

UCH-FC
Biotecnología
C.118
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE
PREGRADO

**"EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA LACCASA
DE *Trametes versicolor*"**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular por

JUAN CARLOS CÁCERES VERGARA

Director del Seminario de Título:
DR. RICARDO CABRERA PAUCAR
Co-Directora del Seminario de Título:
DRA. JENNIFER ALCAÍNO GORMAN

Junio, 2016

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por:

Juan Carlos Cáceres Vergara.

“EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA LACCASA DE *Trametes versicolor*”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Ricardo Cabrera Paucar
Director Seminario de Título

Handwritten signature of Ricardo Cabrera Paucar in blue ink over a horizontal line.

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman
Co-Directora Seminario de Título

Handwritten signature of Jennifer Alcaíno Gorman in blue ink over a horizontal line.



Comisión Revisora y Evaluadora

Victoria Guixé Leguía
Presidente Comisión:

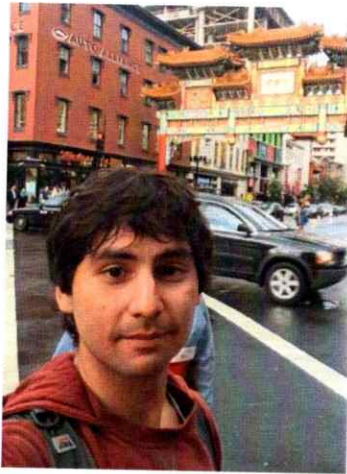
Handwritten signature of Victoria Guixé Leguía in blue ink over a horizontal line.

Dra. María Ines Becker
Evaluadora

Handwritten signature of María Ines Becker in blue ink over a horizontal line.

Santiago de Chile, Junio de 2016

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 estudié desde prekindergarten hasta 4° medio en el Colegio de la Salle.

Mi interés en la biología empezó cuando estaba en la enseñanza media y quería estudiar Medicina. Sin embargo, en el año 2009 rendí la PSU y finalmente entré a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile en el año 2010, donde me di cuenta que la investigación era lo que más me gustaba hacer, ya que se me permitió trabajar en laboratorios de investigación desde el principio.

Llegué al laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular en el año 2012 a trabajar con el Dr. Ricardo Cabrera en una unidad de investigación y fué donde encontré el gusto por la estructura de proteínas. Me licencié de la carrera en el año 2014 y desde entonces desarrollé mi tesis trabajando en los laboratorios de Bioquímica, en el Laboratorio de Genética y en el Centro de Bioinformática Integrativa de la Universidad Andrés Bello.

A comienzos del año 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.

A mis Padres,
Sin quienes no habría logrado nada.

Agradecimientos

Primero quiero agradecer a mi familia, quienes me han apoyado desde el principio a mi mamá por estar siempre preocupada de que todo me salga bien, y por haberme estimulado el gusto por la ciencia. A mi papá por recordarme que la contienda es desigual y que siempre puedo mejorar. A ambos por preocuparse de que nunca me falte nada. A la Tanny por dar siempre los mejores consejos, y por ser mi segunda mamá. Y al Felipe porque mas alla de las peleas siempre he sentido tu apoyo. A la tía Kika, a Mumito y al tío Luciano por los almuerzos del domingo.

También agradecer a mis tutores, al profe Ricardo por confiar en mi y darle alas a mis proyectos, mas alla de que no recuerdes mi nombre (no me llamo saltamontes) y a la profe Jenni por todo el apoyo, el tiempo, y por revisar mis escritos en tiempo record. A los chicos del lab de bioquímica, con especial cariño a Matu y sus eternas conversaciones en el lab, al Matt por ayudarme siempre y por su eterna paciencia. A Dixon, Fernanda y Edu por soportarme todos los días. A los mandriles, Mora, Felipe, Alonso y Gabo y también a la Ale y la Cote que hacen que en el lab me sienta como en mi casa. A los que ya no están en el lab Cotito, Daddy y el cochino Erick por su ayuda al principio de esta tesis. Tambien quiero agradecer a todo el lab de genética por recibirme y especialmente a la Meli y a la Dony, por la paciencia con que me enseñaron a trabajar con ADN. A los chicos de la UNAB y Daniel Aguayo por la ayuda en bioinformática.

Quiero agradecer a los biotec 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. Tambien a Pablo y a Santiago, por estar desde siempre.

Finalmente, al proyecto anillo ACT 1107 por el financiamiento y a la comisión por sus correcciones.

Índice de Contenidos

Biografía	ii
Agradecimientos	iii
Índice de Contenidos	v
Índice de tablas o cuadros	viii
Índice de figuras	ix
Lista de abreviaturas	xi
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Relación estructura-función de Laccasas	7
Sistemas de producción de Laccasa	12
Objetivo general:	18
Objetivos específicos	18
Materiales	19
Reactivos	19
La tabla 2 resume los insumos utilizados en este Seminario y su fabricante.....	19
Cepas	20
Partidores.....	20
Vectores.....	21

Métodos.....	25
Métodos de Microbiología y Biología Molecular.....	25
Medios de cultivo.....	25
Purificación de DNA plasmidial.....	26
Purificación de DNA de <i>S. cerevisiae</i> mediante ruptura mecánica.....	26
Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	27
Electrotransformación de <i>E. coli</i>	27
Electrotransformación de <i>S. cerevisiae</i>	28
Amplificación de DNA por PCR.....	29
Purificación de DNA desde geles de agarosa.....	29
Fosforilación de fragmentos de DNA.....	30
Relleno de extremos cohesivos y desfosforilación de fragmentos de DNA.....	30
Ligado de fragmentos de DNA.....	30
Expresión de Laccasa Recombinante.....	31
Optimización de medios de cultivo.....	31
Métodos de Bioquímica.....	32
Determinación de Actividad Laccasa.....	32
Determinación de la concentración de proteínas.....	34
Electroforesis de proteínas en condiciones denaturantes (SDS-PAGE).....	34
Concentración de proteínas por ultrafiltración.....	35
Precipitación de proteínas por Sulfato de Amonio.....	36

Cromatografía de interacción hidrofóbica en columna	36
Análisis estadístico	37
Métodos de Bioinformática	38
Modelamiento 3D.....	38
Simulaciones de Dinámica Molecular	39
Docking Molecular	40
Resultados.....	42
Cambio del marcador de selección, construcción de pYES2-Kan-Lcc α	43
Inserción del promotor fuerte TEF, construcción de pYES2-Kan-TEF-Lcca.....	48
Expresión de Laccasa	52
Expresión de Laccasa recombinante	52
Optimización de los medios de cultivo	54
Purificación parcial de Laccasa α mediante cromatografía en columna	57
Modelamiento del complejo Laccasa-ABTS	60
Discusión	69
Expresión de Laccasa α	69
Determinación de la actividad Laccasa	72
Purificación de Laccasa	73
Modelamiento del complejo Laccasa-ABTS	74
Conclusiones	79
Bibliografía.....	80

Índice de tablas o cuadros

Tabla 1 Expresión heteróloga de Laccasas de <i>T. versicolor</i>	17
Tabla 2 Insumos Utilizados.....	19
Tabla 3 Partidores.....	20
Tabla 4 Vectores.....	21
Tabla 5 Optimización de cultivos.....	56
Tabla 6 Etapas en el proceso de purificación.....	59
Tabla 7 Proteínas homologas a la Laccasa α de <i>T. versicolor</i> en el PDB.....	61
Tabla 8 Resultados del Docking de ABTS en el modelo de <i>Laccasa α de T. versicolor</i> y en el mutante <i>P394N</i>	66

Índice de figuras

Figura 1 Estructura y Funcion de Laccasas	6
Figura 2 Determinantes del potencial redox, efecto del residuo Pro394	12
Figura 3 Mapa de vectores	22
Figura 4 Mapa de vectores 2	23
Figura 5 Mapa de vectores 3	24
Figura 6 Titulación de ABTS oxidado	33
Figura 7 Construcción del vector pYES2-kan-Lcc α	43
Figura 8 Direccionalidad del casete de resistencia	44
Figura 9 Construcción del vector pYes2-kan-Lcc α	46
Figura 10 Construcción del vector pYES2-Kan-Lcc α	47
Figura 11 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con el vector pYes2-Kan-TEF	49
Figura 12 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con el vector pYES2-Kan-TEF-Lcc α	50
Figura 13 Construcción del vector pYes2-kan-TEF-Lcc α	51
Figura 14 Expresión en placa de Laccasa α	52
Figura 15 Curva de inducción de la expresión de Laccasa α	54
Figura 16 Purificación por cromatografía de interacción hidrofóbica en columna	58
Figura 17 Enriquecimiento de Laccasa α a partir de los sobrenadantes de cultivos de <i>S. cerevisiae</i>	60
Figura 18 Estructura de Laccasa α , PDBid (1GYC)	63
Figura 19 Simulación molecular de Laccasa α y de la mutante P394N	64

Figura 20 Distancia entre el atomo de cobre T1 y el carbonilo de la cadena principal del residuo 394 durante la simulación.....	65
Figura 21 Complejo Laccasa-ABTS generado por Qsite QPLD.....	68
Figura 22 Comparación entre el sitio activo de CotA de <i>B. subtilis</i> y del modelo de Laccasa α en complejo con ABTS.....	77

Lista de abreviaturas

Abs	Absorbancia
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
Amp	Ampicilina
BSA	Albumina de suero bovino
cDNA	DNA complementario
CV	Volumen de columna
DFT	Teoría de funcionales de densidad
Kan	Kanamicina
K_{cat}	Constante catalítica
kDa	kilo Dalton
K_m	Constante de Michaelis Menten
MM-GBSA	<i>Molecular mechanics - Generalized Born and surface area solvation analysis</i>
NMWL	Limite nominal de peso molecular
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
U	Unidades enzimáticas (μmol de sustrato/minuto)
WT	Tipo silvestre
ε	Coefficiente de extinción molar

Resumen

Las Laccasas son oxidasas multicobre de alto interés biotecnológico debido a su utilidad en una variedad de aplicaciones industriales. Sin embargo, aspectos importantes de su estructura y función, tales como el mecanismo de reacción, los determinantes del potencial redox del sitio de cobre o la interacción con distintos sustratos aún no se conocen a cabalidad. El estudio experimental de estos aspectos depende de contar primero con un sistema de expresión y purificación que permita altos rendimientos.

La Laccasa α del hongo *Trametes versicolor* tiene uno de los potenciales redox más altos reportados hasta la fecha y su estructura cristalográfica ha sido determinada, lo cual la convierte en un buen modelo para el estudio de la relación entre estructura y función de Laccasas. Sin embargo, estos estudios fueron realizados utilizando la enzima producida endógenamente por el hongo filamentosó, lo cual no permite su ingeniería. Debido a esto, en este trabajo se optimizó un sistema de expresión y purificación para esta enzima, el cual podrá ser usado en posteriores estudios de mutagénesis sitio dirigida.

Previamente un grupo alemán clonó el gen AY693776 que codifica para la Laccasa α de *T. versicolor*, en el vector pYES2, el cual permite la expresión de proteínas en *Saccharomyces cerevisiae* bajo el promotor *GAL1* y cuenta con el marcador de selección *URA3*. El gen cuenta con el factor α de *S. cerevisiae* el cual permite la exportación de la proteína al sobrenadante. Para permitir su uso en cepas que no necesariamente sean mutantes *ura3-*, utilizando técnicas de Biología Molecular

se sustituyó el marcador de selección del vector pYES2 por un marcador que confiere resistencia al antibiótico geneticina (G418). Se ha reportado que la producción de Laccasa bajo el promotor *GAL1* es baja, por lo que el vector fue modificado para la expresión del gen bajo el control del promotor *TEF1* de *S. cerevisiae*; sin embargo, las cepas transformantes no produjeron la enzima.

La cepa tipo S288c de *S. cerevisiae*, transformada con el vector pYES2 modificado para conferir resistencia a G418 y que tiene el gen de Laccasa α bajo el control del promotor *GAL1*, presenta bajos niveles de actividad Laccasa en el sobrenadante del medio de cultivo. La optimización de las condiciones de cultivo llevó a un aumento de la actividad total en el sobrenadante al disminuir la temperatura de inducción y agregar tampón fosfato a pH 5,0 al medio. La adición de otras fuentes de carbono como rafinosa, sacarosa y etanol, produjeron aumentos mayores de la actividad en el sobrenadante.

El sobrenadante de un cultivo inducido en las condiciones óptimas, fue concentrado por ultrafiltración y la proteína fue parcialmente purificada por cromatografía de interacción hidrofóbica en columna. Llegando a un enriquecimiento de la enzima de unas 485 veces con respecto a la actividad específica inicial.

Por otra parte, como herramienta teórica para proponer experimentos de mutagénesis sitio dirigida en la enzima expresada, también se construyó un modelo 3D de la estructura del complejo Lcc α -ABTS por medio de modelamiento por homología, simulación de dinámica molecular y *docking*. Utilizando este protocolo, se construyó un modelo del mutante P394N, que de acuerdo con información extraída de literatura, debiera exhibir un mayor potencial redox. El modelo fue usado para analizar los efectos de esta mutación sobre la unión del sustrato ABTS, modelada mediante *docking*.

Abstract

Laccases are multicopper oxidases of great biotechnological interest due to their utility in a variety of proposed industrial applications. However, important aspects of their structure, function, reaction mechanism, copper site redox potential structural determinants and its interaction with different substrates, are still not known. The experimental study of those aspects depends on having an efficient expression and purification system.

Laccase α from *Trametes versicolor* has one of the highest redox potentials reported to this date and its crystallographic structure has been determined. These features make this enzyme a good model to study the determinant aspects of the structure-function in Laccases. In this work, an expression and purification system for this enzyme was optimized, which will be useful for further site directed mutagenesis studies.

Previously, the gene AY693776 that encodes the Laccase α from *T. versicolor*, was cloned in the pYES2 vector, which has the *URA3* selection marker and allows protein expression under the control of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. In order to use the vector pYES2 in non *ura3*- mutant strains, the selection marker was modified by changing it for a geneticin (G418) resistance cassette. Low expression levels of Laccase under the GAL1 promoter have been reported, therefore the plasmid was also modified for the expression of genes under the control of the *TEF1* promoter from *S. cerevisiae*; however, the transformant strains were not able to produce the enzyme.

The *S. cerevisiae* S288c strain transformed with the pYES2 modified vector, which confers G418 resistance and contains the Laccase gene under the control of the GAL1 promoter, showed low levels of Laccase activity in the culture supernatants. However, the supernatant activity was enhanced by culture condition and induction optimization, best results were obtained when induction temperature was decreased to 20 °C and when phosphate buffer was added to the induction medium. A second carbon source to the medium as raffinose, sucrose or ethanol increases even more the supernatant activity.

The enzyme was concentrated from induced culture supernatants by ultrafiltration, and partially purified by hydrophobic interaction chromatography. By this way, a 485-fold increment in the specific activity was achieved.

As a tool for the proposal of site directed mutagenesis experiments, to be tested in the expressed enzyme, a 3D model of the Laccase-ABTS complex was built using molecular modelling, molecular dynamics simulation and Docking. Using this protocol, a 3D model for the mutant P394N was constructed, as this mutant should have a higher redox potential according to literature. The generated model was used to analyze the effects of this mutation in the laccase ABTS complex.

Introducción

Las Laccasas son enzimas Oxidasas multicobre (EC.1.10.3.2) que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos tanto fenoles como polifenoles, amino y metoxifenoles, además de otros compuestos no aromáticos y un alto número de compuestos xenobioticos, acoplada a la reducción de Oxígeno molecular hasta agua (Rivera-Hoyos y col., 2013; Rodgers y col., 2010).

Estas enzimas, se caracterizan por tener una alta promiscuidad por sustratos, lo que, asociado a su alta estabilidad extracelular, les ha dado gran importancia a nivel biotecnológico en un amplio y creciente rango de procesos industriales. Se ha propuesto su uso para blanqueamiento de efluentes de la industria textil (Mohorčič y col., 2006), eliminación de compuestos fenólicos responsables del oscurecimiento en jugos de frutas, cervezas y vinos (Minussi y col., 2002), blanqueamiento de pulpas de maderas (Widsten & Kandelbauer, 2008), síntesis de compuestos orgánicos como drogas y tintes (Forte y col., 2010; Nicotra y col., 2004), producción de polímeros (Gübitz & Paulo, 2003), diseño de biosensores (Gomes & Rebelo, 2003) y producción de energía en celdas bioelectroquímicas (Luo y col., 2010).

El conocimiento actual de estas enzimas deriva del análisis de alrededor de 100 enzimas provenientes del reino Fungi (Rodgers y col., 2010). Usualmente se trata de glicoproteínas extracelulares de peso molecular entre 50 y 140 KDa, con gran diversidad en el patrón de glicosilaciones (Claus, 2004). Estas enzimas están compuestas por tres dominios con topología de barril β (Figura 1). 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 y el cobre T2 es coordinado por el motivo restante, y un número de ligandos (entre 2 y 3) derivados de H_2O y O_2 , dependiendo del estado de oxidación de la enzima. En este sitio ocurre la reducción del O_2 a H_2O (Hu y col., 2011; Rivera-Hoyos y col., 2013).

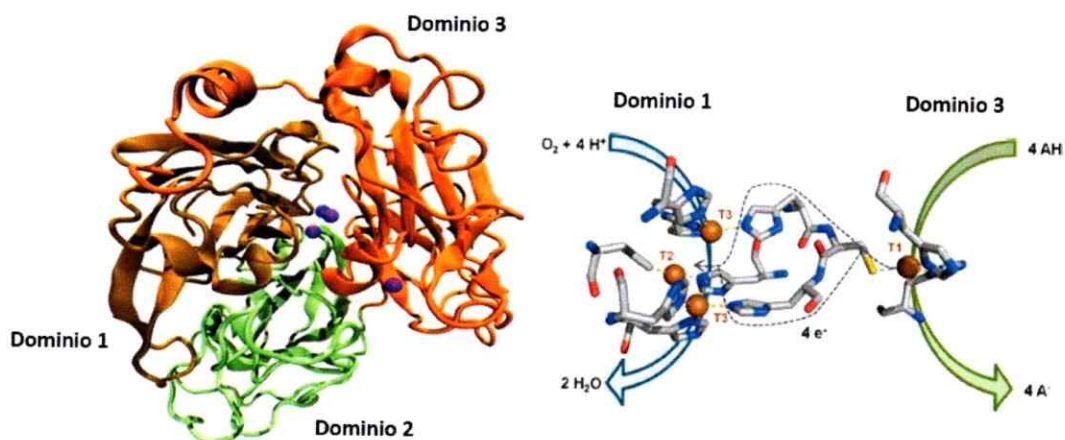


Figura 1 Estructura y Funcion de Laccasas

A la izquierda se muestra la estructura general de la enzima, representando su estructura secundaria. Se colorean los dominios 1, 2 y 3 en café, verde y naranja respectivamente, los átomos de cobre se representan de color morado. A la derecha se esquematizan los sitios de unión a cobre y la reacción que cataliza la enzima, mostrando esta vez los átomos de cobre en naranja (modificado de Pardo & Camarero, 2015b) donde se indica el camino propuesto para la transferencia de electrones por medio de una línea discontinua.

