



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE EN LA
PROTEÍNA PCNA DE *Thermococcus gammatolerans* MEDIANTE
CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Doctor en Ciencias

PRESENTA

YERLI MARÍN TOVAR

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Rudiño Piñera

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dra. Lilian González Segura

[Facultad de Química, UNAM](#)

Ciudad de México

Diciembre de 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE EN LA
PROTEÍNA PCNA DE *Thermococcus gammatolerans* MEDIANTE
CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Bioquímicas

Presenta

YERLI MARÍN TOVAR

Tutor Principal

Dr. Enrique Rudiño Piñera

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos

Instituto de Biotecnología, UNAM

Integrantes del Comité Tutoral

Dr. Víctor Bustamante

Departamento de Microbiología Molecular

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. Lilian González

Departamento de Bioquímica

Facultad de Química, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO

Diciembre de 2023

Este trabajo contó con el apoyo de una beca otorgada por el CONAHCyT (414101/289069), y se realizó bajo la dirección del Dr. Enrique Rudiño Piñera, en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo está dedicado a mi amada esposa Angie, a mis queridos padres Inés y Jaime, y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

A mi amada esposa Angie, la fuerza fundamental tras este trabajo.

Al Dr. Enrique Rudiño Piñera, líder del Laboratorio de Bioquímica Estructural.

A la Biol. Sonia Rojas, Técnica del Laboratorio de Bioquímica Estructural, ya jubilada.

Al Laboratorio de Bioquímica Estructural del Instituto de Biotecnología (IBt).

A los integrantes del Comité Tutoral: Dr. Víctor Bustamante y Dra. Lilian González.

A los integrantes del Jurado de Examen: Dr. Agustín López Munguía, Dra. Adela Rodríguez, Dra. Liliana Pardo, Dr. José Federico del Río y Dr. Carlos Daniel Amero.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), México.

A los científicos que me brindaron su valiosa instrucción en *Stanford Synchrotron Radiation Lightsource* (SSRL) y *Advanced Photon Source* (APS), USA, así como también en la Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina.

A la Dra. Silvia Russi, científica del SSRL.

A Karla, Israel y Alina muy especialmente.

A Hugo, Sara, Luzma, Miguel, Gabi y Jorge.

Finalmente, agradezco a las infinitas y extrañas casualidades de un universo en caos.

LISTA DE SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

Amp	Ampicillin Ampicilina
AU	Asymmetric unit Unidad asimétrica
BL	Beamline Línea de haz
CaPTURE	Cation- π trends using realistic electrostatics Tendencias catión- π usando electrostática realista
CCP4	Collaborative Computational Project No. 4 Proyecto computacional colaborativo No. 4
CCP4mg	CCP4 molecular-graphics Gráficos moleculares de CCP4
Coot	Crystallographic object-oriented toolkit Juego de herramientas orientado a objetos cristalográficos
CspA	Cold shock protein A Proteína de choque frío A
DNA	Deoxyribonucleic acid Ácido desoxirribonucleico
DSB	Double-strand breaks Rupturas de doble cadena
DWD	Diffraction weighted dose Dosis ponderada por difracción
ExPASy	Expert protein analysis system Sistema experto de análisis de proteínas
FWHM	Full width at half maximum Anchura a media altura
ID	Insertion device Dispositivo de inserción

IDCL	Interdomain connector loop Lazo conector interdominio
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Lysogeny broth Caldo de lisogenia
MPD	2-Methyl-2,4-pentanediol 2-Metil-2,4-pentanodiol
MWCO	Molecular weight cut-off Corte de peso molecular
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen Antígeno nuclear de células en proliferación
PCNA _{Tg}	PCNA from <i>Thermococcus gammatolerans</i> PCNA de <i>Thermococcus gammatolerans</i>
PCR	Polymerase chain reaction Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank Banco de datos de proteínas
Phenix	Python-based hierarchical environment for integrated xtallography Entorno jerárquico basado en Python para cristalografía integrada
PISA	Protein interfaces, surfaces and assemblies Interfaces, superficies y ensambles de proteínas
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RADDOSE-3D	Radiation dose 3D Dosis de radiación 3D
RCSB PDB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB Colaboratorio de investigación para bioinformática estructural PDB
RIDL	Radiation-induced density loss Pérdida de densidad inducida por radiación

RMSD	Root-mean-square deviation Raíz de la desviación cuadrática media
ROS	Reactive oxygen species Especies reactivas de oxígeno
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SSB	Single-strand breaks Rupturas de simple cadena
SSRL	Stanford Synchrotron Radiation Lightsource Fuente de luz de radiación sincrotrón de Stanford
TEE	Translation enhancing element Elemento de mejora de la traducción
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane Tris(hidroximetil)aminometano
UCSF Chimera	University of California, San Francisco Chimera Universidad de California, San Francisco Chimera
UniProt	Universal protein resource Recurso universal de proteínas
VMD	Visual molecular dynamics Dinámica molecular visual
XDS	X-ray detector software Software detector de rayos X

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Arquitectura de las abrazaderas deslizantes del DNA	4
Figura 2.	Estrategia de producción de la proteína PCNA _{Tg}	9
Figura 3.	Estrategia de colecta de datos de difracción de rayos X	11
Figura 4.	Determinación estructural y análisis del daño por radiación	12
Figura 5.	La proteína PCNA es esencial para la viabilidad celular	15
Figura 6.	Producción de la proteína PCNA _{Tg}	16
Figura 7.	Cristales de la proteína PCNA _{Tg}	17
Figura 8.	Estructura de la proteína PCNA _{Tg}	18
Figura 9.	Parámetros físicos de los <i>datasets</i> colectados de los cristales PCNA _{Tg}	23
Figura 10.	Decaimiento del poder de difracción de los cristales PCNA _{Tg}	25
Figura 11.	Distribución general de pérdida de densidad electrónica en los cristales PCNA _{Tg}	26
Figura 12.	Pérdida de densidad electrónica en los cristales PCNA _{Tg}	27
Figura 13.	Daño específico localizado en los cristales PCNA _{Tg}	28
Figura 14.	Daño específico en Asp-147 y Asp-87	29
Figura 15.	Interfaces de los trímeros PCNA _{Tg}	30
Figura 16.	Secuencia, estructura y composición de aminoácidos de PCNA	33
Figura 17.	Composición de aminoácidos de PCNA	35
Figura 18.	Proporción de residuos con carga negativa en PCNA	37
Figura 19.	Interacciones moleculares y carga neta de PCNA	38

Figura 20.	Estructura de la proteína PCNA _{Tg} con residuos cargados	40
Figura 21.	Composición de aminoácidos de PCNA de arqueas radiorresistentes	41
Figura 22.	Mapa del cromosoma de <i>Thermococcus gammatolerans</i>	42
Figura 23.	Reacciones típicas de la radiólisis del agua	43
Figura 24.	Mecanismo de ruptura de cadena de un <i>scavenger</i>	44
Figura 25.	Entalpía estándar de formación de los aminoácidos	45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación general de los cristales	19
Tabla 2.	Interacciones moleculares en proteínas	19
Tabla 3.	Estadísticas cristalográficas de las estructuras obtenidas del cristal PCNA _{Tg} I	20
Tabla 4.	Estadísticas cristalográficas de las estructuras obtenidas del cristal PCNA _{Tg} II	21
Tabla 5.	Estadísticas cristalográficas de las estructuras obtenidas del cristal PCNA _{Tg} III	22
Tabla 6.	Características de las proteínas PCNA contempladas en el análisis bioinformático	32
Tabla 7.	Identidad de secuencias de las proteínas PCNA contempladas en el análisis bioinformático	34
Tabla 8.	RMSD entre estructuras de las proteínas PCNA contempladas en el análisis bioinformático	34

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Tiempo de exposición y dosis de radiación acumulada por los cristales PCNA _{Tg}	52
Anexo 2.	Poder de difracción de los cristales PCNA _{Tg}	53
Anexo 3.	Parámetros físicos de los <i>datasets</i> colectados del cristal PCNA _{Tg} I	54
Anexo 4.	Parámetros físicos de los <i>datasets</i> colectados del cristal PCNA _{Tg} II	55
Anexo 5.	Parámetros físicos de los <i>datasets</i> colectados del cristal PCNA _{Tg} III	56
Anexo 6.	Caracterización estadística de la distribución general de pérdida de densidad electrónica en los cristales PCNA _{Tg}	57
Anexo 7.	Átomos con mayor pérdida de densidad electrónica en el cristal PCNA _{Tg} I	58
Anexo 8.	Átomos con mayor pérdida de densidad electrónica en el cristal PCNA _{Tg} II	59
Anexo 9.	Átomos con mayor pérdida de densidad electrónica en el cristal PCNA _{Tg} III	60
Anexo 10.	Pérdida de densidad electrónica de los átomos con mayor daño en los cristales PCNA _{Tg}	61
Anexo 11.	Interacciones iónicas en el trímero PCNA _{Tg} I	62
Anexo 12.	Interacciones iónicas en el trímero PCNA _{Tg} II	63
Anexo 13.	Interacciones iónicas en el trímero PCNA _{Tg} III	64
Anexo 14.	Artículo publicado en la revista <i>Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics</i> .	65

CONTENIDO

	ABSTRACT	1
	RESUMEN	2
1.	INTRODUCCIÓN	3
2.	HIPÓTESIS	7
3.	OBJETIVOS	7
3.1.	Objetivo General	7
3.2.	Objetivos Específicos	7
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1.	Generación de la Cepa Bacteriana	8
4.2.	Producción de la Proteína PCNA _{Tg}	8
4.3.	Purificación de la Proteína PCNA _{Tg}	9
4.4.	Cristalización de la Proteína PCNA _{Tg}	10
4.5.	Colecta de Datos de Difracción de Rayos X	10
4.6.	Determinación de Estructuras	11
4.7.	Análisis del Daño por Radiación	13
4.8.	Análisis Bioinformático	13
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
5.1.	Proteína PCNA _{Tg}	16
5.2.	Análisis Cristalográfico	19
5.3.	Análisis Bioinformático	31
5.4.	Arqueas Radiorresistentes	40
5.5.	Matriz Cristalina	43
5.6.	Alcance Biológico	44
6.	CONCLUSIÓN	46
7.	PERSPECTIVA	46
	REFERENCIAS	47
	ANEXOS	52

“No hay nada que los seres vivos hagan que no se pueda entender desde el punto de vista de que están hechos de átomos que actúan de acuerdo con las leyes de la física.”

Richard Feynman

ABSTRACT

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is an essential protein for cell viability in archaea and eukarya, since it is involved in DNA replication and repair processes. In order to obtain insights regarding the molecular characteristics that confer radioresistance, the structural study of the PCNA from *Thermococcus gammatolerans* (PCNA_{Tg}) in a gradient of ionizing radiation by X-ray crystallography was carried out, together with a bioinformatic analysis of homotrimeric PCNA structures, their sequences, and their molecular interactions. The results obtained from the datasets and the accumulated radiation dose for the last data collection from three crystals revealed moderate and localized damage, since even with the loss of resolution, the electron density map corresponding to the last data collection allowed to build the whole protein structure. Attempting to understand this behavior, multiple sequence alignments, and structural superpositions were performed, revealing that PCNA is a protein with a poorly conserved sequence, but with a highly conserved structure. The PCNA_{Tg} presented the highest percentage of charged residues, mostly negatively charged, with a proportion of glutamate more than double aspartate, a very high negative net charge, lack of cysteines and tryptophan, besides a high number of salt bridges in the trimer (intra and intermolecular). The structural study by X-ray crystallography reveals that the PCNA_{Tg} has the intrinsic ability to resist high levels of ionizing radiation, and the bioinformatic analysis suggests that molecular evolution selected a particular composition of amino acid residues, and their consequent network of synergistic interactions for extreme conditions, as a collateral effect, conferring radioresistance to a protein involved in the chromosomal DNA metabolism of a radioresistant microorganism.

Keywords: PCNA, DNA sliding clamp, *Thermococcus gammatolerans*, radioresistance, radiation damage, ionizing radiation, amino acid composition.

RESUMEN

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es una proteína esencial para la viabilidad celular en arqueas y eucariontes, dado que se encuentra implicada en los procesos de replicación y reparación del DNA. A fin de obtener indicios de las características moleculares que confieren radiorresistencia, se llevó a cabo el estudio estructural de la PCNA de *Thermococcus gammatolerans* (PCNA_{Tg}) en un gradiente de radiación ionizante mediante cristalografía de rayos X, junto con un análisis bioinformático de estructuras PCNA homotriméricas, sus secuencias y sus interacciones moleculares. Los resultados obtenidos de los *datasets* y la dosis de radiación acumulada para la última colecta de datos de tres cristales revelaron un daño moderado y localizado, dado que aún con la pérdida de resolución, el mapa de densidad electrónica correspondiente a la última colecta de datos permitió construir toda la estructura de la proteína. Intentando entender este comportamiento, se realizaron alineamientos múltiples de secuencias y superposiciones estructurales, lo cual reveló que PCNA es una proteína con secuencia poco conservada, pero con estructura altamente conservada. La PCNA_{Tg} presentó el mayor porcentaje de residuos cargados, mayoritariamente residuos con carga negativa, con una proporción de glutamato más del doble que aspartato, una carga neta negativa muy alta, carencia de cisteínas y triptófanos, además de un alto número de puentes salinos en el trímero (intra e intermoleculares). El estudio estructural mediante cristalografía de rayos X revela que la PCNA_{Tg} tiene la capacidad intrínseca de resistir altos niveles de radiación ionizante, y el análisis bioinformático sugiere que la evolución molecular seleccionó una particular composición de residuos aminoácidos, y su consecuente red de interacciones sinérgicas para condiciones extremas, como un efecto colateral, confiriendo radiorresistencia a una proteína involucrada en el metabolismo del DNA cromosomal de un microorganismo radiorresistente.

Palabras clave: PCNA, abrazadera deslizante del DNA, *Thermococcus gammatolerans*, radiorresistencia, daño por radiación, radiación ionizante, composición de aminoácidos.

1. INTRODUCCIÓN

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es una proteína esencial para la viabilidad celular,^{1,2,3,4} dado que se encuentra implicada en procesos fundamentales tales como la replicación y reparación del DNA.^{5,6,7} Pertenece a la familia denominada abrazaderas deslizantes del DNA, también conocidas como factores de procesividad, proteínas que se encuentran en los tres dominios de la vida e incluso en algunos virus, cuyo nombre se debe a su capacidad para ensamblar un complejo en forma de anillo en torno al dúplex DNA,^{8,9,10} el cual constituye una plataforma móvil para el ensamble e interacción de proteínas involucradas en el metabolismo genómico.^{11,12,13}

Las abrazaderas deslizantes del DNA presentan una arquitectura general conservada en los tres dominios de la vida (Fig. 1), cuyas subunidades constituyentes (protómeros) se encuentran unidas cabeza - cola mediante puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas.^{8,9,10} Cada protómero se compone de dominios con topología similar enlazados por un flexible lazo conector interdominio (IDCL), el cual es además un puerto para la interacción con otras proteínas.^{8,9,10} Los protómeros ensamblan un anillo con simetría pseudo-hexamérica (seis dominios), el cual tiene un canal central de diámetro ~35 Å delimitado por hélices α y una periferia definida por láminas β .^{4,5,7} El ensamble molecular constituye una estructura toroidal que presenta una superficie interna con cargas mayoritariamente positivas para la interacción con las cadenas de grupos fosfato del DNA, lo cual le permite desplazarse bidireccionalmente a lo largo del dúplex DNA, y una superficie externa con cargas negativas que se ha propuesto son esenciales para impedir interacciones inespecíficas con el DNA.^{11,12,13}

Las abrazaderas deslizantes del DNA en las bacterias son complejos proteicos de dos subunidades idénticas (~42 kDa), cada una con tres dominios enlazados por dos IDCL, subunidades que ensamblan un anillo homodimérico denominado abrazadera β (~84 kDa).^{8,9,10} Las abrazaderas deslizantes del DNA en todos los eucariontes y la mayoría de las arqueas se encuentran constituidas por tres subunidades idénticas (~28 kDa), cada una con dos dominios enlazados por un IDCL, subunidades que ensamblan un anillo homotrimérico denominado PCNA (~84 kDa),^{4,5,7} aunque es conocido que ciertas especies de arqueas presentan un complejo en el que tres subunidades distintas se asocian formando un anillo heterotrimérico.^{1,2}

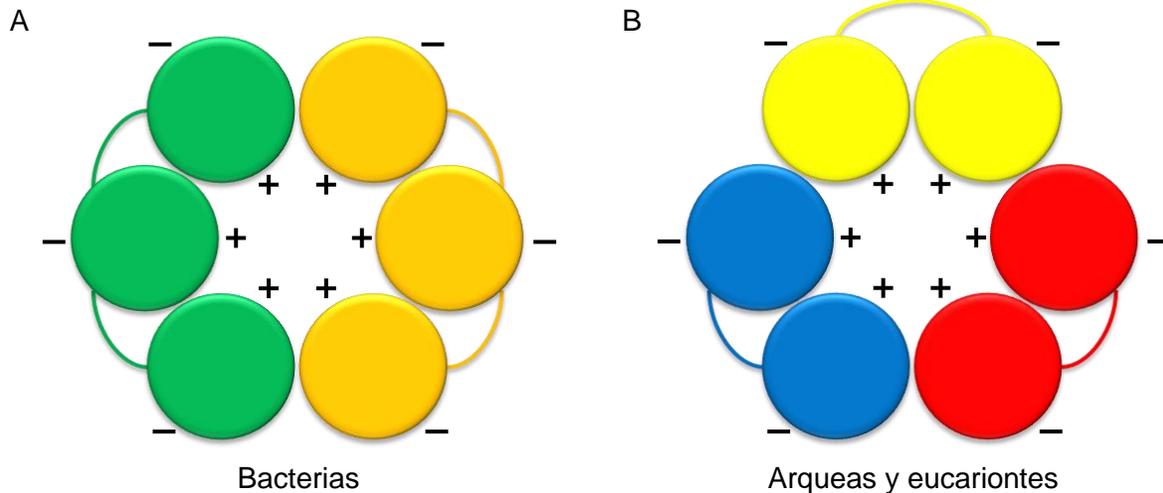


Figura 1. Arquitectura de las abrazaderas deslizantes del DNA. Las abrazaderas deslizantes del DNA son complejos proteicos que presentan una arquitectura general conservada en los tres dominios de la vida, cuyas subunidades constituyentes ensamblan un anillo con simetría pseudo-hexamérica, el cual tiene una superficie interna con cargas mayoritariamente positivas rodeando un canal central, y una superficie externa con cargas negativas. El complejo proteico en las bacterias se compone de dos subunidades idénticas, cada una con tres dominios enlazados por dos IDCL, las cuales ensamblan un anillo homodimérico denominado abrazadera β (A), mientras que en todos los eucariontes y la mayoría de las arqueas se compone de tres subunidades idénticas, cada una con dos dominios enlazados por un IDCL, las cuales ensamblan un anillo homotrimérico denominado PCNA (B).

Thermococcus gammatolerans es un microorganismo hipertermófilo, el organismo más radorresistente conocido hasta la fecha, ya que logra soportar niveles de radiación γ de hasta 30 kGy,^{14,15} una condición letal para casi todos los seres vivos. Aunque se desconocen los mecanismos moleculares que le permiten soportar altos niveles de radiación ionizante, se ha propuesto que su sorprendente radorresistencia probablemente se debe a las características de proteínas individuales, en lugar de un mayor arsenal de sistemas de reparación del DNA.¹⁶

El estudio estructural de proteínas involucradas en el metabolismo genómico resulta así particularmente relevante, dado que la replicación y reparación del DNA son procesos fundamentales para la supervivencia.^{17,18,19} Además, todas las proteínas disponen esencialmente del mismo repertorio de aminoácidos e interacciones para generar una estructura molecular que les permita realizar su función en condiciones extremas.²⁰ Dentro de este contexto, parece razonable considerar que si *T. gammatolerans* soporta altos niveles de radiación ionizante, entonces una proteína esencial para la viabilidad celular tal como PCNA es un buen modelo para obtener indicios de las características moleculares que le permiten a este microorganismo prosperar a altas temperaturas y soportar niveles de radiación letales.

Los mecanismos moleculares que aseguran la integridad y estabilidad del DNA en condiciones extremas plantean preguntas interesantes sobre la vida en la Tierra,^{21,22,23,24} y además tienen potenciales aplicaciones.^{3,6,25} La radiorresistencia es una capacidad que suscita particular interés, ya que la radiación ionizante daña la estructura de la materia y es letal para la vida.²⁶ Los niveles de radiación en la naturaleza tienden a ser relativamente muy bajos (~1 mGy), incluso en los lugares con mayor radiactividad natural de la Tierra debido a la presencia de isótopos radiactivos (~100 mGy),²⁷ tales como las chimeneas hidrotermales submarinas.¹⁴ De hecho, los niveles de radiación que toleran los organismos radiorresistentes no solo exceden los niveles letales para la mayoría de seres vivos y la dosis suministrada en ciertos procedimientos médicos (~1 Gy),²⁸ sino que además se encuentran por encima de la dosis asociada a conocidos accidentes nucleares (~5 Gy) e incluso superan la dosis generada por el efecto de las bombas atómicas (~10 Gy).²⁹

La radiación ionizante puede liberar electrones de los átomos con los cuales interactúa, causando radiólisis y formación de radicales con la consecuente cascada de reacciones que generan daño severo a nivel molecular.^{30,31} Los rayos X y los rayos γ son ejemplos típicos de radiación ionizante de muy alta energía. Dentro de este contexto, la cristalografía de rayos X es la técnica mediante la cual se ha determinado la estructura molecular de la mayoría de macromoléculas biológicas. Sin embargo, se trata de una técnica destructiva que aún a temperaturas criogénicas (100 K) puede dañar la estructura de la materia.^{30,31} La interacción primaria de los rayos X con un cristal involucra tres procesos fundamentales: dispersión elástica (efecto Thomson), dispersión inelástica (efecto Compton) y efecto fotoeléctrico.^{30,31,32}

Durante la interacción de los rayos X con un cristal de proteína (12.4 keV), solo una pequeña proporción de la radiación aplicada interactúa con el cristal (~2%), de la cual una fracción menor corresponde a la dispersión elástica que genera el patrón de difracción (0.15%), mientras que la dispersión inelástica (0.15%) y en mayor proporción el efecto fotoeléctrico (1.70%) contribuyen a la dosis de radiación absorbida.^{30,31,33} Hacia 1990 se calculó un valor denominado el límite de Henderson (20 MGy), definido como la dosis de radiación que puede absorber un cristal de proteína crioenfriado antes de que el patrón de difracción decaiga a la mitad de su intensidad original.³⁴ Esta dosis calculada se sometió a evaluación experimental en 2006, y tras un análisis se determinó un valor conocido como el límite de Garman (30 MGy), el cual se propuso como una dosis límite apropiada para los experimentos de difracción de

rayos X llevados a cabo con cristales de macromoléculas.³⁵ No obstante, se debe considerar que la dosis de radiación absorbida puede comprometer la integridad de la información biológica, y que incluso un cristal de proteína puede ser destruido por la radiación antes de que se alcance esta dosis límite.^{30,31}

La dosis de radiación absorbida por un cristal de proteína causa dos tipos de daño: daño global (físico) y daño específico (químico).^{30,31} El daño global se manifiesta principalmente a través del decaimiento de la cantidad e intensidad de las reflexiones en el patrón de difracción, aumento de la mosaicidad, expansión del volumen de celda con el consecuente incremento del contenido de solvente y en última instancia pérdida de resolución.^{30,31} El daño específico causado a la estructura molecular de una proteína sigue una secuencia de eventos característica que comienza con la reducción de centros metálicos y la ruptura de puentes disulfuro, seguidos de la descarboxilación de residuos aspartato, glutamato y C-terminal, para continuar con el daño del grupo tiometilo (SCH₃) en metioninas y la cuestionada pérdida del grupo hidroxilo (OH) en tirosinas.^{33,36,37,38}

La cristalografía de rayos X es entonces la principal técnica para determinar la estructura 3D de macromoléculas biológicas, así como también constituye simultáneamente una causa de daño por radiación y una herramienta para estudiar el efecto de la radiación ionizante.^{33,37} El estudio de la PCNA de *T. gammatolerans* (PCNA_{Tg}) mediante cristalografía de rayos X presentado en este trabajo se encuentra dirigido a analizar sistemáticamente el efecto de muy altos niveles de radiación ionizante (>20 MGy) en la estructura molecular de una proteína esencial para la vida, buscando identificar las características que le podrían permitir a este microorganismo soportar condiciones letales para casi todos los seres vivos.

2. HIPÓTESIS

La proteína PCNA de *Thermococcus gammatolerans* (PCNA_{Tg}) tiene la capacidad intrínseca de resistir niveles de radiación ionizante superiores al límite de Garman (30 MGy).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Estudiar la estructura molecular de la proteína PCNA_{Tg} en un gradiente de radiación ionizante mediante cristalografía de rayos X.

3.2. Objetivos Específicos

- Producir la proteína PCNA_{Tg} mediante expresión heteróloga en *Escherichia coli* y llevar a cabo su proceso de purificación.
- Realizar pruebas de cristalización de la proteína PCNA_{Tg} que permitan obtener cristales de tamaño y nivel de resolución adecuado para su estudio estructural.
- Someter los cristales de proteína PCNA_{Tg} a difracción de rayos X en colectas sucesivas cubriendo un amplio rango de niveles de radiación ionizante.
- Determinar la estructura molecular de la proteína PCNA_{Tg}, así como también los parámetros físicos de los cristales a diferentes tasas y dosis de radiación.
- Analizar de manera sistemática el efecto de los diferentes niveles de radiación ionizante en la proteína PCNA_{Tg}, buscando identificar cambios específicos en su estructura molecular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Generación de la Cepa Bacteriana

El gen que codifica la proteína PCNA_{Tg} se amplificó por PCR directamente del DNA cromosomal del microorganismo mediante *primers* que contienen los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*, como previamente reportado.³⁹ Brevemente, se realizó la digestión y purificación del producto PCR, tras lo cual se sometió a la reacción de ligación con el vector de expresión pCold-ITM (Takara Bio) linealizado y purificado, para luego transformar bacterias competentes *E. coli* DH5 α TM con el producto de reacción. Se seleccionaron colonias bacterianas a fin de purificar y confirmar el perfil de restricción del plásmido designado pCold-I-PCNA_{Tg}, el cual confiere resistencia a ampicilina (Amp) y contiene el gen que codifica la PCNA_{Tg} fusionado a una etiqueta de histidinas (His₆-tag) en el extremo N-terminal. Finalmente, se transformaron bacterias competentes *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pCold-I-PCNA_{Tg} para la expresión heteróloga de la proteína recombinante, obteniéndose de esta manera la cepa bacteriana denominada *E. coli* BL21(DE3)/pCold-I-PCNA_{Tg}.

