



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Determinación de la estructura cristalográfica del Antígeno Nuclear de Células en Proliferación de *Thermococcus gammatolerans*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Alberto Antony Venancio Landeros

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

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán  
[Instituto de Biotecnología – IBt](#)

Dr. Carlos Amero Tello  
[Centro de Investigaciones Químicas - CIQ](#)

Ciudad de México. Junio, 2022



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

---

A mis padres, Adrián y Socorro  
gracias por su guía, consejo y comprensión.

A mis hermanos, Adriana y Alfonso  
son la compañía y luz de mi vida.

Y a quienes nos acompañan desde un lugar distinto, lo logramos.

## Índice

Resumen .....	1
Introducción .....	2
Abrazaderas deslizantes .....	2
Antígeno Nuclear de Células en Proliferación .....	2
Estructura del PCNA .....	2
<i>Thermococcus gammatolerans</i> .....	7
Justificación .....	8
Objetivo General .....	9
Objetivos específicos .....	9
Metodología .....	10
Microorganismo y vector .....	10
Medios de cultivo .....	11
Soluciones amortiguadoras de pH .....	12
Cultivo, preparación y conservación de <i>Escherichia coli</i> .....	13
Purificación .....	15
Preparación de las columnas .....	15
Colecta de células y extracción de proteínas .....	16
Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) .....	16
Cromatografía de exclusión molecular .....	16
Concentración y cuantificación de TgPCNA .....	17
Cristalización .....	17
Crioprotección y sobreenfriamiento .....	18
Difracción de los cristales .....	19
Construcción de la estructura y afinamiento .....	19
Validación y depósito de la estructura .....	20
Resultados y discusión .....	21
Purificación de TgPCNA .....	21
Cristalización de TgPCNA .....	24
Difracción y obtención de la estructura cristalográfica .....	25
Análisis del daño por radiación en un cristal de TgPCNA .....	34
Estructuras cristalográficas determinadas utilizando los 7 dataset colectados .....	44

Conclusiones .....	52
Perspectivas .....	52
Referencias.....	53

## Lista de figuras

Figura 1: Alineamiento de las secuencias de PCNA .....	3
Figura 2: Estructura de algunas abrazaderas deslizantes .....	4
Figura 3: Mapa del potencial electrostático en la superficie del PCNA de varios organismos.....	5
Figura 4: Estructura del monómero de PCNA.....	6
Figura 5: Mapa del plásmido utilizado para expresar el PCNA de <i>T. gammatolerans</i> .....	10
Figura 6: Secuencia del sitio de multiclonación del plásmido pColdI .....	11
Figura 7: Perfil de purificación del PCNA después de la cromatografía de afinidad .....	21
Figura 8: Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular mediante la columna Superdex 200 26/600 .....	22
Figura 9: SDS-PAGE con la fracción correspondiente al PCNA después de la cromatografía de exclusión molecular .....	22
Figura 10: Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular del PCNA purificado .....	23
Figura 11: Primera cuantificación del PCNA .....	23
Figura 12: Gel SDS-PAGE utilizado para la cuantificación del PCNA .....	24
Figura 13: Cristal 1: Fotografía del cristal de TgPCNA.....	25
Figura 14: Patrón de difracción del cristal del PCNA de <i>T. gammatolerans</i> .....	26
Figura 15: PCNA de <i>Thermococcus gammatolerans</i> junto con el mapa de densidad electrónica ..	27
Figura 16: Región de interacción de un monómero de PCNA con el aledaño para la formación del anillo .....	28
Figura 17: Inicio del asa que conecta ambos dominios .....	29
Figura 18: Parte media del asa .....	30
Figura 19: Celda unitaria obtenida del cristal de PCNA de <i>Thermococcus gammatolerans</i> .....	30
Figura 20: Vista lateral de la celda unitaria y sus simétricos .....	32
Figura 21: Vista superior de la celda unitaria y sus simétricos .....	32
Figura 22: PCNA de <i>Thermococcus gammatolerans</i> ensamblado en trímero .....	33
Figura 23: Cristales empleados para la segunda difracción .....	34
Figura 24: Cambio en el volumen de la celda unitaria en función a la colecta .....	36
Figura 25: Cambio en el volumen de la celda unitaria en función al número de colecta .....	39
Figura 26: Disminución de la intensidad de las difracciones con respecto al ruido en función de la colecta, considerando solamente los datos de la faja de máxima resolución .....	40
Figura 27: Disminución de la intensidad de las difracciones con respecto al ruido en función de la colecta, considerando los datos de todo el cristal .....	40
Figura 28: Aminoácidos del TgPCNA que presentan densidad atómica disminuida después de 7 colectas .....	47

## Resumen

El Antígeno Nuclear de Células en Proliferación es una proteína estructural que se encarga de mediar interacciones entre el ADN y algunas proteínas como polimerasas, nucleasas y ligasas, lo que la convierte en una proteína clave en los procesos de síntesis, modificación y reparación del ADN.

Por otro lado, *Thermococcus gammatolerans* es el organismo más resistente a la radiación ionizante conocido hasta ahora. Entre los daños más graves generados por la radiación podemos encontrar la modificación de las cadenas de ADN. La radiación propicia la generación de sitios abásicos, así como la ruptura del enlace fosfodiéster. Debido al papel tan importante del PCNA en la reparación del ADN, es posible que el PCNA de *Thermococcus gammatolerans* posea diferencias estructurales importantes respecto al de otros organismos no radiotolerantes.

Para determinar la estructura de una proteína mediante cristalografía de rayos X se emplea una fuente de radiación con propiedades similares la radiación a la que está constantemente sometido *Thermococcus gammatolerans*, y a medida que se difracta el cristal, tanto el cristal como la proteína que lo conforma sufren daños debido a la radiación incidente. Durante el presente trabajo, se determinó la estructura cristalográfica del PCNA de *Thermococcus gammatolerans* mediante cristalografía de rayos X, y se realizaron estudios iniciales acerca de como la proteína sufre cambios estructurales a medida que un cristal es difractado en repetidas ocasiones. Los resultados obtenidos sugieren que el PCNA de *Thermococcus gammatolerans* puede recibir una mayor dosis de radiación sin dañarse, ya que no se observa daño estructural en ninguna de las estructuras determinadas.

## Introducción

### Abrazaderas deslizantes

Las abrazaderas deslizantes conforman una familia de proteínas presente en los tres dominios en que se clasifican los seres vivos. Estructuralmente semejan a un anillo que presenta regiones de hélices alfa orientadas hacia el interior y de hojas beta en la porción exterior. De esta forma la región de hélices interacciona con el ADN y las regiones con hojas beta quedan hacia el exterior del anillo y es posible que medien las interacciones con otras proteínas. En las bacterias es conocida como subunidad  $\beta$  y está conformada por un homodímero, mientras que en las arqueas y organismos eucariontes se conoce con el nombre de PCNA y su estructura es trimérica (Krishna, 1994). Estos dímeros o trímeros son ensamblados sobre el DNA, resultando en un anillo alrededor de la doble hélice, y sirven como andamio para facilitar la unión de otras proteínas que intervienen en procesos de modificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, polimerasas, nucleasas, ligasas, entre otras implicadas en la regulación del ciclo celular (Moldovan, 2007). Esta familia presenta una pobre identidad en secuencia (~7% entre organismos filogenéticamente lejanos), pero la estructura es muy conservada (con un rmsd menor a 2Å) (Sander, 1991 & Krishna, 1994).

En general, tanto en la subunidad  $\beta$  como en el PCNA se presentan homopolímeros, sin embargo, algunos estudios de genómica hallaron organismos que presentan un PCNA heterotrimérico (Pan, 2013).

### Antígeno Nuclear de Células en Proliferación

El Antígeno Nuclear de Células en Proliferación (PCNA, por sus siglas en inglés) fue descubierto en 1978 por 2 grupos independientes. Miyachi y colaboradores estudiaban el suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico. En dicho suero encontraron un anticuerpo que reconocía débilmente algunas células de hígado y riñón; con mayor intensidad linfocitos provenientes de los nódulos linfoides, timo y bazo; mientras que los linfocitos de sangre periférica no mostraron reacción (Miyachi 1978). Casi simultáneamente, Bravo y Celis realizaron un estudio de síntesis diferencial de proteínas a través del ciclo celular utilizando células HeLa como modelo de estudio. En este estudio, se encontró una proteína cuya abundancia se duplicaba durante la fase S del crecimiento con respecto a las demás fases (Bravo & Celis, 1980). Estos estudios se limitaron a mencionar su presencia, y no fue sino hasta 8 años después, en 1986, que se describió la primera función del PCNA, que fue la de ser una proteína accesoria a la polimerasa  $\delta$ , esencial para la replicación del genoma (Tan, 1986; Bravo, 1987).

Posteriormente se describieron otras interacciones y modificaciones postraduccionales mediante las cuales se regulan otros procesos como la reparación, arresto en alguna de las fases del ciclo celular, cambios en la homo y heterocromatina; todos ellos mediados por cambios en las proteínas que interaccionan con el PCNA (Maga, 2003).

### Estructura del PCNA

El PCNA es una proteína nuclear que consiste en un trímero con simetría pseudo-hexagonal (Krishna, 1994; Kelman, 1995). Los monómeros que forman estos arreglos suelen ser iguales,

formando un homotrímero. Sin embargo, existen organismos, como la mayoría de los pertenecientes a las Crenarqueotas, que tienen un PCNA heterotrimérico (Dionne, 2003; Gareth, 2006).

A continuación, se muestra un alineamiento de algunas secuencias de PCNA homotrimérico (Figura 1).

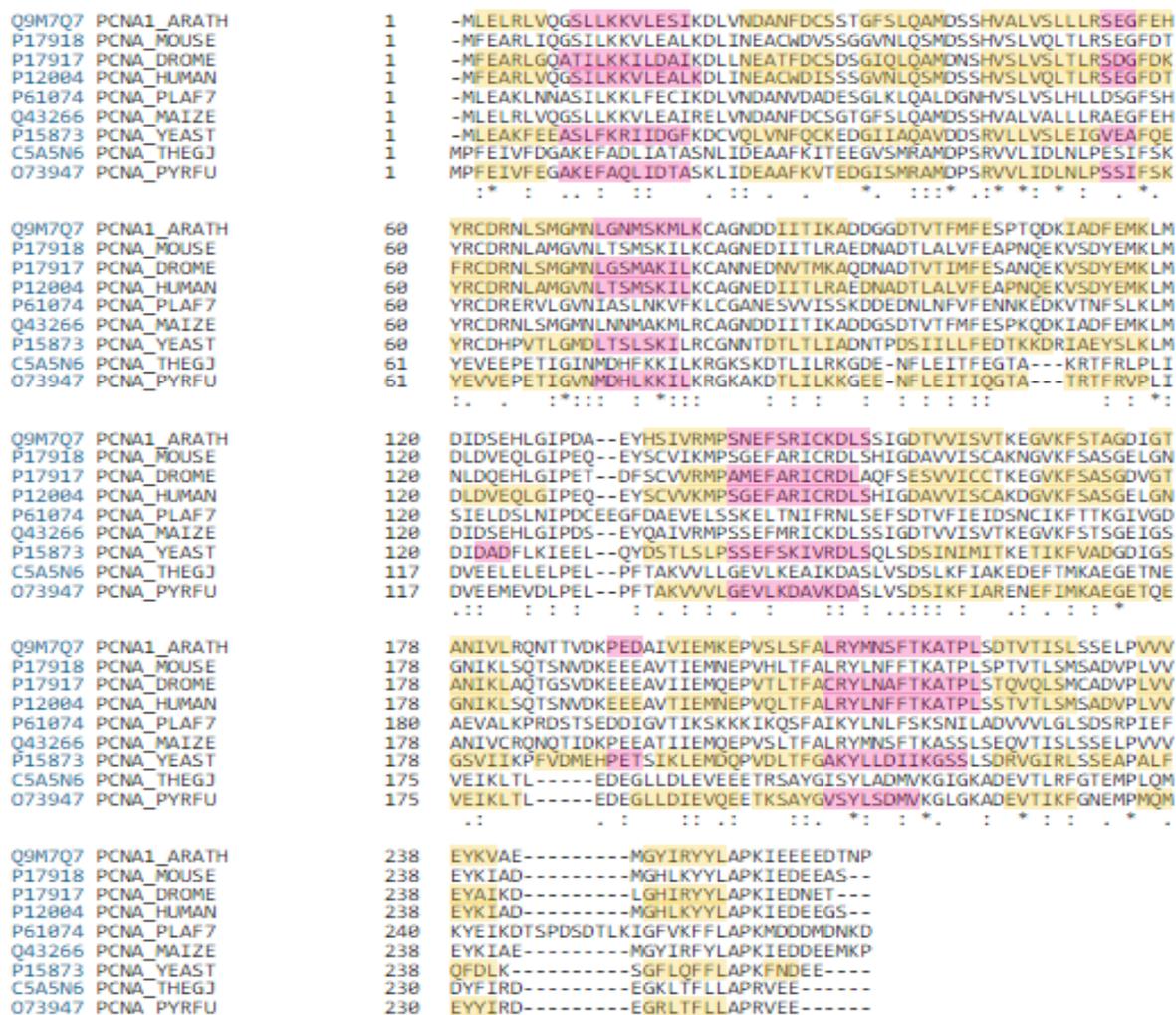
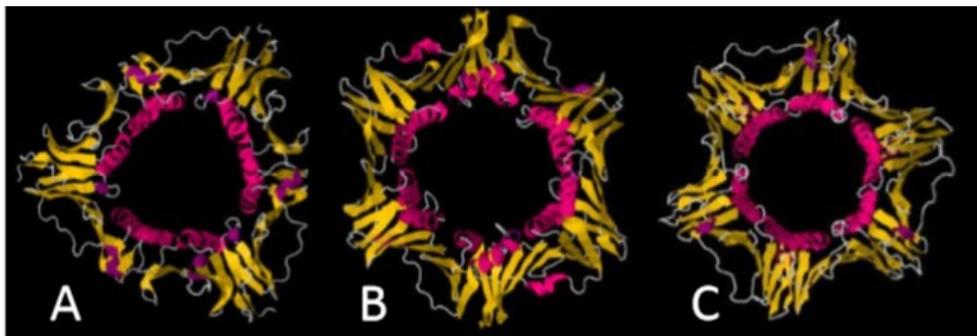


Figura 1: Alineamiento de las secuencias de PCNA. Se muestra un alineamiento de la secuencia del PCNA de (1) Arabidopsis thaliana; (2) Mus musculus; (3) Drosophila melanogaster; (4) Homo sapiens; (5) Plasmodium falciparum; (6) Zea mays; (7) Saccharomyces cerevisiae; (8) Thermococcus gammatolerans; (9) Pyrococcus furiosus. (Identidad de secuencia = 6.90%) En amarillo se muestran las hojas  $\beta$  y en rosa las  $\alpha$  hélices. Estas secuencias reflejan la diversidad en secuencia de esta proteína, pero también reflejan la conservación de la estructura secundaria. Las secuencias fueron tomadas de la base de datos de Uniprot.

La estructura de las abrazaderas deslizantes consta de 6 dominios distribuidos en un dímero, con 3 dominios por subunidad, o por un trímero, con 2 dominios por subunidad; mostrando una simetría pseudo hexagonal.

Cabe destacar que la DNA pol III  $\beta$  de *Escherichia coli*, el equivalente al PCNA, tiene una masa molecular de 41 kDa, el PCNA de 29 kDa, y la proteína GP 45 de 25kDa, y que aún bajo estas condiciones la estructura tridimensional de las tres es muy similar (Figura 2).



