

USO DE LA LACCASA DE *Botrytis
aclada* PARA LA INACTIVACION DE
ANTIBIOTICOS DE LA FAMILIA
TETRACICLINA. MODELAMIENTO
ESTRUCTURAL Y CARACTERIZACIÓN DE LA
INTERACCIÓN

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De:

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Juan Carlos Cáceres Vergara

Octubre, 2018

Director de Tesis Dr.:

Ricardo Cabrera Paucar

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

JUAN CARLOS CÁCERES VERGARA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Ricardo Cabrera

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marcelo Baeza

Dr. Francisco Chávez

Esta tesis esta dedicada a mis padres y hermanos,
quienes me apoyan todos los días.

Biografía



Mi nombre es Juan Carlos Cáceres Vergara, nací en Talca el 29 de Julio de 1991, ciudad donde viví hasta el año 2010. Ahí realicé mis estudios escolares en el Colegio de la Salle.

En el año 2009 rendí la PSU y entré a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile el año 2010, encontrando en ella mi vocación por la investigación. Llegué al laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular el año 2012 a trabajar con el Dr. Ricardo Cabrera en una unidad de investigación. Me licencié de la carrera el 2014. Luego desarrollé mi tesis titulada “Expresión Heteróloga Y Purificación De La Enzima Laccasa De Trametes Versicolor” trabajando en el mismo grupo de investigación, la cual presenté en septiembre del 2016.

A comienzos del 2016 ingresé al Programa de Magíster en Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, con la intención de seguir perfeccionándome en el área de la bioquímica de proteínas buscando aplicar estos conocimientos en biotecnología. Para el cual recibí financiamiento a través de la beca CONICYT de magister. En ese tiempo, además he dirigido mi propio proyecto de investigación FONDEF-VIU titulado “Sistema enzimático para la biorremediación de antibióticos usados en la industria salmonera” relacionado con mi tesis de pregrado y con la presente tesis.

El próximo año continuaré perfeccionándome por medio de un Doctorado en Bioquímica en Estados Unidos para el cual recibí recientemente la beca Fulbright de Doctorado 2019.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia, por siempre estar conmigo y por todo el apoyo que me han dado en todas mis etapas hasta ahora. A mi mamá por siempre estar dedicada a nosotros mas allá de dejarte última en tus prioridades, también por haberme estimulado el gusto por la ciencia, mostrando siempre curiosidad y ganas de aprender. A mi papá por siempre exigirme mas y nunca aceptar que no sea el mejor y por no tener un BMW para que yo haya podido estudiar. A ambos por preocuparse de que nunca me falte nada. A la Tanny por ser mi segunda mamá y por bancarte mis peores momentos, no sabes cuanto te he echado de menos este último año contigo lejos y cuanto me han hecho falta tus consejos. A Felipe por que a pesar de todas las peleas me sigues aguantando. A Rodrigo por acompañar a mi hermana en todas.

También agradecer a mi tutor, Ricardo por confiar en mi y siempre acompañarme en mis proyectos. A los chicos del lab de bioquímica, con especial cariño a Matu por ayudarme a sacar adelante la ciencia de Mexico, por todas las ideas con las que ayudaste a finalizar mi tesis y por siempre tener tiempo para escuchar mis problemas. A los mandriles, Cea, Mora, Felipe, Gabo, Victor y también Alejandra que hacen que la vida en el lab todos los días sea mas entretenida y por hacerme sentir querido en mi segunda casa. A Claudio y Fernando por confiar en mis consejos y enseñanzas. También quiero agradecer a todo el lab de genética especialmente a la Dony y a la profe Jenni por apoyarme con su ayuda, equipo y reactivos cuando me han faltado, sin nunca pedir nada a cambio.

Al Dr. Alvaro Díaz y a Belen Ponce por prestarme el Biorreactor, ayudarme con los experimentos y recibirme en su laboratorio.

A mis compañeros de U, en quienes he encontrado a los mejores amigos, por todos los buenos momentos, y por siempre estar ahí, a Nexo, la Dani, Seba, Jorge, Dieguito, la Cata y muy especialmente a la Eli y a Ricardo. También a Pablo y a Santiago, por estar desde siempre.

Finalmente, a la Beca CONICYT-PCHA/MagísterNacional/2016 – folio 22160435 por haber financiado mis estudios, al proyecto FONDEF-VIU16E0084 por financiar gran parte de los experimentos y a la comisión por sus correcciones.

Índice de Materias

BIOGRAFÍA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE DE MATERIAS	V
LISTA DE TABLAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA.....	X
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LOS ANTIBIÓTICOS COMO CONTAMINANTES.....	1
1.2 USO DE LACCASAS PARA LA OXIDACIÓN DE ANTIBIÓTICOS.....	4
1.3 LA LACCASA DE <i>BOTRYTIS ACLADA</i>	9
1.4 HIPÓTESIS.....	11
1.5 OBJETIVO GENERAL.....	11
1.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1 CEPAS.....	13
2.2 PARTIDORES.....	13
2.3 VECTORES.....	14
2.4 MÉTODOS DE MICROBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	16
2.4.1 Medios de cultivo.....	16
2.4.2 Purificación de DNA plasmidial.....	17
2.4.3 Purificación de DNA cromosómico desde <i>P. pastoris</i>	18
2.4.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	18
2.4.5 Electrotransformación de <i>E. coli</i>	19
2.4.6 Electrotransformación de <i>P. pastoris</i>	19
2.4.7 Amplificación de DNA por PCR.....	20
2.4.8 Purificación de DNA desde geles de agarosa.....	21
2.4.9 Ligado de fragmentos de DNA.....	21

2.4.10	Expresión inducible de Laccasa en <i>P. pastoris</i> .	22
2.4.11	Expresión constitutiva de Laccasa en <i>P. pastoris</i> .	23
2.4.12	Expresión de Laccasa de <i>Botrytis aclada</i> en biorreactor por lotes alimentados.	23
2.5	MÉTODOS DE BIOQUÍMICA.	25
2.5.1	Determinación de la actividad Laccasa.	25
2.5.2	Determinación de la concentración de proteínas.	26
2.5.3	Electroforesis de proteínas en condiciones denaturantes (SDS-PAGE).	27
2.5.4	Precipitación de proteínas por Sulfato de Amonio.	28
2.5.5	Cromatografía de interacción hidrofóbica.	28
2.5.6	Cromatografía de exclusión molecular.	29
2.5.7	Ensayos de inactivación enzimática de antibióticos.	29
2.5.8	Ensayos de oxidación enzimática de Oxitetraciclina.	31
2.5.9	Determinación de las constantes cinéticas aparentes.	32
2.5.10	Análisis estadístico.	34
2.6	MÉTODOS DE BIOINFORMÁTICA	35
2.6.1	Modelamiento 3D.	35
2.6.2	Docking.	37
2.6.3	Simulaciones de Dinámica Molecular.	39
2.6.4	Análisis de Simulaciones.	40
3.	RESULTADOS	43
3.1	EXPRESIÓN DE LA LACCASA DE <i>B. ACLADA</i> EN <i>P. PASTORIS</i> .	43
3.1.1	Construcción del vector pPICZ A BaLcc y su transformación en <i>P. pastoris</i> .	43
3.1.2	Construcción del plasmidio pGAPZ A BaLcc	46
3.1.3	Expresión de Laccasa de <i>Botrytis aclada</i> en <i>P. pastoris</i> .	50
3.2	PURIFICACIÓN DE LA LACCASA DE <i>B. ACLADA</i> EXPRESADA EN <i>P. PASTORIS</i> .	54
3.3	OXIDACIÓN DE OXITETRACICLINA POR LA LACCASA DE <i>B. ACLADA</i> , Y EL EFECTO DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> .	59
3.4	DETERMINACIÓN DE LA ENERGÍA DE UNIÓN ENTRE LA LACCASA DE <i>BOTRYTIS ACLADA</i> Y ANTIBIÓTICOS DE LA FAMILIA TETRACICLINA POR MM-PBSA.	63
3.5	DETERMINACIÓN DE LAS DIFERENCIAS DE AFINIDAD ENTRE LA LACCASA DE <i>BOTRYTIS ACLADA</i> Y ANTIBIÓTICOS DE LA FAMILIA TETRACICLINA.	76
4.	DISCUSIÓN	82
4.1	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA LACCASA DE <i>B. ACLADA</i> EXPRESADA EN <i>P. PASTORIS</i> .	82
4.2	LA LACCASA DE <i>BOTRYTIS ACLADA</i> PUEDE OXIDAR E INACTIVAR TETRACICLINAS.	86
4.3	CARACTERÍSTICAS DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA LACCASA DE <i>B. ACLADA</i> Y TETRACICLINAS.	88
5.	CONCLUSIÓN	94
6.	BIBLIOGRAFIA	95

Lista de tablas

TABLA 1 CANTIDADES Y SÍMBOLO DE LAS UNIDADES DE MEDIDA	X
TABLA 2 ABREVIATURAS STANDARD Y CONVENCIONES	XI
TABLA 3 PARTIDORES	13
TABLA 4 VECTORES	14
TABLA 5 PROTEÍNAS HOMOLOGAS A LA LACCASA DE <i>B. ACLADA</i> EN EL PDB.	64
TABLA 6 ΔG_b CALCULADO POR MM-PBSA PARA LOS COMPLEJOS <i>BALCC</i> -TETRACICLINA.....	73
TABLA 7. ΔG_b CALCULADO POR MM-PBSA Y DESGLOSADO POR RESIDUO PARA LOS COMPLEJOS <i>BALCC</i> -TETRACICLINA.	74

Lista de figuras

FIGURA 1 DISPERSIÓN DE ANTIBIÓTICOS USADOS EN EL TRATAMIENTO DE HUMANOS Y ANIMALES EN EL MEDIO AMBIENTE	3
FIGURA 2 VÍA DE REACCIÓN DE OXIDACIÓN DE TETRACICLINA.	7
FIGURA 3 MAPA DE VECTORES	15
FIGURA 4 INSTALACIÓN DEL BIORREACTOR	24
FIGURA 5 CURVA DE CALIBRACIÓN DE OXITETRACICLINA POR HPLC	32
FIGURA 6 CONFIRMACIÓN DEL CLONAMIENTO DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE LA <i>BALCC</i> EN <i>PPICZ A</i>	45
FIGURA 7 EXPRESIÓN DE <i>BALCC</i> EN MEDIO SÓLIDO.	46
FIGURA 8 CONFIRMACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN DE <i>PGAPZ A</i>	48
FIGURA 9 CONFIRMACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN DEL PLASMIDIO <i>PGAPZ A BALCC</i>	49
FIGURA 10 CURVA DE CRECIMIENTO E INDUCCIÓN DE <i>BALCC</i> BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR <i>AOX1</i>	51
FIGURA 11 CURVA DE CRECIMIENTO E INDUCCIÓN DE <i>BALCC</i> BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR <i>GAP</i>	52
FIGURA 12 CURVA DE CRECIMIENTO E INDUCCIÓN DE <i>BALCC</i> EN BIORREACTOR.....	53
FIGURA 13 EXPRESIÓN DE <i>LACCASA</i> EN CULTIVOS	54
FIGURA 14 PURIFICACIÓN DE <i>BALCC</i> POR CROMATOGRFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA.....	56
FIGURA 15 PURIFICACIÓN POR CROMATOGRFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.....	58
FIGURA 16 CURVA DE OXIDACIÓN DE OXITETRACICLINA	60
FIGURA 17 CURVAS DE INACTIVACIÓN DE TETRACICLINAS	62
FIGURA 18 MODELADO DE LA <i>BALCC</i>	66
FIGURA 19 TRAYECTORIA DE LA SIMULACIÓN DE <i>BALCC APO</i>	67
FIGURA 20 DOCKING DE TETRACICLINAS EN EL MODELO DE LA <i>BALCC</i>	69
FIGURA 21 TRAYECTORIAS DE SIMULACIONES DE LOS COMPLEJOS <i>BALCC</i> -TETRACICLINAS.	71

FIGURA 22 FLUCTUACIÓN DE LA HÉLICE $\alpha 1$ Y EL LOOP $\alpha 1$ - $\beta 10$ EN SIMULACIONES DE BALCC APO Y EN COMPLEJO CON TETRACICLINAS.....	72
FIGURA 23 ENERGÍA DE UNIÓN DESGLOSADO POR RESIDUO.....	75
FIGURA 24 CURVA DE SATURACIÓN DE ABTS.....	78
FIGURA 25 CURVA DE SATURACIÓN DE ABTS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TETRACICLINAS.....	80

Lista de Símbolos, Abreviaturas o Nomenclatura

Tabla 1 Cantidades y símbolo de las unidades de medida

Magnitud	Dimensión	Símbolo
Longitud	Metro	m, mm, cm, μm , nm
Longitud	Angstrom	Å
Volumen	litro	L, ml, μl
Tiempo	Hora	h, min, s, ms, μs , ns
Masa	gramo	Kg, g, mg, μg
Aceleración	Fuerza g	g
Absorbancia	Unidades de absorbancia	DO, Abs
Concentración	mol/L	M, mM, μM , $\%(\text{p/v})$, $\%(\text{p/p})$
Concentración	Equivalentes /L	N
Concentración	Porcentaje peso en volumen	$\% \text{p/v}$
Masa molecular	Dalton	Da, kDa
Tamaño molecular	pares de bases	Pb, Kpb
Temperatura	grados Celsius	$^{\circ}\text{C}$
Energía	Caloría por mol	Kcal/mol
Presión	pascal	Pa, mPa
Actividad enzimática	Unidades por minuto	U
Tensión	Voltaje	V, kV, etc
Resistencia	Ohm	Ω
Corriente	Ampere	A, mA
Capacitancia	Farad	F, μF
Flujo de aire	Volumen de aire por volumen de biorreactor por minuto	vvm

Tabla 2 Abreviaturas standard y convenciones

Abreviatura	Significado
K	Constante de equilibrio
k_i	Constante de inhibición
K_M	Constante de Michaelis-Menten
K_d	Constante de disociación
ϵ	Coefficiente de extinción molar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
Abs	Absorbancia
K_{cat}	Constante Catalítica
V_{max}	Velocidad maxima
IC_{50}	Concentracion inhibitoria media
Zeo	Zeocina
MM-PBSA	<i>Molecular Mechanics – Poisson-Boltzmann surface analysis</i>
NMWL	Límite nominal de peso molecular
DO_{600}	Densidad optica a 600 nm
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
RMSF	<i>Root mean square Fluctuation</i>
GAFF	<i>General Amber Forcefield</i>
TC ó TAC	Tetraciclina
OTC	Oxitetraciclina
CTC	Clortetraciclina
HBT	1- hidroxibenzotriazol
M-CLEAs	Magnetic – Crosslinked Enzyme Agregates
LiP	Lignoperoxidasa
MnP	Manganeso peroxidasa

RESUMEN

El aumento en la aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos es de gran preocupación en el ámbito de salud pública debido al aumento de la mortalidad y costos de tratamiento causado por las enfermedades que provocan. Se han detectado concentraciones de residuos de antibióticos sobre los niveles inhibitorios en aguas residuales, y los tratamientos actuales no son capaces de eliminar estos residuos. En relación con todo esto, los antibióticos de tipo tetraciclina son de gran interés debido a su alto uso, alto nivel de excreción y a su alta persistencia en el medio ambiente. Se ha reportado el uso de enzimas de tipo laccasa de hongos basidiomicetos para la oxidación de diferentes tetraciclinas mostrando distintas eficiencias. Sin embargo, las propiedades observadas aún están por debajo de lo requerido para una aplicación industrial y la optimización ha sido hasta ahora afrontada desde el ámbito de la Biocatálisis y no desde la Ingeniería de Enzimas. En este trabajo se estudió el uso de la laccasa del hongo ascomiceto *Botrytis aclada* expresada en *P. pastoris* para la oxidación de tetraciclinas, enzima que presenta una alta tolerancia a inhibición por iones cloruro y alta producción heteróloga. Se produjo y purificó la enzima y se probó su capacidad para oxidar oxitetraciclina e inactivar oxitetraciclina, clortetraciclina y tetraciclina. Bajo la hipótesis de que el sitio de unión de tetraciclinas corresponde al sitio canónico de las Laccasas y con la información disponible sobre el mecanismo catalítico, se modeló la interacción con estos 3 antibióticos y se calculó su energía de unión por métodos *in silico*. Además, las constantes de disociación de los distintos complejos fueron estudiadas *in vitro*

mediante análisis de la inhibición competitiva ejercida por el antibiótico sobre la actividad de oxidación de ABTS de la laccasa. Observamos que la energía calculada correlaciona con la constante de disociación determinada para los tres antibióticos, mostrando una afinidad por Clortetraciclina > Tetraciclina > Oxitetraciclina.

ABSTRACT

The high apparition rate of antimicrobial resistant bacteria is of great concern for public health care due to the rise in mortality and the high cost associated to treat the illnesses caused by them. Antibiotic residual concentrations highly over the inhibitory levels have been detected in wastewaters. Now, wastewater treatment plants are not able to remove this kind of residues. In this matter, tetracycline antibiotics are of great concern due to their high use, high excretion rates and persistence in the environment. The use of Laccases from basidiomycetes for the oxidation of a variety of tetracyclines has been reported, showing variable performance. However, the observed oxidation rates are still under the required for industrial applications. Antibiotics removal has been optimized using approaches from the biocatalysis field and not from rational design enzyme engineer. In this work, we studied the use of laccase from *Botrytis aclada*, an ascomycete fungus, for the oxidation of tetracyclines. This enzyme shows high tolerance to chloride inhibition and high heterologous production rates. The enzyme was expressed and purified, and we proved its capacity to oxidase oxytetracycline and to inactivate oxytetracycline, and tetracycline. Having in mind the hypothesis that the binding site of tetracyclines is the canonical laccase active site, we modeled the interaction with those three antibiotics and calculated the energy of binding using *in silico* approaches. Also, we determined in vitro the dissociation constants of the complexes by analyzing inhibition kinetics using the antibiotic as a competitive inhibitor of the enzymatic ABTS oxidation.

We observed a good correlation between the calculated Energy and the dissociation constants, showing higher affinity for Chlortetracycline > Tetracycline > Oxytetracycline.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los antibióticos como contaminantes.

El uso de antibióticos desde inicios del siglo 20, en conjunto con una mejor higiene y programas de vacunación han aumentado drásticamente la expectativa de vida del humano (Berkner, et al., 2014). No obstante, el alto éxito terapéutico de estas drogas y el desconocimiento de sus riesgos ha llevado a un uso global muchas veces laxo e irresponsable. Por ejemplo, el uso de antibióticos para tratar infecciones leves o virales, así como el uso de cantidades masivas en agricultura y acuicultura como medida preventiva de enfermedades o como promotor del crecimiento del ganado ha llevado a la aparición y diseminación de bacterias resistentes y genes de resistencia a antibióticos, a nivel global.

Las bacterias resistentes son un problema para la salud mundial debido a la dificultad en su tratamiento y el aumento de la morbilidad y mortalidad de las patologías que causan. La Organización Mundial de la Salud ubica este problema como uno de los de mayor preocupación para la salud mundial (<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>). Las resistencias antimicrobianas amenazan el tratamiento y prevención de enfermedades causadas por bacterias y comprometen el éxito de cirugías mayores. El costo del tratamiento de pacientes afectados por bacterias resistentes es más alto debido a la mayor duración de la enfermedad, la necesidad de

exámenes adicionales y el uso de drogas más costosas. Se estima, por ejemplo, que el costo anual del tratamiento de enfermedades causadas por bacterias resistentes sólo en Estados Unidos sería de entre \$21 y \$34 billones de dólares al año, junto con 8 millones de días adicionales de hospitalización (WHO, 2014). Se prevé que para el 2050, 10 millones de muertes al año serán causadas por bacterias resistentes (O'Neill, 2014).

Para controlar este problema no sólo es necesario disminuir el mal uso de antibióticos, sino que afrontar el problema causado por sus residuos. Los antibióticos no son metabolizados luego de que el paciente los ingiere o el animal es tratado. Por lo contrario, generalmente el compuesto es excretado, encontrándose entre un 10 y 90% del compuesto activo en la orina, dependiendo del tipo de antibiótico (Berkner, 2014). Como consecuencia, los residuos de antibióticos llegan a través del alcantarillado a las plantas de tratamiento de aguas. En ellas, incluso los tratamientos de tres pasos (mecánico, biológico y químico) no son capaces de remover los antibióticos efectivamente (Joss, et al., 2006). De hecho, se han detectado altos niveles de antibióticos en aguas residuales provenientes de instalaciones de engorde de animales (Malintan, et al., 2006), en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas (Karthikeyan, et al., 2006) y en efluentes provenientes de hospitales (Abejón, Belleville, et al., 2015). Como estos residuos llegan a masas de agua dulce, agua salada y se esparcen a través de la cadena trófica, pueden no sólo causar daños ambientales y ecológicos (Berkner, 2014), sino que aumentar el riesgo de aparición de resistencias bacterianas. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos métodos capaces de

removerlos de las aguas residuales, creando barreras para su diseminación. Se han propuesto varios tratamientos que podrían remover antibióticos en plantas de tratamiento (Ben, et al., 2009; Jordá, et al., 2011; T. H. Kim, et al., 2012; Michael, et al., 2012). Entre ellos, los tratamientos enzimáticos (Suda, et al., 2012; Wen, et al., 2010) muestran la ventaja de ser específicos y amigables con el medio ambiente.

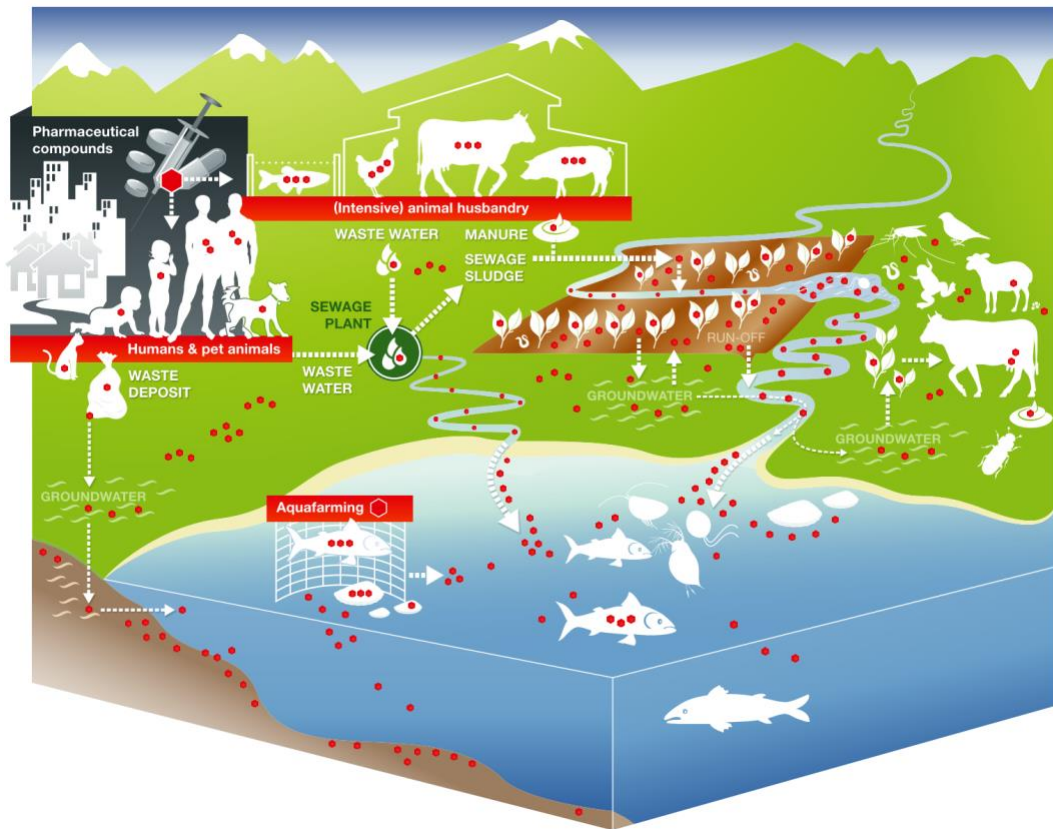


Figura 1 Dispersión de antibióticos usados en el tratamiento de humanos y animales en el medio ambiente.

Tomado directamente de (Berkner, 2014). Comenzando con la aplicación del antibiótico en medicina humana o animal, la diseminación de residuos de antibióticos en el ecosistema se dibuja como una red de caminos de exposición. Los residuos de antibióticos son representados como puntos rojos.

1.2 Uso de Laccasas para la oxidación de antibióticos.

Se ha reportado el uso de varias enzimas ligninolíticas para la remoción de varios compuestos farmacéuticos, entre ellas manganeso peroxidasas (MnP), Laccasas y ligninoperoxidasas (LiP) (Suda, 2012; Wen, 2010). Las Laccasas son Oxidasas multicobre (EC.1.10.3.2) que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos, tanto fenoles como polifenoles, acoplada a la reducción de Oxígeno molecular hasta agua (Rivera-Hoyos y col., 2013; Rodgers y col., 2010). Aunque las Laccasas no son las enzimas mas eficientes para degradar antibióticos (Suda, 2012), su ventaja justamente radica en que sólo producen agua como subproducto de reacción, frente a las demás enzimas lignolíticas que producen especies reactivas de oxígeno. Las Laccasas pueden oxidar antibióticos de varias familias (Ding, et al., 2016; Shi, et al., 2014), pero muestran una mayor eficiencia en la degradación de antibióticos del tipo tetraciclina (Suda, 2012; Yang, et al., 2015). La degradación de tetraciclinas es de gran interés, por sobre otros antibióticos debido a su alto uso industrial, alto nivel de excreción del compuesto activo en la orina (sobre el 70%) y su alta persistencia en el medio ambiente (Daghrir, et al., 2013).