4.2. Producción de la Proteína PCNA_{Tg}

El crecimiento de la cepa *E. coli* BL21(DE3)/pCold-I-PCNA_{Tg} se siguió realizando mediciones de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm (A_{600}) en función del tiempo empleando un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific), y la producción de la proteína PCNA_{Tg} se llevó a cabo a través de una metodología que comprende tres etapas secuenciales: estriado, inóculo y cultivo (Fig. 2). El estriado de la cepa se realizó en una caja Petri con 25 mL medio LB-agar / 200 μ g/mL Amp, para después incubar a 37 °C durante 12 h. El inóculo se hizo poniendo una colonia aislada en un matraz de 250 mL con 50 mL medio LB / 100 μ g/mL Amp, para enseguida incubar a 37 °C / 200 rpm hasta alcanzar un valor A_{600} en la fase exponencial de crecimiento (~12 h). El cultivo se llevó a cabo en un matraz de 2.8 L con 1 L medio LB / 100 μ g/mL Amp, adicionando un volumen de inóculo suficiente para iniciar con un valor $A_{600} = 0.1$, para luego incubar a 37 °C / 200 rpm hasta alcanzar un valor $A_{600} = 0.5$, tras lo cual se indujo la expresión de la proteína agregando IPTG 0.1 mM e incubando inmediatamente a 15 °C / 200 rpm durante 12 h. Finalmente, el cultivo bacteriano se cosechó centrifugando a 7000 rpm / 4 °C en ciclos de 10 min y se almacenó a -20 °C.

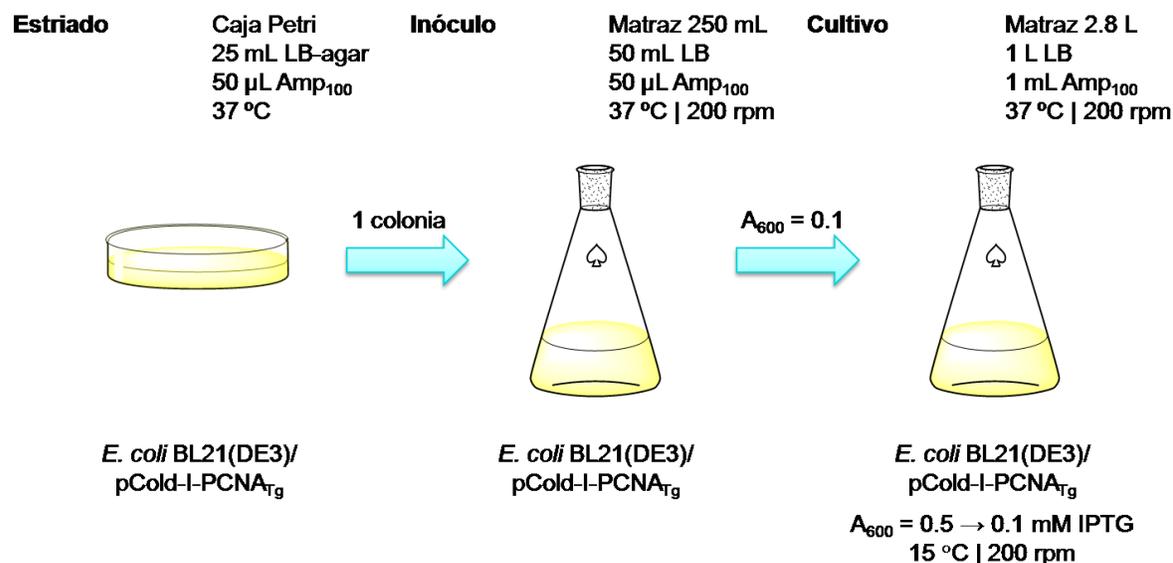


Figura 2. Estrategia de producción de la proteína PCNA_{Tg}. La producción de la proteína recombinante PCNA_{Tg} se llevó cabo mediante expresión heteróloga empleando la cepa bacteriana *E. coli* BL21(DE3)/pCold-I-PCNA_{Tg} en una metodología de tres etapas secuenciales: estriado, inóculo y cultivo.

4.3. Purificación de la Proteína PCNA_{Tg}

El cultivo bacteriano se resuspendió en 25 mL *buffer* A (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 400 mM) y se incubó con lisozima 1 mg/mL en agitación lenta a T_{amb} durante 30 min, tras lo cual las bacterias se lisaron mediante sonicación en baño frío con pulsos de 1 min a una amplitud 35% durante 10 min (Ultrasonic Processor, Cole Palmer), agregando inmediatamente antes de sonicar PMSF 1 mM. El lisado bacteriano se centrifugó a 10000 rpm / 4 °C durante 30 min y se procedió a la filtración del sobrenadante con filtro de poro 0.22 μ m, obteniéndose un extracto que se sometió a la primera etapa de purificación por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ en un equipo ÄKTA™ pure (GE Healthcare), empleando una columna HisTrap™ HP 5 mL (Amersham Biosciences) equilibrada previamente con *buffer* A, lavando con *buffer* A y eluyendo con un gradiente escalonado de imidazol 10–100% en *buffer* B (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 400 mM, imidazol 500 mM). La presencia de la PCNA_{Tg} en las fracciones correspondientes al mayor pico de absorbancia A_{280} se confirmó mediante SDS-PAGE 12.5% y se concentró por ultrafiltración a 4500 rpm / 4 °C en ciclos de 30 min usando tubos Amicon® Ultra 10000 MWCO (Merck Millipore), obteniéndose una solución de proteína concentrada (12 mg/mL) que se sometió a la segunda etapa de purificación por cromatografía

de exclusión molecular en un equipo ÄKTA™ prime (GE Healthcare), empleando una columna HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 pg (Amersham Biosciences) equilibrada previamente con *buffer* A. De nuevo, la presencia de la PCNA_{Tg} en las fracciones correspondientes al mayor pico de absorbancia A₂₈₀ se confirmó mediante SDS-PAGE 12.5% y se concentró por ultrafiltración a 4500 rpm / 4 °C en ciclos de 30 min usando tubos Amicon® Ultra 10000 MWCO (Merck Millipore), obteniéndose una solución de proteína concentrada (12 mg/mL) para subsecuentemente realizar pruebas de cristalización.

4.4. Cristalización de la Proteína PCNA_{Tg}

La proteína PCNA_{Tg} en *buffer* A se sometió a pruebas de cristalización a una temperatura de 18 °C bajo condiciones similares a previamente reportadas,⁴⁰ empleando el método de *microbatch* en placas de 72 pozos (Hampton Research) y el método de difusión de vapor (técnicas gota sentada y gota colgante) en placas de 24 pozos (Hampton Research), con dos concentraciones de proteína (10, 12 mg/mL) y condiciones de agente cristalizante en el que varía la concentración de (NH₄)₂SO₄ (citrato de sodio 100 mM pH 5.2, (NH₄)₂SO₄ 1.8–3.2 M, MPD 7.5%), colocando por pozo 1 µL solución de proteína y 1 µL agente cristalizante, recubriendo con 10 µL aceite de parafina (*microbatch*) o de entrada depositando en los reservorios 500 µL agente cristalizante (difusión de vapor). Se seleccionaron cristales de proteína PCNA_{Tg} con morfología regular (16) y se remojaron en una solución criopreservadora que contiene la concentración de (NH₄)₂SO₄ correspondiente (Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, citrato de sodio 50 mM pH 5.2, MPD 3.75%, glicerol 30%), tras lo cual se montaron en *crioloops*, se crioenfriaron inmediatamente en N₂ líquido y se almacenaron en un vaso Dewar para luego llevar a difractar en una línea de radiación sincrotrón de tercera generación del SSRL (*Stanford Synchrotron Radiation Lightsource*), Menlo Park, California, USA.

4.5. Colecta de Datos de Difracción de Rayos X

Los cristales de proteína PCNA_{Tg} se expusieron a rayos X en la línea BL12-2 del SSRL, la cual es una línea tipo ID equipada con un detector Dectris Pilatus 6M y un goniómetro horizontal, empleando un haz gaussiano de tamaño 50x15 µm (FWHM 15 50), flujo 1.7x10¹² p/s con transmisión 10% (1.7x10¹¹ p/s), colimación rectangular 400x400 µm, temperatura 100

K, distancia cristal - detector 350 mm y una energía $E = 12.7$ keV correspondiente a una longitud de onda $\lambda = 0.98$ Å (Fig. 3). Se colectó para cada cristal una serie de *datasets* en la misma zona cubriendo un ángulo de rotación $\varphi = 180^\circ$ escaneado con una oscilación $\Delta\varphi = 0.5^\circ$, lo cual corresponde a 360 *frames/dataset* obtenidos mediante un diseño experimental de colectas sucesivas planteado para evaluar el efecto de la dosis de radiación acumulada, manteniendo constantes todos los parámetros y variando únicamente el tiempo de exposición por *frame* (s/fr) de un *dataset* dado. El cristal I se sometió a 5 rondas alternadas de colecta (C1–C5) y quemado (B1–B5) a 1 y 3 s/fr respectivamente (10 *datasets*), para el cristal II se realizaron 20 colectas (C1–C20) a 1 s/fr (20 *datasets*) y con el cristal III se hicieron 15 colectas (C1–C15) a 1 s/fr (15 *datasets*).

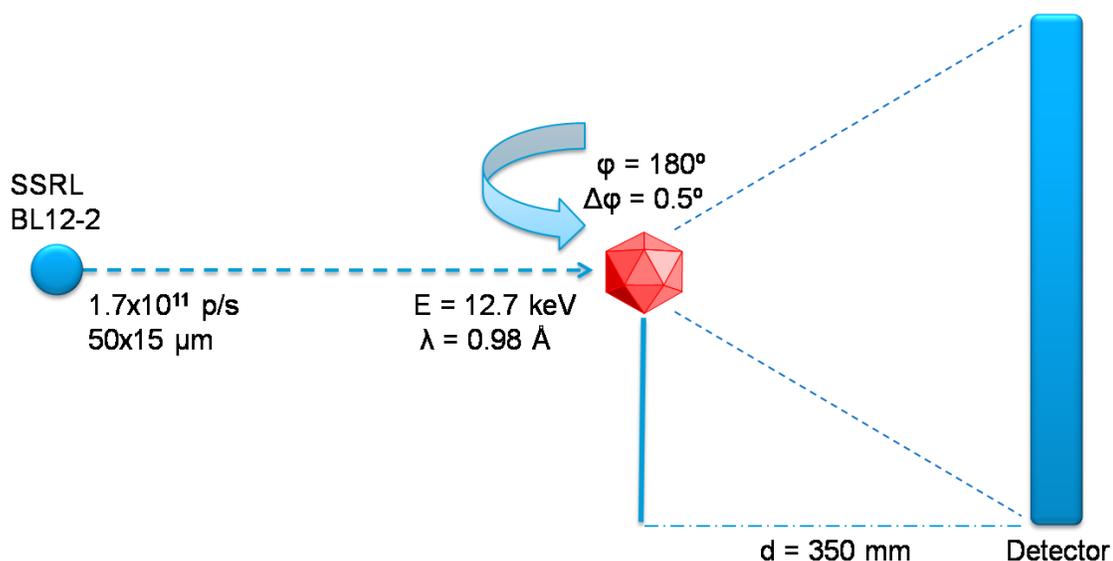


Figura 3. Estrategia de colecta de datos de difracción de rayos X. Los cristales de proteína PCNA_{Tg} se sometieron a difracción de rayos X mediante un diseño experimental de colectas sucesivas en la misma zona de cada cristal, cubriendo un ángulo de rotación $\varphi = 180^\circ$ escaneado con una oscilación $\Delta\varphi = 0.5^\circ$, llevado a cabo en la línea BL12-2 del SSRL, la cual se encuentra equipada con un detector Dectris Pilatus 6M, empleando un haz gaussiano de tamaño 50×15 μm , flujo 1.7×10^{11} p/s, distancia cristal - detector 350 mm y una energía $E = 12.7$ keV correspondiente a una longitud de onda $\lambda = 0.98$ Å.

4.6. Determinación de Estructuras

Los *datasets* de los cristales I (10), II (20) y III (15) se indexaron e integraron empleando el paquete XDS,⁴¹ para enseguida continuar el procesamiento del archivo de reflexiones con la suite CCP4,⁴² teniendo cuidado de tomar el primer archivo de reflexiones de cada serie como referencia para el indexado consistente de los *datasets* (Fig. 4). Pointless^{43,44} se usó con el fin

de asignar el grupo espacial más probable y simultáneamente cambiar el formato del archivo de reflexiones (HKL a MTZ), tras lo cual se realizó el escalamiento de los datos con Aimless (resolución de acuerdo con el criterio $I/\sigma_I > 2$),^{43,44,45} y el cálculo subsecuente del contenido de la unidad asimétrica (AU) con Matthews-coef,⁴⁶ para luego resolver las fases mediante reemplazo molecular con Phaser,⁴⁷ suministrando como modelo de búsqueda el archivo de coordenadas previamente reportado (PDB 5A6D).³⁹ El modelo inicial correspondiente a la primera colecta de cada serie se sometió a un afinamiento en cuerpo rígido empleando la suite Phenix,⁴⁸ seguido por varios ciclos iterativos de construcción manual con las herramientas brindadas por Coot⁴⁹ y afinamiento restringido empleando la suite Phenix⁴⁸ hasta que se obtuvo un modelo final, el cual se sometió a solamente un ciclo de afinamiento restringido empleando la suite Phenix⁴⁸ para obtener el modelo correspondiente a la última colecta de cada serie. Finalmente, las estructuras cristalinas (PDB códigos 7N5I, 7N5J, 7N5K, 7N5L, 7N5M, 7N5N) se depositaron en la base de datos RCSB PDB,⁵⁰ y se generaron las respectivas tablas de estadísticas cristalográficas con el programa Table One de la suite Phenix.⁴⁸

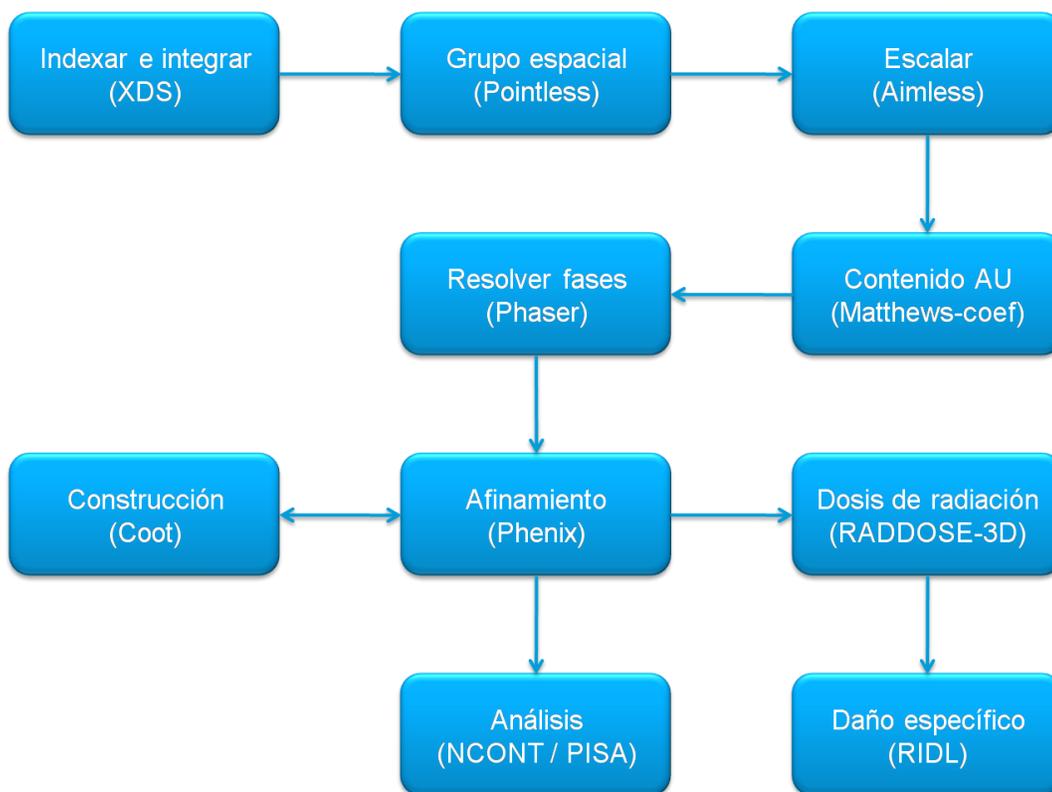


Figura 4. Determinación estructural y análisis del daño por radiación. Se muestra un diagrama de flujo simplificado de los principales procedimientos y recursos computacionales empleados en la determinación de estructuras y el análisis del daño por radiación de la proteína PCNA_{Tg}.

4.7. Análisis del Daño por Radiación

La dosis de radiación DWD (*Diffraction Weighted Dose*) absorbida por los cristales PCNA_{Tg} durante cada una de las colectas de datos de difracción de rayos X se calculó empleando el programa RADDOSE-3D (Garman Lab, Universidad de Oxford),⁵¹ y el daño específico causado en cada cristal por efecto de la dosis de radiación acumulada se evaluó empleando el programa RIDL (Garman Lab, Universidad de Oxford),⁵² el cual permite detectar y cuantificar la pérdida de densidad electrónica en función de la dosis de radiación a fin de determinar cambios específicos en la estructura molecular. El cálculo de la dosis de radiación absorbida requiere el suministro de las dimensiones del cristal, los parámetros de celda unitaria, el contenido de la celda (número de moléculas presentes en la celda, número de aminoácidos por molécula, número de aminoácidos con átomos de azufre en cada molécula, fracción de solvente), la condición de cristalización (concentración de azufre (SO₄²⁻), iones (Na⁺, Cl⁻), elementos pesados), las características físicas de la línea de rayos X (tipo y tamaño del haz, flujo, energía, colimación) y la estrategia de colecta de datos (ángulo de rotación escaneado, tiempo de exposición total). La dosis de radiación acumulada por cada cristal corresponde a la suma de la dosis de radiación absorbida durante determinada colecta y la dosis de radiación absorbida durante todas las colectas precedentes. Adicionalmente, las figuras representando densidad electrónica se realizaron empleando CCP4mg,⁵³ las interacciones ($d \leq 3.2 \text{ \AA}$) entre residuos con carga negativa (Asp, Glu) y positiva (Lys, Arg) en el trímero PCNA_{Tg} correspondiente a la primera colecta de la serie de cada cristal se determinaron con NCONT,⁴² y las interfaces de los respectivos trímeros PCNA_{Tg} se analizaron empleando PISA,⁵⁴ los últimos dos programas dentro de la suite CCP4.⁴²

4.8. Análisis Bioinformático

Un análisis bioinformático se realizó para proteínas PCNA homotriméricas representativas con estructura 3D publicada, resultando de esta manera 12 secuencias de aminoácidos (UniProt)⁵⁵ con sus respectivas estructuras moleculares (RCSB PDB),⁵⁰ seis corresponden a cinco especies de arqueas^{39,40,56,57,58} y seis corresponden a cinco especies de eucariontes,^{59,60,61,62,63} una de las especies de cada dominio con dos proteínas reportadas, teniendo cuidado de elegir la estructura sin mutaciones con mejor resolución para aquellas especies que tienen varios registros PDB de la misma PCNA (la estructura PCNA de *Pyrococcus furiosus* publicada tiene

la mutación M73L).⁴⁰ Las secuencias de aminoácidos se analizaron con la herramienta ProtParam⁶⁴ del portal ExPASy,⁶⁵ los diagramas de cintas se realizaron empleando el *software* UCSF Chimera⁶⁶ y la composición de residuos aminoácidos se determinó a partir de la lista arrojada por ProtParam,⁶⁴ considerando una clasificación general basada en tres propiedades fisicoquímicas: polaridad, carga y aromaticidad. Los alineamientos múltiples de secuencias y las superposiciones de estructuras se hicieron empleando UCSF Chimera,⁶⁶ calculando la identidad de secuencia con el programa Clustal Omega⁶⁷ y el valor RMSD con el algoritmo Needleman-Wunsch,⁶⁶ considerando el global, entre las secuencias y estructuras de arqueas y eucariontes de manera independiente, así como también entre todos los pares de secuencias y estructuras contempladas. El número de puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones catión- π se determinaron empleando UCSF Chimera,⁶⁶ VMD⁶⁸ y CaPTURE⁶⁹ respectivamente, considerando las interacciones que corresponden al monómero y trímero (intra e intermoleculares), así como también las interacciones específicamente entre monómeros (intermoleculares) de los trímeros PCNA analizados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los mecanismos moleculares involucrados en el metabolismo genómico son fundamentales para la supervivencia de los seres vivos, dado que el DNA es la molécula en la que estriba el almacenamiento, transmisión y expresión de la información genética. Parece razonable considerar que si *T. gammatolerans* tiene la capacidad de soportar niveles de radiación letales para casi todos los seres vivos, entonces las proteínas involucradas en el metabolismo de su genoma constituyen piezas clave que probablemente posean características particulares que les permita resistir altos niveles de radiación ionizante (Fig. 5).

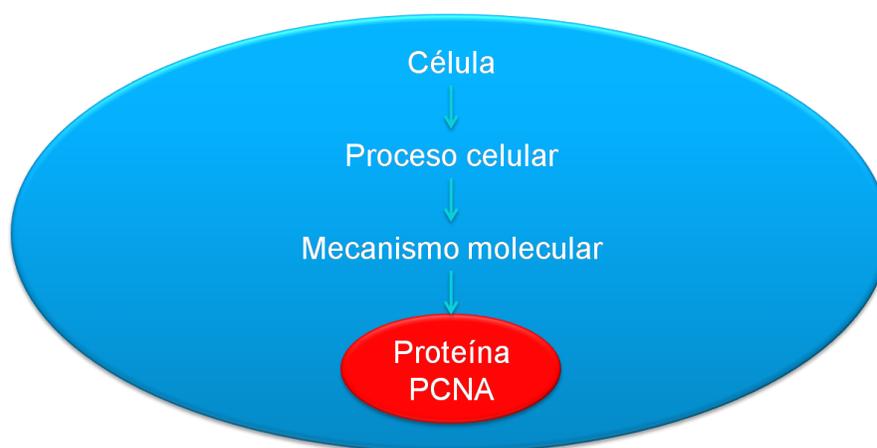


Figura 5. La proteína PCNA es esencial para la viabilidad celular. Los procesos de replicación y reparación del DNA son fundamentales para la supervivencia y se llevan a cabo mediante mecanismos moleculares en los cuales la proteína PCNA tiene una función central.

Si bien las proteínas implicadas en el metabolismo del DNA son piezas clave, la radiorresistencia de este microorganismo hipertermófilo se debe a procesos celulares llevados a cabo mediante complejos mecanismos moleculares, en los cuales resulta difícil identificar los factores involucrados y más aún esclarecer su aporte individual. Sin embargo, el estudio estructural de la proteína PCNA_{Tg} en un gradiente de radiación ionizante mediante cristalografía de rayos X, aunado a un análisis bioinformático de secuencias, estructuras e interacciones moleculares, constituye una estrategia factible para obtener indicios de las características moleculares que confieren radiorresistencia.

5.1. Proteína PCNA_{Tg}

La proteína PCNA_{Tg} se produjo empleando la cepa *E. coli* BL21(DE3)/pCold-I-PCNA_{Tg} en una metodología de tres etapas secuenciales y se purificó a través de dos etapas cromatográficas (Fig. 6), tras lo cual se llevó a cabo su cristalización por dos métodos (Fig. 7) para el estudio de su estructura molecular mediante cristalografía de rayos X (Fig. 8).

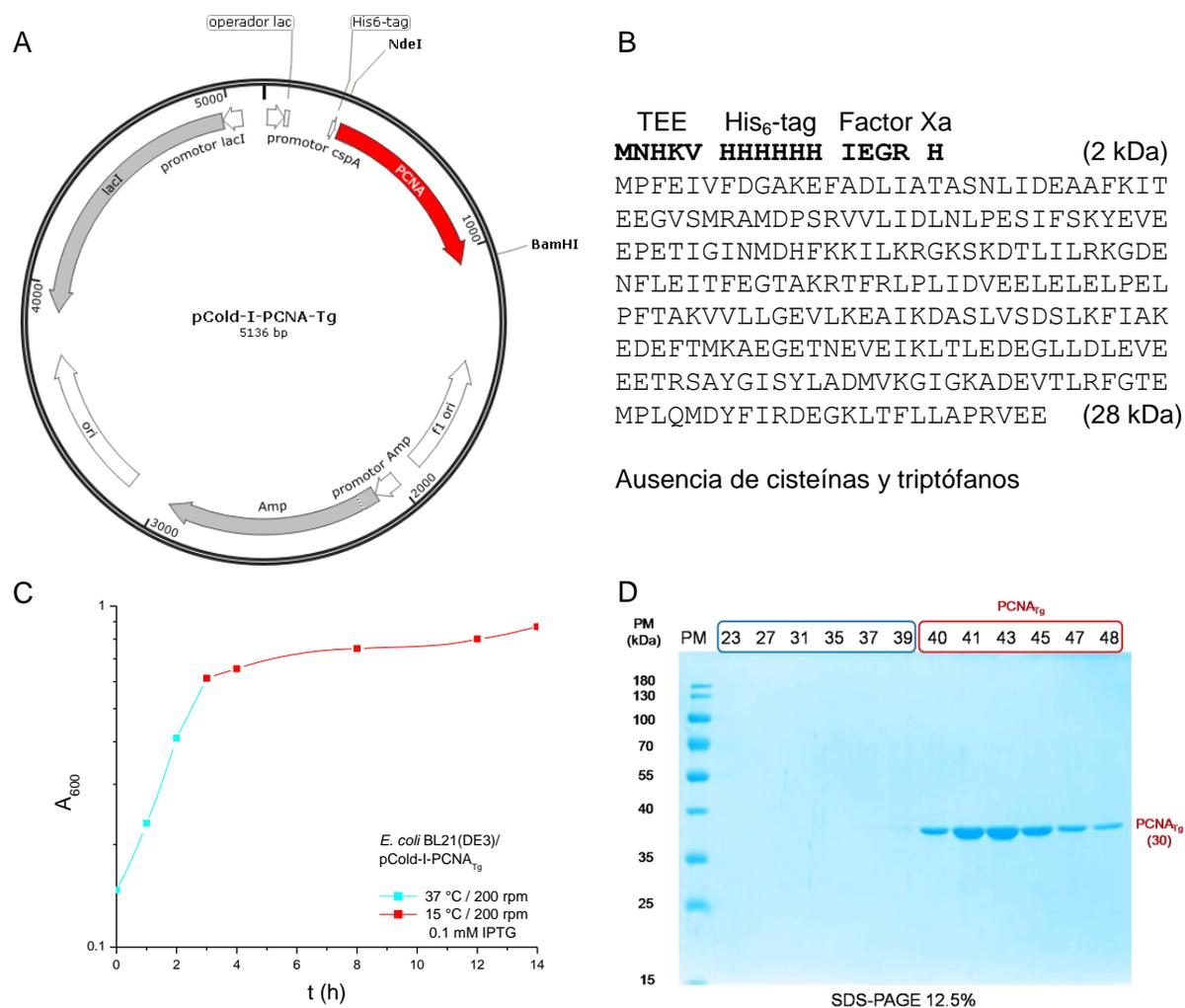


Figura 6. Producción de la proteína PCNA_{Tg}. Se muestra el mapa del plásmido pCold-I-PCNA_{Tg} (A), señalando sus principales características, la secuencia de aminoácidos de la proteína PCNA_{Tg} (B), resaltando con negrita la etiqueta de histidinas (His₆-tag) en el extremo N-terminal, la cual se encuentra flanqueada por un elemento de mejora de la traducción (TEE) y un sitio de corte reconocido por una proteasa (factor Xa), así como también la curva de crecimiento en escala logarítmica de la cepa *E. coli* BL21(DE3)/pCold-I-PCNA_{Tg} (C), diferenciando las dos condiciones de cultivo, y el perfil de purificación de la proteína PCNA_{Tg} (D), indicando el marcador de peso molecular (PM) y los números de las fracciones de la segunda etapa cromatográfica que se sometieron a SDS-PAGE.