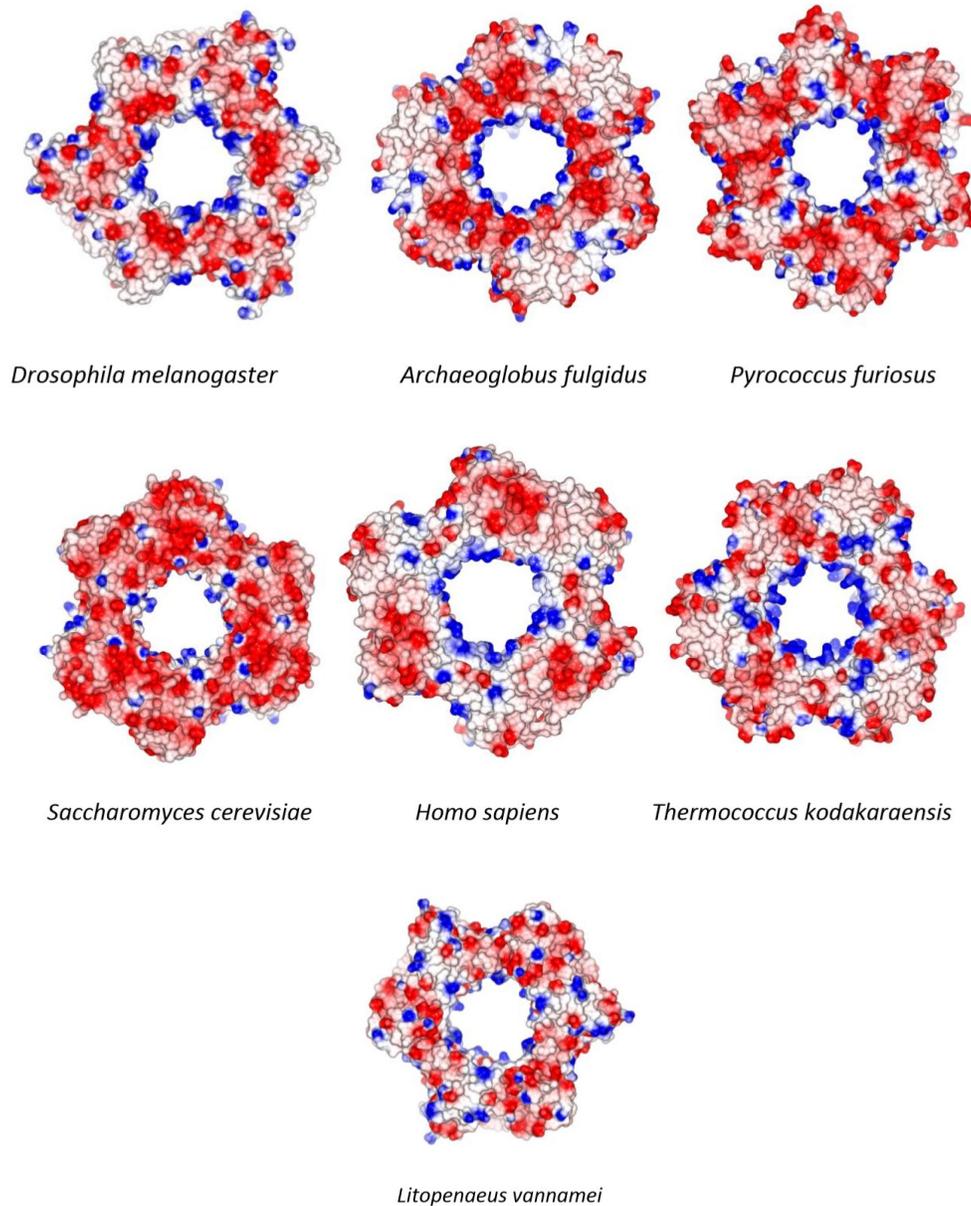
*Figura 2: Estructura de algunas abrazaderas deslizantes.*

*A: gp45 del bacteriófago T4 (Código PDB: 1CZD). B: Subunidad  $\beta$  de la ADN pol III de E. coli (Código PDB: 1MMI). C: PCNA de Saccharomyces cerevisiae (Código PDB: 1PLQ). En amarillo se muestran las hojas  $\beta$  y en rosa las hélices  $\alpha$ . Las tres estructuras mostradas fueron determinadas por cristalografía. La figura se realizó con el programa Coot (Emsley, 2010).*

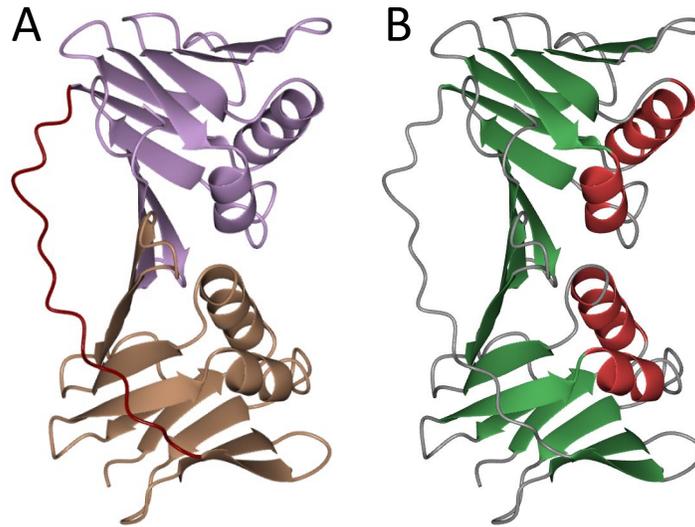
Los aminoácidos localizados al interior del anillo forman las hélices  $\alpha$ , e interactúan con el ADN y por ende están cargados positivamente; mientras que los aminoácidos externos que forman las hojas  $\beta$  son mayoritariamente negativos. Gracias a las cargas negativas de su superficie, es capaz de interactuar y aumentar la eficiencia de otras enzimas como: pol  $\delta$ , p21, MeCTr, DNA ligasa I, Fen I, Ciclina D, pol  $\epsilon$ , RF-C, CDK2, Gadd45, entre otras (Maga, 2003 & Moldovan, 2007). Además, existe evidencia preliminar que sugiere la unión de varias proteínas al mismo tiempo al PCNA (Roberts, 2003; Dionne, 2003).

A pesar de que la distribución de cargas se mantiene, es decir las cargas positivas se orientan al interior del anillo y las negativas al exterior, la abundancia de estas en la superficie de los trímeros varía entre especies, como se muestra en la Figura 3.

La estructura del monómero de PCNA está conformada por dos dominios principales, el dominio del Amino terminal (Dominio 1) y el del Carboxilo terminal (Dominio 2), así como por el Asa que los conecta (IDCL, Inter Domain Connecting Loop). Asimismo, la porción de hélices alfa se encuentra orientada hacia la porción que formará el interior del anillo, mientras que las hélices alfa lo rodean. El asa interdominio une ambos dominios, y se proyecta hacia la cara frontal del PCNA. Esta estructura se muestra en la Figura 4.



*Figura 3: Mapa del potencial electrostático en la superficie del PCNA de varios organismos. Se muestra la cara posterior del anillo. En general observamos cargas positivas en el interior, que permiten la interacción con el esqueleto de fosfatos con carga negativa, y una superficie con mayor abundancia de cargas negativas, que interacciona con otras proteínas. Las regiones donde el potencial es igual o menor a -0.5 V se muestra en color rojo, mientras que donde es igual o mayor a 0.5 V se muestra azul. Las regiones cuyo potencial electrostático queda entre ambos rangos se muestra en color blanco. La figura fue realizada utilizando CCP4MG.*



*Figura 4: Estructura del monómero de PCNA.*

*Se muestra la cara frontal del anillo. A: Los colores representan los dominios. En color beige se muestra el Dominio 1 (N-terminal), en color rojo se muestra el Asa interdominio (IDCL, Inter Domain Connecting Loop), y en lila se muestra el Dominio 2 (C-terminal) B: El color corresponde con la estructura secundaria. En verde podemos observar las hojas beta, mientras que en color rojo podemos observar las hélices alfa. Las hélices se orientan en dirección al centro del anillo, mientras que las hojas beta y el Asa interdominio se orientan hacia el exterior, lo que permite que interactúen con otras proteínas. La figura fue realizada utilizando CCP4MG usando la estructura 5A6D del PDB.*

### *Thermococcus gammatolerans*

*Thermococcus gammatolerans* es una archaea, perteneciente a las Euryarchaeota, y es la arquea termofílica más radiotolerante conocida hasta ahora, ya que puede recibir hasta 7500 Gy de radiación gamma y reparar su genoma, lo que le permite mantener su viabilidad celular (Jolivet, 2003). Fue aislada a partir de muestras tomadas de las ventilas hidrotermales localizadas en la Cuenca de Guaymas. Algunas de las condiciones ambientales presentes en las ventilas hidrotermales son altas temperaturas, de hasta 300 °C, y condiciones de alta radioactividad, resultado de la presencia de radionucleidos en los depósitos polimetálicos sulfurosos.

Aún no se han descubierto todos los mecanismos mediante los cuales este organismo resiste y repara el daño generado en el material genético debido a la radiación. Es posible que esta gran resistencia sea conferida por varios factores, como es una alta eficiencia de reparación del genoma, ya sea por enzimas con una eficiencia catalítica extraordinaria o por la acumulación de una gran cantidad de ellas; o bien, por proteínas que eviten o aumenten la tolerancia al daño sobre el ADN. En los organismos termotolerantes este fenómeno es especialmente interesante debido a que, a la temperatura de crecimiento ideal, más de 80°C, el ADN se encontraría disociado y esto daría lugar a mayores daños por la radiación; sin embargo, el ADN se presenta en su estructura clásica de doble hélice gracias a las proteínas asociadas a él. Además, al parecer esta resistencia ante los daños producidos por la radiación es conferida, al menos parcialmente, por las proteínas asociadas a él (Confalonieri, 2011).

## Justificación

El ADN y las proteínas son biomoléculas especialmente susceptibles al daño causado por la radiación ionizante. Los principales daños causados en el ADN son la ruptura del enlace fosfodiéster y la generación de sitios abásicos, mientras que en las proteínas el daño se observa principalmente en regiones que contienen iones metálicos, en el átomo de azufre de los aminoácidos cisteína y metionina, y en menor medida, en la descarboxilación de la cadena lateral de los aminoácidos ácido glutámico y ácido aspártico, así como otras modificaciones en la cadena lateral de otros aminoácidos. Los estudios realizados indican que el daño causado al ADN es proporcional a la dosis de radiación recibida, y una vez que la célula recibe una dosis de radiación que genera un daño superior al que es capaz de reparar, la célula será incapaz de reproducirse. Es por ello que los organismos que son capaces de recibir radiación ionizante en altas cantidades y sobrevivir a ella deben ser capaces de reparar ese daño de una forma poco frecuente en otros seres vivos. Paralelamente al daño que está sufriendo el ADN, muchas otras moléculas, como las proteínas, están siendo dañadas por la radiación incidente; y si las proteínas encargadas de la reparación pierden su capacidad catalítica debido a la modificación de las cadenas laterales de los aminoácidos que las conforman, la reparación será poco o nada eficiente.

Por ello, *Thermococcus gammatolerans*, organismo que resiste altas dosis de radiación ionizante, debe presentar formas de minimizar el daño generado a la maquinaria enzimática generado por la radiación y así reparar el daño causado al ADN eficientemente. Se han estudiado algunas vías de reparación del genoma que son catalizadas por diversas enzimas independientes; sin embargo, la mayor parte de los procesos descubiertos tienen un factor común, la interacción de las proteínas con la proteína estructural PCNA. El PCNA es una proteína que carece de función catalítica, que funge como andamio o anclaje entre las enzimas encargadas de realizar la reparación y el ADN. Debido a esta función la presencia del PCNA en un estado funcional es de vital importancia para la reparación del ADN, por ende, es posible que algunas características clave que la diferencien de las demás puedan ser encontradas al analizar su estructura y compararla con la del PCNA proveniente de otros organismos.

## Objetivo General

- Determinar la estructura del PCNA de *Thermococcus gammatolerans* por medio de cristalografía de rayos X con una progresión de daño generado por la radiación acumulada proveniente de un sincrotrón.

## Objetivos específicos

- Expresar y purificar el PCNA de *Thermococcus gammatolerans* en *Escherichia coli* utilizando cromatografía de afinidad.
- Obtener cristales con un orden interno adecuado para la determinación de la estructura.
- Obtener la estructura cristalográfica por medio de la técnica de reemplazo molecular, utilizando las coordenadas tridimensionales del PCNA de *Thermococcus kodakaraensis* como base.
- Analizar el daño estructural sufrido por la proteína durante las colectas sucesivas.
- Comparar la estructura determinada con otras depositadas en el PDB, enfocándonos en las diferencias estructurales que puedan resaltar características que la diferencien y puedan explicar una posible tolerancia frente a la radiación ionizante.

## Metodología

### Microorganismo y vector

Para la expresión de la proteína se utilizó la cepa de *Escherichia coli* BL-21 Star (DE3). Esta cepa posee el siguiente genotipo:

F- ompT hsdSB (rB - mB -) gal dcm rne131 (DE3)

Descripción del fenotipo:

F-: No posee el plásmido F-

ompT: Mutación en el precursor de la proteasa VII.

hsdSB (rB - mB -): Mutaciones en el sistema de metilación y restricción dependiente de metilación.

gal: Impide el uso de galactosa.

dcm: Impide la metilación de citosinas.

rne131: Mutación que disminuye la degradación de mRNA expresado de forma heteróloga.

DE3: Contiene un profago. Este profago contiene la secuencia codificante de la ARN polimerasa del bacteriófago T7. Por ende, esta cepa puede expresar genes que se encuentren bajo promotores T7

Por otro lado, el plásmido utilizado para clonar y expresar el gen que codifica el PCNA fue el vector pCold I (Takara), en la Figura 5 se observa el mapa de este vector.

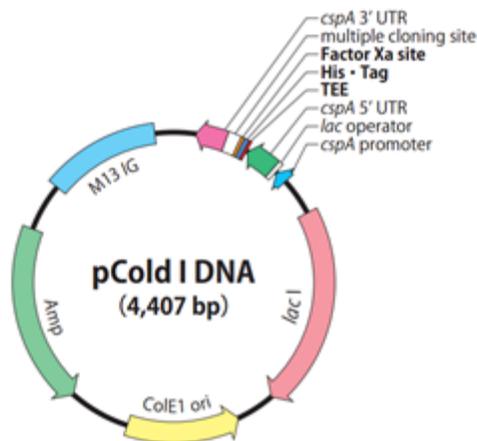
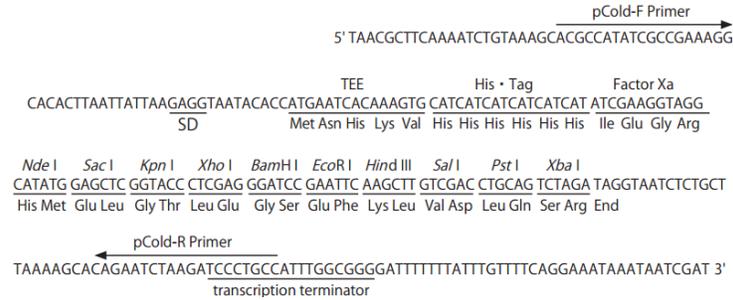


Figura 5: Mapa del plásmido utilizado para expresar el PCNA de *T. gammatolerans*.

Y en la Figura 6, se muestra detalladamente el sitio de clonación:



**Figura 6: Secuencia del sitio de multiclonación del plásmido pColdI.**  
 Se muestra tanto la secuencia de nucleótidos como los elementos que codifican.

El gen fue obtenido mediante comunicación directa con el Dr. Patrick Forterre, del (Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud, quien amablemente nos donó ADN genómico purificado de *Thermococcus gammatolerans*. A partir de este material genético, se realizó una PCR para amplificar el gen mediante los primers mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1: Cebadores utilizados para amplificar la región codificante para el PCNA de *Thermococcus gammatolerans*.

Nombre	Secuencia
<b>Sentido</b>	ggtcggaaattc <b>CATATGCCGTTTGAGATCGTTTTTG</b>
<b>Antisentido</b>	ggttgg <b>GGATCCTCACTCCTCAACGCGGGGAGC</b>

*En negritas se destaca la región de corte de las enzimas de restricción NdeI y BamHI, respectivamente.*

Tanto el plásmido como el inserto fueron digeridos con las enzimas NdeI y BamHI, y posteriormente ligados.

La ligación fue comprobada mediante PCR y secuenciación.

## Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se esterilizaron mediante calor húmedo en una autoclave a 121°C y 0.1 MPa de presión. Después de la esterilización el medio se deja enfriar hasta que alcanza una temperatura de aproximadamente 45°C y se le agrega esta hasta alcanzar a una concentración de 0.1 g/L. El plásmido pColdI confiere resistencia a este antibiótico.

-Medio de cultivo Luria-Bertani

El medio de cultivo Luria (Lennox) consta de: Peptona de caseína, 10 g/L; Extracto de Levadura, 5 g/L; Cloruro de Sodio, 5 g/L; y 15 g/L de agar cuando se requiera medio sólido. Los componentes se disuelven en agua destilada y se esterilizan. El medio de cultivo sólido se vacía en placas estériles de 9mm de diámetro, usando alrededor de 22 mL de medio de cultivo por placa.

-Medio de cultivo para inóculo.

El medio de cultivo para la preparación del inóculo usado fue tomado de Spadiut (Spadiut, 2008), la composición se lista a continuación: Glicerol, 5 g/L; Peptona de caseína, 5 g/L; Extracto de levadura, 5 g/L; Cloruro de sodio, 5 g/L. Los componentes se disuelven en agua destilada, y se esteriliza.

-Medio de cultivo M9.

El medio de cultivo M9 se utilizó para la expresión heteróloga del PCNA. La composición es: Glicerol, 10 g/L; Peptona de caseína, 10 g/L; Sulfato de magnesio 1M, 10 mL; Cloruro de Calcio 0.5M, 1 mL; y 200 mL de solución salina M9. La composición de la solución salina M9 es:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 42.5 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15 g/L; NaCl, 2.5 g/L;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5.0 g/L. El medio se prepara en matraces bafleados, ya que las protuberancias de la base generan mayor turbulencia durante la agitación orbital, lo que permite una mejor aireación.

## Soluciones amortiguadoras de pH

A continuación, se muestran las soluciones que serán utilizadas para la purificación de la proteína. Además de la preparación listada, las soluciones que serán utilizadas en el equipo ÄKTA Pure 25 deben ser filtradas usando una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y degasificadas antes de usarlas en el equipo.

-Buffer A

Tris 50 mM, NaCl 400 mM, pH 7.5.

Para la preparación se utiliza cloruro de sodio, 23.37 g/L y Tris Base, 6.05 g/L. Los componentes se solubilizan en 750 mL de agua destilada, se ajusta el pH a 7.5 con ácido clorhídrico 2 M y se afora a 1L.

-Buffer B

Tris 50 mM, NaCl 400 mM, Imidazol 500 mM, pH7.5.

Para la preparación de la solución Buffer B, se utilizará cloruro de sodio, 23.37 g/L; Tris Base, 6.05 g/L e Imidazol, 34.09 g/L. Los componentes se solubilizan en 750 mL de agua destilada, se ajusta el pH a 7.5 con ácido clorhídrico 2 M y se afora a 1L.