A nuestro conocimiento el primer reporte del uso de Laccasas para la oxidación de antibióticos fue el 2012 (Suda, 2012), los autores compararon el uso de un extracto de Laccasa de *Trametes versicolor* (en presencia y ausencia del mediador 1-hidroxibenzotriazol HBT) con el uso de una Manganeso peroxidasa, para la oxidación de 4 antibióticos de tipo tetraciclina. Aunque la Laccasa fue capaz de oxidar los antibióticos

por sí sola, se señala que no es suficiente para llegar a una aplicación industrial, porque es muy lenta en comparación con la MnP. Sin embargo, en presencia de HBT la oxidación se ve aumentada fuertemente, incluso superando lo observado para la MnP. Además, se reportó que los productos de reacción pierden la capacidad de inhibir el crecimiento de cultivos de bacterias y algas, demostrando la capacidad de esta enzima de inactivar antibióticos, lo cual disminuye su potencial como contaminantes.

Por su parte, (Chang, et al., 2015) utilizaron microcápsulas para inmovilizar enzimas provenientes de un extracto de *Pleurotus eryngii* para la oxidación de 3 tetraciclinas en sedimento de río en un biorreactor. El extracto contenía actividad laccasa, pero a su vez podía contener manganeso peroxidasa y aryl alcohol oxidasas. Observaron que la inmovilización incrementa la capacidad del extracto para la oxidación de los compuestos, en conjunto con la comunidad bacteriana proveniente del sedimento en el biorreactor, y además presenta una mayor capacidad de mantener la actividad para usos repetidos.

Posteriormente, el grupo de Sanchez-Marcano, desarrolló un reactor de membrana enzimático, con Laccasa de *T. versicolor* inmovilizada para la oxidación de tetraciclina en aguas residuales (De Cazes, et al., 2014). Observaron que, más allá de tener un sistema más eficiente que lo observado para enzimas en su forma libre, se requiere de un área de membrana y una masa de enzima enormes para llegar a niveles de oxidación industriales. En estudios posteriores evaluaron la viabilidad económica de este sistema para su uso a escala industrial en la oxidación de tetraciclina de aguas

municipales, de hospitales o industriales. En estudios siguientes generaron un modelo matemático para optimizar la oxidación de tetraciclina en el reactor (Abejón, 2015; Abejón, De Cazes, et al., 2015). Detectaron que las variables que mayor efecto tendrían para optimizar la oxidación serían la V_{\max} de la enzima, y la reducción de los costos de regeneración del reactor, por lo cual, la aplicabilidad del proceso aumentaría si se utilizaran enzimas más activas, más específicas por tetraciclina y de menor costo de producción (Abejón, 2015, 2015).

Posteriormente, tanto Llorca (Llorca, et al., 2015) como Yang (Yang, 2015) identificaron diferentes intermediarios de la reacción y propusieron que la oxidación de tetraciclina utilizando Laccasa como catalizador ocurre en una vía específica de transformaciones. En el caso de Llorca se utilizó un extracto de *T. versicolor* en solución, mientras que Yang utilizó un extracto de laccasa de *Cerrena unicolor* inmovilizada en M-CLEAs. Resulta interesante que, a pesar de utilizar extractos enzimáticos provenientes de organismos diferentes, enzima inmovilizada o enzima libre, hayan observado un mecanismo similar. El primer paso en la vía corresponde a la oxidación de la posición 5 produciendo una cetona, y luego el grupo amino en la posición 4 es bi-desmetilado. Luego ocurren oxidaciones en las posiciones 4, 6 y 12 formando el producto TP 396 (Figura 2). En el caso de Llorca el intermediario cetona no pudo ser detectado. Es importante observar además, que para el caso de la laccasa de *C. unicolor* el uso del mediador ABTS, no aumenta la velocidad de oxidación, sino que la disminuye, mostrando un resultado completamente contrario al efecto del mediador HBT observado por Suda

(Suda, 2012). Para la enzima libre además se podría suponer algún nivel de preferencia por las distintas tetraciclinas: Yang observa una mayor oxidación de Tetraciclina frente a Oxitetraciclina, mientras que Suda para cuatro tetraciclinas observa una oxidación en el siguiente orden: Clortetraciclina > Doxiciclina > Tetraciclina > Oxitetraciclina; siendo sustratos que difieren en uno o dos grupos funcionales. Entonces, dado que los principales cambios en la estructura del antibiótico ocurren en las posiciones 4, 5 y 6, podemos suponer que ese extremo del compuesto estaría cercano a la región reactiva de la enzima.

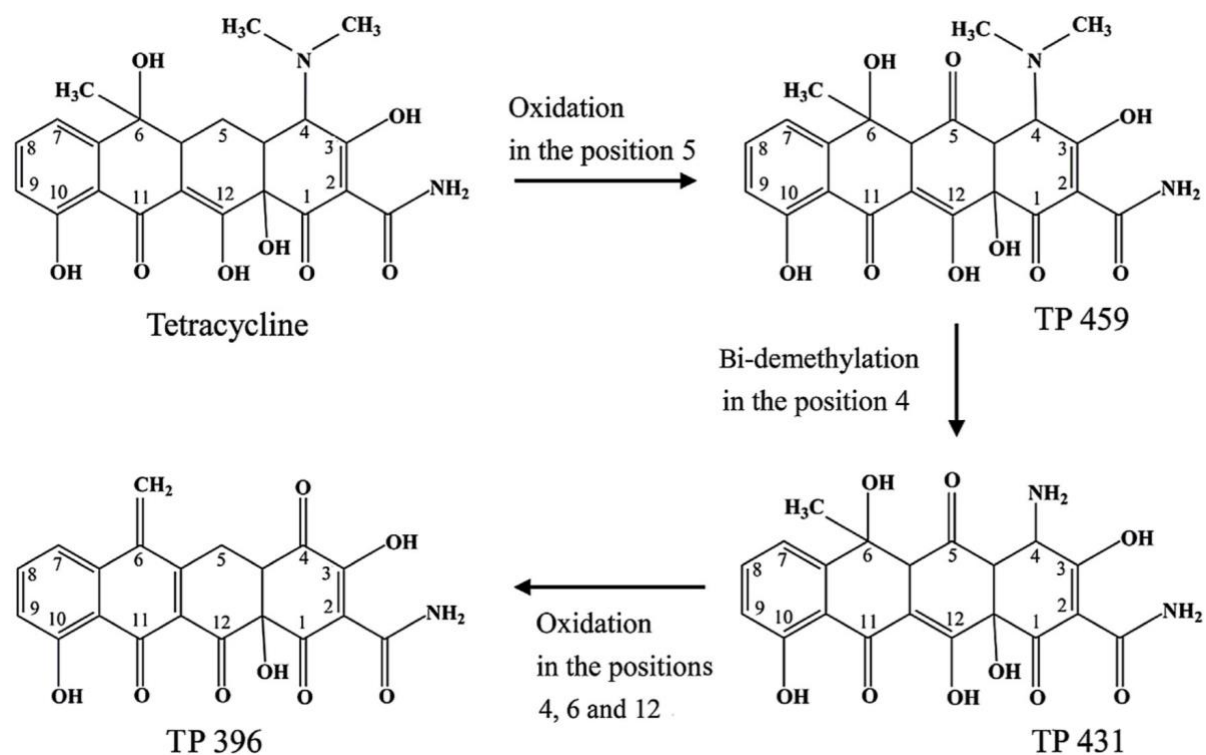


Figura 2 Vía de reacción de oxidación de tetraciclina.

Tomado directamente de (Yang, et al., 2016).

Más allá de estas observaciones, poco se sabe de la interacción misma entre las Laccasas y los antibióticos de tipo tetraciclina. De hecho, aunque se han depositado en el PDB cerca de 100 estructuras cristalográficas de Laccasas, los determinantes de especificidad por sustratos de estas enzimas no han sido estudiados.

Sin embargo, se cuenta con bastante información estructural sobre las Laccasas. Son glicoproteínas monoméricas o dimericas de entre 50 y 140 KDa (Claus, 2004). Estas enzimas están compuestas por tres dominios con topología de barril β . En el dominio 3 se encuentra el sitio de unión al sustrato y un átomo de cobre de tipo 1, coordinado por dos histidinas y una cisteína. Entre los dominios 1 y 3 se encuentra un centro trinuclear de cobre T2/T3. Los átomos de cobre están organizados de forma triangular y coordinados fuertemente por un patrón conservado de cuatro motivos H-X-H, donde 3 de ellos coordinan al par de cobres T3. El cobre T2 es coordinado por el motivo restante, y un número de ligandos (entre 2 y 3) derivados de H₂O y O₂, dependiendo del estado de oxidación de la enzima. En este sitio ocurre la reducción del O₂ a H₂O (Hu, et al., 2011; Rivera-Hoyos, et al., 2013).

La transferencia de electrones entre el sustrato y el oxígeno ocurre a través de los sitios de unión a cobre. Debe ocurrir la transferencia de 4 electrones, para la producción de una molécula de agua a partir de una de oxígeno, esto asociado a transiciones de varios estados de oxidación en el sitio de unión a oxígeno (Huang, et al., 1999). Por su parte en el sitio de unión a sustrato, el electrón pasa desde el sustrato al sitio de unión a cobre a través de una de las histidinas que coordinan al cobre T1 (Galli,

et al., 2013; Tadesse, et al., 2008). Por lo tanto, se espera que la interacción entre los antibióticos de tipo tetraciclina y la laccasa este caracterizada por una baja distancia entre esa histidina y el C5 del compuesto, facilitando la transferencia del electrón.

Recapitulando, a la fecha se ha caracterizado la capacidad de oxidación antibióticos por parte de extractos de laccasa provenientes de hongos basidiomicetos, observándose bajas tasas de oxidación. Pero la posible toxicidad y alto costo de los mediadores disminuiría su uso. El uso de la enzima inmovilizada puede aumentar su capacidad para oxidar el compuesto y aumenta su vida media, reduciendo los costos de producción. La capacidad de optimizar la V_{max} y la especificidad de la enzima parece indispensable, por lo que el conocimiento de los determinantes de especificidad y del mecanismo de reacción de la enzima serian una herramienta invaluable para llevar este proceso a su uso industrial.

1.3 La laccasa de *Botrytis aclada*.

Recientemente se clonó y expresó en *Pichia pastoris* una laccasa proveniente del patógeno de plantas, *Botrytis aclada*. Se reportó la expresión de esta enzima como la más alta expresión heteróloga de una laccasa lograda hasta la fecha (Kittl, Mueangtoom, et al., 2012). Una característica común en la mayor parte de las Laccasas descritas a la fecha es su alta inhibición por iones Cl^- , encontrando valores de IC_{50} menores a 100 mM (Kittl, Mueangtoom, et al., 2012). La laccasa de *Botrytis aclada* presenta un IC_{50} por NaCl de 1,4 M, uno de los más altos encontrados en la familia de enzimas. En estudios

posteriores, se logró optimizar su expresión con el uso de un promotor constitutivo, disminuyendo el tiempo de cultivo (Kittl, Gonaus, et al., 2012). Posteriormente se caracterizó su estructura cristalográfica y se observó que se trata de una laccasa dimérica (E. M. Osipov et al., 2015; E. Osipov et al., 2014). Estas características hacen de esta enzima un muy buen candidato para estudiar y optimizar la oxidación de tetraciclinas. Sin embargo, su capacidad para oxidar antibióticos aún no ha sido probada.

1.4 Hipótesis.

La Laccasa de *Botrytis aclada* expresada en *P. pastoris* oxida antibióticos de la familia tetraciclina. Es posible predecir la preferencia por diferentes tetraciclinas por medio de métodos *in silico*, teniendo en cuenta una interacción caracterizada por una baja distancia entre el C5 de la tetraciclina y la H494, residuo clave para la transferencia de electrones.

1.5 Objetivo general.

Caracterizar la interacción entre la laccasa de *Botrytis aclada* expresada en *P. pastoris* y antibióticos de la familia tetraciclina, a través de dinámica molecular, MM-PBSA y cinética enzimática.

1.6 Objetivos específicos.

- Expresar de la laccasa de *B. aclada* en *P. pastoris*.
- Purificar la laccasa de *B. aclada* expresada en *P. pastoris*.
- Evaluar la oxidación e inactivación de tetraciclinas por parte de la Laccasa de *B. aclada* expresada en *P. pastoris*, y el efecto de los productos de reacción sobre el crecimiento de *E. coli*.
- Calcular las energías de unión entre la Laccasa de *Botrytis aclada* y antibióticos de la familia tetraciclina por dinámica molecular y MM-PBSA.

- Determinar las diferencias de afinidad entre la Laccasa de *Botrytis aclada* expresada en *P. pastoris* y antibióticos de la familia tetraciclina mediante ensayos de inhibición competitiva

2. Materiales y Métodos

2.1 Cepas.

Para la transformación y amplificación de los plásmidos se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli* (*F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1endA1 hsdR17 (rkrk+) poa supE44 λ -thi-1gyrA96 relA1 tonA*), mientras que para la expresión de proteínas se usó la cepa SMD1168 de *Pichia pastoris* (*his4 pep4*).

2.2 Partidores.

Los partidores diseñados y utilizados en este trabajo se indican en la tabla 3, los sitios en los cuales hibridan con los plásmidos construidos se muestran en la Figura 3.

Tabla 3 Partidores.

Nombre	Secuencia	Orientación
AOX1_Forward	5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'	F
AOX1_reverse	5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'	R
Gap2 fw	5' GGTGTCCTCGTCCAATCAGG 3'	F
pGAP foward	5' GTCCCTATTTCAATCAATTGAA 3'	F
Balcc fwd	5' CGGTACTTCTATCCATTGGCACG 3'	F
Balcc rv	5' CCCAGTTACCACGAATCC 3'	F

2.3 Vectores.

Los vectores utilizados y construidos en esta tesis se indican en la Tabla 4 y sus mapas se muestran en la Figura 3

Tabla 4 Vectores.

Nombre	Descripción	Referencia
pPICZ A	Vector de expresión inducible en <i>P. pastoris</i> . Marcador de selección en levaduras y bacterias transformantes: Zeo. Ori.	Invitrogen
pGAPZ A	Vector de expresión constitutiva en <i>P. pastoris</i> . Marcador de selección en levaduras y bacterias transformantes: Zeo. Ori.	Invitrogen
pPICZ A-BaLcc	Vector pPICZ A que porta entre los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>Apal</i> , la secuencia codificante de la <i>BaLcc</i> (Uniprot id JN559771) que codifica para la proteína Laccasa de <i>B. aclada</i> .	Esta Tesis
pGAPZ A-BaLcc	Vector pGAPZ A que porta entre los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>Apal</i> , la secuencia codificante de la <i>BaLcc</i> (Uniprot id JN559771) que codifica para la proteína Laccasa de <i>B. aclada</i> .	Esta Tesis

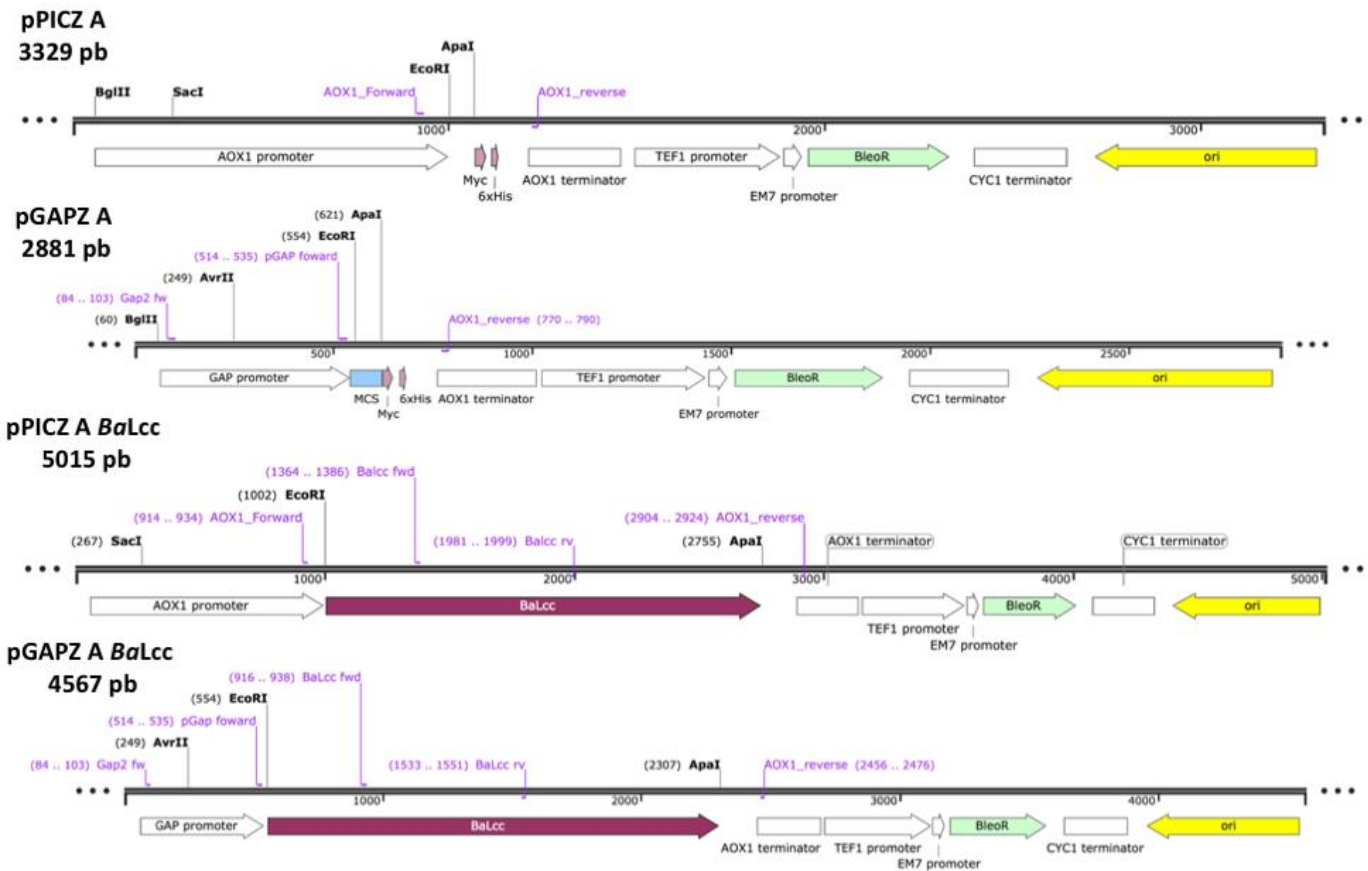


Figura 3 Mapa de vectores.

Se muestran esquemas de los vectores pPICZ A, pGAPZ A, pPICZ A BaLcc y pGAPZ A BaLcc construidos. Se destacan en negro los sitios de restricción utilizados y en morado las regiones en las cuales hibridan los partidores utilizados.

2.4 Métodos de Microbiología y Biología Molecular

2.4.1 Medios de cultivo.

Medio LB low salt: Se usó para el crecimiento de cultivos de *E. coli* transformada con vectores que poseen la secuencia codificante del gen de resistencia a Zeocina como marcador de selección. Se compone de 1% p/v de peptona, 0.5% p/v de extracto de levadura y 0.5% p/v de NaCl. Se ajustó el pH del medio a 7,5 con NaOH 1N. Para su preparación se usó agua desionizada y se esterilizó en autoclave. Se utilizó 25 µg/mL de Zeocina como concentración de trabajo.

Medio YEP: Se usó para el crecimiento de cultivos de *P. pastoris*. Se compone de 1% p/v extracto de levadura, 2% p/v de glucosa y 2% p/v de peptona. Se preparó utilizando agua desionizada, y se esterilizó en autoclave. Se utilizó 100 µg/mL de Zeocina como concentración de trabajo. Cuando las placas fueron utilizadas para el proceso de transformación de *P. pastoris* se suplementaron con 1M de Sorbitol.

Medio BMG o BMM (Buffered Minimal Glycerol/Buffered Minimal Methanol): Estos medios se utilizaron para el crecimiento y expresión de proteínas en *Pichia pastoris*. Se componen de 1,34% p/v de *Yeast nitrogen base w/o aminoacids*, 100 mM fosfato de potasio pH 5,6; 4×10^{-5} % p/v biotina, 1% glicerol (para BMG) o 0,5% de metanol (para BMM). Se prepararon usando agua desionizada y se esterilizaron en autoclave.

Cuando se usaron los medios para la expresión de proteínas se suplementaron con 300 mM de sulfato de cobre.

Medios sólidos: Cuando se prepararon medios sólidos, se prepararon los medios en la misma forma que se describe mas arriba, pero además se agregó agar a una concentración de 1,5% p/v, previo a la esterilización en autoclave. Una vez estéril se enfrió hasta alrededor de 55°C y se suplementó el antibiótico. Para preparar placas de expresión, además del antibiótico se adicionó ABTS a una concentración final de 2mM y sulfato de cobre a una concentración de 300 mM.

2.4.2 Purificación de DNA plasmidial.

El DNA plasmidial de los clones de *E. coli* recombinantes se purificó por medio del *kit E.Z.N.A. Plasmid miniprep Kit 1*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Al final del procedimiento, se determinó la absorbancia a 260 nm (Abs260) y 280 nm (Abs280) de una dilución de las muestras, en cubetas de cuarzo. Con esto se estimó la pureza del DNA por medio de la relación Abs260/abs280, lo cual en todos los casos fue superior a 1.8, indicando un grado de pureza mayor a 95%. Se calculó la concentración de DNA como:

$$[DNA_{plasmidial}] = Abs_{260} \times 50 \frac{ng}{\mu L}$$

2.4.3 Purificación de DNA cromosómico desde *P. pastoris*.

Para la purificación de DNA desde *P. pastoris* se tomó una colonia de interés, y se inoculó en 5 mL de medio YEP, se incubó a 30°C con agitación durante una noche. Se centrifugó el cultivo a 5.500 x g a temperatura ambiente por 5 minutos. Se tomó el pellet, a partir del cual se purificó el DNA cromosómico siguiendo las instrucciones del kit *Wizard® Genomic DNA Purification kit* para la purificación de DNA cromosómico de levaduras. Se utilizó la enzima Liticasa de *Arthobacter luteus* (SIGMA) para el paso de degradación de la pared celular. El DNA purificado fue utilizado como molde para reacciones de PCR.

2.4.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los geles se prepararon a una concentración de 0.8% p/v de agarosa (SeaKem) en *buffer* TAE (Tris-HCL 40 mM, Ácido acético 20 mM y EDTA 1mM) y *Gelred* (Biotium) a una concentración final de 1X. Para cargar las muestras de DNA en el gel, éstas se mezclaron en una proporción de 5:1 con *buffer* de carga (*DNA Gel Loading Dye 6X, Merck*). Se incluyó en uno de los carriles un marcador de peso molecular *AccuRuler 1 kb DNA RTU Ladder (MaestroGen)*. Las electroforesis se corrieron a voltaje constante de 80 V y el DNA se visualizó con un transiluminador UV.

2.4.5 Electrotransformación de *E. coli*.

Preparación de células electrocompetentes: Se cultivó *E. coli* DH5 α en medio LB a 37°C con agitación. Una vez que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,7; se centrifugó a 5.500 x g por 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con 50 mL de agua destilada estéril a 4°C. Luego se centrifugó a 5.500 x g por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Las células se suspendieron en glicerol al 10% v/v y se almacenaron a -80°C hasta que fueron utilizadas.

Electrotransformación: Se mezclaron 40 μ L de células electrocompetentes con 4 μ L de DNA plasmidial obtenido por miniprep o 4 μ L de una reacción de ligación. Las células se electroporaron en un electroporador *Biorad Gene Pulser Xcell* en cubetas de 0,2 cm bajo las siguientes condiciones: 2,5 kV, 200 Ω y 25 μ F. Luego del pulso, las células se suspendieron en 1 mL de medio LB y se incubaron a 37 °C durante 1 h, tras lo cual se sembraron en placas LB-agar suplementadas con el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron durante una noche o hasta encontrar colonias.

2.4.6 Electrotransformación de *P. pastoris*.

Preparación de células electrocompetentes: Cultivos de una noche de 50 mL de *P. pastoris* en medio YEP se centrifugaron a 5.500 x g por 5 min y se lavaron 2 veces con 50 mL de agua estéril a 4 °C y una vez con 4 mL de Sorbitol 1M estéril a 4°C. Se descartó

el sobrenadante y las células se suspendieron en 400 µL de Sorbitol 1M a 4 °C. Las células electrocompetentes se transformaron inmediatamente.