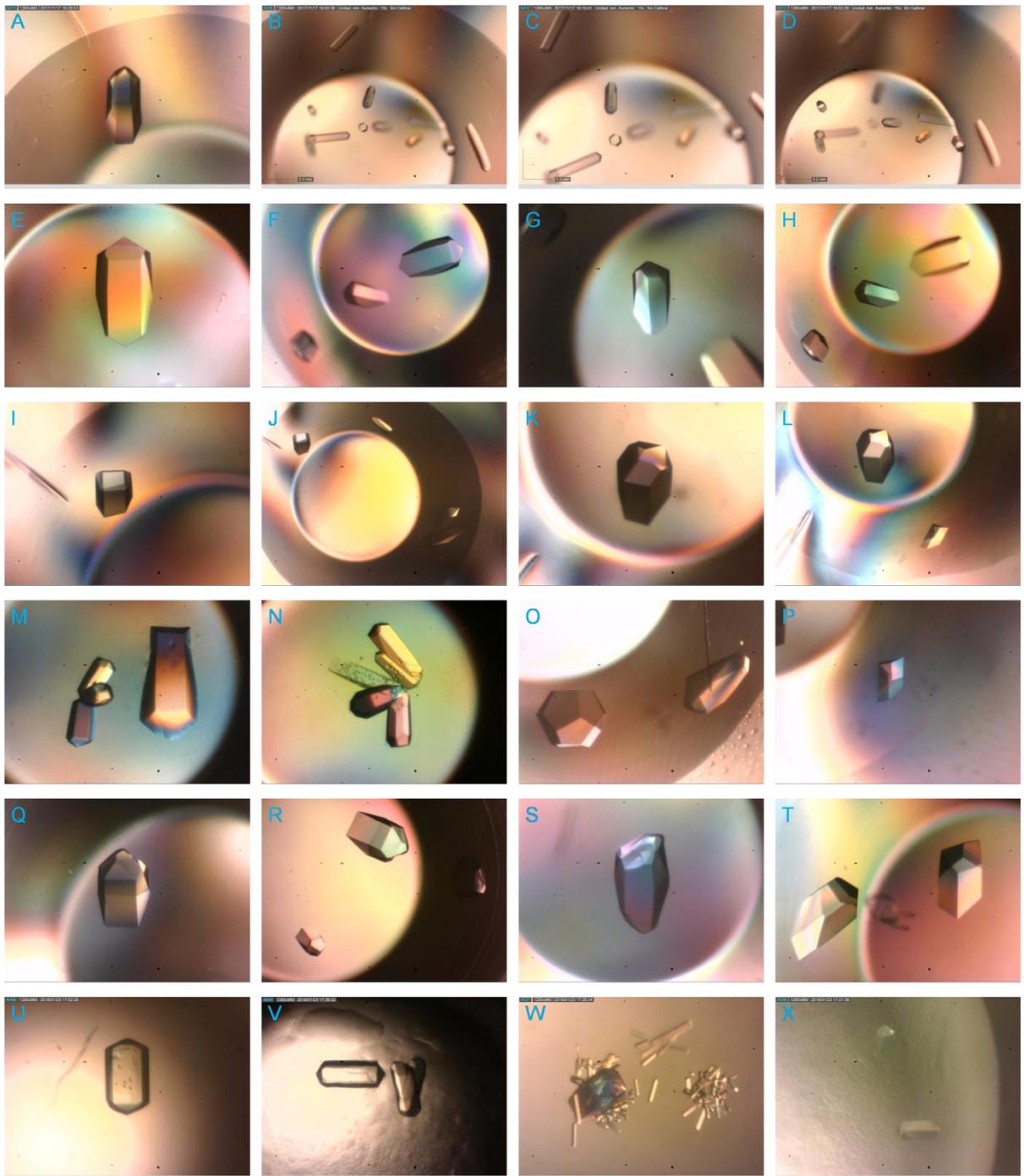


Figura 7. Cristales de proteína PCNA_{Tg}. Se muestran cristales de proteína PCNA_{Tg} (~100 μ m) obtenidos a 18 $^{\circ}$ C empleando los métodos *microbatch* (A–T) y difusión de vapor (U–X), con dos concentraciones de proteína (10, 12 mg/mL) en *buffer* A (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 400 mM) y condiciones de agente cristalizante en el que varía la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (citrato de sodio 100 mM pH 5.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.8–3.2 M, MPD 7.5%).

El plásmido pCold-I-PCNA_{Tg} confiere resistencia a ampicilina (Amp) y contiene el gen que codifica la PCNA_{Tg} fusionado a una etiqueta de histidinas (His₆-tag) en el extremo N-terminal (Fig. 6), la cual se encuentra flanqueada por un elemento de mejora de la traducción (TEE) y un sitio de corte reconocido por una proteasa (factor Xa). El sistema de expresión del plásmido se basa en el promotor del gen que codifica la proteína CspA (*Cold shock protein A*),⁷⁰ una proteína de *E. coli* que se expresa en muy alto nivel a baja temperatura cuando el crecimiento celular es escaso, por lo cual se emplean dos temperaturas de cultivo marcadamente diferentes que generan dos fases de crecimiento: una fase a 37 °C (0–3 h) con un crecimiento exponencial ($\mu=0.49 \text{ h}^{-1}$) hasta alcanzar un valor $A_{600} = 0.5$, seguida de una fase de inducción a 15 °C (3–14 h) con un crecimiento ralentizado ($\mu=0.03 \text{ h}^{-1}$) durante la cual se produce la PCNA_{Tg} (Fig. 6). El uso de IPTG en el sistema constituye una medida adicional para evitar la expresión de fuga que podría ocurrir antes del descenso de la temperatura de cultivo.⁷⁰



Figura 8. Estructura de la proteína PCNA_{Tg}. Se muestra un diagrama de cintas de la estructura molecular del homotrímero de la proteína PCNA_{Tg} realizado empleando UCSF Chimera (PDB 7N5I), representando con distinto color cada protómero (amarillo, cian, rosa).

5.2. Análisis Cristalográfico

Aunque los cristales de proteína se clasifican como cristales moleculares, lo cierto es que su estructura y propiedades distan mucho de los constituidos por átomos o iones, e incluso difieren notablemente de los constituidos por moléculas pequeñas (Tablas 1 y 2). Las proteínas son moléculas relativamente muy grandes y las interacciones intermoleculares muy débiles, lo que lleva a que el empaquetamiento en la red 3D no sea tan fuerte y estricto como en cristales comunes. Los cristales de proteína se forman en condiciones fisicoquímicas restringidas, son frágiles, muy pequeños (<1 mm), su consistencia semeja un gel, tienen un alto contenido de solvente (~50%) y presentan mosaicidad.^{71,72} No obstante, la estructura molecular de una proteína determinada por cristalografía de rayos X representa el promedio espacial y temporal de un gran número de moléculas dispuestas en una red 3D ($\sim 10^{15}$), y ha sido extensamente probado que su información es importante para describir procesos biológicos.^{71,72}

Tabla 1. Clasificación general de los cristales.

Cristal	Fuerza	Ejemplo
Metálico	Enlace metálico	Cobre metálico
Iónico	Enlace iónico	Cloruro de sodio
Covalente	Enlace covalente	Cuarzo, grafito, diamante
Molecular	Fuerzas de Van der Waals	Sacarosa, hielo, hielo seco

Una clasificación general de los cristales de acuerdo con el tipo de partículas dispuestas en la red (átomos, iones, moléculas) y la naturaleza de la fuerza principal que las mantiene unidas.⁷³

Tabla 2. Interacciones moleculares en proteínas.

Interacciones moleculares		
Fuerzas de Van der Waals	Dipolo - dipolo	Puente de hidrógeno
	Dipolo - dipolo inducido	
	Dispersión de London	
Interacciones electrostáticas	Interacciones iónicas	Puente salino (par iónico)
	Ion - dipolo	
	Ion - dipolo inducido	
Interacciones aromáticas	Ion - cuadrupolo	Interacción catión- π
	Apilamiento π	Interacción π - π
Otras interacciones	Interacciones no polares	Interacciones hidrofóbicas
	Enlaces de coordinación	Catión metálico - O/N/S
	Puentes disulfuro	Enlace Cys-Cys

Las interacciones intra e intermoleculares que pueden contribuir a la estabilidad estructural y funcional de una proteína.

Tabla 3. Estadísticas cristalográficas de las estructuras obtenidas del cristal PCNA_{Tg} I.

PCNA _{Tg}	Cristal I - C1	Cristal I - C5
Línea	SSRL BL12-2	SSRL BL12-2
Longitud de onda (Å)	0.98	0.98
Dosis de radiación (MGy)	5.22	89.05
Rango de resolución (Å)	32.32 - 1.95 (2.02 - 1.95)	37.33 - 2.82 (2.92 - 2.82)
Grupo espacial	P6 ₃	P6 ₃
Parámetros de (Å °) celda unitaria	a=186.62 b=186.62 c=63.92 α=90 β=90 γ=120	a=187.87 b=187.87 c=64.31 α=90 β=90 γ=120
Mosaicidad (°)	0.12	0.17
Contenido de solvente (%)	53.86	54.75
Macromoléculas por AU	4	4
Reflexiones totales	952500 (93259)	323916 (33062)
Reflexiones únicas	92797 (9191)	31591 (3147)
Multiplidad	10.3 (10.1)	10.3 (10.5)
Integridad (%)	99.89 (99.83)	99.75 (99.90)
Media I/σ(I)	27.82 (2.43)	18.68 (2.43)
Factor B Wilson (Å ²)	37.68	71.46
R _{merge}	0.189 (1.003)	0.152 (1.205)
R _{meas}	0.199 (1.057)	0.161 (1.266)
R _{pim}	0.062 (0.330)	0.050 (0.386)
CC _{1/2}	0.998 (0.886)	0.979 (0.797)
Reflexiones en afinamiento (5% para R _{free})	92776	31574
R _{work} / R _{free}	0.191 / 0.226	0.170 / 0.233
Número de átomos	8541	8541
Átomos de proteína	8023	8023
Átomos de ligandos / solvente	198 / 320	198 / 320
Residuos de proteína	990	990
RMSD _{longitudes de enlace} (Å)	0.011	0.010
RMSD _{ángulos de enlace} (°)	1.38	1.38
Ramachandran (%) Favorecido / permitido / atípico	97.45 / 1.73 / 0.81	95.82 / 3.36 / 0.81
Rotámeros atípicos (%)	2.03	0.56
Factor B promedio (Å ²) Proteína / ligandos / solvente	45.58 44.87 / 71.04 / 47.81	72.83 71.93 / 105.03 / 75.58
PDB ID	7N5I	7N5J

Las estadísticas cristalográficas de las estructuras determinadas para las colectas 1 (C1) y 5 (C5) del cristal PCNA_{Tg} I, indicando entre paréntesis los valores para la capa de mayor resolución.

Tabla 4. Estadísticas cristalográficas de las estructuras obtenidas del cristal PCNA_{Tg} II.

PCNA _{Tg}	Cristal II - C1	Cristal II - C20
Línea	SSRL BL12-2	SSRL BL12-2
Longitud de onda (Å)	0.98	0.98
Dosis de radiación (MGy)	3.84	76.96
Rango de resolución (Å)	32.02 - 1.98 (2.05 - 1.98)	40.63 - 3.07 (3.18 - 3.07)
Grupo espacial	P6 ₃	P6 ₃
Parámetros de (Å °) celda unitaria	a=186.92 b=186.92 c=64.03 α=90 β=90 γ=120	a=187.68 b=187.68 c=64.12 α=90 β=90 γ=120
Mosaicidad (°)	0.15	0.16
Contenido de solvente (%)	54.09	54.52
Macromoléculas por AU	4	4
Reflexiones totales	913562 (87058)	249306 (23378)
Reflexiones únicas	89151 (8861)	24414 (2386)
Multiplidad	10.2 (9.8)	10.2 (9.8)
Integridad (%)	99.89 (99.86)	99.70 (99.92)
Media I/σ(I)	24.34 (2.35)	12.45 (2.26)
Factor B Wilson (Å ²)	39.46	76.84
R _{merge}	0.224 (1.004)	0.254 (1.172)
R _{meas}	0.236 (1.061)	0.268 (1.232)
R _{pim}	0.074 (0.340)	0.083 (0.377)
CC _{1/2}	0.999 (0.828)	0.996 (0.768)
Reflexiones en afinamiento (5% para R _{free})	89133	24400
R _{work} / R _{free}	0.190 / 0.228	0.151 / 0.224
Número de átomos	8541	8541
Átomos de proteína	8023	8023
Átomos de ligandos / solvente	198 / 320	198 / 320
Residuos de proteína	990	990
RMSD _{longitudes de enlace} (Å)	0.009	0.010
RMSD _{ángulos de enlace} (°)	1.24	1.38
Ramachandran (%) Favorecido / permitido / atípico	96.74 / 2.44 / 0.81	94.20 / 5.19 / 0.61
Rotámeros atípicos (%)	1.35	0.68
Factor B promedio (Å ²) Proteína / ligandos / solvente	47.42 46.64 / 73.78 / 50.70	77.33 76.49 / 110.94 / 77.68
PDB ID	7N5K	7N5L

Las estadísticas cristalográficas de las estructuras determinadas para las colectas 1 (C1) y 20 (C20) del cristal PCNA_{Tg} II, indicando entre paréntesis los valores para la capa de mayor resolución.

Tabla 5. Estadísticas cristalográficas de las estructuras obtenidas del cristal PCNA_{Tg} III.

PCNA _{Tg}	Cristal III - C1	Cristal III - C15
Línea	SSRL BL12-2	SSRL BL12-2
Longitud de onda (Å)	0.98	0.98
Dosis de radiación (MGy)	1.91	28.72
Rango de resolución (Å)	33.94 - 2.00 (2.07 - 2.00)	31.99 - 2.20 (2.28 - 2.20)
Grupo espacial	P3	P3
Parámetros de (Å °) celda unitaria	a=92.62 b=92.62 c=63.73 α=90 β=90 γ=120	a=93.06 b=93.06 c=63.98 α=90 β=90 γ=120
Mosaicidad (°)	0.27	0.26
Contenido de solvente (%)	53.03	53.65
Macromoléculas por AU	2	2
Reflexiones totales	214019 (19532)	159257 (16171)
Reflexiones únicas	41186 (4088)	31432 (3150)
Multiplidad	5.2 (4.8)	5.1 (5.1)
Integridad (%)	99.55 (98.91)	99.62 (99.75)
Media I/σ(I)	20.57 (2.52)	19.02 (2.37)
Factor B Wilson (Å ²)	42.62	52.15
R _{merge}	0.124 (0.909)	0.131 (0.986)
R _{meas}	0.139 (1.006)	0.146 (1.097)
R _{pim}	0.061 (0.427)	0.064 (0.479)
CC _{1/2}	0.999 (0.845)	0.999 (0.748)
Reflexiones en afinamiento (5% para R _{free})	41153	31387
R _{work} / R _{free}	0.188 / 0.239	0.177 / 0.226
Número de átomos	4184	4184
Átomos de proteína	3971	3971
Átomos de ligandos / solvente	88 / 125	88 / 125
Residuos de proteína	495	495
RMSD _{longitudes de enlace} (Å)	0.008	0.008
RMSD _{ángulos de enlace} (°)	1.23	1.26
Ramachandran (%) Favorecido / permitido / atípico	96.95 / 2.65 / 0.41	97.15 / 2.44 / 0.41
Rotámeros atípicos (%)	0.91	0.68
Factor B promedio (Å ²) Proteína / ligandos / solvente	50.51 49.97 / 73.64 / 51.53	60.80 60.19 / 85.83 / 62.56
PDB ID	7N5M	7N5N

Las estadísticas cristalográficas de las estructuras determinadas para las colectas 1 (C1) y 15 (C15) del cristal PCNA_{Tg} III, indicando entre paréntesis los valores para la capa de mayor resolución.

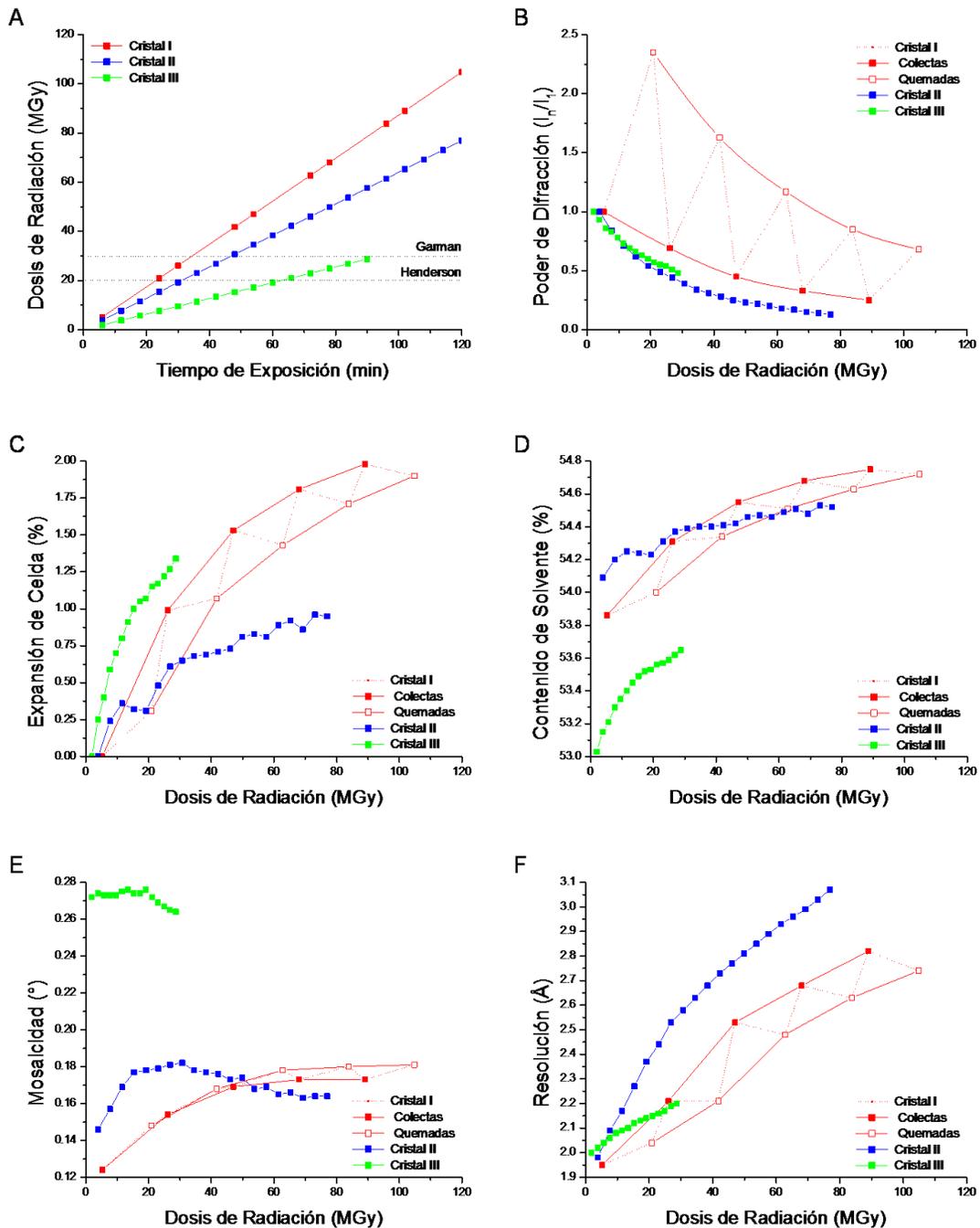


Figura 9. Parámetros físicos de los *datasets* colectados de los cristales PCNA_{Tg}. Los valores calculados empleando RADDOSE-3D para la dosis de radiación acumulada por los cristales PCNA_{Tg} se grafican en función del tiempo de exposición (A), indicando con líneas punteadas los límites de Henderson (20 MGy) y Garman (30 MGy). Además, el poder de difracción (B), la expansión del volumen de celda (C), el contenido de solvente (D), la mosaicidad (E) y la resolución (F) obtenidos después de indexar, integrar y escalar los 10 (grupo espacial P6₃), 20 (grupo espacial P6₃) y 15 (grupo espacial P3) *datasets* colectados de los cristales I (rojo), II (azul) y III (verde) respectivamente, según el criterio $I/\sigma_I > 2$ para el corte de resolución, se grafican en función de la dosis de radiación, indicando para el cristal I (rojo) el comportamiento de los parámetros para colectas y quemadas independientemente.

En este estudio, los cristales I (PDB 7N5I y 7N5J, Tabla 3) y II (PDB 7N5K y 7N5L, Tabla 4) contienen la misma concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.6 M), pertenecen al grupo espacial $P6_3$ del sistema cristalino hexagonal y sus respectivas estructuras tienen cuatro macromoléculas por AU, mientras que el cristal III (PDB 7N5M y 7N5N, Tabla 5) contiene una menor concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.5 M), pertenece al grupo espacial P3 del sistema cristalino trigonal y su estructura tiene dos macromoléculas por AU. No obstante, las estructuras son casi idénticas en la red 3D, por lo que los cambios de grupo espacial y celda unitaria reflejan cambios más bien sutiles en el arreglo cristalino.

La tasa de dosis de radiación (cristal I: 0.87 MGy/min, cristal II: 0.64 MGy/min, cristal III: 0.32 MGy/min) y la dosis de radiación acumulada para la última colecta (cristal I: 89.1 MGy, cristal II: 77.0 MGy, cristal III: 28.7 MGy) cubren un amplio rango de niveles de radiación (Fig. 9A, Anexo 1). Si bien el poder de difracción de los tres cristales decae con la dosis de radiación, en el caso del cristal I, como efecto del tiempo de exposición por *frame*, los respectivos valores obtenidos para colectas (1 s/fr) son más bajos que para quemadas (3 s/fr), y en consecuencia, el poder de difracción del cristal I decae para colectas y quemadas independientemente (Fig. 9B, Anexo 2). Resulta interesante que el poder de difracción de los tres cristales exhibe un decaimiento exponencial con la dosis de radiación (Fig. 10).

Aunque la dosis de radiación acumulada para los cristales I y II constituye más del doble del límite de Garman (30 MGy), el análisis de los resultados obtenidos de los *datasets* reveló un daño global moderado (Fig. 9C–F, Anexos 3 y 4). El aumento de la mosaicidad se mantuvo en un intervalo de valores muy bajo (0.12–0.18°), y la expansión del volumen de celda (<2%) con el consecuente incremento del contenido de solvente (54–55%) parecen bajos, dado que aún con la pérdida de resolución en los cristales I (1.95–2.82 Å) y II (1.98–3.07 Å), el mapa de densidad electrónica correspondiente a la última colecta permitió construir toda la estructura de la proteína.

La dosis de radiación acumulada para el cristal III apenas se acerca al límite de Garman, lo cual parece reflejarse en una menor pérdida de resolución (2.00–2.20 Å), además de que el aumento de la mosaicidad se mantuvo en un intervalo de valores muy estrecho (0.26–0.28°), y la expansión del volumen de celda (1.34%) con el consecuente incremento del contenido de solvente (53–54%) también son bajos (Fig. 9C–F, Anexo 5). Adicionalmente, aunque los

factores B Wilson y promedio aumentaron en la estructura correspondiente a la última colecta de los tres cristales, los valores permanecieron dentro de rangos aceptables (Tablas 3–5).

