entonces de encontrar ocupaciones parciales construyendo *data-sets* compuestos para obtener datos a dosis intermedias entre las obtenidas en ánodo rotatorio y aquellas determinadas en fuente sincrotrón. La dosis mínima de los *data-sets* compuestos fue de 4 MGy. Por ello los cuatro *data-sets* conformados comprenden las dosis de 4, 8, 12 y 16 MGy.

Al igual que en las estructuras de alta dosis descritas anteriormente, solamente se observó densidad electrónica en la región correspondiente al T3 Cu. Los dos sitios restantes, T1 y T2 Cu, se encontraron desocupados. Por otra parte, no se observaron diferencias en las ocupaciones calculadas para los dos T3 Cu, que fueron de 0.5 y 0.4 todo el intervalo de dosis para el T3_A Cu y el T3_B Cu respectivamente.

Las diferencias observadas entre los modelos determinados a dosis ascendentes fueron dos, la distancia de separación entre los dos T3 Cu y en la

densidad electrónica calculada entre ambos cobres. En esta última el mejor ajuste del modelo se obtuvo al incluir una molécula de H₂O. Entre la menor (4 MGy) y mayor (16 MGy) dosis, observamos una expansión gradual de la distancia de 4.43 Å al inicio a 4.74 Å. Esa expansión de la distancia de los cobres T3 aleja a la molécula de H₂O, que inicialmente se encontraba equidistante de los sitios T3_A Cu y T3_B Cu (2.2 y 2.3 Å respectivamente). La configuración final del sitio, aquella determinada a 16 MGy, posiciona a la molécula de H₂O a 2.1Å del T3_A Cu y a 2.8 Å del T3_B Cu (Figura 4.8).

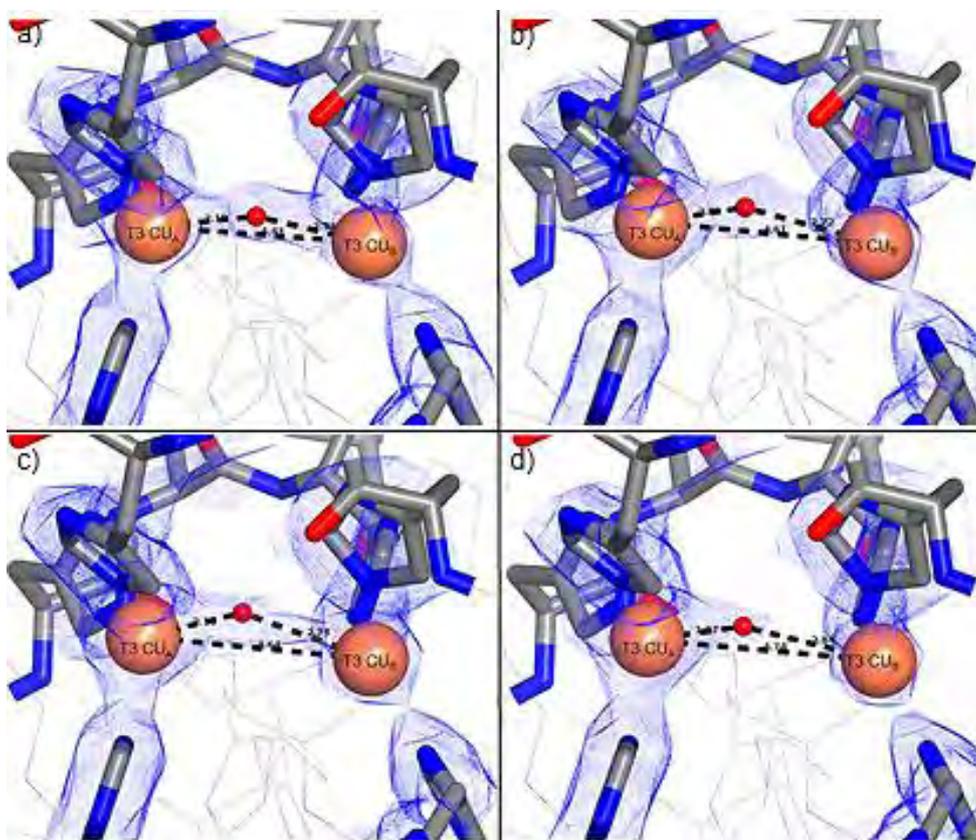


Figura 4.8 Cambios inducidos por el aumento de la dosis absorbida en los sitios T3 del centro trinuclear. a) 4, b) 8 c) 12 y d) 16 MGy. Mapas $2F_o-F_c=1.7 \sigma$ y $F_o-F_c=3.5 \sigma$.