Electrotransformación: Para la transformación se utilizó DNA plasmidial linearizado con la enzima *AvrII* (en el caso de plásmidos con el promotor GAP) o *SacI* (en el caso de plásmidos con el promotor AOX1). La digestión se realizó durante una noche. Al producto de la digestión se agregaron al menos 2 volúmenes de etanol 100% y se incubó durante 1 h a -20°C para precipitar el DNA. Posteriormente se centrifugó por 20 minutos a 4°C a 21.000 x g y luego se descartó el sobrenadante. El DNA precipitado fue suspendido en 80 µL de células de *P. pastoris* electrocompetentes y se incubó en hielo durante 5 minutos. Las células se electroporaron en un electroporador *Biorad Gene Pulser Xcell* en condiciones de voltaje de 1,5 KV, capacitancia de 25 µF y resistencia de 200 Ω, usando cubetas de 2 cm de separación. Las células electroporadas se suspendieron en 1 mL de medio Sorbitol 1M y se incubaron a 30 °C durante 3 h. Las células se sembraron en placas YEP-agar suplementadas con 1M sorbitol y entre 100 y 500 µg/mL de Zeocina, luego se incubaron a 30°C durante 3 días o hasta encontrar colonias.

2.4.7 Amplificación de DNA por PCR.

Para las reacciones de PCR se utilizó el *kit Hot Start PCR Master Mix: SapphireAmp Fast PCR Master Mix (Takara)* utilizando las instrucciones del fabricante, se utilizaron 2,5 µM de cada partidor y 10 a 100 ng de DNA molde, o media colonia de *E. coli*. Se utilizó

un termociclador *Kyratec SC200*, utilizando el programa de ciclos propuesto por el fabricante. Se hizo una elongación final de 10 min a 72°C y luego se conservó el DNA a 4°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa.

2.4.8 Purificación de DNA desde geles de agarosa.

Fragmentos de DNA separados por electroforesis en gel de agarosa fueron purificados a partir de una tajada del gel cortada con un bisturí. Se disolvió el gel en una solución de ioduro de potasio 6 M incubando a 55°C por 10 min. Se adicionaron 10 µL de *Glassmilk* (dióxido de silicio) y se incubó por 5 min en hielo, se centrifugó y eliminó el sobrenadante. El DNA precipitado se lavó 3 veces con solución de lavado (Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 25mM pH 7,5 y etanol 50% v/v) y se suspendió en 15 µL de agua estéril. Se incubó a 55°C por 10 min, se centrifugó y recuperó el sobrenadante.

2.4.9 Ligado de fragmentos de DNA.

Para el ligado de fragmentos de DNA, cantidades equivalentes de vector y fragmento se incubaron con 1 U de la enzima *T4 DNA ligase* (*Thermo Fisher*) en *buffer* de reacción por entre 1 y 16 h a 18°C. La reacción se inactivó incubando a 75°C por 10 min. El producto de la ligación fue dializado previo a ser electroporado en células electrocompetentes.

2.4.10 Expresión inducible de Laccasa en *P. pastoris*.

Se inoculó una cepa de *P. pastoris* transformada con el vector pPICZ A *BaLcc* en 10 mL de medio YEP suplementado con 100 µg/mL de Zeocina. Se cultivó con agitación en matraces de vidrio a 30°C durante una noche o hasta alcanzar la fase estacionaria ($DO_{600} > 10$).

100 mL de medio BMG fueron inoculados con la biomasa obtenida en el cultivo anterior y se cultivó durante una noche a 30°C. El volumen total fue centrifugado a 5.000 x g por 10 minutos y las células fueron resuspendidas en 50 mL de medio BMM. La expresión de Laccasa fue inducida inoculando las células en 500 mL de medio BMM. Se cultivó en matraces de vidrio con agitación a 25°C durante 5 días. Al cabo de 5 días se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C por 30 minutos y se utilizó el sobrenadante para pasos posteriores de purificación.

Para estudiar la curva de crecimiento y expresión, se realizó el mismo procedimiento, pero el volumen en cada paso fue 10 veces menor. Se tomaron alícuotas de 1 mL de los cultivos cada 24 h. Se registró el crecimiento celular midiendo la DO_{600} . Luego las alícuotas se centrifugaron a 16.000 x g por 10 min guardando el sobrenadante para el cuál se determinó la actividad Laccasa y la concentración de proteínas.

2.4.11 Expresión constitutiva de Laccasa en *P. pastoris*.

Se inoculó una cepa de *P. pastoris* transformada con el vector pGAPZ A *BaLcc* en 50 mL de medio YEP suplementado con 100 µg/mL de Zeocina. Se cultivó con agitación en matraces de vidrio a 30°C durante una noche o hasta alcanzar un cultivo en fase exponencial ($DO_{600} > 10$).

Se inoculó desde el cultivo anterior 500 mL de medio BMG hasta una DO_{600} de 1.0, luego se cultivó durante 5 noches a 25°C. Al cabo de este tiempo se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C por 30 minutos y se utilizó el sobrenadante para pasos posteriores de purificación.

El estudio de la curva de crecimiento y expresión se realizó de la misma forma descrita antes para la expresión inducible.

2.4.12 Expresión de Laccasa de *Botrytis aclada* en biorreactor por lotes alimentados.

Se inoculó una cepa de *P. pastoris* transformada con el vector pGAPZ A *BaLcc* en 50 mL de medio YEP en un matraz de vidrio. Se cultivó con agitación a 30°C durante una noche. Se inoculó desde el cultivo anterior 500 mL de medio BMG, pero con 4% v/v de glicerol en el biorreactor hasta una DO_{600} de 1,0. Se realizó la fase por lote a 30°C, 800 rpm y se mantuvo controlado el pH a 5 con NaOH 2 N. A las 18 horas de cultivo se comenzó la fase alimentada con medio BMG con 50% v/v de glicerol a 5,3 mL/h,

manteniendo una agitación constante de 800 rpm, y pH 5. La temperatura se disminuyó a 25°C paulatinamente al inicio de la fase alimentada, luego se disminuyó a 23°C a las 63 horas de cultivo. Durante todo el cultivo se mantuvo el flujo de entrada de oxígeno a 1 vvm (volumen de aire por volumen de cultivo por minuto), teniendo en cuenta el volumen inicial del cultivo, y no fue ajustado posteriormente. Se agregó antiespumante *antifoam 204 (SIGMA)* cuando fue necesario. Se muestra la instalación del biorreactor en la Figura 4. Se tomaron muestras de 5 mL a diferentes tiempos para las cuales se midió la DO_{600} y la actividad enzimática volumétrica en el sobrenadante.

Luego de finalizado el cultivo el volumen total fue centrifugado por 30 minutos a 10.000 rpm a 4°C y se utilizó el sobrenadante para los pasos posteriores de purificación.

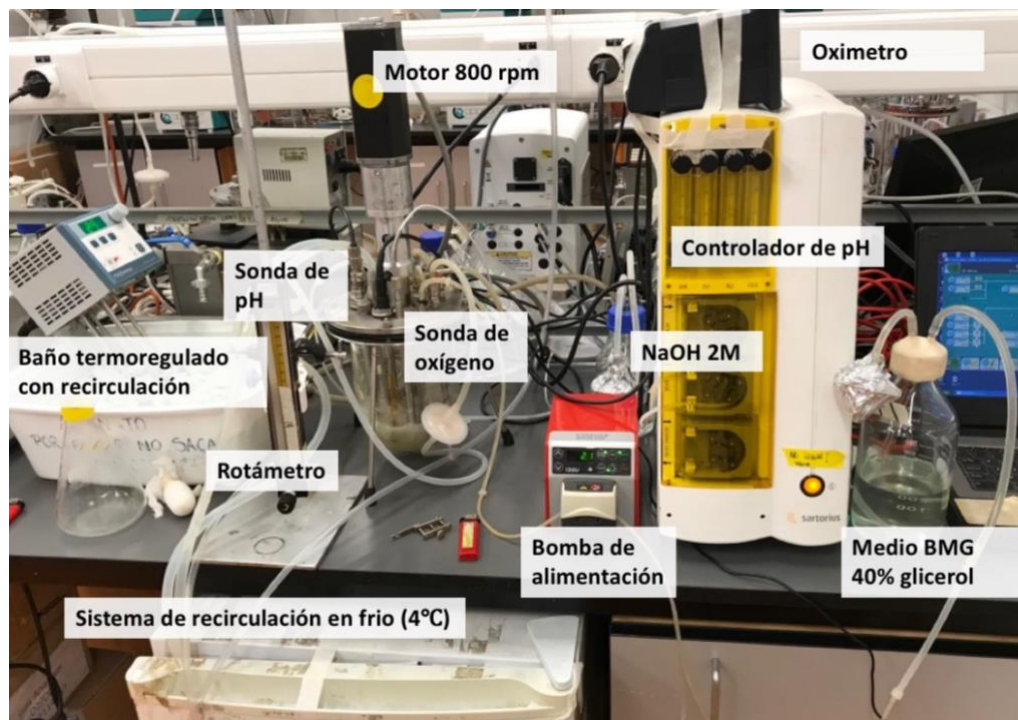


Figura 4 Instalación del Biorreactor.

Se muestra la instalación del biorreactor y se destacan los componentes principales.

2.5 Métodos de Bioquímica

2.5.1 Determinación de la actividad Laccasa.

La actividad Laccasa fue determinada cuantificando la oxidación del sustrato *ABTS*. Este sustrato en su forma oxidada presenta un pico de absorbancia a 420 nm (Li, et al., 2012). El cambio en el espectro de absorbancia se registró en un espectrofotómetro *Biotek Synergy 2 UV-visible* en placas de 96 pocillos (Thermo Scientific Nunc 269620).

Los ensayos se realizaron a 25°C en un volumen de reacción total de 200 μL que contenían 10 μL del *buffer* de actividad (1.0 M acetato de sodio, pH 5,0), 10 μL de *ABTS* (3mM) la cantidad de enzima a medir y agua nanopura para completar el volumen final. El sustrato se utilizó como iniciador de la reacción y se agregó con el inyector del espectrofotómetro, luego se agitó la placa por 30 s a velocidad media y se registró el cambio de absorbancia por 5 min. En caso de medir actividad desde fracciones de una cromatografía en columna, se utilizaron 2 μL de cada fracción.

Los pocillos de reacción tienen un radio de 0,35 cm, por lo tanto, para una reacción de 200 μL el paso óptico será de 0,52 cm. Así, se utilizó un coeficiente de extinción molar para el *ABTS* oxidado de $\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Kelly, et al., 2015).

Para el cálculo de actividad volumétrica, se utilizó la ecuación:

$$\frac{U}{L} = \frac{\Delta A V_t 10^6}{t \varepsilon d V_s}$$

Donde U corresponde a la actividad enzimática en $\mu\text{mol}/\text{min}$, ΔA a la diferencia en la absorbancia, V_t al volumen total de la reacción en mL, 10^6 es el factor de corrección para convertir de mol/L a $\mu\text{mol}/\text{L}$, t es el tiempo, ε el coeficiente de extinción molar, d el paso óptico y V_s el volumen de la muestra.

2.5.2 Determinación de la concentración de proteínas.

Se determinó la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976) en cubetas de 1 mL con un paso óptico de 1 cm. Utilizando como estándar de concentración la proteína BSA (Sigma) y midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro *BIOBASE BK-UV 1600*.

En el caso de la proteína purificada se usó la determinación de absorbancia intrínseca de triptófanos a 280 nm, la cual fue medida en cubetas de cuarzo, para obtener la concentración de proteína en agua. Se usó el coeficiente de absorción molar en agua para la proteína de $125.290 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y la masa molar de 61.565 g/mol calculada con el servidor *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>).

2.5.3 Electroforesis de proteínas en condiciones denaturantes (SDS-PAGE).

El análisis de las masas moleculares de proteína de muestras de cada etapa de la purificación se realizó mediante electroforesis en condiciones denaturantes en una cámara vertical *Mini PROTEAN® 3 cell (BioRad)*. Las muestras se mezclaron en proporción 5:1 con buffer de carga 6X (Tris-HCl 375 mM pH 6,8, glicerol 6 % v/v, SDS 12 % p/v, β -mercapto-etanol 4,2 mM y azul de bromofenol 6 %) y se incubaron a 100°C por 10 min.

Posteriormente, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida a entre 9 y 12% p/v. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante de 80 V hasta el paso del frente de corrida al gel separador y luego se corrieron a 200 V hasta la caída del frente. Como buffer de corrida se utilizó Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 0,1 % p/v). Realizada la electroforesis, se tiñó el gel con Azul Brillante de Coomassie R-250 0,3 % p/v disuelto en una mezcla de metanol 50 % v/v, ácido acético 10 % v/v, durante dos horas con agitación constante, y se destiñó con la misma mezcla sin Azul de Coomassie, hasta obtener un contraste claro de las bandas. La masa molecular relativa de las proteínas se determinó a partir de su migración electroforética. Se utilizó el estándar de peso molecular *MAESTROGEN AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder*, del cual se cargaron 5 μ L.

2.5.4 Precipitación de proteínas por Sulfato de Amonio.

La masa de sulfato de amonio necesaria para llevar el sobrenadante de los cultivos a 60% de saturación, fue calculada con el servidor “Ammonium Sulfate Calculator” de Encor Biotechnology Inc (www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm). Luego de agregar el sulfato de amonio sólido se homogenizó gentilmente con agitación a 4°C por 1 h. Se centrifugó a 40.000 x g por 30 min a 4°C y se descartó el precipitado.

2.5.5 Cromatografía de interacción hidrofóbica.

Las purificaciones por interacción hidrofóbica se realizaron en columnas *Phenyl Sepharose HP* de 5 mL, en un sistema de cromatografía automática *Akta prime plus* (*General Electric*). La columna se equilibró con 10 volúmenes de columna de *buffer* fosfato 0,05 M a 60% de saturación de sulfato de amonio a pH 5,6 y una vez equilibrada, se inyectó la muestra saturada en un 60% con sulfato de amonio. Se lavó la columna con 10 volúmenes del *buffer* de equilibrio y se eluyó con 7 volúmenes de un gradiente de disminución de sulfato de amonio. Finalmente se lavó con 5 volúmenes del *buffer* sin sulfato de amonio.

La concentración de proteínas durante la cromatografía se registró por medio de la absorbancia a 280 nm. La concentración de sulfato de amonio se registró midiendo la conductividad. Se colectaron las fracciones del frente y del gradiente para las cuales se detectó proteína a 280 nm. Para esas fracciones se determinó la actividad Laccasa.

Las fracciones con actividad fueron concentradas utilizando concentradores *Amicon Ultra –15 Ultracel -10K*. Las fracciones concentradas fueron utilizadas en pasos posteriores de purificación. En el caso de purificaciones con gran volumen de muestra se conectaron hasta 3 columnas en tándem y se escalaron los volúmenes de forma lineal.

2.5.6 Cromatografía de exclusión molecular.

Las purificaciones por cromatografía de exclusión molecular se realizaron en una columna *HiPrep 16/60 Sephacryl S200 (General Electric)* de 120 mL, en un sistema de cromatografía automatizada *Akta prime plus (General Electric)*. La columna fue equilibrada con 2 volúmenes de *buffer* fosfato 0,05 M pH 5,6, 150 mM de Cloruro de Sodio, se inyectó la muestra concentrada del paso anterior de purificación en *buffer* de equilibrio. Se eluyó la columna con 200 mL del mismo *buffer*.

La concentración de proteínas durante la cromatografía se registró por medio de la absorbancia a 280 nm. Se colectaron las fracciones para las cuales se detectó concentración de proteínas. Para esas fracciones se determinó la actividad Laccasa. Las fracciones con actividad fueron concentradas utilizando concentradores *Amicon Ultra – 15 Ultracel -10K*.

2.5.7 Ensayos de inactivación enzimática de antibióticos.

Soluciones a 0,6 mM, de los antibióticos tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina fueron tratados con 10 U/mL de *BaLcc* purificada. Se trató el antibiótico

por 48 h a 25 °C en *buffer* acetato 0,1 M a pH 5,0 en tubos de centrifuga con un volumen de espacio libre de al menos 30 veces el volumen de reacción (para asegurar que la concentración de oxígeno no fuera limitante en la reacción). Se realizaron además reacciones control sin enzima, agregando el volumen correspondiente de agua. Se tomaron muestras a distintos tiempos, y fueron congeladas a -80 °C, hasta que se analizó su efecto sobre el crecimiento de cultivos de *E. coli* DH5 α .

Para los ensayos de inhibición se utilizó un cultivo de una noche de *E. coli* DH5 α en medio LB. Se inoculó, en tubos de 2 mL, 970 μ L de LB con 10 μ L del cultivo y se trató con 10 μ L de las muestras de reacciones tomadas anteriormente. Se realizaron reacciones control tratadas con 3 μ g de antibiótico (100% de inhibición) a las cuales se les agregó 10 μ L de una muestra de antibiótico a 0,6 mM en lugar de la muestra tratada, y reacciones control sin antibiótico a las cuales se les agregó 10 μ L de agua estéril en lugar de la muestra tratada. Se incubó el cultivo a 37 °C y 250 rpm de agitación con los tubos en posición horizontal por una noche. Todos los cultivos fueron realizados por triplicado. Se midió la DO₆₀₀ de los cultivos al cabo de 24 h.

Se calculó el % de inhibición de crecimiento para cada muestra a través de la sustracción de la DO₆₀₀ de la muestra menos la de los cultivos control no tratados. Se utilizó como 100% la sustracción de la DO₆₀₀ del cultivo tratado con antibiótico y como 0% la del cultivo tratado con agua.

2.5.8 Ensayos de oxidación enzimática de Oxitetraciclina.

300 $\mu\text{g/mL}$ (0,6 mM) del antibiótico oxitetraciclina fueron tratados con 10 U/mL (0,9 mg/mL) de *BaLcc* purificada. Se trató el antibiótico por 48 h a 25 °C en buffer barbital 0,015 M a pH 7,0 en volúmenes de reacción de 500 μL en tubos de centrifuga de 15 mL. Se realizaron además reacciones control sin enzima, agregando el volumen correspondiente de agua. Se tomaron muestras a distintos tiempos y fueron diluidas 10 veces en acetonitrilo, deteniendo la reacción de esa forma. Se mezcló mediante *vortex* por 30 segundos y se centrifugó a 20.000 x g a 4°C por 15 minutos. Los sobrenadantes fueron guardados a -80 °C hasta que fueron analizados por *HPLC*.

La cuantificación de oxitetraciclina fue realizada en un equipo *HPLC Waters 1525* de dos bombas, con un detector de absorbancia *UV/vis 2487*. Se utilizó una columna *Kromasil 100-5-C18* de 250 mm de 4,6 mm. Se utilizó como fase móvil (A) 0,2% v/v Ac fórmico (Sigma) y (B) 100% v/v de acetonitrilo (Merck). La columna se equilibró con 10% B. Se inyectaron 20 μL de muestra y la corrida se realizó a un flujo constante de 1 mL/min, se mantuvo la concentración a 10% B por 5 minutos, se realizó un gradiente entre 10 y 55% de B por 12,85 minutos. Se lavó la columna por 5 minutos con 100% B y luego se volvió a equilibrar la columna con 10% B previo a cargar la muestra siguiente.

A partir del cromatograma obtenido, el pico de oxitetraciclina se identificó por su tiempo de retención (13,46 min) y se cuantificó la concentración a partir del área del pico, mediante el uso de una curva de calibración. La curva de calibración se realizó

inyectando muestras de oxitetraciclina (Sigma) a concentraciones de entre 10 y 150 ug/mL utilizando el mismo protocolo descrito antes (Figura 5). Se tituló la concentración de las muestras estándar de oxitetraciclina de la misma forma que se describe en la pagina 34.

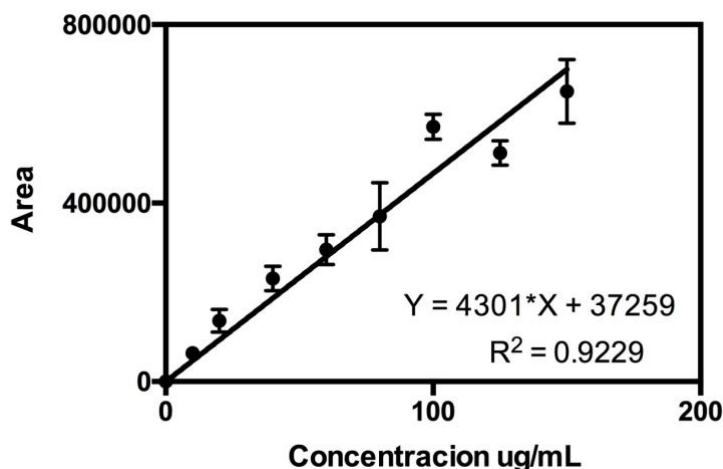


Figura 5 Curva de calibración de Oxitetraciclina por HPLC.

2.5.9 Determinación de las constantes cinéticas aparentes.

Las constantes cinéticas de la enzima se calcularon a partir de mediciones de velocidad inicial (v_0) a diferentes concentraciones de sustrato (S), en condiciones de 30°C, *buffer* acetato de sodio 25 mM pH 5,0. Se utilizó el sustrato *ABTS*, y su oxidación fue medida por la diferencia de absorbancia a 420 nm. Se utilizó un equipo *Biotek Synergy 2* en placas de 96 pocillos (Thermo Scientific Nunc 269620). Los datos fueron ajustados al modelo cinético de Michaelis-Menten descrito por la ecuación:

$$v_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

En donde,

$$V_{max} = k_{cat} \times E_T$$

En la ecuación 2, La K_M es la constante de Michaelis, que corresponde a la concentración de sustrato a la cual $v_0 = \frac{1}{2} V_{max}$. V_{max} por su parte, es la velocidad máxima que puede alcanzar la reacción catalizada por la enzima y a su vez, equivale al producto de la constante catalítica k_{cat} por la concentración de enzima total E_T . Específicamente, la k_{cat} se calcula por medio de la ecuación:

$$k_{cat} = \frac{V_{max} \times MM_{enzima} \times 0,001}{60 \text{ s}}$$

V_{max} es la velocidad máxima expresada en unidades de $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de enzima; MM_{enzima} es la masa molar de la enzima expresada en g/mol; 0,001 el factor de conversión para convertir los g/mol en mg/ μmoles y 60 el factor de conversión para convertir los minutos a segundos. Finalmente, la k_{cat} se expresa en s^{-1} .

En el caso de ensayos de inhibición se midió la v_0 en condiciones de diferentes concentraciones de los inhibidores Oxitetraciclina (SIGMA), Tetraciclina (SIGMA) y Clortetraciclina (SIGMA), reactivos con al menos un 95% de pureza. Se realizaron ajustes globales utilizando el programa *GraphPad Prism 6*, ajustando a un modelo de inhibición competitiva descrito por la ecuación:

$$v_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m^{app} + [S]}$$

Donde K_m^{app} , es la K_m observada en presencia del inhibidor y corresponde a:

$$K_m^{app} = K_m \left(1 + \frac{i}{K_i}\right)$$

En este caso, i corresponde a la concentración de inhibidor y K_i a la constante de inhibición competitiva. Los parámetros V_{max} , K_m , K_i , para las curvas a distintas concentraciones de inhibidor son constantes, por lo cual se ajustaron a un sólo valor global.

Los inhibidores y el *ABTS* reducido fueron titulados calculando su concentración a través de la ley de Lambert-Beer utilizando el coeficiente de extinción molar en agua informado en literatura y midiendo la absorbancia de una muestra a la longitud de onda requerida. Para *ABTS* reducido $\epsilon_{340}=4,8 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Li, 2012), para oxitetraciclina $\epsilon_{354}=1,289 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para tetraciclina $\epsilon_{355}=1,332 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, y para clortetraciclina de $\epsilon_{354}=1,04 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Ng, et al., 2003).

2.5.10 Análisis estadístico.

Los valores de actividad enzimática y de concentración de proteínas fueron analizados utilizando el software *GraphPad Prism* versión 6, con el cual se calcularon los promedios, varianzas y desviaciones estándar de los datos. Cuando se calculó la actividad

específica los valores fueron divididos y la propagación del error se calculó con la siguiente formula:

$$\sigma R = |R| \sqrt{\left(\frac{\sigma X}{X}\right)^2 + \left(\frac{\sigma Y}{Y}\right)^2}$$

Donde X e Y son los valores que fueron divididos y R, el cociente de la división.

Para el caso de los ajustes globales realizados a través del software *GraphPad Prism* versión 6, para determinar la calidad del ajuste se calculó el valor de $S_{y.x}$, el cual se calcula a través de la desviación estándar de los residuales (distancia vertical de un punto con la línea del ajuste, en unidades del eje y). Si se tienen n datos, después de la regresión se tienen n residuales. Se calcula entonces, el $S_{y.x}$ como una desviación estándar de los residuales, pero en el denominador se calcula n-k donde k es el numero de parámetros ajustados en la regresión y n el numero de datos (es el numero de grados de libertad de la regresión). Por lo tanto, un valor mayor indica un peor ajuste.

$$S_{y.x} = \sqrt{\frac{\sum(\text{residual}^2)}{n - K}}$$

2.6 Métodos de Bioinformática

2.6.1 Modelamiento 3D.

La estructura de la laccasa de *Botrytis aclada* se encuentra depositada en la base de datos PDB (PDB id: 3SQR), sin embargo, no presenta completitud de los sitios de unión

a cobre, por lo que se buscaron estructuras de proteínas homólogas en el PDB para generar mediante modelamiento por homología una estructura con los sitios completos. Se utilizó el software *Blastp* (McWilliam, et al., 2013) para encontrar estructuras de proteínas en el PDB con secuencias similares a la de la laccasa de *B. aclada* (Uniprot id JN559771). Se seleccionó la estructura de la Laccasa de *Melanocarpus albomyces* (PDBid 2Q90, 38% de identidad) para ser utilizada como molde para el modelado por homología.

Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa *ClustalW2* (Goujon, et al., 2010; Larkin, et al., 2007; McWilliam, 2013). Para generar los modelos se utilizó el programa *Modeller 9.17* (Eswar, et al., 2008) utilizando las estructuras con PDB id: 3SQR y 2Q90 como molde con algunas modificaciones: se eliminaron las moléculas de agua no estructurales y las glicosilaciones de tipo N-acetil-D-glucosamina. Los primeros residuos del N-terminal (M1-A37), correspondientes al péptido señal y a una región no resuelta en las estructuras molde, no fueron modeladas. Se utilizó solo la estructura 2Q90 como molde para modelar los 4 sitios de unión a cobre, los cuales fueron modelados como cuerpos rígidos (se copiaron desde la estructura y no fueron minimizados en pasos posteriores) esto debido a la completitud y alta resolución de esos sitios en esa estructura. Para el resto de la estructura se utilizó información proveniente de ambas estructuras molde. Se generaron 10 modelos utilizando *variable target function methods (VTFM)*, *conjugated gradient (GC)* y simulaciones de Dinámica Molecular con *simulated annealing*. Los modelos generados se evaluaron con el programa *VERIFY3D* (Eisenberg,

et al., 1997), el cual indica el grado de correspondencia entre la secuencia y la estructura 3D. Se eligió el mejor modelo bajo ese criterio y se utilizó en pasos posteriores de Docking y simulaciones de Dinámica Molecular.

2.6.2 Docking.

Los modelos 3D enzima-sustrato fueron construidos por medio de *Docking*. Se tomó la estructura del último estado de la trayectoria de la Dinámica Molecular de la enzima en su forma Apo (se detalla su implementación mas adelante en el texto). Se utilizó el software *Dock Prep* del paquete *Chimera* (Pettersen, et al., 2004) para calcular las cargas, eliminar el solvente, agregar hidrógenos, y crear los archivos en el formato MOL2 que se requerían en pasos posteriores. Las cargas para los residuos estándar fueron calculadas utilizando el campo de fuerza AMBER ff14SB (Maier, et al., 2015). Para los residuos no estándar se utilizó el método AM1-BCC para calcular las cargas, se dio una carga de -1 a la cisteína 489 del sitio de unión a cobre T1, y de 0 a las cisteínas que forman puentes disulfuro. Las estructuras de los ligandos fueron descargadas desde Ligand Depot (Feng, et al., 2004) en formato SDF y se agregaron hidrógenos y calcularon cargas de la misma forma que para la estructura de la proteína, obteniendo finalmente los archivos MOL2. Los archivos en formato PDBQT fueron preparados con el software *Autodocktools* (Morris, et al., 2009) usando los archivos en formato MOL2 generados anteriormente, sin recalculas las cargas. Se realizó un *Docking* flexible, en el cual se

configuraron como móviles los residuos D236, P365, P422 e I424, pertenecientes al sitio activo.

El Docking fue realizado utilizando el software Autodock Vina (Trott, et al., 2010) con 50 como el parámetro de exhaustividad (presenta un valor de 8 por defecto), el cual controla la cantidad de soluciones posibles analizadas, mayores valores aumentan la precisión del Docking, pero a su vez aumentan el tiempo de cómputo. Los sustratos fueron ubicados en una caja de $22 \text{ \AA} \times 22 \text{ \AA} \times 22 \text{ \AA}$ centrada a 5 \AA de la H494 en dirección del eje X. Se generaron 20 conformaciones diferentes, las cuales fueron ordenadas de acuerdo con su energía de unión. Entre las conformaciones de menor energía se eligió la que cumpliera con el criterio de mostrar la menor distancia entre el átomo C5 del ligando y la H494 (ver Introducción).

2.6.3 Simulaciones de Dinámica Molecular.

Se realizaron simulaciones de Dinámica Molecular para la proteína en su forma apo y para los complejos con tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina construidos antes por *Docking*. Se utilizó el software *NAMD2.12* (Phillips et al., 2005) y los campos de fuerza *AMBERff14SB* (Maier, 2015) y *GAFF* (Wang, et al., 2004). Se utilizó el campo de fuerza *GAFF* para los parametros de los tres antibioticos. Este es un campo de fuerza general, el cual es compatible con el campo de fuerza Amber, tiene parametros para todas las moléculas compuestas por C, N, O, H, S, P, F, Cl, Br y I, por lo cual es util para la parametrización rápida y suficientemente confiable de las moléculas de tetraciclina. Los sistemas fueron preparados usando la herramienta *tleap* de *Ambertools 17* (D.A. Case, et al., 2017). En el caso de los antibióticos, los parámetros y topologías fueron generados por homología con átomos similares que se encuentran en la base de datos, del campo de fuerza *GAFF* utilizando el programa *Antechamber* (Wang, et al., 2006) del paquete *Ambertools*. Cada sistema fue simulado en una caja de aguas tipo TIP3P con una distancia de 13 Å en cada dirección y la carga general del sistema fue neutralizada con iones Na⁺. Se usó un paso de integración de 1 fs, y las interacciones no enlazantes fueron consideradas en un radio de 9 Å con funciones de *switching* en torno a los 11 Å. Para interacciones de largo alcance se empleó el modelo de partícula de Mesh Ewald (Essmann, et al., 1995). A cada sistema se aplicaron 50.000 pasos de minimización de energía, seguidos de un aumento gradual de temperatura a 300 K. Durante la simulación,

los sitios de unión a cobre y las cadenas laterales de los aminoácidos ligados se mantuvieron restringidos en una posición fija en todos los sistemas, ya que, a nuestro conocimiento, los campos de fuerza actualmente disponibles no poseen parámetros para sitios de unión a cobre de los tipos T1, T2 y T3. Las cisteínas 2 y 11, 108 y 524, 201 y 209, 297 y 331 fueron enlazadas por puentes disulfuro y se simularon como tales. Cada simulación fue realizada por triplicado desde semillas diferentes.

2.6.4 Análisis de Simulaciones.

Se utilizó el software *VMD 1.9.3* (Humphrey, et al., 1996) para analizar las trayectorias. La herramienta *stamp* del paquete *multiseq* (Roberts, et al., 2006) fue utilizada para realizar superposiciones estructurales entre los distintos complejos. Se utilizó la herramienta *RMSD trajectory tool* para realizar análisis de Root Mean Square Deviation (RMSD) entre las posiciones de la proteína durante la simulación molecular, para lo cual se hizo una superposición estructural entre todos los estados de la proteína durante la trayectoria y luego se calculó el RMSD para los átomos de la cadena principal utilizando la ecuación:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{Atomos}} (r_i(t_1) - r_i(t_2))^2}{N_{atomos}}}$$

Donde N_{atomos} corresponde al número de átomos cuya posición se esta comparando y $r_i(t)$ es la posición de un átomo i en un tiempo t dado.

El *Root Mean Square Fluctuation (RMSF)* fue calculado utilizando la herramienta *Cpptraj* (Roe, et al., 2013) del paquete *Ambertools 17* (David A. Case, et al., 2005). Se tomo en cuenta sólo el carbono alfa de cada residuo utilizando toda la trayectoria. Para esto se utilizó la ecuación:

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T (r_i(t_i) - \bar{r}_i)^2}$$

Donde T corresponde a la duración de la simulación (en pasos de tiempo), $r_i(t)$ es la posición de un átomo i en un tiempo t dado y \bar{r}_i es su posición promedio durante toda la simulación. Los resultados de RMSF de 3 simulaciones independientes fueron promediados y se calculó el error estándar.

Las energías de unión y energías de unión por residuo fueron calculadas usando *MM-PBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area)* como está implementado en *Ambertools 17* (D.A. Case, 2017). Este se calcula a través de la ecuación:

$$\begin{aligned} \Delta G_{union, solvado} &= \Delta G_{complejo, solvado} \\ &- [\Delta G_{proteina, solvado} + \Delta G_{ligando, solvado}] \end{aligned}$$

La energía de cada estado se calcula como:

$$\Delta G_{solvado} = E_{MM} + \Delta G_{solvación} - TS_{soluto}$$

El primer término a la derecha de la ecuación es la energía calculada durante la simulación para cada *snapshot* de la trayectoria. El segundo término se calcula a través de una solución numérica de la ecuación de Poisson-Boltzmann y un estimado de la energía libre no polar. El último término no fue calculado, debido al alto tiempo de cómputo requerido y a que como los sistemas a comparar se encuentran relacionados el término entrópico se puede asumir como el mismo. Se utilizaron dinámicas de los complejos Enzima-Sustrato para extraer *snapshots* representativos de la proteína apo y el ligando en solución y no dinámicas independientes de cada uno de esos estados.

Se utilizó el *script MMPBSA.py.MPI* (Miller, et al., 2012), se tomaron 2010 *snapshots* (configuraciones a lo largo de la simulación) de cada réplica de cada trayectoria, tomando un total de 6030 *snapshots* por complejo. Se estableció la fuerza iónica en unidades de molaridad como 0,1. El parámetro *inp* como 1 (Se activa el cómputo de las energías de solvatación no polares) y el parámetro *radiopt* como 0 (para usar los radios especificados en el archivo *prmtop*, de acuerdo con los campos de fuerza usados para la simulación anterior). Las demás opciones fueron establecidas por defecto.

3. Resultados

3.1 Expresión de la laccasa de *B. aclada* en *P. pastoris*.

3.1.1 Construcción del vector pPICZ A *BaLcc* y su transformación en *P. pastoris*.

La secuencia codificante de la Laccasa de *B. aclada* fue sintetizado por GenScript Corporation (Piscataway, NJ, USA) y se clonó en el vector pPICZ A (Invitrogen). El cual es un plasmidio binario de expresión para *P. pastoris*, que se caracteriza por una alta producción de proteínas bajo el control del promotor de la alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *P. pastoris*, que es inducible por metanol y es reprimido por otras fuentes de carbono como glucosa y etanol (S. Kim, et al., 2013). El metanol, en este caso, cumple un rol tanto de inductor como de fuente de carbono y debe agregarse al cultivo cada día para reponer tanto lo que se ha consumido como lo que se ha evaporado del compuesto. El plasmidio cuenta con un marcador de selección de resistencia a zeocina y un origen de replicación para *E. coli*. En el caso de *P. pastoris* el plasmidio linearizado se integra en una o varias copias en la región del genoma de *P. pastoris* homologa al promotor AOX1.

Para realizar el clonamiento, el DNA de la secuencia codificante y del vector fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *Apal* y luego los fragmentos fueron ligados y transformados en la cepa DH5 α de *E. coli*. Se seleccionaron colonias

transformantes por su resistencia a zeocina y luego a través de PCR de colonias, utilizando los partidores AOX1_Forward y AOX1_reverse (Tabla 3). Se obtuvieron 2 colonias que tras ser analizadas por PCR de colonias, presentan el amplicon del tamaño esperado (2000 pb). Se purificó el DNA plasmidial de estas colonias por medio de miniprep y al digerir el plasmidio con las enzimas de restricción *EcoRI* y *Apal* se observaron dos fragmentos, uno de 3000 pb correspondiente al vector linearizado y uno de 2000 pb correspondiente a la secuencia codificante de la *BaLcc* clonada en esos sitios de restricción (Figura 6). Además, por medio de PCR, utilizando como molde el DNA plasmidial purificado antes, y varias combinaciones de partidores que hibridan en regiones tanto del plasmidio como del fragmento clonado: AOX1_Forward y *BaLcc* rv, *BaLcc* fwd y AOX1_reverse y *BaLcc* rv y *BaLcc* fwd, se observaron amplicones de los tamaños esperados (1000 pb , 1500 pb y 600 pb respectivamente), lo cual se confirma el correcto clonamiento.(Figura 6). Luego, el plasmidio construido, pPICZ A *BaLcc* fue secuenciado dando cuenta de que no se introdujeron mutaciones espurias.

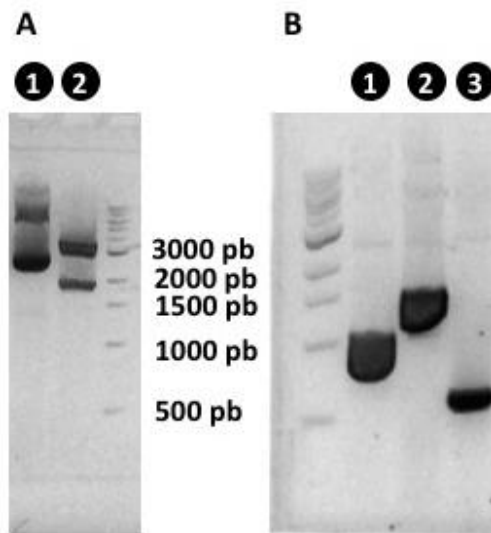


Figura 6 Confirmación del clonamiento de la secuencia codificante de la *BaLcc* en pPICZ A.

A Se observa el patrón de digestión del plasmidio construido, se cargó en **1** el plasmidio pPICZ A *BaLcc* sin digerir y en **2** el plasmidio digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *ApaI*. **B** Confirmación por PCR de la correcta construcción del plasmidio pPICZ A *BaLcc*, se muestran los amplicones correspondientes a la reacción de PCR utilizando los partidores **1** AOX1_Forward y *BaLcc* rv, **2** *BaLcc* fwd y AOX1_reverse y **3** *BaLcc* rv y *BaLcc* fwd.

Posteriormente, el plasmidio construido se transformó en *P. pastoris*. Para esto previamente fue linealizado con la enzima de restricción *SacI*, ya que al ser este un plasmidio de integración en el cromosoma de *P. pastoris* la probabilidad de observar eventos de recombinación homóloga aumenta al estar linealizado. El plasmidio en su forma lineal fue electrotransformado en la cepa SMD1168 de *P. pastoris*. Se seleccionaron 8 colonias resistentes al antibiótico zeocina. Estas colonias fueron crecidas en placas de inducción y una nueva selección se aplicó, continuando con aquellas que produjeron un halo de oxidación del sustrato ABTS en torno a la colonia (el cual se torna de color verde oscuro al ser oxidado) (Figura 7). La cepa originada a partir de la colonia

que presentó un halo de oxidación de ABTS mayor fue utilizada en los experimentos de expresión y purificación posteriores.

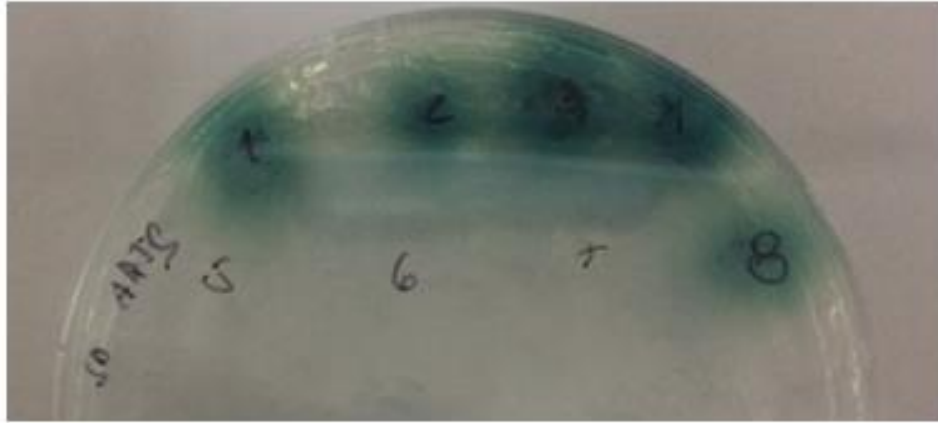


Figura 7 Expresión de BaLcc en medio sólido.

8 colonias de *P. pastoris* transformadas con el plasmidio pPICZ A *BaLcc*, fueron sembradas en placas de medio de expresión (ver sección Medios de cultivo (pagina 16)). Se observa un halo de oxidación del sustrato ABTS, alrededor de las colonias que expresan la enzima.

3.1.2 Construcción del plasmidio pGAPZ A *BaLcc*.

Debido al largo tiempo que toma la expresión bajo el promotor inducible (del orden de 5 días (ver sección Expresión de la laccasa de *B. aclada* (página 50)) y el requerimiento de agregar metanol día a día, se decidió evaluar la expresión de la laccasa de *B. aclada* bajo el control del promotor constitutivo GAP. Para esto se debió construir el vector pGAPZ A a partir del vector pPICZ A y luego clonar la secuencia codificante de la laccasa de *B. aclada* en ese nuevo vector. El vector pGAPZ A, es una modificación del vector pPICZ A, en la cual el promotor AOX1 es remplazado por el promotor de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de *P. pastoris*. Por lo cual mantiene las mismas

características del vector pPICZ A, pero se integra en la región del cromosoma homologa al promotor GAP.

La secuencia correspondiente al promotor GAP, con la misma secuencia que se encuentra en el vector pGAPZ A (Invitrogen) fue sintetizada por GenScript Corporation (Piscataway, NJ, USA), entre los sitios de restricción *Bgl*III y *Eco*RI. Luego, el vector pPICZ A fue digerido con las enzimas *Bgl*III y *Eco*RI y se purificó el fragmento de mayor peso molecular (2387 pb). Este fragmento fue ligado con el promotor GAP, el cual fue previamente digerido con las enzimas de restricción *Bgl*III y *Eco*RI. El producto de ligación fue transformado en la cepa de *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron colonias transformantes por el marcador de resistencia a zeocina, y se confirmaron por PCR de colonias con los partidores pGapZa fwd y AOX1_reverse (Tabla 3, Materiales y Métodos), obteniendo varias colonias con el amplicon esperado. Se purificó el DNA plasmidial de 3 de esas colonias y se confirmó la correcta construcción por medio del patrón de digestión del plasmidio con las enzimas de restricción *Bgl*III y *Eco*RI, observándose que el DNA de las tres colonias presentó los tamaños esperados (Figura 8).

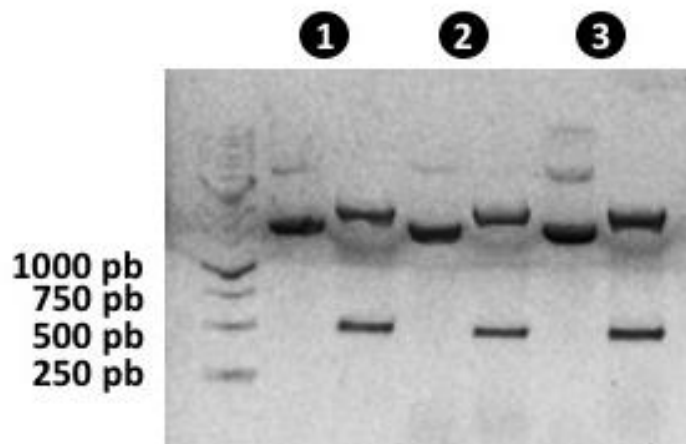


Figura 8 Confirmación de la construcción de pGAPZ A.

Se observa el patrón de digestión de los plásmidos purificados desde las colonias transformantes, a la izquierda se cargó el DNA sin digerir y a la derecha el DNA digerido con las enzimas de restricción *Bgl*II y *Eco*RI, para las colonias **1**, **2** y **3**.

Posteriormente, la secuencia codificante de la laccasa de *Botrytis aclada* se clonó en el vector pGAPZ A de la misma forma en que fue clonado en el vector pPICZ A. Se digirió el vector en el sitio de múltiple clonamiento con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Ap*al y se purificó un fragmento de DNA lineal de 3.262 pb desde el gel de agarosa. Luego la secuencia codificante de la laccasa de *B. aclada* fue digerido con las mismas enzimas y ambos fragmentos fueron ligados. El producto de ligación fue transformado en la cepa DH5 α de *E. coli*. Las transformantes fueron seleccionadas por su resistencia a zeocina y confirmadas por PCR de colonias, utilizando los partidores pGAP fwd y BaLcc rv (Tabla 3, Materiales y Métodos). Se seleccionaron 3 colonias positivas, desde las cuales se purificó DNA plasmidial. El plasmidio fue digerido con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Ap*al logrando confirmar la correcta construcción debido a la liberación de un fragmento de 1.753 pb, lo cual se observó para 2 de las tres colonias seleccionadas

(Figura 9). Se utilizó en adelante el DNA de una de estas colonias. Luego de secuenciar la región entre el promotor y el terminador en el plásmido no se encontraron mutaciones espurias.

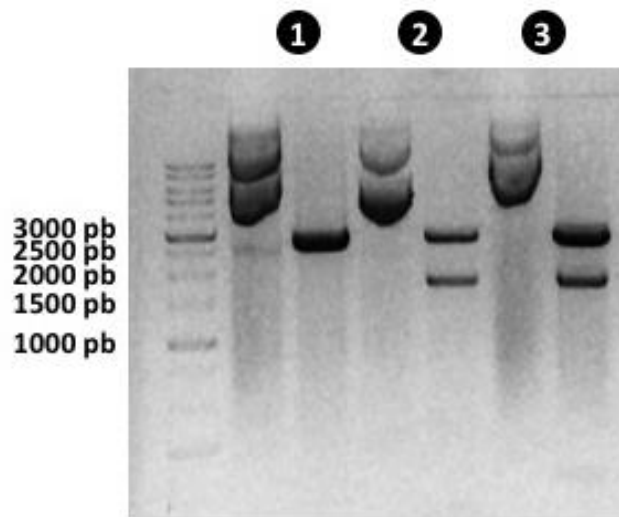


Figura 9 Confirmación de la construcción del plásmido pGAPZ A *BaLcc*.

Se observa el patrón de digestión de los plásmidos purificados desde las colonias transformantes, a la izquierda se cargó el DNA sin digerir y a la derecha el DNA digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *Apal*, para las colonias **1, 2 y 3**.

Al igual que para el plásmido pPICZ A *BaLcc*, el DNA plasmidial fue linearizado previamente a ser transformado en *P. pastoris*. El plásmido fue digerido con la enzima de restricción *AvRII* y con él se transformó la cepa SMD1168 de *P. pastoris*. Se seleccionaron colonias transformantes por el marcador de resistencia a zeocina y por la formación de halos de oxidación de ABTS en placas de expresión, obteniendo colonias similares a las obtenidas para el caso del plásmido pPICZ A *BaLcc* (Figura 7). Estas colonias fueron utilizadas en pasos posteriores de expresión y purificación.

3.1.3 Expresión de Laccasa de *Botrytis aclada* en *P. pastoris*.

Se realizaron ensayos de expresión de la laccasa de *B. aclada* en *P. pastoris*, comparando el efecto del control de los promotores AOX1 y GAP. Además, para el caso del promotor constitutivo se comparó la expresión en cultivos por lotes en matraces con cultivos por lotes alimentados en biorreactor. La secuencia silvestre de la proteína cuenta con una señal de exportación correspondiente a los primeros 20 aminoácidos en el extremo N-terminal, por lo tanto, la proteína se detectó en el medio extracelular. A lo largo del tiempo de cultivo, se midió la turbidez y la expresión de laccasa a través de la actividad en el sobrenadante.

En el caso del promotor inducible AOX1, el cultivo se realizó en 2 etapas, una inicial de crecimiento en el medio BMG (el cual contiene glicerol 1 % p/v como fuente de carbono) y una fase de inducción en medio BMM (el cual contiene metanol 0,5 % p/v como fuente de carbono e inductor). Para mantener la inducción, se debió agregar cada 24 horas metanol hasta un 0,5% v/v debido al rápido consumo y la evaporación de este compuesto. Se observa que la actividad en el sobrenadante aumenta a medida que aumenta la turbidez, la cual no alcanza una fase estacionaria debido a que es alimentada con metanol cada día. A las a las 120 horas el cultivo alcanza una DO_{600} de 17.2. La actividad en el sobrenadante llega a un máximo de 276 ± 19 U/L al quinto día. No se continuó el cultivo por mas días debido a que no se encontraron diferencias significativas entre las actividades a las 96 y 120 horas (Figura 10).

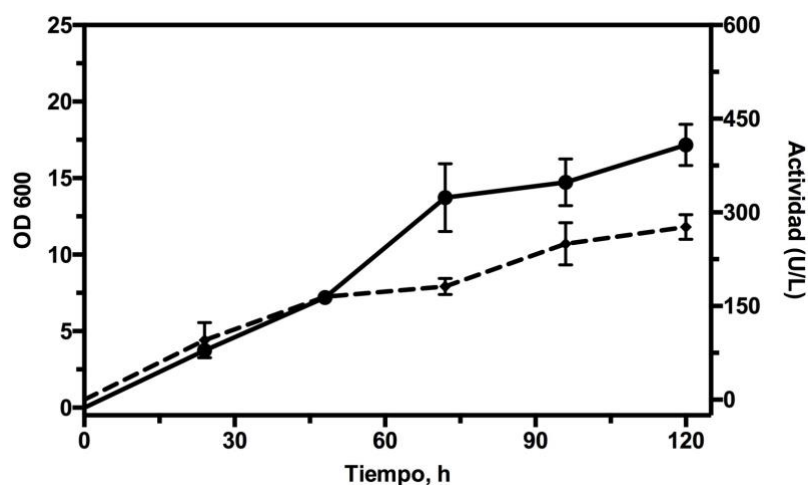


Figura 10 Curva de crecimiento e inducción de *BaLcc* bajo el control del promotor AOX1.

Se registró el crecimiento de *Pichia pastoris* transformada con el vector pPICZ A *BaLcc* a través de la densidad óptica (línea continua) y la actividad de oxidación de ABTS en el sobrenadante del cultivo (línea discontinua) a diferentes tiempos durante 5 días.