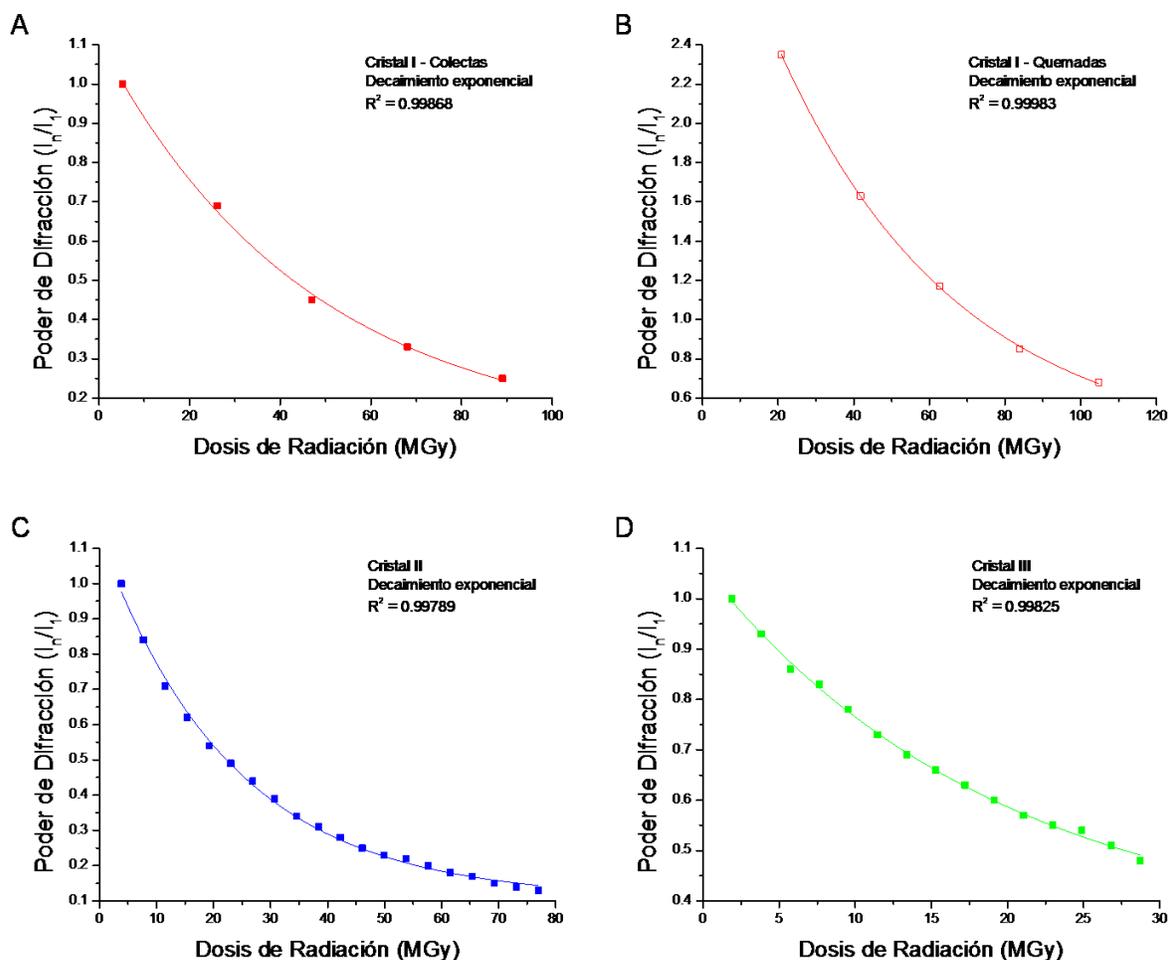


Figura 10. Decaimiento del poder de difracción de los cristales PCNA_{Tg}. El poder de difracción de los cristales PCNA_{Tg} I (A, B), II (C) y III (D) se grafica en función de la dosis de radiación, mostrando el ajuste de los respectivos valores a una función de decaimiento exponencial, e indicando para el cristal I el decaimiento para colectas (A) y quemadas (B) independientemente.

De acuerdo con los cálculos realizados empleando RIDL,⁵² la puntuación de asimetría (asimetría sobre 0) para el cristal I disminuye para colectas y quemadas independientemente, y en general, los valores para el cristal II también disminuyen con la dosis de radiación, mientras que los valores para el cristal III inicialmente aumentan con la dosis de radiación, indicando mayor daño específico, pero los valores eventualmente también disminuyen a altas dosis de radiación como consecuencia inevitable del daño global (Fig. 11, Anexo 6), lo cual ha sido

observado previamente durante el desarrollo de RIDL.⁵² Y si bien el valor modal para la distribución de pérdida de densidad electrónica en los tres cristales cambia progresivamente a valores más altos con el incremento de la dosis de radiación, los respectivos valores normalizados indican que el daño específico fue moderado considerando los altos niveles de radiación alcanzados en este estudio (Fig. 12).

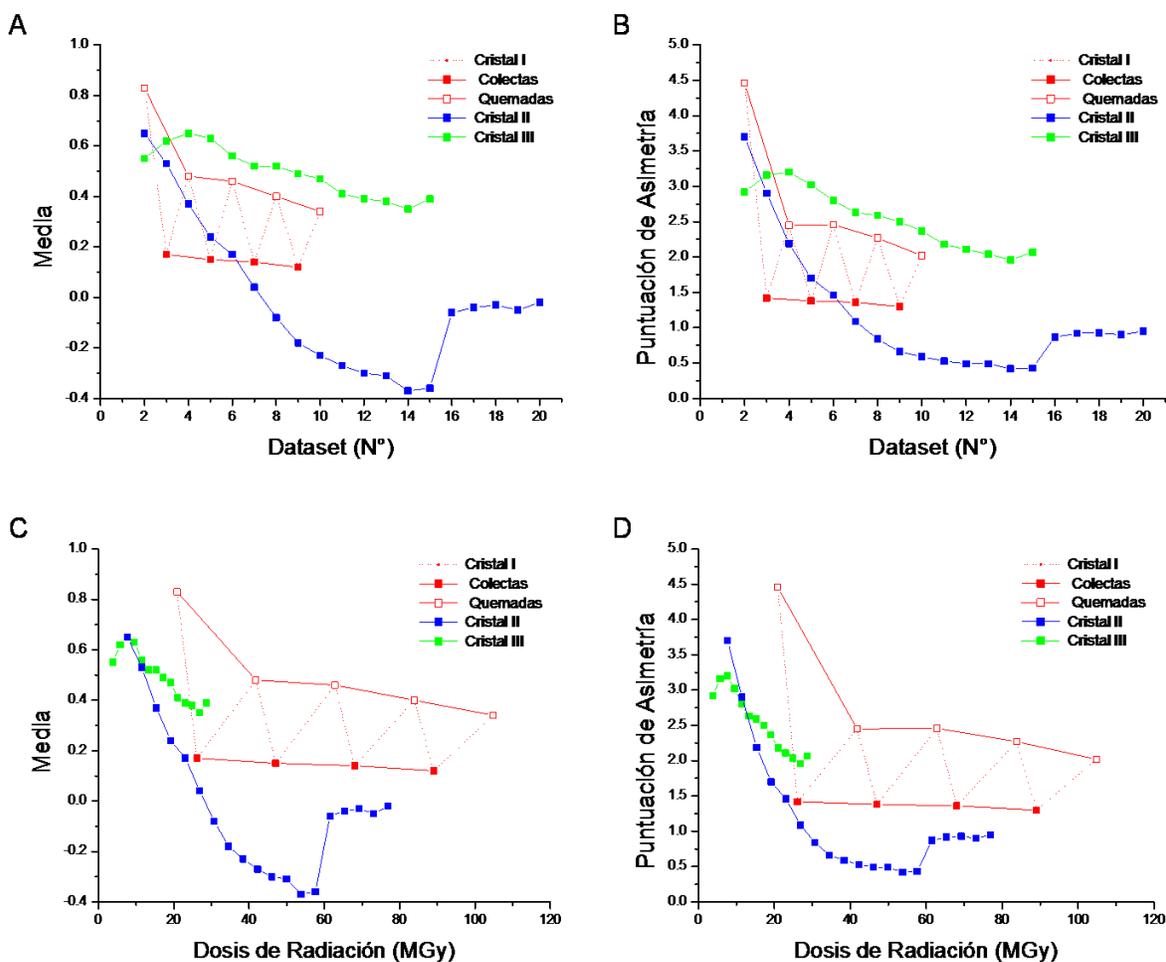


Figura 11. Distribución general de pérdida de densidad electrónica en los cristales PCNA_{Tg}. La media y la puntuación de asimetría de la distribución general de pérdida de densidad electrónica (valores de C_{α} -normalized D_{neg} (atom) métrica) obtenidas empleando RIDL para los cristales PCNA_{Tg} I (rojo), II (azul) y III (verde) se grafican en función del número de *dataset* (A, B) y dosis de radiación (C, D), indicando para el cristal I (rojo) el comportamiento de las estadísticas para colectas y quemadas independientemente.

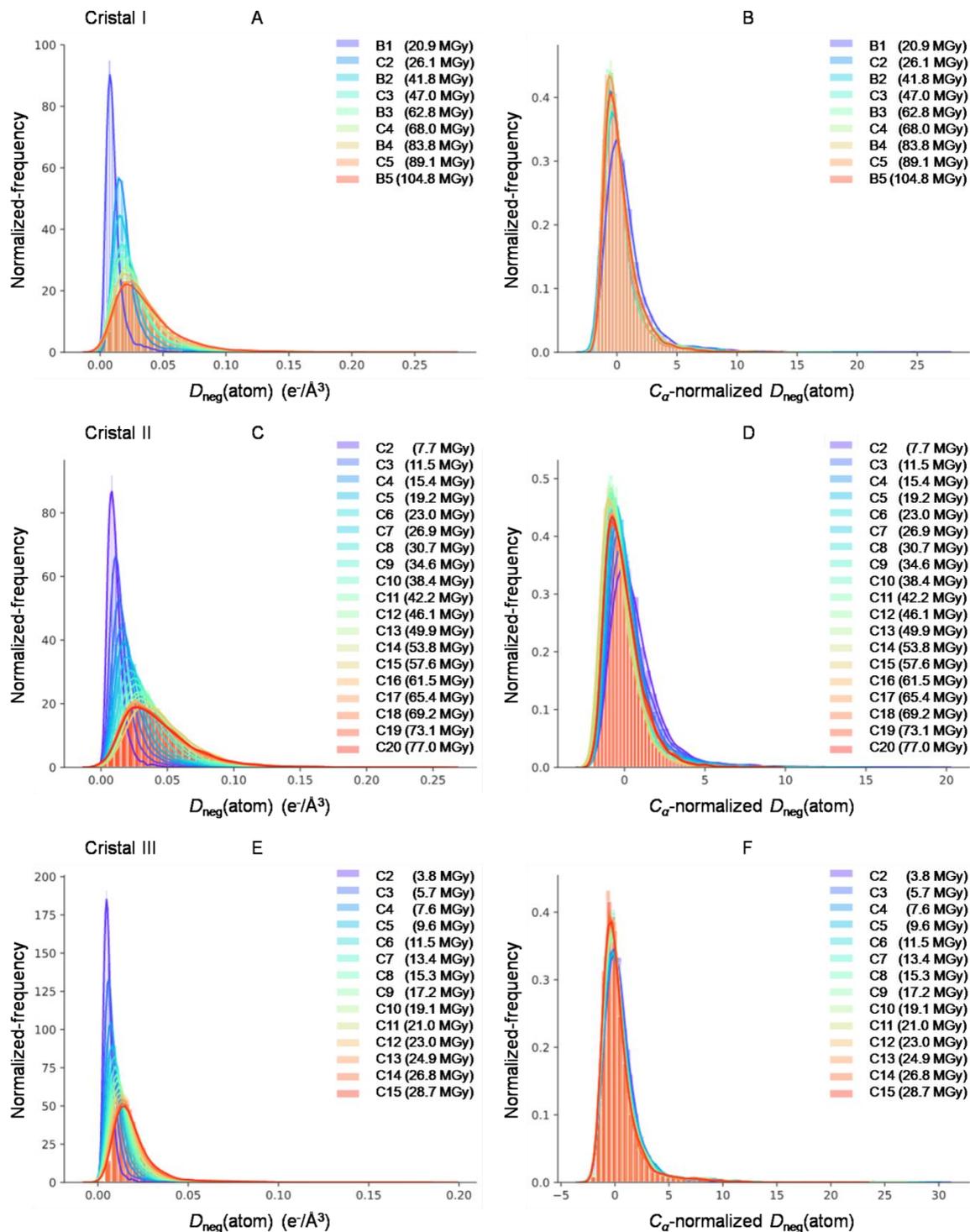


Figura 12. Pérdida de densidad electrónica en los cristales PCNA_{Tg}. La distribución de pérdida de densidad electrónica (A, C, E) y los respectivos valores normalizados (B, D, F) obtenidos empleando RIDL se representan para los cristales PCNA_{Tg} I (A, B), II (C, D) y III (E, F) con relación al primer *dataset* (colecta C1), adicionalmente indicando los valores calculados empleando RADDOSE-3D para la dosis de radiación acumulada por los cristales I (colectas C2–C5, quemadas B1–B5), II (colectas C2–C20) y III (colectas C2–C15).

La literatura cristalográfica usualmente asume que a temperaturas criogénicas, el daño es proporcional a la dosis de radiación acumulada e independiente de la tasa de dosis de radiación.^{30,31} Sin embargo, el decaimiento del poder de difracción y la pérdida de resolución en los cristales I y II sugiere que la tasa de dosis de radiación tiene un efecto (Figs. 9 y 10), e incluso parece haber una relación inversa, ya que hay menos daño a una mayor tasa de dosis de radiación, un fenómeno que ya se ha observado a temperatura ambiente.⁷⁴ El análisis del daño por radiación también muestra una relación compleja entre daño global y daño específico (Figs. 9–12), ambos coexisten y se deben interpretar conjuntamente, dado que se puede observar un compromiso continuo entre ambos tipos de daño.

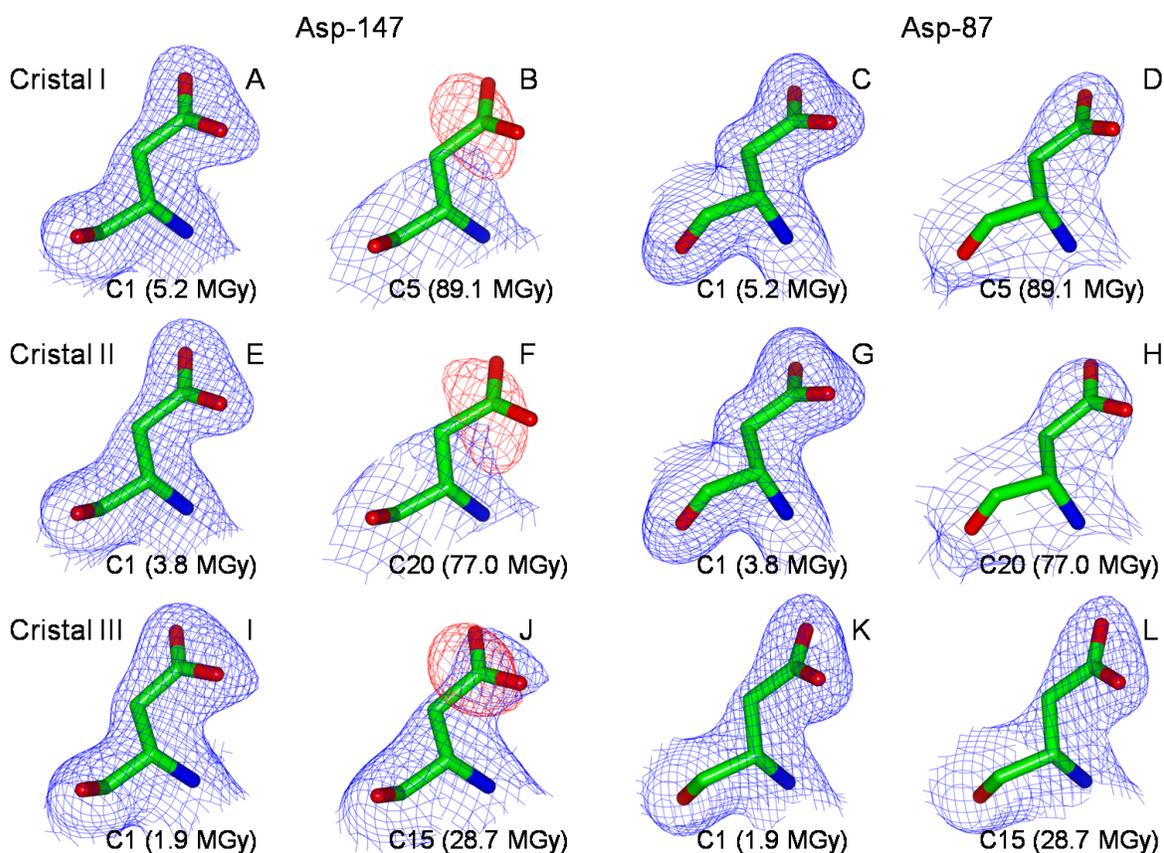


Figura 13. Daño específico localizado en los cristales PCNA_{Tg}. El Asp-147 no muestra daño a la dosis de radiación de la primera colecta (A, E, I), pero es el residuo aminoácido que muestra más daño (descarboxilación) a la dosis de radiación de la última colecta de los cristales PCNA_{Tg} (B, F, J), mientras que el Asp-87 no muestra daño a la dosis de radiación de la primera colecta (C, G, K), ni a la dosis de radiación de la última colecta (D, H, L). Representaciones realizadas empleando CCP4mg (cristal I: PDB 7N5I y 7N5J, cristal II: PDB 7N5K y 7N5L, cristal III: PDB 7N5M y 7N5N) con los mapas de densidad electrónica $2F_o - F_c$ (azul) y $F_o - F_c$ (rojo) contorneados a 1.0σ y -3.5σ respectivamente.

El daño específico observado también fue moderado considerando la proporción de residuos aminoácidos que mostraron pérdida de densidad electrónica evidente (Anexos 7–9). A pesar del alto porcentaje de residuos con carga negativa, la descarboxilación de solo algunos residuos acídicos fue evidente, además de que solamente ciertos residuos (Asp-147) aparecen descarboxilados en todas las macromoléculas presentes en la AU de los tres cristales (Fig. 13). No obstante, el daño específico mostró dependencia del ambiente local (Fig. 14), ya que varios residuos aspartato y glutamato solo aparecen descarboxilados en algunas macromoléculas de la AU, y en general, el glutamato es menos afectado que el aspartato (Anexo 10), así como también los residuos implicados en interacciones iónicas (Anexos 11–13).

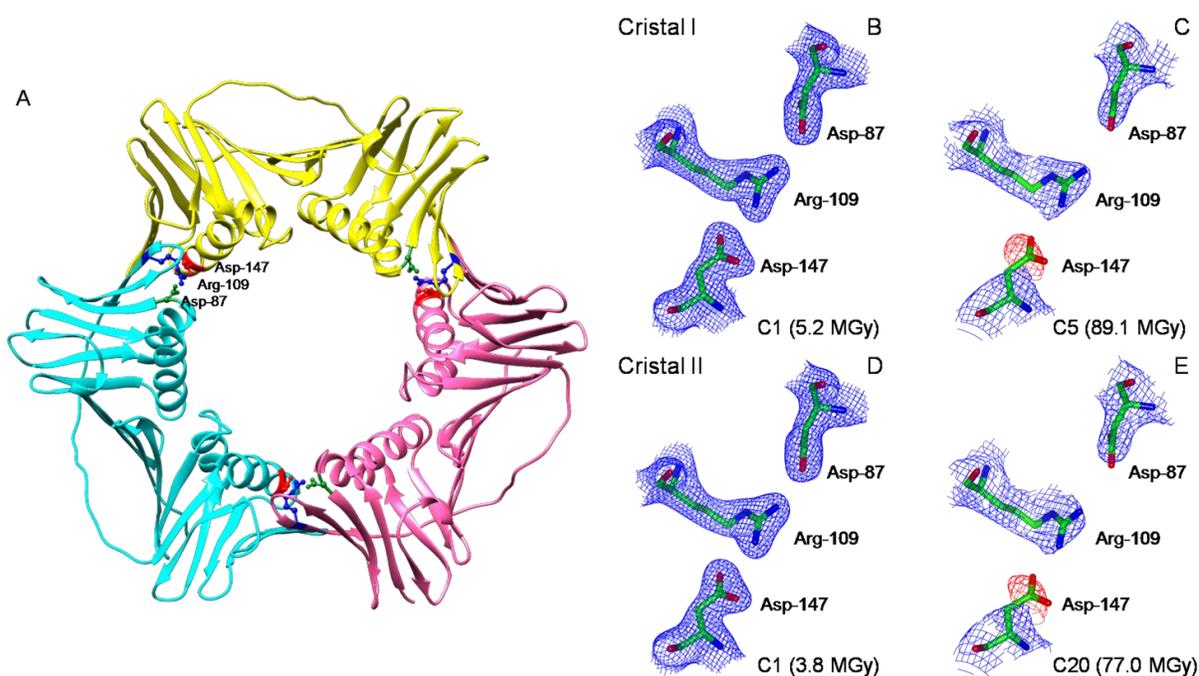


Figura 14. Daño específico en Asp-147 y Asp-87. Se muestra un diagrama de cintas de la estructura PCNA_{Tg} homotrimerica (A), representando en cada protómero (amarillo, cian, rosa) con modelos de barras y esferas los residuos aminoácidos Asp-147 (rojo), Asp-87 (verde) y Arg-109 (azul). Los residuos aminoácidos Asp-147 y Asp-87 comparten un puente salino con la Arg-109 que brinda protección a la dosis de radiación de la primera colecta de los cristales PCNA_{Tg} (B, D), pero favorece la protección de la interacción intramolecular (Asp-87–Arg-109, 2.7 Å) sobre la interacción intermolecular (Asp-147–Arg-109, 2.9 Å) a la dosis de radiación de la última colecta (C, E). Diagrama de cintas realizado empleando UCSF Chimera (PDB 7N5I) y representaciones realizadas empleando CCP4mg (cristal I: PDB 7N5I y 7N5J, cristal II: PDB 7N5K y 7N5L) con los mapas de densidad electrónica $2F_o - F_c$ (azul) y $F_o - F_c$ (rojo) contorneados a 1.0σ y -3.5σ respectivamente.

Cristal I								
B		A			C		B	
Glu-143	3.9	Arg-82	Glu-143	2.7	Arg-82	Glu-143	2.7	Arg-82
	3.2			2.5			2.6	
	2.6			2.9			2.9	
	2.4	Lys-84		3.8	Lys-84		3.8	Lys-84
	3.8			2.5			2.5	
	3.5	Arg-109		3.4	Arg-109		3.6	Arg-109
Asp-147	3.5	Arg-109	Asp-147	3.2	Arg-82	Asp-147	3.3	Arg-82
	3.1			3.9	Arg-109		4.0	Arg-109
Glu-174	3.9	Arg-112		3.5			3.4	
	3.5			2.9			2.9	
	2.9		Glu-174	3.8	Arg-112	Glu-174	3.6	Arg-112
				3.6		Glu-176	4.0	Arg-112
				2.4				
Puente sal	11			13			12	
Puente H (no listado)	8			9			9	

Cristal II								
B		A			C		B	
Glu-143	3.4	Arg-82	Glu-143	2.8	Arg-82	Glu-143	2.5	Arg-82
	2.7			2.6			2.6	
	2.4	Lys-84		2.7			2.6	
	3.8			3.8	Lys-84		3.7	Lys-84
	3.4	Arg-109		2.6			2.5	
Asp-147	3.5	Arg-109		3.3	Arg-109		3.4	Arg-109
	2.9		Asp-147	3.1	Arg-82	Asp-147	3.2	Arg-82
Glu-174	2.8	Arg-112		4.0	Arg-109		3.9	Arg-109
	3.6			3.5			3.4	
				2.9			2.8	
			Glu-174	3.7	Arg-112	Glu-174	3.5	Arg-112
				2.4		Glu-176	3.5	Arg-112
				3.7				
Puente sal	9			13			12	
Puente H (no listado)	8			10			9	

Cristal III								
B		A			C		B	
Glu-143	3.7	Arg-82	Glu-143	3.7	Arg-82	Glu-143	3.7	Arg-82
	3.0			3.0			3.0	
	2.2			2.2			2.2	
	2.6	Lys-84		2.6	Lys-84		2.6	Lys-84
	3.8			3.8			3.8	
	3.5	Arg-109		3.5	Arg-109		3.5	Arg-109
Asp-147	3.9	Arg-109	Asp-147	3.9	Arg-109	Asp-147	3.9	Arg-109
	3.3			3.3			3.3	
	2.9			2.9			2.9	
Glu-174	3.9	Arg-112	Glu-174	3.9	Arg-112	Glu-174	3.9	Arg-112
	3.8			3.8			3.8	
	2.9			2.9			2.9	
Puente sal	12			12			12	
Puente H (no listado)	10			10			10	

Figura 15. Interfaces de los trímeros PCNA_{Tg}. Las interfaces de los trímeros PCNA_{Tg} analizados empleando PISA se representan para los respectivos cristales (colecta C1), listando las distancias correspondientes a los puentes salinos ($d \leq 4.0 \text{ \AA}$), además indicando los números de puentes salinos y puentes de hidrógeno (no listado).

Considerando la naturaleza y localización de los residuos que sufren más daño (residuos con carga negativa), la interacción entre residuos con carga positiva de la superficie interna del trímero PCNA_{Tg} y grupos fosfato del DNA no sería afectada, ni la interacción con otras proteínas involucradas en el metabolismo genómico a través del IDCL. La localización de los residuos ácidos descarboxilados tampoco afectaría la repulsión de la superficie externa del trímero PCNA_{Tg}, lo cual impide interacciones inespecíficas con el DNA. Aunque el Asp-147 descarboxilado se localiza en las interfaces (Fig. 14), la red de puentes de hidrógeno y puentes salinos logra mantener la estabilidad del trímero PCNA_{Tg} en el arreglo cristalino (Fig. 15).

El daño específico causado por los rayos X a la estructura molecular de una proteína cristalizada es de naturaleza química, y sigue una secuencia de eventos característica en la cual se han descrito la reducción de centros metálicos, el daño de sitios catalíticos, la ruptura de puentes disulfuro, la descarboxilación de residuos ácidos y el daño del grupo tiometilo en metioninas.^{30,31,33,36} Resulta interesante que la proteína PCNA_{Tg} no tiene centros metálicos, ni sitios catalíticos, carece de cisteínas, y el comportamiento de los residuos aspartato y glutamato es modulado por sus interacciones químicas.

5.3. Análisis Bioinformático

Intentando entender y contextualizar los resultados obtenidos por cristalografía de rayos X, se realizó un análisis bioinformático para estructuras PCNA homotriméricas representativas, resultando 12 secuencias de aminoácidos con sus respectivas estructuras moleculares, seis corresponden a cinco especies de arqueas (cuatro hipertermófilos, un halófilo) y seis corresponden a cinco especies de eucariontes, una de las especies de cada dominio con dos proteínas reportadas (Tabla 6).