A partir de los mismos *data-sets* compuestos, calculamos mapas anómalos para observar si la señal anómala correspondía con las ocupaciones calculadas para

cada uno de los sitios metálicos ($T3_{\alpha} Cu = 0.5$ y $T3_{\beta} Cu = 0.4$). En el *data-set* compuesto a menor dosis, es claro que la señal del $T3_{\alpha} Cu$ es mucho mayor que la su contraparte el $T3_{\beta} Cu$ (Figura 4.9a), en congruencia con la mayor ocupación calculada. De manera inesperada, observamos que, al aumentar la dosis absorbida, la señal anómala del $T3_{\alpha} Cu$ disminuye hasta desaparecer a dosis mayores a los 12 MGy (Figura 4.9 c). Aunque no es tan claro como la desaparición de la señal del sitio $T3_{\beta} Cu$, la señal anómala del $T3_{\alpha} Cu$ también disminuye al comparar los modelos obtenidos a menor (4 MGy) y mayor dosis (16 MGy).

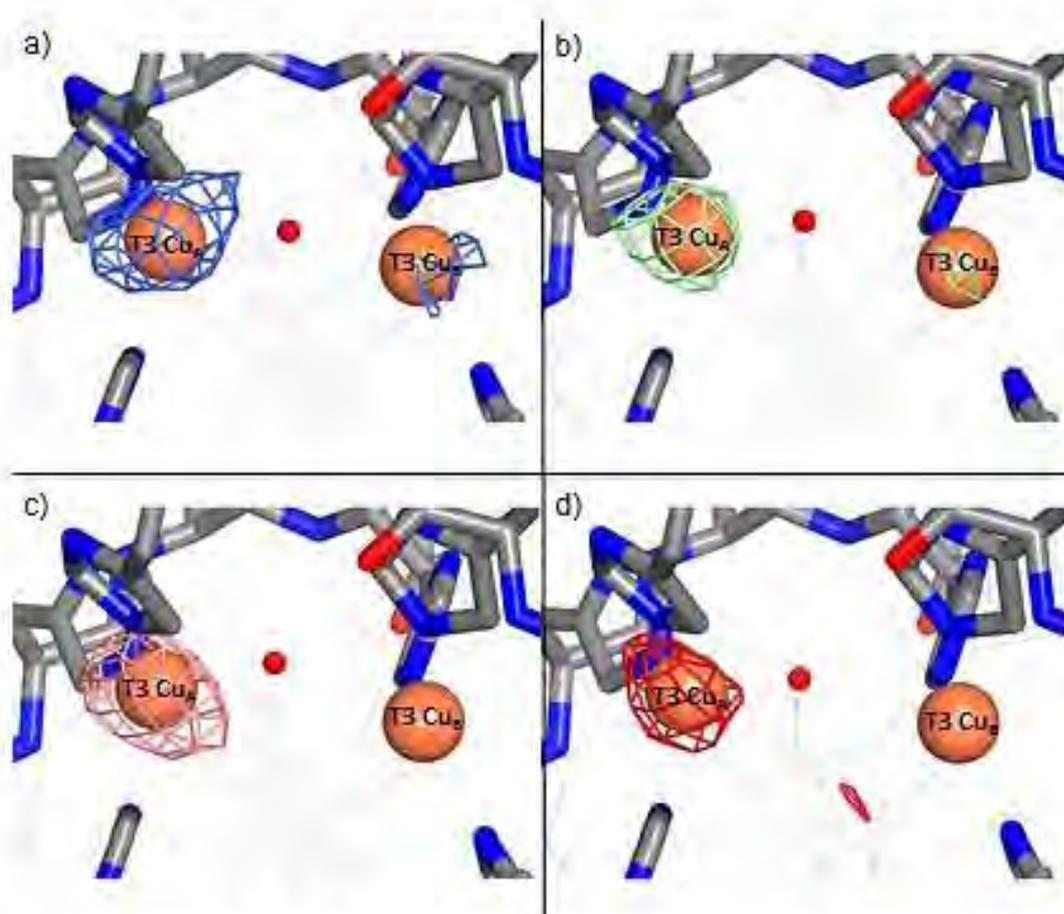


Figura 4.9 Efecto del aumento de la dosis absorbida en la señal anómala de los sitios T3 del centro trinuclear. El color de la densidad representa el aumento de la dosis absorbida por el cristal: a) 4, b) 8 c) 12 y d) 16 MGy. Mapas anómalos a 0.09 \AA^{-1} .

4.4 Discusión

En conjunto, los datos obtenidos de espectroscopía en la región visible, correspondiente al T1 Cu y los espectros de XAS a diferentes dosis absorbidas, demostraron la reducción de los sitios de cobre durante la exposición a la radiación ionizante. Esta afirmación es válida tanto para cristales como para proteína en solución. Los espectros en la región visible, muestran que el sitio T1 Cu se reduce durante los primeros segundos y a dosis absorbidas relativamente bajas (0.2 MGy). Debido a limitaciones experimentales no pudimos observar lo que ocurre en la zona del T3 Cu, mientras que el sitio T2 no puede seguirse por otra técnica que no sea EPR. Los espectros de XAS muestran que al finalizar la colecta de un *data-set*, una parte representativa de la población de cobres contenida en la muestra pasa del estado oxidado Cu^{2+} a su estado reducido Cu^{1+} . Un punto débil de nuestro análisis es que no permite concluir el orden de reducción de los sitios ni las dosis mínimas a las que éstas ocurren. Resultados similares han sido reportados para enzimas con sitios mononucleares de cobre como la azurina, cuyo T1 Cu se reduce a dosis de absorción menores a 6.6 MGy ([MacEdo et al., 2009](#)).