Existe gran interés en las Laccasas de organismos del reino Fungi, desde los cuales alrededor de 100 han sido purificadas y estudiadas (Rivera-Hoyos y col., 2013). Estas

enzimas presentan variabilidad no solo entre especies, sino también multiplicidad de genes en cada especie, encontrándose entre 1 y 17 genes de Laccasa en el genoma de cada especie (Kues & Ruhl, 2011). Además, se ha observado una alta variabilidad en el pH óptimo, punto isoeléctrico, potencial redox del sitio de cobre T1, K_m y k_{cat} de diferentes sustratos, así como en las condiciones y niveles en que son expresadas por estos organismos (Hoegger y col., 2006). Por estos motivos, no existe una Laccasa ideal para todos los propósitos y la posibilidad de diseñar Laccasas mejoradas para cada aplicación industrial es promisoria. No obstante, aún no se comprenden las características que determinan sus funciones biológicas (Rodgers y col., 2010) en parte porque no se ha logrado producir grandes cantidades de enzima de forma heteróloga (Rivera-Hoyos y col., 2013) para realizar estudios de la relación estructura-función. Debido a estas razones, el diseño racional de Laccasas para aplicaciones biotecnológicas ha demostrado no ser una tarea fácil.

Relación estructura-función de Laccasas

A pesar que se cuenta con gran cantidad de estructuras cristalográficas de estas enzimas en el PDB, la relación entre la estructura e importantes características funcionales como: el rol de diferentes patrones de glicosilación, el mecanismo por el cual el sitio activo reconoce diferentes sustratos, las características que afectan el potencial redox de la enzima, y como la enzima interacciona con inhibidores, aun no es conocido. El dilucidar estas incógnitas es de alta importancia debido a que entregaría herramientas para modificar tanto la K_m como la k_{cat} de estas enzimas para la oxidación de diferentes sustratos aumentando su potencial como herramienta biotecnológica.

La función natural de estas enzimas es la degradación de lignina, y compuestos fenólicos relacionados. Sin embargo, el potencial redox de esta enzima (≤ 0.8 V) no es

suficientemente alto como para oxidar gran parte de la lignina, cuyo potencial redox esta sobre los 1.3 V. Esta limitación puede ser sobrepasada por la producción endógena de mediadores redox, pequeñas moléculas capaces de expandir la actividad catalítica de estas enzimas a compuestos no fenólicos que forman parte de la lignina. Esto ha dado gran importancia tecnológica a moléculas sintéticas que pueden ser mediadores muy eficientes, tal como los sustratos artificiales ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonic acid), 2,6-DMP (2,6 dimetoxifenol) y SGZ (syringaldazine). No obstante, los determinantes de afinidad y especificidad de las Laccasas por estos sustratos son poco conocidos. Por ejemplo, los valores de K_m para ABTS en diferentes Laccasas varían en órdenes de magnitud (Dwivedi y col., 2011) sin que se conozcan las interacciones proteína-ligando que determinan esas diferencias.

A la fecha se han reportado pocas estructuras de Laccasas unidas a sustrato. Por ejemplo, a nuestro conocimiento la única estructura resuelta de un complejo Laccasa-ABTS es la de la bacteria *Bacillus subtilis* (PDBid 1UVW) (Enguita y col., 2004), la cual se ha utilizado para estudios que buscan reducir la K_m del sustrato ABTS a través de mutagénesis sitio dirigida y evolución dirigida (Gupta & Farinas, 2009). Aún más importante, a la fecha no existe una estructura de Laccasa proveniente de hongos en complejo con este sustrato. Más allá de eso, a partir de estudios de *docking* se propone que aunque los sitios de unión de las Laccasas de bacterias y hongos no serían conservados, la interacción entre ABTS y el sitio de unión sería similar, siendo importante que la distancia entre el N ϵ de la histidina que coordina al cobre y la región reactiva del sustrato sea la menor ya que a través de este residuo se transferirían los electrones entre el sustrato y el cobre T1 (Christensen & Kepp, 2014).

Por otra parte, existen estructuras de laccasas provenientes de hongos en complejo con otros sustratos, entre ellas la Laccasa de *Trametes versicolor* en complejo con el sustrato 2,5-xylydine (PDBId 1KYA) (Bertrand y col., 2002) y la Laccasa de *Trametes trogii* en presencia del sustrato p-toluato (Matera y col., 2008). Estos compuestos no presentan alto valor tecnológico, sino que provendrían de los cultivos de los hongos, ya que no se buscaba la cristalización en presencia de ellos. La Laccasa del hongo ascomicete *Melanocarpus albomyces* fue cristalizada en presencia del compuesto 2,6 DMP, el cual es un mediador de importancia biotecnológica (Kallio y col., 2009). En todas estas estructuras se observa que los sustratos se unen de forma similar al ABTS en la proteína de bacteria, cerca del sitio de unión del cobre T1, a una distancia que permite la transferencia de electrones con el Nε una de las histidinas que coordinan el cobre. Los diferentes sustratos se encuentran estabilizados por varios aminoácidos de tipo hidrofóbicos y algunos aromáticos, principalmente fenilalanina. Los sitios de Laccasa de hongos contienen más residuos aromáticos que los sitios que el sitio de bacteria que principalmente están compuestos por aminoácidos hidrofóbicos. Por todo esto, es necesaria la determinación de más estructuras de Laccasas en presencia de diferentes sustratos e inhibidores, o en su defecto el modelado y simulación de estos complejos. Este último aspecto fue el que se abordó en esta tesis.

Un alto potencial redox en estas enzimas es de gran interés debido a que ampliaría el rango de sustratos oxidables y estaría determinando el valor de la k_{cat} para la transferencia de electrones (Xu y col., 1996). Los potenciales redox más altos para el cobre T1 se han encontrado en enzimas provenientes de hongos, especialmente en la familia basidiomicetes, las cuales a pesar de presentar estructuras similares, muestran

variaciones significativas en su potencial redox con valores de entre 430 y 780 mV, contra un electrodo de Hidrogeno estándar (Shleev y col., 2005). Sin embargo, aún se desconocen los determinantes estructurales que causarían estas variaciones. La geometría de coordinación del cobre T1 es conservada en toda la familia de enzimas. Está coordinado por dos residuos de histidina y uno de cisteína y además dos residuos axiales hidrofóbicos se encuentran axiales a la coordinación, una isoleucina la cual es conservada y un residuo no conservado que puede ser fenilalanina, leucina o metionina (Rivera-Hoyos y col., 2013). El residuo axial variable se ha relacionado con el potencial redox de la enzima, siendo mayor en enzimas que presentan fenilalanina (Eggert y col., 1996).

Además, se han observado variaciones en el potencial redox que estarían determinadas por residuos no directamente involucrados en la coordinación del sitio de cobre. Esto último fue analizado por (Cambria y col., 2012) quienes compararon 4 estructuras de laccasas de hongos con potencial redox conocido y observaron algunos patrones que causarían que el sitio de cobre se vuelva más deficiente en electrones, desestabilizando los estados de oxidación mayores y aumentando el potencial redox. En las laccasas de alto potencial redox un factor importante podría ser la distancia de coordinación con una de las histidinas del sitio de Cu. Esta distancia es mayor en la Laccasa de *T versicolor* (PDBid 1GYC) por la presencia de un puente de hidrógeno entre S113 y E460, con E460 perteneciente a la misma hélice α en que se encuentra la histidina. Este puente de hidrogeno no ocurre en las laccasas de bajo potencial redox analizadas. Mas allá de ese puente, toda la red de puentes de hidrógeno en el sitio activo estaría conservada y modularía las distancias de coordinación y por lo tanto el potencial redox. La hidropatía del sitio

umentaría el potencial, al no restringir la interacción del agua con el metal, encontrándose sitios mas hidrofóbicos en enzimas de alto potencial redox. Otra característica sería la formación de interacciones de tipo π - π *stacking* con el anillo de imidazol de la histidina que coordina al metal, lo cual jugaría un rol importante en modular la transferencia de electrones en el sitio. Finalmente, el carbonilo de la cadena principal de una prolina conservada contribuiría con un par de electrones al sitio de cobre, estabilizando estados de oxidación altos y por lo tanto disminuyendo el potencial redox. Si la distancia entre ambos es mayor, como se observa en enzimas de alto potencial redox (figura 2) el sitio se haría mas deficiente en electrones. Sin embargo, este efecto no ha sido corroborado mediante mediciones del potencial redox en mutantes para este aminoácido. El mutar esa prolina por una asparagina (residuo que se encuentra en la enzima de alto potencial redox de *Rigidoporus lignosus*) se introduciría una cadena lateral polar en un sitio apolar relativamente expuesto a solvente. El consecuente incremento de la solvatación llevaría al carbonilo de la cadena principal a alejarse del sitio de cobre. Por esta razón en este trabajo se propone una mutante *in silico* para la enzima de *Trametes versicolor* de prolina por asparagina, y se analizó el efecto de esto sobre la unión por sustrato.

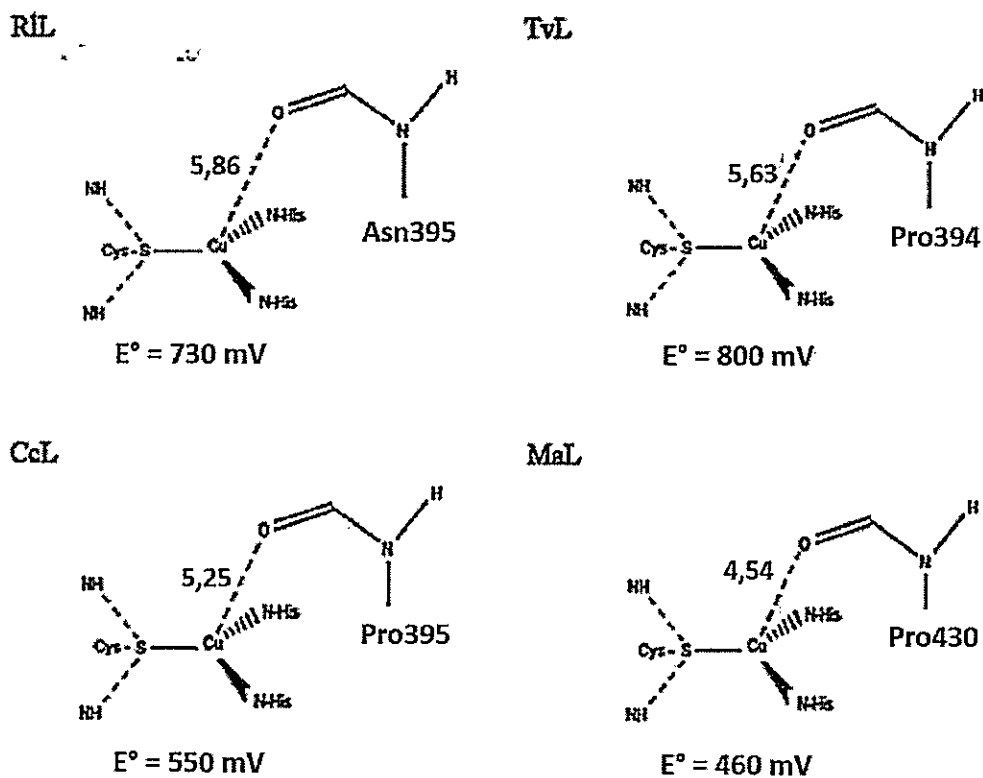


Figura 2 Determinantes del potencial redox, efecto del residuo Pro394

Representación esquemática de la interacción entre el cobre T1 y el carbonilo de la cadena principal de un aminoácido vecino, en las laccasas de RIL (*Rigidoporus lignosus*), TvL (*Trametes versicolor*), CcL (*Coprinus cinereus*) y MaL (*Melanocarpus albomyces*). Modificado de (Cambria y col., 2012).

Sistemas de producción de Laccasa

Generalmente la actividad Laccasa se ha expresado como U/L de cultivo (Pardo & Camarero, 2015b; Rivera-Hoyos y col., 2013). Esto probablemente se debe al enfoque ingenieril que se da a la producción de esta enzima, buscando una unidad que dé cuenta del costo (litros de cultivo necesarios) para producir cierta cantidad de



enzima (unidades de enzima) además, de ser un valor fácil de cuantificar. Sin embargo, este valor se ve afectado por los niveles de expresión, es decir por la cantidad de otras proteínas que se encuentren en el sobrenadante del cultivo, lo cual puede ser muy variable debido a las condiciones experimentales. A diferencia de la actividad específica, el dato de U/L es menos apropiado para comparar con resultados de distintos experimentos o diferentes laboratorios.

Componentes del medio de cultivo también podrían afectar la determinación de actividad Laccasa en el sobrenadante. Por ejemplo, en la expresión heteróloga de una Laccasa de *T. versicolor* en *Sacharomyces cerevisiae*, al precipitar las proteínas del sobrenadante de los medios de cultivo y dializarlas en tampón fosfato se encontró que la actividad total aumentó por la simple concentración de las proteínas. Los autores explican que esto se debería a la posible presencia de fuertes inhibidores de la enzima en el cultivo (Necochea y col., 2005b). Por otra parte, aminoácidos que se encuentran suplementados en los medios de cultivo como cisteína, tirosina, triptófano, histidina y cistina, pueden reaccionar con la forma oxidada del sustrato ABTS y reducirlo (Aliaga & Lissi, 2000), disminuyendo la actividad enzimática observada. Por todo esto es importante ser cuidadoso al comparar los diferentes resultados reportados en literatura.

Para hacer posibles las aplicaciones industriales y estudios estructurales, es necesario lograr una alta producción de enzimas tanto activas como estables. La producción de Laccasas desde el organismo original es baja (Mate & Alcalde, 2014), lo cual se ha intentado optimizar modificando el medio y condiciones de cultivo. Se ha logrado aumentar los niveles de expresión de Laccasa en *T. versicolor* desde 1.000 U/L hasta alrededor de 2.500 U/L (oxidación del sustrato ABTS) mediante la adición de diferentes sustratos (1-hydroxybenzotriazole y 2,5-xylidine) o el aumento de la

concentración de cobre en el medio (Collins & Dobson, 1997). Se observó el mismo efecto al agregar los sustratos guaicol y ácido p-coumarico al cultivo, aumentando la actividad en alrededor de 253 veces. Sin embargo, en este último caso se midió la oxidación de 2,6-dimethoxyphenol (Terrón y col., 2004). También se ha reportado que la adición de etanol en medios de cultivos de *T. versicolor* aumenta la producción de Laccasa alrededor de 20 veces (110 U/L a 2.600 U/L) (Lee y col., 1999).

A pesar de las mejoras obtenidas, no es probable que se llegue a masificar la producción de Laccasa desde el organismo nativo. Las aplicaciones industriales para estas enzimas requieren producciones altas y de enzimas modificadas para usos específicos, lo cual muy difícilmente se podrá lograr en los organismos nativos ya que por lo general la manipulación genética en ellos es difícil. Además, la presencia de multiplicidad de isoformas hace su purificación más compleja.

El uso de hospederos de fácil cultivo y manipulación genética da versatilidad y posibilidades de aumentar la producción de estas enzimas (Piscitelli y col., 2010). Se han realizado esfuerzos para expresar Laccasas de forma heteróloga en una serie de hospederos tanto procariontes como eucariontes. Se han producido Laccasas provenientes de bacterias en el hospedero *Escherichia coli*, entre las cuales se encuentran las de *Marinomonas mediterránea* (Sanchez-Amat y col., 2001), *Bacillus halodurans* que presenta actividad a pH básico (Ruijsenaars & Hartmans, 2004) y una Laccasa termostable de *Thermus thermophilus* (Miyazaki, 2005), entre otras. La Laccasa de *Bacillus subtilis* se expresó en *E. coli* y se caracterizó estructuralmente (Durão y col., 2008; Enguita y col., 2004). Enzimas provenientes de eucariotas también se han expresado en bacteria. Por ejemplo, la Laccasa del hongo lignolítico *Cyathus bulleri* fue la primera Laccasa de hongo en ser expresada en *E. coli* (Salony y col.,

2008). Sin embargo, en estos organismos la producción heteróloga de enzimas provenientes de hongos, las cuales tienen múltiples modificaciones postraduccionales es difícil y el interés por la producción de Laccasas provenientes de bacterias, no se ha masificado.

Las Laccasas de hongos de la clase basidiomicetes son las de mayor interés debido a los altos potenciales redox que presentan. Sin embargo, los organismos del reino Fungi más utilizados para la expresión heteróloga de proteínas pertenecen a la división de los ascomicetes. En estos últimos las Laccasas son de menor potencial redox (Mate & Alcalde, 2014) pero existe un mayor número de herramientas para su manipulación genética y optimización de producción de proteínas. Por otra parte, el patrón de glicosilaciones permitido por cada división del reino Fungi es diferente, encontrándose que, aunque tanto ascomicetes como basidiomicetes reconocen y glicosilan asparaginas cuando se encuentran en motivos N-X-S/T (X es cualquier aminoácido excepto prolina), el procesamiento posterior de estas es diferente. Además, en ascomicetes se forman glicanos de hasta 100 manosas, mientras que en basidiomicetes, estos glicanos no se conforman por más de 5 manosas (Berends y col., 2009). Si bien el rol de las glicosilaciones no ha sido determinado, si podría afectar parámetros cinéticos, la estabilidad y el pH óptimo de la enzima (Vite-Vallejo y col., 2009). Por lo tanto, la elección del organismo hospedero es importante ya que la enzima que se está produciendo podría resultar diferente a la enzima del organismo del que proviene.