En el caso del promotor constitutivo GAP, el cultivo se realizó en sólo 1 etapa de crecimiento y expresión en el medio BMG (el cual contiene glicerol 1 % p/v como fuente de carbono). Se observa que la actividad en el sobrenadante aumenta a medida que aumenta la densidad óptica. Una vez alcanzada la fase estacionaria en torno a las 65 horas, la actividad en el sobrenadante deja de aumentar alcanzando un máximo de 372 \pm 5 U/L y una DO_{600} de 22,5.

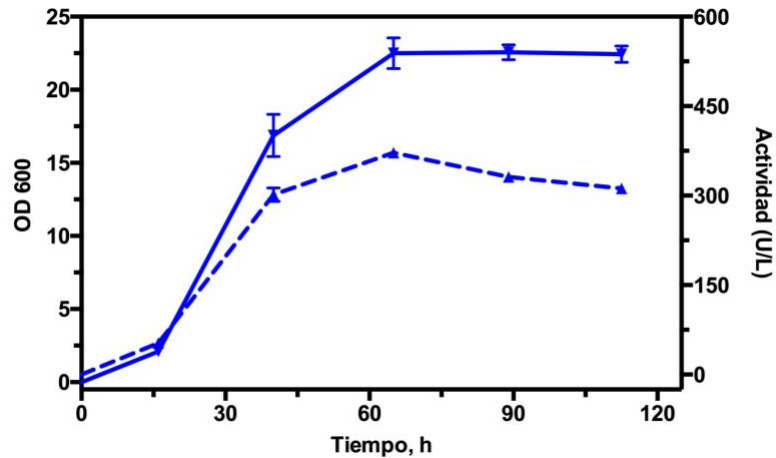


Figura 11 Curva de crecimiento e inducción de *BaLcc* bajo el control del promotor GAP.

Se registró el crecimiento a través de la densidad óptica (línea continua) y la actividad de oxidación de ABTS en el sobrenadante (línea discontinua) de cultivos de *P. pastoris* transformada con el vector pGAPZ A *BaLcc*.

Con este resultado, se buscó optimizar la expresión de *BaLcc* bajo el control del promotor GAP mediante el escalamiento en un biorreactor, realizando un cultivo por lote alimentado. En este caso se pudo registrar el oxígeno disuelto, la temperatura, y el pH del cultivo, manteniendo el control sobre la temperatura y el pH. Durante todo el cultivo el pH se mantuvo constante en un valor de 5.0, y la temperatura se mantuvo a 30°C entre el tiempo 0 (tiempo de inóculo) hasta las 18 horas de cultivo. Luego se disminuyó la temperatura a 25°C y se mantuvo a esa temperatura hasta las 70 horas, momento en que se disminuyó a 23°C y se mantuvo así hasta el final del cultivo. Adicionalmente, el cultivo fue alimentado con glicerol 50% a 5,3 mL/h desde las 18 horas hasta el final del cultivo. La turbidez aumentó entre las 18 y 63 horas exponencialmente hasta una DO_{600} de 61,2; con un consiguiente aumento de la actividad en el

sobrenadante hasta un máximo de 1420 ± 36 U/L a las 63 horas. Posteriormente al disminuir el oxígeno disuelto y la temperatura, la tasa de crecimiento y la actividad en el sobrenadante disminuyeron (Figura 12).

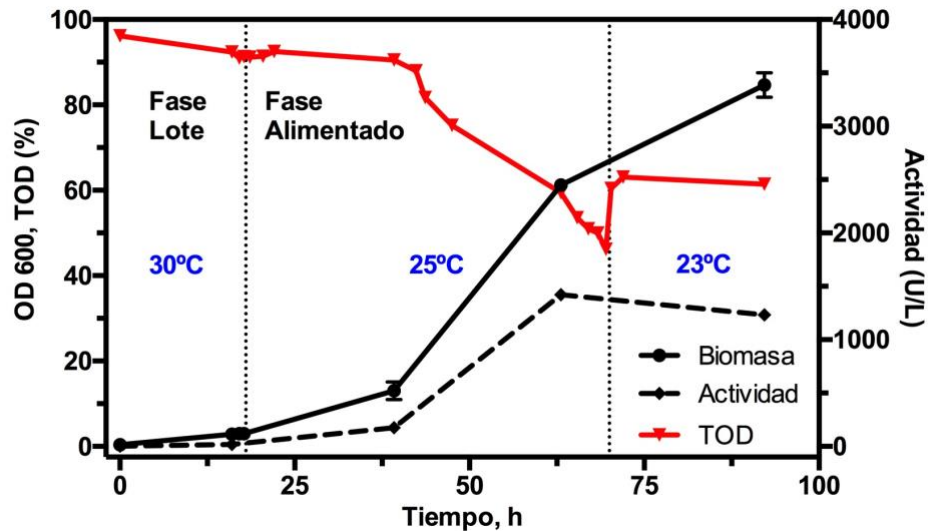


Figura 12 Curva de crecimiento e inducción de *BaLcc* en Biorreactor.

Se registró el crecimiento a través de la densidad óptica (línea continua) y la actividad de oxidación de ABTS en el sobrenadante (línea discontinua) de cultivos de *P. pastoris* transformada con el vector pGAPZ A *BaLcc* en biorreactor. Se midió la tensión de oxígeno disuelto (línea roja). Con línea discontinua se separan las tres fases del cultivo, antes de las 18 horas por lote a 30°C, luego entre 18 y 70 horas una fase alimentada con glicerol al 50% a 5,3 mL/h a 25°C y una tercera fase a 23°C grados también alimentado a la misma tasa.

Así, podemos concluir que la expresión de proteínas bajo el control del promotor constitutivo es $95,2 \pm 9,7$ U/L mayor que bajo el control del promotor inducible, siendo esta diferencia significativa. Por su parte, el cultivo en biorreactor permite un incremento de 1.143 U/L sobre la expresión obtenida en el cultivo en matraz. En este caso, aunque sólo se realizó una replica biológica del cultivo en biorreactor y no se puede afirmar que

esta diferencia sea estadísticamente significativa, es claro que la expresión en cultivo en biorreactor constituye la mejor condición de expresión (Figura 13).

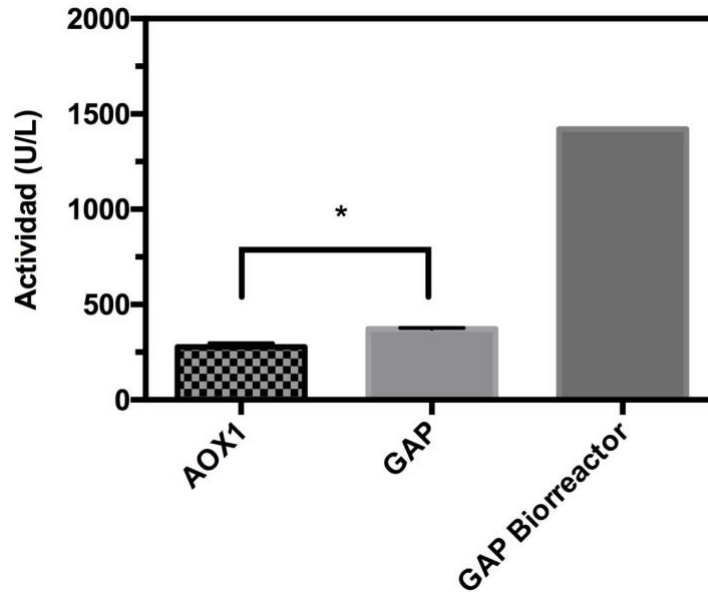


Figura 13 Expresión de Laccasa en cultivos.

Se observa la comparación entre las mayores actividades de oxidación de ABTS producidas por los cultivos de *P. pastoris* en matraz bajo el control de los promotores AOX1 y GAP, y en biorreactor bajo el control del promotor GAP. Se indican las diferencias significativas con un “*”.

3.2 Purificación de la laccasa de *B. aclada* expresada en *P. pastoris*.

La enzima fue purificada desde los sobrenadantes con actividad enzimática obtenidos desde los cultivos bajo el control de los promotores AOX1 o GAP, en matraces o en biorreactor. La purificación fue realizada en 3 pasos, primero una precipitación con sulfato de amonio, seguida de una cromatografía de interacción hidrofóbica y un paso

final de cromatografía de exclusión molecular. En cada etapa se utilizaron las fracciones con actividad enzimática obtenidas en el paso anterior.

En el primer paso los sobrenadantes fueron llevados a un 60% de saturación de sulfato de amonio, agregando el compuesto sólido lentamente y con agitación a 4°C. Una vez saturado, se dejó agitar por al menos 1 hora y luego se centrifugó por 30 minutos a 40.000 x g a 4°C. Posteriormente el sobrenadante fue cargado en una columna de interacción hidrofóbica *Phenyl Sepharose HP* (5 ml), previamente equilibrada en *buffer* fosfato 50 mM a pH 5.0, saturado en un 60% con sulfato de amonio. En estas condiciones no se pudo detectar actividad en el frente de la cromatografía. Luego de que la columna se lavó con 10 volúmenes del *buffer* de equilibrio, se eluyó la proteína mediante un gradiente de disminución de sulfato de amonio. Se observaron dos picos principales, siendo el primero en eluir el que presentó actividad Laccasa (Figura 14 A). Todas las fracciones del gradiente que presentaron actividad de oxidación de ABTS, fueron concentradas y utilizadas para el paso posterior. Al observar la composición de tamaños de proteínas de la muestra a través de SDS-PAGE y las fracciones con actividad obtenidas en el paso de cromatografía, observamos en el caso del extracto y el paso de precipitación con sulfato de amonio, tres bandas principales, dos de bajo peso molecular y una correspondiente a la laccasa de *B. aclada*, en torno a los 100 KDa. Luego del paso de purificación se observa un enriquecimiento en esa última banda (Figura 14 B).

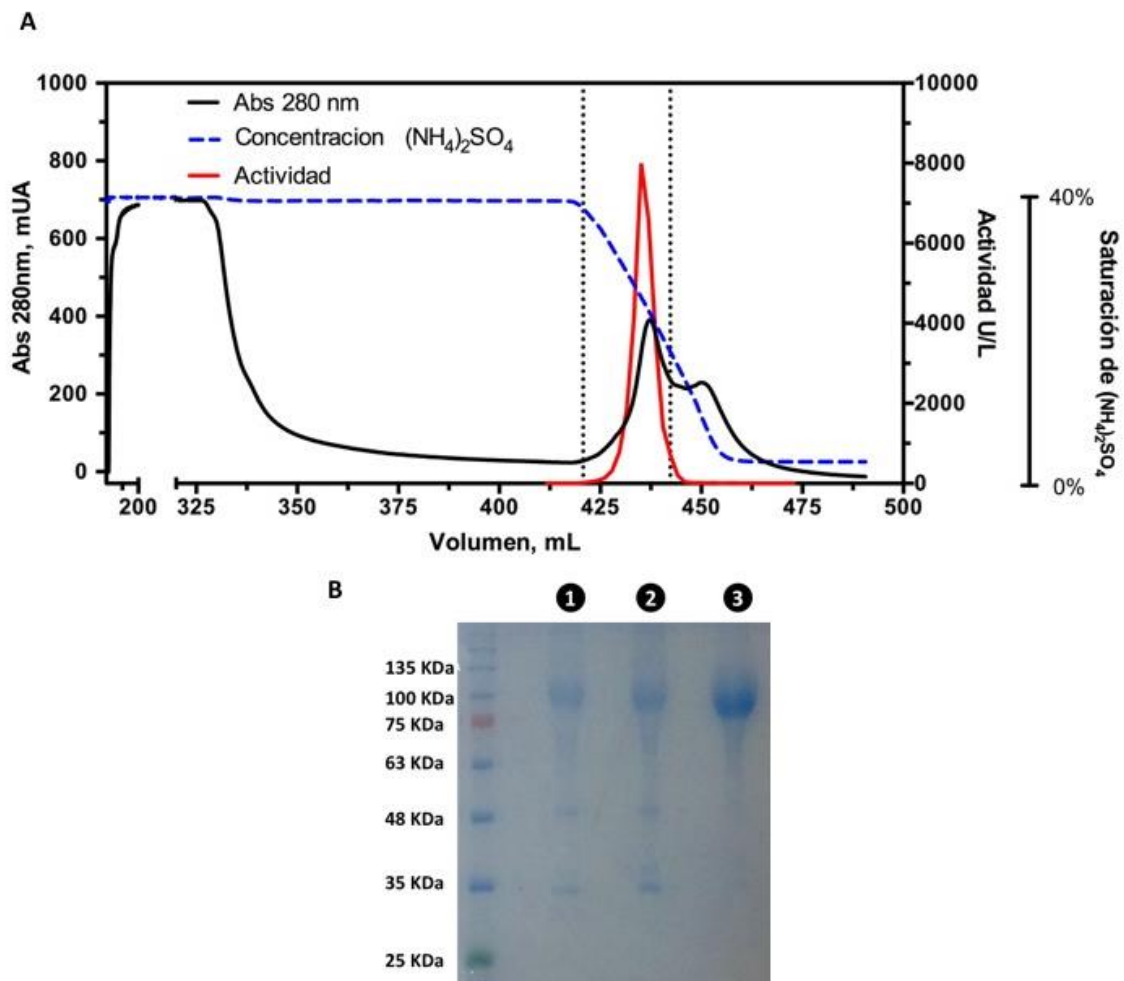


Figura 14 Purificación de BaLcc por cromatografía de interacción hidrofóbica.

A Sobrenadantes con actividad Laccasa tras ser precipitados con sulfato de amonio fueron cargados en una columna *Phenyl Sepharose*. La columna fue eluída en un gradiente de sulfato de amonio (línea roja punteada). Se registró la concentración de proteínas por la absorbancia a 280 nm y la actividad laccasa por la oxidación del sustrato ABTS. Las fracciones entre las líneas punteadas fueron concentradas y utilizadas en el paso siguiente de purificación. **B** Gel SDS-PAGE al 12%, teñido con Azul de comassie de las fracciones obtenidas en los pasos de purificación. Se cargó en cada carril 20 ug de proteínas totales, en el carril **1** se cargó el sobrenadante concentrado de un cultivo inducido; en el **2** el sobrenadante a un 60% de saturación de sulfato de amonio concentrado y en el **3** las fracciones con actividad de oxidación de ABTS (entre líneas punteadas en el cromatograma).

La fracciones con actividad concentradas fueron purificadas por cromatografía de exclusión molecular con el objetivo de alcanzar la mayor pureza posible. Se cargó la muestra en una columna *Sephacryl S-200* previamente equilibrada en buffer fosfato 50 mM, NaCl 150 mM pH 5.0 y se obtuvieron dos picos principales durante la elución, el de menor peso molecular presentó actividad de oxidación de ABTS, y por lo tanto fue colectado y concentrado para ser utilizado en los experimentos posteriores (Figura 15 A). Se observó la proteína purificada en geles de SDS-PAGE, comprobando su pureza (Figura 15 B). Por otra parte se caracterizó el espectro de absorbancia de la enzima purificada, encontrando 3 picos de absorbancia a 280, 340 y 610 nm, típicos de esta familia de enzimas (Madhavi, et al., 2009). Se midió la relación Abs_{280}/Abs_{610} obteniendo un valor de 29,8. Este valor se usó en adelante como medida de la pureza de la enzima.

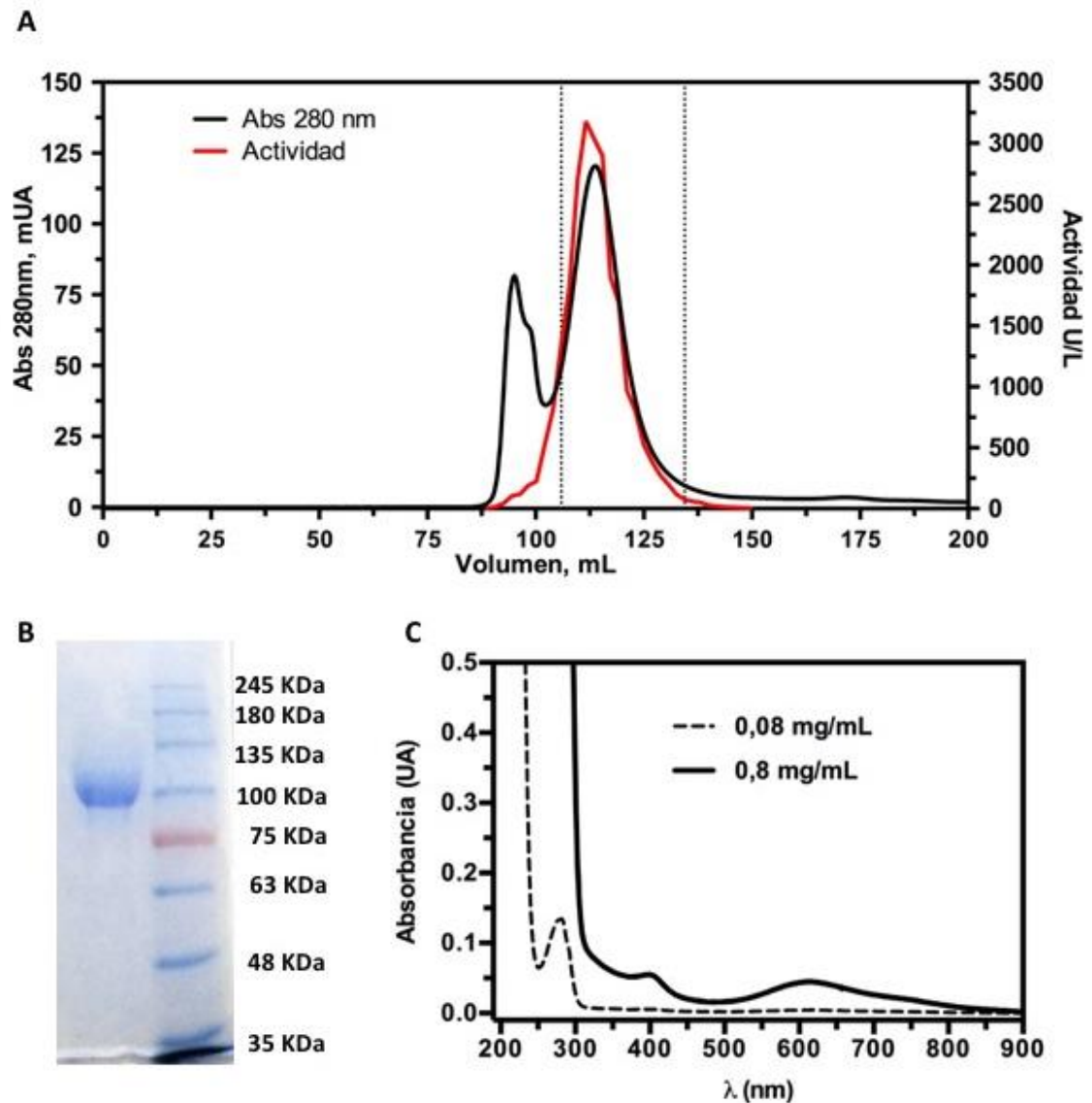


Figura 15 Purificación por cromatografía de exclusión molecular.

A Las fracciones con actividad de una cromatografía de interacción hidrofóbica fueron cargadas en una columna *Sephacryl S-200 16/60*. La columna fue eluída con 200 mL de buffer de equilibrio. Se registró la concentración de proteínas a través de la absorbancia a 280 nm y la actividad laccasa a través de la oxidación del sustrato ABTS. Las fracciones entre las líneas punteadas fueron concentradas y utilizadas en experimentos posteriores. **B** Gel SDS-PAGE al 9%, teñido con Azul de comassie de las fracciones entre líneas punteadas en el grafico anterior. Se cargó 10 μ g de proteína, en el carril. **C** Espectro de absorbancia entre 200 y 900 nm de muestras a diferentes concentraciones de *BaLcc* purificada. Se observan picos a 280, 398 y 610 nm.

3.3 Oxidación de Oxitetraciclina por la Laccasa de *B. aclada*, y el efecto de los productos de reacción sobre el crecimiento de *E. coli*.

No existiendo, a nuestro conocimiento, registros de actividad de oxidación de antibióticos para alguna laccasa proveniente de un hongo Ascomiceto, como la laccasa de *Botrytis aclada*, se procedió a evaluar su capacidad para oxidar oxitetraciclina. Para esto el antibiótico fue tratado por 48 horas con 10 U/mL de la enzima purificada, a 25°C y pH 7,0. Se tomaron muestras a diferentes tiempos, y tras detener la reacción con acetonitrilo, se cuantificaron las concentraciones residuales de oxitetraciclina por HPLC en una columna C18 (Kromasil). Se observa que la concentración de oxitetraciclina disminuye hasta en torno a un 50 % a las 6 horas, alcanzando un 85 % de oxidación a las 24 horas y un 95% a las 48 horas. Importantemente, se observa que el compuesto no tratado con la enzima (control negativo) mantiene su concentración sin cambios significativos durante las 48 horas de reacción (Figura 16). Si consideramos que los tres primeros puntos siguen un comportamiento lineal, podemos calcular la velocidad inicial a partir de la pendiente de esta recta. De esta forma, la v_0 calculada para 0,6 mM del antibiótico es de $1,09 \times 10^{-6}$ U/mg.

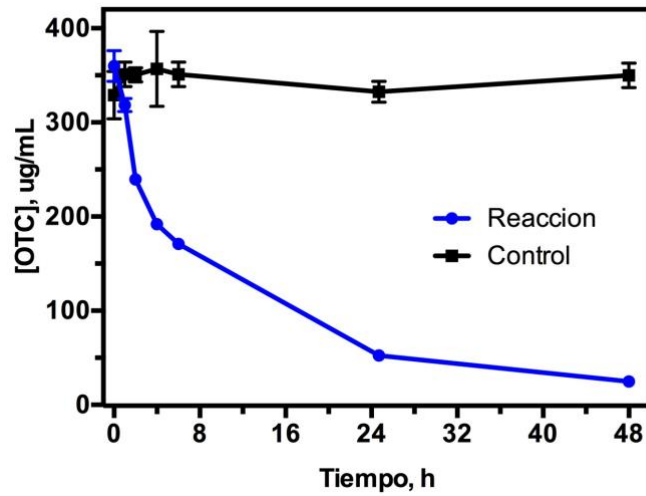


Figura 16 Curva de oxidación de Oxitetraciclina.

Se cuantificó la concentración residual de oxitetraciclina en muestras tratadas con *BaLcc* (azul) y en reacciones no enzimáticas (control) a diferentes tiempos por HPLC en una columna de fase reversa C18.

Posteriormente, luego de probar la capacidad de la *BaLcc* de oxidar Oxitetraciclina, debido a la posibilidad de la formación de productos de oxidación que mantengan o aumenten su actividad biológica (Yang, 2016), se evaluó la capacidad residual de las muestras tratadas de inhibir el crecimiento de cultivos de *E. coli*. Adicionalmente, se estudió la inactivación de tetraciclina y clortetraciclina de la misma forma. Los distintos antibióticos fueron incubados con 10 U/mL de *BaLcc* por 48 horas a pH 5,0 y 25 °C y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. Con estas muestras se trataron cultivos de *E. coli* y se cuantificó el efecto sobre el crecimiento de los cultivos. Se observa que a las 12 h de tratamiento tanto tetraciclina como clortetraciclina mantienen en torno a un 50% de su actividad antimicrobiana, mientras que clortetraciclina en torno a un 12% de ella. A las 24 h tetraciclina y oxitetraciclina sólo un

25 % de su actividad microbiológica, mientras que clortetraciclina en torno a un 12%. A las 48 h de tratamiento los tres antibióticos muestran menos del 20% de la actividad inicial.

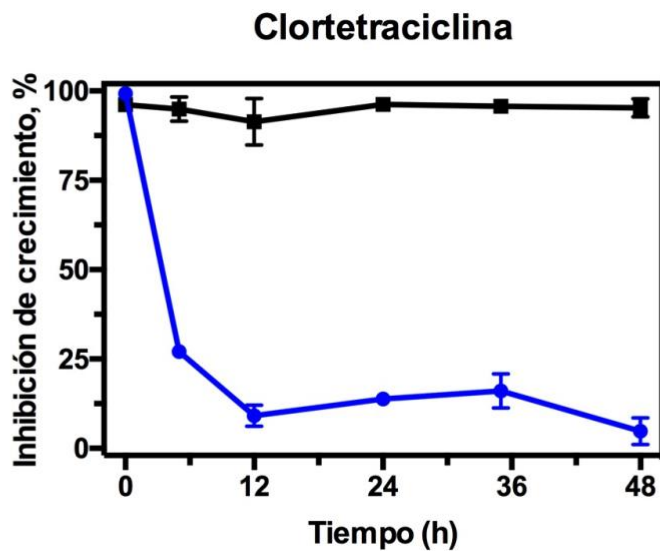
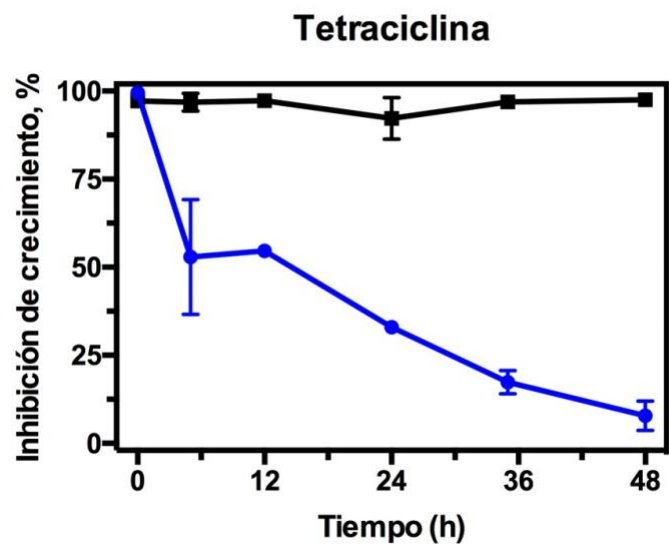
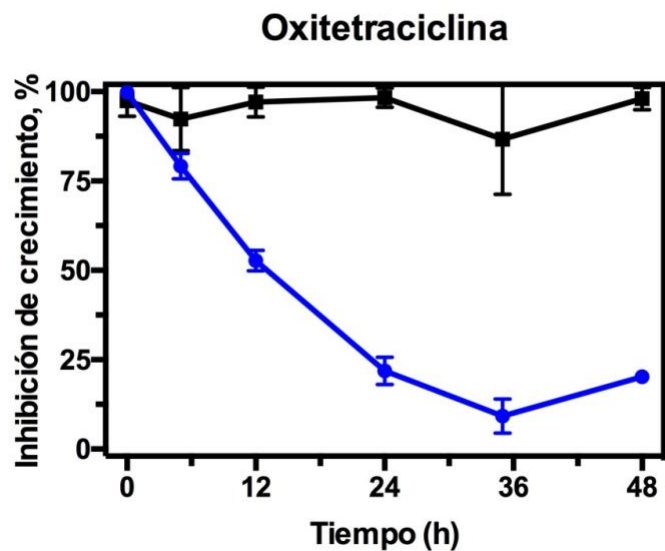


Figura 17 Curvas de inactivación de tetraciclinas.