El afinamiento de las estructuras determinadas a baja dosis en ánodo rotatorio mostró que no hubo diferencias significativas entre la asignación de ocupaciones por procesamiento manual y por el método automático en *PHENIX*. Sin embargo, la ventaja del método automático es que elimina el sesgo del método manual y mostró ser tan eficiente como el anterior. La similitud de los valores de ocupación, sustenta nuestra observación previa que sugiere que tanto la ocupación de los sitios de cobre como la conformación de la esfera de coordinación son susceptibles al pH.

Las estructuras determinadas a altas dosis, mostraron que a dosis mayores que 4 MGy el sitio T2 Cu se escinde, sin importar el pH del medio cristalino. A altas

dosis y pH más alcalino (5.5 y 7.2), el sitio T2 no presentó densidad electrónica, a diferencia de los valores de ocupación de 0.3-0.5 observados a baja dosis.

El sitio T1 Cu también mostró ser más susceptible a la radiólisis a altas dosis. Mientras que a baja dosis su ocupación es de 0.3 a pH 4.0, en cristales crecidos en condiciones idénticas, pero difractados en fuentes sincrotrón su ocupación fue de 0.0, es decir, no se observó densidad electrónica para este sitio. A pH más alcalino, en específico pH 7.2, la ocupación del T1 Cu a bajas dosis fue de 0.6-0.7. Sin embargo, a altas dosis, la mayor ocupación observada fue de 0.2, siendo 0.0 en la mayoría de los cristales probados.

Por último, los sitios T3 Cu que habían mostrado no ser susceptibles a la radiólisis a bajas dosis (ocupaciones cercanas a 0.8), a alta dosis disminuyen su ocupación a ≤ 0.5 .

En síntesis, podemos concluir que hay un orden en la radiólisis observada en los cristales de Cg L, en la que el primero en ser escindido es el T2 Cu, seguido por el T1 Cu y por último una disminución en los sitios T3 Cu, que en nuestros resultados, nunca es menor de 0.4, incluso a la mayor dosis de absorción probada de 16 MGy.

Respecto a los *data-sets* compuestos, únicamente se observó densidad electrónica en los cobres del sitio T3. Con el aumento de dosis, en los modelos determinados a 4, 8, 12 y 16 MGy, no se observaron cambios en la ocupación de ninguno de los dos T3 Cu. En cambio, sí se observó una expansión de la distancia que separa al T3_A del T3_B, ésto conforme aumenta la dosis y como consecuencia la desaparición de la densidad electrónica (ruptura del enlace) entre el T3_B Cu y la molécula de agua modelada. Esto sugiere que la molécula de agua, que originalmente se encontraba *punteando* los dos cobres T3, se encuentra enlazada únicamente al T3_A al aumentar la dosis absorbida a 16 MGy. Junto con este cambio

observamos que la señal anómala correspondiente al $T3_A$ Cu es mucho mayor que la del $T3_B$ desde la menor dosis obtenida. La tenue señal del $T3_B$ desaparece a partir de los 12 MGy, aun cuando la ocupación de los dos sitios es igual (0.5 ambos) en el intervalo de dosis de 4-16 MGy. Puesto que la ocupación no cambia al aumentar la dosis, interpretamos esa diferencia en la densidad anómala como consecuencia de la reducción del sitio $T3_B$. Mientras que el $T3_A$ se encuentra oxidado, congruente con la unión de la molécula de H_2O , el $T3_B$ se ha reducido durante la irradiación con rayos X. Como se observa en la figura 4.7 la absorción y por tanto la contribución anómala, disminuye con el aumento de la dosis absorbida.

4.5 Conclusiones

En conclusión, la radiólisis de los sitios de cobre impidió la determinación de intermediarios de la reducción de O_2 , puesto que la ausencia del sitio T2 no es consistente con el mecanismo catalítico propuesto.

Sin embargo, observamos por dos métodos distintos, XAS y espectroscopia en el espectro visible, que los sitios de cobre se reducen al aumentar la dosis de radiación absorbida. Mientras que los espectros en la región visible, muestran la reducción específica del T1 Cu, XAS muestra la reducción de una parte de la población de Cu contenida en la muestra.

La combinación de las técnicas de espectroscopía y de la densidad electrónica calculada para los modelos cristalográficos, nos permite deducir que la reducción de los sitios, precede o es simultánea a la radiólisis. Mientras que a dosis menores a 4 MGy la ocupación del T2 Cu ya es menor a 0.5 en los tres cristales probados, la del T1 Cu es dependiente del pH del medio. A estas bajas dosis la ocupación de los dos T3 no se ve afectada significativamente. En cambio, a dosis mayores de 4 MGy no

existe densidad electrónica en el sitio T2 Cu. Lo mismo observamos con la ocupación del T1 Cu que tiende a 0.0 a dosis mayores a la mencionada. Mientras que a bajas dosis (menores a 1 MGy) la ocupación de los cobres del sitio T3 es de alrededor de 0.8, a altas dosis ésta disminuye a valores ≤ 0.5 . La reducción observada mediante XAS, junto con los mapas anómalos calculados para los datasets compuestos, sugiere que el sitio T3_B Cu es más susceptible a la reducción que su contraparte el T3_A Cu, quien permanece predominantemente⁴⁵ oxidado y coordinado por una molécula de H₂O.