Aun así, una gran variedad de Laccasas del reino Fungi han sido expresadas en levaduras ascomicetes debido a su facilidad de manipulación y a su capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales específicas de organismos eucariontes

como procesamiento proteolítico, formación de puentes disulfuro y glicosilaciones. Los organismos más utilizados como hospederos de Laccasas recombinantes han sido *S. cerevisiae* y *Pichia pastoris*, los cuales no presentan laccasas endógenas. En ellos se han expresado de forma exitosa Laccasas provenientes de hongos, bacterias y plantas (Piscitelli y col., 2010). Por ejemplo, se han caracterizado las Laccasas α , β , γ y δ de *T. versicolor* utilizando el vector pPICZA en *P. pastoris* donde el cDNA de estos genes quedó bajo el control del promotor AOX1 (Koschorreck y col., 2008). Los autores encontraron niveles diferenciales de expresión para las 4 Laccasas, los cuales también fueron diferentes dependiendo de la presencia de un péptido señal nativo o del factor α de *S. cerevisiae* como señales de exportación al sobrenadante. También, se optimizó la expresión usando distintas temperaturas durante la inducción y además usando biorreactores de tipo *fed batch* obteniendo niveles de expresión de los más altos informados (Tabla 1)

Para la expresión de proteínas en *S. cerevisiae* se ha usado ampliamente sistemas basados en promotores inducibles por galactosa, pero en estos casos se encontraron bajos niveles de expresión de Laccasa. Se ha reportado la expresión de 4 Laccasas de *T. versicolor* unidas al factor α de *S. cerevisiae* o al péptido señal nativo en *S. cerevisiae* (los autores no especifican la cepa) bajo el control del promotor GAL1 en un vector pYES2 (Koschorreck y col., 2008). Los autores comentaron que debido a los muy bajos niveles de expresión (los autores no muestran datos al respecto), debieron introducir estos genes en un vector de expresión en *P. pastoris* y expresarlos en ese organismo. También se ha expresado una Laccasa de *M. albomyces* en *S. cerevisiae* usando el vector pYES2, produciendo una actividad para la oxidación de ABTS de 0,6 U/L de cultivo en el sobrenadante (Kiliskinen & Saloheimo, 2004). Otros

autores expresaron 4 Laccasas de *T. versicolor* en la cepa INVSC1 (invitrogen) de *S cerevisiae* en el vector pYES2. En pocillos de 200. μ L lograron hacer evolución dirigida de la enzima para mejorar su actividad en líquidos iónicos como solvente, debido a que la enzima tiene aplicaciones que requieren su actividad en este tipo de medios (Liu y col., 2013). En este trabajo se utilizó el el gen de la Laccasa α de *T. versicolor*, donada amablemente por estos autores. Debido a los bajos niveles de expresión reportados, uno de los objetivos fue modificar el vector para obtener una mayor expresión, cambiando el promotor en el cual está basado.

Tabla 1 Expresión heteróloga de Laccasas de *T. versicolor*

Laccasa (código Genbank)	Hospedero	Actividad U/L	Referencia
		140.000,00	(Hong y col., 2002)
LCC1 (X84683.1)	<i>Pichia pastoris</i>	5.000,00	(Jönsson y col., 1997)
		25,00	(Soden y col., 2002)
LCC2 (Y18012.1)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,12	(Larsson y col., 2001)
LCCI (U44430)		39,00	(Gelo-Pujic y col., 1999)
LCCIV (U44431)	<i>Pichia pastoris</i>	150,00	(Brown y col., 2002)
LCC1 (X84683.1)	<i>Pichia methanolica</i>	9.800,00	(Guo y col., 2006)
LCCIIIb (AF414109)	<i>Yarrowia lipolytica</i>	230,00	(Jolivalt y col., 2005)
Lcc α (AY693776)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,04	(Necochea y col., 2005a)
LCC1 (no reportado)	<i>Pichia pastoris</i>	2,80	(Bohlin y col., 2006)
Gene IV (U44431)	<i>Aspergillus niger</i>	592,00	(Téllez-Jurado y col., 2006)
Lcc1 (AY693776)		820,00	
Lcc2 (Y18012)		3.400,00	(Koschorreck y col., 2008)
CVLG1 (D84235)	<i>Pichia pastoris</i>	1.280,00	
Lcc1 (X84683)		1.550,00	

TEF1 es un promotor fuerte el cual muestra una expresión continua y más fuerte que una serie de promotores basados en glucosa y que los promotores GAL1 y GAL10 (Partow y col., 2010). Además tiene la ventaja de permitir la expresión de proteínas en medios con glucosa como fuente de carbono en los cuales *S. cerevisiae* muestra mayores tasas de crecimiento (Partow y col., 2010). Esto unido al hecho de que el costo económico de la galactosa es considerablemente mayor al de la glucosa, en este trabajo se intentó utilizar este promotor en lugar del promotor GAL1 para lograr la expresión de Laccasa en *Saccharomyces cerevisiae*.

De acuerdo a los antecedentes expuestos los objetivos de este Seminario de Título fueron:

Objetivo general:

Expresión y purificación de la enzima Laccasa α de *T. versicolor* desde *Saccharomyces cerevisiae* y proposición de un modelo para su complejo con ABTS.

Objetivos específicos

- Expresar de forma heteróloga la Laccasa α de *T. versicolor* en *S. cerevisiae*.
- Optimizar los niveles de expresión de la Laccasa α de *T. versicolor* en *S. cerevisiae*.
- Purificar la Laccasa α de *T. versicolor* desde sobrenadantes de cultivos de *S. cerevisiae* por cromatografía de interacción hidrofóbica.
- Construir modelos 3D del complejo Laccasa – ABTS y del mutante P394N.

Materiales

Reactivos

La tabla 2 resume los insumos utilizados en este Seminario y su fabricante.

Tabla 2 Insumos Utilizados

Fabricante	Insumos
Agilent Technologies	<i>PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase</i>
Biolabs	Estándar de peso molecular
Biorad	Reactivo de Bradford
Calbiochem	SDS, Glicina
Corning	G418-sulfato
Difco	<i>Yeast nitrogen base w/o aminoacids</i>
GE Healthcare	<i>HiTrap Phenyl HP</i>
IDT	Oligonucleótidos
Invitrogen	Acrilamida, bis-acrilamida, 100 mM dNTP Set
Merck	Azul de Coomassie R-250, Persulfato de amonio, Bromuro de etidio, Peptona, Extracto de levadura, D-Sorbitol, Sulfato de Cobre, D-Glucosa, Glicerol, Cloruro de Potasio, Cloruro de Magnesio, Ioduro de Potasio, Dióxido de Silicio, Etanol, Fosfato de Sodio di básico, Fosfato de Sodio monobásico, Metanol, Ácido acético, Carbonato de Sodio, Cloruro de Sodio, Sulfato de Cobre, Agar-agar, Tris, EDTA, Fenol, Cloroformo, Alcohol Isoamilico.
Merck Millipore	Discos de ultrafiltración de celulosa regenerada, Amicon Ultra-4 10 Kda.
OMEGA Bio-tek	<i>E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit II</i>
Seakem	Agarosa
Sigma Aldrich	B-mercapto-etanol, BSA, D-Galactosa, ABTS, D-Sorbitol, Biotina, Laccasa de <i>T. versicolor</i> , Azul de bromofenol, Azul de comassie, Formaldehido, Tiosulfato de Sodio, Nitrato de Plata, Sulfato de Amonio, Perlas de vidrio 5 mm.
TCL	TEMED
Thermo Scientific	Enzimas de restricción, Marcadores de peso molecular <i>GeneRuler 1kb DNA Ladder</i> y <i>Lambda DNA/HindIII Marker</i> , <i>T4 kinase</i> , <i>Fast AP alkaline phosphatase</i> , <i>klenow fragment</i> , <i>DNA Gel Loading Dye (6X)</i> , <i>Taq DNA Polymerase</i> , <i>T4 DNA ligasa</i> , ATP.
US biological	Kanamicina, Ampicilina, <i>Drop-out Mix Complete w/o Yeast Nitrogen Base</i>

Cepas

Para la transformación y amplificación de plásmidos se usó la cepa de DH5 α de *E. coli* (*F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1endA1 hsdR17 (rkrk+) poa supE44 λ -thi-1gyrA96 relA1 tonA*) y para la expresión de proteínas, se usó la cepa S288c de *S. cerevisiae* (*MAT α SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6*).

Partidores

Los partidores diseñados y utilizados en este trabajo, se indican en la tabla 3, y se muestran los sitios en los cuales hibridan en las figuras 1, 2 y 3.

Tabla 3 Partidores

Nombre	Secuencia	Orientación
pT7	5' TAATACGACTCACTATA 3'	F
Kan	5' GACATGGAGGCCCGAGAATACC 3'	F
Kan 2	5' CAGTATAGCGACCAGCATTCA 3'	R
CYC-pYES2	5' GCAAATTAAGCCTTCGAGCGT 3'	R
T7 Lcc	5' TCACCCTTCTTACCGGTAATC 3'	R
pTef-Sc-fwd	5' CAGGCGCGTTGGACTTTTAAT 3'	F
pTef-SC-rv	5'GTGTTTCGCAAAGTTAACTTTGTAATTTAAA 3'	R
TEF lcc fw *	5' CAAACTAGTAACGGCCGCC 3'	F
Lcc fw *	5' TGTGATGGTTTGAGAGGTCCA 3'	F
Lcc rv 2 *	5' GCAGCAGTTGGAGTAGAAGC 3'	R
Lcc fw 2 *	5' GCTCCAGTTGCTGAACCTACTAC 3'	F
Lcc rv *	5'GCACCTGGAGCCAAAGCAGTAG 3'	R
Lcc fw 3 *	5' CTGATAACCCTGGTCCATGG 3'	F

* Marca aquellos partidores utilizados sólo para secuenciar.

Vectores

Los vectores utilizados y construidos en esta tesis se indican en la tabla 4 y sus mapas se muestran en las figuras 1, 2 y 3.

Tabla 4 Vectores

Nombre	Descripción	Referencia
pYES2	Vector de expresión inducible en <i>S. cerevisiae</i> . Marcador de selección en levaduras transformantes: URA3. Amp ^r Ori.	ATCC
pFA6	Vector que porta el casete de resistencia Kan ^R , el cual está formado por el gen Kan ^R bajo el promotor constitutivo TEF de <i>Ashbya gossypii</i> . Este casete confiere resistencia a kanamicina en <i>E. coli</i> , y a G418 en <i>S. cerevisiae</i> . Amp ^r Ori.	(Wach y col., 1994)
pYES2-Lccα	Vector pYES2 que porta entre los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> , el gen <i>Lccα</i> (Genbank: AY693776) que codifica para la proteína Laccasa α de <i>T. versicolor</i> unida al factor α de exportación de <i>S. cerevisiae</i> en su N-terminal.	(Liu y col., 2013)
pYES2-Kan	Vector pYES2 que porta el casete de resistencia Kan ^R entre los sitios de restricción <i>NheI</i> y <i>NcoI</i> . El gen <i>Ura3</i> fue interrumpido	Este seminario
pYES2-Kan-Lccα	Vector pYES2-Kan que porta, entre los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> , el gen <i>Lccα</i> extraído del vector pYES2-Lccα.	Este seminario
pYES2-Kan-TEF	Vector construido a partir del vector pYES2pYES2-Kan, en el cual el promotor <i>GAL</i> fue remplazado por el promotor <i>TEF</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	Este seminario
pYES2-Kan-TEF-Lccα	Vector pYES2-Kan-TEF que porta el gen <i>Lccα</i> entre los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i>	Este seminario

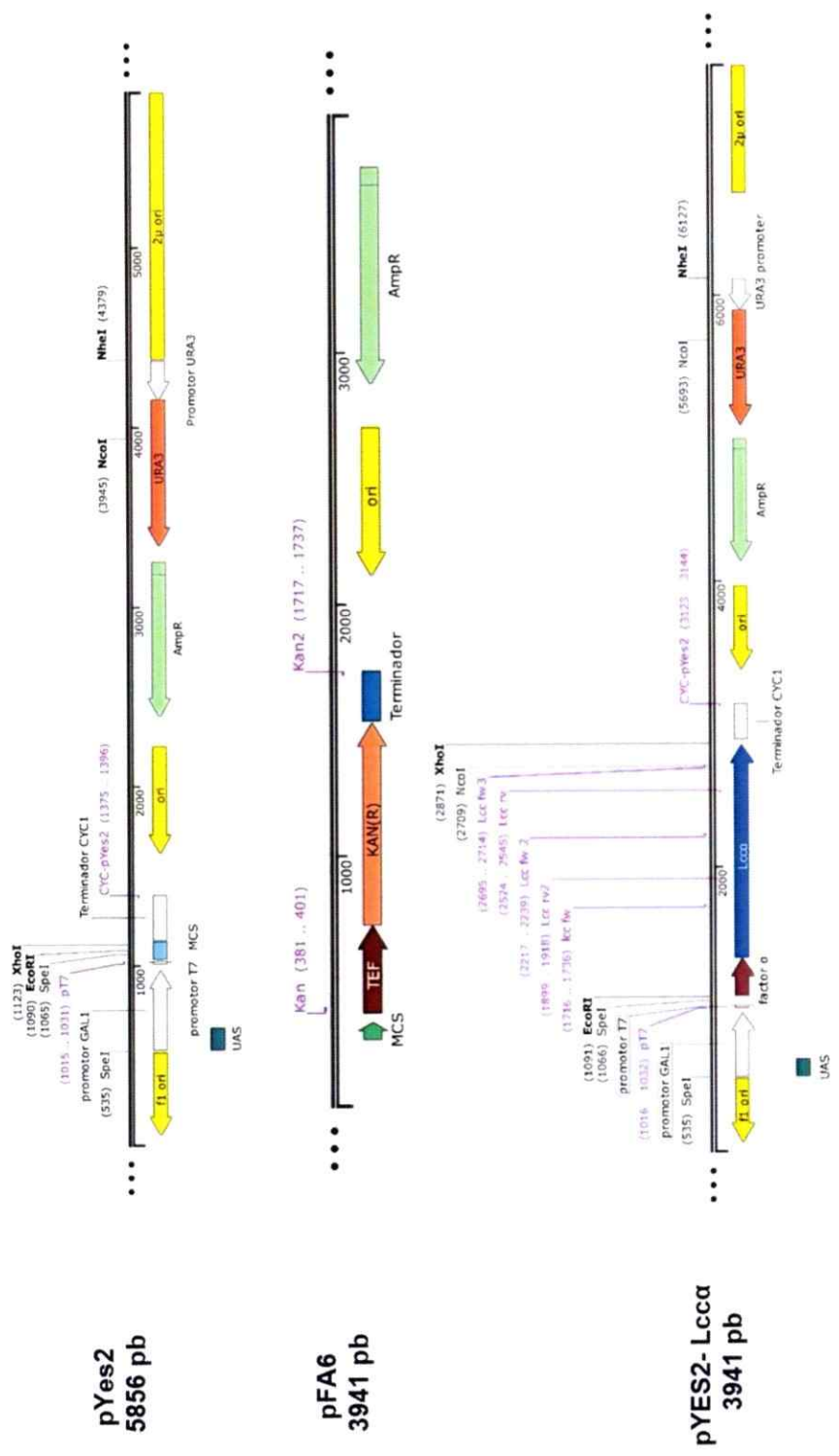


Figura 3 Mapa de Vectores Esquema de los vectores utilizados en esta tesis. Se denotan en color morado los partidores utilizados. Los sitios de restricción en color negro, en negrita si se trata de sitios de corte únicos.

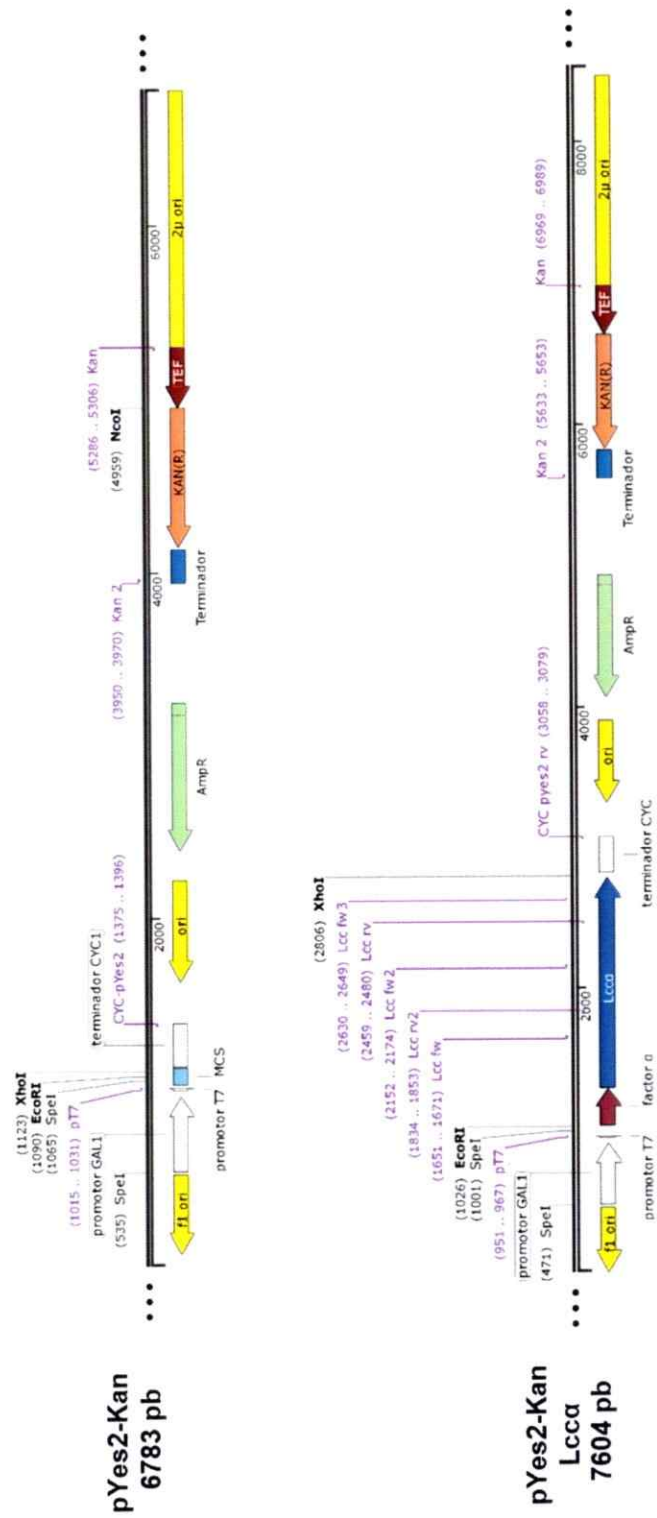


Figura 4 Mapa de Vectores 2 Esquema de los vectores construidos en esta tesis. Se denotan en color morado los partidores utilizados. Los sitios de restricción en color negro, en negrita si se trata de sitios de corte únicos.