## **Cultivo, preparación y conservación de *Escherichia coli***

### Cultivo y conservación de *E. coli* BL21 (DE3)

A partir de un tubo o placa con la cepa pura, se toma una asada o una colonia y se siembra una placa de medio Luria sin antibiótico. La placa se incuba a 37°C durante 18 horas y las colonias obtenidas se colectan con un asa microbiológica. Las células se colocan en criotubos que contienen 1 mL de una solución estéril de glicerol al 25% (v/v) en agua. Se agitan suavemente con la micropipeta o con un vórtex, para disgregar los grumos gruesos de células. Cuando no se observen cúmulos de células, los tubos se etiquetan y colocan en un ultracongelador a -80°C.

### Preparación de *E. coli* BL21 (DE3) quimiocompetentes

La preparación de células competentes es un proceso vital en la producción de proteínas recombinantes, ya que nos permite introducir material genético exterior a la célula. Para la preparación de ellas es necesario preparar una noche antes un preinóculo. Para ello, se toma una colonia de *E. coli* BL21 (DE3) y se inoculan 5 mL de medio de cultivo Caldo Luria (Lennox) sin antibiótico. El cultivo se incuba a 37°C y en agitación a 200 rpm durante toda la noche. También se coloca dentro de la incubadora un matraz de 500 mL que contenga 100 mL de Caldo Luria (Lennox) sin antibiótico, este matraz será inoculado al día siguiente, y al permanecer a 37°C previo a la inoculación, favorecerá el crecimiento celular, lo que disminuirá tiempo de incubación al día siguiente.

Al día siguiente se toma 1 mL de ese cultivo y se inoculan los 100 mL de medio Caldo Luria (Lennox) sin antibiótico que se dejaron en la incubadora durante la noche previa. El cultivo se incuba a 37°C y con agitación de 200 rpm. Cuando alcanza una densidad óptica a 660 nm entre 0.4 y 0.5 se colectan las células por medio de centrifugación a 10 000 rpm en una centrifuga 5804 R de Eppendorf (13 751 g) con una temperatura de 4 °C durante 2 minutos. Se retira el medio de cultivo.

El paquete celular se resuspende en 50 mL de una solución estéril de cloruro de calcio 50 mM a una temperatura de 4°C. Se coloca en hielo y permanece ahí durante 10 minutos.

Transcurrido ese tiempo, la suspensión se centrifuga con las mismas condiciones, se retira el sobrenadante y el pellet se resuspende en 30 mL de una solución 50 mM de cloruro de calcio y 15% v/v de glicerol manteniendo la temperatura de 4 °C.

La suspensión permanece en hielo durante 45 minutos y se alicuota en tubos estériles de 1.5mL, en volúmenes de 50  $\mu$ L. Estas alícuotas se almacenaron en un ultracongelador a -80°C hasta su uso.

#### Transformación de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pColdI-TgPCNA

Se toma una alícuota de células BL-21 quimiocompetentes del ultracongelador a -80°C y se descongelan en hielo. Una vez que están descongeladas se agregan 1  $\mu$ L de plásmido pColdI-TgPCNA y se agita suavemente para homogeneizar. Se mantiene en hielo durante 30 minutos más.

Después se realiza el choque térmico para la transformación de las células. Para ello el tubo se coloca en un baño a 42°C durante 45 segundos. Transcurrido ese tiempo el tubo se coloca en hielo por 2 minutos, se le agrega 1 mL de medio Caldo Luria (Lennox) y se incuba a 37°C durante 45 minutos.

Finalmente, el contenido se dispersa en una placa de medio LB con 0.1 g/L de ampicilina. La placa se incuba a 37°C durante una noche. Se recomienda sembrar varias placas utilizando diferentes volúmenes de cultivo.

Al día siguiente, se toma una de las colonias y con ella se inocula una placa nueva de medio LB con ampicilina. La cepa transformada será almacenada a -80°C, de la misma forma en que se almacena la cepa sin transformar. Esta será utilizada para inocular el medio de cultivo para la producción de PCNA.

#### Producción de PCNA

Se inoculan 150 ml del medio para inóculo con una colonia de *E. coli* BL-21 Star transformada y se incuba a 37°C con agitación de 200 rpm hasta que alcanza una densidad óptica de 0.5 a 600 nm.

El medio de producción se inocula con 5% (v/v) de este cultivo y se incuba a 37°C a 200 rpm. Cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de 0.5 a 600 nm, se le agregan IPTG hasta alcanzar una concentración 0.1 mM y se coloca en el cuarto frío (4°C) durante 30 minutos. Para favorecer que el cultivo se enfríe adecuadamente, se recomienda agitar el matraz cada 5 minutos. Posteriormente se continúa la incubación cambiando la temperatura a 15°C y la agitación se mantiene constante. Se continúa la incubación durante 24 horas. Al terminar el periodo de inducción, el cultivo se transfiere a botellas para centrifugar de 250 mL y se centrifuga en una centrífuga Beckman Coulter 341735 J2-21, con un rotor JA-14 (Beckman-Coulter) a una velocidad de 6,000 rpm (5514  $xg$ ) a una temperatura de 4°C. Finalmente se retira el sobrenadante y los paquetes celulares se congelan a -20°C hasta su uso.

## Purificación

### Preparación de las columnas

- HisTrap FF

Para la purificación de TgPCNA se utilizó una columna HisTrap FF, una columna preempacada utilizada en cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) de GE Lifesciences; con un volumen de columna de 5 mL. La columna está compuesta de Ni -Sepharosa 6, con un tamaño de poro de aproximadamente 90  $\mu\text{m}$ .

La preparación de la columna se realizó de la siguiente forma:

La columna se almacena en Etanol al 20%. Debido a ello, primero debe lavarse con 15 mL de agua destilada, después se pasan 10 mL de una solución de EDTA 0.1 M pH 8. Con ello se retira el níquel de la columna. Posteriormente se lava con agua destilada y se le agregan 5 mL de una solución 100 mM de  $\text{NiCl}_2$ . Finalmente se lava con agua destilada para retirar todo el níquel no unido, y se equilibra con el Buffer A, usando 20 mL de este.

La columna equilibrada esta lista para utilizarse en la purificación. Cuando la purificación concluye se pasan 25 mL más de agua y finalmente 15 mL de Etanol al 20%. La columna se almacena en un refrigerador a 4°C.

- Columna preempacada para Filtración en Gel, Cromatografía de exclusión Molecular.

La columna empleada es HiLoad Superdex 200 pg 26/60 (GE Lifesciences). La resina está compuesta por dextran y agarosa. El rango de pesos moleculares en los cuales la resolución es adecuada es de 10 000 a 600 000. La columna tiene un volumen de 320 mL en total, tiene un número mayor a 13 000 platos teóricos/m y un tamaño de partícula promedio de 34  $\mu\text{m}$ . La porosidad es de 10  $\mu\text{m}$ .

La columna fue utilizada en conjunto con el equipo Akta Pure 25 (GE Lifesciences).

Previo a utilizar la columna se debe equilibrar en forma similar a la columna HisTrap. Al igual que en el caso anterior, la columna se conserva en Etanol al 20%, por lo que primero se lava con 350 mL de agua destilada, y después se equilibra con 350 mL de Buffer A. Una vez que la conductividad se estabiliza la columna esta lista para aplicar la muestra. Después de utilizarse debe ser lavada con 350 mL de agua destilada, y después con 350 mL de Etanol al 20% si se almacenará por más de una semana. Todas las soluciones que sean empleadas durante esta cromatografía deben ser previamente filtradas con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  y degasificadas.

### **Colecta de células y extracción de proteínas**

Se toman los pellets congelados y se resuspenden en 50 mL de Buffer A por cada litro de cultivo colectado. Se agrega lisozima a una concentración de 1 mg en 50 mL y se coloca en un orbitador durante 30 minutos.

Se agrega PMSF hasta una concentración de 1mM y se sónica utilizando los siguientes parámetros: Amplitud de 40%, pulsos 59/59 (Activo/descanso) y una duración de 12 minutos. Se colecta en tubos para centrifuga de 50 mL y se centrifuga a 11 000 rpm (15 126 x *g*) en una centrifuga 5804 R de Eppendorf. Se toma el sobrenadante y a partir de este se purifica la proteína.

### **Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC)**

El sobrenadante se pasa por la columna de afinidad HisTrap FF previamente equilibrada, usando un flujo de 3 mL/min. Después se hacen pasar 10 mL de una solución 4% Buffer B/96% Buffer A (Cuya concentración final es: 400 mM de NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 20 mM Imidazol) para retirar las proteínas unidas débilmente a la resina. Posteriormente se pasan 10 mL de una solución 10% Buffer B/90% Buffer A (400 mM de NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM Imidazol) y se colecta la fracción. Al terminar se hace un último lavado usando 10 mL en el cual el porcentaje del Buffer B se aumenta a 20%, al finalizar esta etapa, la elusión se realiza utilizando 100% de Buffer B. Las fracciones se separan y se analizan por medio de un gel desnaturizante SDS-PAGE.

Para preparar las muestras para la electroforesis, se mezclan en una relación 1:1 con buffer de Laemmli. El buffer de Laemmli 2X tiene la siguiente formulación: 4% SDS, 10%  $\beta$ -Mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.05% Azul de bromofenol, 100 mM Tris pH 6.8. Se toman 20  $\mu$ L de cada una de las fracciones, se mezclan con 20  $\mu$ L de buffer de Laemmli, y se colocan en un termobloque a 95°C durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se le da un breve pulso a los tubos usando una centrifuga, para colectar todo el volumen en el fondo del tubo, y se cargan 20  $\mu$ L de la mezcla en los pozos del gel. La electroforesis se realiza con un voltaje de 110 V durante aproximadamente 55 minutos. Una vez finalizada, el gel se retira de la cámara, se separa de los vidrios donde se prepara, y se coloca en una solución de tinte con Azul de Coomassie (50 % metanol, 10 % ácido acético, 0.5% Azul de Coomassie G-250). Se coloca en agitación orbital durante 45 minutos. Después, se destiñe y será posible observar las bandas.

Las fracciones en las cuales se observa una banda con un peso molecular acorde al de TgPCNA se concentran hasta un volumen de 0.75 mL y se purifican por medio de cromatografía de exclusión molecular.

### **Cromatografía de exclusión molecular**

La columna debe estar preparada previamente en el equipo Äkta Pure 25 y se establece un flujo de 1 mL/min usando Buffer A. La muestra se aplica a la columna usando un asa de 500  $\mu$ L. Se programa la colecta de fracciones a partir del minuto 112 después de que se aplicó la muestra a la

columna, esto es debido a que el volumen vacío de la columna es de 112 mL. La elución se fracciona cada 5 mL. Las fracciones que muestren absorbancia mayor al valor basal registrado a 280 nm se analizan por medio de un gel desnaturante SDS-PAGE. El volumen de elución teórico del PCNA es de 215.18 mL, sin embargo, este volumen está calculado utilizando solamente el peso molecular de la proteína, e ignora la influencia de la estructura tridimensional de esta. Al analizar el gel de electroforesis, se toman las fracciones en las que se observa una banda correspondiente a PCNA purificado, se concentran y se cuantifican.

### **Concentración y cuantificación de TgPCNA**

Las fracciones seleccionadas son concentradas en filtros Amicon Ultra (Merk Millipore) de 15 mL. Estos tubos contienen filtros de celulosa regenerada y se centrifugan a 4 000 *xg* en una centrifuga 5804 R (Eppendorf). Cuando el volumen es menor a 4 mL, se transfiere a un filtro Amicon Ultra de 4 mL. La proteína purificada se concentra hasta aproximadamente 250  $\mu$ L si proviene de 2 L de cultivo.

Cuando se alcanza este volumen, la proteína es cuantificada por densitometría en un gel SDS-PAGE. La cuantificación por medio de densitometría en SDS-PAGE se realiza de la siguiente forma:

Se prepara un estándar de BSA a 1 mg/mL, y se colocan 2, 4, 6 y 8  $\mu$ L del estándar en 10  $\mu$ L de buffer de carga. Las muestras a cuantificar se diluyen en factores 1:1; 1:2; 1:3; 1:5 y 1:10. Se toma 1  $\mu$ L de cada una de ellas y se coloca en 10  $\mu$ L de buffer de carga. Las muestras se calientan a 96°C durante 5 minutos, se les da un pulso en la centrifuga para recuperar todo el volumen, y se cargan en un gel de acrilamida al 10% para realizar un SDS-PAGE.

Se debe tener especial cuidado al cargar la muestra, ya que debe introducirse todo el volumen de la muestra en los pozos sin que este pase a los pozos vecinos. La electroforesis se corre con un voltaje de 140 V durante 45 minutos. El gel se revela con reactivo de Coomassie y se analiza en un Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad) usando la placa blanca (White tray). La imagen se analiza con el software Image Lab, de la misma empresa, y se cuantifica por medio de la interpolación de la cantidad y saturación de píxeles, usando la curva patrón del mismo gel.

Una vez que se conoce la concentración alcanzada, se diluye la proteína a una concentración adecuada para las pruebas de cristalización.

### **Cristalización**

Para encontrar una condición de cristalización adecuada para esta proteína se realizó una exploración inicial utilizando los kits Wizard I, II, III y IV de Rigaku Reagents y la técnica de *microbatch*.

También se utilizó el kit de PEG/Ion de Hampton Research así como otras condiciones reportadas para proteínas similares.

La condición de cristalización más exitosa (100 mM de citrato de sodio pH 5.8, 2.4 M sulfato de amonio, 10% v/v 2-metil-2,4 pentaenediol (MPD)) fue optimizada usando las siguientes concentraciones de los componentes:

100 mM de Citrato de sodio pH 5.2, 5.5 y 5.8

Sulfato de amonio 2.4, 2.6 y 2.8 M

MPD 5%, 7.5% y 10%

Estas condiciones se probaron mediante la técnica de *microbatch*. Las pruebas de cristalización se incubaron a 18°C durante al menos 3 semanas.

La técnica de *microbatch* consiste en colocar 1 µL de proteína en un pozo, y mezclarla con 1 µL de la solución de cristalización, y finalmente colocar 10 µL de aceite sobre la gota, para evitar la evaporación durante la incubación. Las placas se colocan a 18 °C en un habitáculo donde permanecen con el menor número de perturbaciones posibles.

## Crioprotección y sobreenfriamiento

Para que la colecta de datos de un cristal sea adecuada se recomienda que este se sobreenfríe a una temperatura de 100 K para mejorar la calidad de los datos obtenidos, reduciendo los daños por radiación al reducir la difusión de las especies producto de la radiólisis. El cristal debe ser montado en un asa de rayón (MiTeGen), el diámetro de esta va a depender del tamaño del cristal.

Para sobreenfriar los cristales evitando la formación de hielo que puede dañar o destruir el cristal, se utilizan moléculas pequeñas que impiden la formación de hielo en la gota. Estos criopreservadores son diversos, los más comunes son glicerol, trehalosa, sales en altas concentraciones y algunos aceites. El éxito de un criopreservador no puede ser asegurado previo a su uso, ya que el cambio de densidad y composición entre el ambiente en el cual el cristal nucleó y creció respecto al ambiente en el cual se congelará puede ocasionar fracturas, rupturas o solubilización del cristal. Para la preparación de las soluciones crioprotectoras se prefiere recurrir a moléculas pequeñas ya que la difusión de ellas dentro del cristal es más rápida.

Con base en ello, comprobó experimentalmente que el glicerol al 20% era un criopreservador adecuado, ya que los resultados de difracción de cristales mostraban un tenue anillo de hielo, cuya intensidad no interfiere con la del patrón de difracción.

Los cristales posteriores se sobreenfriaron agregando este criopreservador a las soluciones madre en las que crecieron, y colocando el cristal pocos segundos en esta solución antes de colocarlo en nitrógeno líquido.

## Difracción de los cristales

Los cristales enfriados se transportaron al SSRL (Stanford Synchrotron Radiation Lightsource) para ser difractados en la línea 14-1. Las especificaciones de la línea se listan en la Tabla 2.

Tabla 2: Características de la línea 14-1 del SSRL

<b>Fuente</b>	<b>Magneto Doblado</b>
<b>Energía</b>	6.0 - 13.0 KeV
<b>Detector</b>	MARmosaic 325 CCD
<b>Distancia al detector</b>	95 - 650 mm
<b>Goniómetro</b>	Huber Kappa diffractometer
<b>Sistema de enfriamiento</b>	Oxford Cryojet
<b>Presión</b>	Ambiente
<b>Temperatura</b>	100K

El flujo del haz de fotones fue de  $1.18 \times 10^{12}$  fotones/segundo. La estrategia de colección se detallará en cada cristal.

## Construcción de la estructura y afinamiento

Los datos fueron integrados usando Mosflm y escalados usando Scala, ambos de la suite de CCP4, versión 6.5. Para determinar el límite de corte en cuanto a resolución, se tomaron en consideración los valores de CC (1/2),  $I/\sigma(I)$ ; además de la integridad. EL valor de CC (1/2) debe ser alrededor de 0.8, el de  $I/\sigma(I)$  de al menos 2.0 y la integridad cercana a 100%, estos valores se toman considerando los datos en la faja de mayor resolución.

La primera estructura fue determinada por reemplazo molecular utilizando el PCNA de *Thermococcus kodakaraensis* (PDB: 3LX1) y el programa Phaser, el cual se encuentra dentro de CCP4. Para las estructuras subsecuentes, se utilizó la estructura a mayor resolución disponible del PCNA de *T. gammatolerans* determinada durante esta misma tesis. El afinamiento se realizó usando PHENIX (Python-based Hierarchical ENvironment for Integrated Xtallography), versión 1.9-1692), COOT (Crystallographic Object-Oriented Toolkit, de la suite de CCP4); y Refmac en ciclos iterativos hasta alcanzar la convergencia de los valores  $R$  y  $R_{free}$ .