Se cuantificó la actividad antimicrobiana como % de inhibición del crecimiento de cultivos de *E. coli* DH5 α para muestras de los antibióticos oxitetraciclina, clortetraciclina y tetraciclina tratadas con *BaLcc* (azul) y no tratadas (negro)

3.4 Determinación de la energía de unión entre la Laccasa de *Botrytis aclada* y antibióticos de la familia tetraciclina por MM-PBSA.

La interacción molecular entre la laccasa de *Botrytis aclada* y los antibióticos tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina fue estudiada por medio de enfoques *in silico*. Se construyeron modelos 3D del complejo enzima-sustrato por medio de Docking, se observó la estabilidad de los complejos por dinámica molecular y luego se calculó la energía de unión por MM-PBSA.

Se utilizó la herramienta Blastp, para buscar en la base de datos de estructuras cristalográficas PDB, proteínas con secuencias similares a la Uniprot id JN559771, correspondiente a la laccasa de *Botrytis aclada*. Se encontraron 2 estructuras con más de 95% de identidad, las cuales corresponden a la estructura de *Botrytis aclada*, y una mutante (ver Tabla 5). Estas estructuras (PDBid 3SQR y 3V9E) presentan una alta resolución e información de densidad electrónica para el 100% de los aminoácidos. Sin embargo, el sitio de cobre T2 para ambas estructuras está vacío y no representan estructuras activas. Por lo tanto, entre las demás estructuras encontradas se seleccionó la estructura de *Melanocarpus albomyces* (PDBid 2Q9O, 38% de identidad) para modelar la región de unión a cobre T2, debido a la completitud de sus sitios de unión a cobre y alta resolución.

Tabla 5 Proteínas homologas a la Laccasa de *B. aclada* en el PDB.

PDBid	Organismo	Identidad, %	Cobertura, %	Resolución, Å	Complejidad de sitios de unión a Cu
3SQR	Botrytis aclada	100	100	1,67	3/4
3V9E	Botrytis aclada	99	100	1,70	3/4
5LWX	Aspergillus niger	42	93	1,49	4/4
5LM8	Aspergillus niger	43	89	1,7	4/4
5LWW	Aspergillus niger	43	89	2,65	4/4
3PPS	Thielavia arenaria	38	95	2,5	4/4
1GW0	Melanocarpus albomyces	38	93	2,4	4/4
2Q90	Melanocarpus albomyces	38	93	1,3	4/4

Para obtener el modelo con los sitios de unión a cobre completos se utilizó el programa Modeller y se realizó modelamiento por homología utilizando como moldes la laccasa de *B. aclada* y la de *M. albomyces*. Los sitios de unión a cobre se modelaron como cuerpos rígidos (se copia los átomos y sus posiciones, y se mantienen fijos durante los pasos de minimización siguientes) utilizando sólo la información proveniente de la estructura de *M. albomyces*, incluyendo el átomo de cobre de cada sitio de unión y todos los átomos de los aminoácidos que los coordinan. Se obtuvieron 10 modelos para los cuales se evaluó la correspondencia entre la secuencia y la estructura 3D, utilizando el servidor Verify 3D. Se eligió el mejor modelo, con un 94% de los residuos (509 de 543) bien evaluados (*score* superior a 0,2). Se hizo énfasis en el correcto modelamiento del sitio de unión a sustrato, debido a que posteriormente se trabajaría con esta región mediante Docking. Se observa que los elementos de estructura secundaria que forman

el sitio activo, cercanos al sitio de unión al cobre T1 presentan buena evaluación, estos son: parte de la hélice α_1 y el loop α_1 - β_{10} (residuos 178 - 190), el loop β_{18} - α_{3-10} (residuos 292 - 302), el loop β_{21} - β_{22} (residuos 359 - 368), el loop β_{23} - β_{24} (residuos 420 - 424) y la hélice α_3 (residuos 491 - 499) (Figura 18).

Dado que las estructuras cristalográficas están restringidas por los contactos cristalinos, para reflejar mejor la estructura en solución es necesario llevarlas a un estado relajado, mediante un protocolo de minimización de energía y así examinar su dinámica, es decir, el ensamblaje de conformaciones a las que accede a una cierta temperatura. Una métrica apropiada para evaluar cambios globales de la estructura es el RMSD, el cual indica el promedio de las diferencias en distancia que muestra cada átomo de la estructura respecto de la posición que ocupaba al inicio de la simulación. Más aún, se puede suponer que la estructura ha llegado a una conformación relajada cuando este parámetro se mantenga en un valor estable. Como se observa en la Figura 19, cambios importantes ocurren en el primer ns de la simulación y luego se alcanza un estado estable, presumiblemente de baja energía, el cual varía muy poco hasta el final de la simulación. Debido a que toda simulación molecular inicia desde un estado de distribución aleatoria de velocidades (semilla), cada simulación podría dar resultados diferentes, por lo cual se realizaron 3 simulaciones desde semillas distintas, no observamos diferencias significativas entre las 3 simulaciones (Figura 19).

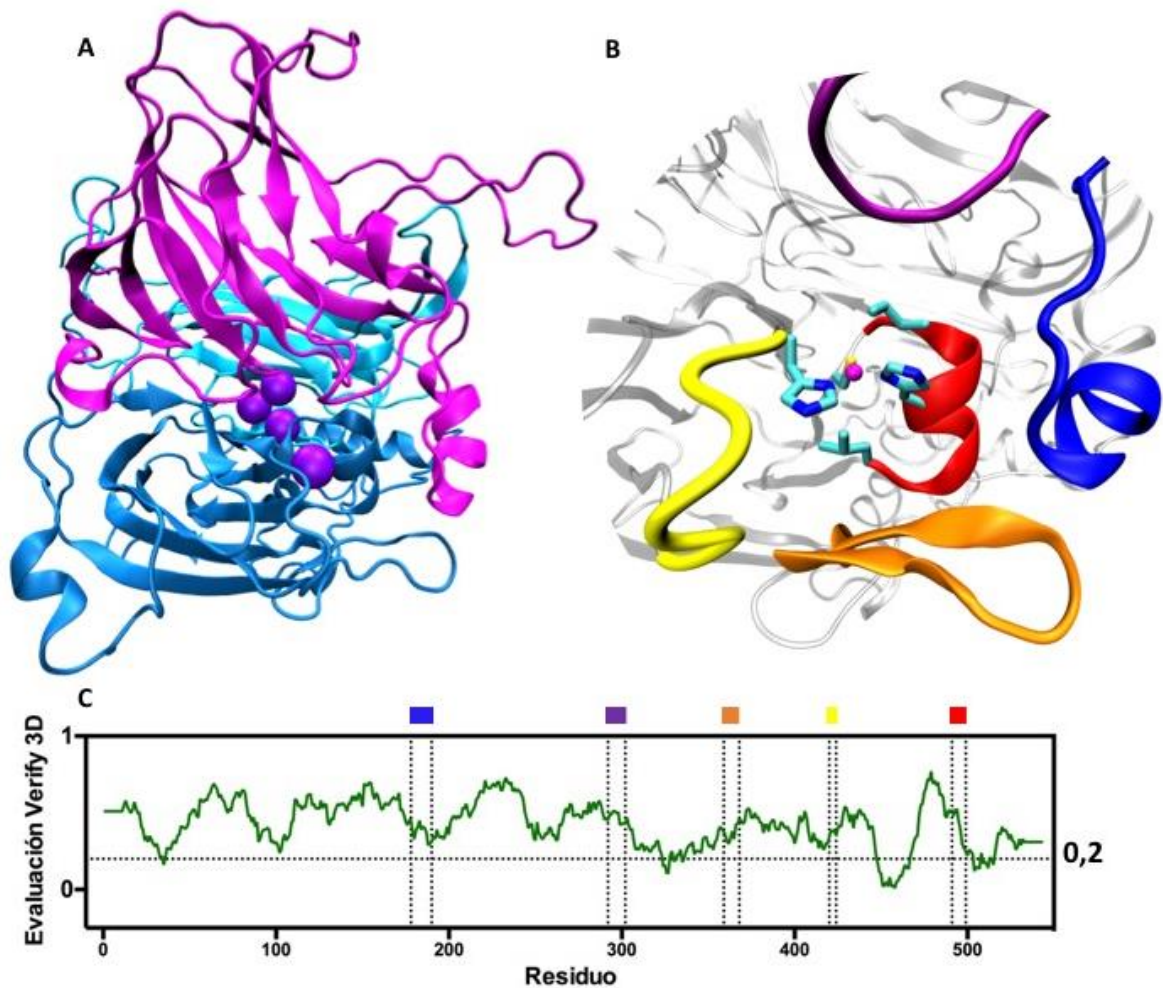


Figura 18 Modelado de la *BaLcc*.

Se muestra en **A** el modelo 3D de la *BaLcc* construido, en celeste el dominio 1, en rosado el dominio 2 y en azul el dominio 3, los sitios de cobre se muestran en morado **B** un acercamiento del sitio de unión a sustrato de la enzima, próximo al sitio de cobre T1, destacando con colores los elementos de estructura secundaria que forman el sitio: la hélice $\alpha 1$ y el loop $\alpha 1$ - $\beta 10$ en azul, el loop $\beta 18$ - $\alpha 3$ - 103 en morado, el loop $\beta 21$ - $\beta 22$ en naranja, el loop $\beta 23$ - $\beta 24$ en amarillo y la hélice $\alpha 3$ en rojo. Se muestran los ligandos del cobre T1 en representación de enlaces (carbonos en cian, oxígeno en azul, azufre en amarillo y cobre en morado). **C** Evaluación del modelo por verify 3D, se muestra en línea continua la evaluación promediada en ventanas de 10 aminoácidos, se destacan la evaluación para los elementos de estructura secundaria del sitio de unión a sustrato en los mismos colores que en **B**.

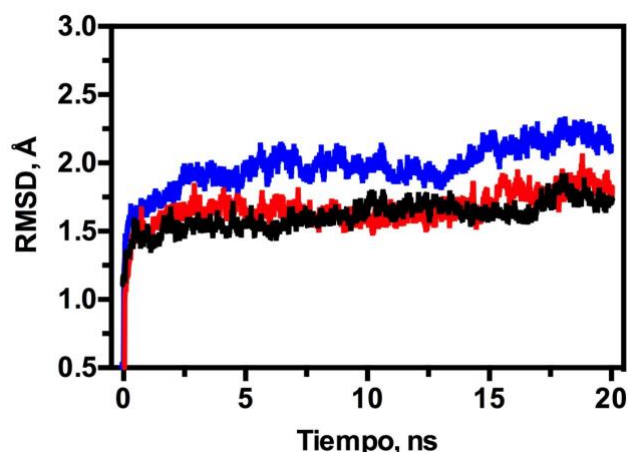


Figura 19 Trayectoria de la simulación de *BaLcc* apo.

Se muestra el RMSD de la cadena principal del modelo de *BaLcc* en su forma apo para tres simulaciones de dinámica molecular iniciadas desde semillas aleatorias diferentes .

Para realizar el Docking de los tres antibióticos en el sitio activo de la laccasa se utilizó la estructura correspondiente a la última conformación obtenida en una de las simulaciones. Para ello, los compuestos fueron ubicados en una caja de 23 Å x 23 Å x 23 Å centrada en el sitio activo (a 5 Å de la H494, en dirección al solvente). Se obtuvo 20 modos de unión para cada compuesto, de los cuales se eligió el que presentaba la menor distancia entre el carbono 5 y la H494, en acuerdo con el mecanismo de reacción propuesto (Introducción: sección: “Uso de Laccasas para la oxidación de antibióticos.”) y la menor energía de unión (Figura 20). Para los tres antibióticos los modos de unión resultantes fueron similares; se puede observar una serie de aminoácidos hidrofóbicos en torno a los anillos C y D de los compuestos, formando interacciones de tipo Van der Waals y π - π con algunas fenilalaninas que se encuentran en esa región. Las energías de unión calculadas para las estructuras seleccionadas fueron de -8,7 kcal/mol, -7,8 kcal/mol y -9,2 kcal/mol para oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina

respectivamente. Esto indica que el complejo *BaLcc*-clortetraciclina sería el más estable de los tres.

Luego se analizó por simulación de Dinámica Molecular la estabilidad de los complejos generados. Para esto, se realizaron simulaciones de los 3 complejos durante 10 ns, en las mismas condiciones que para la estructura apo. Se realizaron 3 réplicas de cada simulación, desde semillas diferentes. Se observa que el RMSD respecto de cada estructura inicial para los tres complejos alcanza un estado estable durante el primer ns de simulación (Figura 21). Al observar las trayectorias individuales se observa que los antibióticos se mantienen estables en el sitio activo, aunque explorando diferentes conformaciones.

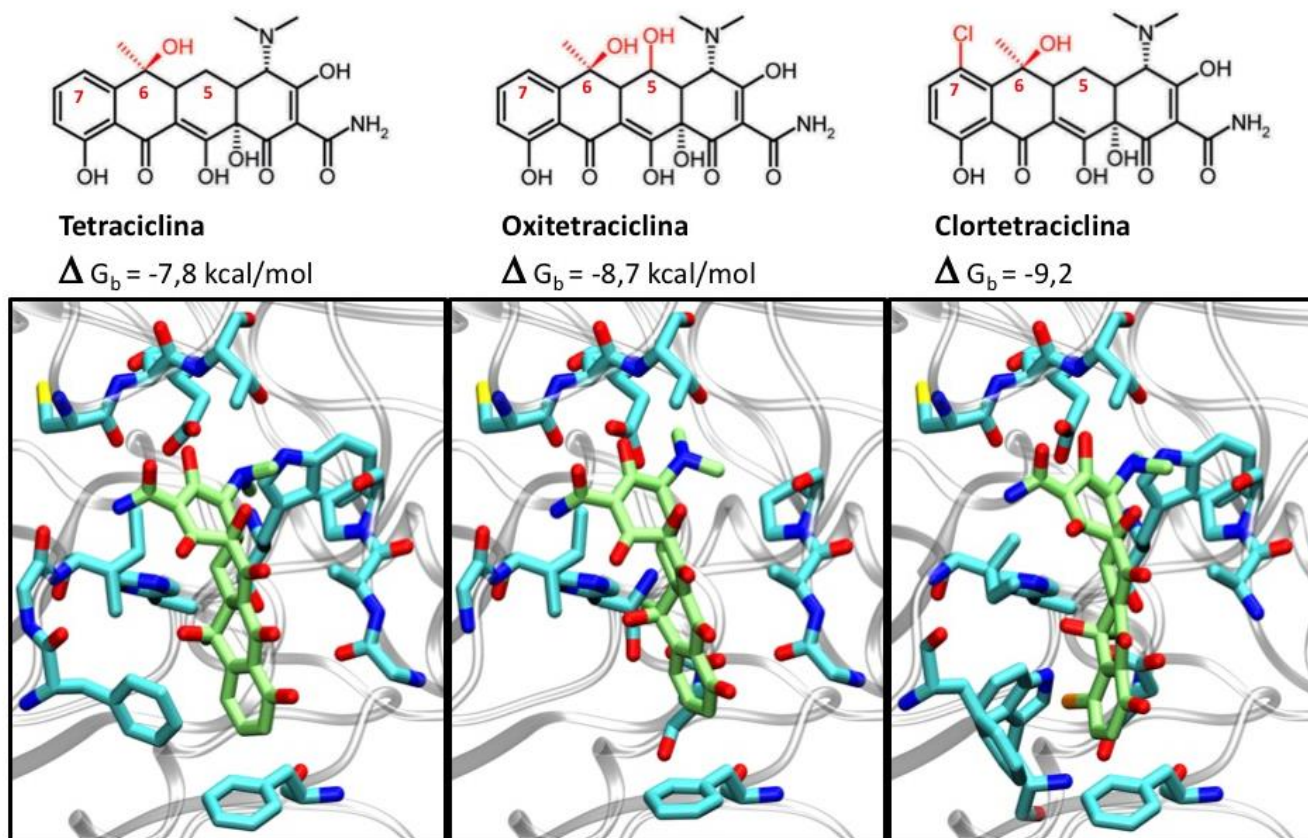


Figura 20 Docking de tetraciclinas en el modelo de la *BaLcc*.

Se muestran los mejores modos de unión generados por Docking para los complejos *BaLcc* - tetraciclinas. Arriba se muestra la estructura en 2D de los 3 antibióticos y la energía de unión obtenida en la evaluación del Docking. Abajo se muestra la estructura 3D. Se muestran los aminoácidos a menos de 4 Å del antibiótico. Se muestran los carbonos en cian para la proteína y en lima para el antibiótico, en azul los nitrógenos, en amarillo azufre, y oxígeno en rojo.

Para tener una idea del efecto de la unión de ligandos sobre las conformaciones generales adoptadas por la enzima, se analizó el movimiento de cada residuo durante las simulaciones de Dinámica Molecular. Esto se cuantificó calculando el RMSF (Figura 22) para todos los residuos de la proteína en presencia y en ausencia de los ligandos, este valor da una medida de la fluctuación de todos los átomos de un residuo con respecto a su posición promedio durante toda la simulación. Se observa que el movimiento de los elementos de estructura secundaria que forman el sitio activo muestra diferencias entre lo observado para la estructura apo y para las estructuras en presencia de los ligandos. En particular, para la hélice $\alpha 1$ y el loop $\alpha 1$ - $\beta 10$ ocurre un movimiento mayor que para los demás elementos de estructura secundaria en la forma apo, mientras que se observa una estabilización de esta región en las simulaciones en presencia de antibióticos. Esta hélice y el loop conectado a ella se mueven hacia afuera del sitio activo en un movimiento similar al de una tapa, permitiendo la entrada del solvente. Mientras tanto, el resto de la proteína no muestra diferencias en su RMSF en ausencia y presencia de ligandos.

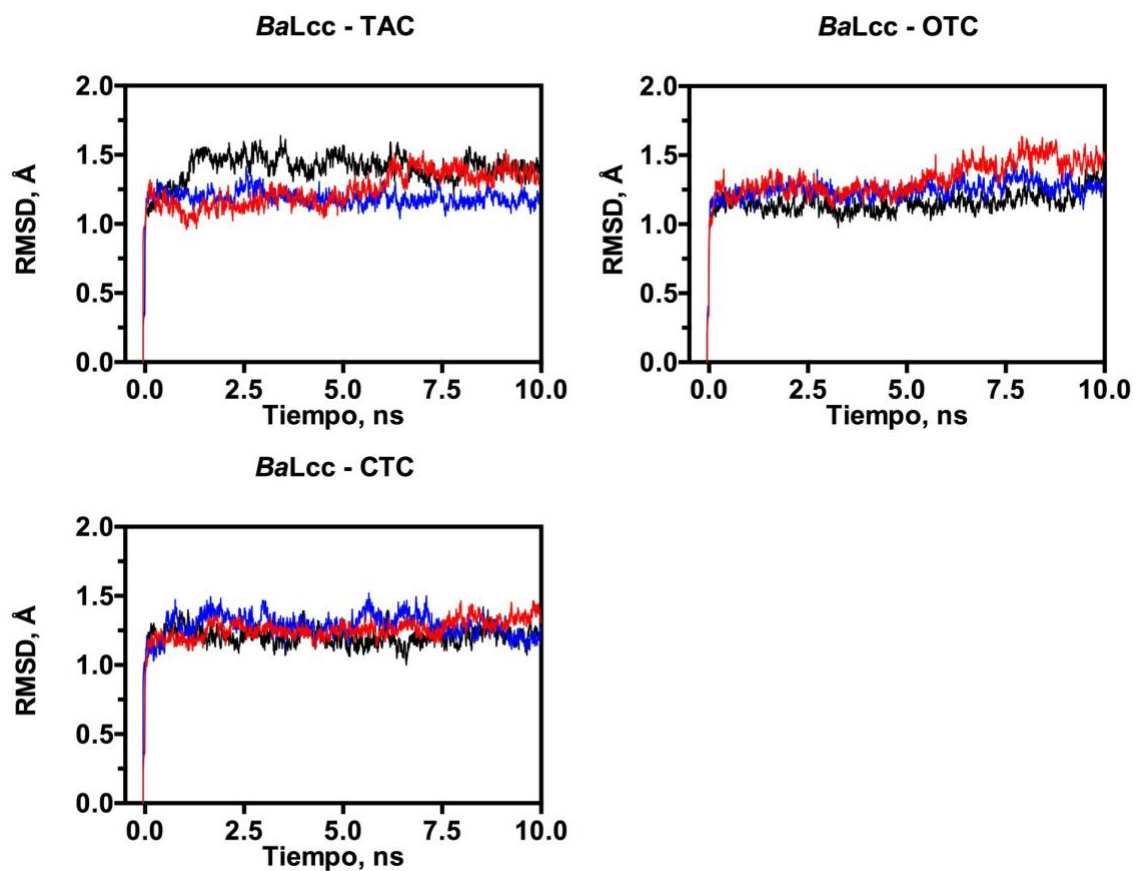


Figura 21 Trayectorias de simulaciones de los complejos *BaLcc*-tetraciclinas.

Se muestra el RMSD de la cadena principal de los modelos de *BaLcc*-Tetraciclinas durante simulaciones de dinámica molecular independientes de 10 ns cada una. Cada replica se muestra de un color diferente.

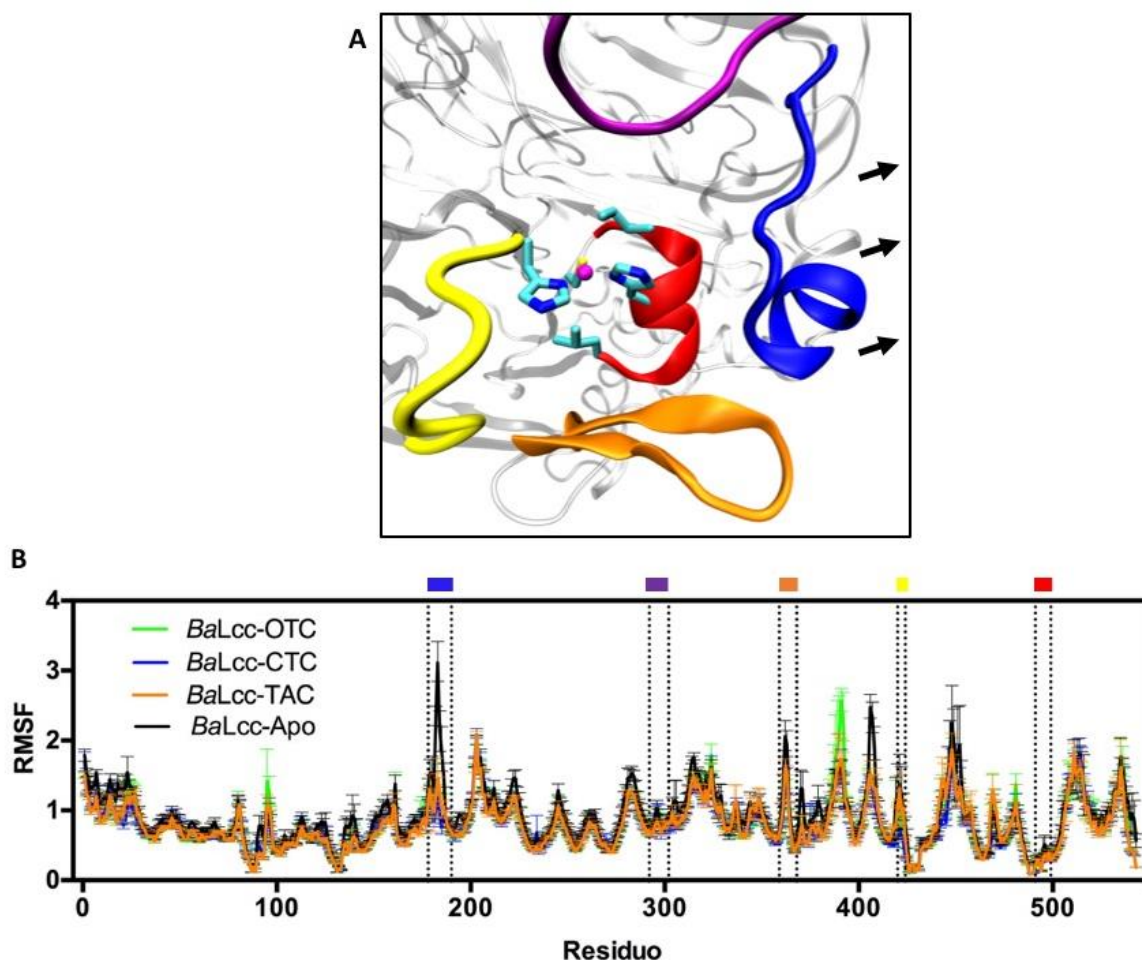


Figura 22 Fluctuación de la hélice $\alpha 1$ y el loop $\alpha 1$ - $\beta 10$ en simulaciones de *BaLcc* apo y en complejo con tetraciclinas.