Métodos

Métodos de Microbiología y Biología Molecular

Medios de cultivo

Medio LB: Se usó este medio para el crecimiento de cultivos de *E. coli*. Se compone de 1% p/v de peptona, 0.5% p/v de extracto de levadura y 0.5% p/v de Cloruro de Sodio. Para su preparación se usó agua desionizada y se esterilizó en autoclave.

Medio YEP: Se usó este medio para el crecimiento de cultivos de *S. cerevisiae*. Este 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.

Medio SD-glucosa: Este medio mínimo se utilizó para el crecimiento de *S. cerevisiae*. Se compone de 0,67% p/v de Yeast nitrogen base w/o aminoacids y 2% p/v de D-glucosa. Se preparó usando agua desionizada y se esterilizó en autoclave.

Medio SC-galactosa: Se utilizó este medio para la inducción de la expresión de proteínas en *S. cerevisiae*. Se compone de 0,67% p/v de Yeast nitrogen base w/o aminoacids, 2% p/v de D-galactosa. Se preparó el medio sin D-galactosa y aforó hasta un 80% del volumen total. Se esterilizó en autoclave y se agregó el resto del volumen total de una solución de D-Galactosa 10% p/v, 1% p/v de *Drop-out mix complete w/o Yeast Nitrogen Base* esterilizada por filtración. Además, se suplementó el medio con sulfato de cobre a una concentración final de 0,1 mM y G418 a una concentración de 150 µg/mL.

Medios sólidos: En el caso de prepararse medios sólidos 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 medio con los antibióticos Kanamicina, Ampicilina o G418 a concentraciones de 50, 100 o 150 µg/mL respectivamente. 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 100 mM.

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 I*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se determinó la absorbancia a 260 nm y 280 nm, de una dilución de las muestras, en cubetas de cuarzo. Con esto se estimó la pureza del DNA por medio de la relación Abs_{260}/abs_{280} , lo cual fue superior a 1.8, indicando un grado de pureza mayor a 95. Se calculó la concentración de DNA como:

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

Purificación de DNA de *S. cerevisiae* mediante ruptura mecánica

Para la purificación de DNA desde *S. cerevisiae* se tomó una colonia de interés, se sembró en una placa del medio correspondiente y se incubó a 30°C hasta el desarrollo de colonias. Con un asa estéril, se tomaron células desde la placa, se suspendieron en 600 µL de tampón TE (25 mM Tris, 10 mM EDTA), se adicionó 100 µL de microesferas de vidrio (0,5 mm de diámetro) y 600 µL de una solución de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico 25:24:1 (solución F:C:I). Las células se rompieron

mediante agitación en vortex a máxima velocidad por 10 min. Se centrifugó a 14.000 g por 10 min y se colectó la fase superior (alrededor de 600 μ L). A lo colectado se le adicionó un volumen (600 μ L) de solución F:C:I y luego se centrifugó a 14.000 g por 5 min. Se rescató la fase superior y a esta se le adicionó 200 μ L de una solución de cloroformo y alcohol isoamílico 24:1. Se centrifugó por 5 min a 14.000g y se colectó la fase superior. Se agregó 1 mL de etanol 100% v/v a -20°C y se incubó a esa temperatura por 3 h para precipitar el DNA. Se centrifugó por 5 min a 14.000 g y se descartó el sobrenadante. El precipitado, una vez seco, se suspendió en 100 μ L de agua nanopura estéril.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los geles se prepararon a una concentración de 0.8% p/v de agarosa en tampón TAE (Tris-HCL 40 mM, Ácido acético 20 mM y EDTA 1mM) y bromuro de etidio a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para cargar las muestras de DNA en el gel, éstas se mezclaron en una proporción de 5:1 con amortiguador de carga (DNA Gel Loading Dye (6X)). Se incluyó en uno de los carriles un marcador de peso molecular *GeneRuler 1kb DNA Ladder* o *Lambda DNA/HindIII Marker*. Las electroforesis se corrieron a voltaje constante de 80 V y el DNA se visualizó con un transiluminador UV.

Electrotransformación de *E. coli*.

Preparación de células electrocompetentes: Se cultivó *E. coli* en medio LB suplementado con 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido nalidíxico, a 37°C con agitación. Una vez que el cultivo alcanzó una DO_{600} de 0,7, se centrifugó a 5.500 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 g por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Las células se suspendieron en glicerol al 10% v/v y almacenaron a -80°C.

Electrotransformación: Se mezclaron 40 µL de células electrocompetentes con 4 µL de DNA plasmidial, obtenido por miniprep. 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 µF. 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 los antibióticos correspondientes. Las placas se incubaron durante una noche o hasta el desarrollo de colonias.

Electrotransformación de *S. cerevisiae*

Preparación de células electrocompetentes: Cultivos de una noche de 50 mL de *S. cerevisiae* en medio YEP se centrifugaron a 5.500 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 las células y se suspendieron en 800 µL de Sorbitol 1M a 4 °C. Las células electrocompetentes se transformaron inmediatamente.

Electrotransformación: Se mezclaron 40 µL de células electrocompetentes con 8 µL de DNA plasmidial en cubetas de electroporación de 2 mm. 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. Las células electroporadas se suspendieron en 1 mL de medio YEP y se incubaron a 30 °C durante 3 h. Las células se sembraron en placas YEP-agar suplementadas con 150 µg/mL de G418 y se incubaron a 30°C durante 3 días o hasta encontrarse colonias.

Amplificación de DNA por PCR

Para las reacciones de PCR se utilizó la enzima *Taq* DNA polimerasa o *Pfu* DNA polimerasa, en caso que el DNA amplificado fuera usado para ser clonado. Los volúmenes de reacción fueron de 25 μ L en amortiguador de PCR pH 8,4 (Tris HCL 200mM, KCL 500mM), 2mM MgCl₂, 0,2 mM de cada uno de los 4 deoxinucleotidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 2.5 μ M de cada partidor y 10 a 100 ng de DNA molde, o media colonia de *E. coli* o *S. cerevisiae*. Se utilizó una unidad de enzima por reacción. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystem 2720. Se mantuvo la temperatura a 94°C por 3 min (5 min en el caso de que el DNA molde proviniera de colonias), luego se realizaron 35 ciclos de tres temperaturas; 30 s de denaturación a 94°C, 30 s de alineamiento a 55°C y 3 min de extensión a 72°C. 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 en geles de agarosa.

Purificación de DNA desde geles de agarosa

Fragmentos de DNA separados por electroforesis en gel de agarosa se cortaron con un bisturí y luego se purificaron. Se disolvió el gel en una solución de ioduro de potasio 6 M incubando a 55°C por 10 min. Se adicionaron 10 μ L de Glassmilk (Dioxido 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 μ L de agua estéril. Se incubó a 55°C por 10 min, se centrifugó y recuperó el sobrenadante.

Fosforilación de fragmentos de DNA

Los productos de PCR que serían insertados en vectores cortados con enzimas de restricción de extremos romos fueron fosforilados. Para esto se incubó el producto de PCR con 10 U de la enzima T4 *kinasa* y ATP 2.5 mM a 37°C por 20 min, luego la reacción fue inactivada por 10 min a 75 °C.

Relleno de extremos cohesivos y desfosforilación de fragmentos de DNA

Los vectores que fueron digeridos con enzimas de restricción que dejan extremos cohesivos y que serían ligados a productos de PCR, se trataron para rellenar los extremos y luego fueron desfosforilados. El DNA digerido en el tampón de digestión se incubó con 1 U de la enzima *Klenow fragment* y 0,05 mM de cada uno de los 4 deoxinucleotidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) por 10 min a 37°C. La reacción se detuvo incubando por 10 min a 75°C. Luego, los fragmentos de extremos romos fueron desfosforilados con 1 U de *FastAP thermosensitive Alkaline phosphatase* por 10 min a 37°C. La reacción se detuvo incubando por 5 min a 75°C.

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 ligasa en tampón de reacción por entre 1 y 16 h a 22°C. La reacción se inactivó incubando a 75°C por 10 min. El producto de la ligación se dializó previo a ser electroporado en células electrocompetentes.

Expresión de Laccasa Recombinante

Se inoculó *S. cerevisiae* transformada con el vector pYES2-Kan-Lccα en 50 mL de medio SD-Glucosa suplementado con 150 µg/mL de G418. Se cultivó con agitación en matraces de vidrio a 30°C durante una noche o hasta alcanzar DO₆₀₀ mayor que 8.

La expresión de Laccasa fue inducida cambiando las células a medio SD-Galactosa. Para esto, el total de la masa celular se lavó con una solución 0.9% p/v de cloruro de sodio (NaCl) y luego se agregó 50 mL de medio SC-Galactosa. Se cultivó en matraces de vidrio con agitación a 30°C durante 5 días.

Se tomaron alícuotas de 1 mL de los cultivos cada 24 h. Se registró el crecimiento celular midiendo la DO₆₀₀. Luego las alícuotas se centrifugaron a 16.000 g por 10 min guardando el sobrenadante en el cual se determinó la actividad Laccasa y la concentración de proteínas.

Optimización de medios de cultivo

Para la optimización de los medios de cultivo, se realizaron varios cultivos por duplicados biológicos de 50 mL en matraces variando alguna condición del cultivo. Se midió la actividad Laccasa en el sobrenadante del cultivo al quinto día después de la inducción. Las variables estudiadas fueron la temperatura de inducción, la inclusión en el medio de inducción de tampón fosfato pH 5,0 a una concentración final de 100 mM, el efecto de la adición de 1% etanol, de 25 ng/mL de biotina y de 1% p/v D-rafinosa o de D-Sacarosa.

Métodos de Bioquímica

Determinación de Actividad Laccasa.

La actividad Laccasa fue determinada por la capacidad de los sobrenadantes de oxidar el sustrato ABTS. Este sustrato en su forma oxidada presenta un pico de absorbancia a 420 nm (Liu y col., 2013). El cambio en el espectro de absorbancia se registró en un espectrofotómetro Biotek Synergy 2 UV-visible en placas de 96 pocillos.

Los ensayos se realizaron a 25°C en volúmenes de reacción totales de 200 µL que contenían 60 µL del sobrenadante de los cultivos, 110 µL de tampón de actividad (0,05 M fosfato, pH 5,0) y 30 µL de ABTS (5mM). El sustrato se utilizó como gatillante 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 entre 5 min y 1 h. En caso de medirse actividad desde fracciones de una cromatografía en columna, se utilizaron 10 µL de la fracción y se aforó hasta 200 µL con agua nanopura.

Para determinar la concentración de ABTS oxidado, se determinó el coeficiente de extinción molar del ABTS oxidado en una solución similar a la de los ensayos. Para esto, distintas concentraciones de ABTS fueron totalmente oxidadas utilizando un exceso de extracto de Laccasa de *T. versicolor*. En pocillos de reacción de 200 µL totales, se agregaron entre 0 y 15 nmoles de ABTS, 60 µL de Laccasa (10 mg/mL en tampón de actividad) y se aforó hasta 200 µL con tampón de actividad. Se homogenizaron las muestras y se incubó por 10 min (hasta que la absorbancia se estabilizó). Se registró la absorbancia final. 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, con el cual se calculó el coeficiente de extinción molar.

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.

Se determinó el coeficiente de extinción molar del ABTS oxidado en los pocillos de reacción en tampón fosfato 50 mM a pH 5,0. Para esto se determinó la OD_{420} de distintas concentraciones de ABTS oxidado (**Figura 6**). Se obtuvo una relación que se ajustó a una ecuación lineal.

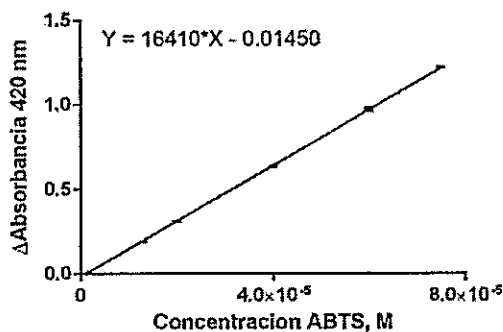


Figura 6 Titulación de ABTS oxidado

Absorbancia a 420nm de distintas concentraciones de ABTS oxidado. Este ensayo se hizo por triplicado, obteniendo valores de error estándar de 5.8×10^{-5} unidades de absorbancia (razón por la cual las líneas de error no se observan en el gráfico). Se hizo una regresión lineal con los datos, obteniendo un coeficiente de correlación r^2 de 0,994, se muestra la ecuación en el gráfico.

La pendiente de la absorbancia a 420 nm con respecto a la concentración Molar de ABTS es de la forma:

$$A = \epsilon C d$$

Donde A corresponde a la absorbancia, ϵ al coeficiente de extinción molar y d al paso óptico. Si se tiene un paso óptico de 0,52 cm, entonces el coeficiente de extinción molar corresponde a $31.557 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en las condiciones del ensayo.

En adelante, se definió una unidad de enzima como la cantidad de enzima necesaria para oxidar $1 \mu\text{mol}$ de ABTS por min de reacción, utilizando $31.557 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como ϵ para calcularlo, en condiciones de tampón fosfato 28 mM, pH 5,0 a 25°C .

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 y midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro Unicam UV2. Algunas determinaciones de concentración de proteínas se realizaron en placas de 96 pocillos en el espectrofotómetro Biotek Synergy 2 UV-visible, en reacciones de un volumen total de $200 \mu\text{L}$ de acuerdo a un método de Bradford modificado (Ernst & Zor, 2010), utilizando como estándar de concentración la proteína BSA.

Electroforesis de proteínas en condiciones denaturantes (SDS-PAGE)

El análisis de las masas moleculares de proteína de cada etapa de la purificación, se realizó mediante electroforesis en condiciones desnaturantes en una cámara vertical Mini PROTEAN® 3 cell (BioRad). Las muestras se mezclaron en

proporción 3:1 con un amortiguador de carga 4X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, glicerol 4 % v/v, SDS 8 % p/v, β -mercapto-etanol 2,8 mM y azul de bromofenol 4 %) y se calentaron a 100°C por 5 min.

Posteriormente, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 15 %. 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 amortiguador de corrida se utilizó Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 0,1 % p/v). Los geles se tiñeron con nitrato de plata para lo cual el gel se fijó en solución de fijado (Metanol 40% v/v, Formaldehido 0.02% v/v) por 10 min. Se lavó con agua nanopura 2 veces por 5 min. Luego se incubó en una solución de tiosulfato de sodio 0,2 g/L por 1 min y se lavó 2 veces con agua nanopura. Se incubó luego con una solución de nitrato de plata 0,01 M por 10 min lavando posteriormente 2 veces con agua nanopura y una vez con solución de tiosulfato de sodio 0,2 g/L. Finalmente, las bandas se tiñeron con solución de revelado (3% p/v de carbonato de sodio, 0.05% v/v de formaldehido). Una vez que se observaron las bandas, la reacción se detuvo con una solución de ácido acético al 5% v/v.

Concentración de proteínas por ultrafiltración

Los sobrenadantes de los cultivos con actividad Laccasa primero se clarificaron por centrifugación a 8.000 g por 10 min a 4°C y luego se filtraron con un filtro de 0,22 μ m. Las muestras se concentraron en un sistema Amicon model 402 de 350 mL con agitación. El sistema se mantuvo en hielo con una presión de nitrógeno de 50 psi y se utilizó un Disco de ultrafiltración de celulosa regenerada de 10 kDa NMWL. Una vez que el volumen se encontró bajo los 50 mL, se agregó tampón fosfato 0,05 M a pH 5,0

hasta llenar la cámara y se siguió concentrando. Este último paso se repitió dos veces de manera de cambiar la proteína al tampón de purificación.

Precipitación de proteínas por Sulfato de Amonio

El sobrenadante de un cultivo ya concentrado por ultrafiltración, se llevó a 1,6 M de sulfato de amonio, calculando la masa de sulfato de amonio necesaria con el servidor "Ammonium Sulfate Calculator" de Encor Biotechnology Inc (www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm). Se homogenizó gentilmente con agitación orbital a 4°C por 1 h. Se centrifugó a 16.000 g por 30 min a 4°C y se descartó el precipitado.

Cromatografía de interacción hidrofóbica en columna.

Las purificaciones por interacción hidrofóbica se realizaron en columnas *phenyl sepharose HP* de 5 mL, en un sistema de cromatografía automática *Akta prime plus*. La columna primero se equilibró con 10 CV de tampón fosfato 0,05 M, 1,6 M sulfato de amonio a pH 5 y una vez equilibrada, se inyectó la muestra en tampón de equilibrio. Se lavó la columna con 10 CV del tampón de equilibrio, se eluyó con un gradiente de sulfato de amonio de 7 CV y finalmente se lavó con 5 CV del tampón 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.