Refmac fue utilizado para realizar el afinamiento de cuerpo rígido inicial y para ordenar las columnas de forma que PHENIX pueda leerlas adecuadamente. Posteriormente se alternó el uso del comando phenix.refine para calcular nuevamente las fases con la nueva estructura con el

ajuste mediante coot, que nos permite visualizar el mapa de densidad electrónica  $2F_oF_c$  y el mapa de diferencias  $F_oF_c$ , y con ellos ajustar las cadenas laterales, conformaciones alternativas de ciertos aminoácidos y otras moléculas, como agua.

### **Validación y depósito de la estructura**

Cuando los valores de afinamiento estructural  $R_{work}$  y  $R_{free}$  se consideraron adecuados,  $R_{work}$  por debajo de 0.2 y un  $R_{free}$  con una diferencia de menos de 0.05 unidades con respecto a  $R_{work}$ , además de un porcentaje bajo (menor al 2%) de aminoácidos con ángulos phi y psi fuera de las áreas permitidas en el gráfico de Ramachandran, la estructura se consideró como adecuada para su depósito en la base de datos del PDB (Bank, 1971).

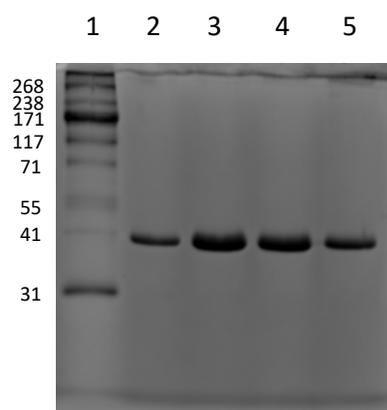
La estructura fue depositada mediante AutoDep, del EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute), para ser anexada al PDB cuando fuera aprobada. La estructura se publicó bajo el código de acceso 5A6D.

## Resultados y discusión

### Purificación de TgPCNA

Una vez que se obtuvieron células transformadas con el plásmido, se seleccionó una colonia que expresa el TgPCNA, se conservó y a partir de esta se produjeron los cultivos subsecuentes, como se describe en los métodos.

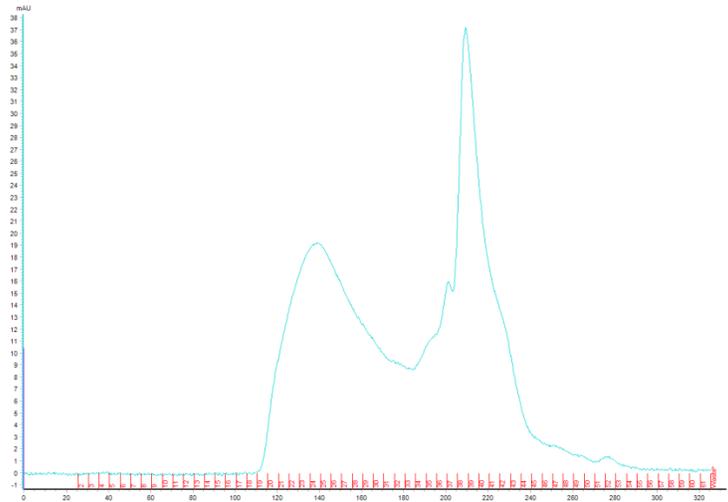
Posteriormente, se realizó la cromatografía de afinidad por cationes metálicos divalentes inmovilizados. La elución se muestra en la Figura 7.



*Figura 7: Perfil de purificación del PCNA después de la cromatografía de afinidad. (1) Marcador de peso molecular; (2-5) Eluciones de una columna de afinidad HisTrap FF de 5 mL, realizadas con 100% de Buffer B. A la izquierda se muestra la masa correspondiente a cada una de las bandas del marcador de peso molecular.*

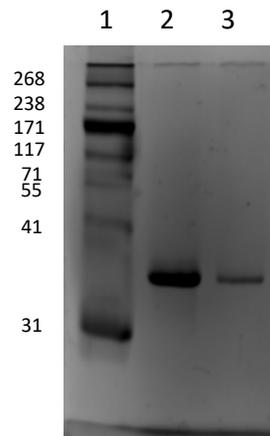
Las fracciones con la banda correspondiente a la masa molecular de TgPCNA se concentraron hasta alcanzar un volumen de 2 mL y se aplicaron a una columna Superdex 200 pg 26/600 para la cromatografía de exclusión molecular. Se utilizó el Buffer A y un flujo de 1 mL/min.

En la Figura 8 se muestra el perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular.



*Figura 8: Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular mediante la columna Superdex 200 26/600.*

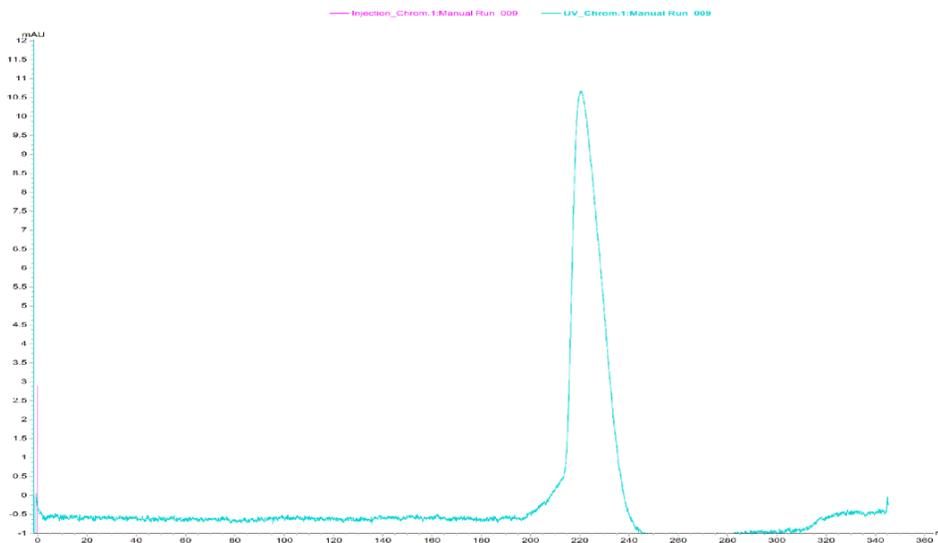
El volumen de elución del PCNA fue de 218 mL. Este valor se interpoló en la recta obtenida de la calibración de la columna, dando como resultado un peso molecular de 31 kDa, que es muy cercano a la masa real del PCNA de 28 kDa. Se realizó una SDS-PAGE para analizar la muestra (Figura 9).



*Figura 9: SDS-PAGE con la fracción correspondiente al PCNA después de la cromatografía de exclusión molecular.*

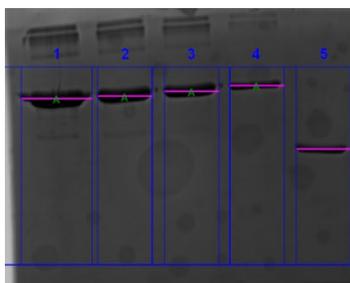
*Carriles: 1: Marcador de peso molecular; 2: PCNA antes de ser inyectado a la columna; 3: PCNA obtenido de la columna. A la izquierda se muestra la masa correspondiente a cada una de las bandas del marcador de peso molecular.*

Con base en el cromatograma se seleccionaron las fracciones que contenían PCNA y se concentraron mediante centrifugación utilizando un tubo Amicon Ultra de 15 mL con un corte de 10 kDa hasta obtener un volumen de 3 mL. Al alcanzar este volumen se utilizó un Amicon Ultra de 4 mL para continuar con la concentración hasta alcanzar un volumen de 300  $\mu$ L. Se tomaron 100  $\mu$ L y se aplicaron a la columna de exclusión molecular. La filtración molecular se llevó a cabo con los mismos parámetros que antes, empleando la misma columna, con el fin de cerciorarse de la pureza de la muestra. El cromatograma de esta segunda cromatografía de exclusión molecular se muestra en la Figura 10.



*Figura 10: Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular del PCNA purificado.*

La proteína se cuantificó por medio de densitometría a través de SDS-PAGE utilizando un método de densitometría de píxeles. Este método consiste en analizar la densidad y saturación de una imagen y calcular su concentración mediante la interpolación con un estándar de concentración conocida. Los resultados de la cuantificación se observan en las Figuras 10 y 11.



*Figura 11: Primera cuantificación del PCNA*

*Carriles: 1: Albúmina a 4 mg/mL; 2: Albúmina a 3 mg/mL; 3: Albúmina a 2 mg/mL; 4: Albúmina a 1 mg/mL; 5: PCNA obtenido de la cromatografía de exclusión molecular.*

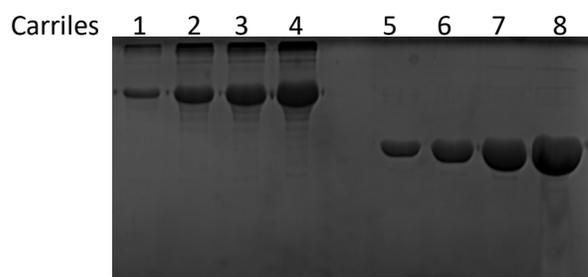


Figura 12: Gel SDS-PAGE utilizado para la cuantificación del PCNA.

Del lado izquierdo se encuentra el estándar de BSA, y del lado derecho se encuentra el PCNA. Se utilizaron 4 diluciones con factor 1:2 para corroborar que se hace una cuantificación adecuada. Carriles: 1: Albúmina a 2 mg/mL; 2: Albúmina a 4 mg/mL; 3: Albúmina a 6 mg/mL; 4: Albúmina a 8 mg/mL; 5: TgPCNA diluído 1:8; 6: TgPCNA diluído 1:4; 7: TgPCNA diluído 1:2; 8: TgPCNA diluído 1:2.

La proteína se concentró hasta 12 mg/mL para las pruebas de cristalización.

## Cristalización de TgPCNA

Inicialmente las pruebas de cristalización se hicieron por la técnica de microbatch, usando la proteína a una concentración de 8, 10 y 12 mg/mL y los kits de cristalización de Rigaku Reagents Wizard I, II, III y IV, así como PEG/Ion de Hampton Research. Las condiciones de cristalización exitosas se muestran en la Tabla 3; aunque en algunas de ellas los cristales observados eran muy pequeños.

Tabla 3: Condiciones bajo las cuales se obtuvieron cristales del PCNA de *T. gammatolerans*

Kit	Condición	Composición		
Wizard 1	37	2.5 M Cloruro de Sodio	100 mM Imidazol/HCl pH 8.0	
Wizard 2	21	35% (v/v) MPD	100 mM Acetato de Sodio/Ácido Acético pH 4.5	
	29	1260 mM Sulfato de Amonio	100 mM CHES/Hidróxido de Sodio	200 mM Cloruro de Sodio
	36	10% (p/v) PEG 3000	100 mM Fosfato dibásico de sodio/Ácido Cítrico pH 4.2	200 mM Cloruro de Sodio
	37	1 M Tartrato de Sodio y Potasio	100 mM Tris/HCl pH 7.0	200 mM Sulfato de Litio
	38	2.5 M Cloruro de Sodio	100 mM Acetato de Sodio/Ácido Acético pH 4.5	200 mM Sulfato de Litio
	41	2 M Sulfato de Amonio	100 mM Tris/HCl pH 7.0	200 mM Sulfato de Litio
	48	1M Tartrato de Sodio y Potasio	100 mM MES/Hidróxido de Sodio pH 6.0	
Wizard 3	40	10% (v/v) MPD	100 mM Bicina/Hidróxido de Sodio pH 9	200 mM Acetato de Zinc
	42	30% (p/v) PEG 4000	100 mM Tris/HCl pH 8.5	200 mM Sulfato de Litio
	45	1.5 M Sulfato de Litio	100 mM Tris/HCl pH 8.5	
	46	50% (v/v) MPD	100 mM Tris/HCl pH 8.5	200 mM Cloruro de Amonio
Wizard 4	9	5% (v/v) PEG 400	100 mM Acetato de Sodio/Ácido Acético pH 5.5	2 M Sulfato de litio y 100 mM Sulfato de Magnesio

La condición en la que se obtuvieron cristales de mejor tamaño y apariencia fue la misma que la reportada previamente para el PCNA de *T. kodakaraensis* (Ladner, 2011). A partir de esta condición original se realizó la optimización de la siguiente forma:

- Se utilizaron 3 concentraciones de sulfato de amonio: 2.4 M, 2.6 M y 2.8M.
- Se utilizaron 3 concentraciones de MPD: 5%, 7.5% y 10%
- Se utilizaron 3 valores diferentes de pH en la composición del buffer de citratos: 5.2, 5.5 y 5.8.

Se prepararon nuevas soluciones de cristalización mediante la combinación de dichas concentraciones.

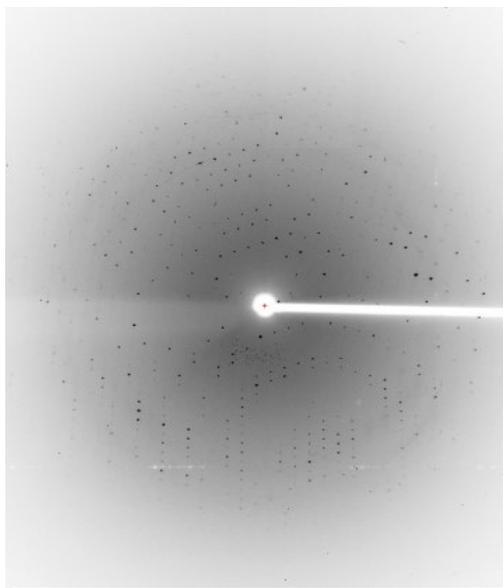


*Figura 13: Cristal 1: Fotografía del cristal de TgPCNA.*

*Las condiciones bajo las que se obtuvo fueron 2.8M de sulfato de amonio, 7.5% de MDP y 100 mM de buffer de citratos con un pH de 5.2. La concentración de enzima fue de 10 mg/mL. Las dimensiones aproximadas del cristal son 0.5 x 0.25 mm.*

## **Difracción y obtención de la estructura cristalográfica**

El cristal obtenido según las condiciones de Ladner (Figura 13) fue difractado en el SSRL, en la línea 14-1. El patrón de difracción se obtuvo con una resolución de 2.8 Å; por lo que se consideró adecuado para determinar la estructura cristalográfica (Figura 14). La estrategia de colecta fue la siguiente: Se expuso el cristal durante 30 segundos con una rotación de 1° bajo un flujo de nitrógeno líquido. El *dataset*, o conjunto de datos, incluye un total de 100 imágenes. Los datos estadísticos del cristal se encuentran concentrados en la Tabla 4.



*Figura 14: Patrón de difracción del cristal del PCNA de T. gammatolerans. El cristal se obtuvo bajo las siguientes condiciones: 2.8 M sulfato de amonio, 7.5% de 2-metil-2,4-pentandiol, 100 mM citrato de sodio pH 5.2; y una concentración de proteína de 10 mg/mL.*

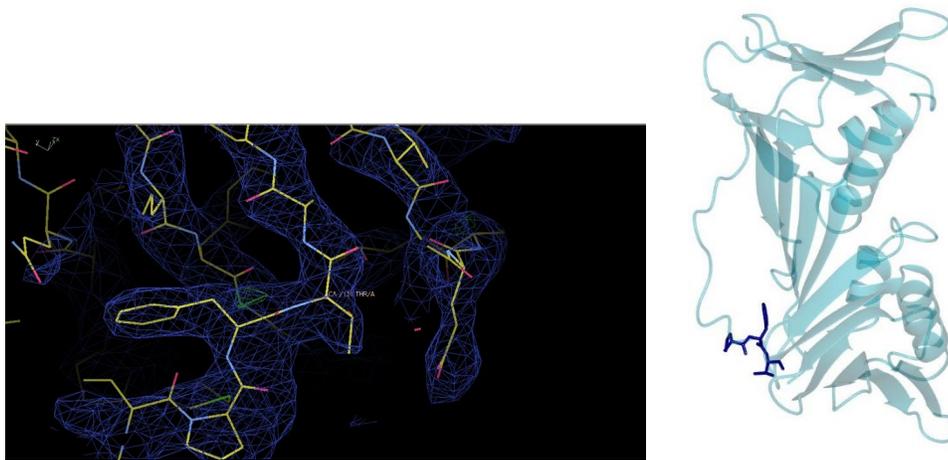
Tabla 4: Datos de difracción del cristal

Fuente de rayos X	<b>SSRL, línea 14-1</b>
Longitud de onda	1.18
Grupo espacial	<i>P3</i>
Parámetros de la celda unitaria	<i>a</i> = 92.67, <i>b</i> =92.67, <i>c</i> =63.63
Ángulos	$\alpha=90^\circ$ , $\beta=90^\circ$ , $\gamma=120^\circ$
Resolución	50-2.8 (2.95-2.8)
Contenido de solvente	56.13 %
Reflexiones totales	47457 (6927)
Reflexiones únicas	15022 (2183)
$R_{\text{meas}}$	0.068 (0.574)
$R_{\text{merge}}$	0.06311 (0.5523)
Completeness (%)	99.7 (99.9)
$[I/\sigma(I)]$	15.3 (2.6)
Multiplicidad	3.2 (3.2)
Mosaicidad	0.28

*Entre paréntesis se muestran los datos de la última faja de resolución.*

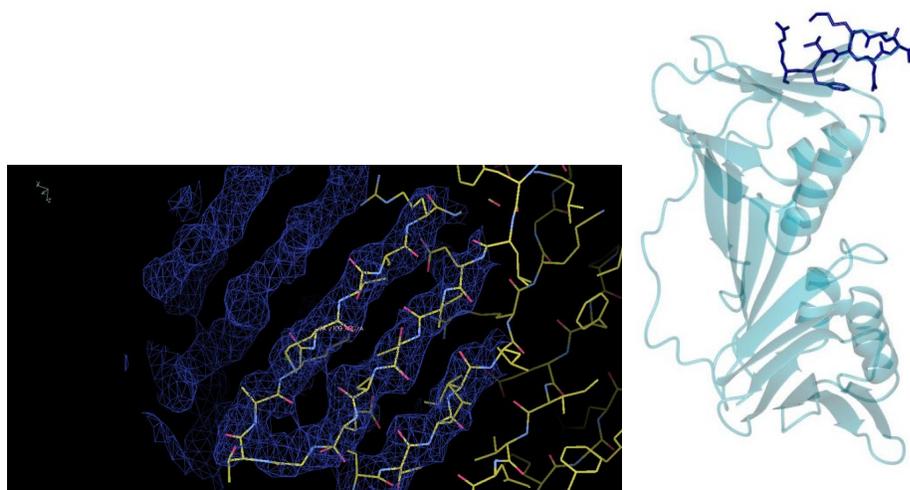
Mediante Phaser, una herramienta de la suite de CCP4, se realizó el cálculo de las fases para obtener la estructura por medio de reemplazo molecular, usando las coordenadas del PCNA de *Thermococcus kodakaraensis* (PDB: 3LX1). Posteriormente la estructura fue afinada con PHENIX REFINE y COOT.