A Se muestra el sitio activo en la estructura Apo y el movimiento que sufre la hélice $\alpha 1$ y el loop $\alpha 1$ - $\beta 10$ durante la simulación (en azul) se mantiene el código de colores usado en la Figura 18. **B** Se observa el RMSF calculado para cada uno de los residuos de la proteína en su forma apo y en complejo con tetraciclina (TAC), oxitetraciclina (OTC) y clortetraciclina (CTC). Se destacan los residuos de los elementos de estructura secundaria que forman el sitio activo usando el mismo código de colores que se muestra en A. Se muestra el promedio del RMSF calculado para tres simulaciones independientes y el error estándar calculado.

Se calculó la energía de unión entre *BaLcc* y los 3 antibióticos (ΔG_b) por medio del método MM-PBSA. Este es un método de post-procesamiento de Dinámica Molecular que utiliza diferentes conformaciones de una simulación para calcular la

diferencia de energía entre dos estados de un sistema. En este caso, los estados son unido y no unido al antibiótico.

Para el análisis de MM-PBSA se utilizaron todos los *snapshots* generados en las simulaciones anteriores. Se calcularon las energías de unión para los tres complejos (Tabla 6). Las energías de unión calculadas predicen que el complejo con clortetraciclina es el más estable, seguido de tetraciclina y después oxitetraciclina. Al observar la contribución de cada residuo a la energía de unión se observa que las principales interacciones favorables para los tres antibióticos se deben a interacciones de tipo Van der Waals con residuos hidrofóbicos, y están distribuidas entre todos los residuos de este tipo en el sitio activo, siendo la interacción más importante con ILE424. Al buscar diferencias entre los tres sustratos, observamos que clortetraciclina a diferencia de los otros compuestos muestra una interacción favorable con el residuo ASP167 y la interacción desfavorable con el ASP236 es menos importante que en el caso de los otros compuestos (Figura 23 y Tabla 7).

Tabla 6 ΔG_b calculado por MM-PBSA para los complejos *Ba*Lcc-tetraciclina.

Sustrato	ΔG_b , kcal/mol
Tetraciclina	$-13,95 \pm 0,10$
Clortetraciclina	$-23,3 \pm 0,1$
Oxitetraciclina	$-7,0 \pm 0,1$

Tabla 7. ΔG_b calculado por MM-PBSA y desglosado por residuo para los complejos *BaLcc*-tetraciclina.

Los residuos se muestran en el código de colores de acuerdo a la estructura secundaria de la que forman parte de acuerdo a lo mostrado en la Figura 22, se muestra la energía de unión para aquellos residuos con $|\Delta G_b| > 0,5$ kcal/mol en negro y en gris las $|\Delta G_b| < 0,5$ kcal/mol (menos importantes).

Residuo	ΔG_b , kcal/mol		
	Tetraciclina	Clortetraciclina	Oxitetraciclina
ASP 167	0,522 ± 0,006	-0,034±0,007	0,457 ±0,007
ALA 184	-1,038 ± 0,006	-1,198±0,005	-1,055±0,006
PRO 185	-1,12±0,02	-1,27±0,01	-1,28±0,01
ASP 236	4,51±0,04	0,60±0,07	5,91±0,04
SER 298	-1,002±0,008	-0,808±0,008	-0,83±0,01
THR 299	0,03±0,02	0,63±0,02	1,22±0,02
TRP 367	-0,369±0,005	-0,491±0,006	-0,592±0,006
PHE 422	-0,456±0,008	-0,764±0,005	-0,83±0,01
ILE 424	-2,139±0,007	-2,137±0,005	-2,169±0,008
TRP 493	-0,89±0,01	-0,991±0,008	-0,636±0,008
GLU 497	3,48±0,06	7,13±0,05	4,74±0,05

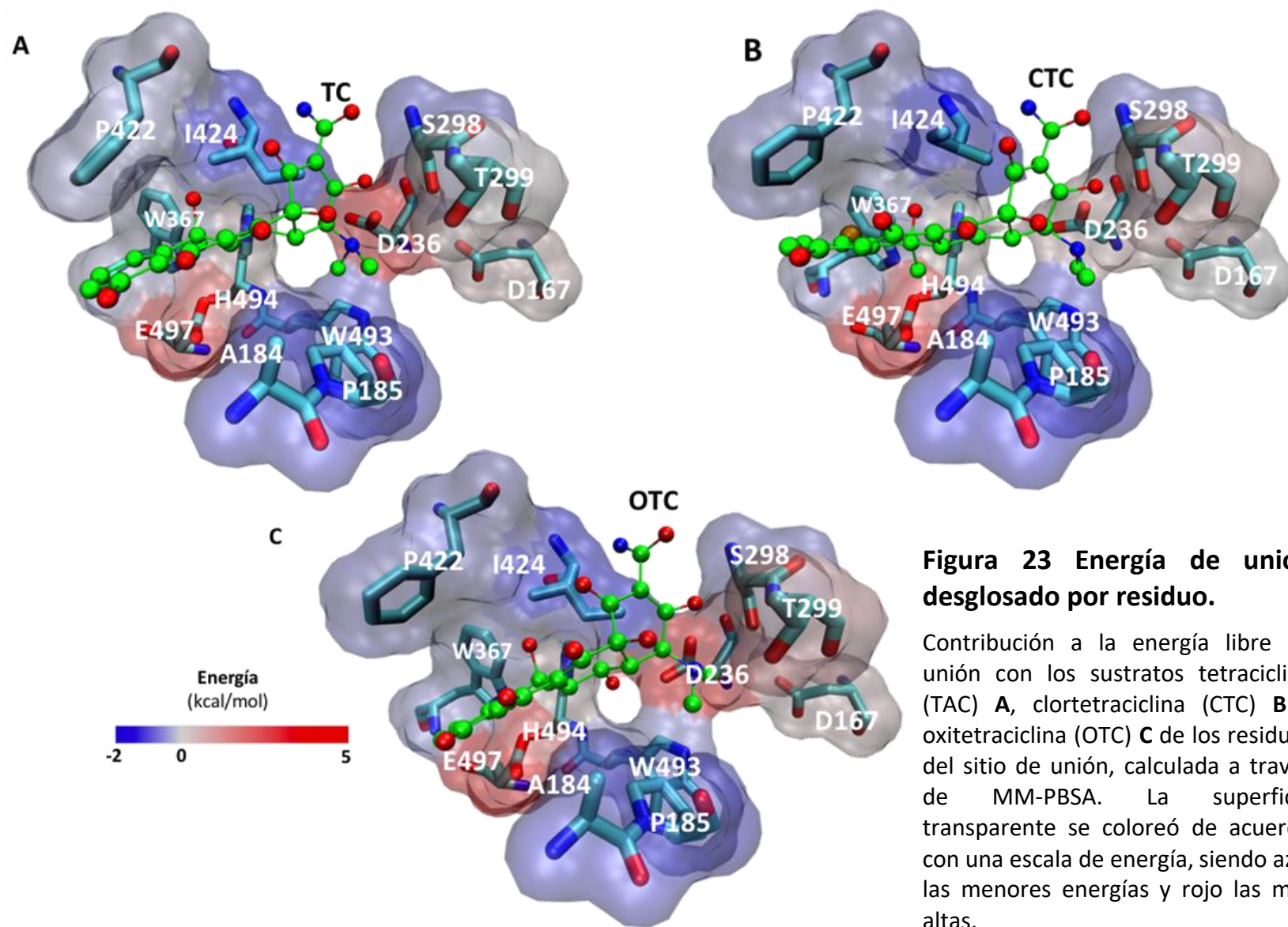


Figura 23 Energía de unión desglosado por residuo.

Contribución a la energía libre de unión con los sustratos tetraciclina (TAC) **A**, clortetraciclina (CTC) **B** y oxitetraciclina (OTC) **C** de los residuos del sitio de unión, calculada a través de MM-PBSA. La superficie transparente se coloreó de acuerdo con una escala de energía, siendo azul las menores energías y rojo las mas altas.

3.5 Determinación de las diferencias de afinidad entre la Laccasa de Botrytis aclada y antibióticos de la familia tetraciclina.

Para analizar la unión de la laccasa con los tres antibióticos *in vitro* se utilizaron los antibióticos como inhibidores de la reacción de oxidación del sustrato ABTS. Esto debido a la enorme diferencia de velocidad que presentan esas reacciones. Por ejemplo, si consideramos la v_0 obtenida previamente para 0,6 mM Oxitetraciclina (página 59) de $1,09 \times 10^{-6} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y la comparamos con la obtenida para la oxidación de ABTS a una concentración saturante (2 mM), que es de $17,4 \pm 1,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, nos damos cuenta que hay más de 7 ordenes de magnitud de diferencia. Como los inhibidores a la vez son sustratos para la enzima, se requiere trabajar en concentraciones de inhibidor a las cuales la velocidad de oxidación de la tetraciclina sea despreciable con respecto a la velocidad de oxidación del ABTS. Sólo conocemos la V_0 para la oxidación de oxitetraciclina a 0,6 mM la cual es de $1,09 \times 10^{-6}$. Luego, por medio de MM-PBSA determinamos la K_d para ese antibiótico, la cual es de $4 \pm 2,6$ mM. Si asumiéramos que la K_m para este compuesto fuera igual a su K_d podríamos calcular la V_{\max} para el compuesto en el caso de que tuviera una cinética ajustada a la ecuación de Michaelis-Menten. De esa forma, la V_{\max} que calculamos es de $8,3 \times 10^{-6} \pm 5,8 \times 10^{-6} \text{ U/mg}$, si en esa ecuación ahora calculamos la V_0 con esa V_{\max} para una concentración de sustrato de 4 mM (la máxima concentración que se utilizó como concentración del inhibidor en las

cinéticas de inhibición, se calcula una V_0 de $4,2 \times 10^{-6} \pm 2,9 \times 10^{-6}$ U/mg. Esto implica que en los 5 minutos de reacción en la cinética de inhibición de los 0,8 μ moles de oxitetraciclina que había en la cubeta (200 μ L) teniendo en cuenta que en la cubeta habían 0,3 μ g de enzima, se oxidan $6,3 \times 10^9$ μ moles de oxitetraciclina, lo cual corresponde al $7,88 \times 10^{-7}$ %. Lo cual es despreciable. De esta forma, si los antibióticos estudiados se están uniendo al sitio activo, debieran actuar como inhibidores competitivos, por lo cual se hicieron curvas de saturación de ABTS en presencia de diferentes concentraciones de antibiótico y se observó el comportamiento de inhibición.

Primero se obtuvo una curva de saturación de ABTS para determinar los parámetros cinéticos de la *BaLcc* en las condiciones del ensayo de buffer acetato de sodio 25 mM, pH 5,0 a 30°C. La curva de saturación se ajustó a la ecuación de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos obtenidos (Figura 24) son similares a los obtenidos por Kittl (Kittl, Mueangtoom, et al., 2012) quien obtuvo una K_m de 2,9 μ M y una k_{cat} de 109 s^{-1} (obtenidos en condiciones de pH 3,0, y 30°C). Kittl reporta la actividad óptima de oxidación de ABTS para esta enzima a pH 3, sin embargo los reportes de actividad de oxidación de tetraciclinas para otros miembros de la familia muestran el óptimo a pH 6.0 (Yang, 2016), por lo cual en los ensayos subsiguientes se midió la cinética de inhibición en una condiciones de pH intermedia, es decir, a pH 5.

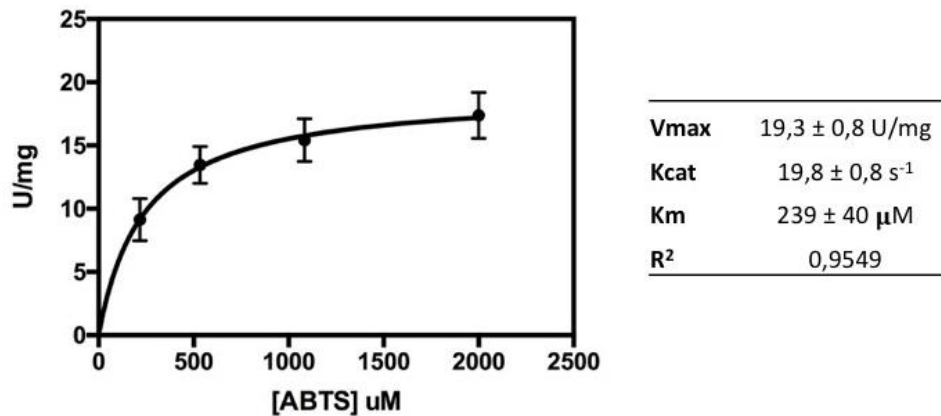
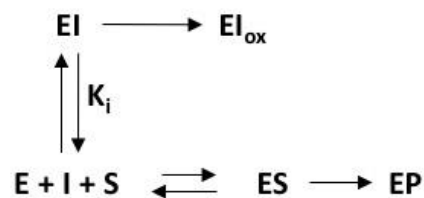


Figura 24 Curva de Saturación de ABTS.

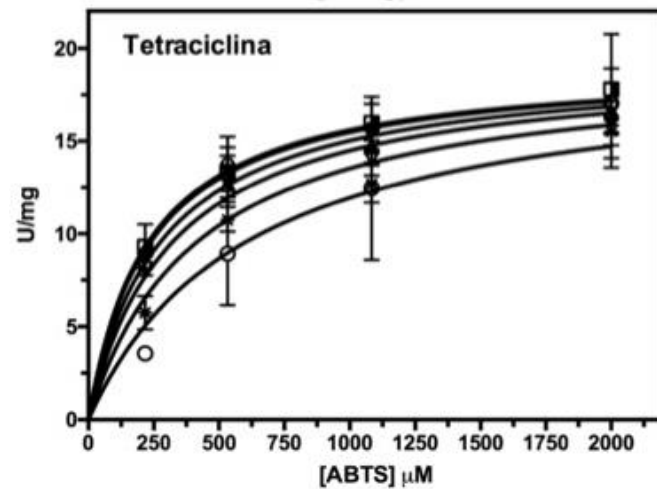
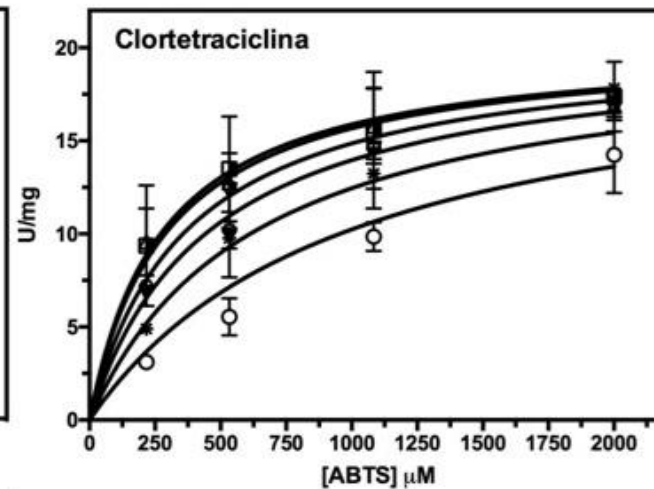
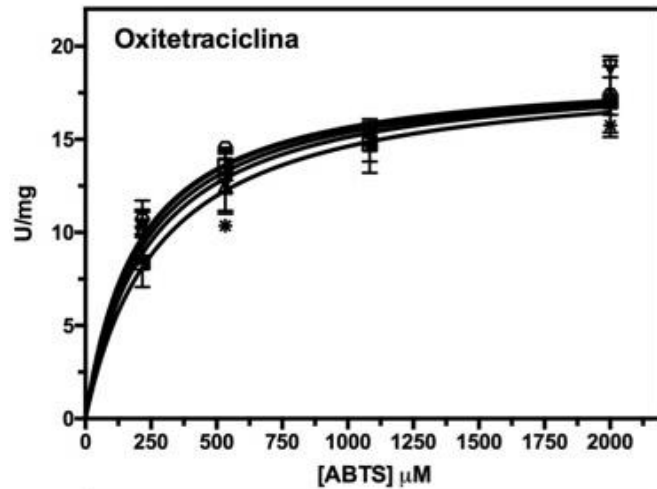
Se muestra la cinética de saturación de *BaLcc* con ABTS, en condiciones de buffer acetato 25 mM, pH 5,0 y 30°C. En la tabla adjunta se reportan los parámetros cinéticos calculados con el ajuste.

Se realizaron curvas de saturación con ABTS a concentraciones crecientes de los antibióticos tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina. Debido a la suposición de que los antibióticos se unen al mismo sitio de unión que el ABTS, se espera encontrar cinéticas con un comportamiento de inhibición competitiva. En el caso de una cinética competitiva el inhibidor es capaz de unirse a la enzima, pero no al complejo enzima sustrato, con el mecanismo siguiente:



En el cual E corresponde a la enzima, I al inhibidor (tetraciclinas, el cual puede ser oxidado por la enzima), S al sustrato (ABTS) y P al producto. Si se asume que el paso de

El a E_{ox} tiene una velocidad despreciable (como se discutió mas arriba) con respecto al paso ES a EP, la K_i de la reacción corresponde a la constante de disociación entre la enzima y el inhibidor, lo cual puede relacionarse directamente con las energías de unión calculadas antes. De hecho, las cinéticas de inhibición realizadas muestran un comportamiento competitivo para los tres inhibidores. Se calcularon las constantes de inhibición, las cuales son del orden milimolar (Figura 25) y podemos observar una correlación entre las energías de unión calculadas y las constantes de disociación determinadas: Las energías de unión calculadas por MM-PBSA dan $-7,0 \pm 0,1$ Kcal/mol, $-13,95 \pm 0,10$ Kcal/mol y $-23,3 \pm 0,1$ Kcal/mol para oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina respectivamente, siendo este ultimo el complejo mas estable, mientras que las constantes de inhibición son de: $4,26 \pm 2,6$ mM, $2,4 \pm 0,4$ mM y $1,5 \pm 0,3$ mM para oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina respectivamente, siendo la constante de inhibición para clortetraciclina la más baja. Se trabajó a las concentraciones mas altas tanto de antibiótico como de ABTS que se pudo, sin observar precipitación de los compuestos. En el caso de la oxitetraciclina, el valor de K_i fue calculado a partir de la parte de las ecuaciones que sólo proviene del ajuste, por lo tanto, representa una alta desviación estándar.



- 0
- ▲ 100
- 500
- ▼ 1000
- * 2000
- 4000

	OTC	CTC	TC
$K_M, \mu\text{M}$	201 ± 27	279 ± 33	230 ± 25
K_i, mM	$4 \pm 2,6$	$1,5 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,4$
$V_{max}, \text{U/mg}$	$18,8 \pm 0,5$	$20,3 \pm 0,6$	$19,2 \pm 0,5$
K_{cat}, s^{-1}	$19,3 \pm 0,6$	$20,8 \pm 0,6$	$19,7 \pm 0,5$
R^2	0,9799	0,9837	0,9863
$Sy.x$	0,9237	0,8270	0,7466

Figura 25 Curva de Saturación de ABTS a diferentes concentraciones de Tetraciclinas.

Se muestra la cinética de saturación de *BaLcc* con ABTS, en condiciones de buffer acetato 25 mM, pH 5,0 y 30°C a concentraciones crecientes de entre 0 y 4 mM de los antibióticos Tetraciclina, Oxitetraciclina y Clortetraciclina. En la tabla adjunta se reportan los parámetros cinéticos calculados con el ajuste global de todas las curvas obtenidas para cada antibiótico, y los parametros de calidad del ajuste. La curva a 4 mM de oxitetraciclina no fue tomada en cuenta debido a que no se logró un ajuste satisfactorio.

Al observar los parámetros de calidad de los ajustes se pueden ver valores de R^2 globales sobre 0,97, lo cual habla de buenos ajustes para cada curva. Sin embargo, al observar el parámetro de $S_{y.x}$ que habla del ajuste global, se observa un peor ajuste para la curva de oxitetraciclina, lo cual podría indicar cierta desviación del comportamiento competitivo.

4. Discusión

4.1 Expresión y purificación de la laccasa de *B. aclada* expresada en *P. pastoris*.

La expresión y purificación de la *BaLcc* fue realizada de manera similar a lo reportado por Kittl el 2012 (Kittl, Gonaus, et al., 2012; Kittl, 2012). En el primer trabajo, se describe el clonamiento, expresión y purificación de la *BaLcc* en *P. pastoris* utilizando el vector pPICZ A, bajo el control del promotor inducible AOX1 obteniendo una de las expresiones mas altas para una laccasa reportadas a la fecha (51.000 U/L). Luego en la publicación siguiente reportan la expresión de la misma proteína bajo el control del promotor constitutivo GAP. Obtienen una expresión aun mayor (53.300 U/L) y en menor tiempo. Realizando ambos cultivos en biorreactores por lotes alimentados en la cepa X33 de *P. pastoris* (cepa silvestre).

En nuestro caso, el secuencia codificante de la *BaLcc* fue sintetizada con una previa optimización de codones para su expresión en *P. pastoris*. Si bien el DNA codificante fue clonado en el vector pPICZ A bajo el control del promotor AOX1, la expresión fue realizada en la cepa SMD1168 (mutante para proteasas extracelulares). Para cultivos realizados en matraces la actividad volumétrica obtenida (276 ± 19 U/L) al quinto día desde la inducción, requirió de dos días previos, uno para el pre-inóculo y un segundo día de crecimiento en medio BGMH. Esta expresión es muy alta con respecto a

lo que hemos observado previamente en experimentos anteriores para la expresión de Laccasas provenientes de otros organismos en *S. cerevisiae* (Cáceres Vergara, 2016) o en *P. pastoris* (data no publicada).

Al realizar la expresión bajo el promotor constitutivo GAP se observa una expresión significativamente mayor (372 ± 5 U/L) que la obtenida bajo el promotor AOX1 a las 65 horas de cultivo. Se observa que la expresión bajo este promotor tiene como ventaja una mayor expresión de proteínas y un menor tiempo de cultivo (unas 55 horas menos desde la inducción) para alcanzar el máximo de actividad. Además, no requiere una fase de crecimiento de un día anterior a la inducción, por lo tanto, en total se requieren unas 70 horas menos de cultivo.

La expresión de laccasa bajo el control del promotor constitutivo GAP es unas cinco veces mayor cuando el cultivo se realiza en biorreactor por lote alimentado que cuando se cultiva en matraz. Sólo se intentó la expresión una vez y por lo tanto no se trabajó en su optimización, debido a que la cantidad de enzima producida y posteriormente purificada es suficiente para los objetivos de este trabajo.

Vale la pena notar que la mejor expresión obtenida por nosotros es significativamente menor que la reportada por Kittl. Esto puede deberse a varios factores en los cuales no profundizamos experimentalmente. Primero, las condiciones en que Kittl midió la actividad en los pasos de expresión y purificación de la enzima no aparecen reportados en su trabajo, por lo cual lo mas probable es que las diferencias de expresión se deban a diferencias en las condiciones del ensayo. Por otra parte, se han reportado

inconsistencias y ambigüedades en la determinación de la actividad laccasa en diferentes trabajos en la literatura (Baltierra-Trejo, et al., 2015), por lo que podría ser que la actividad calculada por Kittl haya sido calculada de forma diferente a la recomendada.

Además, hay que considerar que el vector pPICZ A al insertarse en el DNA genómico de *Pichia pastoris* puede hacerlo en una o mas copias de forma variable, y el numero de copias se correlaciona directamente con el nivel de expresión de la proteína. Nosotros no determinamos el numero de copias del DNA codificante en las colonias que seleccionamos, si no más bien seleccionamos las colonias con un halo de oxidación de ABTS de mayor tamaño. Así, es posible que las cepas de *P. pastoris* obtenidas por Kittl tuvieran un mayor numero de copias que las producidas por nosotros y de esa forma se explique, en parte la diferencia en actividad volumétrica en el sobrenadante, sin embargo, este es un evento de muy baja probabilidad. Otro factor que puede causar la diferencia observada podría ser las condiciones de cultivo, las cuales, más allá de ser similares en temperatura, agitación y flujo de alimentación pueden diferir en el diseño del biorreactor y en diferencias en el medio de cultivo.