Análisis estadístico

Los valores de actividad enzimática y de concentración de proteínas fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism versión 6.01, con el cual se calcularon los promedios, varianzas y desviaciones estándar de los datos. Los test de ANOVA de una vía fueron realizados utilizando el mismo software con lo cual se obtuvieron los valores de F, el p-value y coeficiente R². Cuando se calculó la actividad específica los valores fueron divididos y la propagación del error se calculó con la siguiente fórmula:

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

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

Métodos de Bioinformática

Modelamiento 3D

Se construyeron modelos por homología de la enzima Laccasa α de *T. versicolor* deducida del gen *lcc1* (Genbank: AY693776) y el mutante P394N de la misma secuencia. Para esto se buscaron estructuras en la base de datos similares al producto génico de *lcc1* usando la herramienta Blastp (McWilliam y col., 2013). La secuencia aminoacídica deducida se alineó utilizando el programa clustalW2 (Goujon y col., 2010; Larkin y col., 2007; McWilliam y col., 2013) con la secuencia de la variante de esta enzima que ha sido cristalizada (PDBid 1GYC); ambas proteínas comparten un 98% de identidad de secuencias con una cobertura de un 100%. Para generar los modelos se utilizó el programa Modeller 9.14 (Eswar y col., 2008) utilizando la estructura con PDB id: 1GYC como molde con algunas modificaciones: se eliminaron las moléculas de agua no estructurales, la molécula de isopropil alcohol y las glicosilaciones N-acetyl-D-glucosamina. Los primeros 20 residuos, correspondientes a la secuencia de exportación WT, no fueron modelados. Se generaron 10 modelos utilizando el método de función objetivo variable, métodos de gradiente conjugado y simulaciones de dinámica molecular con alineamiento simulado. Los modelos generados se evaluaron con el programa VERIFY3D (Eisenberg y col., 1997) de acuerdo a su correspondencia entre secuencia y estructura 3D.

Los mejores modelos se optimizaron por medio de la herramienta *Protein Preparation Wizard* (Madhavi Sastry y col., 2013) de la suite maestro 9.4, con lo cual el orden de los enlaces fue reasignado, se agregaron átomos de hidrógenos y se crearon enlaces metálicos entre los aminoácidos H458, H395 y C453 y el átomo de cobre

CU503, en el sitio de cobre T1, y entre los residuos H64, H66, H109, H111, H398, H400, H452 y H454, y los átomos de cobre CU500, CU501 y CU502 del sitio trinuclear T2/T3. Se formaron enlaces disulfuro entre los residuos de C205 y C117, y C488 y C85. El estado de protonación de los residuos se optimizó a pH 5.0 por medio del software PROPKA (Olsson y col. 2011). Se asignó una carga de +2 a todos los átomos de cobre y el residuo D206 fue protonado.

Simulaciones de Dinámica Molecular

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular para el modelo tridimensional de la proteína Laccasa α . Para esto se preparó el sistema en el software Maestro 9.8 release 2014-2. Se utilizó la herramienta *system builder* para construir el sistema. La proteína preparada antes se ubicó en una caja ortorrómbica de solvente explícito TIP3P con una capa mínima de 15 Å a cada lado de la proteína y fue neutralizada reemplazando moléculas de agua al azar por 5 iones cloruro ubicados a al menos 5 Å de la proteína. Se realizaron simulaciones de dinámica molecular sobre el sistema bajo el campo de fuerza OPLS-2005 (Shivakumar y col., 2010). El sistema fue minimizado por el método de *Steepest decent*, con un gradiente de 1 kcal/mol Å. Seguido del protocolo por defecto de presimulación. Seguido de esto, se llevó a cabo una simulación de tipo NPT de 10 ns a 300 K y presión isobárica de 1,01325 bar. El paso de integración fue de 2 fs y las interacciones no enlazantes fueron calculadas en un rango de 9 Å. Para las interacciones de alto rango el modelo de Mesh-Ewald (Essmann y col., 1995) fue utilizado. Durante todo el procedimiento, tanto los átomos de cobre como sus ligando fueron fijados por medio de restricciones de posición. Se tomó la estructura de un *snapshot* representativo de un estado estable en la simulación y esta se utilizó en el siguiente paso.

Docking Molecular

El sustrato ABTS fue dibujado en Maestro 9.8 con forma plana, luego la geometría de la molécula fue minimizada por métodos de mecánica cuántica, optimizando geometría y cargas. Estos cálculos se realizaron usando DFT como esta implementado en Jaguar 7.9 con el funcional B3LYP con orbitales no restringidos y el *basis set* 6-31G. La conformación de mínima energía se utilizó para el modelamiento del complejo enzima sustrato.

El complejo enzima sustrato se modeló con la metodología de Docking. Para esto, al último *snapshot* de las simulaciones se le borraron las moléculas de agua y los iones Cl⁻. Se utilizó el programa Glide 5,8. El sistema fue preparado con la herramienta *grid generation* con una grilla de 30 Å centrada en el residuo H458. La molécula de ABTS previamente optimizada se posicionó por Docking usando la opción de *Xtra precision*, con la opción de flexibilidad para los anillos desactivada, sin embargo, el resto del ligando se mantuvo flexible. Las posiciones generadas fueron evaluadas por la función Emodel del programa Glide 5,8, ya que esta función da mayor importancia a componentes del campo de fuerza (electrostáticos y van der Waals) que los que se dan en la función GlideScore, la que la hace mejor para evaluar diferentes poses para un mismo ligando. La mejor posición se utilizó en el siguiente paso. Se hizo un nuevo *Docking*, usando como centro de la grilla la posición generada anteriormente. Se usó como tamaño de la grilla el sugerido de acuerdo al tamaño del ligando. Y se repitió el proceso.

A partir de esta posición se hizo un Docking cuántico (Qsite QPLD), las cargas para el ligando se calculan en fase gas, usando el programa Jaguar en el modo de mayor precisión, la base QM es 3-21g BLYP. Los demás parámetros se dejan por

default. La energía de unión para los complejos proteína-ABTS se calculó por medio de la función MM-GBSA de la suite maestro 9.8 ("Suite 2012: Glide, version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.", 2012). Se obtuvieron diferentes conformaciones por minimización de la proteína a 10 Å del sustrato, y se calculó la energía para estas conformaciones por medio de la función de *Generalized Born and surface area continuum solvation* (GBSA), utilizando las cargas para el sustrato antes calculadas, en este protocolo se llevan a cabo un número de minimizaciones para el receptor por sí solo, el ligando por sí sólo, el complejo receptor-ligando y cálculos de energía para el ligando extraído del complejo receptor ligando optimizado y del receptor extraído del mismo complejo.

Resultados

Construcción de vectores y transformación de *S. cerevisiae*

El gen que expresa la Laccasa α de *T. versicolor* clonado en un vector pYES2, fue amablemente donado por el Dr. Ulrich, de RWTH Aachen University, Alemania (Liu y col., 2013). En este vector, el gen de Laccasa α se encuentra en el sitio de múltiple clonamiento bajo el control del promotor inducible GAL1. Este promotor en presencia de glucosa se encuentra reprimido; sin embargo, en su ausencia y en presencia de D-galactosa, se activa permitiendo la expresión del gen río abajo. Sin embargo, el vector pYES2 tiene como marcador de selección en levaduras el gen *URA3*. Este método de selección no es compatible con las cepas disponibles en los laboratorios en que fue realizada esta tesis. Por otra parte, se ha descrito anteriormente que la expresión heteróloga de Laccasa en *S. cerevisiae* mediante el uso del vector pYES2 es muy baja.

Por estas razones el vector original se modificó para expresar la Laccasa α en la cepa S288c de *S. cerevisiae*. Para ello se adoptaron dos estrategias: Por una parte, se modificó el marcador de selección en levaduras, cambiándolo por el gen de resistencia a geneticina (G418), el cual a su vez confiere resistencia a kanamicina en *E. coli*. Y, por otra parte, para aumentar los niveles de expresión, el promotor GAL1 fue escindido del vector y en su sitio se insertó el promotor TEF de *S. cerevisiae*. A continuación, se detalla la implementación de estas modificaciones.

Cambio del marcador de selección, construcción de pYES2-Kan-Lcc α

El vector pYES2 fue digerido con las enzimas de restricción *NheI* y *NcoI* escindiendo parte del gen *URA3*. Por su parte, el gen que codifica la resistencia a G418 se amplificó por PCR desde el plasmidio pFA6 usando los partidores Kan y Kan2 (ver **Tabla 3 Partidores**). A continuación, se ligaron el vector digerido y el producto de PCR. El producto de ligación se usó para transformar células de *E. coli*, las que luego se sembraron en placas de medio LB suplementadas con ampicilina.

Debido a que el gen de resistencia a G418 en *S. cerevisiae*, confiere resistencia a kanamicina en *E. coli*, 50 colonias seleccionadas al azar se sembraron en placas de medio LB-Kanamicina. Aquellas colonias que presentaban ambas resistencias fueron evaluadas por PCR usando los partidores kan y kan2. En la (**Figura 7**, carril 5) se muestra el producto de PCR amplificado desde el DNA plasmidial purificado desde una de estas colonias.

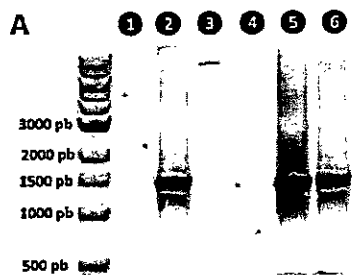


Figura 7 Construcción del vector pYES2-kan-Lcc α .

Amplificación por PCR de las regiones del gen de resistencia a Kanamicina/G418 (1357 pb) de los plasmidios construidos. Los plasmidios se cargaron en el orden: 1 control negativo (sin DNA templado) 2 pFA6 3 pYES2 4 pYES2-Lcc α 5 pYES2-Kan 6 pYES2-Kan-Lcc α .

Como el ligado se realizó con extremos romos, el fragmento pudo quedar orientado en dos direcciones. En el caso que la construcción se haya ligado con el promotor distal al origen de replicación 2μ , el sitio de corte *NcoI* se reformaría, pero en caso contrario, solo se encontraría un sitio de corte *NcoI* en medio del casete de resistencia. Para conocer la direccionalidad en que se insertó el gen de resistencia, se digirió el plasmidio con las enzimas *NcoI* y *NheI* (**Figura 8**), dando como resultado un solo sitio de corte en el plasmidio. El DNA plasmidial se usó para transformar células de *S. cerevisiae*, las cuales se sembraron en medio YEP G418 para ser usadas como control negativo de expresión.

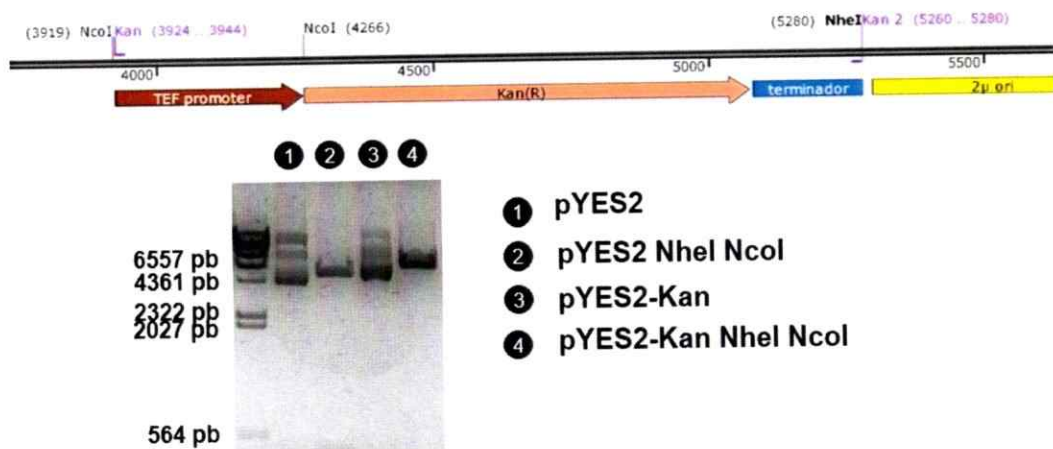


Figura 8 Direccionalidad del casete de resistencia

Arriba se muestra el mapa del vector pYES2-Kan alternativo, en el cual se marcan los sitios de corte *NheI* y *NcoI* que flanquean al casete de resistencia. Abajo el resultado de la digestión de los vectores pYES2 y pYES2-Kan con las enzimas de restricción *NheI* y *NcoI*, mostrando el linearizado del segundo plasmidio

Luego, el gen que expresa la Laccasa α de *T. versicolor* se ligó al vector pYES2-Kan.construido. Para esto, tanto el vector pYES2-Kan como el vector pYES2-Lcc α , se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. En el caso de pYES2-Kan, se abrió el vector en el sitio de múltiple clonamiento y en el caso de pYES2-Lcc α , se liberó el gen que codifica a la enzima. Ambos fragmentos se ligaron para transformar células de *E. coli*, que luego se sembraron en placas de medio LB suplementadas con kanamicina. Las colonias transformantes se evaluaron por PCR de colonias con los partidores pT7 y CYC-pYES2, siendo positivas aquellas que presentaban un producto de PCR de 2.129 pb (**Figura 9**, carril 6 muestra el amplificado usando como templado el plasmidio purificado de una colonia positiva). El inserto de un plásmido pYES2-Kan-Lcc α de una colonia positiva, se secuenció completamente sin encontrar mutaciones (**Figura 9 B**). El DNA plasmidial fue electrotransformado en células de *S. cerevisiae* electrocompetentes, las cuales fueron sembradas en placas YEP-agar suplementadas con G418. Se esquematiza la construcción de estos vectores en la **Figura 10**.

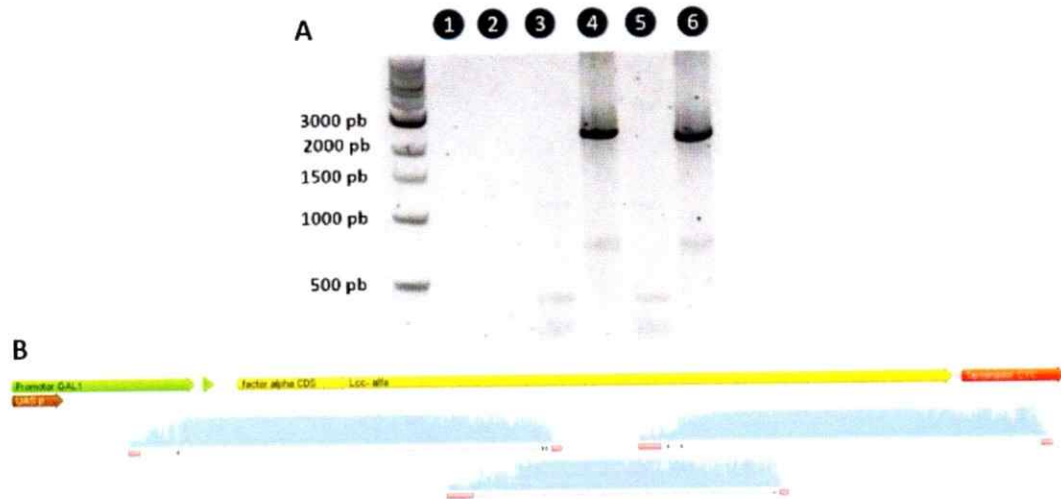


Figura 9 Construcción del vector pYes2-kan-Lcc α .

A Amplificación por PCR de la región inserta entre el promotor t7 y el terminador CYC (2129 pb para el gen Lcc α y 382 pb para el vector sin inserto). Los plasmidios se cargaron en el orden: **1** control negativo (sin DNA templado) **2** pFA6 **3** pYES2 **4** pYES2-Lcc α **5** pYES2-Kan **6** pYES2-Kan-Lcc α . **B** Cobertura de la secuenciación del vector pYes2-Kan-Lcc α , no se encontró ninguna mutación, en la región secuenciada.

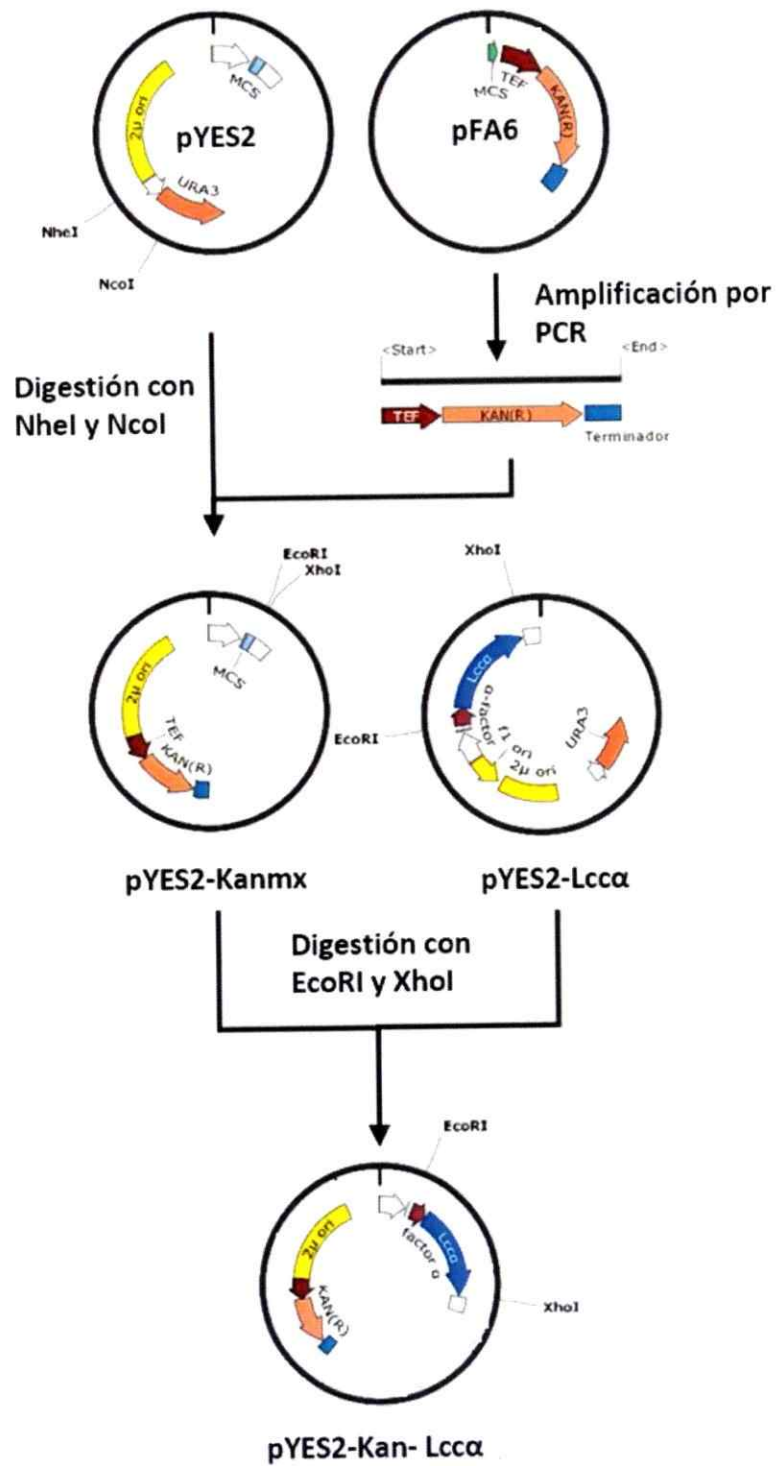


Figura 10 Construcción del vector pYES2-Kan-Lcc α

Inserción del promotor fuerte TEF, construcción de pYES2-Kan-TEF-

Lcca

Para esta modificación del vector pYES2, primero se construyó el vector pYES2-Kan-TEF, para lo cual se amplificó el promotor TEF1 desde el genoma de *S. cerevisiae* por medio de PCR con los partidores pTEF-SC y pTEF-SC2 (ver **Tabla 3 Partidores**), usando como molde una colonia de la levadura obteniendo un producto de PCR único de 500 pb. Por su parte, el vector pYES2-Kan se digirió con la enzima de restricción *SpeI*, la cual escinde el promotor GAL1 del vector. Luego, el producto de PCR y el vector se ligaron, se transformó *E. coli* y los transformantes se seleccionaron en placas LB-agar suplementadas con kanamicina. De las colonias transformantes, 50 fueron seleccionadas al azar y analizadas por PCR con los partidores pTEF SC y pYES2 CYC (ver **Tabla 3 Partidores**), detectándose un amplificado de 825 pb (**Figura 11**, carril 7 muestra el amplificado usando como templado el plasmidio purificado de una colonia positiva). El DNA plasmidial pYES2-Kan-TEF purificado desde una de las colonias positivas se transformó en células de *S. cerevisiae* que luego se sembraron en placas YEP-agar suplementadas con G418. Se purificó DNA total de las colonias transformantes y éste se analizó por PCR utilizando los partidores pTEF-SC fw y pYES2-CYC (ver **Tabla 3 Partidores**) detectándose un fragmento de DNA amplificado de 825 pb (**Figura 11**, carriles 2 al 6) como era esperado. Estas células fueron utilizadas como control negativo de expresión.