La estructura se construyó basándose en los mapas de densidad electrónica. En las Figura 15 a la Figura 18 se puede observar el mapa de densidad electrónica junto con la región de la proteína que representa.



*Figura 15: PCNA de Thermococcus gammatolerans junto con el mapa de densidad electrónica.*

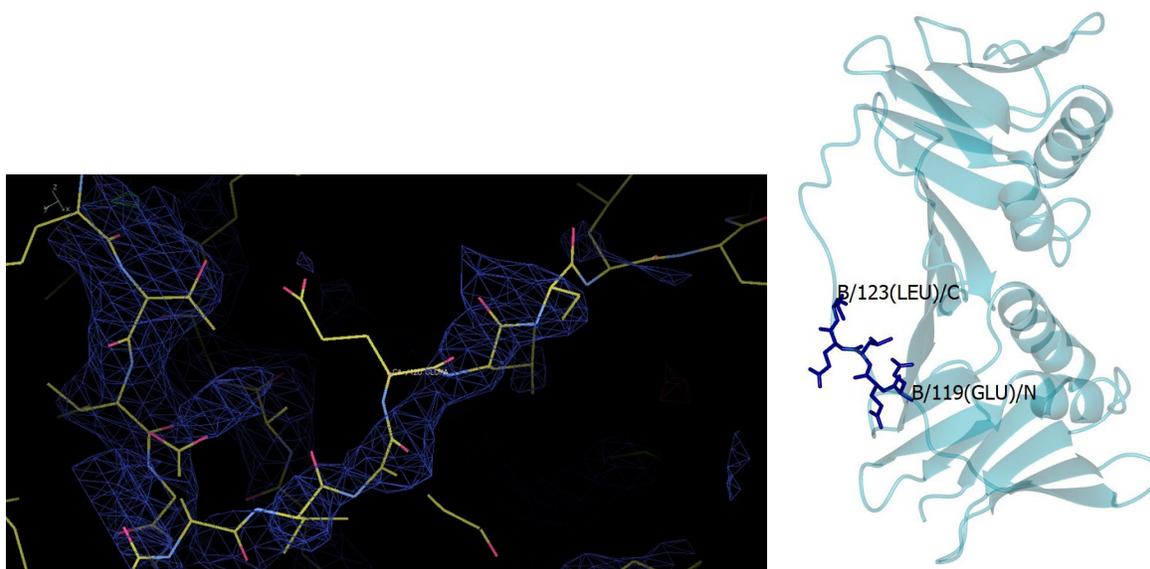
*Se observa un buen ajuste de la estructura al mapa. Del lado derecho podemos observar que representa la parte final del dominio, justo antes de formar el asa interdominio. PDB: 5a6d, figura generada mediante CCP4MG. En la figura de la izquierda podemos observar la misma región, visualizada en COOT. Se observa la estructura de una subunidad, el mapa de densidad junto con los átomos en color amarillo, azul y rosa, así como la densidad electrónica que corresponde a la subunidad contigua. Se muestra el mapa el mapa de densidad electrónica  $2F_oF_c$ , con el contorno a 1 sigma.*



*Figura 16: Región de interacción de un monómero de PCNA con el aledaño para la formación del anillo.*

*Se muestran solo los átomos de una subunidad. En la figura de la derecha se muestra que estos aminoácidos corresponden a la región que interactúa con la siguiente molécula de PCNA. PDB: 5a6d, figura generada mediante CCP4MG. En la figura de la izquierda podemos observar la misma región, visualizada en COOT. Se observa la estructura de una subunidad, el mapa de densidad junto con los átomos en color amarillo, azul y rosa, así como la densidad electrónica que corresponde a la subunidad contigua. Se muestra el mapa el mapa de densidad electrónica  $2F_oF_c$ , con el contorno a 1 sigma.*

Sin embargo, el asa que se encuentra entre los dominios muestra una baja densidad electrónica (Figura 17 y Figura 18), esto es causado por la flexibilidad de la región que permite múltiples conformaciones, heterogéneas entre las celdas que componen el cristal, lo que vuelve difícil de observar mediante cristalografía ya que no se presenta una intensidad de difracción tan fuerte como en el resto (Figura 15 y Figura 16) de las regiones, debido a que el efecto aditivo en la difracción de las celdas unitarias se vuelve menor. Aunque en la base de datos del PDB existen estructuras de PCNA en las que esta región se muestra definida en la densidad electrónica, no es lo más común. En algunas de ellas esta asa se encuentra estabilizada, es decir, tiene el movimiento restringido debido a la interacción con otras proteínas o con la misma proteína, pero proveniente de las celdas unitarias contiguas.



*Figura 17: Inicio del asa que conecta ambos dominios.*

*Se observa una densidad electrónica adecuada en la región del lado izquierdo, que pertenece al dominio A del PCNA. En la figura de la derecha se muestra que estos aminoácidos corresponden la región terminal del dominio A y los primeros aminoácidos que se encuentran en el asa interdominio. PDB: 5a6d, figura generada mediante CCP4MG. En la figura de la izquierda podemos observar la misma región, visualizada en COOT. Se observa la estructura de una subunidad, el mapa de densidad junto con los átomos en color amarillo, azul y rosa, así como la densidad electrónica que corresponde a la subunidad contigua. Se muestra el mapa el mapa de densidad electrónica  $2F_oF_c$ , con el contorno a 1 sigma.*

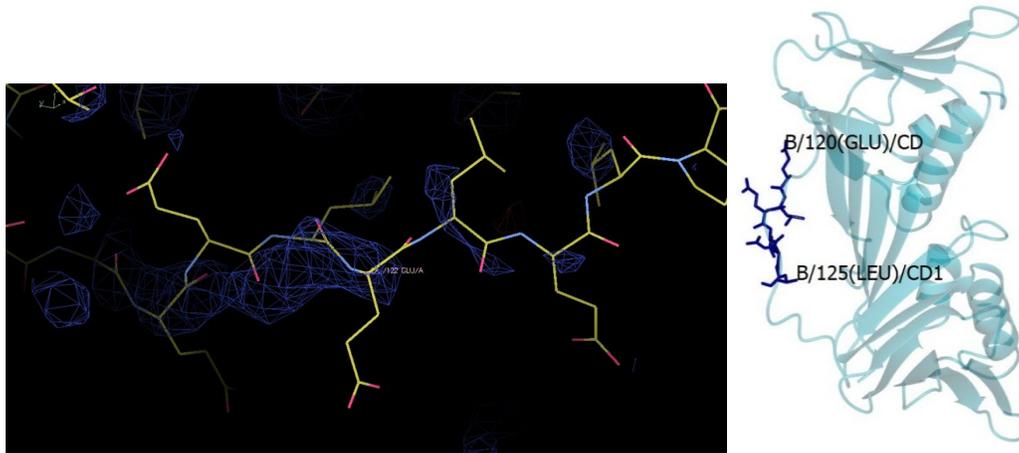


Figura 18: Parte media del asa. Como se puede observar, la densidad electrónica visible en esta región es muy escasa. En la figura de la derecha se muestra que estos aminoácidos corresponden la región mostrada. PDB: 5a6d, figura generada mediante CCP4MG. En la figura de la izquierda podemos observar la misma región, visualizada en COOT. Se observa la estructura de una subunidad, el mapa de densidad junto con los átomos en color amarillo, azul y rosa, así como la densidad electrónica que corresponde a la subunidad contigua. Se muestra el mapa el mapa de densidad electrónica  $2F_oF_c$ , con el contorno a 1 sigma.

La estructura representada por medio de listones es la siguiente.

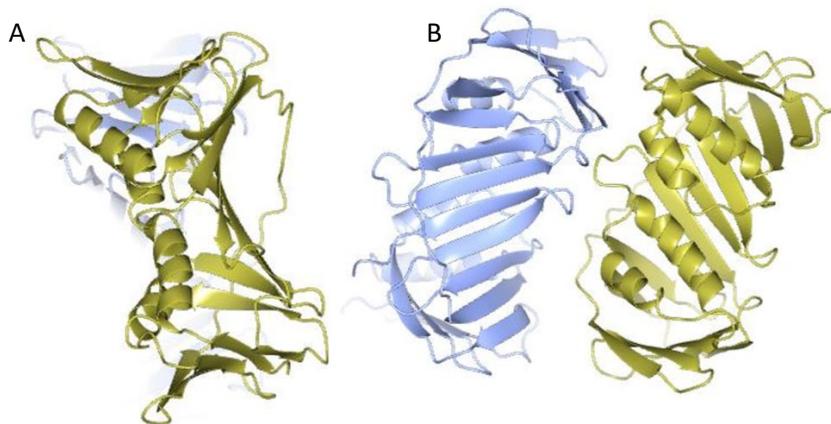


Figura 19: Celda unitaria obtenida del cristal de PCNA de *Thermococcus gammatolerans*. La celda unitaria se encuentra compuesta por dos moléculas de PCNA. A: Vista frontal de la celda unitaria. Se muestra la molécula frontal (Amarillo) con las alfa hélices hacia el lado izquierdo, y la molécula posterior (Azul) se encuentra con posicionada hacia el lado contrario, con la cara que contiene las hélices alfa hacia el lado derecho. B: Vista lateral de la celda unitaria. En esta perspectiva se pueden apreciar ambas moléculas de forma más clara. La molécula frontal (Amarillo) muestra las hélices alfa, mientras que la molécula posterior (Azul) presenta las láminas beta. La imagen fue generada en CCP4MG, empleando la representación con listones y colores por molécula.

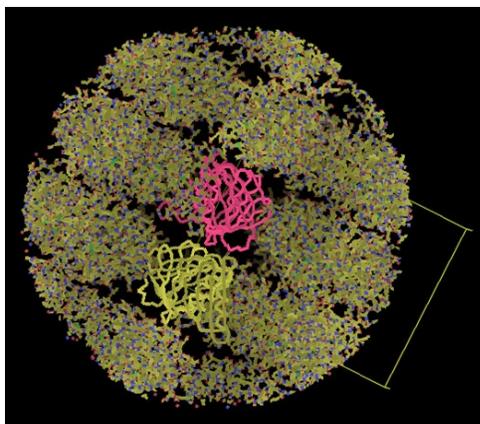
Tabla 5: Parámetros estadísticos de la estructura del PCNA de *Thermococcus gammatolerans*

<b>Línea</b>	14-1 del SSRL
<b>Longitud de onda (Å)</b>	1.18
<b>Resolución (Å)</b>	49.86 - 2.8
<b>Grupo espacial</b>	P 3
<b>Temperatura (K)</b>	100
<b>Detector</b>	MARCCD
<b>Parámetros de celda unitaria (a,b,c)</b>	92.669, 92.669, 56.13
<b>Reflexiones únicas</b>	15022 (1521)
<b>Contenido de solvente</b>	56.13
<b>I/(σ(I))</b>	15.75 (2.64)
<b>Redundancia</b>	3.2
<b>Integridad</b>	99.69 (99.87)
<b>R<sub>merge</sub></b>	0.063 (0.55)
<b>Afinamiento</b>	
<b>R<sub>work</sub></b>	0.1883
<b>R<sub>free</sub></b>	0.2379
<b>R.m.s.d. distancia</b>	0.011
<b>R.m.s.d. ángulos</b>	1.51
<b>Factor B promedio</b>	70.7
<b>Ramachandran (%)</b>	
<b>Favorecidos</b>	93
<b>Permitidos</b>	6.18
<b>No permitidos</b>	0.82
<b>Código PDB</b>	5a6d

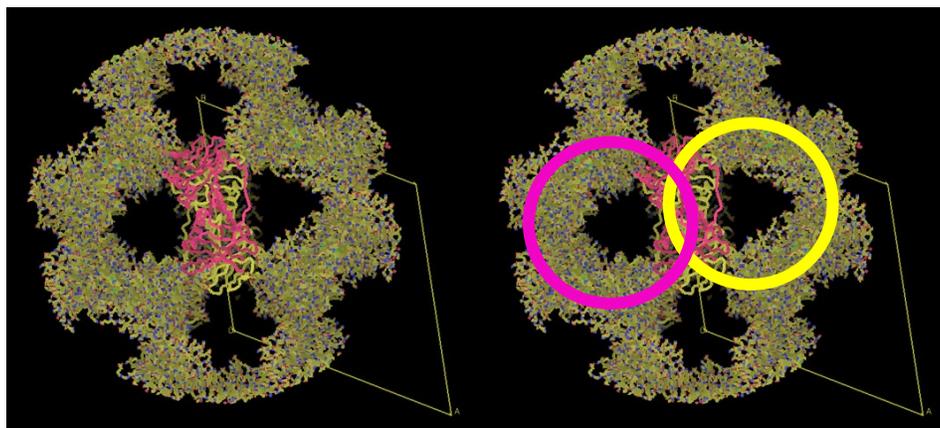
La estructura fue depositada en el PDB, se sometió a revisión y curación por parte de Abhik Mukhopadhyay, y fue aceptada (Código de acceso 5A6D). La estructura final se muestra en la Figura 19, y sus parámetros estadísticos se muestran en la Tabla 5.

Al observar el contenido de la unidad asimétrica y cómo está orientada respecto a los vecinos, notamos que el PCNA se encuentra en la forma trimérica, formando un anillo como se muestra en la Figura 20. Esta observación es secundada por el servidor Protein Quaternary Structure (PQS), el cual, basándose tanto en la superficie de la molécula como en la distribución de aminoácidos polares y no polares, sugiere un ensamble trimérico del PCNA en solución. Durante la filtración en gel (Cromatografía de exclusión molecular) no observamos este comportamiento ya que el volumen de elución de la proteína corresponde al que tendría una proteína con una masa molecular similar a la del monómero, aunque en estudios previos se ha sugerido que la oligomerización de una proteína está condicionada por la concentración (Merten, 2012), y en el

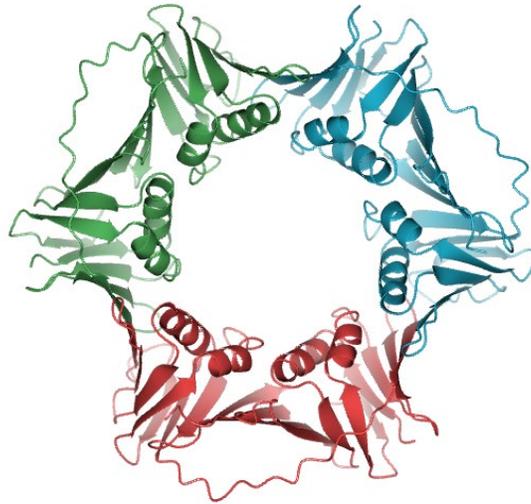
caso del PCNA de *Thermococcus kodakaraensis* sucede de esa forma, ya que la proteína tiende a la formación de trímeros bajo condiciones altas de concentración (Ladner, 2011). Sin embargo, dado que dentro de la columna de exclusión molecular la concentración es mucho más baja, alrededor de 0.05 mg/mL, en comparación con la de las pruebas de cristalización, 10 mg/mL, es posible que se comporte como un monómero, lo cual es respaldado por el peso molecular calculado a partir del volumen de elución de la proteína dentro de la columna de exclusión molecular, pero que en las pruebas de cristalización forme una estructura trimérica ya que la concentración es mucho mayor, o que la nucleación favorezca la formación de este arreglo.