El alineamiento múltiple de secuencias PCNA arrojó un porcentaje de identidad global muy bajo (3.7%), lo cual muestra que es una proteína con secuencia poco conservada, mientras que la superposición de las respectivas estructuras moleculares arrojó un valor RMSD global muy significativo (1.29 Å), lo cual revela, en claro contraste con el alineamiento de secuencias, que a pesar de la variedad de residuos el plegamiento se mantiene, y por lo tanto es una proteína con estructura altamente conservada (Fig. 16, Tablas 7 y 8).

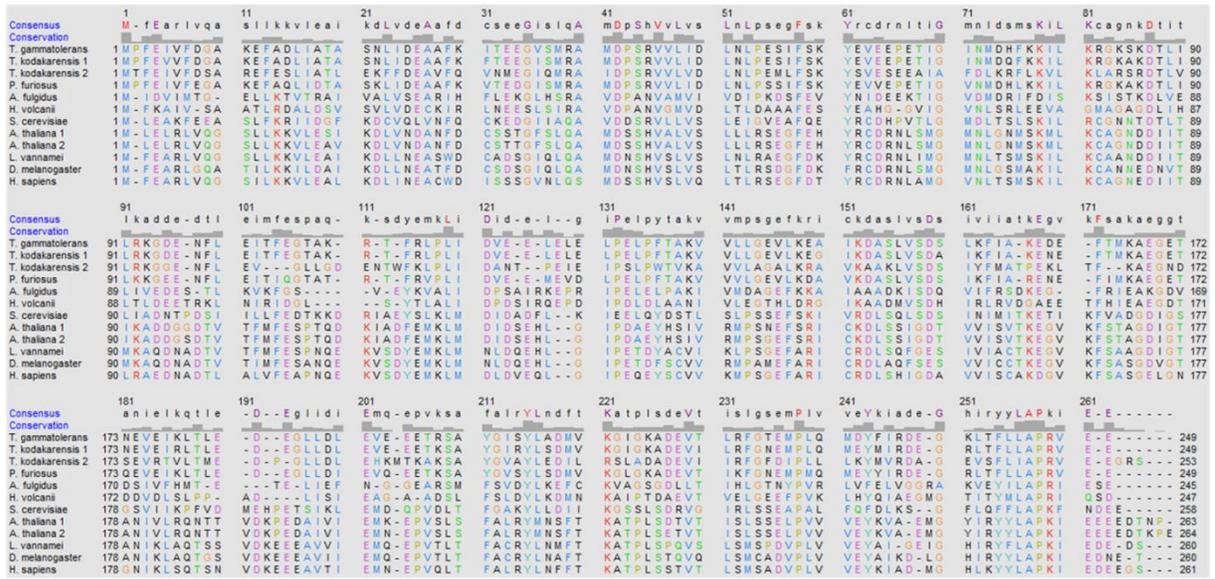
Tabla 6. Características de las proteínas PCNA contempladas en el análisis bioinformático.

Secuencia (UniProt)	Proteína PCNA	Aminoácidos (N°)	PM (kDa)	pI	Estructura (PDB)	Resolución (Å)
C5A5N6	<i>T. gammatolerans</i>	249	28	4.44	5A6D	2.80
Q5JF32	<i>T. kodakarensis 1</i>	249	28	4.47	3LX1	2.00
Q5JFD3	<i>T. kodakarensis 2</i>	253	28	4.82	3LX2	2.40
O73947	<i>P. furiosus</i>	249	28	4.54	1GE8	2.10
O29912	<i>A. fulgidus</i>	245	27	4.88	1RWZ	1.80
D0VWY8	<i>H. volcanii</i>	247	27	4.20	3IFV	2.00
P15873	<i>S. cerevisiae</i>	258	29	4.42	1PLQ	2.30
Q9M7Q7	<i>A. thaliana 1</i>	263	29	4.60	2ZVV	2.00
Q9ZW35	<i>A. thaliana 2</i>	264	29	4.58	2ZVW	2.50
G1E6N7	<i>L. vannamei</i>	260	29	4.59	4CS5	3.00
P17917	<i>D. melanogaster</i>	260	29	4.67	4HK1	2.00
P12004	<i>H. sapiens</i>	261	29	4.57	1U7B	1.88

El código de secuencia (UniProt) de 12 secuencias de aminoácidos, incluyendo el número de aminoácidos (N°), el peso molecular (kDa) y el punto isoeléctrico teórico (pI) obtenidos con la herramienta ProtParam del portal ExPASy, así como también el código de estructura (PDB) y la resolución (Å) de 12 estructuras moleculares seleccionadas, seis corresponden a cinco especies de arqueas y seis corresponden a cinco especies de eucariontes, una de las especies de cada dominio con dos proteínas reportadas.

La composición de residuos aminoácidos de PCNA a través de los ejemplos es notablemente diversa (Fig. 16), y se puede observar que el número promedio de residuos en arqueas (249) es menor que en eucariontes (261) en este análisis (Tabla 6). El porcentaje promedio de residuos polares en arqueas (19%) es menor que en eucariontes (29%), mientras que el porcentaje de residuos no polares parece bastante uniforme (Fig. 17). La proporción de residuos aromáticos muestra algunas diferencias claras, con las arqueas presentando los valores extremos (Fig. 17). Una secuencia de aminoácidos más corta es una característica que ha sido asociada con proteínas más compactas y estables a altas temperaturas,^{20,75} lo cual sugiere entonces una mayor estabilidad de la PCNA de arqueas. El número de aminoácidos de la PCNA_{Tg} (249) y su porcentaje de residuos polares (19%) se encuentran justo en los valores promedio de las arqueas analizadas.

A



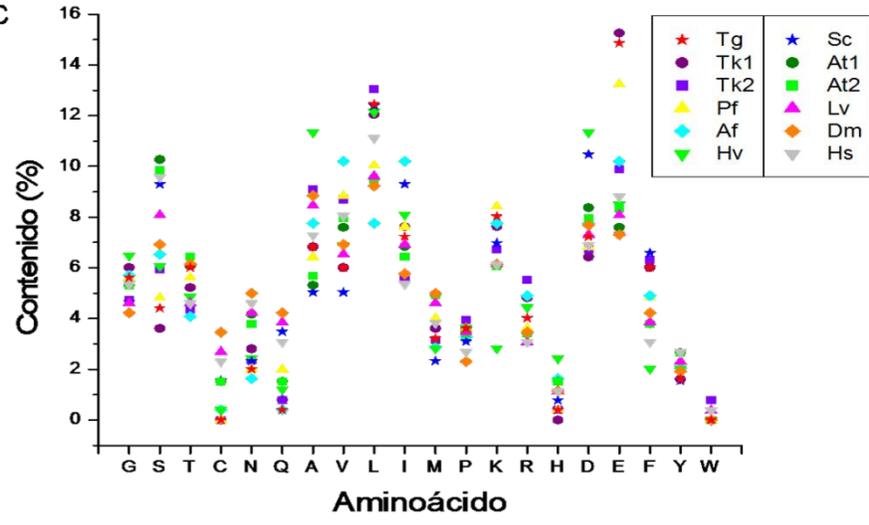
B



Arqueas

Tg: *T. gammatolerans*
 Tk1: *T. kodakarensis 1*
 Tk2: *T. kodakarensis 2*

C



Eucariontes

Sc: *S. cerevisiae*
 At1: *A. thaliana 1*
 At2: *A. thaliana 2*
 Lv: *L. vannamei*
 Dm: *D. melanogaster*
 Hs: *H. sapiens*

Figura 16. Secuencia, estructura y composición de aminoácidos de PCNA. Se muestra el alineamiento múltiple de secuencias (A), indicando en la parte superior los pocos residuos aminoácidos completamente conservados (códigos de letra rojos), y el diagrama de cintas de la superposición estructural (B) realizados empleando UCSF Chimera, así como también se representa la composición de residuos aminoácidos de 12 proteínas PCNA (C), seis corresponden a cinco especies de arqueas y seis corresponden a cinco especies de eucariontes, una de las especies de cada dominio con dos proteínas reportadas.

Tabla 7. Identidad de secuencias de las proteínas PCNA contempladas en el análisis bioinformático.

PCNA	<i>Tg</i>	<i>Tk1</i>	<i>Tk2</i>	<i>Pf</i>	<i>Af</i>	<i>Hv</i>	<i>Sc</i>	<i>At1</i>	<i>At2</i>	<i>Lv</i>	<i>Dm</i>	<i>Hs</i>
<i>Hs</i>	27	27	21	25	24	25	36	65	66	74	71	100
<i>Dm</i>	25	26	20	25	21	22	36	62	62	81	100	
<i>Lv</i>	25	26	21	24	22	23	39	66	67	100		
<i>At2</i>	22	23	19	23	24	26	40	97	100			
<i>At1</i>	23	24	19	23	24	26	40	100				
<i>Sc</i>	29	28	25	29	22	20	100					
<i>Hv</i>	33	34	29	34	37	100						
<i>Af</i>	30	29	27	29	100							
<i>Pf</i>	83	84	53	100								
<i>Tk2</i>	54	55	100									
<i>Tk1</i>	92	100										
<i>Tg</i>	100											

Arqueas

Tg: *T. gammatolerans*
Tk1: *T. kodakarensis 1*
Tk2: *T. kodakarensis 2*

Pf: *P. furiosus*
Af: *A. fulgidus*
Hv: *H. volcanii*

Eucariontes

Sc: *S. cerevisiae*
At1: *A. thaliana 1*
At2: *A. thaliana 2*
Lv: *L. vannamei*
Dm: *D. melanogaster*
Hs: *H. sapiens*

La identidad (%) entre pares de secuencias de aminoácidos de 12 proteínas PCNA, seis corresponden a cinco especies de arqueas y seis corresponden a cinco especies de eucariontes, una de las especies de cada dominio con dos proteínas reportadas.

Tabla 8. RMSD entre estructuras de las proteínas PCNA contempladas en el análisis bioinformático.

PCNA	<i>Tg</i>	<i>Tk1</i>	<i>Tk2</i>	<i>Pf</i>	<i>Af</i>	<i>Hv</i>	<i>Sc</i>	<i>At1</i>	<i>At2</i>	<i>Lv</i>	<i>Dm</i>	<i>Hs</i>
<i>Hs</i>	1.19	1.21	1.26	1.27	1.52	1.53	0.98	0.80	0.78	0.78	0.88	-
<i>Dm</i>	1.23	1.44	1.43	1.43	1.60	1.63	1.22	0.87	0.83	0.55	-	
<i>Lv</i>	1.27	1.41	1.42	1.43	1.58	1.66	1.12	0.85	0.83	-		
<i>At2</i>	1.30	1.50	1.47	1.52	1.69	1.63	1.04	0.28	-			
<i>At1</i>	1.37	1.55	1.50	1.59	1.76	1.69	1.08	-				
<i>Sc</i>	1.45	1.46	1.56	1.52	1.76	1.72	-					
<i>Hv</i>	1.17	1.37	1.24	1.25	1.28	-						
<i>Af</i>	1.29	1.38	1.43	1.28	-							
<i>Pf</i>	0.77	0.40	0.88	-								
<i>Tk2</i>	0.92	0.96	-									
<i>Tk1</i>	0.81	-										
<i>Tg</i>	-											

Arqueas

Tg: *T. gammatolerans*
Tk1: *T. kodakarensis 1*
Tk2: *T. kodakarensis 2*

Pf: *P. furiosus*
Af: *A. fulgidus*
Hv: *H. volcanii*

Eucariontes

Sc: *S. cerevisiae*
At1: *A. thaliana 1*
At2: *A. thaliana 2*
Lv: *L. vannamei*
Dm: *D. melanogaster*
Hs: *H. sapiens*

El RMSD (Å) entre pares de estructuras cristalinas (cadena A) de 12 proteínas PCNA, seis corresponden a cinco especies de arqueas y seis corresponden a cinco especies de eucariontes, una de las especies de cada dominio con dos proteínas reportadas.

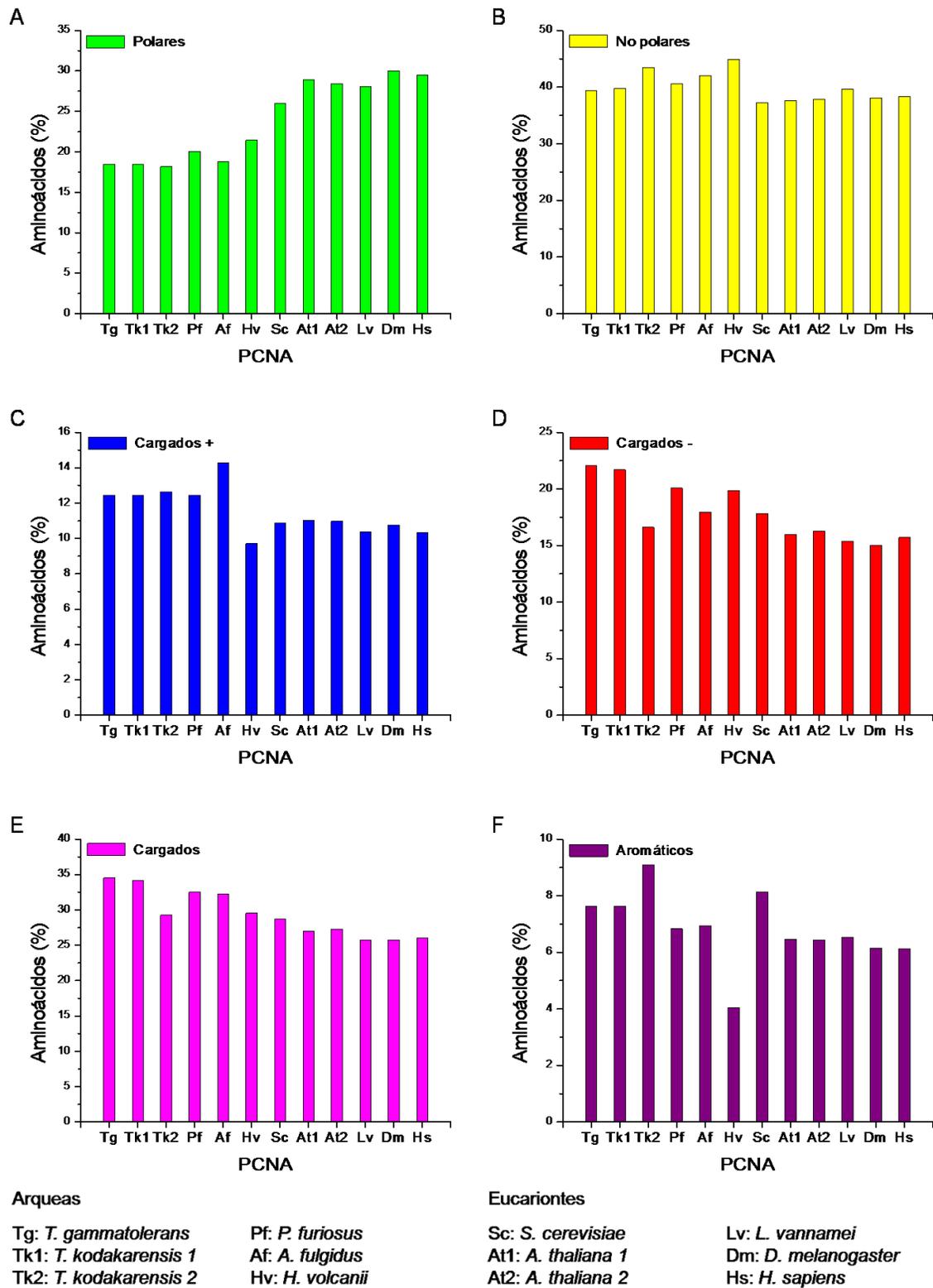


Figura 17. Composición de aminoácidos de PCNA. La composición de residuos aminoácidos de 12 proteínas PCNA se representa de acuerdo con una clasificación general de aminoácidos: polar (A), no polar (B), cargado + (C), cargado - (D), cargado (E) y aromático (F).

El porcentaje promedio de residuos con carga positiva en arqueas es mayor que en eucariontes, aun cuando un arquea (halófilo) muestra el menor porcentaje (Fig. 17). Además, el porcentaje promedio de residuos con carga negativa en arqueas es mayor que en eucariontes, con las proteínas PCNA_{Tg} y PCNA-1 de *Thermococcus kodakarensis* (PCNA_{Tk1}) mostrando el mayor porcentaje (22%). Consecuentemente, el porcentaje promedio de residuos cargados totales en arqueas (32%) es mayor que en eucariontes (27%), con la PCNA_{Tg} presentando el mayor porcentaje (35%). Este patrón de intercambio se encuentra reportado en la literatura, un patrón según el cual las proteínas de organismos termófilos muestran tendencia a tener menor proporción de residuos polares, a cambio de mayor proporción de residuos cargados, los cuales permiten formar interacciones electrostáticas que brindan mayor estabilidad a las altas temperaturas en las que dichos organismos prosperan.^{20,75,76,77}

Examinando con detalle la proporción de residuos con carga negativa en la PCNA analizada (Fig. 18), resulta interesante que en eucariontes el porcentaje promedio de glutamato es casi equivalente al de aspartato (8%), mientras que en arqueas el porcentaje promedio de glutamato (12.0%) es mayor que el de aspartato (7.7%), aun cuando un arquea (halófilo) muestra una tendencia inversa. El mayor porcentaje de glutamato con valores casi iguales lo presentan las proteínas PCNA_{Tg} y PCNA_{Tk1} (15%), si bien el porcentaje de aspartato en la PCNA_{Tg} (7.2%) es un poco mayor que en la PCNA_{Tk1} (6.4%), y por lo tanto el porcentaje de residuos con carga negativa en la PCNA_{Tg} es ligeramente mayor que en la PCNA_{Tk1}. De acuerdo con resultados publicados, entre los residuos con carga negativa, las proteínas de organismos termófilos muestran tendencia a tener mayor proporción de glutamato que aspartato,^{20,75} una característica que parece favorecer su estabilidad.^{78,79}

Otro detalle interesante es la escasa presencia de cisteínas y triptófanos en la PCNA analizada (Fig. 16), entre las cuales la PCNA_{Tg} carece de cisteínas y triptófanos. La cisteína es un aminoácido susceptible a sufrir oxidación a altas temperaturas y por lo tanto se encuentra con menor frecuencia en proteínas de organismos termófilos,^{20,75} además de que es conocido que los puentes disulfuro son especialmente sensibles al daño por radiación.^{30,31,32,33} La ausencia de cisteínas en la PCNA_{Tg} podría ser entonces no solo una ventaja a altas temperaturas sino también frente al daño por radiación.

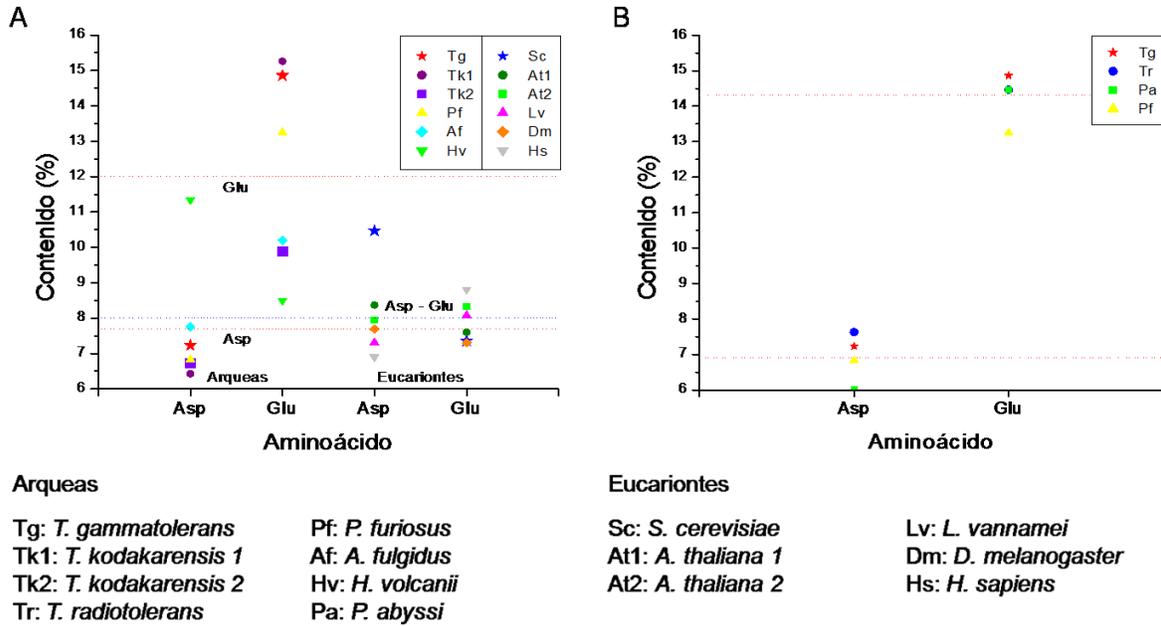


Figura 18. Proporción de residuos con carga negativa en PCNA. Se representa la proporción de residuos con carga negativa (Asp y Glu) en la PCNA contemplada en el análisis bioinformático (A), así como también en la PCNA de cuatro especies de arqueas radiorresistentes (B), indicando los porcentajes promedio en arqueas (líneas punteadas rojas, panel A: Asp 7.7% y Glu 12.0%, panel B: Asp 6.9% y Glu 14.3%) y eucariontes (línea punteada azul, panel A: Asp-Glu 8%).

El número de puentes de hidrógeno calculado para los 12 trímeros PCNA es bastante uniforme, mientras que el número de puentes de hidrógeno intermoleculares muestra algunas variaciones claras, con el mismo eucarionte presentando el valor más bajo en ambos casos (Fig. 19). El número de interacciones catión- π calculado para los 12 trímeros PCNA es bastante variable, especialmente entre las arqueas, una de las cuales posee el mayor número, en tanto que un arquea y un eucarionte no tienen este tipo de interacción (Fig. 19), además de que ningún trímero PCNA posee interacciones catión- π intermoleculares. La carga neta para los 12 trímeros PCNA es negativa (pI teórico ácido), aunque algunas arqueas presentan valores muy negativos (Fig. 19).

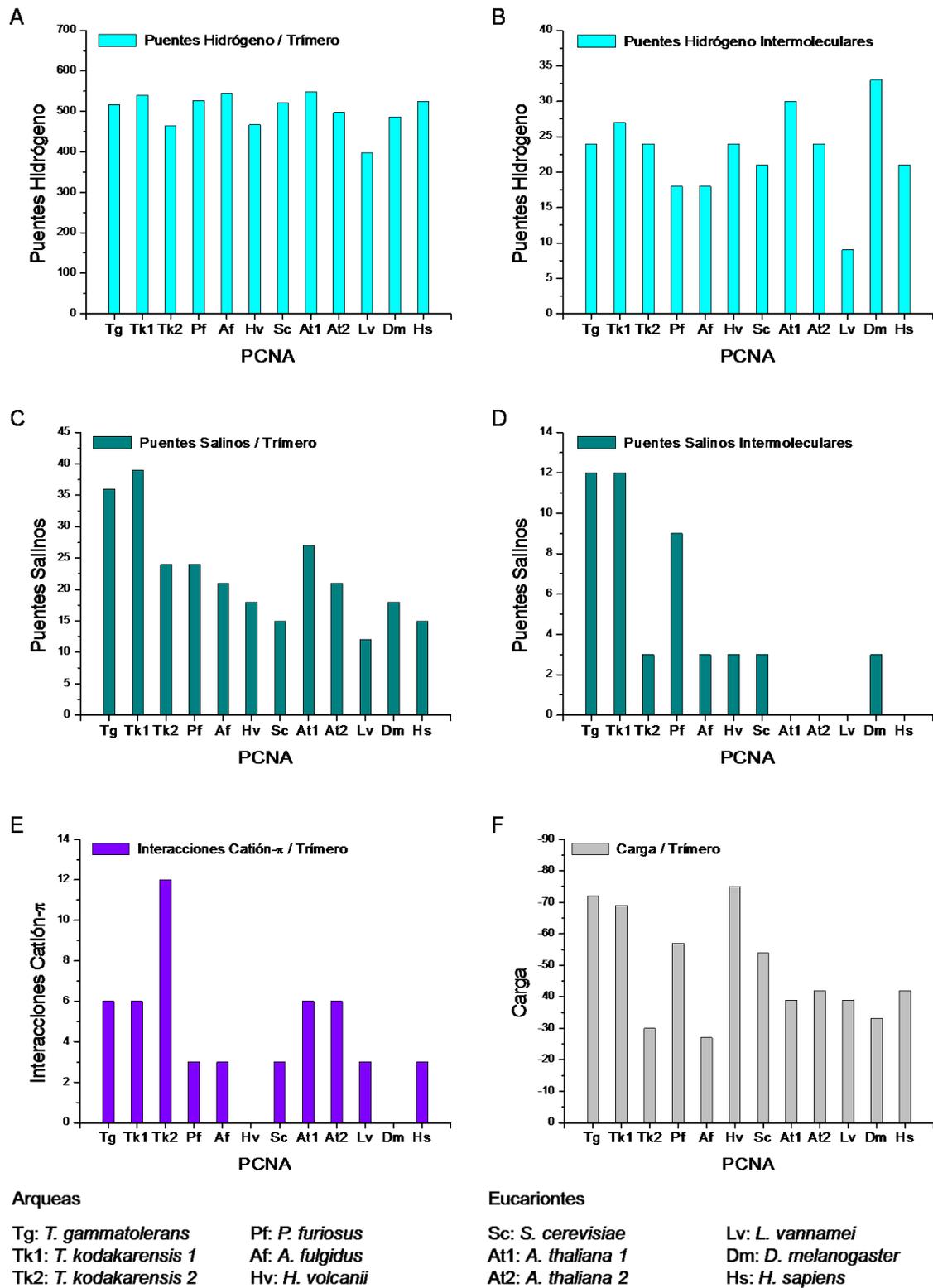


Figura 19. Interacciones moleculares y carga neta de PCNA. Se representan los números de puentes de hidrógeno (A, B), puentes salinos (C, D) e interacciones catión- π (E) determinados empleando UCSF Chimera, VMD y CaPTURE respectivamente, así como la carga neta (F) de 12 trímeros PCNA.

Parece razonable que la PCNA del arquea (halófilo) con el menor porcentaje de residuos con carga positiva (la mayor carga neta negativa) no tenga interacciones catión- π (Figs. 17 y 19). También parece razonable que el número de interacciones catión- π muestre concordancia con el número de residuos aromáticos, ya que la PCNA de arqueas con la mayor presencia o ausencia de este tipo de interacción, también poseen la mayor o menor proporción de residuos aromáticos respectivamente (Figs. 17 y 19).