⁴⁵ recordemos que estamos hablando de un promedio poblacional y no de moléculas únicas/sencillas.

Si bien la presentación de los resultados obtenidos en esta tesis se hizo en capítulos independientes, el trabajo en conjunto tuvo un objetivo común: comprender las bases químicas del daño por radiación ocasionado durante la determinación de estructuras de proteínas por medio de difracción de rayos X. Englobados en el objetivo general planteamos dos objetivos particulares: proponer métodos para aminorar los efectos del daño causado por la radiación y utilizar el daño para desencadenar reacciones en enzimas redox.

Como conclusión general, los efectos del daño por radiación son causados por las especies radicales generadas durante la irradiación, predominantemente los e_{aq}^- y $\cdot OH$. Los efectos del daño deben ser considerados durante la determinación de estructuras de proteínas, pero con mayor énfasis en el caso de metaloproteínas.

A continuación sintetizamos los resultados obtenidos en los tres capítulos anteriores, correspondientes a:

- i. el empleo de radioprotectores o *scavengers* para atenuar los efectos del daño por radiación y para comprender a detalle el mecanismo químico del daño del mismo (Capítulo 2).
- ii. la caracterización de *Cg L* (potencial catalítico (E_{cat}), propiedades espectroscópicas de los sitios de Cu, estado de oxidación y ocupaciones de los cuatro iones metálicos que componen los sitios activos de la enzima) (Capítulo 3).
- iii. y por último la propuesta de sistematizar un enfoque que intenta describir mecanismos catalíticos combinando sistemas redox y las cascadas de reacciones que ocurren durante la irradiación con rayos X. En este enfoque, el control de

variables como la dosis y la disponibilidad de protones (pH del medio, cuando la donación de H^+ está involucrada en la reacción reductiva) inciden directamente en los resultados obtenidos (Capítulo 4).

5.1 Efecto de la producción de radicales sobre cristales de HEWL

Por espectroscopía UV-Visible acoplada a la difracción de rayos X, mostramos que la adición de $NaNO_3$, en soluciones concentradas y cristales de HEWL, mitiga la aparición de la banda de 580 nm correspondiente a los e_{aq}^- . Nuestros resultados demuestran que las moléculas de nitrato, presentes en soluciones y cristales de HEWL, constituyen un mínimo energético para los e_{aq}^- . Como consecuencia, la difusión de los electrones ya no concluye, predominantemente, en los enlaces S-S, y en consecuencia se disminuye significativamente la formación de radicales $RS-SR'^{\bullet}$ observada en la región de ~ 400 nm. Este resultado fue confirmado a nivel de densidad electrónica, en donde observamos que la integridad de los puentes disulfuro es mayor en los tres cristales remojados en $NaNO_3$ que en el cristal nativo y el co-cristalizado con ascorbato. Durante este trabajo no probamos la eficiencia del ascorbato como mitigador de radicales, utilizando UV-Visible, porque ésta ya fue demostrada anteriormente. A concentraciones mayores a 0.5 M, el ascorbato resulto ser un eficiente mitigador de la formación de electrones solvatados y de la ruptura de enlaces disulfuro (Southworth-Davies & Garman, 2007).

La adición de nitrato y ascorbato incrementa la dosis media ($D_{1/2}$) tolerada por cristales de HEWL en un factor de dos. Aunque ambas moléculas actúan por mecanismos distintos, nitrato sobre la vía reductiva y ascorbato sobre la oxidativa, ambos tienen un efecto comparable sobre la estabilidad de la red cristalina. El efecto de la presencia de *scavengers* sobre el aumento de la tolerancia a la dosis

absorbida es comparable al obtenido por difracción a temperaturas de 50 y 15 K (Meents *et al.*, 2007; Meents *et al.*, 2010). Por otra parte, la variabilidad observada entre cristales incubados en nitrato sugiere que el tiempo de remojo puede tener un efecto perjudicial sobre la estabilidad de la red cristalina. También mostramos que los resultados obtenidos dependen del método que se utilice para cuantificar el daño inducido por la radiación. El análisis del factor de decaimiento, R_d , y el de intensidades globales dieron resultados distintos para los cristales *nit14* y *nit118*. A pesar de las diferencias observadas entre ambos métodos, ambos mostraron que la presencia de nitrato en el cristal *nit14* y la co-cristalización con ascorbato en el cristal *asc*, tiene efecto positivo sobre la tolerancia de los cristales a la radiación. La variabilidad en los cristales de nitrato se explica por el método de remojo utilizado, en el que la concentración final del *scavenger* pudo variar entre cada cristal.

5.2 Efecto de la producción de radicales sobre cristales de *Cg L*

Al contrastar los resultados obtenidos de la cuantificación de cobre y los espectroscópicos (UV-Vis y EPR), con las ocupaciones calculadas en todas las estructuras determinadas en este trabajo, indican que los sitios metálicos, tanto en cristales como en soluciones concentradas de *Cg L*, son sujeto a la reducción y radiólisis.