*Figura 20: Vista lateral de la celda unitaria y sus simétricos. En representación de cilindros se observa la unidad asimétrica, con las dos subunidades de PCNA al centro, una de color rosa y otra amarilla. Mediante la representación de átomos completos podemos ver las celdas simétricas contiguas. La imagen se generó en COOT y el radio en el que se muestran es de 70 Å.*



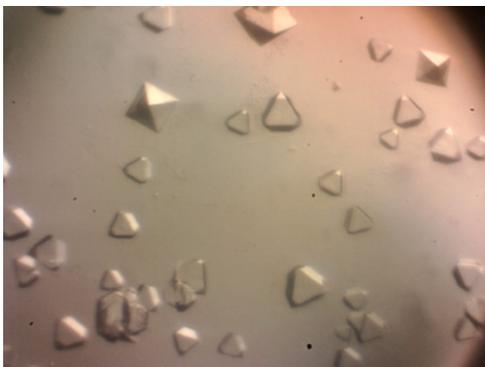
*Figura 21: Vista superior de la celda unitaria y sus simétricos. En representación de cilindros se observa la unidad asimétrica, con las dos subunidades de PCNA al centro, una de color rosa y otra amarilla. Mediante la representación de átomos completos podemos ver las celdas simétricas contiguas. Desde esta perspectiva es posible ver el anillo trimérico formado por la subunidad de la celda unitaria junto con otras dos subunidades adyacentes, provenientes de los simétricos. La imagen se generó en COOT y el radio en el que se muestran es de 70 Å.*



*Figura 22: PCNA de Thermococcus gammatolerans ensamblado en trímero. La imagen fue generada en CCP4MG, empleando la representación con listones y colores por molécula.*

## Análisis del daño por radiación en un cristal de TgPCNA

Posteriormente, se difractó otro cristal en la misma línea del SSRL. En el siguiente cristal colectado (Figura 23), se deseaba observar la progresión del daño en el cristal, por la misma región de cristal se colectó múltiples veces: Se colectó 7 veces la región de los grados 0- 150°, con un tiempo de exposición de 2s, un delta phi de 1°, con un total de 150 imágenes por colecta.



*Figura 23: Cristales empleados para la segunda difracción. Estos cristales fueron obtenidos bajo las condiciones: 2.6 M sulfato de amonio + 7.5% MPD + 100 mM citrato de sodio pH 5.2. Se utilizó una concentración de 9 mg/mL. El tamaño de los cristales oscila entre 0.2 mm a 0.5 mm.*

Antes de obtener la estructura cristalográfica se deben filtrar los datos, lo que puede causar pérdida de información. En el caso de esta colecta este procesamiento de datos se vuelve especialmente interesante debido a que podremos observar el efecto de la radiación acumulada en el cristal ya que afectará los parámetros del cristal, disminuyendo su calidad a medida que las colectas avanzan. La resolución máxima a la cual los datos son adecuados para la determinación de las estructuras cristalográficas va en disminución, ya que en el primer dataset los datos alcanzan una resolución de 1.8 Å, mientras que en el último la resolución disminuyó a 1.85 Å. Cabe destacar que esta disminución es bastante pequeña considerando que se ha colectado 7 veces y se ha depositado en él una dosis aproximada de 15.19 MGy.

En la Tabla 6 se resumen los parámetros estadísticos de las 7 colectas que se realizaron del cristal.

Tabla 6: Parámetros estadísticos obtenidos de la difracción del cristal durante las 7 colectas. Entre paréntesis se muestran los datos de la faja de mayor resolución.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Resolución</b>	49.71 – (1.90-1.80)	49.67 – (1.90 – 1.80)	49.72 – (1.90 – 1.80)	49.70 – (1.94 – 1.84)	49.75 – (1.94 – 1.84)	49.74 – (1.94 – 1.84)	49.72 – (1.95 – 1.85)
<b>R<sub>merge</sub></b>	0.051 (0.402)	0.052 (0.466)	0.057 (0.528)	0.059 (0.508)	0.061 (0.514)	0.057 (0.502)	0.056 (0.370)
<b>R<sub>meas</sub></b>	0.062 (0.489)	0.062 (0.569)	0.068 (0.643)	0.071 (0.621)	0.073 (0.625)	0.068 (0.610)	0.067 (0.450)
<b>Reflexiones totales</b>	179249 (25773)	177212 (25221)	179357 (25707)	166026 (23400)	168532 (24196)	168457 (7716)	165527 (23701)
<b>Reflexiones únicas</b>	56181 (8235)	56019 (8221)	56221 (8225)	52551 (7683)	52723 (7710)	52699 (7716)	51791 (7556)
<b>I/(<math>\sigma</math>(I))</b>	12.2 (2.7)	10.4 (2.3)	10.1 (2.1)	9.5 (2.1)	9.6 (2.1)	9.9 (2.2)	10.8 (2.9)
<b>CC<sub>½</sub></b>	0.996 (0.746)	0.997 (0.697)	0.996 (0.633)	0.996 (0.672)	0.996 (0.678)	0.996 (0.704)	0.996 (0.810)
<b>Integridad (%)</b>	99.9 (100)	99.9 (99.9)	99.9 (100)	99.9 (99.9)	99.9 (100)	99.9 (100)	99.9 (100)
<b>Multiplicidad</b>	3.2 (3.1)	3.2 (3.1)	3.2 (3.1)	3.2 (3.0)	3.2 (3.1)	3.2 (3.1)	3.2 (3.1)

Uno de los parámetros estructurales del cristal que se ve afectado por la radiación absorbida es el volumen de la celda unitaria. Para este cristal se realizó un cálculo del volumen de la celda unitaria utilizando los parámetros mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7: Cambios en las dimensiones de la celda unitaria con respecto a la radiación recibida

Colecta	Radiación absorbida (MGy)	a = b	c	Volumen de la celda unitaria (Å <sup>3</sup> )	Porcentaje de cambio
1	2.17	92.477	63.409	5078.26393	100.00%
2	4.34	92.489	63.39	5077.40104	99.98%
3	6.51	92.513	63.398	5079.35952	100.02%
4	8.68	92.44	63.4	5075.51162	99.95%
5	10.85	92.572	63.443	5086.20651	100.16%
6	13.02	92.56	63.429	5084.42496	100.12%
7	15.19	92.583	63.39	5082.56139	100.08%

El aumento del volumen de la celda unitaria en función de la radiación recibida se observa en la Figura 24:

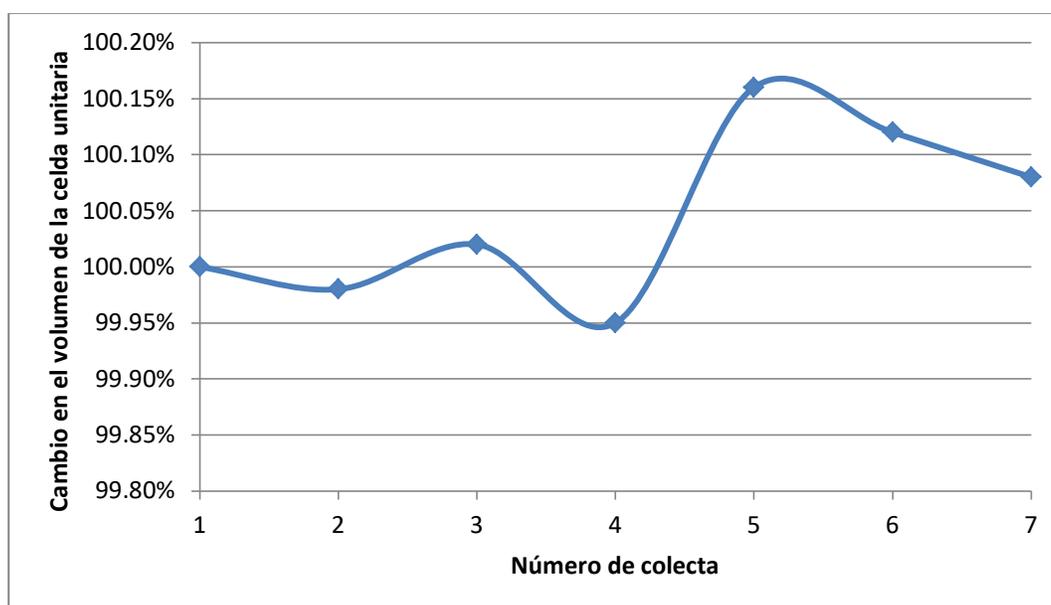


Figura 24: Cambio en el volumen de la celda unitaria en función a la colecta.

Tabla 8: Parámetros estadísticos obtenidos de la difracción del cristal durante las 7 colectas, con una resolución máxima de 1.8 Å.

	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>	
<b>Resolución</b>	49.71 – 1.8	1.9-1.8	49.67-1.8	1.9-1.8	49.72-1.8	19.-1.8	49.70-1.8	1.9-1.8
<b>Grupo Espacial</b>	P3		P3		P3		P3	
<b>Rmerge</b>	0.051	0.402	0.052	0.466	0.057	0.528	0.06	0.681
<b>Rmeas</b>	0.062	0.489	0.062	0.569	0.068	0.643	0.072	0.834
<b>Totales</b>	179249	25773	177212	25221	179357	25707	176816	24824
<b>Únicas</b>	56181	8235	56019	8221	56221	8225	56149	8232
<b>I/Sigma I</b>	12.2	2.7	10.4	2.3	10.1	2.1	9.1	1.6
<b>CC ½</b>	0.996	0.746	0.997	0.697	0.996	0.633	0.996	0.486
<b>Integridad</b>	99.9	100	99.9	99.9	99.9	100	99.9	99.8
<b>Multiplicidad</b>	3.2	3.1	3.2	3.1	3.2	3.1	3.1	3

	<b>5</b>		<b>6</b>		<b>7</b>	
<b>Resolución</b>	49.75-1.8	1.9-1.8	49.74-1.8	1.90-1.8	49.73-1.8	1.9-1.8
<b>Grupo Espacial</b>	P3		P3		P3	
<b>Rmerge</b>	0.061	0.682	0.057	0.687	0.06	0.754
<b>Rmeas</b>	0.074	0.831	0.069	0.836	0.072	0.918
<b>Totales</b>	179894	25903	179796	25819	179713	25828
<b>Únicas</b>	56367	8285	56339	8263	56319	8261
<b>I/Sigma I</b>	9.1	1.6	9.3	1.6	8.8	1.5
<b>CC ½</b>	0.996	0.497	0.996	0.5	0.996	0.434
<b>Integridad</b>	99.9	100	99.9	100	99.9	100
<b>Multiplicidad</b>	3.2	3.1	3.2	3.1	3.2	3.1

El aumento en el volumen de la celda unitaria es un efecto colateral en otros cristales proteicos sometidos a radiación en un sincrotrón, ya que es un efecto debido a la absorción de radiación por parte del cristal. A pesar de que los estudios concuerdan en el aumento del volumen de la celda unitaria (Garman, 2003), la proporción en que aumenta respecto a la cantidad de radiación recibida es aún desconocida, y dado que está relacionada con la composición del reservorio, los parámetros técnicos de la colecta (temperatura, intensidad del haz de luz, tiempo de exposición) e inclusive con la composición o estructura de la proteína; este coeficiente de absorción podría ser distinto para cada cristal. Por ello, y a pesar de que el volumen de la celda unitaria aumenta por la cantidad de radiación recibida, no podremos relacionar directamente este aumento en el volumen de la celda unitaria con la cantidad de radiación absorbida, ni con el daño recibido por la proteína (Southworth-Davies, 2007). Por otro lado, existen otros estudios, bajo las condiciones en que realizan los experimentos, determinan que existe una relación proporcional entre el aumento del volumen de la celda unitaria con respecto a la radiación recibida y proponen el monitoreo de este aumento como una medida de cuantificación del daño recibido, y este método tiene la ventaja de que puede ser utilizado durante la colecta (Ravelli, 2002).

En este caso, no se observa un aumento en el tamaño de la celda unitaria con respecto a la dosis de radiación recibida (Tabla 7), y aunque el volumen de la celda unitaria si es mayor en la última colecta con respecto a la primera, durante las colectas 2 a 6 no observamos un aumento consistente. Curiosamente, en la colecta número 4 se observa una disminución del volumen de la celda unitaria. Desconocemos el porqué de esta variación, sin embargo, es interesante que esta colecta también tenga cambios anómalos en otros parámetros. En un estudio se analiza el aumento del volumen de la celda unitaria en función a la dosis de radiación recibida por 3 cristales de distintas proteínas (Sliz, 2003). Los cristales se difractan 4 veces consecutivas, con una rotación de  $1^\circ$  por frame y una colecta total de entre  $30$  a  $40^\circ$ , pero con distintas estrategias de exposición. Durante la primera y tercera colecta, se emplea un flujo atenuado a una décima parte, con un tiempo de exposición de 5s; durante la segunda, se retiró el atenuador y se expuso el cristal durante 0.5 s; y finalmente, la cuarta colecta también se realizó sin atenuador, con un tiempo de exposición de 5 segundos. Cabe destacar que no se especifica el tamaño de los cristales utilizados. El aumento en el tamaño del volumen de la celda unitaria durante la primera colecta fue de 0.4 % para la proteína HLA, 0.5% para la proteína US2 y 4% para la proteína  $\lambda 3$ . Esto significa que, durante una sola colecta, el aumento porcentual del volumen de la célula unitaria es más del doble que el obtenido para el cristal de TgPCNA durante las 7 colectas. Por lo tanto, consideramos que el aumento en el volumen de la celda unitaria durante las 7 colectas no es alto, sin embargo, para conocer realmente la magnitud de este cambio es necesario compararlo con el de otras proteínas cristalizadas bajo condiciones similares, y posteriormente difractadas bajo condiciones igual, para realizar una comparación adecuada.

Algunos de los parámetros cristalográficos, como el número de reflexiones totales, dependen de la resolución máxima a la que se corten los datos de difracción. Por ello, cortar los datos de difracción a menor resolución inevitablemente llevará a un número menor de reflexiones totales. Por ello, y para evitar que la disminución del orden en el cristal y la consiguiente pérdida de

resolución que provoca, sea la causa de la disminución en la calidad de los datos obtenidos, decidimos procesar de nuevo todos los datasets, pero ahora con un corte de resolución constante a 1.8 Å. Estos datos no fueron utilizados para la determinación de las estructuras, sólo para la discusión de la progresión del daño en el cristal. En la Tabla 8 observamos los resultados de las 7 colectas al procesar todas ellas con una resolución máxima de 1.8 Å. Es notable que los parámetros reflexiones totales, reflexiones únicas y multiplicidad, tengan ligeras variaciones, pero no se observa una clara disminución a medida que el experimento progresa (Figura 25). Esto nos indica que, al menos en el caso de este cristal, aparentemente el número de reflexiones no se ve afectado por la radiación acumulada, pero otros parámetros no se comportan de esta forma.

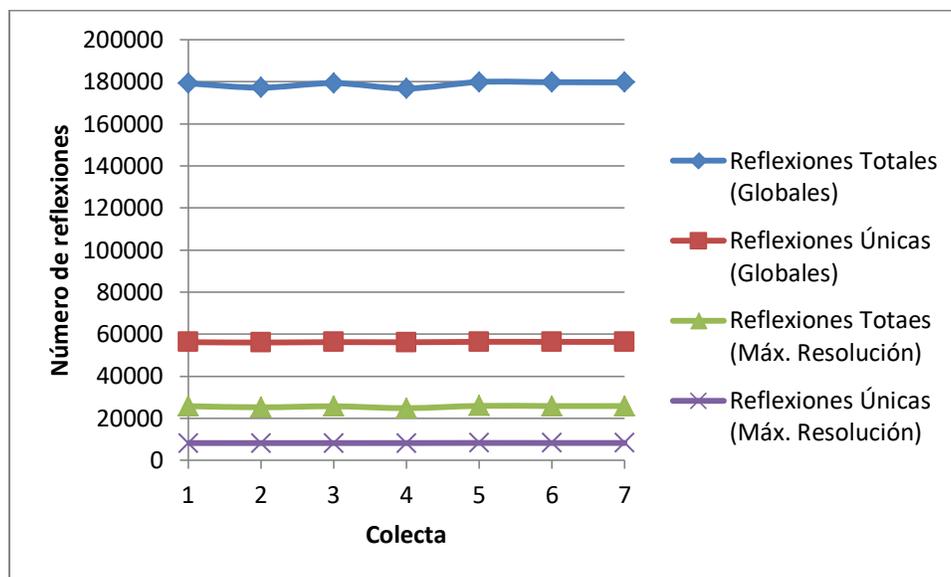


Figura 25: Variación en el número de reflexiones en cada dataset cortado a 1.8 Å.

El valor de  $I/(\sigma(I))$  representa la cantidad de veces que, en promedio, son más intensos los puntos del patrón de difracción respecto al fondo (ruido) detectado. Cuando analizamos los datos utilizando la resolución de corte necesaria para determinar una estructura cristalográfica se observa una disminución drástica de la calidad de este valor entre el dataset 3 y 4, lo que causa que la resolución a la cual se cortan los datos baje de 1.8 Å a 1.84 Å (Tabla 8). Se desconoce el porqué de esta disminución tan marcada, ya que simultáneamente se observó un aumento en el volumen de la celda unitaria. Para analizar este cambio desde otro punto de vista, decidimos tomar también los datos cortados a 1.8 Å de resolución, y así eliminar el cambio drástico en los parámetros estadísticos observado entre el dataset 3 y el 4.