Si bien el número de puentes salinos calculado para los 12 trímeros PCNA no muestra una tendencia clara, el número promedio en arqueas (27) es mayor que en eucariontes (18), además de que todos los trímeros PCNA de arqueas tienen puentes salinos intermoleculares (Fig. 19). El mayor número de puentes salinos intermoleculares lo comparten los trímeros PCNA_{Tg} y PCNA_{Tkl} (12), mientras que solamente los trímeros PCNA de dos eucariontes poseen puentes salinos intermoleculares, por lo que en efecto el número promedio en arqueas es mayor que en eucariontes. Se ha propuesto que las proteínas termófilas tienden a tener más puentes salinos que las proteínas mesófilas, un resultado que concuerda con el patrón de intercambio ya mencionado en el que una mayor proporción de residuos cargados, a expensas de residuos polares, favorece la formación de interacciones electrostáticas,^{20,75,76,77} lo cual resultaría en mayor estabilidad estructural de los trímeros PCNA de arqueas.

La PCNA_{Tg} tiene un número de aminoácidos (249) y un porcentaje de residuos polares (19%) justo en los valores promedio de las arqueas analizadas. Sin embargo, cabe señalar que tiene el mayor porcentaje de residuos cargados (35%), mayoritariamente residuos con carga negativa (22%), con una proporción de glutamato (15%) más del doble que aspartato (7%), una carga neta negativa muy alta, carencia de cisteínas y triptófanos, además de un alto número de puentes salinos en el trímero (intra e intermoleculares). Las características descritas respaldan una mayor estabilidad estructural de la PCNA de arqueas y sugieren que la PCNA_{Tg} es la proteína más estable entre los ejemplos de este análisis (Fig. 20).

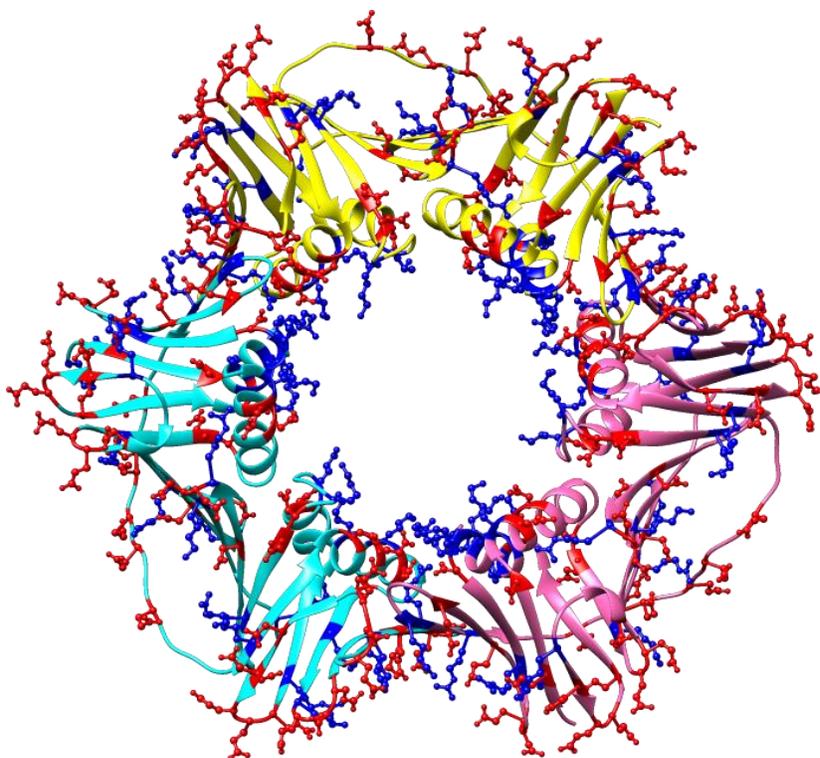


Figura 20. Estructura de la proteína PCNA_{Tg} con residuos cargados. Se muestra un diagrama de cintas de la estructura molecular del homotrímero de la proteína PCNA_{Tg} realizado empleando UCSF Chimera (PDB 7N5I), representando en cada protómero (amarillo, cian, rosa) con modelos de barras y esferas los residuos aminoácidos con carga negativa (rojo) y positiva (azul).

5.4. Arqueas Radiorresistentes

Además de *T. gammatolerans*,^{14,15,16} es conocido que otras arqueas hipertermófilas de los géneros *Thermococcus* (*T. radiotolerans*, *T. marinus*, *T. stetteri*) y *Pyrococcus* (*P. furiosus*, *P. abyssi*) también pueden resistir altos niveles de radiación ionizante.^{80,81,82,83} No obstante, solo se encuentran reportadas las secuencias PCNA de *T. radiotolerans*, *P. furiosus* y *P. abyssi*,⁵⁵ entre las cuales la estructura PCNA de *P. furiosus*⁴⁰ ya ha sido contemplada en el análisis bioinformático realizado en este estudio (Figs. 16–19, 21). Resulta interesante que la PCNA_{Tg} comparte un alto porcentaje de identidad con las secuencias PCNA de *T. radiotolerans* (89%), *P. furiosus* (83%) y *P. abyssi* (82%), así como también el más bajo valor RMSD con la estructura PCNA de *P. furiosus* (0.77 Å). Adicionalmente, estas cuatro proteínas PCNA tienen el mismo número de residuos (249) y una composición de aminoácidos similar en la que destaca un porcentaje de glutamato mayor que aspartato (Fig. 18), así como también la ausencia de cisteínas y triptófanos.

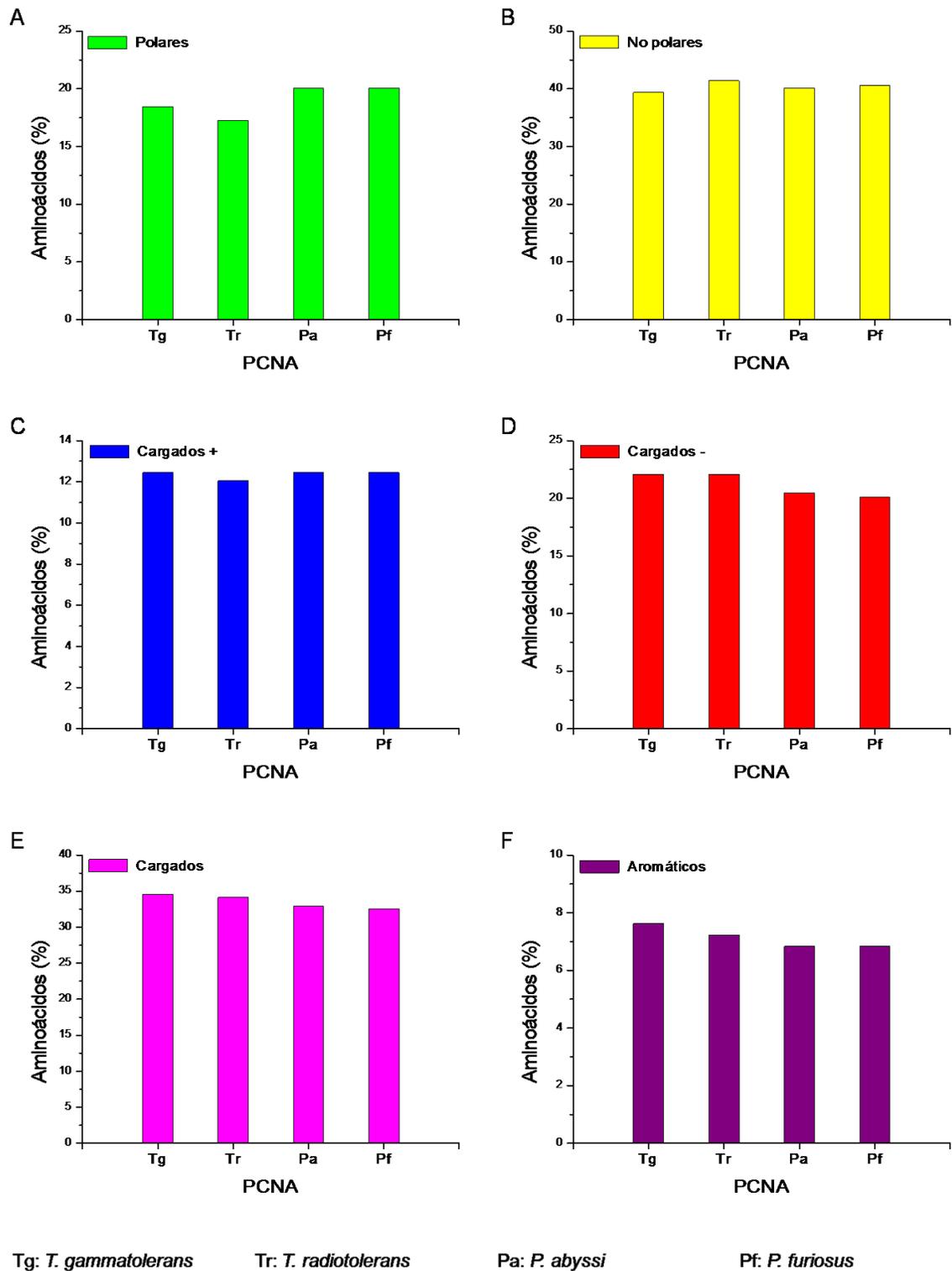


Figura 21. Composición de aminoácidos de PCNA de arqueas radiorresistentes. La composición de residuos aminoácidos de la PCNA de cuatro especies de arqueas radiorresistentes se representa de acuerdo con una clasificación general de aminoácidos: polar (A), no polar (B), cargado + (C), cargado - (D), cargado (E) y aromático (F).

Aunque los mecanismos moleculares que confieren radiorresistencia no están claros, los estudios sugieren que los organismos radiorresistentes requieren sistemas de reparación del DNA altamente eficientes,^{25,84,85,86} lo cual les permite enmendar el DNA fragmentado, efecto de letales rupturas de doble cadena (DSB) causadas por acumulación sucesiva de rupturas de simple cadena (SSB).^{87,88} Se sabe que la susceptibilidad del DNA al daño por radiación es similar para distintos tipos celulares, ya que la tasa de DSB en el genoma (DSB/Gy·Mbp) es poco variable para diversos organismos, tanto sensibles como resistentes expuestos a radiación ionizante (~0.01 DSB/Gy·Mbp), lo cual significa que organismos con genomas pequeños sufren menor número de DSB para una dosis de radiación dada, y que la radiorresistencia parece estar determinada por su capacidad para preservar la funcionalidad de los sistemas de reparación del DNA.^{87,88}

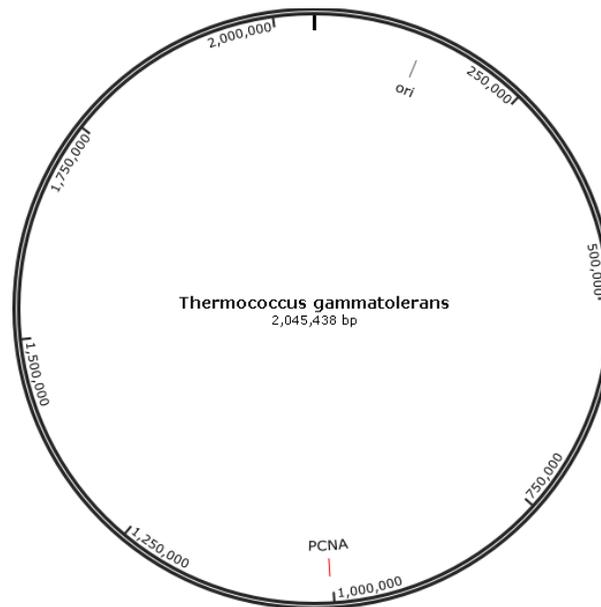


Figura 22. Mapa del cromosoma de *Thermococcus gammatolerans*. El genoma de *T. gammatolerans* se encuentra en un único cromosoma circular (~2 Mbp), el cual presenta 2157 secuencias codificantes entre las que se indica el locus correspondiente al gen que codifica la proteína PCNA.

Los estudios realizados con arqueas hipertermófilas anaeróbicas (*T. gammatolerans*, *P. furiosus*, *P. abyssi*) también sugieren que las proteínas implicadas en sus procesos de replicación y reparación del DNA permanecen funcionales después de exposición a radiación ionizante, y parecen ser expresadas constitutivamente, además de que estos microorganismos tienen genomas relativamente pequeños (~2 Mbp) y no poseen mecanismos específicos de

protección del DNA (Fig. 22).^{15,81,82} Adicionalmente, las condiciones de crecimiento anaeróbicas pueden aliviar el efecto del oxígeno, lo cual implica bajos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) producto de la radiólisis del agua, y por lo tanto menos daño oxidativo inducido por la radiación ionizante (Fig. 23).⁸³ Los mecanismos involucrados en mantener la integridad y estabilidad del DNA frente al daño causado por estrés oxidativo a altas temperaturas son determinantes en la supervivencia,⁸³ y por lo tanto la radiorresistencia que muestran las arqueas hipertermófilas podría ser consecuencia de la adaptación de la vida a altas temperaturas.^{25,84,85,86}

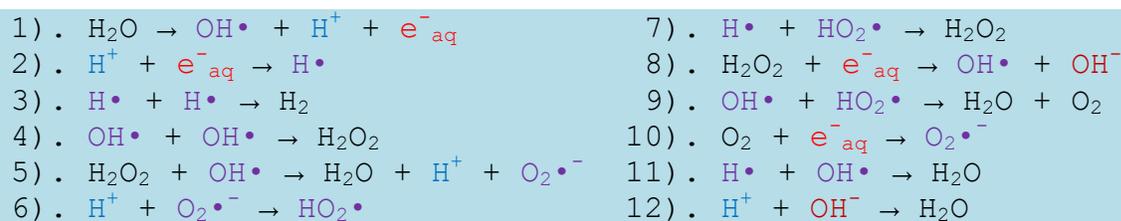


Figura 23. Reacciones típicas de la radiólisis del agua. La radiación ionizante causa la radiólisis de las moléculas de agua (H_2O) dando como resultado especies reactivas de oxígeno (ROS) en una cascada de reacciones que generan radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), perhidroxilo ($\text{HO}_2\cdot$) y superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), así como también átomos de hidrógeno ($\text{H}\cdot$), protones (H^+), aniones hidróxido (OH^-), moléculas de hidrógeno (H_2), oxígeno (O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y electrones hidratados (e^-_{aq}).

5.5. Matriz Cristalina

Aunque hay una gran cantidad de reportes acerca de lo que se denominan *scavengers*,^{30,89,90,91} moléculas que actúan como “drenadores” y por lo tanto tienen un efecto protector frente a los radicales producto de la radiólisis causada por la radiación ionizante, los resultados suelen ser contradictorios y las características fisicoquímicas que requieren dichas moléculas parecen ser dejadas de lado en la literatura cristalográfica. Los *scavengers* (p. ej. antioxidantes fenólicos) actúan “drenando” radicales de tal manera que ceden los electrones de hidrógenos con baja energía de disociación de enlace, lo que facilita la separación del hidrógeno y la formación de un nuevo radical, el cual debe ser relativamente estable y conservar su estructura química para que logre detener la reacción en cadena (mecanismo de ruptura de cadena),⁹² de lo contrario actuaría propagando la reacción en cadena como cualquier otra molécula (Fig. 24).



Figura 24. Mecanismo de ruptura de cadena de un *scavenger*. Ante la presencia de un radical ($R\bullet$), el *scavenger* (AH) cede un átomo de hidrógeno (H) para desactivarlo (RH) y a la vez forma un nuevo radical ($A\bullet$), el cual debe ser relativamente estable para que pueda desactivar otro radical ($R\bullet$) y logre detener la reacción en cadena (RA).

El comportamiento de un cristal $PCNA_{Tg}$ frente al daño por radiación depende entonces de la composición de residuos aminoácidos de la proteína y sus interacciones, así como también de los componentes (iones, moléculas) acarreados durante el proceso de cristalización a la matriz cristalina. Sin embargo, las condiciones empleadas en el crecimiento y cosecha de los cristales $PCNA_{Tg}$ carecen de componentes que cumplan las características fisicoquímicas de un *scavenger*,⁹² además de que no hay reportes concluyentes de que alguno de los componentes usados pueda actuar como tal,^{89,90,91} por lo tanto la secuencia $PCNA_{Tg}$ parece ser la única responsable del comportamiento descrito en este estudio.

5.6. Alcance Biológico

Aunque la proteína $PCNA_{Tg}$ en el arreglo cristalino no se encuentra en la misma condición que en una célula, el alto contenido de solvente de estos cristales (53–55%) y las interacciones que generan una red 3D de trímeros $PCNA_{Tg}$ en el cristal podría no estar tan lejos de la congestionada red de interacciones moleculares en una célula. También cabe señalar que si bien hay reportes de chimeneas hidrotermales submarinas que emiten radiación natural debido a la presencia de isótopos radiactivos (^{210}Pb , ^{210}Po , ^{222}Rn),¹⁴ lo cierto es que los más altos niveles de radiación ionizante en la naturaleza están varios órdenes de magnitud debajo de los niveles de radiación que *T. gammatolerans* soporta en condiciones de laboratorio, y mucho más debajo aún de los niveles de radiación alcanzados en este estudio estructural.

Resulta también muy sugerente que la $PCNA_{Tg}$ tenga un alto porcentaje de residuos con carga negativa (22%), con una proporción de glutamato (15%) más del doble que aspartato (7%), los cuales son especies químicas altamente oxidadas con la entalpía estándar de formación (ΔH_f°) más exotérmica entre todos los aminoácidos (Fig. 25),⁹³ justo el valor del glutamato más exotérmico que el valor del aspartato, residuos que además tienen la capacidad de formar puentes salinos, lo cual puede hacerlos aún más estables. La ausencia de triptófano, el

aminoácido con el valor menos exotérmico,⁹³ aunque no es una característica exclusiva de la PCNA_{Tg}, ni de la PCNA de arqueas radorresistentes analizadas en este estudio (es el aminoácido menos frecuente en proteínas), parece que estos rasgos no han sido seleccionados aleatoriamente por la naturaleza.

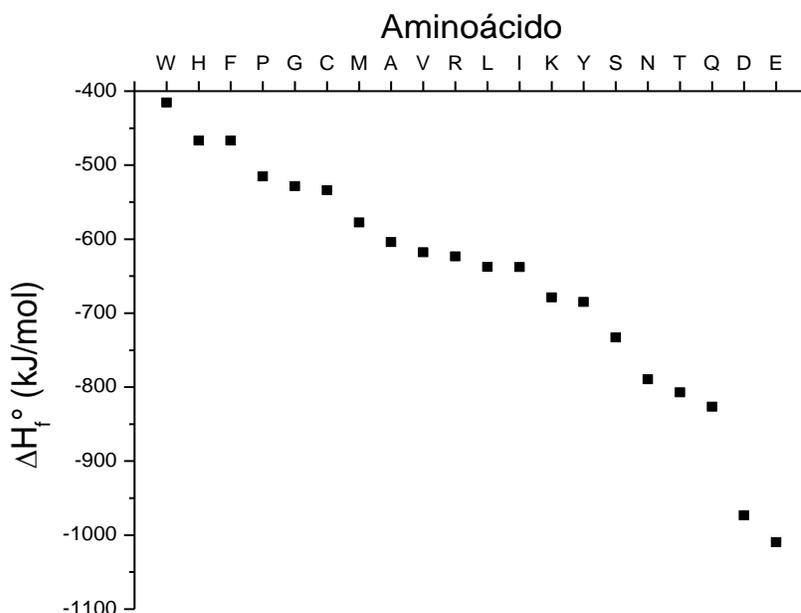


Figura 25. Entalpía estándar de formación de los aminoácidos. Los valores de entalpía estándar de formación (ΔH_f°) de los 20 aminoácidos canónicos se grafican en orden ascendente según su potencial exotérmico, desde el menos exotérmico (triptófano) hasta el más exotérmico (glutamato).

Según un análisis proteómico reportado, dos proteínas que formarían una enzima glutamato deshidrogenasa putativa, la cual está implicada en el metabolismo del glutamato, se encuentran entre las tres proteínas más abundantes detectadas en cualquier fase de crecimiento de *T. gammatolerans*.¹⁶ También se ha reportado que el aspartato y el glutamato se encuentran entre los aminoácidos más resistentes a la radiación ionizante, mientras que la cisteína se encuentra entre los menos resistentes,⁹⁴ así como también que los residuos aspartato y glutamato involucrados en la formación de puentes salinos son menos afectados, e incluso pueden ser completamente resistentes al daño por radiación.³⁷ Adicionalmente, el glutamato se ha propuesto como un dosímetro de radiación γ debido a la estabilidad de los radicales que se generan durante su exposición a radiación ionizante.⁹⁵

El estudio estructural de la PCNA_{Tg} mediante cristalografía de rayos X revela que se trata de una proteína con la capacidad intrínseca de resistir altos niveles de radiación ionizante. Dado que todas las proteínas disponen esencialmente del mismo repertorio de aminoácidos e interacciones, parece estar claro que sus propiedades dependen de un complejo balance de estos factores,^{20,75,76} además de que se ha sugerido que la radiorresistencia que muestran las arqueas hipertermófilas podría ser consecuencia de la adaptación de la vida a altas temperaturas.^{25,84,85,86} Se podría entonces especular que la PCNA_{Tg} es un ejemplo de adaptación, en el cual la evolución molecular seleccionó paulatinamente una particular composición de residuos aminoácidos, que le permite a esta proteína mantener su estructura y función en las condiciones rigurosas en las cuales prospera *T. gammatolerans*, como un efecto colateral, confiriendo propiedades tales como radiorresistencia.

6. CONCLUSIÓN

El estudio estructural mediante cristalografía de rayos X revela que la proteína PCNA_{Tg} tiene la capacidad intrínseca de resistir altos niveles de radiación ionizante, y todas las observaciones derivadas del análisis bioinformático sugieren que la evolución molecular seleccionó una particular composición de residuos aminoácidos, y su consecuente red de interacciones sinérgicas para condiciones extremas, como un efecto colateral, confiriendo radiorresistencia a una proteína involucrada en los procesos de replicación y reparación del DNA de un microorganismo radiorresistente.

7. PERSPECTIVA

Considerando la gran diversidad de secuencia de aminoácidos que presenta la proteína PCNA, tendrán que llevarse a cabo estudios estructurales con una proteína que presente composición de aminoácidos similar (p. ej. PCNA de *P. furiosus*), así como también con una proteína que presente composición de aminoácidos diferente (p. ej. PCNA de *L. vannamei*), lo cual probablemente permitirá develar el papel que tiene la composición de residuos aminoácidos en la estabilidad de la PCNA_{Tg} frente a la radiación ionizante y arrojará más indicios para comprender las características moleculares que confieren radiorresistencia.

REFERENCIAS

1. Pan M, Kelman LM, Kelman Z. The archaeal PCNA proteins. *Biochem Soc Trans.* 2011;39(1):20-24.
2. Winter JA, Bunting KA. Rings in the extreme: PCNA interactions and adaptations in the archaea. *Archaea.* 2012;2012:951010.
3. Altieri AS, Kelman Z. DNA sliding clamps as therapeutic targets. *Front Mol Biosci.* 2018;5:87.
4. Choe KN, Moldovan GL. Forging ahead through darkness: PCNA, still the principal conductor at the replication fork. *Mol Cell.* 2017;65(3):380-392.
5. Boehm EM, Gildenberg MS, Washington MT. The many roles of PCNA in eukaryotic DNA replication. *Enzymes.* 2016;39:231-254.
6. Stoimenov I, Helleday T. PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 3):605-613.
7. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell.* 2007;129(4):665-679.
8. Hedglin M, Kumar R, Benkovic SJ. Replication clamps and clamp loaders. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a010165.
9. Indiani C, O'Donnell M. The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(10):751-761.
10. Jeruzalmi D, O'Donnell M, Kuriyan J. Clamp loaders and sliding clamps. *Curr Opin Struct Biol.* 2002;12(2):217-224.
11. Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 15):3051-3060.
12. Tsurimoto T. PCNA, a multifunctional ring on DNA. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1443(1-2):23-39.
13. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene.* 1997;14(6):629-640.
14. Jolivet E, L'Haridon S, Corre E, Forterre P, Prieur D. *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53(Pt 3):847-851.
15. Tapias A, Leplat C, Confalonieri F. Recovery of ionizing-radiation damage after high doses of gamma ray in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus gammatolerans*. *Extremophiles.* 2009;13(2):333-343.
16. Zivanovic Y, Armengaud J, Lagorce A, et al. Genome analysis and genome-wide proteomics of *Thermococcus gammatolerans*, the most radioresistant organism known amongst the archaea. *Genome Biol.* 2009;10(6):R70.
17. Kelman LM, Kelman Z. Archaeal DNA replication. *Annu Rev Genet.* 2014;48:71-97.
18. Kelman Z, White MF. Archaeal DNA replication and repair. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8(6):669-676.
19. Kelman Z. DNA replication in the third domain (of life). *Curr Protein Pept Sci.* 2000;1(2):139-154.
20. Zhou XX, Wang YB, Pan YJ, Li WF. Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. *Amino Acids.* 2008;34(1):25-33.
21. Grogan DW. Understanding DNA repair in hyperthermophilic archaea: persistent gaps and other reasons to focus on the fork. *Archaea.* 2015;2015:942605.
22. Grogan DW. Stability and repair of DNA in hyperthermophilic archaea. *Curr Issues Mol Biol.* 2004;6(2):137-144.