En cuanto a la reducción de los sitios metálicos, podemos decir que el T1Cu se es susceptible a la reducción aún a dosis muy bajas, 0.3 MGy, como lo mostraron los espectros UV-Visible acoplados a la difracción. Los espectros de XAS muestran que a dosis mayores, mayores a los 4 MGy, hay un claro desplazamiento de la población original de Cu^{2+} hacia una población predominante de Cu^{1+} . Los mapas anómalos calculados sugieren que el T3_B Cu es más susceptible a la reducción que su

contrapar el T3_A Cu. En combinación con los resultados derivados de los estudios en cristales de HEWL podemos afirmar que la reducción de los sitios de cobre observada durante la irradiación con rayos X ocurre como consecuencia de la generación de electrones. En ausencia de sustrato, esta es la única fuente de electrones en la muestra.

La ocupación de los sitios es susceptible a la cantidad de dosis recibida (Tabla 5.1). Mientras que a dosis menores a 1 MGy la presencia de los sitios T1 y T2 Cu parece depender del pH, a dosis mayores a los 4 MGy sólo observamos los T3 Cu y a una ocupación de 0.5 Este resultado, es fortalecido por la falta de actividad observada en cristales irradiados en sincrotrón y posteriormente disueltos en soluciones conteniendo el sustrato 2,6-DMP.

Tabla 5.1 Ocupaciones de los sitios de cobre en las estructuras de *Cg L* y su dependencia de la dosis.

Cristal	Total	T1 Cu	T2 Cu	T3 Cu	Dosis (MGy)
pH 4	1.8	0.3	0.0	A = 0.8 B = 0.7	0.3
pH 5.5	2.8	0.7	0.5	A = 0.8 B = 0.8	0.4
pH 7.0	2.5	0.7	0.3	A = 0.8 B = 0.7	0.3
0.9798	1.0	0.0	0.0	A = 0.5 B = 0.5	16
1.12	1.0	0.0	0.0	A = 0.5 B = 0.5	8
1.38	1.0	0.0	0.0	A = 0.5 B = 0.5	6

A partir de estas observaciones podemos establecer un orden para la radiólisis de los sitios de cobre en Cg L en el cual el más susceptible de todos es el T2 Cu, seguido por el T1 Cu y por último los dos T3 Cu. Puesto que en un inicio todos se encuentran en estado oxidado, proponemos que las diferencias se deben a la accesibilidad de los sitios y/o a diferencias en el potencial redox de cada sitio. De esta forma la accesibilidad del T2 Cu a los electrones sería mayor que la del T1 Cu y ésta a su vez significativamente mayor a la del T3 Cu. Respecto al potencial redox, los sitios de mayor potencial actuarían como mínimos energéticos para los e_{aq}^- , reduciéndose y posiblemente radiolizándose antes que los de menor potencial, que a su vez, actuarían como mínimos locales para los e_{aq}^- . El potencial catalítico determinado por electroquímica solo nos señala que Cg L es una lacasa de alto potencial y muestra una dependencia de E_{cat} con el pH, lo cual pudiera explicar la dependencia de la ocupación y configuración de los sitios de cobre con respecto al pH del medio. Sin embargo, a partir de este cálculo es imposible separar la contribución de cada sitio metálico a E_{cat} , porque éstos actúan como un circuito eléctrico. Para separar las contribuciones individuales debiéramos utilizar métodos como la utilización de inhibidores específicos para cada sitio o modificaciones genéticas como la eliminación de los residuos de aminoácidos que los coordinan. Sobre este tema se ha propuesto que el sitio T2 actúa como un transistor, es decir regula o funciona como punto de control del flujo de electrones desde y hacia los demás cobres en la proteína (Shleev & Ruzgas, 2008).

A pesar de que pudimos observar diferencias en la región del centro trinuclear⁴⁶ al conformar *data-sets* compuestos, éstas no son extrapolables al mecanismo catalítico de las lacasas por la ausencia de T1 y T2 Cu en las estructuras

⁴⁶ El sitio de reducción del O₂.

determinadas. Las que si podemos extrapolar al mecanismo de la enzima son las estructuras determinadas a baja dosis. Mientras que las estructuras a pH 5.5 y 7 corresponderían al intermediario oxidado (Figura 4.), con la diferencia que a pH 5.5 observamos una conformación alternativa en la His418. Esa conformación alternativa puede significar la flexibilidad del sitio para la liberación de las aguas formadas a partir de la reducción del O₂. La estructura a pH 4.0 correspondería al intermediario reducido (Figura 4) con la salvedad de la ausencia del sitio T2 Cu.