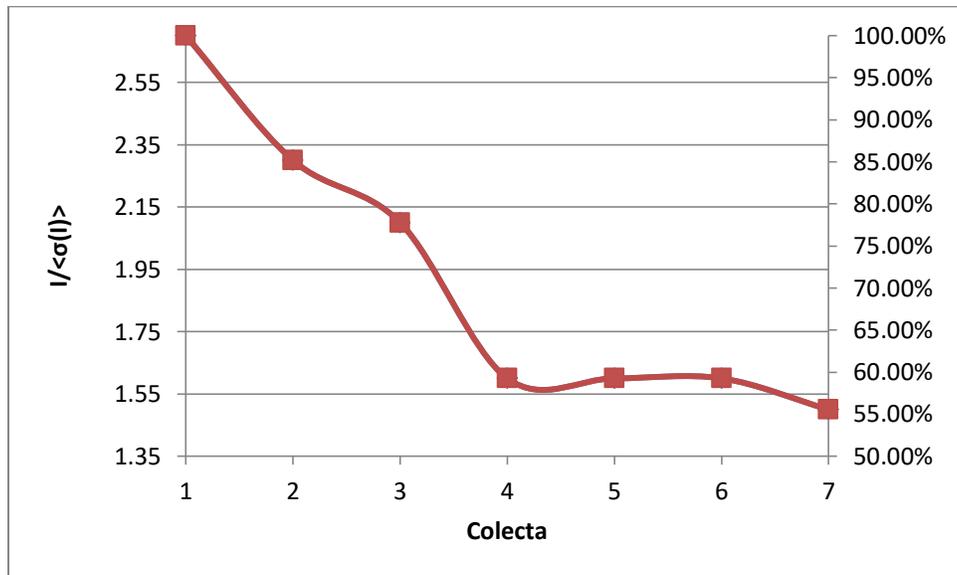


Figura 26: Disminución de la intensidad de las difracciones con respecto al ruido en función de la colecta, considerando solamente los datos de la faja de máxima resolución. Se muestran los datos correspondientes a la mayor faja de resolución, considerando  $1.8 \text{ \AA}$  como máxima resolución para todas las colectas. En el eje izquierdo se muestra el dato crudo de  $I/\langle\sigma(I)\rangle$ , mientras que del lado derecho se muestra el porcentaje de disminución, tomando como 100% el valor de  $I/\langle\sigma(I)\rangle$  del primer dataset.

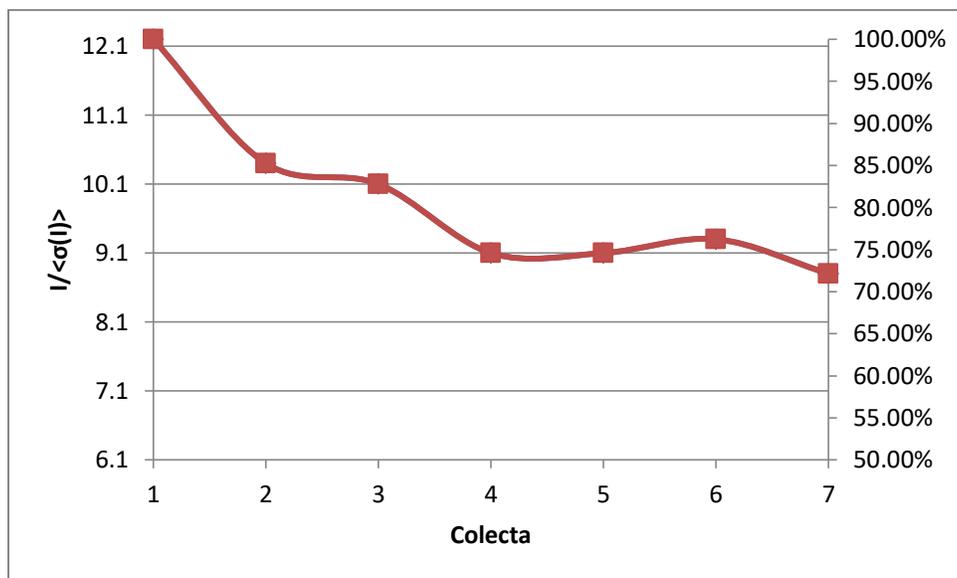


Figura 27: Disminución de la intensidad de las difracciones con respecto al ruido en función de la colecta, considerando los datos de todo el cristal. Se muestran los datos correspondientes al promedio considerando todas las reflexiones, considerando  $1.8 \text{ \AA}$  como máxima resolución para todas las colectas. En el eje izquierdo se muestra el dato crudo de  $I/\langle\sigma(I)\rangle$ , mientras que del lado derecho se muestra el porcentaje de disminución, tomando como 100% el valor de  $I/\langle\sigma(I)\rangle$  del primer dataset.

Como podemos observar, la disminución del valor de  $I/\langle\sigma(I)\rangle$  es notable conforme se deposita mayor radiación en el cristal (Figura 26 y Figura 27), y aunque la pérdida de intensidad es mayor cuando sólo se considera la faja de mayor resolución (Figura 26), el perfil de pérdida de intensidad es similar a cuando se considera el promedio de todas las reflexiones (Figura 27). La disminución de la intensidad de la señal con respecto al fondo puede estar dada por disminución de la intensidad de la señal, o por el aumento de la intensidad del ruido de fondo. El caso número 1 la pérdida de intensidad se debe a la disminución del orden del cristal y la disminución de celdas unitarias correctamente alineadas que conlleva. Esto resulta en que la pérdida de las difracciones de alta resolución sea mayor que las de baja resolución. Por el otro lado, el ruido inicial es generado por una alta mosaicidad y formación de cristales de hielo. Este ruido puede aumentar ya que al generarse gases dentro del cristal la celda unitaria se expande de una forma no uniforme, lo que incrementa dicha mosaicidad.

A pesar de que se utilizaron todos los dataset hasta una resolución de 1.8 Å, el dataset 4 sigue mostrando un comportamiento inusual con respecto a los demás. Este fenómeno llama nuestra atención debido a que durante cada una de las colectas el cristal se irradió con la misma intensidad y el mismo tiempo de exposición, por lo que teóricamente el cristal recibió la misma dosis de radiación durante cada colecta, y al no cambiar su composición química, absorbió a su vez la misma dosis. Suponiendo que no se trate de un fenómeno causado por un evento fuera de nuestro control, como variaciones en la intensidad del haz del sincrotrón, consideramos que esto está causado por (1) El aumento de la temperatura del cristal, (2) La generación de radicales reactivos no es linealmente proporcional a la radiación absorbida, si no que al alcanzar una cierta dosis se disparara un evento de ionización excepcional o (3) La estructura puede “absorber” o “asimilar” una cantidad limitada de radiación, o de radicales libres, y que una vez superado este límite, el daño generado fuera muy brusco, con un comportamiento similar al que se obtiene al titular una solución amortiguadora con una base o un ácido y agotar su capacidad amortiguadora; y en el caso del cristal, al agotarse los grupos disponibles para la oxidación, el oxígeno libre no reacciona con otros grupos, si no con otra molécula y forma oxígeno gaseoso, que aumenta y deforma el volumen de la celda unitaria, afectando también al orden de dichas celdas, lo que ocasiona que la cantidad de celdas alineadas correctamente disminuya, y con ello la intensidad del patrón de difracción.

La opción número 1 no es fácil de comprobar, ya que medir cambios en la temperatura del cristal es un proceso metodológicamente complejo; sin embargo, algunos modelos matemáticos basados en la densidad promedio, tamaño, absorción de radiación, y enfriamiento por parte del flujo de nitrógeno líquido, nos sugieren que el cristal sufre de un incremento en la temperatura de 4.1°C durante el primer segundo en que es expuesto a la radiación del sincrotrón, y la temperatura se mantiene constante durante el tiempo posterior. Este estudio tiene las limitaciones de que asume un cristal de dimensiones menores al tamaño del haz de luz, una composición del cristal estándar que no considera proteínas sino hidratos de clatrato con características químicas distintas a las proteínas, y no se considera la formación de hielo (Nicholson, 2001). Por otro lado, Kriminski

indica que para conocer el cambio de temperatura en un cristal es necesario conocer las propiedades de dicho cristal, el calentamiento generado por la absorción de radiación y el enfriamiento generado por el flujo de nitrógeno sobre la superficie del cristal. Debido a que ambos valores implican un cálculo complejo, se limita a recomendar que el cristal sea más grande que el haz de luz ya que esto permite un mejor enfriamiento al existir transferencia de calor desde la región irradiada a la región que queda fuera del haz (Kriminski, 2003). Hasta este punto no es posible conocer los cambios que sucedieron dentro del cristal, sin embargo, esperaríamos que dichos cambios fueran homogéneos y constantes durante la colecta ya que el tiempo de exposición, la intensidad de la luz, el flujo de nitrógeno y la composición del cristal permanecieron constantes.

Por otro lado, comprobar por medio de las estructuras cristalográficas los siguientes puntos tampoco es tarea fácil. En el caso del punto número 3, podríamos buscar si hay una evidencia en algún grupo de la proteína que demuestre una clara acumulación del daño por radiación, debido a una mayor susceptibilidad de ser afectado por radicales libres generados en el medio o de absorber radiación directamente. Este punto estaría secundado por el hecho de que los átomos con mayor densidad electrónica (Como los átomos de azufre de los aminoácidos cisteína y metionina) o con una mayor susceptibilidad de oxidarse (Como los carboxilos de las cadenas laterales del ácido glutámico y del ácido aspártico). No debemos olvidar que la acumulación de daño en el cristal no es un proceso discreto, sino un proceso continuo; pero al observarlo mediante cristalografía no podemos conocer finamente las etapas que lo componen, ya que se necesita cierto número de imágenes para la determinación de la estructura. Esta limitación ha sido superada de forma parcial mediante la colecta de múltiples cristales y usando datasets compuestos. Estos datasets compuestos permiten observar el estado de la estructura de una proteína que ha sido irradiada un tiempo menor al mínimo necesario para la determinación de su estructura, estableciendo ventanas más cortas de difracción en varios cristales, y después unir los datos obtenidos de todos ellos para la determinación de una única estructura.

La radiación absorbida mostrada en la Tabla 7 se refiere a la radiación total absorbida en el cristal al realizar la colecta del último frame de cada dataset, pero esta cantidad depositada no es la misma que se tiene en el primer frame de dicho dataset. Puesto de otra forma, es probable que ese punto de quiebre de la capacidad amortiguadora se encuentre en algún punto durante la colecta del dataset 4, no necesariamente al final de este; por lo que no es factible determinar el punto exacto de agotamiento de absorción del cristal. En cuanto al punto número 2, sería fácil de probar al irradiar una solución similar a la del cristal, pero en ausencia de proteína y titular la cantidad de radicales libres generados, o cambios en el potencial redox de la solución. La limitante de este experimento sería que (1) parte de la radiación interactúa con la proteína, ya sea por difracción o absorbiéndola, y los efectos generados por esta absorción son imposibles de ver en un ambiente sin la proteína, por lo que la interacción del haz incidente del sincrotrón y el daño generado no serán iguales en ausencia de ella; (2) para facilitar la medición de los radicales libres

de oxígeno sería recomendable el añadir compuestos que reaccionen con estos radicales, y que al reaccionar tengan cambios en su estructura que generen modificaciones en su perfil de absorción de UV-Vis, lo que permitiría generar y monitorear estos radicales durante la colecta simulada. Si estos compuestos son moléculas pequeñas inclusive sería posible incluirlas en las soluciones de cristalización y así conocer el comportamiento de ellas dentro de los cristales. Además, en el caso de esta proteína, sería posible incluso más sencillo debido a que la absorción UV-Vis es muy baja, debido a la baja proporción de aminoácidos aromáticos. (3) El volumen de líquido a irradiar debe ser el mismo del de la gota que contenía el cristal, limitando la cantidad de muestra que se puede tratar durante una “colecta simulada”. Para ello, el compuesto mencionado en el punto anterior, además de permitir cuantificar su oxidación, debe ser suficientemente resistente como para resistir una colecta simulada completa, e inclusive, varias colectas consecutivas. Este experimento sería especialmente útil si es posible cuantificar la cantidad de radicales generados por Grey, e inclusive como esta generación o absorción cambia en función de la composición del líquido, y no sólo estimarla. Sin embargo, por el momento solamente podemos estimar la radiación absorbida mediante software, que a pesar de que nos ofrece una idea de la radiación recibida, existe la posibilidad de que no sea exacto.

## Estructuras cristalográficas determinadas utilizando los 7 dataset colectados

Tomando los 7 dataset colectados del mismo cristal, procedimos a determinar la estructura cristalográfica. La colecta se realizó en la línea 14-1 del SSRL con siguiente estrategia de colección: Cada set consistió de 150 frames. Para la toma de estos 150 frames se utilizó un tiempo de 2 segundos de exposición. Este es el tiempo que el obturador deja pasar el haz de rayos X, que incide en el cristal, es dispersado por este, y forma el patrón de difracción al llegar al detector. La  $\Delta$  entre cada frame fue de  $1^\circ$ , este dato se refiere a la cantidad de grados que un cristal rota durante la difracción. Por lo tanto, cada dataset consistió de  $150^\circ$  colectados a lo largo de 300 segundos de exposición. Al llegar al frame 150, el cristal fue rotado hasta alcanzar la posición original en que se empezó a difractar, y de nuevo se colectó con la misma estrategia. Este paso fue repetido 6 veces, para alcanzar 7 datasets completos obtenidos de la misma región del cristal.

Para el indexado se utilizaron los frames 1 y 90, y el programa ipmosflm. De igual forma que la estructura anterior el grupo espacial en el que cristalizó fue P3. Ninguno de los parámetros se restringió, de forma que ipmosflm determinó la mosaicidad y el tamaño de la celda unitaria. Una vez obtenidos los datasets integrados, se procedió al escalado y unión de las intensidades mediante Scala, de la suite de CCP4. Los criterios para determinar la resolución a la cual serían cortados los datos fueron  $\langle I/(\sigma(I)) \rangle$  mayor a 2.0, y recomendable tener  $CC(1/2)$  mayor a 0.8. Siguiendo estos criterios, la resolución máxima de los datos fue de 1.8 Å en los primeros 3 datasets, a 1.84 Å en los siguientes 3 y el último a 1.85 Å. Para solucionar el problema de las fases se realizó el reemplazo molecular usando la estructura 5A6D determinada previamente. Al realizar el afinamiento de la estructura, nos encontramos con que los valores de  $R_{work}$  y  $R_{free}$  se mantenían fuera de los rangos aceptables. Debido a ello, regresamos a analizar los frames más detenidamente.

Durante esta segunda inspección, notamos que existía un segundo arreglo de átomos, más débil que el que formaba el grupo P3. Para eliminar estos datos de la determinación de la estructura, la mosaicidad se fijó en 0.35. Durante el escalado de los datos se observaba una mayor influencia de este segundo arreglo cristalográfico en los primeros 50 frames de cada dataset, por lo que estos no fueron utilizados para la determinación de la estructura. Finalmente, se obtuvieron 7 estructuras cristalográficas a partir de un mismo cristal de PCNA. Los detalles de dichas estructuras se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Parámetros estadísticos del afinamiento de las 7 estructuras determinadas a partir del mismo cristal:

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b><math>R_{work}</math></b>	0.2051	0.2079	0.2078	0.2099	0.2085	0.2095	0.2064
<b><math>R_{free}</math></b>	0.2476	0.2494	0.2422	0.2433	0.2419	0.2549	0.2441
<b>R.m.s.d. distancia</b>	0.007	0.007	0.008	0.016	0.015	0.008	0.017
<b>R.m.s.d. ángulos</b>	1.06	1.25	1.26	1.94	1.87	1.25	1.83
<b>Factor <math>B</math> promedio</b>	42.61	44.81	47.54	49.49	51.4	47.42	47.85
<b>Ramachandran (%)</b>	<hr/>						
<b>Favorecidos</b>	96.93	95.8	96.39	96.95	95.99	96.36	95.76
<b>Permitidos</b>	2.86	4	2.81	2.44	2.81	3.23	3.23
<b>No permitidos</b>	0.2	0.2	0.8	0.61	1.2	0.4	1.01

Una vez determinadas todas las estructuras, procedimos a revisarlas cuidadosamente y a determinar en qué aminoácidos podían observarse regiones de densidad electrónica anómala. Los aminoácidos más susceptibles son 1) cisteína y metionina, 2) ácido glutámico y aspártico y 3) aminoácidos con grupos amino en la cadena lateral. El parámetro para determinar un aminoácido como anómalo fue que tuviera una desviación mayor a  $3.5 \sigma$  en su nube de densidad electrónica.