23. Grogan DW. The question of DNA repair in hyperthermophilic archaea. *Trends Microbiol.* 2000;8(4):180-185.
24. Grogan DW. Hyperthermophiles and the problem of DNA instability. *Mol Microbiol.* 1998;28(6):1043-1049.
25. Ranawat P, Rawat S. Radiation resistance in thermophiles: mechanisms and applications. *World J Microbiol Biotechnol.* 2017;33(6):112.
26. Nenoï M, ed. *Evolution of Ionizing Radiation Research.* 1 ed. London: InTech; 2015.
27. Ghiassi-nejad M, Mortazavi SM, Cameron JR, Niroomand-rad A, Karam PA. Very high background radiation areas of Ramsar, Iran: preliminary biological studies. *Health Phys.* 2002;82(1):87-93.
28. The Royal College of Radiologists. *Radiotherapy Dose Fractionation.* 3 ed. London: RCR; 2019.
29. Kinoshita A, Baffa O, Mascarenhas S. Electron spin resonance (ESR) dose measurement in bone of Hiroshima A-bomb victim. *PLoS One.* 2018;13(2):e0192444.
30. Garman EF, Weik M. Radiation damage in macromolecular crystallography. *Methods Mol Biol.* 2017;1607:467-489.
31. Garman EF. Radiation damage in macromolecular crystallography: what is it and why should we care? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010;66(Pt 4):339-351.
32. Garman EF, Owen RL. Cryocooling and radiation damage in macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2006;62(Pt 1):32-47.
33. Ravelli RB, Garman EF. Radiation damage in macromolecular cryocrystallography. *Curr Opin Struct Biol.* 2006;16(5):624-629.
34. Henderson R. Cryo-protection of protein crystals against radiation damage in electron and X-ray diffraction. *Proc R Soc Lond B.* 1990;241(1300):6-8.
35. Owen RL, Rudino-Pinera E, Garman EF. Experimental determination of the radiation dose limit for cryocooled protein crystals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(13):4912-4917.
36. Burmeister WP. Structural changes in a cryo-cooled protein crystal owing to radiation damage. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2000;56(Pt 3):328-341.
37. Fioravanti E, Vellieux FM, Amara P, Madern D, Weik M. Specific radiation damage to acidic residues and its relation to their chemical and structural environment. *J Synchrotron Radiat.* 2007;14(Pt 1):84-91.
38. Bury CS, Carmichael I, Garman EF. OH cleavage from tyrosine: debunking a myth. *J Synchrotron Radiat.* 2017;24(Pt 1):7-18.
39. Venancio-Landeros AA, Rudino-Pinera E, Cardona-Felix CS. Cloning, recombinant production and crystallographic structure of proliferating cell nuclear antigen from radioresistant archaeon *Thermococcus gammatolerans.* *Biochem Biophys Rep.* 2016;8:200-206.
40. Matsumiya S, Ishino Y, Morikawa K. Crystal structure of an archaeal DNA sliding clamp: proliferating cell nuclear antigen from *Pyrococcus furiosus.* *Protein Sci.* 2001;10(1):17-23.
41. Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010;66(Pt 2):125-132.
42. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011;67(Pt 4):235-242.
43. Evans P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2006;62(Pt 1):72-82.
44. Evans PR. An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011;67(Pt 4):282-292.
45. Evans PR, Murshudov GN. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2013;69(Pt 7):1204-1214.

46. Kantardjieff KA, Rupp B. Matthews coefficient probabilities: improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci.* 2003;12(9):1865-1871.
47. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr.* 2007;40(Pt 4):658-674.
48. Liebschner D, Afonine PV, Baker ML, et al. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 2019;75(Pt 10):861-877.
49. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010;66(Pt 4):486-501.
50. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):235-242.
51. Bury CS, Brooks-Bartlett JC, Walsh SP, Garman EF. Estimate your dose: RADDOS-3D. *Protein Sci.* 2018;27(1):217-228.
52. Bury CS, Garman EF. RIDL: a tool to investigate radiation-induced density loss. *J Appl Crystallogr.* 2018;51:952-962.
53. McNicholas S, Potterton E, Wilson KS, Noble ME. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011;67(Pt 4):386-394.
54. Krissinel E. Stock-based detection of protein oligomeric states in jsPISA. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W314-319.
55. The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D506-D515.
56. Ladner JE, Pan M, Hurwitz J, Kelman Z. Crystal structures of two active proliferating cell nuclear antigens (PCNAs) encoded by *Thermococcus kodakaraensis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(7):2711-2716.
57. Winter JA, Christofi P, Morroll S, Bunting KA. The crystal structure of *Haloferax volcanii* proliferating cell nuclear antigen reveals unique surface charge characteristics due to halophilic adaptation. *BMC Struct Biol.* 2009;9:55.
58. Chapados BR, Hosfield DJ, Han S, et al. Structural basis for FEN-1 substrate specificity and PCNA-mediated activation in DNA replication and repair. *Cell.* 2004;116(1):39-50.
59. Carrasco-Miranda JS, Lopez-Zavala AA, Arvizu-Flores AA, et al. Crystal structure of the shrimp proliferating cell nuclear antigen: structural complementarity with WSSV DNA polymerase PIP-box. *PLoS One.* 2014;9(4):e94369.
60. Wang K, Shi Z, Zhang M, Cheng D. Structure of PCNA from *Drosophila melanogaster*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2013;69(Pt 4):387-392.
61. Strzalka W, Oyama T, Tori K, Morikawa K. Crystal structures of the *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 proteins complexed with the human p21 C-terminal segment. *Protein Sci.* 2009;18(5):1072-1080.
62. Bruning JB, Shamoo Y. Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase- δ p66 subunit and flap endonuclease-1. *Structure.* 2004;12(12):2209-2219.
63. Krishna TS, Kong XP, Gary S, Burgers PM, Kuriyan J. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell.* 1994;79(7):1233-1243.
64. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM, ed. *The Proteomics Protocols Handbook*. 1 ed. Totowa: Humana Press; 2005:571-607.

65. Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Web Server issue):W597-603.
66. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-1612.
67. Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci.* 2018;27(1):135-145.
68. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14(1):33-38, 27-38.
69. Gallivan JP, Dougherty DA. Cation- π interactions in structural biology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(17):9459-9464.
70. Qing G, Ma LC, Khorchid A, et al. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.* 2004;22(7):877-882.
71. Rupp B. *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology*. 1 ed. New York: Garland Science; 2010.
72. Rhodes G. *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*. 3 ed. London: Elsevier; 2006.
73. Chang R. *Chemistry*. 10 ed. New York: McGraw-Hill; 2010.
74. Southworth-Davies RJ, Medina MA, Carmichael I, Garman EF. Observation of decreased radiation damage at higher dose rates in room temperature protein crystallography. *Structure.* 2007;15(12):1531-1541.
75. Kumar S, Nussinov R. How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(9):1216-1233.
76. Karshikoff A, Ladenstein R. Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a 'traffic rule' for hot roads. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(9):550-556.
77. Das R, Gerstein M. The stability of thermophilic proteins: a study based on comprehensive genome comparison. *Funct Integr Genomics.* 2000;1(1):76-88.
78. Lee DY, Kim KA, Yu YG, Kim KS. Substitution of aspartic acid with glutamic acid increases the unfolding transition temperature of a protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320(3):900-906.
79. Aswad DW, Paranandi MV, Schurter BT. Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance, and analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2000;21(6):1129-1136.
80. Jolivet E, Corre E, L'Haridon S, Forterre P, Prieur D. *Thermococcus marinus* sp. nov. and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation. *Extremophiles.* 2004;8(3):219-227.
81. Jolivet E, Matsunaga F, Ishino Y, Forterre P, Prieur D, Myllykallio H. Physiological responses of the hyperthermophilic archaeon "*Pyrococcus abyssi*" to DNA damage caused by ionizing radiation. *J Bacteriol.* 2003;185(13):3958-3961.
82. Gerard E, Jolivet E, Prieur D, Forterre P. DNA protection mechanisms are not involved in the radioresistance of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus abyssi* and *P. furiosus*. *Mol Genet Genomics.* 2001;266(1):72-78.
83. DiRuggiero J, Santangelo N, Nackerdien Z, Ravel J, Robb FT. Repair of extensive ionizing-radiation DNA damage at 95 °C in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol.* 1997;179(14):4643-4645.
84. Jung KW, Lim S, Bahn YS. Microbial radiation-resistance mechanisms. *J Microbiol.* 2017;55(7):499-507.

85. Pavlopoulou A, Savva GD, Louka M, et al. Unraveling the mechanisms of extreme radioresistance in prokaryotes: lessons from nature. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2016;767:92-107.
86. Ishino Y, Narumi I. DNA repair in hyperthermophilic and hyperradioresistant microorganisms. *Curr Opin Microbiol*. 2015;25:103-112.
87. Daly MJ. Death by protein damage in irradiated cells. *DNA Repair (Amst)*. 2012;11(1):12-21.
88. Daly MJ. A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(3):237-245.
89. Kmetko J, Warkentin M, Englich U, Thorne RE. Can radiation damage to protein crystals be reduced using small-molecule compounds? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011;67(Pt 10):881-893.
90. Nowak E, Brzuszkiewicz A, Dauter M, Dauter Z, Rosenbaum G. To scavenge or not to scavenge: that is the question. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2009;65(Pt 9):1004-1006.
91. Allan EG, Kander MC, Carmichael I, Garman EF. To scavenge or not to scavenge, that is STILL the question. *J Synchrotron Radiat*. 2013;20(Pt 1):23-36.
92. Wright JS, Johnson ER, DiLabio GA. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soc*. 2001;123(6):1173-1183.
93. Lide DR, ed. *CRC Handbook of Chemistry and Physics: Standard Thermodynamic Properties of Chemical Substances*. 89 ed. Boca Raton: CRC Press; 2008.
94. Iglesias-Groth S, Cataldo F, Ursini O, Manchado A. Amino acids in comets and meteorites: stability under gamma radiation and preservation of the enantiomeric excess. *Mon Not R Astron Soc*. 2011;410(3):1447-1453.
95. Melendez-Lopez AL, Cruz-Castaneda J, Paredes-Arriaga A, Negron-Mendoza A, Ramos-Bernal S. Study of L-glutamic acid in solid state for its possible use as a gamma dosimeter at different temperatures (77, 195 and 295 K). *J Nucl Phy Mat Sci Rad A*. 2017;5(1):179-186.

ANEXOS

Anexo 1. Tiempo de exposición y dosis de radiación acumulada por los cristales PCNA_{Tg}.

Dataset (N°)	Cristal I		Cristal II		Cristal III	
	Tiempo (min)	Dosis (MGy)	Tiempo (min)	Dosis (MGy)	Tiempo (min)	Dosis (MGy)
1	6	5.22	6	3.84	6	1.91
2	24	20.89	12	7.68	12	3.82
3	30	26.11	18	11.52	18	5.73
4	48	41.78	24	15.36	24	7.64
5	54	47.03	30	19.20	30	9.55
6	72	62.79	36	23.04	36	11.46
7	78	68.04	42	26.88	42	13.37
8	96	83.80	48	30.72	48	15.28
9	102	89.05	54	34.56	54	17.20
10	120	104.81	60	38.40	60	19.12
11			66	42.24	66	21.04
12			72	46.08	72	22.96
13			78	49.93	78	24.88
14			84	53.78	84	26.80
15			90	57.63	90	28.72
16			96	61.48		
17			102	65.35		
18			108	69.22		
19			114	73.09		
20			120	76.96		

El tiempo de exposición y los valores calculados empleando RADDOSE-3D para la dosis de radiación acumulada durante la colecta de los *datasets* de los tres cristales PCNA_{Tg}.

Anexo 2. Poder de difracción de los cristales PCNA_{Tg}.

Ds	Cristal I			Cristal II			Cristal III		
	Rflx	I _{mean}	I _n /I ₁	Rflx	I _{mean}	I _n /I ₁	Rflx	I _{mean}	I _n /I ₁
1	92804	370.91	1.00	89165	320.55	1.00	41157	1911.95	1.00
2	81409	994.76	2.35	76096	314.75	0.84	40075	1823.26	0.93
3	64589	365.15	0.69	68118	298.83	0.71	38989	1741.30	0.86
4	64639	866.21	1.63	59531	296.91	0.62	37898	1718.88	0.83
5	43433	356.51	0.45	52353	295.06	0.54	36889	1654.49	0.78
6	46031	877.38	1.17	48094	290.70	0.49	36386	1569.03	0.73
7	36658	306.66	0.33	43263	288.20	0.44	35919	1515.36	0.69
8	38773	758.99	0.85	40814	272.23	0.39	34932	1484.39	0.66
9	31589	268.93	0.25	38606	254.78	0.34	34457	1433.55	0.63
10	34387	677.56	0.68	36466	245.03	0.31	34001	1387.29	0.60
11				34553	233.29	0.28	33567	1345.66	0.57
12				33081	215.40	0.25	33066	1311.17	0.55
13				31727	211.39	0.23	32630	1299.73	0.54
14				30451	202.61	0.22	31790	1259.48	0.51
15				29191	192.60	0.20	31393	1211.70	0.48
16				28038	181.73	0.18			
17				27221	173.58	0.17			
18				26399	165.23	0.15			
19				25398	159.90	0.14			
20				24413	155.61	0.13			

El número de reflexiones únicas (Rflx), la intensidad media (I_{mean}) y el poder de difracción (I_n/I₁) obtenidos para los *datasets* (Ds) colectados de los tres cristales PCNA_{Tg}.

Anexo 3. Parámetros físicos de los *datasets* colectados del cristal PCNA_{Tg} I.

Ds (N°)	Parámetros de celda unitaria (Å °)	Volumen (Å ³)	Expansión (%)	Solvente (%)	Mosaicidad (°)	Resolución (Å)
1	186.62 186.62 63.92 90 90 120	1927754	0.00	53.86	0.124	1.95
2	186.81 186.81 63.98 90 90 120	1933720	0.31	54.00	0.148	2.04
3	187.23 187.23 64.13 90 90 120	1946915	0.99	54.31	0.154	2.21
4	187.28 187.28 64.14 90 90 120	1948291	1.07	54.34	0.168	2.21
5	187.56 187.56 64.24 90 90 120	1957188	1.53	54.55	0.169	2.53
6	187.53 187.53 64.21 90 90 120	1955341	1.43	54.51	0.178	2.48
7	187.75 187.75 64.29 90 90 120	1962581	1.81	54.68	0.173	2.68
8	187.74 187.74 64.24 90 90 120	1960669	1.71	54.63	0.180	2.63
9	187.87 187.87 64.31 90 90 120	1965853	1.98	54.75	0.173	2.82
10	187.87 187.87 64.26 90 90 120	1964387	1.90	54.72	0.181	2.74

El número de *dataset* (N°), parámetros de celda unitaria (Å | °), volumen de celda (Å³), expansión de celda (%), contenido de solvente (%), mosaicidad (°) y resolución (Å) obtenidos después de indexar, integrar y escalar ($I/\sigma_I > 2$) los 10 *datasets* (grupo espacial P6₃) colectados del cristal PCNA_{Tg} I.

Anexo 4. Parámetros físicos de los *datasets* colectados del cristal PCNA_{Tg} II.

Ds (N°)	Parámetros de celda unitaria (Å °)	Volumen (Å ³)	Expansión (%)	Solvente (%)	Mosaicidad (°)	Resolución (Å)
1	186.92 186.92 64.03 90 90 120	1937459	0.00	54.09	0.146	1.98
2	187.08 187.08 64.08 90 90 120	1942028	0.24	54.20	0.157	2.09
3	187.15 187.15 64.10 90 90 120	1944406	0.36	54.25	0.169	2.17
4	187.14 187.14 64.09 90 90 120	1943677	0.32	54.24	0.177	2.27
5	187.14 187.14 64.08 90 90 120	1943495	0.31	54.23	0.178	2.37
6	187.26 187.26 64.11 90 90 120	1946718	0.48	54.31	0.179	2.44
7	187.35 187.35 64.12 90 90 120	1949221	0.61	54.37	0.181	2.53
8	187.39 187.39 64.12 90 90 120	1950042	0.65	54.39	0.182	2.58
9	187.41 187.41 64.13 90 90 120	1950591	0.68	54.40	0.178	2.63
10	187.42 187.42 64.13 90 90 120	1950760	0.69	54.40	0.177	2.68
11	187.44 187.44 64.13 90 90 120	1951267	0.71	54.41	0.176	2.73
12	187.46 187.46 64.13 90 90 120	1951600	0.73	54.42	0.173	2.77
13	187.52 187.52 64.14 90 90 120	1953071	0.81	54.46	0.174	2.81
14	187.54 187.54 64.14 90 90 120	1953562	0.83	54.47	0.168	2.85
15	187.54 187.54 64.13 90 90 120	1953092	0.81	54.46	0.169	2.89
16	187.60 187.60 64.13 90 90 120	1954648	0.89	54.49	0.165	2.93
17	187.63 187.63 64.13 90 90 120	1955285	0.92	54.51	0.166	2.96
18	187.61 187.61 64.11 90 90 120	1954154	0.86	54.48	0.163	2.99
19	187.68 187.68 64.12 90 90 120	1956033	0.96	54.53	0.164	3.03
20	187.68 187.68 64.12 90 90 120	1955922	0.95	54.52	0.164	3.07

El número de *dataset* (N°), parámetros de celda unitaria (Å | °), volumen de celda (Å³), expansión de celda (%), contenido de solvente (%), mosaicidad (°) y resolución (Å) obtenidos después de indexar, integrar y escalar ($I/\sigma_1 > 2$) los 20 *datasets* (grupo espacial P6₃) colectados del cristal PCNA_{Tg} II.

Anexo 5. Parámetros físicos de los *datasets* colectados del cristal PCNA_{Tg} III.

Ds (N°)	Parámetros de celda unitaria (Å °)	Volumen (Å ³)	Expansión (%)	Solvente (%)	Mosaicidad (°)	Resolución (Å)
1	92.62 92.62 63.73 90 90 120	473420	0.00	53.03	0.272	2.00
2	92.70 92.70 63.78 90 90 120	474621	0.25	53.15	0.274	2.02
3	92.75 92.75 63.81 90 90 120	475298	0.40	53.21	0.273	2.04
4	92.80 92.80 63.84 90 90 120	476194	0.59	53.30	0.273	2.06
5	92.84 92.84 63.87 90 90 120	476741	0.70	53.35	0.273	2.08
6	92.88 92.88 63.88 90 90 120	477230	0.80	53.40	0.275	2.09
7	92.91 92.91 63.90 90 90 120	477732	0.91	53.45	0.276	2.10
8	92.94 92.94 63.92 90 90 120	478171	1.00	53.49	0.274	2.12
9	92.96 92.96 63.92 90 90 120	478388	1.05	53.52	0.274	2.13
10	92.97 92.97 63.93 90 90 120	478490	1.07	53.53	0.276	2.14
11	93.00 93.00 63.94 90 90 120	478883	1.15	53.56	0.272	2.15
12	93.00 93.00 63.94 90 90 120	478977	1.17	53.57	0.269	2.16
13	93.02 93.02 63.95 90 90 120	479195	1.22	53.59	0.267	2.17
14	93.04 93.04 63.96 90 90 120	479452	1.27	53.62	0.265	2.19
15	93.06 93.06 63.98 90 90 120	479774	1.34	53.65	0.264	2.20

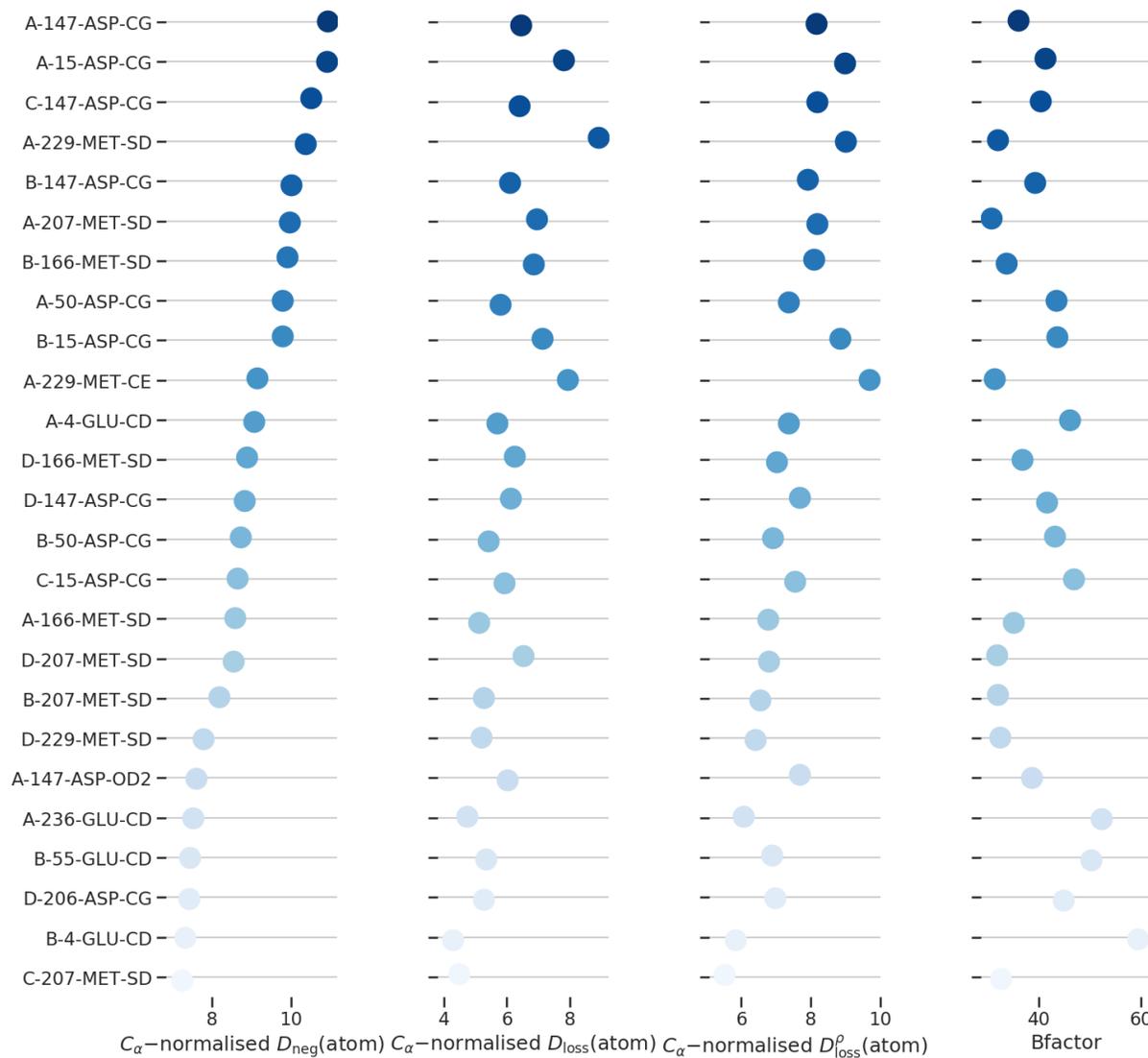
El número de *dataset* (N°), parámetros de celda unitaria (Å | °), volumen de celda (Å³), expansión de celda (%), contenido de solvente (%), mosaicidad (°) y resolución (Å) obtenidos después de indexar, integrar y escalar ($1/\sigma_1 > 2$) los 15 *datasets* (grupo espacial P3) colectados del cristal PCNA_{Tg} III.

Anexo 6. Caracterización estadística de la distribución general de pérdida de densidad electrónica en los cristales PCNA_{Tg}.

Ds	Cristal I				Cristal II				Cristal III			
	mean	std	skew	asym	mean	std	skew	asym	mean	std	skew	asym
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0.83	2.09	3.40	4.46	0.65	1.63	2.49	3.70	0.55	1.75	3.85	2.92
3	0.17	1.61	3.25	1.42	0.53	1.68	2.78	2.90	0.62	2.02	4.50	3.16
4	0.48	1.86	3.12	2.45	0.37	1.54	2.71	2.19	0.65	2.13	4.15	3.20
5	0.15	1.48	2.72	1.38	0.24	1.43	2.53	1.70	0.63	2.15	4.06	3.02
6	0.46	1.71	2.71	2.46	0.17	1.36	2.47	1.46	0.56	2.07	4.10	2.80
7	0.14	1.41	2.48	1.36	0.04	1.28	2.32	1.09	0.52	2.00	3.90	2.63
8	0.40	1.58	2.51	2.27	-0.08	1.21	2.13	0.84	0.52	2.06	3.83	2.59
9	0.12	1.34	2.20	1.30	-0.18	1.13	1.89	0.66	0.49	2.00	3.82	2.50
10	0.34	1.51	2.37	2.02	-0.23	1.10	1.83	0.59	0.47	2.01	3.72	2.37
11					-0.27	1.06	1.63	0.53	0.41	1.90	3.57	2.18
12					-0.30	1.05	1.52	0.49	0.39	1.87	3.53	2.11
13					-0.31	1.07	1.47	0.49	0.38	1.89	3.53	2.04
14					-0.37	1.06	1.32	0.42	0.35	1.83	3.43	1.96
15					-0.36	1.04	1.33	0.43	0.39	1.88	3.45	2.07
16					-0.06	1.20	1.74	0.87				
17					-0.04	1.21	1.80	0.92				
18					-0.03	1.20	1.71	0.93				
19					-0.05	1.19	1.61	0.90				
20					-0.02	1.19	1.62	0.95				

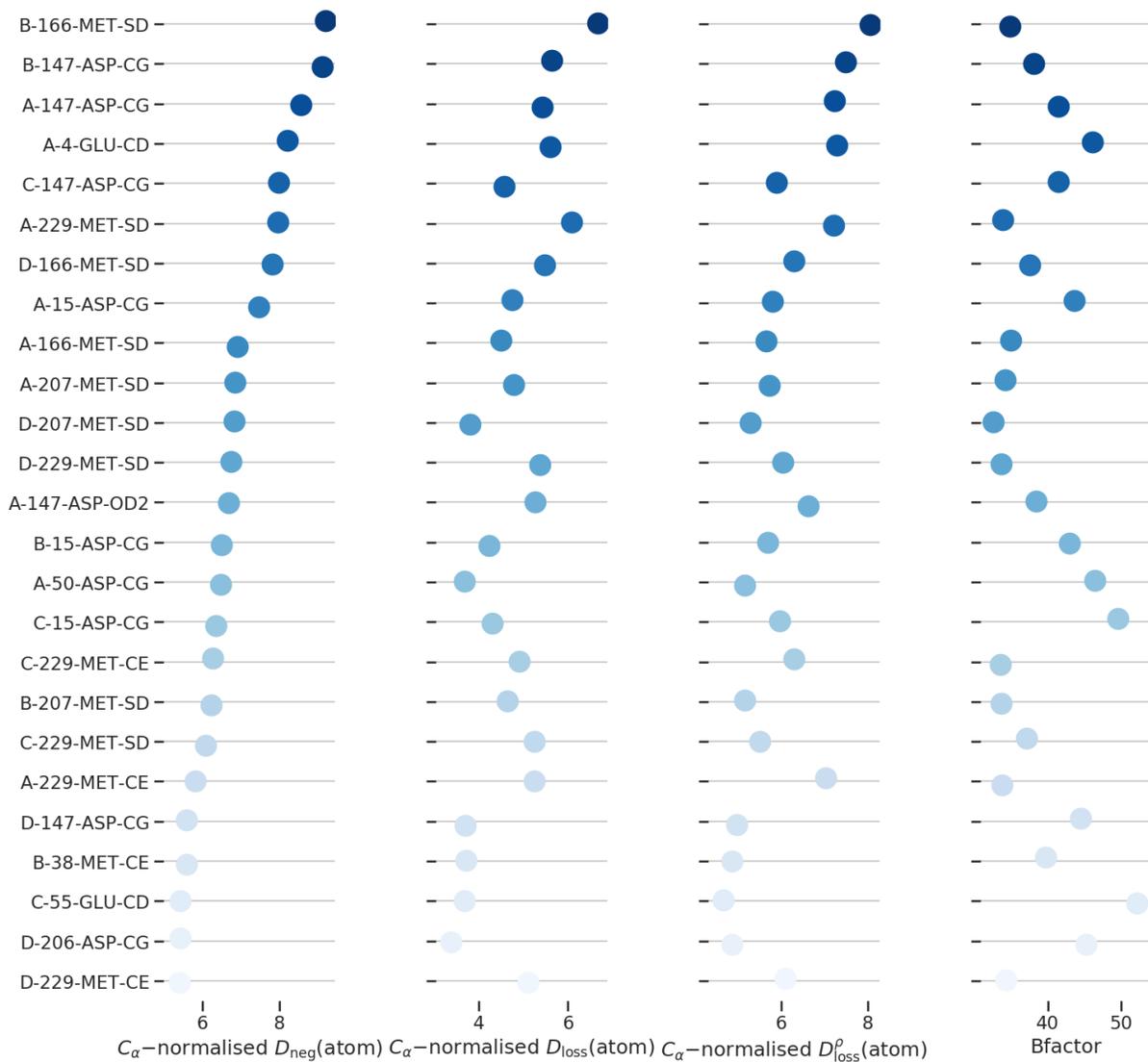
La media (mean), desviación estándar (std), oblicuidad (skew) y puntuación de asimetría (asym) de la distribución general de pérdida de densidad electrónica (valores de C_{α} -normalized $D_{neg}(\text{atom})$ métrica) en función de la dosis de radiación obtenidas empleando RIDL para los *datasets* (Ds) colectados de los tres cristales PCNA_{Tg}.