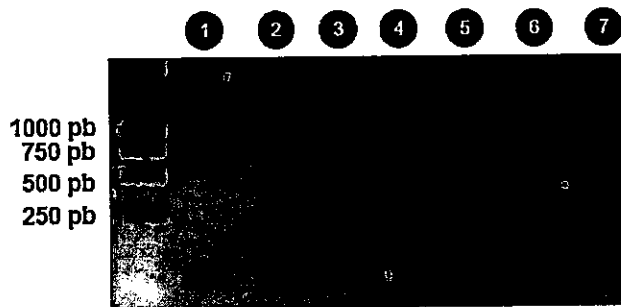


Figura 11 Transformación de *S. cerevisiae* con el vector pYes2-Kan-TEF

Amplificación por PCR de la región comprendida entre el promotor TEF y el terminador CYC, con los partidores pTEF SC y pYES2 CYC. El gel fue cargado de acuerdo al DNA que fue utilizado como templado: en el carril 1 se utilizó DNA extraído de *S. cerevisiae* sin transformar. En los carriles 2 al 6 se utilizó DNA extraído de 5 colonias de *S. cerevisiae* transformadas con el vector pYES2-Kan-TEF, seleccionadas al azar. En el carril 7 se utilizó el DNA plasmidial pYES2-Kan-TEF purificado, con el cual fueron transformadas las levaduras.

El gen que expresa la Laccasa α de *T. versicolor* fue ligado en el vector pYES2-Kan-TEF recién construido, para construir el vector pYES2-Kan-TEF-Lcc α . Para esto, tanto el vector pYES2-Kan-TEF como el vector pYES2-Lcc α fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. En el caso de pYES2-Kan-TEF, el vector se abrió en el sitio de múltiple clonamiento y en el caso de pYES2-Lcc α , se liberó el fragmento que contiene el gen que codifica la Enzima. Los productos de ambas reacciones de digestión se ligaron y se transformó células de *E. coli* que luego se sembraron en placas de medio LB-agar suplementadas con Kanamicina. Las colonias transformantes se evaluaron por PCR de colonias con los partidores pTEF-SC y CYC-pYES2 (ver **Tabla 3 Partidores**), siendo positivas aquellas que presentaron un producto de PCR de 2.570 pb (**Figura 12**, carril 2 muestra el amplificado usando como templado el plasmidio purificado de una colonia positiva). Se purificó el DNA plasmidial de una de

las colonias positivas, y la región del inserto fue secuenciada desde el inicio del promotor TEF hasta el terminador CYC. No se encontró ninguna mutación en toda la región secuenciada (datos no mostrados). Con el plásmido pYES2-Kan-TEF-Lcc α ya confirmado, se transformó *S. cerevisiae* y las células transformadas se sembraron en placas de medio YEP suplementado con G418. Se extrajo DNA de 6 colonias transformantes seleccionadas al azar y se comprobó por PCR la amplificación de la región entre el promotor TEF y el terminador CYC, encontrándose en 3 de ellas el amplificado esperado de 2.570 pb (Figura 12, carriles 3 al 8). Se esquematiza la construcción de estos vectores en la Figura 13.

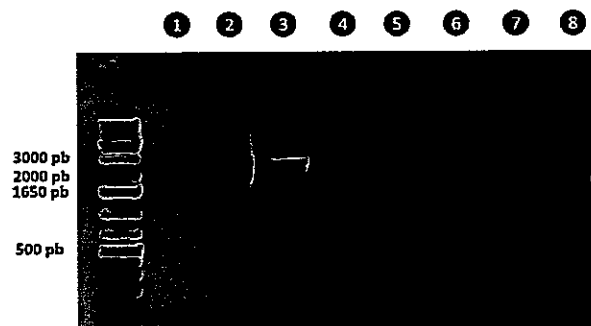


Figura 12 Transformación de *S. cerevisiae* con el vector pYES2-Kan-TEF-Lcc α

Amplificación por PCR del fragmento entre el promotor TEF y el terminador CYC (alrededor de 2500 pb con inserto). Se cargó el gel de acuerdo al DNA usado como templado: 1 DNA extraído desde *S. cerevisiae* sin transformar, 2 DNA plasmidial pYES2-Kan-TEF-Lcc α , 3-8 DNA extraído desde colonias transformadas con el vector pYES2-Kan-TEF-Lcc α

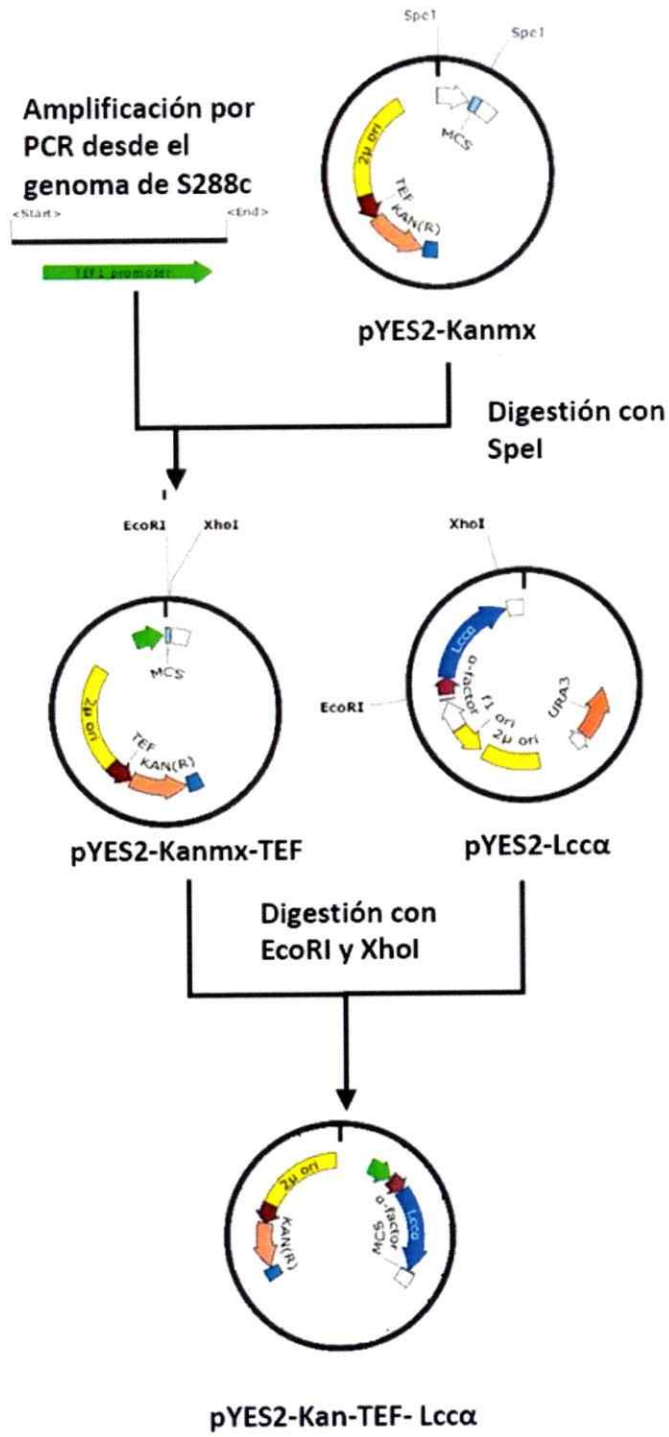


Figura 13 Construcción del vector pYes2-kan-TEF-Lcc α

Expresión de Laccasa

Expresión de Laccasa recombinante

Una vez logradas las construcciones de los vectores pYES2-Kan-Lcc α y pYES2-Kan-TEF-Lcc α , se procedió a evaluar la expresión de la proteína y luego optimizar las condiciones que incrementan la actividad específica en el sobrenadante.

Así, las colonias transformantes de *S. cerevisiae* transformadas con el vector pYES2-Kan-TEF-Lcc α fueron sembradas en placas con medio SD-glucosa, suplementadas con G418 y el sustrato ABTS. Más allá que las cepas transformadas muestran niveles de crecimiento normales en medio YEP no se observó la formación de un halo de ABTS oxidado alrededor de ninguna de las colonias (datos no mostrados).

Colonias al azar de *S. cerevisiae* transformadas con el vector pYES2-Kan-Lcc α fueron sembradas en placas de medio de expresión, suplementadas con G418, Galactosa y ABTS, observándose en este caso halos de oxidación de ABTS alrededor de todas ellas (**Figura 14**).

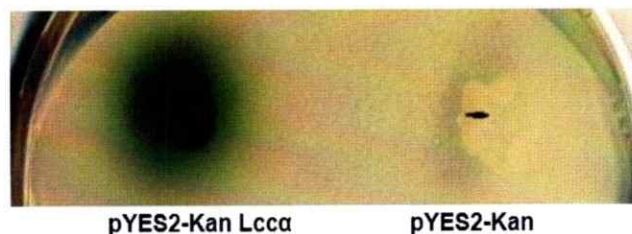


Figura 14 Expresión en placa de Laccasa α

Colonias de *S. cerevisiae* transformadas con los plasmidios construidos, en placas de medio de expresión, se observa un halo de oxidación del sustrato ABTS, alrededor de la colonia que expresa la enzima.

Debido a estos resultados en ensayos en placa, se optó por utilizar el sistema de inducción bajo el promotor GAL1, más allá de que se había reportado que produce bajas cantidades de enzima. Por ello se hizo estrictamente necesario optimizar los niveles de expresión como se detalla posteriormente. Se registraron los niveles de expresión de Laccasa en cultivos de *S. cerevisiae* transformada con el vector pYES2-Kan-Lcc α y de la misma cepa transformada con el vector pYES2-Kan, como control negativo de expresión. Dada la presencia del factor α de exportación de *S. cerevisiae* arriba de la secuencia, la proteína expresada es exportada hacia el medio extracelular y por lo tanto se cuantificó la actividad Laccasa en el sobrenadante, así como la concentración de proteína total.

Los sobrenadantes de los cultivos de ambas cepas en medio SD-Glucosa, no son capaces de oxidar el sustrato ABTS previo a la inducción. Se registró la actividad en el sobrenadante de los cultivos cada 24 h durante 5 días luego de la inducción. Nunca se observó actividad en el sobrenadante de los cultivos de células transformadas con el vector sin inserto. Una vez que las células son suspendidas en el medio de inducción, el crecimiento cesa y la biomasa se mantiene constante a lo largo del proceso de inducción. Por su parte, en el sobrenadante del cultivo pYES2-Kan-Lcc α , se pudo detectar actividad desde las 57 h posterior a la inducción (**Figura 15 Curva de inducción de la expresión de Laccasa α**). La actividad detectada aumentó hasta las 81 h de cultivo, alcanzando un máximo de $0,07 \pm 0,01$ U/L y manteniéndose estable alrededor de este valor. La concentración de proteínas en el sobrenadante del cultivo fue de $1,5 \pm 0,3$ μ g/mL, con lo cual se obtiene una actividad específica de $0,04 \pm 0,01$ U/mg.

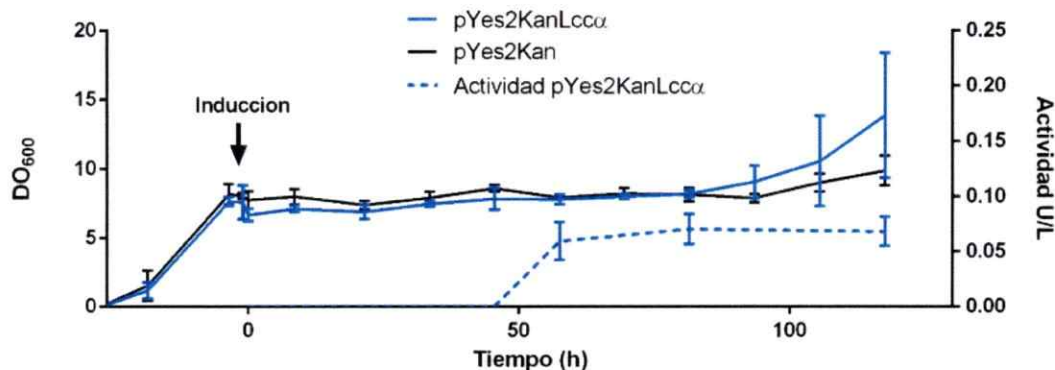


Figura 15 Curva de inducción de la expresión de Laccasa α

Se registró el crecimiento (línea continua) y la actividad Laccasa en el sobrenadante (línea discontinua) de cultivos de *S. cerevisiae* transformada con los vectores pYES2-Kan-Lcc α y pYES2-Kan.

Optimización de los medios de cultivo

Debido a la baja actividad específica de Laccasa en el sobrenadante (0,047 U/mg), se siguió una estrategia de optimización del cultivo. Inicialmente se probó el efecto de la disminución en la temperatura de inducción hasta los 20°C, obteniéndose al quinto día después de la inducción, una actividad 2,5 veces mayor a la observada en el primer cultivo con una concentración de proteínas similar. Por lo tanto, todos los cultivos posteriores fueron realizados a esa temperatura.

Posteriormente se agregó al medio de inducción tampón fosfato a pH 5,0, obteniéndose un aumento en la actividad en el sobrenadante de 8,5 veces con respecto al cultivo inicial y 5 veces más proteínas totales (ver **Tabla 5 Optimización de cultivos**). Con esto, sobre cultivos con tampón fosfato incubados a 20°C, se probó el efecto de agregar biotina, como potenciador del crecimiento, así como el efecto de agregar otras fuentes de carbono que no inhiben al promotor galactosa (etanol, sacarosa y rafinosa). Los cultivos con biotina presentaron una actividad menor que la

del control. La adición de una segunda fuente de carbono, aumentó la expresión de proteínas. Sin embargo, los cultivos con etanol como segunda fuente de carbono, tuvieron la mayor actividad que se pudo detectar, siendo 25 veces mayor que la actividad del cultivo inicial, y la concentración de proteínas 5 veces mayor. Los resultados se resumen en la **Tabla 5 Optimización de cultivos**.

De acuerdo con estos resultados, las condiciones óptimas de inducción requieren de un medio suplementado con una segunda fuente de carbono obteniendo los mayores aumentos en los cultivos suplementados con etanol o sacarosa. Entre ellos, los cultivos suplementados con etanol presentaron mayor actividad total por lo que si bien la enzima esta menos representada que en los cultivos con sacarosa, habría mayor masa de enzima para purificar. Por estos motivos, los cultivos posteriores se realizaron con etanol como segunda fuente de carbono, amortiguados a pH 5,0 con tampón fosfato y mantenido la temperatura constante a 20°C. Luego de 5 días de inducción el cultivo (normalmente de 50 ml) es centrifugado y el sobrenadante contiene actividad Laccasa que luego es usada para llevar a cabo la purificación. Se realizaron cultivos en volúmenes mayores de hasta 1 L, en los cuales no se observaron diferencias significativas con respecto a los cultivos de 50 mL (datos no mostrados).

Tabla 5 Optimización de cultivos

Paso de optimización	Actividad U/L	Veces (respecto cultivo inicial)	Concentración de proteínas µg/mL	Veces (respecto cultivo inicial)	Actividad específica U/mg	Veces (respecto al cultivo inicial)
cultivo inicial 30°C	0,07±0,01	1	1,5±0,3	1	0,04±0,01	1
20°C	0,17±0,04	2,5	2,1±0,8	1,4	0,08±0,04	1,8
pH 5,0 a 20°C	0,60±0,06	8,5	5,1±0,4	3,2	0,12±0,02	2,6
pH 5,0 a 20°C, biotina	0,415± 0,009	5,9	3,36±0,08	2,1	0,124±0,004	2,8
pH 5,0 a 20°C, rafinosa	0,52±0,01	7,4	2,8±0,7	1,8	0,17±0,04	4,5
pH 5,0 a 20°C, sacarosa	0,974±0,007	13,8	2,9±0,7	1,8	0,34±0,06	7,7
pH 5,0 a 20°C, etanol	1,8±0,5	24,9	8±2	5,5	0,20±0,08	4

Los valores de actividad y concentración de proteínas corresponden a los promedios de al menos dos replicas biológicas, con doble replica técnica, con sus valores de desviación estándar. Se hizo un test de ANOVA de una vía, el cual muestra que las diferencias observadas en la actividad bajo los distintos tratamientos son estadísticamente significativas con respecto al cultivo inicial, con un valor de F de 12,2, un p-value de 0,0007 y un R² de 0,8905. En el caso de la concentración de proteínas el test de ANOVA de una vía, muestra que las diferencias observadas son estadísticamente significativas con respecto al cultivo inicial con un valor de F de 7,42, un p-value de 0,0044 y un R² de 0,8318.