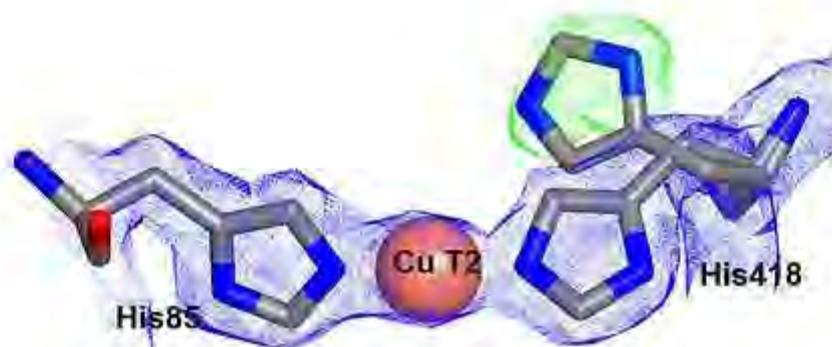


Figura 5.1 Conformación alternativa observada en la His418

En resumen, en esta tesis demostramos la formación de especies reactivas durante la difracción de cristales de *HEWL*, así como su eficiente mitigación mediante la adición de *scavengers* que actúan por mecanismos distintos.

En el caso de *Cg L* el daño se manifiesta en los sitios activos, centros de cobre, que sufren reducción y radiólisis dependientes de la dosis. Los centros de cobre exhibieron una susceptibilidad variable en el orden $T2 > T1 > T3$, el cual

hipotetizamos, está relacionado con su accesibilidad o propiedades electrónicas como el potencial redox.

5.3. Perspectivas

Entre las perspectivas que se derivan de esta tesis proponemos evaluar el efecto de añadir simultáneamente *scavengers* con diferentes propiedades sobre la estabilidad de la red cristalina. En particular, la combinación de ascorbato y nitrato pudieran tener un efecto sumatorio en la $D_{1/2}$ de cristales expuestos a rayos X.

Otra perspectiva es la adición de *scavengers*, en particular de nitrato de sodio, a cristales de metaloproteínas para aminorar la reducción y posiblemente la radiólisis de los sitios. El efecto de la adición de nitrato debe ser analizado desde varios enfoques:

- i. XAS y/o UV-Visible acoplados a la difracción, para mostrar su efecto sobre la reducción de los sitios.
- ii. A nivel de intensidades para ver su efecto sobre el daño global.
- iii. Mapas anómalos para identificar inequívocamente a los metales y poder establecer estados de oxidación en enzimas con múltiples centros de cobre.
- iv. A nivel de daño específico para ver su efecto sobre la protección de residuos de aminoácidos.

Por último, una vez caracterizado el efecto de los *scavengers* sobre los cristales de proteínas con sitios redox activos, controlando la concentración de los mismos y la dosis absorbida sería posible obtener intermediarios de la reducción en sistemas redox.

6 Referencias

- Adam, V., Royant, A., Nivière, V., Molina-Heredia, F. P. & Bourgeois, D. (2004). *Structure* **12**, 1729-1740.
- 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. & Zwart, P. H. (2010). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**, 213-221.
- Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G. L. & Thornton, J. M. (2008). *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **13**, 1205-1218.
- Armstrong, F. A. (2005). *Current Opinion in Chemical Biology* **9**, 110-117.
- Arndt, U. W. (1984). *Journal of Applied Crystallography* **17**, 118-119.
- Barker, A. I., Southworth-Davies, R. J., Paithankar, K. S., Carmichael, I. & Garman, E. F. (2009). *Journal of Synchrotron Radiation* **16**, 205-216.
- Bento, I., Martins, L. O., Lopes, G. G., Carrondo, M. A. & Lindley, P. F. (2005). *Dalton Transactions* 3507-3513.
- Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szołke, H., Henriksen, A. & Hajdu, J. (2002). *Nature* **417**, 463-468.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). *Nucleic Acids Research* **28**, 235-242.
- Blake, C. & Phillips, D. C. (1962). *Biological Effects of Ionizing Radiation at the Molecular Level: The Proceedings of the Symposium on the Biological Effects of Ionizing Radiation at the Molecular Level*. International Atomic Energy Agency.
- Blanford, C. F., Heath, R. S. & Armstrong, F. A. (2007). *Chemical Communications* 1710-1712.
- Blundell, T. L. & Johnson, L. N. (1976). *Protein Crystallography*. London: Academic Press Inc.
- Bukh, C. & Bjerrum, M. J. (2010). *Journal of Inorganic Biochemistry* **104**, 1029-1037.
- Burmeister, W. P. (2000). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **56**, 328-341.
- Buxton, G. V. (2008). *Radiation Chemistry. From Basics to Application in Materials and Life Sciences*.
- Carugo, O. & Carugo, K. D. (2005). *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 213-219.
- The CCP4 suite: Programs for protein crystallography* (1994). **50**, 760-763.
- Claus, H. (2003). *Archives of Microbiology* **179**, 145-150.
- Cracknell, J. A., Vincent, K. A. & Armstrong, F. A. (2008). *Chemical Reviews* **108**, 2439-2461.
- Cracknell, J. A., McNamara, T. P., Lowe, E. D. & Blanford, C. F. (2011). *Dalton Transactions* **40**, 6668-6675.
- De la Mora, E. (2008). PhD thesis, Universidad Nacional Autónoma de México.
- De La Mora, E., Carmichael, I. & Garman, E. F. (2011). *Journal of Synchrotron Radiation* **18**, 346-357.
- Dick, L. A., Malfant, I., Kuila, D., Nebolsky, S., Nocek, J. M., Hoffman, B. M. & Ratner, M. A. (1998). *Journal of the American Chemical Society* **120**, 11401-11407.
- Diederichs, K. (2006). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **62**, 96-101.