Anexo 7. Átomos con mayor pérdida de densidad electrónica en el cristal PCNA_{Tg} I.



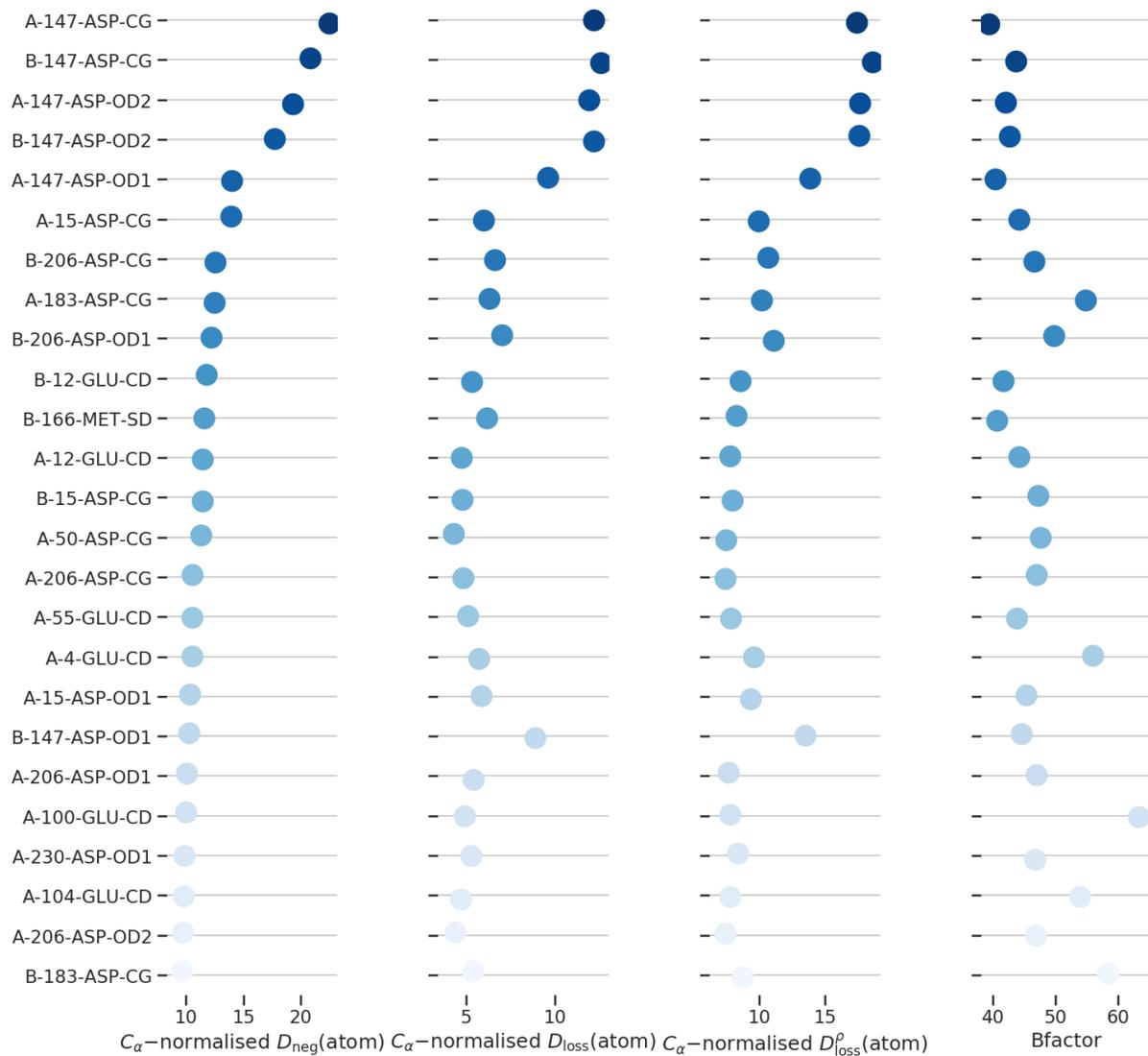
Los átomos con mayor pérdida de densidad electrónica en la estructura correspondiente a la última colecta (C5) del cristal PCNA_{Tg} I, de acuerdo con los cálculos realizados empleando RIDL.

Anexo 8. Átomos con mayor pérdida de densidad electrónica en el cristal PCNA_{Tg} II.



Los átomos con mayor pérdida de densidad electrónica en la estructura correspondiente a la última colecta (C20) del cristal PCNA_{Tg} II, de acuerdo con los cálculos realizados empleando RIDL.

Anexo 9. Átomos con mayor pérdida de densidad electrónica en el cristal PCNA_{Tg} III.



Los átomos con mayor pérdida de densidad electrónica en la estructura correspondiente a la última colecta (C15) del cristal PCNA_{Tg} III, de acuerdo con los cálculos realizados empleando RIDL.

Anexo 10. Pérdida de densidad electrónica de los átomos con mayor daño en los cristales PCNA_{Tg}.

Ds	Cristal I			Cristal II			Cristal III		
	Asp-C _γ	Glu-C _δ	Met-S _δ	Asp-C _γ	Glu-C _δ	Met-S _δ	Asp-C _γ	Glu-C _δ	Met-S _δ
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	8.18 (5.60)	4.14 (3.24)	7.10 (4.29)	5.56 (3.74)	2.83 (2.43)	5.18 (3.40)	5.88 (4.93)	2.79 (2.69)	4.09 (2.53)
3	6.13 (4.34)	2.95 (2.88)	3.87 (2.64)	6.27 (4.00)	3.05 (2.75)	5.29 (3.69)	7.26 (6.04)	3.81 (3.34)	5.06 (3.45)
4	7.18 (4.69)	3.68 (3.22)	6.26 (4.17)	5.69 (3.59)	2.79 (2.52)	4.68 (3.52)	8.08 (5.99)	4.52 (3.62)	5.69 (3.51)
5	5.32 (3.52)	2.63 (2.41)	4.70 (3.24)	5.12 (3.27)	2.44 (2.35)	4.33 (3.18)	8.31 (6.04)	4.46 (3.70)	5.60 (3.55)
6	6.26 (3.94)	3.24 (2.80)	6.49 (4.20)	4.74 (3.12)	2.24 (2.22)	4.29 (3.12)	8.00 (5.91)	4.18 (3.88)	5.25 (3.45)
7	4.87 (3.17)	2.33 (2.30)	4.78 (3.25)	4.24 (2.82)	1.90 (2.13)	3.76 (2.94)	7.70 (5.46)	4.15 (3.65)	5.23 (3.58)
8	5.57 (3.35)	2.88 (2.48)	6.32 (4.06)	3.76 (2.69)	1.56 (2.04)	3.38 (2.65)	8.14 (5.52)	4.25 (3.75)	5.34 (3.49)
9	4.29 (2.79)	2.10 (2.15)	4.72 (3.16)	3.25 (2.44)	1.26 (1.84)	2.79 (2.18)	7.86 (5.55)	4.22 (3.75)	4.95 (3.25)
10	5.07 (3.16)	2.56 (2.38)	6.10 (3.81)	2.93 (2.36)	1.14 (1.74)	2.62 (2.13)	7.85 (5.53)	4.20 (3.79)	5.17 (3.44)
11				2.59 (2.07)	0.96 (1.67)	2.42 (2.00)	7.45 (4.96)	3.98 (3.57)	4.88 (3.25)
12				2.37 (1.96)	0.86 (1.59)	2.33 (1.90)	7.30 (4.92)	3.93 (3.55)	4.94 (3.32)
13				2.41 (2.05)	0.81 (1.63)	2.42 (2.04)	7.30 (4.98)	3.96 (3.68)	4.68 (3.15)
14				2.07 (1.94)	0.63 (1.54)	2.00 (1.92)	7.02 (4.85)	3.81 (3.49)	4.65 (2.93)
15				2.01 (1.87)	0.64 (1.51)	2.17 (1.85)	7.35 (4.96)	3.95 (3.58)	5.13 (3.04)
16				3.19 (2.28)	1.38 (1.87)	3.80 (2.63)			
17				3.15 (2.44)	1.42 (1.86)	3.84 (2.84)			
18				3.05 (2.34)	1.38 (1.85)	3.58 (2.69)			
19				2.94 (2.16)	1.33 (1.77)	3.67 (2.67)			
20				2.93 (2.18)	1.33 (1.79)	3.59 (2.81)			
Global	5.87 (1.21)	2.95 (0.65)	5.59 (1.09)	3.59 (1.30)	1.58 (0.76)	3.48 (1.00)	7.54 (0.62)	4.02 (0.41)	5.05 (0.41)

La media (desviación estándar indicada entre paréntesis) de la pérdida de densidad electrónica (valores de C_{α} -normalized $D_{neg}(\text{atom})$ métrica) en función de la dosis de radiación obtenida empleando RIDL para los átomos con mayor daño (Asp-C_γ, Glu-C_δ, Met-S_δ), promediada sobre todos los átomos de cada tipo y además promediada a través de todos los *datasets* (Ds) colectados de los tres cristales PCNA_{Tg}.

Anexo 11. Interacciones iónicas en el trímero PCNA_{Tg} I.

SOURCE ATOMS	TARGET ATOMS	DISTANCE
/1/A/ 120 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/A/ 30 (LYS) . / NZ [N]:	2.53
/1/A/ 50 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/A/ 39 (ARG) . / NE [N]:	2.72
	/1/A/ 39 (ARG) . / NH2 [N]:	2.96
/1/A/ 4 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/A/ 60 (LYS) . / NZ [N]:	2.95
/1/A/ 15 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/A/ 81 (LYS) . / NZ [N]:	2.90
/1/A/ 4 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/A/ 92 (ARG) . / NH1 [N]:	2.57
/1/B/ 147 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/A/ 109 (ARG) . / NH1 [N]:	3.06
/1/A/ 87 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/A/ 109 (ARG) . / NH2 [N]:	2.74
/1/B/ 174 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/A/ 112 (ARG) . / NH2 [N]:	2.93
/1/A/ 163 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/A/ 178 (LYS) . / NZ [N]:	2.55
/1/A/ 194 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/A/ 196 (ARG) . / NH1 [N]:	3.15
/1/A/ 12 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/A/ 234 (ARG) . / NE [N]:	2.94
/1/A/ 12 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/A/ 234 (ARG) . / NH2 [N]:	2.83
/1/A/ 153 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/A/ 246 (ARG) . / NH1 [N]:	2.09
	/1/A/ 246 (ARG) . / NH2 [N]:	3.14
/1/B/ 50 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/B/ 39 (ARG) . / NE [N]:	2.64
	/1/B/ 39 (ARG) . / NH2 [N]:	2.80
/1/B/ 15 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/B/ 81 (LYS) . / NZ [N]:	3.13
/1/B/ 4 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/B/ 92 (ARG) . / NE [N]:	2.99
	/1/B/ 92 (ARG) . / NH2 [N]:	2.99
/1/C/ 147 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/B/ 109 (ARG) . / NH1 [N]:	2.94
/1/B/ 87 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/B/ 109 (ARG) . / NH2 [N]:	2.76
/1/B/ 194 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/B/ 196 (ARG) . / NH1 [N]:	3.02
/1/B/ 206 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/B/ 209 (LYS) . / NZ [N]:	3.11
/1/B/ 12 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/B/ 234 (ARG) . / NE [N]:	3.07
/1/B/ 12 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/B/ 234 (ARG) . / NH2 [N]:	3.11
/1/B/ 153 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/B/ 246 (ARG) . / NH2 [N]:	2.94
/1/C/ 50 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/C/ 39 (ARG) . / NH1 [N]:	2.84
/1/C/ 15 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/C/ 81 (LYS) . / NZ [N]:	3.02
/1/A/ 147 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/C/ 82 (ARG) . / NE [N]:	3.16
/1/C/ 4 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/C/ 92 (ARG) . / NH1 [N]:	2.94
/1/A/ 147 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/C/ 109 (ARG) . / NH1 [N]:	2.87
/1/C/ 87 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/C/ 109 (ARG) . / NH2 [N]:	2.73
/1/A/ 174 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/C/ 112 (ARG) . / NH1 [N]:	2.39
/1/C/ 163 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/C/ 178 (LYS) . / NZ [N]:	3.14
/1/C/ 194 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/C/ 196 (ARG) . / NH1 [N]:	2.84
/1/C/ 12 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/C/ 234 (ARG) . / NE [N]:	2.96
/1/C/ 12 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/C/ 234 (ARG) . / NE [N]:	3.17
	/1/C/ 234 (ARG) . / NH2 [N]:	3.17
/1/C/ 153 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/C/ 246 (ARG) . / NH1 [N]:	3.08

Las interacciones iónicas (puentes salinos) entre residuos con carga negativa (Asp, Glu) y positiva (Lys, Arg) determinadas empleando NCONT ($d \leq 3.2 \text{ \AA}$) para el trímero PCNA_{Tg} correspondiente al cristal I (colecta C1).

Anexo 12. Interacciones iónicas en el trímero PCNA_{Tg} II.

SOURCE ATOMS	TARGET ATOMS	DISTANCE
/1/A/ 120 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/A/ 30 (LYS) . / NZ [N]:	2.64
/1/A/ 50 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/A/ 39 (ARG) . / NE [N]:	2.81
	/1/A/ 39 (ARG) . / NH2 [N]:	3.04
/1/A/ 4 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/A/ 60 (LYS) . / NZ [N]:	3.16
/1/A/ 15 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/A/ 81 (LYS) . / NZ [N]:	2.96
/1/A/ 4 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/A/ 92 (ARG) . / NH2 [N]:	3.12
/1/C/ 147 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/A/ 109 (ARG) . / NH1 [N]:	2.94
/1/A/ 87 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/A/ 109 (ARG) . / NH2 [N]:	2.81
/1/A/ 100 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/A/ 112 (ARG) . / NH1 [N]:	3.12
/1/C/ 174 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/A/ 112 (ARG) . / NH2 [N]:	2.83
/1/A/ 163 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/A/ 178 (LYS) . / NZ [N]:	3.06
/1/A/ 194 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/A/ 196 (ARG) . / NH1 [N]:	3.03
/1/A/ 12 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/A/ 234 (ARG) . / NE [N]:	2.96
/1/A/ 12 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/A/ 234 (ARG) . / NH2 [N]:	2.81
/1/A/ 153 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/A/ 246 (ARG) . / NH1 [N]:	2.38
/1/B/ 50 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/B/ 39 (ARG) . / NH2 [N]:	3.01
/1/A/ 147 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/B/ 82 (ARG) . / NE [N]:	3.15
/1/A/ 147 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/B/ 109 (ARG) . / NH1 [N]:	2.89
/1/B/ 87 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/B/ 109 (ARG) . / NH2 [N]:	2.74
/1/A/ 174 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/B/ 112 (ARG) . / NH1 [N]:	2.40
/1/B/ 194 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/B/ 196 (ARG) . / NH1 [N]:	2.66
/1/B/ 12 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/B/ 234 (ARG) . / NE [N]:	2.94
/1/B/ 12 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/B/ 234 (ARG) . / NH2 [N]:	3.15
/1/B/ 153 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/B/ 246 (ARG) . / NH1 [N]:	3.15
	/1/B/ 246 (ARG) . / NH2 [N]:	2.95
/1/C/ 50 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/C/ 39 (ARG) . / NE [N]:	2.65
	/1/C/ 39 (ARG) . / NH2 [N]:	2.78
/1/C/ 15 (ASP) . / OD1 [O]:	/1/C/ 81 (LYS) . / NZ [N]:	3.15
/1/C/ 4 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/C/ 92 (ARG) . / NE [N]:	2.65
	/1/C/ 92 (ARG) . / NH2 [N]:	2.79
/1/C/ 67 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/C/ 93 (LYS) . / NZ [N]:	3.12
/1/B/ 147 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/C/ 109 (ARG) . / NH1 [N]:	2.83
/1/C/ 87 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/C/ 109 (ARG) . / NH2 [N]:	2.83
/1/C/ 194 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/C/ 196 (ARG) . / NH1 [N]:	3.13
/1/C/ 230 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/C/ 220 (ARG) . / NH1 [N]:	2.90
/1/C/ 12 (GLU) . / OE1 [O]:	/1/C/ 234 (ARG) . / NE [N]:	3.02
/1/C/ 12 (GLU) . / OE2 [O]:	/1/C/ 234 (ARG) . / NH2 [N]:	3.06
/1/C/ 153 (ASP) . / OD2 [O]:	/1/C/ 246 (ARG) . / NH2 [N]:	2.81

Las interacciones iónicas (puentes salinos) entre residuos con carga negativa (Asp, Glu) y positiva (Lys, Arg) determinadas empleando NCONT ($d \leq 3.2 \text{ \AA}$) para el trímero PCNA_{Tg} correspondiente al cristal II (colecta C1).

Anexo 13. Interacciones iónicas en el trímero PCNA_{Tg} III.

SOURCE ATOMS	TARGET ATOMS	DISTANCE
/1/A/ 50 (ASP) . / OD1 [O] :	/1/A/ 39 (ARG) . / NE [N] :	3.20
/1/A/ 74 (ASP) . / OD2 [O] :	/1/A/ 78 (LYS) . / NZ [N] :	2.67
/1/C/ 143 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/A/ 82 (ARG) . / NH2 [N] :	3.03
/1/C/ 143 (GLU) . / OE2 [O] :	/1/A/ 82 (ARG) . / NH2 [N] :	2.16
/1/C/ 143 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/A/ 84 (LYS) . / NZ [N] :	2.60
/1/A/ 100 (GLU) . / OE2 [O] :	/1/A/ 92 (ARG) . / NE [N] :	2.97
/1/A/ 4 (GLU) . / OE2 [O] :	/1/A/ 92 (ARG) . / NH1 [N] :	2.63
/1/C/ 147 (ASP) . / OD2 [O] :	/1/A/ 109 (ARG) . / NH1 [N] :	2.89
/1/A/ 87 (ASP) . / OD2 [O] :	/1/A/ 109 (ARG) . / NH2 [N] :	2.76
/1/C/ 174 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/A/ 112 (ARG) . / NH1 [N] :	2.94
/1/A/ 190 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/A/ 133 (LYS) . / NZ [N] :	2.76
/1/A/ 163 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/A/ 178 (LYS) . / NZ [N] :	2.42
/1/A/ 230 (ASP) . / OD2 [O] :	/1/A/ 220 (ARG) . / NH1 [N] :	2.92
/1/A/ 12 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/A/ 234 (ARG) . / NE [N] :	3.03
/1/A/ 12 (GLU) . / OE2 [O] :	/1/A/ 234 (ARG) . / NE [N] :	3.08
	/1/A/ 234 (ARG) . / NH2 [N] :	2.89
/1/B/ 50 (ASP) . / OD1 [O] :	/1/B/ 39 (ARG) . / NE [N] :	3.20
/1/B/ 74 (ASP) . / OD2 [O] :	/1/B/ 78 (LYS) . / NZ [N] :	2.67
/1/A/ 143 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/B/ 82 (ARG) . / NH2 [N] :	3.03
/1/A/ 143 (GLU) . / OE2 [O] :	/1/B/ 82 (ARG) . / NH2 [N] :	2.16
/1/A/ 143 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/B/ 84 (LYS) . / NZ [N] :	2.60
/1/B/ 100 (GLU) . / OE2 [O] :	/1/B/ 92 (ARG) . / NE [N] :	2.97
/1/B/ 4 (GLU) . / OE2 [O] :	/1/B/ 92 (ARG) . / NH1 [N] :	2.63
/1/A/ 147 (ASP) . / OD2 [O] :	/1/B/ 109 (ARG) . / NH1 [N] :	2.89
/1/B/ 87 (ASP) . / OD2 [O] :	/1/B/ 109 (ARG) . / NH2 [N] :	2.75
/1/A/ 174 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/B/ 112 (ARG) . / NH1 [N] :	2.94
/1/B/ 190 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/B/ 133 (LYS) . / NZ [N] :	2.76
/1/B/ 163 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/B/ 178 (LYS) . / NZ [N] :	2.42
/1/B/ 230 (ASP) . / OD2 [O] :	/1/B/ 220 (ARG) . / NH1 [N] :	2.92
/1/B/ 12 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/B/ 234 (ARG) . / NE [N] :	3.03
/1/B/ 12 (GLU) . / OE2 [O] :	/1/B/ 234 (ARG) . / NE [N] :	3.08
	/1/B/ 234 (ARG) . / NH2 [N] :	2.89
/1/C/ 50 (ASP) . / OD1 [O] :	/1/C/ 39 (ARG) . / NE [N] :	3.20
/1/C/ 74 (ASP) . / OD2 [O] :	/1/C/ 78 (LYS) . / NZ [N] :	2.67
/1/B/ 143 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/C/ 82 (ARG) . / NH2 [N] :	3.03
/1/B/ 143 (GLU) . / OE2 [O] :	/1/C/ 82 (ARG) . / NH2 [N] :	2.16
/1/B/ 143 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/C/ 84 (LYS) . / NZ [N] :	2.60
/1/C/ 100 (GLU) . / OE2 [O] :	/1/C/ 92 (ARG) . / NE [N] :	2.97
/1/C/ 4 (GLU) . / OE2 [O] :	/1/C/ 92 (ARG) . / NH1 [N] :	2.63
/1/B/ 147 (ASP) . / OD2 [O] :	/1/C/ 109 (ARG) . / NH1 [N] :	2.89
/1/C/ 87 (ASP) . / OD2 [O] :	/1/C/ 109 (ARG) . / NH2 [N] :	2.76
/1/B/ 174 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/C/ 112 (ARG) . / NH1 [N] :	2.94
/1/C/ 190 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/C/ 133 (LYS) . / NZ [N] :	2.76
/1/C/ 163 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/C/ 178 (LYS) . / NZ [N] :	2.42
/1/C/ 230 (ASP) . / OD2 [O] :	/1/C/ 220 (ARG) . / NH1 [N] :	2.92
/1/C/ 12 (GLU) . / OE1 [O] :	/1/C/ 234 (ARG) . / NE [N] :	3.03
/1/C/ 12 (GLU) . / OE2 [O] :	/1/C/ 234 (ARG) . / NE [N] :	3.08
	/1/C/ 234 (ARG) . / NH2 [N] :	2.89

Las interacciones iónicas (puentes salinos) entre residuos con carga negativa (Asp, Glu) y positiva (Lys, Arg) determinadas empleando NCONT ($d \leq 3.2 \text{ \AA}$) para el trímero PCNA_{Tg} correspondiente al cristal III (colecta C1).

Anexo 14. Artículo publicado en la revista *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*.

PCNA from *Thermococcus gammatolerans*: A protein involved in chromosomal DNA metabolism intrinsically resistant at high levels of ionizing radiation

Yerli Marín-Tovar, Hugo Serrano-Posada, Adelaida Díaz-Vilchis, Enrique Rudiño-Piñera.

Abstract

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is an essential protein for cell viability in archaea and eukarya, since it is involved in DNA replication and repair. In order to obtain insights regarding the characteristics that confer radioresistance, the structural study of the PCNA from *Thermococcus gammatolerans* (PCNA_{Tg}) in a gradient of ionizing radiation by X-ray crystallography was carried out, together with a bioinformatic analysis of homotrimeric PCNA structures, their sequences, and their molecular interactions. The results obtained from the datasets and the accumulated radiation dose for the last collection from three crystals revealed moderate and localized damage, since even with the loss of resolution, the electron density map corresponding to the last collection allowed to build the whole structure. Attempting to understand this behavior, multiple sequence alignments, and structural superpositions were performed, revealing that PCNA is a protein with a poorly conserved sequence, but with a highly conserved structure. The PCNA_{Tg} presented the highest percentage of charged residues, mostly negatively charged, with a proportion of glutamate more than double aspartate, lack of cysteines and tryptophan, besides a high number of salt bridges. The structural study by X-ray crystallography reveals that the PCNA_{Tg} has the intrinsic ability to resist high levels of ionizing radiation, and the bioinformatic analysis suggests that molecular evolution selected a particular composition of amino acid residues, and their consequent network of synergistic interactions for extreme conditions, as a collateral effect, conferring radioresistance to a protein involved in the chromosomal DNA metabolism of a radioresistant microorganism.

Keywords: DNA sliding clamp, ionizing radiation, PCNA, radiation damage, radioresistance, *Thermococcus gammatolerans*.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.26346>