Purificación parcial de Laccasa α mediante cromatografía en columna

Previo a la purificación de la enzima se realizó una etapa de concentración seguida de una cromatografía de interacción hidrofóbica. Los resultados de estas etapas se resumen en la **Figura 16**, la **Figura 17** y la **Tabla 6 Etapas en el proceso de purificación**.

En la etapa de concentración, en una celda amicon con agitación constante, todo el sobrenadante de un cultivo, se llevó a un volumen menor a 10 mL. Gran parte de la proteína total se perdió en este paso (cerca del 80%). Sin embargo, la actividad total aumentó alrededor de 58 veces y la actividad específica unas 300 veces.

Posteriormente, previo al paso de cromatografía de interacción hidrofóbica, el concentrado de proteínas se precipitó agregando sulfato de amonio hasta 2,46 M para aumentar la interacción de la proteína con la resina de la columna de interacción hidrofóbica en paso siguiente, sin embargo, parte de la actividad total se pierde en este paso (ver **Tabla 6 Etapas en el proceso de purificación**). El sobrenadante se cargó en una columna phenil sepharose, previamente equilibrada. La mayor parte de la proteína interactúa con la resina en estas condiciones, dado que se detectó muy baja actividad Laccasa en el frente de la cromatografía. Luego de que la columna se lavó con el tampón de equilibrio, se eluyó la proteína en un gradiente de disminución de la concentración de sulfato de amonio. Se observaron dos picos principales en el gradiente, siendo el primero en eluir, el que tiene actividad Laccasa (**Figura 16**). El cromatograma que se muestra es representativo. En todas las purificaciones que fueron realizadas, el pico que presenta actividad eluye cuando la conductividad alcanza alrededor de los 130 mS/cm (alrededor de 1,75 M de sulfato de amonio). Sin embargo,

los demás picos varían en tamaño, obteniéndose la proteína con distintos niveles de pureza en cada purificación.

Todas las fracciones del gradiente que presentaron actividad al oxidar ABTS, fueron concentradas para luego medir la actividad específica del concentrado. Con esto se obtuvo una actividad específica de 2,46 U/mg, con lo que se consiguió un aumento de 486 veces en esta con respecto a la actividad específica del sobrenadante (ver **Tabla 6 Etapas en el proceso de purificación**).

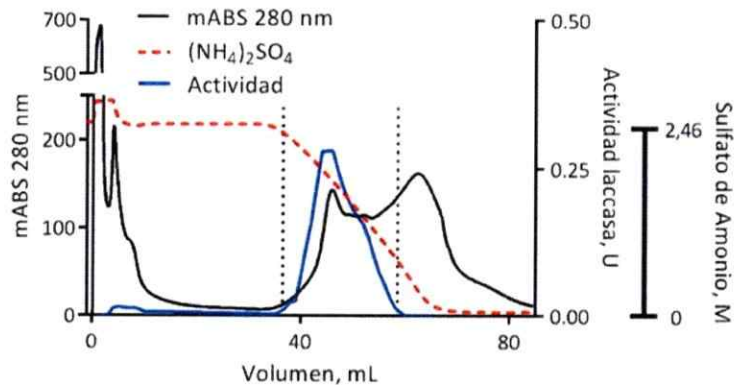


Figura 16 Purificación por cromatografía de interacción hidrofóbica en columna

Sobrenadantes de precipitaciones 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 siguió la concentración de proteínas por la absorbancia a 280 nm y la actividad laccasa por la capacidad de oxidar el sustrato ABTS. Las fracciones entre las líneas punteadas fueron concentradas

Tabla 6 Etapas en el proceso de purificación

	Volumen, mL	Concentración de proteínas, mg/mL	Proteína total, mg	Actividad total, U	Rendimiento, % (*)	Actividad específica, U/mg	veces
Sobrenadante	650	0,031	20,15	0,10	1,72	0,005	1
Concentrado	8,5	0,45	3,825	5,85	100,00	1,53	306
Precipitación por sulfato de	9	0,39	3,51	3,93	67,17	1,12	224
Interacción Hidrofóbica	0,5	2,31	1,155	2,81	47,96	2,43	486

* El rendimiento se calcula con respecto a la actividad total en el concentrado.

Las fracciones concentradas de cada uno de los pasos de purificación fueron cargadas en un gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes. Se observa un enriquecimiento de 3 bandas de 70, 54 y 30 Kda. Debido a que el peso molecular estimado de la enzima laccasa utilizada en este estudio es de 53 Kda, ésta correspondería a la segunda banda observada; sin embargo, la banda de mayor peso molecular también podría corresponder a la laccasa, pero con modificaciones postraduccionales. (Figura 17).

Adicionalmente, a partir de la última fracción, se realizaron intentos de purificación utilizando una columna de intercambio anionico de tipo HiTrapQ y columnas de filtración en gel en resinas Sephacryl-300 y en Superdex-75. Sin embargo, aún hay que mejorar los protocolos para poder lograr mayores niveles de pureza y estandarizar el proceso.

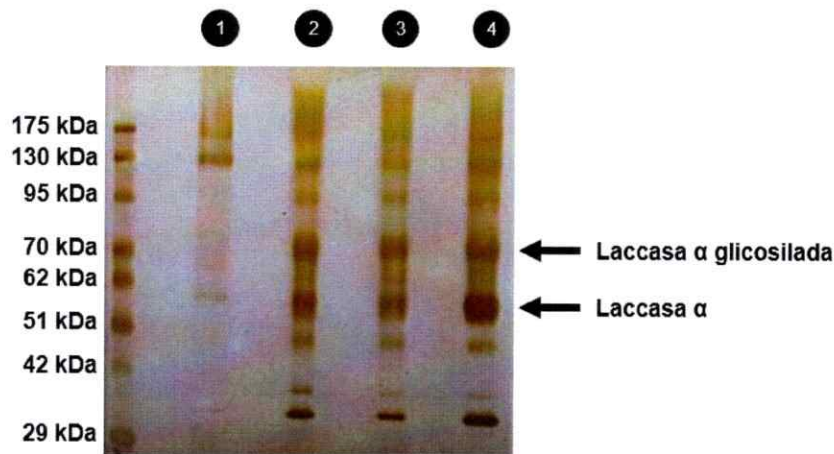


Figura 17 Enriquecimiento de Laccasa α a partir de los sobrenadantes de cultivos de *S. cerevisiae*

Gel SDS-PAGE al 12%, teñido con plata de las fracciones obtenidas en los pasos de purificación. Se cargó en cada carril 5ug de proteínas totales, en el carril 1 se cargó el concentrado del sobrenadante de un cultivo no inducido. En el carril 2 el concentrado de un sobrenadante de un cultivo inducido. En el 3 el sobrenadante concentrado en sulfato de amonio 2,6 M. Y en el carril 4 las fracciones con actividad Laccasa de una purificación en columna de interacción hidrofóbica

Modelamiento del complejo Laccasa-ABTS

Habiendo implementado un sistema de expresión y purificación de la enzima (que debe ser optimizado) el cual permite su ingeniería por medio de mutagénesis sitio-dirigida, se hace necesario un modelo para el análisis de la estructura de la enzima, el cual permita predecir características de su función. Para esto se desarrolló un modelo 3D de la enzima en complejo con su sustrato tipo, el ABTS, mediante el uso de herramientas de bioinformática estructural: modelamiento por homología, simulación molecular y Docking. Esta metodología también se utilizó para analizar el mutante P394N, para el cual se hipotetiza un mayor potencial redox en el sitio de cobre T1.

Se utilizó la herramienta Blastp, para buscar en la base de datos de estructuras cristalográficas PDB, una estructura con secuencia similar a la secuencia aminoacídica deducida del gen AY693776, que hemos expresado en *S. cerevisiae*. Se encontraron cuatro estructuras con una identidad mayor a 79% (**Tabla 7 Proteínas homologas a la Laccasa α de *T. versicolor* en el PDB**), entre ellas, una variante de la Laccasa α de *T. versicolor* con un 98% de identidad. Esta estructura (PDBid 1GYC) corresponde a la enzima expresada y purificada desde el sobrenadante de un cultivo de *T. versicolor* y fue cristalizada en su forma oxidada en presencia de 4 átomos de cobre (Piontek y col., 2002) a una resolución de 1,9 Å. La estructura revela la presencia de varias glicosilaciones de tipo N-acetyl glucosamina.

Tabla 7 Proteínas homologas a la Laccasa α de *T. versicolor* en el PDB

PDBid	Organismo	Identidad, %	Cobertura, %
1GYC	<i>Trametes versicolor</i>	98	100
1KYA	<i>Trametes versicolor</i>	80	100
3FPX	<i>Trametes hirsuta</i>	79	100
3PLX	<i>Trametes hirsuta</i>	79	100

8 de los 499 aminoácidos de la secuencia de Laccasa α son diferentes a los de la estructura cristalográfica encontrada. Estos fueron ubicados en la estructura para observar su cercanía con el sitio activo, de forma de poder evaluar si estos residuos afectarían en los estudios posteriores (**Figura 18**). Los residuos diferentes son: A5V, V31F, T56S, I259V, T294P, N340D, D364E (mostrándose a la izquierda el residuo en

la estructura cristalográfica, al centro la posición en la secuencia y a la derecha el residuo en el gen analizado). Se observa que estos residuos se encuentran alejados del sitio activo, por lo que no deberían afectar en el estudio del mutante propuesto, ya que la diferencia se encuentra en el sitio activo, lejos de las diferencias con el cristal. Sin embargo, se hace necesario el modelamiento por homología tanto de la enzima silvestre como de la mutante para que el paso de modelamiento del mutante no sesgue los estudios posteriores. Otra ventaja del modelamiento por homología es debida a que la estructura presenta 2 residuos con valores atípicos en el gráfico de Ramachandran y 17 residuos con cadenas laterales con ángulos atípicos que pueden ser corregidos por el modelamiento. Además, como el siguiente paso es la minimización y simulación del modelo buscando una estructura mas relajada que disminuya la dificultad para hacer el docking del sustrato, es conveniente iniciar desde una estructura modelada que se encuentra mas relajada y no desde la estructura que se encuentra disponible en el PDB.

Siendo lo anterior valido, el modelamiento por homología de Lcc α , y su mutante P394N se hizo usando como molde la estructura cristalográfica de Laccasa de *T. versicolor*. Se obtuvieron 10 modelos para los cuales se evaluó la correspondencia entre la secuencia y la estructura 3D utilizando el servidor Verify 3D. El mejor modelo, con un 94.2% de los residuos bien evaluados, en el caso de la laccasa silvestre y de un 94,1% para la mutante fueron utilizados en los pasos posteriores.

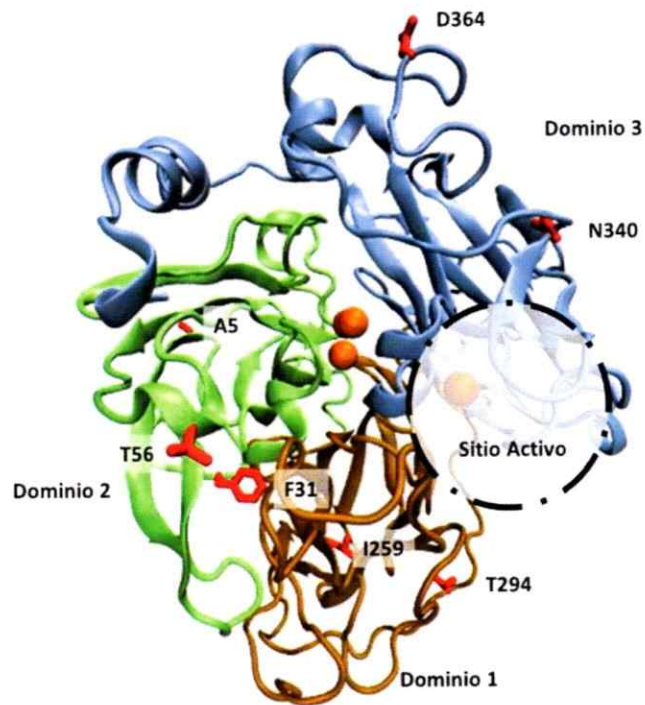


Figura 18 Estructura de Laccasa α , PDBid (1GYC).

Se muestra la estructura de la Laccasa α cristalizada, se destacan aquellos aminoácidos que difieren con los del gen AY693776 del Genbank.

Los modelos fueron llevados a un mínimo de energía por medio de minimización y dinámica molecular. Manteniendo los núcleos de cobre y sus ligandos restringidos a la posición que se encuentra en el cristal, debido a que este tipo de sitios no se encuentra disponible en el campo de fuerza utilizado y, a nuestro conocimiento, tampoco se encuentra disponible en otros campos de fuerza de dinámica molecular comúnmente utilizados. Ambas proteínas alcanzan una conformación estable (tras 1 ns de simulación) y se mantienen así durante los 9 ns restantes (**Figura 19**).

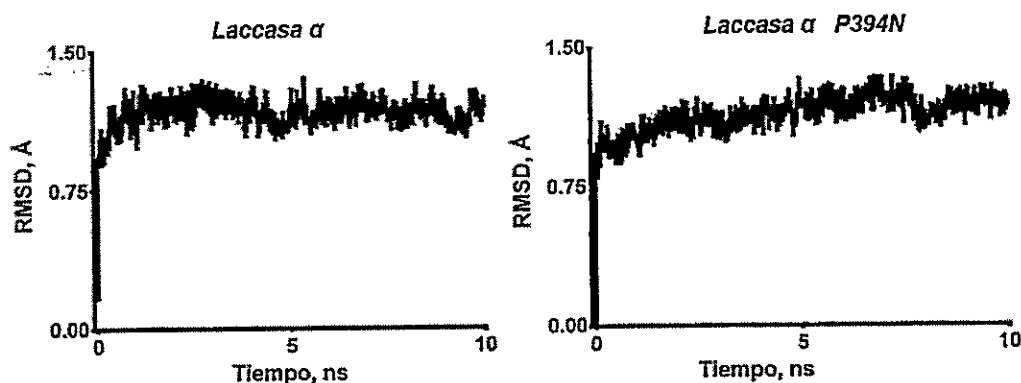


Figura 19 Simulación molecular de Laccasa α y de la mutante P394N

Se muestra el RMSD calculado para los átomos de la cadena principal de las proteínas, con respecto a la posición inicial durante los 10 ns de simulación de dinámica molecular

La distancia entre el carbonilo de la cadena principal del aminoácido 394 y el átomo de cobre en el sitio T1 durante la simulación para la proteína silvestre y para la mutante es mayor en el caso de la mutante siendo de $5,6 \pm 0,2 \text{ \AA}$ versus $6,0 \pm 0,2 \text{ \AA}$ en la silvestre (Figura 20). Además, se observa que la asparagina dirige su cadena lateral hacia el solvente y forma puentes de hidrógeno con el agua en el caso de la mutante. Se espera que, en tiempos mas largos, ésta exponga mayor superficie al solvente que lo observado en los 10 ns de simulación. De ambas simulaciones se tomó la estructura del último *snapshot*, las cuales se utilizaron para el modelamiento de las enzimas en complejo con sus sustratos con los objetivos de: i) generar un modelo de la enzima silvestre en complejo con el ABTS y ii) analizar si la mutacion propuesta no solo afectaría el potencial redox sino también la constante de unión por el sustrato. Previo a esto, el sustrato ABTS fue dibujado y optimizado por medio de cálculos de DFT teoría de funcionales de densidad. Se ha reportado el cálculo de una mayor densidad de electrones desapareados alrededor de los dobles enlaces que se encuentran entre los

anillos benzotiazol (Christensen & Kepp, 2014), y esto también fue observado para los orbitales calculados por nosotros (datos no mostrados), por lo cual esperábamos que esta sea la región más reactiva del sustrato.

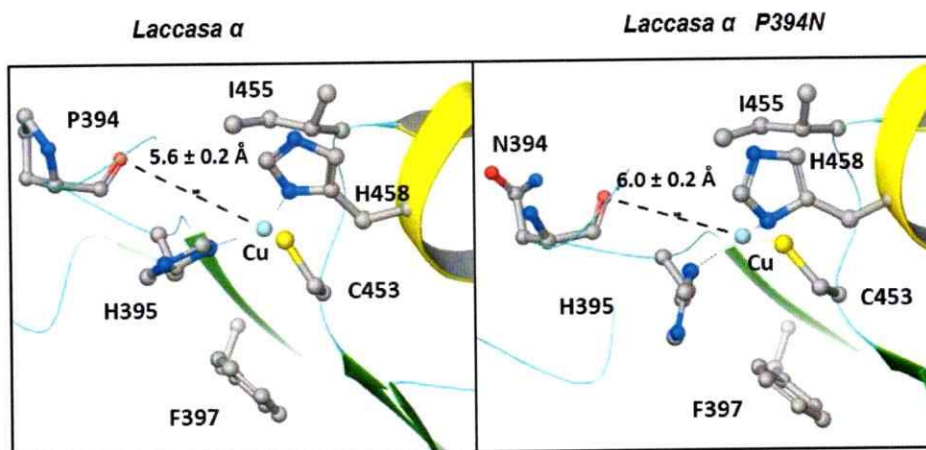


Figura 20 Distancia entre el átomo de cobre T1 y el carbonilo de la cadena principal del residuo 394 durante la simulación

Se muestra la distancia durante la simulación de dinámica molecular entre el carbonilo de la cadena principal del aminoácido 394 y el cobre del sitio T1 en la Laccasa silvestre y en el mutante.