- Durão, P., Chen, Z., Silva, C. S., Soares, C. M., Pereira, M. M., Todorovic, S., Hildebrandt, P., Bento, I., Lindley, P. F. & Martins, L. O. (2008). *Biochemical Journal* **412**, 339-346.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**, 486-501.
- Evans, G., Polentarutti, M., Carugo, K. D. & Bricogne, G. (2003). *Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography* **59**, 1429-1434.
- Evans, P. (2006). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **62**, 72-82.
- Ferraroni, M., Myasoedova, N. M., Schmatchenko, V., Leontievsky, A. A., Golovleva, L. A., Scozzafava, A. & Briganti, F. (2007). *BMC Structural Biology* **7**.
- Felsenfeld, G. (1960). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **87**, 247-251.
- Fourmond, V., Hoke, K., Heering, H. A., Baffert, C., Leroux, F., Bertrand, P. & Léger, C. (2009). *Bioelectrochemistry* **76**, 141-147.
- Fioravanti, E., Vellieux, F. M. D., Amara, P., Madern, D. & Weik, M. (2007). *Journal of Synchrotron Radiation* **14**, 84-91.
- Garman, E. F. & Grime, G. W. (2005). *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **89**, 173-205.
- Gupta, G., Rajendran, V. & Atanassov, P. (2003). *Electroanalysis* **15**, 1577-1583.
- Hakulinen, N., Kiiskinen, L. L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paanen, A., Koivula, A. & Rouvinen, J. (2002). *Nature Structural Biology* **9**, 601-605.
- Hakulinen, N., Kruus, K., Koivula, A. & Rouvinen, J. (2006). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **350**, 929-934.
- Hall, J. F., Kanbi, L. D., Strange, R. W. & Hasnain, S. S. (1999). *Biochemistry* **38**, 12675-12680.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. ed. Oxford: Oxford Science Publications.
- Hanna, P. M., Tamilarasan, R. & McMillin, D. R. (1988). *Biochemical Journal* **256**, 1001-1004.
- Henderson, R. (1990). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **241**, 6-8.
- Jakoncic, J., Di Michiel, M., Zhong, Z., Honkimaki, V., Jouanneau, Y. & Stojanoff, V. (2006). *Journal of Applied Crystallography* **39**, 831-841.
- Jones, G. D. D., Lea, J. S., Symons, M. C. R. & Taiwo, F. A. (1987). *Nature* **330**, 772-773.
- Kabsch, W. (2010). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**, 125-132.
- Kallio, J. P., Auer, S., Jänis, J., Andberg, M., Kruus, K., Rouvinen, J., Koivula, A. & Hakulinen, N. (2009). *Journal of Molecular Biology* **392**, 895-909.
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H. & Phillips, D. C. (1958). *Nature* **181**, 662-666.
- Kmetko, J., Warkentin, M., Englich, U. & Thorne, R. E. (2011). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **67**, 881-893.
- Kunamneni, A., Plou, F. J., Ballesteros, A. & Alcalde, M. (2008). *Recent Patents on Biotechnology* **2**, 10-24.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). *Journal of Applied Crystallography* **26**, 286-291.
- Leslie, A. G. W. (2006). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **62**, 48-57.
- MacEdo, S., Pechlaner, M., Schmid, W., Weik, M., Sato, K., Dennison, C. & Djinović-Carugo, K. (2009). *Journal of Synchrotron Radiation* **16**, 191-204.
- Machonkin, T. E., Quintanar, L., Palmer, A. E., Hassett, R., Severance, S., Kosman, D. J. & Solomon, E. I. (2001). *Journal of the American Chemical Society* **123**, 5507-5517.
- Marcus, R. A. & Sutin, N. (1985). *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Bioenergetics* **811**, 265-322.