Nuestro protocolo de purificación es similar al seguido por Kittl. En el caso de Kittl, agregaron sulfato de amonio sólido al sobrenadante del cultivo, y luego cargaron en una columna de interacción hidrofóbica de tipo *Phenyl Sefarose FF* (de flujo rápido), después las fracciones con actividad laccasa fueron cargadas en una columna *Phenyl Source* (columna de interacción hidrofóbica de alta resolución) y finalmente la enzima purificada fue obtenida por exclusión molecular. En nuestro protocolo, en lugar de dos

pasos de cromatografía de interacción hidrofóbica realizamos un solo paso, en una columna *Phenyl Sepharose HP* la cual tiene una resolución y capacidad de carga intermedias entre las de la *Phenyl Sepharose FF* y la *Phenyl Source* usadas por Kittl (la primera de baja resolución y alta capacidad de carga y la segunda de alta resolución y baja carga). En ese paso obtuvimos al menos un 80% de pureza, la diferencia principal con el protocolo de Kittl se debe a la alta concentración de proteínas en su sobrenadante debido a la alta densidad celular que logra en los cultivos en biorreactor y la alta expresión. La alta densidad celular aumenta mucho la producción de otras proteínas en el medio extracelular a la vez que se aumenta la producción de laccasa, por lo cual su purificación requiere de un primer paso de captura utilizando una columna de un gran volumen (350 mL) de *Phenyl Sepharose FF* y luego un paso de purificación en una columna de mejor resolución. En nuestro caso, los sobrenadantes tenían mucha menor carga de proteína por lo que la laccasa puede ser capturada y purificada en un solo paso. Lo mismo pasa con el último paso de exclusión molecular en el cual la columna *Sephacryl S-200* que nosotros utilizamos permite menor carga y menor resolución que la utilizada por Kittl. Con todo esto, la relación Abs_{280}/Abs_{610} de 29,81 obtenida por nosotros para la proteína purificada muestra una mayor pureza que la obtenida por Kittl de 41,6.

4.2 La Laccasa de *Botrytis aclada* puede oxidar e inactivar Tetraciclinas.

Existen varios reportes de la oxidación e inactivación de tetraciclinas por parte de Laccasas de basidiomicetes, entre ellos; la enzima de *T. versicolor* (Abejón, 2015; Llorca, 2015; Taheran, et al., 2017), la de *Pleurotus eryngii* (Chang, 2015) y la de *Cerrena unicolor* (Yang, 2016). Sin embargo, a nuestro conocimiento no existe ningún reporte anterior a este trabajo caracterizando dicha actividad para una laccasa proveniente de un hongo ascomiceto ni tampoco para una enzima purificada desde un hospedero heterólogo. Demostramos que la *BaLcc* puede oxidar el compuesto oxitetraciclina, y observamos que no ocurre oxidación del compuesto en los ensayos control en ausencia de enzima, por lo tanto la oxidación se debe a la actividad enzimática. Si se quisiera elaborar más con respecto a este punto, se podría hacer un control sin actividad en presencia de una forma inactiva de la enzima, esto, por ejemplo, en ausencia de oxígeno, el otro reactante de la oxidación. Se puede lograr la ausencia de oxígeno en el ensayo al trabajar en una atmosfera anóxica, al burbujear los tubos de reacción con N₂, o usar quelantes de oxígeno como cianuro. Con esto demostraríamos, sin perturbar la estructura de la enzima, que la oxidación del antibiótico se debe exclusivamente a la actividad de la laccasa.

En nuestras condiciones de ensayo, observamos que la *BaLcc* oxida tetraciclinas en tiempos de reacción similares a los reportados en literatura. Por ejemplo, observamos

el caso de (Yang, 2016) para la laccasa de *Cerrena unicolor* quienes utilizaron 20 U/mL de enzima inmovilizada con lo cual se oxidó en un 65% 100 µg/mL de tetraciclina y en un 60% 100 µg/mL de oxitetraciclina a las 48 horas de tratamiento. En el caso de la laccasa de *Trametes versicolor* se reporta la oxidación en 24 h de un 30% y 56% de 20 µg/mL de tetraciclina, para la enzima libre e inmovilizada respectivamente (De Cazes, 2014). También se ha reportado para la laccasa de *Trametes versicolor* una oxidación de un 78% de 100 µg/mL de tetraciclina en 18 h. En los últimos dos trabajos no se informa la cantidad de enzima utilizada. Entonces, observamos tasas de oxidación y tiempos de tratamiento similares para la laccasa de *Botrytis aclada* y para Laccasas de otros organismos, sin embargo, las condiciones no son estrictamente comparables.

Como los productos de oxidación de tetraciclinas pueden mostrar la misma potencia antibiótica que el compuesto original (Halling-Sørensen, G. Sengel, 2002) y se ha reportado que la oxidación de tetraciclinas catalizada por laccasa ocurre en varios pasos (Yang, 2016), se midió el efecto de los productos de reacción de tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina tratados con *BaLcc* sobre cultivos de *E. coli*. Esto da cuenta de la pérdida de su actividad contra este organismo. Dado que se ha reportado que otras Laccasas inactivan tetraciclinas en ensayos biológicos que utilizan bacterias Gram positivas, Gram negativas y un alga, observando que la inactivación es muy similar para los tres organismos (Suda, 2012), se espera que la inactivación de los compuestos caracterizada en este trabajo mediante ensayos contra *E. coli*, sea extensiva a organismos de todo el espectro de acción del compuesto. Se pudo observar que la

cantidad de oxitetraciclina y su toxicidad disminuyen casi a la par, manteniendo a las 24 horas de tratamiento un 25% de actividad inhibitoria, mientras se cuantifica sólo un 15% del antibiótico inicial. Esto sugiere que los productos de reacción para el caso de la enzima de *B. aclada* tendrían menor potencia que el compuesto sin tratar, pero que aún así mantendrían cierta potencia como antibióticos. Con respecto a los otros dos antibióticos, tetraciclina muestra una disminución de su actividad antimicrobiana muy similar a la de oxitetraciclina. Mientras por su parte la clortetraciclina pierde actividad microbiológica mas rápido que los otros dos antibióticos. Esta mayor velocidad de inactivación para clortetraciclina podría deberse a una mayor afinidad por ese compuesto que por las otras dos tetraciclinas, lo cual es congruente con lo predicho por MM-PBSA y con lo observado por cinética enzimática.

En resumen, con esto se prueba el potencial de la *BaLcc* para ser utilizada en aplicaciones de biorremediación de antibióticos en el medio ambiente. Dejando como proyección el comprobar que mantenga un buen rendimiento de oxidación en condiciones ambientales, lo cual es promisorio teniendo en cuenta su alta tolerancia a la inhibición por iones cloruro.

4.3 Características de la interacción entre la laccasa de *B. aclada* y tetraciclinas.

Como se mencionó mas arriba, la laccasa de *B. aclada* presenta una velocidad de oxidación de antibióticos similar a la observada para otras Laccasas, y gran potencial para

su uso industrial. Facilitando la posibilidad de hacer ingeniería sobre ella, para mejorar su catálisis y otras propiedades como pH óptimo, temperatura óptima y estabilidad, y finalmente llevarla a una aplicación industrial.

Como base para buscar optimizar la actividad de oxidación de antibióticos mediante ingeniería de enzimas se debe entender cómo la laccasa interactúa con este tipo de sustrato. Por ello, modelamos la interacción entre la enzima y 3 antibióticos de la familia tetraciclina, para los cuales observamos previamente su inactivación. El sitio de unión fue seleccionado de acuerdo con la información encontrada en otras estructuras cristalográficas de Laccasas unidas a sustratos. Observamos la laccasa de la bacteria *B. subtilis* CotA unida a ABTS (Enguita, et al., 2004) y unida a ácido sináptico (Xie, et al., 2015), la Laccasa del hongo ascomiceto: *M. albomyces* unida a 2-DMP (Kallio, et al., 2009) y las Laccasas de hongos basidiomicetes: la de *Trametes trogii* unida a *p*-methilbenzoato y la de *Trametes versicolor* unida a 2,5-xilidina. En estas estructuras, los diferentes sustratos se ubican a corta distancia de una de las histidinas del sitio de cobre T1. El sitio de unión se caracteriza por estar formado por 4 elementos de estructura secundaria ubicados a unos 7 Å del sitio de cobre T1, formados principalmente por residuos no polares y uno o dos residuos ácidos ubicados al fondo del sitio activo. Estas observaciones sugieren fuertemente que tanto el ABTS como las tetraciclinas se unirían al mismo sitio en la *BaLcc*. Sin embargo, debe mencionarse que se ha reportado una estructura de CotA unida a ABTS (Liu, et al., 2016) en otro sitio de unión, a unos 26 Å del sitio descrito. Este sitio podría ser un sitio activo ya que mutaciones en residuos que

forman ese sitio causan cambios en los parámetros cinéticos de la enzima. Ese sitio de unión se encuentra en un túnel formado por el loop que une los dominios 2 y 3 y una hoja beta del dominio 3. Este sitio se pudo observar en estructuras provenientes de bacterias, sin embargo, sólo presenta abertura por un extremo del túnel. En enzimas provenientes de hongos basidiomicetes el sitio no es observable, ya que el loop sería mas largo y formaría una hélice 3_{10} que lo haría colapsar sobre la hoja beta del dominio 3. Por lo cual este túnel y sitio de unión alternativo, sería una característica sólo de CotA. Al observar la estructura de *BaLcc*, del grupo de los hongos ascomicetes vemos que ese loop se parece en tamaño y forma al de los hongos basidiomicetes y por lo tanto no dejaría espacio para la unión a ABTS. Con esto descartamos ese posible sitio de unión.

La posible interacción entre *BaLcc* y las tetraciclinas fue estudiada mediante *Docking*. Se observa que las tres tetraciclinas se unen en una forma similar, encontrándose modos de unión de baja energía en acuerdo con el mecanismo de reacción propuesto (ver introducción, sección Uso de Laccasas para la oxidación de antibióticos.”). La distancia entre la H494 y el C5 de las 3 tetraciclinas analizadas fue aproximadamente de 5 Å. Además, se pudo observar que los complejos construidos son estables a través de la dinámica molecular.

Se calculó la energía de unión entre la enzima y las tetraciclinas por MM-PBSA. Esta energía no puede relacionarse con el ΔG de unión real para este complejo ya que el sistema utilizado fue construido bajo restricciones de posición para los sitios de unión a cobre (Materiales y Métodos) y por lo tanto no considera la flexibilidad que podría tener

el sitio ni su aporte a la energía de unión, ya que no está considerado en la función de energía sólo se considera su componente de energía de solvatación. Con esto, sólo es válido usar esta herramienta para comparar energías de unión entre sustratos diferentes o entre mutantes de la misma enzima para el mismo sustrato. Los sistemas deben construirse siguiendo los mismos pasos, ya que si se calcula el $\Delta\Delta G$ entre una mutante y otra, o un sustrato y otro, como el error es sistemático, al hacer la sustracción, el error se elimina, y por lo tanto la diferencia entre los ΔG es válida. Con todo esto, se puede correlacionar el ΔG calculado con la K_d en la medida de que se comparen sustratos similares. Observamos que los ΔG calculados para tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina darían una relación en la cual clortetraciclina formaría el complejo más estable, seguido de tetraciclina y oxitetraciclina como el menos estable.

Observamos por otra parte, a través del comportamiento inhibitorio de la oxidación de ABTS, que las tetraciclinas tienen un comportamiento de unión mutuamente excluyente con el sustrato ABTS. Las K_i , las cuales en el modelo competitivo son equivalentes a las K_d para los complejos Enzima-tetraciclina tienen valores del orden milimolar, mostrando la misma tendencia observada que por MM-PBSA. El orden en la afinidad es el mismo que observa Suda (Suda, 2012) para la oxidación de los tres compuestos utilizando la laccasa de *Trametes versicolor*, la cual oxida más rápido los compuestos en el siguiente orden: Clortetraciclina > Doxiciclina > Tetraciclina > Oxitetraciclina. Se debe ser cuidadoso con el valor calculado para la K_d del complejo *BaLcc*-OTC, esta muestra un alto error debido a que las concentraciones a las que se realizó el experimento son bajas relativas al valor

obtenido y por lo tanto está calculada a partir de la parte del ajuste que tiene mayor incertidumbre, ya que en esa parte de la grafica no hay valores experimentales. Es difícil aumentar la concentración de ABTS en nuestras condiciones de ensayo debido a que, al ser este compuesto una sal de diamonio, aumenta la fuerza iónica del medio de reacción, llevando a una disminución en la solubilidad de las tetraclinas causando un límite de concentración tanto para tetraciclina como para ABTS al cual podemos determinar la v_0 sin que alguno de los compuestos precipite.

Al analizar la energía de unión de los residuos del sitio activo se observa que es similar para los tres ligandos, observamos que la mayor parte de las interacciones favorables se encuentran distribuidas entre los residuos no polares del sitio activo, encontrando las interacciones de menor energía para la P185, la A184, la S298 y la ILE424, sin encontrar mayores diferencias para los tres antibióticos. Se observa que las principales interacciones no favorables son causadas por los residuos ácidos en el sitio activo D167, D236 y E497. Al observar la descomposición de esas energías, vemos que su componente principal es la energía de solvatación y no E_{MM} dando cuenta de que no se trata de una interacción entálpica no favorable con el sustrato, sino que esos residuos al estar cargados serían mas estables al interactuar con el agua que con un sustrato tan apolar. Estos tres residuos se hacen buenos candidatos para hacer mutagénesis sitio dirigida en busca de enzimas más afines por tetracilinas. Sin embargo se debe tener cuidado, ya que se ha observado a partir de información estructural y cinética que el residuo D236 en proteínas homologas, interacciona con grupos $-NH_2$ o $-OH$ de algunos sustratos,

permitiendo su correcto posicionamiento en cercanía con la H494 que permite la transferencia de electrones (Tadesse, 2008). Por lo cual mutantes para ese residuo podrían disminuir la eficiencia catalítica de la enzima con otros sustratos. Es interesante que se puede relacionar la solubilidad en agua de los compuestos con la K_d determinada teniendo para oxitetraciclina 50 mg/mL (100 mM) (SIGMA), para tetraciclina 10 mg/mL (20 mM) (SIGMA) y para clortetraciclina 8,6 mg/mL (16 mM) (SIGMA), mostrando que el compuesto mas soluble en agua es menos afín con la enzima lo cual tiene sentido teniendo en cuenta la hidrofobicidad del sitio activo.

5. Conclusión

La laccasa de *B. aclada* expresada en *P. pastoris* oxida el antibiótico oxitetraciclina e inactiva los antibióticos tetraciclina, clortetraciclina y oxitetraciclina. La preferencia por estos tres compuestos predicha por MM-PBSA correlaciona correctamente con las diferencias de afinidad calculadas para los tres compuestos mediante ensayos de inhibición competitiva. Esto es congruente con la unión de las tetraciclinas en el sitio de la enzima predicho, caracterizado por la baja distancia entre el C5 de la tetraciclina y la H494 del sitio de unión a cobre T1.

6. Bibliografía

- Abejón, Belleville, & Sanchez-Marcano. (2015). Design, economic evaluation and optimization of enzymatic membrane reactors for antibiotics degradation in wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 156, 183–199.
- Abejón, De Cazes, Belleville, & Sanchez-Marcano. (2015). Large-scale enzymatic membrane reactors for tetracycline degradation in WWTP effluents. *Water Research*, 73, 118–131.
- Baltierra-Trejo, Márquez-Benavides, & Sánchez-Yáñez. (2015). Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase. *Journal of Microbiological Methods*, 119, 126–131.
- Ben, Qiang, Pan, & Chen. (2009). Removal of veterinary antibiotics from sequencing batch reactor (SBR) pretreated swine wastewater by Fenton's reagent. *Water Research*, 43(17), 4392–4402.
- Berkner, Konradi, & Schonfeld. (2014). Antibiotic resistance and the environment--there and back again: Science & Society series on Science and Drugs. *EMBO reports*, 15(7), 740–744.
- Bradford. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.
- Cáceres Vergara. (2016). *Expresión heteróloga y purificación de la Enzima Laccasa de Trametes versicolor*. Universidad de Chile.
- Case, D.A., Cerutti, Cheatham, Darden, Duke, Giese, Gohlke, Goetz, Greene, Homeyer, Izadi, Kovalenko, Lee, LeGrand, Li, Lin, Liu, Luchko, Luo, Mermelstein, Merz, Monard, York, & Kollman. (2017). Amber 2017. *University of California, San Francisco*.
- Case, David A., Cheatham, Darden, Gohlke, Luo, Merz, Onufriev, Simmerling, Wang, & Woods. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1668–1688.
- Chang, & Ren. (2015). Biodegradation of three tetracyclines in river sediment. *Ecological Engineering*, 75, 272–277.
- Daghrir, & Drogui. (2013). Tetracycline antibiotics in the environment: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 11(3), 209–227.
- De Cazes, Belleville, Petit, Llorca, Rodriguez-Mozaz, De Gunzburg, Barceló, & Sanchez-Marcano. (2014). Design and optimization of an enzymatic membrane reactor for tetracycline degradation. *Catalysis Today*, 236, 146–152.
- Ding, Wu, Zou, Lou, Zhang, Zhong, Lu, & Dai. (2016). Simultaneous removal and degradation characteristics of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics by laccase-mediated oxidation coupled with soil adsorption. *Journal of Hazardous Materials*, 307, 350–358.
- Eisenberg, Lothy, & Bowie. (1997). VERIFY3D : Assessment of Protein Models with Three-

- Dimensional Profiles. *Methods in enzymology*, 277, 396–404.
- Enguita, Marçal, Martins, Grenha, Henriques, Lindley, & Carrondo. (2004). Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry*, 279(22), 23472–23476.
- Essmann, Perera, Berkowitz, Darden, Lee, & Pedersen. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(1995), 8577–8593.
- Eswar, Eramian, Webb, Shen, & Sali. (2008). Protein structure modeling with MODELLER. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 426, 145–159.
- Feng, Chen, Maddula, Akcan, Oughtred, Berman, & Westbrook. (2004). Ligand Depot: A data warehouse for ligands bound to macromolecules. *Bioinformatics*.
- Galli, Madzak, Vadalà, Jolival, & Gentili. (2013). Concerted electron/proton transfer mechanism in the oxidation of phenols by laccase. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 14(18), 2500–2505.
- Goujon, McWilliam, Li, Valentin, Squizzato, Paern, & Lopez. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL. 2), 695–699.
- Halling-Sørensen, G. Sengel. (2002). Toxicity of Tetracyclines and Tetracycline Degradation Products to Environmentally Relevant Bacteria, Including Selected Tetracycline-Resistant Bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(3), 263–271.
- Hu, Farrokhnia, Heimdal, Shleev, Rulíšek, & Ryde. (2011). Reorganization energy for internal electron transfer in multicopper oxidases. *The journal of physical chemistry. B*, 115(45), 13111–13126.
- Huang, Zoppellaro, & Sakurai. (1999). Spectroscopic and Kinetic Studies on the Oxygen-centered Radical Formed during the Four-electron Reduction Process of Dioxygen by *Rhus vernicifera* Laccase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), 32718–32724.
- Humphrey, Dalke, & Schulten. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*.
- Jordá, Martín, Gómez, Reina, Sánchez, López, & Pérez. (2011). Economic evaluation of the photo-Fenton process. Mineralization level and reaction time: The keys for increasing plant efficiency. *Journal of Hazardous Materials*.
- Joss, Zabczynski, Göbel, Hoffmann, Löffler, McArdell, Ternes, Thomsen, & Siegrist. (2006). Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Research*.
- Kallio, Auer, Jänis, Andberg, Kruus, Rouvinen, Koivula, & Hakulinen. (2009). Structure-function studies of a *Melanocarpus albomyces* laccase suggest a pathway for oxidation of phenolic compounds. *Journal of molecular biology*, 392(4), 895–909.
- Karthikeyan, & Meyer. (2006). Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA, 361, 196–207.
- Kelly, Mezulis, Yates, Wass, & Sternberg. (2015). The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858.
- Kim, S., Warburton, Boldogh, Svensson, Pon, d'Anjou, Stadheim, & Choi. (2013).

- Regulation of alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter and peroxisome biogenesis in different fermentation processes in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, *166*(4), 174–181.
- Kim, T. H., Kim, Kim, Lim, Lee, & Yu. (2012). Degradation and toxicity assessment of sulfamethoxazole and chlortetracycline using electron beam, ozone and UV. *Journal of Hazardous Materials*.
- Kittl, Gonaus, Pillei, Haltrich, & Ludwig. (2012). Constitutive expression of *Botrytis aclada* laccase in *Pichia pastoris*, *3*(4), 232–235.
- Kittl, Mueangtoom, Gonaus, Khazaneh, Sygmund, Haltrich, & Ludwig. (2012). A chloride tolerant laccase from the plant pathogen ascomycete *Botrytis aclada* expressed at high levels in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, *157*(2), 304–314.
- Larkin, Blackshields, Brown, Chenna, Mcgettigan, McWilliam, Valentin, Wallace, Wilm, Lopez, Thompson, Gibson, & Higgins. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, *23*(21), 2947–2948.
- Li, Zhang, Liu, Yue, Lu, Qiu, Gao, Gao, Wu, Wang, Huang, Ph, & Zhang. (2012). In Vitro Kinetic Evaluation of the Free Radical Scavenging Ability of Propofol, (June).
- Liu, Xie, & Wang. (2016). Crystal structure of CotA laccase complexed with 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) at a novel binding site, 328–335.
- Llorca, Rodríguez-Mozaz, Couillerot, Panigoni, de Gunzburg, Bayer, Czaja, & Barceló. (2015). Identification of new transformation products during enzymatic treatment of tetracycline and erythromycin antibiotics at laboratory scale by an on-line turbulent flow liquid-chromatography coupled to a high resolution mass spectrometer LTQ-Orbitrap. *Chemosphere*, *119*, 90–98.
- Madhavi, & Lele. (2009). Laccase: properties and applications, *4*(Thurston 1994), 1694–1717.
- Maier, Martinez, Kasavajhala, Wickstrom, Hauser, & Simmerling. (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *11*(8), 3696–3713.
- Malintan, & Mohd. (2006). Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*.
- McWilliam, Li, Uludag, Squizzato, Park, Buso, Cowley, & Lopez. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research*, *41*(Web Server issue), 597–600.
- Michael, Hapeshi, Michael, Varela, Kyriakou, Manaia, & Fatta-Kassinos. (2012). Solar photo-Fenton process on the abatement of antibiotics at a pilot scale: Degradation kinetics, ecotoxicity and phytotoxicity assessment and removal of antibiotic resistant enterococci. *Water Research*.
- Miller, McGee, Swails, Homeyer, Gohlke, & Roitberg. (2012). MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation*.
- Morris, Huey, Lindstrom, Sanner, Belew, Goodsell, & Olson. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of*

- computational chemistry*, 30(16), 2785–2791.
- Ng, & Linder. (2003). HPLC separation of tetracycline analogues: Comparison study of laser-based polarimetric detection with UV detection. *Journal of Chromatographic Science*, 41(9), 460–466.
- O’Neill. (2014). Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations, 2014. *Review on Antimicrobial Resistance*, 4(December), 1–16.
- Pettersen, Goddard, Huang, Couch, Greenblatt, Meng, & Ferrin. (2004). UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J Comput Chem*.
- Rivera-Hoyos, Morales-Álvarez, Poutou-Piñales, Pedroza-Rodríguez, Rodríguez-Vázquez, & Delgado-Boada. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, 27(3–4), 67–82.
- Roberts, Eargle, Wright, & Luthey-Schulten. (2006). MultiSeq: Unifying sequence and structure data for evolutionary analysis. *BMC Bioinformatics*.
- Roe, & Cheatham. (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of Chemical Theory and Computation*.
- Shi, Ma, Han, Zhang, & Yu. (2014). Removal of sulfonamide antibiotics by oriented immobilized laccase on Fe₃O₄ nanoparticles with natural mediators. *Journal of Hazardous Materials*, 279, 203–211.
- Suda, Hata, Kawai, Okamura, & Nishida. (2012). Treatment of tetracycline antibiotics by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Bioresource Technology*, 103(1), 498–501.
- Tadesse, D’Annibale, Galli, Gentili, & Sergi. (2008). An assessment of the relative contributions of redox and steric issues to laccase specificity towards putative substrates. *Organic & biomolecular chemistry*, 6(5), 868–878.
- Taheran, Naghdi, Brar, Knystautas, Verma, & Surampalli. (2017). Degradation of chlortetracycline using immobilized laccase on Polyacrylonitrile-biochar composite nanofibrous membrane. *Science of The Total Environment*, 605, 315–321.
- Trott, & Olson. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*.
- Wang, Wang, Kollman, & Case. (2006). Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*.
- Wang, Wolf, Caldwell, Kollman, & Case. (2004). Development and testing of a general Amber force field. *Journal of Computational Chemistry*.
- Wen, Jia, & Li. (2010). Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1–3), 924–928.
- WHO. (2014). Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. *World Health Organization*, 61(3), 383–394.
- Xie, Liu, Liu, & Wang. (2015). Structural insight into the oxidation of sinapic acid by CotA laccase. *Journal of Structural Biology*, 190(2), 155–161.
- Yang, Lin, Yang, Ng, Ye, & Lin. (2016). Degradation of tetracycline by immobilized laccase

and the proposed transformation pathway. *Journal of Hazardous Materials*.
Yang, Xu, Yang, Ye, & Lin. (2015). Cross-linked enzyme aggregates of Cerrena laccase: Preparation, enhanced NaCl tolerance and decolorization of Remazol Brilliant Blue Reactive. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 65, 1–7.