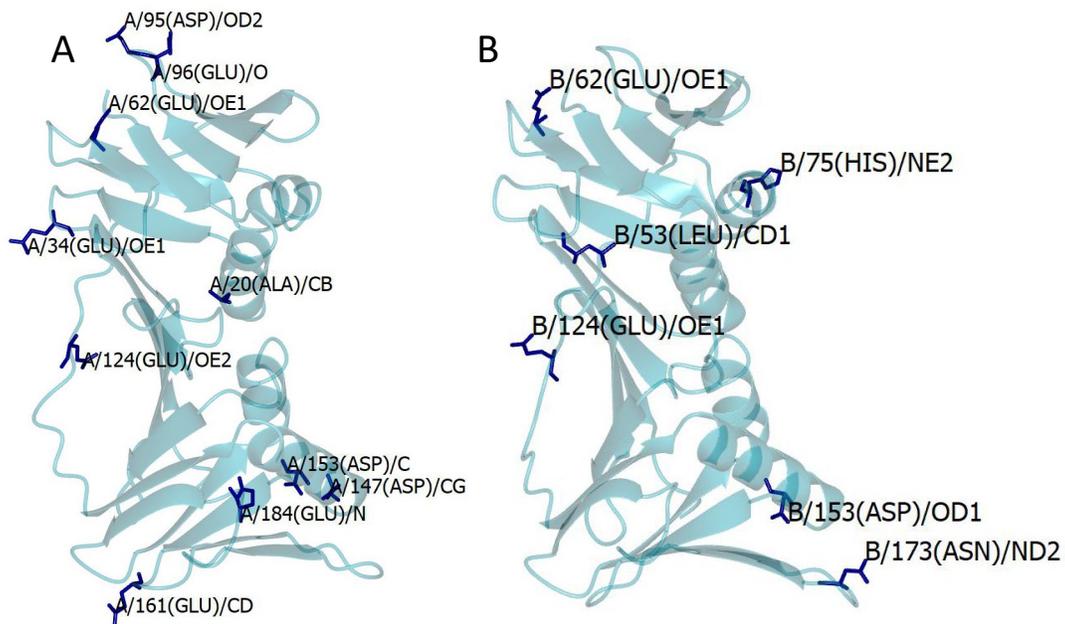
Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Aminoácidos cuya cadena lateral no presenta electrónica clara

Cadena	Posición	Aminoácido con densidad electrónica disminuida.	Estructura en la que se observa la anomalía						
			1	2	3	4	5	6	7
<b>A</b>	1	Metionina							*
	20	Alanina							*
	34	Ácido Glutámico					*		*
	62	Ácido Glutámico						*	
	95	Ácido Aspártico							*
	96	Ácido Glutámico							*
	124	Ácido Glutámico					*		*
	147	Ácido Aspártico							*
	153	Ácido Aspártico							*
	161	Ácido Glutámico						*	
	184	Ácido Glutámico						*	
	<b>B</b>	53	Leucina						
62		Ácido Glutámico						*	
75		Histidina							*
124		Ácido Glutámico						*	
153		Ácido Aspártico					*	*	
173		Asparagina							

Los residuos de aminoácidos (Tabla 10) muestran una disminución en la resolución de la densidad electrónica, y son más abundantes a medida que se deposita una mayor cantidad de radiación. Las estructuras fueron determinadas cortando los datos a la máxima resolución que permitían los datos obtenidos, lo que implica que en aquellas colectas en las que se alcanzó una integridad de datos adecuada y mayor resolución, se obtuvieron estructuras con mayor definición. Estas estructuras a mayor definición presentan una mayor certidumbre en cuanto a la posición de los átomos y la densidad electrónica correspondiente, por lo que pequeños cambios en la densidad electrónica generarán áreas con densidad anómala, mientras que, a menor resolución, se necesitan cambios más grandes en la densidad electrónica para que el mapa muestre zonas fuera de  $3.5 \sigma$ . Para conocer la influencia de la resolución en el daño aparente, se volvió a determinar la estructura de la colecta número 6 pero realizando el corte de los datos a la misma resolución de la alcanzada en la colecta número 7, es decir, se disminuyó la resolución del dataset 6 en  $0.1 \text{ \AA}$ . Al analizar esta nueva estructura el resultado fue que la interpretación de la densidad

electrónica de algunos aminoácidos cambio, ya que en la estructura a 1.84 Å no poseían una densidad completa de la cadena lateral, y algunas se marcan como densidad electrónica roja en el mapa de  $F_oF_c$ , mientras que en la estructura a 1.85 Å estas regiones no superan el umbral de  $2.5 \sigma$ , por lo que no se observan en el mapa  $F_oF_c$ , aunque la densidad electrónica de algunas cadenas laterales es menos definida y se observan regiones más gruesas. Se tomó un umbral más bajo al usual debido a que en el mapa de diferencia a  $3.5 \sigma$  no se observaron disminuciones claras en la densidad electrónica. Este resultado nos indica que parte del daño recibido por el cristal es enmascarado por la pérdida de resolución del mismo, lo cual podría explicar porque en algunos cristales con menor resolución el daño no sea visible y es posible que en otras proteínas analizadas mediante este método se subestime el daño a medida que la resolución del cristal disminuye.



*Figura 28: Aminoácidos del TgPCNA que presentan densidad atómica disminuida después de 7 colectas.*

*Del lado derecho el monómero A, del lado izquierdo, el B. La disminución en la densidad electrónica debe interpretarse como una disminución en la definición del mapa de densidad  $2F_oF_c$ , pero que no supera el límite de  $3.5 \sigma$  dentro del mapa  $F_oF_c$  por lo que no se consideran como dañados, o con ausencia de átomos.*

Los aminoácidos sospechosos coinciden con los reportados previamente como los más sensibles, además de que la mayoría de ellos están orientados hacia el solvente, como se muestra en la Figura 28 (Gerstel, 2015). Entre los aminoácidos más sensibles se encuentran en el grupo de los aminoácidos hidrofílicos, ya que contienen grupos polares que son fácilmente oxidados. Además de estos aminoácidos expuestos al solvente, la alanina 20 de la cadena A y la leucina 53 de la cadena B tienen densidades poco definidas. Para tratar de obtener una razón que justifique el orden en que se dañan los aminoácidos se calculó el pKa de las cadenas laterales con base en la estructura. El pKa de un aminoácido cambia en función del ambiente químico que lo rodea, la exposición al solvente y los aminoácidos vecinos, y aunque el programa utilizado (PROPKA2) no considera todos los parámetros, podría ser más cercano al pKa real de los aminoácidos en la estructura que el pKa nominal (Tabla 11).

Tabla 11: pKa de los residuos de ácido glutámico y aspártico presentes en el PCNA de *Thermococcus gammatolerans*.

Número de residuo de ácido glutámico	Cadena		Número de residuo de ácido aspártico	Cadena	
	A	B		A	B
4	7*	4.33	8	5.43	3.82
12	4.49	4.23	15	4.65	3.13
26	5.21	7.15	25	4.65	8.97*
33	5.17	4.74	42	2.31	5.12
34	4.83	4.62	50	5.38	4.70
55	6.59	4.78	74	3.45	4.58
62	4.47*	4.93	87	2.71	2.76
64	4.71	4.66	95	3.25	3.91
65	4.59	4.52	117	3.94	4.87
67	4.73	4.53	147	4.40	4.48
96	4.45	4.62	153	2.30	4.63
100	4.71	4.45	162	4.07	4.01
104	5.23	4.6	183	3.75	3.17
119	3.92	6.3	188	5.04	3.46
120	4.03	4.75	206	4.72	5.47
122	4.57	4.25	215	5.13	4.19
124	4.46	4.6	230	5.69	5.10
127	4.62	4.65	235	4.77	3.97
139	4.6	4.59			
143	5.28	5.42			
161	4.82	4.86			
163	3.84	3.48			
169	4.55	4.7			
171	4.55	4.56			
174	5.2	4.28			
176	3.47	3.6			
182	4.69	4.6			
184	4.82	4.63			
190	4.33	4.08*			
192	5.58*	5.73*			
193	4.38*	4.71			
194	3.54	3.73			
216	8.15	4.78			
224	4.76	4.67			
236	3.89*	4.74			

Sombreado se muestra el pKa de los aminoácidos con resolución de densidad electrónica disminuida en la cadena lateral.

En el caso de ambos aminoácidos, observamos que el daño se presenta en algunos que presentan un pKa alrededor de 4.5, con excepción de aspártico 95 y 153 de la cadena A. Dado que el pH de la solución en la cual cristalizaron fue de 5.5, la cadena lateral de estos residuos se encuentra desprotonada en una proporción de alrededor del 90%. Sin embargo, si el estado de protonación fuera la única determinante, aquellos residuos de aminoácidos con las cadenas laterales con el pKa más bajo se verían dañadas primero, y esto no se observó.

Como se mencionó anteriormente, esta estructura fue determinada basándonos en la estructura 3LX1, que es el PCNA de *Thermococcus kodakaraensis*. Entre ambas secuencias existe una alta identidad (92.77%), pero al descargar la estructura 3LX1 y observar los mapas de densidad electrónica, notamos que dicha estructura presenta residuos dañados sobre el límite de  $3.5 \sigma$ , a diferencia de la determinada para el PCNA de *Thermococcus gammatolerans*. Es importante destacar que *Thermococcus kodakaraensis* no se ha reportado como un organismo radioresistente. Estos datos no pueden ser tomados directamente como prueba de que la estructura de *Thermococcus gammatolerans* sea más resistente a la radiación, ya que no contamos con varios detalles de la colecta mediante la cual se obtuvieron los datos para determinar la estructura de *Thermococcus kodakaraensis* como son: (1) Longitud de onda usada durante la difracción, aunque si sabemos que usó una fuente de radiación casera que tiene menor energía que un sincrotrón pero requiere un mayor tiempo de exposición, (2) Tiempo de exposición de cada frame tomado, (3) Número de frames tomados, y (4) número de colectas.

A pesar de no contar con esos datos, podemos suponer que la radiación acumulada durante esa colecta es similar a la depositada durante una o dos colectas de nuestro cristal, debido a que los experimentos de difracción que tienen como objetivo determinar la estructura cristalográfica de una proteína colectan el mínimo de frames necesarios para determinarla. Así que, basado en que (1) la longitud de onda es mayor, por lo que la radiación incidente es de menor energía, la radiación depositada en el cristal por cada frame será menor, (2) debido a lo anterior, el tiempo de exposición debe ser mayor, por lo que en este parámetro la estructura recolectada en el ánodo rotatorio tendría una mayor exposición, (3) normalmente sólo se toman los frames necesarios para la determinación de la estructura y esto cambia dependiendo del grupo espacial, pero nosotros tomamos más frames de los necesarios, así que podríamos considerar que la cantidad de frames tomados no varía demasiado entre ambas estructuras, y (4) de forma cotidiana, sólo se colecta un dataset por cristal, mientras que nosotros colectamos 7. Además, en cuanto a aspectos que no están relacionados directamente con la colecta, la estructura 3LX1 tiene una menor resolución que cualquiera de nuestros datasets, por lo que el daño que alcanza a reflejarse en los mapas  $F_oF_c$  debe ser aún mayor para que sea evidente en el mapa. Finalmente, la solución de cristalización es casi idéntica entre ambos cristales, por lo que el coeficiente de absorción de radiación de ambas soluciones debe ser muy similar. El conjunto de todos los aspectos descritos anteriormente, podemos asumir que la dosis recibida en el cristal de *T. kodakaraensis* es similar a la recibida por el de *T. gammatolerans* durante las primeras colectas, lo que nos permite la comparación del daño recibido por ambas estructuras. Por ello, parece que el PCNA de *Thermococcus gammatolerans* tolera una mayor cantidad de radiación que el de

*Thermococcus kodakaraensis*, sin embargo, es necesario hacer estudios bajo las mismas condiciones con este PCNA, y con otros provenientes de otras especies. En otras estructuras de PCNA también se observa daño durante la primera colecta, sin embargo, las soluciones de cristalización son diferentes, por lo que la absorción de radiación puede ser diferente. Las estructuras de las proteínas provenientes de otros organismos fueron alineadas considerando su estructura secundaria para calcular el rmsd. Al compararla con el PCNA de *Saccharomyces cerevisiae* (Código PDB: 1PLQ), el rmsd tiene un valor de 1.380 Å; con el de *Thermococcus kodakaraensis* (Código PDB: 3LX1), el rmsd tiene un valor de 0.884 Å, con el de *Archaeoglobus fulgidus* (Código PDB: 1RWZ), el rmsd tiene un valor de 1.513 Å, con *Pyrococcus abysii* (Código PDB: 6T7X), el rmsd es de 0.801 Å, y finalmente, con *Haloferax volcanii* (Código PDB: 3HI8), el rmsd es de 1.665 Å. El análisis y comparación de las estructuras no parece tener una relación con la radioresistencia de los organismos listados.

## Conclusiones

Es posible que la proteína PCNA de *Thermococcus gammatolerans* presente un cierto grado de resistencia a la radiación. Mediante el análisis del mapa  $F_0F_C$  no observamos cambios en la densidad electrónica por encima de  $3.5 \sigma$ , aún después de 7 colectas sobre el mismo cristal. Asimismo, los datos sugieren que la resolución es un factor importante al evaluar el daño generado por la radiación, ya que cuando la resolución disminuye, el daño puede quedar enmascarado, y por ende, se debe considerar esta posibilidad durante el procesamiento y análisis de los datos en estudios de daño por radiación. Aunque parece que esta resistencia es una propiedad intrínseca de la proteína, el origen de esta resistencia permanece incierto, aunque probablemente permanezca en la secuencia de aminoácidos y su acomodo dentro de la estructura, así como las interacciones que mantienen entre ellos.

## Perspectivas

Este trabajo establece un precedente prometedor para estudiar la radiotolerancia en proteínas mediante estudios cristalográficos, ya que es posible que esta proteína presente propiedades radiotolerantes mayores a otras proteínas de estructura similar.

Para continuar con dichos estudios, se recomienda cristalizar el PCNA de otros organismos bajo condiciones de cristalización similares. Si se logra, entonces disminuiríamos el impacto que tienen las propiedades de la solución en la absorción de radiación por parte del cristal, ya que estas propiedades serán similares entre las soluciones. Una vez que se tengan estos cristales, convendría difractarlos bajo un esquema idéntico de difracción.

Con esos datos, podríamos conocer si realmente el TgPCNA de *Thermococcus gammatolerans* es más tolerante que otros al daño generado por la radiación, y de ser así, posteriormente dilucidar el origen de esta capacidad. Es posible que esta capacidad esté relacionada con la resistencia a la oxidación, uno de los fenómenos que comúnmente afectan a las proteínas.

## Referencias

- Bank, P. D. (1971). Protein data bank. *Nature New Biol*, 233, 223. [rcsb.org](http://rcsb.org)
- Bravo, R., & Celis, J. E. (1980). A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *The Journal of cell biology*, 84(3), 795–802. <https://doi.org/10.1083/jcb.84.3.795>
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P. A., & Macdonald-Bravo, H. (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 326(6112), 515–517. <https://doi.org/10.1038/326515a0>
- Confalonieri, F., Sommer, S. (2011) Bacterial and archaeal resistance to ionizing radiation. *Journal of Physics: Conference Series* 261 012005 doi:10.1088/1742-6596/261/1/012005
- Dionne, I., Nookala, R. K., Jackson, S. P., Doherty, A. J., & Bell, S. D. (2003). A heterotrimeric PCNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Molecular cell*, 11(1), 275–282. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00824-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00824-9)
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4), 486-501.
- Garman, E. (2003). 'Cool' crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage. *Current opinion in structural biology*, 13(5), 545-551.
- Gerstel, M., Deane, C. M., & Garman, E. F. (2015). Identifying and quantifying radiation damage at the atomic level. *Journal of synchrotron radiation*, 22(2), 201-212.
- Jolivet, E., L'Haridon, S., Corre, E., Forterre, P., & Prieur, D. (2003). *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(Pt 3), 847–851. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02503-0>
- Kelman, Z., & O'Donnell, M. (1995). Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps. *Nucleic acids research*, 23(18), 3613–3620. <https://doi.org/10.1093/nar/23.18.3613>
- Kriminski, S., Kazmierczak, M., & Thorne, R. E. (2003). Heat transfer from protein crystals: implications for flash-cooling and X-ray beam heating. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 59(4), 697-708.
- Krishna, T. S., Kong, X. P., Gary, S., Burgers, P. M., & Kuriyan, J. (1994). Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell*, 79(7), 1233-1243.
- Ladner, J. E., Pan, M., Hurwitz, J., Kelman, Z. (2011) Crystal structures of two active proliferating cell nuclear antigens (PCNAs) encoded by *Thermococcus kodakaraensis*. *PNAS* February 15, 2011 108 (7) 2711-2716; <https://doi.org/10.1073/pnas.1019179108>
- Maga, G., & Hubscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of cell science*, 116(Pt 15), 3051–3060. <https://doi.org/10.1242/jcs.00653>

- Merten, J. A., Schultz, K. M., & Klug, C. S. (2012). Concentration-dependent oligomerization and oligomeric arrangement of LptA. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 21(2), 211–218. <https://doi.org/10.1002/pro.2004>
- Miyachi, K., Fritzler, M. J., & Tan, E. M. (1978). Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 121(6), 2228–2234.
- Moldovan, G. L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, 129(4), 665–679. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003>
- Morgunova, E., Gray, F. C., Macneill, S. A., & Ladenstein, R. (2009). Structural insights into the adaptation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from *Haloferax volcanii* to a high-salt environment. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 65(Pt 10), 1081–1088. <https://doi.org/10.1107/S09074444909029321>
- Nicholson, J., Nave, C., Fayz, K., Fell, B., & Garman, E. (2001). Modelling heating effects in cryocooled protein crystals. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 467, 1380-1383.
- Pan, M., Santangelo, T. J., Čuboňová, L., Li, Z., Metangmo, H., Ladner, J., ... & Kelman, Z. (2013). *Thermococcus kodakarensis* has two functional PCNA homologs but only one is required for viability. *Extremophiles*, 17(3), 453-461.
- Ravelli, R. B., Theveneau, P., McSweeney, S., & Caffrey, M. (2002). Unit-cell volume change as a metric of radiation damage in crystals of macromolecules. *Journal of synchrotron radiation*, 9(6), 355-360.
- Roberts, J. A., Bell, S. D., & White, M. F. (2003). An archaeal XPF repair endonuclease dependent on a heterotrimeric PCNA. *Molecular microbiology*, 48(2), 361–371. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03444.x>
- Sander, C., & Schneider, R. (1991). Database of homology - derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 9(1), 56-68.
- Sliz, P., Harrison, S. C., & Rosenbaum, G. (2003). How does radiation damage in protein crystals depend on X-ray dose?. *Structure*, 11(1), 13–19.
- Southworth-Davies, R. J., Medina, M. A., Carmichael, I., & Garman, E. F. (2007). Observation of decreased radiation damage at higher dose rates in room temperature protein crystallography. *Structure*, 15(12), 1531-1541.
- Tan, C. K., Castillo, C., So, A. G., & Downey, K. M. (1986). An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. *The Journal of biological chemistry*, 261(26), 12310–12316.
- Williams, G. J., Johnson, K., Rudolf, J., McMahon, S. A., Carter, L., Oke, M., Liu, H., Taylor, G. L., White, M. F., & Naismith, J. H. (2006). Structure of the heterotrimeric PCNA from *Sulfolobus solfataricus*. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 62(Pt 10), 944–948. <https://doi.org/10.1107/S1744309106034075>