- Matera, I., Gullotto, A., Tilli, S., Ferraroni, M., Scozzafava, A. & Briganti, F. (2008). *Inorganica Chimica Acta* **361**, 4129-4137.
- McCarthy, A. A., Brockhauser, S., Nurizzo, D., Theveneau, P., Mairs, T., Spruce, D., Guijarro, M., Lesourd, M., Ravelli, R. B. G. & McSweeney, S. (2009). *Journal of Synchrotron Radiation* **16**, 803-812.
- McGeehan, J., Ravelli, R. B. G., Murray, J. W., Owen, R. L., Cipriani, F., McSweeney, S., Weik, M. & Garman, E. F. (2009). *Journal of Synchrotron Radiation* **16**, 163-172.
- Meents, A., Gutmann, S., Wagner, A. & Schulze-Briese, C. (2010). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 1094-1099.
- Meents, A., Wagner, A., Schneider, R., Pradervand, C., Pohl, E. & Schulze-Briese, C. (2007). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **63**, 302-309.
- Murray, J. W., Garman, E. F. & Ravelli, R. B. G. (2004). *Journal of Applied Crystallography* **37**, 513-522.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **53**, 240-255.
- Nave, C. & Garman, E. F. (2005). *Journal of Synchrotron Radiation* **12**, 257-260.
- Oliéric, V., Ennifar, E., Meents, A., Fleurant, M., Besnard, C., Pattison, P., Schiltz, M., Schulze-Briese, C. & Dumas, P. (2007). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **63**, 759-768.
- Owen, R. L., Rudiño-Piñera, E. & Garman, E. F. (2006). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4912-4917.
- Owen, R. L., Holton, J. M., Schulze-Briese, C. & Garman, E. F. (2009). *Journal of Synchrotron Radiation* **16**, 143-151.
- Owen, R. L., Pearson, A. R., Meents, A., Boehler, P., Thominet, V. & Schulze-Briese, C. (2009). *Journal of Synchrotron Radiation* **16**, 173-182.
- Paithankar, K. S., Owen, R. L. & Garman, E. F. (2009). *Journal of Synchrotron Radiation* **16**, 152-162.
- Paithankar, K. S. & Garman, E. F. (2010). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**, 381-388.
- Palmore, G. T. R. & Kim, H. H. (1999). *Journal of Electroanalytical Chemistry* **464**, 110-117.
- Penfield, K. W., Gewirth, A. A. & Solomon, E. I. (1985). *Journal of the American Chemical Society* **107**, 4519-4529.
- Piontek, K., Antorini, M. & Choinowski, T. (2002). *Journal of Biological Chemistry* **277**, 37663-37669.
- Polyakov, K. M., Fedorova, T. V., Stepanova, E. V., Cherkashin, E. A., Kurzeev, S. A., Strokopytov, B. V., Lamzin, V. S. & Koroleva, O. V. (2009). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **65**, 611-617.
- Ramagopal, U. A., Dauter, Z., Thirumuruhan, R., Fedorov, E. & Almo, S. C. (2005). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **61**, 1289-1298.
- Rao, P. S. & Hayon, E. (1974). *Journal of Physical Chemistry* **78**, 1193-1196.
- Ravel, B. & Newville, M. (2005). *Journal of Synchrotron Radiation* **12**, 537-541.
- Ravelli, R. B. G. & McSweeney, S. M. (2000). *Structure* **8**, 315-328.
- Ravelli, R. B. G., Theveneau, P., McSweeney, S. & Caffrey, M. (2002). *Journal of Synchrotron Radiation* **9**, 355-360.
- Rice, L. M., Earnest, T. N. & Brunger, A. T. (2000). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **56**, 1413-1420.
- Rosenbaum, G., Holmes, K. C. & Witz, J. (1971). *Nature* **230**, 434-437.
- Shleev, S. & Ruzgas, T. (2008). *Angewandte Chemie - International Edition* **47**, 7270-7274.

- Solomon, E. I., Jones, P. M. & May, J. A. (1993). *Chemical Reviews* **93**, 2623-2644.
- Solomon, E. I., Lowery, M. D., LaCroix, L. B. & Root, D. E. (1993). *Methods in Enzymology* **226**, 1-32.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M. & Machonkin, T. E. (1996). *Chemical Reviews* **96**, 2563-2605.
- Southworth-Davies, R. J. & Garman, E. F. (2007). *Journal of Synchrotron Radiation* **14**, 73-83.
- Stoll, S. & Schweiger, A. (2006). *Journal of Magnetic Resonance* **178**, 42-55.
- Swartz, H. M. & Swartz, S. M. (1983). *Methods of biochemical analysis* **29**, 207-323.
- Taylor, A. B., Stoj, C. S., Ziegler, L., Kosman, D. J. & Hart, P. J. (2005). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15459-15464.
- Teng, T. Y. (1990). *Journal of Applied Crystallography* **23**, 387-391.
- Tye, J. W., Hall, M. B. & Darensbourg, M. Y. (2005). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 16911-16912.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). *Journal of Applied Crystallography* **30**, 1022-1025.
- Vaguine, A. A., Richelle, J. & Wodak, S. J. (1999). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **55**, 191-205.
- Vincent, K. A., Cracknell, J. A., Clark, J. R., Ludwig, M., Lenz, O., Friedrich, B. & Armstrong, F. A. (2006). *Chemical Communications* 5033-5035.
- Vincent, K. A., Cracknell, J. A., Lenz, O., Zebger, I., Friedrich, B. & Armstrong, F. A. (2005). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 16951-16954.
- Weik, M., Ravelli, R. B. G., Kryger, G., McSweeney, S., Raves, M. L., Harel, M., Gros, P., Silman, I., Kroon, J. & Sussman, J. L. (2000). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 623-628.
- Wuerges, J., Lee, J. W., Yim, Y. I., Yim, H. S., Kang, S. O. & Carugo, K. D. (2004). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8569-8574.
- Yano, J., Kern, J., Irrgang, K. D., Latimer, M. J., Bergmann, U., Glatzel, P., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Sauer, K., Messinger, J., Zouni, A. & Yachandra, V. K. (2005). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 12047-12052.