Los modelos de complejos enzima-sustrato se construyeron por medio de Docking en 3 etapas, una inicial exploratoria en la cual el sustrato se ubicó utilizando una grilla amplia (30x30x30 Å) alrededor del sitio activo utilizando como centro de la grilla la H458, debido a que se reporta que a través de ella ocurriría el salto del electrón entre el sustrato y el sitio de cobre T1 (Kallio y col., 2009). Luego un segundo paso en el cual la mejor posición del Docking anterior es utilizada para fijar el centro de la grilla, y el tamaño se ajusta al tamaño del sustrato. Finalmente, esta posición fue refinada utilizando la metodología de QPLD en la cual se calculan las cargas por medio de teoría de funcionales de densidad (DFT) y por lo tanto se toman en cuenta los orbitales

electrónicos. La distancia entre la región reactiva del sustrato y la His458 del sitio de unión a cobre fue utilizada como filtro de selección, para elegir posiciones generadas por Docking que pudieran ser reactivas, además del valor del GlideScore, se evaluó la energía de unión del complejo por medio de MM-GBSA (Tabla 8). Se observa que no hay diferencias significativas para la constante de unión calculada para la enzima silvestre y la mutante.

Tabla 8 Resultados del Docking de ABTS en el modelo de *Laccasa α* de *T. versicolor* y en el mutante P394N

Método	Modelo silvestre			Mutante P394N		
	Glide Emodel	$\Delta G_{unión}$, Kcal/mol	Distancia H458, Å	Glide Emodel	$\Delta G_{unión}$, Kcal/mol	Distancia H458, Å
GlideDocking 1	-35,898	-66,029	3,5	-42,555	-71,976	3,8
GlideDocking 2	-18,231	-82,39	2,8	-53,172	-81,301	2,5
QsiteQPLD	-24,594	-71,64	2,4	-21,892	-80,151	2,3

En ambos casos las posiciones del sustrato son muy similares, se observa que las posiciones de menor energía de unión son aquellas en las cuales los grupos sulfonatos se encuentran estabilizados por residuos cargados como la R261 o la N264. Gran cantidad de residuos aromáticos se encuentran en contacto con los anillos aromáticos del ABTS. Sólo residuos de los dominios 1 y 3 interaccionan con el sustrato (Figura 21). Es notable que, aunque el sustrato es simétrico, solo una mitad se encuentra enterrada en la proteína, mientras que la otra mitad está expuesta al

solvente, encontrándose uno de los grupos sulfonato interactuando con el residuo de R161, y escondido bajo las fenilalaninas F382 y F457, mientras que el otro grupo sulfonato está expuesto al solvente, interactuando de forma lejana con el grupo amida del residuo de N264.

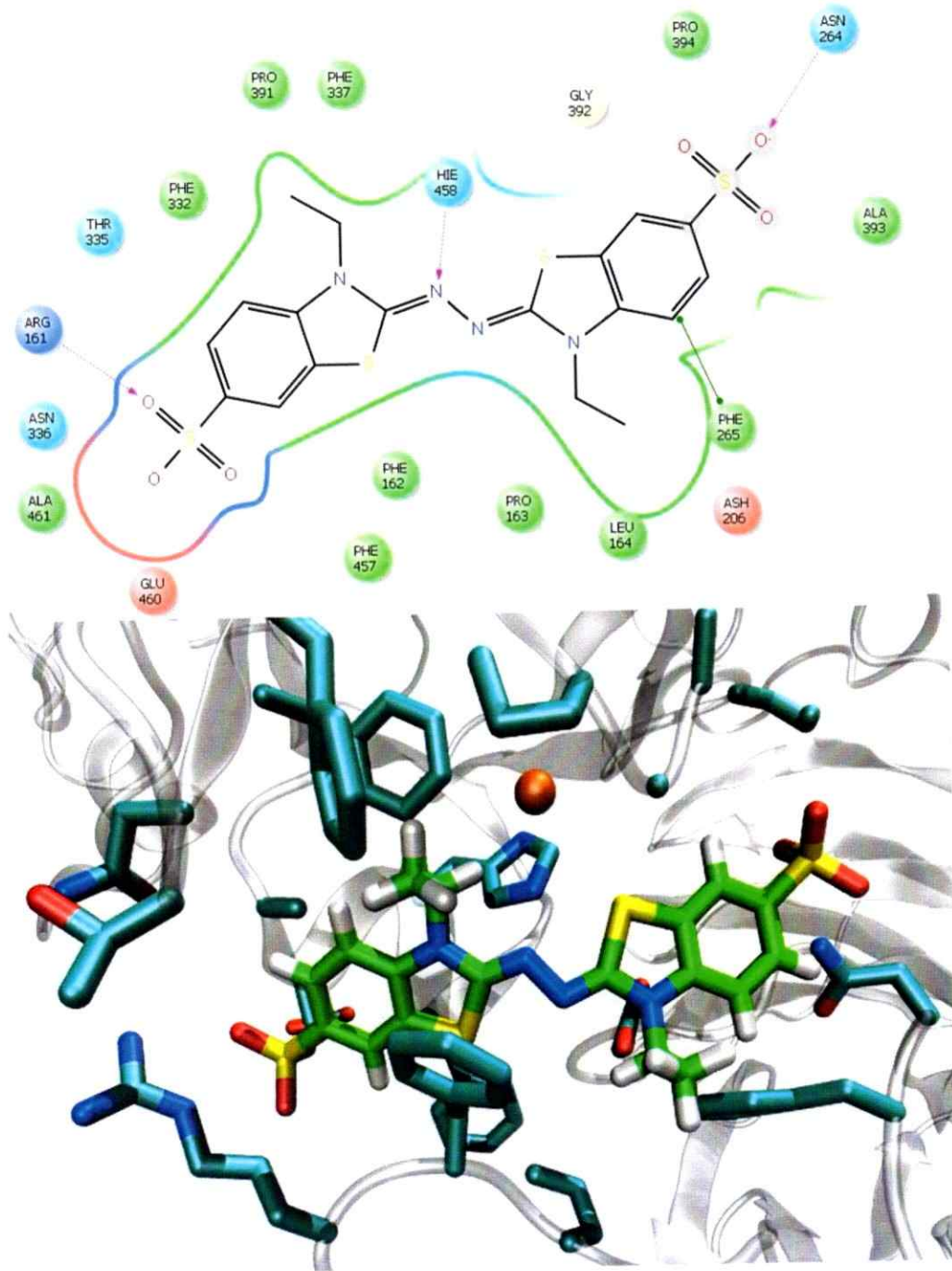


Figura 21 Complejo Laccasa-ABTS generado por Qsite QPLD

Arriba esquema en el cual se muestran los residuos que interactúan con el sustrato, abajo se muestra el sitio activo en 3D, con el átomo de cobre T1 en naranja y los átomos de carbonos del sustrato ABTS en verde.

Discusión



Expresión de Laccasa α

Con la intención de mejorar los niveles de expresión de la proteína Laccasa α de *T. versicolor* se intentó expresar el gen que la codifica en la levadura *S. cerevisiae* utilizando el promotor TEF1 en lugar de GAL1. Si bien no se obtuvieron resultados de expresión de Laccasa, las cepas transformadas crecen a velocidades similares a las observadas en las cepas sin transformar por lo que la no expresión de la enzima no se debe a que sea tóxica para el crecimiento de la levadura. Queda como interrogante la razón por la cual no se obtuvo expresión bajo este promotor. Sin embargo, como la expresión de este gen bajo el promotor GAL1 ya ha sido reportada, se continuó utilizando este sistema.

Como era esperado (Koschorreck y col., 2008) los niveles de expresión bajo el promotor GAL1 fueron bajos ($0,07 \pm 0,01$ U/L), por lo que se procedió a la optimización de las condiciones de cultivo. Esto incluyó el cambio en la temperatura de expresión, la adición de biotina, tampón fosfato al medio y el uso de diferentes fuentes de carbono, entre las cuales se utilizó rafinosa, sacarosa y etanol.

A 20°C la expresión de Laccasa aumento 2,5 veces, en comparación con el cultivo a 30°C. Generalmente en *S. cerevisiae* se expresan proteínas a 30 °C, ya que esta es la temperatura óptima de crecimiento para estas levaduras. Sin embargo, al disminuir la temperatura a 20 y 25 °C, es posible aumentar los niveles de expresión de proteínas. Se ha observado que la expresión de GFP del organismo de agua fría *Aequorea victoria*, en *S. cerevisiae* es más alta a 20°C (Huang & Shusta, 2005), los

autores argumentan que esto se debe a las condiciones de crecimiento del organismo del cual proviene la enzima. Además, se reportó que al disminuir la temperatura de cultivo, se disminuiría la proteólisis de las proteínas expresadas (Tøsttrup & Carlsen, 1990). También, se ha reportado que la expresión de Laccasa α en *S. cerevisiae* bajo el promotor CUP1 en el sobrenadante, es más alta en cultivos a 19°C (Necochea y col., 2005b).

En el medio de inducción la Galactosa funciona a su vez como el inductor y como fuente de carbono. *S. cerevisiae* presenta una tasa lenta de crecimiento en galactosa, lo cual nos llevó al uso de una segunda fuente de carbono en el medio de inducción. Se ha reportado previamente el uso de raffinosa, sacarosa o glicerol, fuentes de carbono pobres, pero que no inhiben al promotor GAL1. Se observó que el efecto del etanol sobre la actividad total fue mayor a lo esperado. Sin embargo, la actividad específica es mayor para cultivos en sacarosa por lo que los cultivos con etanol estarían produciendo más Laccasa, pero menos representada que en los con sacarosa. Se hace necesario analizar la conveniencia de utilizar etanol como segunda fuente de carbono o sacarosa ya que con la primera se produce una mayor actividad total, pero con la segunda se comenzaría la purificación con la enzima más representada. En este trabajo se prefirió utilizar etanol debido a que encontramos más conveniente comenzar desde sobrenadantes que presentarían mayor actividad total.

No es la primera vez que se observa que el etanol afecte positivamente la producción de enzimas. Se ha reportado un aumento similar al producir Laccasa en *T. versicolor* en presencia de etanol (Lee y col., 1999). Los autores indican haber determinado que la actividad y estabilidad de estas enzimas en presencia de etanol no se vería aumentada en el rango de 0 a 50 g/L. El efecto podría ser explicado debido a

que este alcohol aumentaría la permeabilidad de la membrana causando cambios en los ácidos grasos que la componen o que podría ocurrir un efecto estimulador de la producción de melanina, la cual está formada por monómeros aromáticos que pueden funcionar como inductores de la expresión de Laccasa. Para la expresión de otras proteínas también se ha observado un efecto similar. En la producción de anticuerpos de camélido en cultivos de *S. cerevisiae* (Laar y col., 2006) en las fases finales de un cultivo en batch, cuando el etanol se convierte en la única fuente de carbono la expresión de esas proteínas aumenta. Además, en cultivos con etanol como única fuente de carbono, este efecto se ve exacerbado. Más allá de que no encontraron evidencias directas que expliquen la inducción por etanol, los autores sugieren posibles causas como, por ejemplo, un efecto similar al *heat-shock*, cambiando el balance redox de la célula lo que induce la producción de tampón glutatión que está ligado a procesos de folding y formación de puentes disulfuro.

Un mayor aumento de la expresión podría lograrse optimizando la concentración de los azúcares en el medio, la concentración y pH del tampón, el uso de otros tampones, la concentración de sulfato de cobre, etc. También proponemos el uso de otros organismos como *P. pastoris* y de otras cepas de *S. cerevisiae* que presenten mayores tasas de producción de proteínas heterólogas. Entre ellas, cepas de *S. cerevisiae* mutantes de los genes *PEP4*, *PRB1* y *CAN1* (Jones, 1991), que codifican las principales proteasas tanto intra como extracelulares de *S. cerevisiae*. En dichos mutantes se ha observado un aumento en la producción de proteínas heterólogas. Además, proponemos el uso de cepas mutantes de *S. cerevisiae* del gen *REG1*, que no presentan inhibición por glucosa de los genes regulados por promotores

GAL, así como también el uso de cepas incapaces de metabolizar galactosa las cuales presentan una inducción más duradera (Hovland y col., 1989). —

Determinación de la actividad Laccasa

En otros trabajos que han determinado la oxidación de ABTS, se ha detectado picos de absorbancia tanto a 436 como a 420 nm. Se ha utilizado un coeficiente de extinción molar de $29.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 436 nm (Niku-Paavola y col., 1988) y de $36.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 420 nm o 418 nm (Collins & Dobson, 1997; Han y col., 2005; Kenzom y col., 2014; Osipov y col., 2014; Pardo & Camarero, 2015a). En ninguno de estos trabajos se muestra la determinación experimental de este valor y tampoco se cita otro trabajo en el cual se haya realizado. El primer trabajo en el cual se muestra la determinación experimental fue el de (Childs & Bardsley, 1975) donde obtuvieron un coeficiente de $36.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 414 nm en condiciones de tampón fosfato de potasio, a pH 6,0 y 37°C de temperatura constante. En todos los trabajos descritos anteriormente se utilizaron distintas condiciones de reacción (variados tampones, pH y temperatura) las cuales podrían afectar el coeficiente de extinción, por lo cual la comparación de actividad para distintas Laccasas debe tomarse con precaución. Por esta razón, en este trabajo se determinó el coeficiente de extinción molar en las condiciones de medición de actividad. De esta manera se obtuvo un valor de $31.557 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en tampón fosfato de sodio a pH 5,0 a 25°C . Como se mencionó anteriormente, la presencia de algunos aminoácidos en los medios de cultivos podría volver a reducir al sustrato oxidado por la enzima, por lo cual las mediciones de actividad en el sobrenadante podrían estar subestimadas.

Purificación de Laccasa

Los sobrenadantes de los cultivos con actividad Laccasa, fueron concentrados por ultrafiltración en celdas con agitación. Se observó un aumento de 300 veces en la actividad específica y de 58 veces en la actividad total. Por lo que este paso además de concentrar la proteína, podría estar purificándola de proteínas de bajo peso molecular (aquellas que pasan la membrana) o de algún inhibidor que se encuentre en el sobrenadante. Se ha reportado un efecto similar al concentrar la Laccasa α de *T. versicolor* expresada de forma heteróloga en *S. cerevisiae*, encontrando un aumento de 57 veces en la actividad específica, atribuido a la existencia de un fuerte inhibidor de la actividad Laccasa en el medio de cultivo (Necochea y col., 2005a).

El concentrado del sobrenadante del cultivo fue precipitado con 2,6 M de sulfato de amonio y el sobrenadante se purificó en una columna de interacción hidrofóbica, en la cual interactuó el total de la enzima activa. La Laccasa fue detectada en un segundo pico en el gradiente de elución que se colectó por completo y concentró, encontrándose un aumento en la actividad específica de más de 400 veces respecto a lo observado en el sobrenadante del cultivo. Al analizar esta fracción en geles SDS-PAGE, se esperaba encontrar enriquecimiento de una banda de 53 KDa, correspondiente al peso molecular calculado para la enzima expresada, sin embargo, se observó el enriquecimiento de 3 bandas. Una de alrededor de 30 Kda presenta un peso molecular muy bajo para tratarse de la enzima, mientras que la banda de 53 kDa podría corresponder a la Laccasa expresada. La presencia de una tercera banda de alrededor de 70 KDa que también se ve enriquecida podría corresponder a la enzima en su forma glicosilada, lo cual se observó antes al expresar esta enzima en *P. pastoris* donde se reporta un aumento aparente de 20 kDa en el tamaño de la enzima debido a

glicosilaciones (Koschorreck y col., 2008). Por lo cual con los datos con que se cuenta actualmente no es posible concluir si se tiene la enzima sin glicosilar, glicosilada o poblaciones de ambas formas de la enzima. Agregar mas pasos al protocolo de purificación podría aclarar esto, o la identificación de estas bandas por análisis de espectrometría de masas. (Koschorreck y col., 2008) además reportan que esta enzima una vez purificada tiene una actividad específica de 2,6 U/mg a pH 5,0 y 25°C (las mismas condiciones en que se evaluó la actividad en este trabajo) pero no muestran geles de electroforesis que indiquen el nivel de pureza de la enzima. En nuestro caso, la fracción obtenida por cromatografía de interacción hidrofóbica presentó una actividad específica de 2,43 U/mg.

Modelamiento del complejo Laccasa-ABTS

A la fecha existen pocas estructuras cristalográficas de Laccasas del reino Fungi en presencia de sustratos. Por lo que para analizar la estructura del complejo Laccasa-ABTS de *T. versicolor* se requiere de su modelamiento molecular. Es por ello que se modeló tanto la enzima en su forma apo por modelamiento por homología seguido de simulación de dinámica molecular, como el sustrato cuya geometría fue optimizada por medio de DFT. Además, se modeló la mutante P394N, para la cual se hipotetiza un mayor potencial redox.

Para el modelamiento de esta proteína y de la mutante se utilizó como molde un estructura de alta similitud (98% de identidad, PDBid 1GYC) (Piontek y col., 2002), con alta resolución (1,9 Å) que corresponde a una variante de la proteína Laccasa α . Teniendo en cuenta que difieren a nivel de secuencia en 7 aminoácidos, y que estos se encuentran alejados del sitio de unión, el modelamiento por homología para esta proteína se realizó utilizando el protocolo estándar. En un paso siguiente, con el

objetivo que alcanzaran un estado menos rígido que el que se presenta en la estructura cristalográfica, los modelos fueron simulados hasta alcanzar un estado estable. Luego de 1 ns de simulación, alcanzan el estado esperado, el cual se mantiene por los siguientes 9 ns. Observamos que en la mutante la distancia entre el carbonilo de la cadena principal y el sitio de cobre aumenta respecto de la proteína silvestre, debido a una tendencia en la cadena lateral de la asparagina por solvatare, alejando el carbonilo del cobre.

La geometría del sustrato ABTS fue dibujada en 2D, para luego ser optimizada por DFT hasta obtener una estructura 3D en su conformación de mínima energía. Y para estudiar las interacciones que determinan la formación del complejo proteína ABTS, se procedió a su modelamiento a través de *Docking*. El *Docking* se realizó en tres pasos, en los cuales no sólo se tomó en cuenta el puntaje asignado por el programa y la energía de unión calculada, sino que se seleccionaron aquellas estructuras en las cuales la región más reactiva del sustrato (en torno a los dobles enlaces entre los anillos tiazólicos (Christensen & Kepp, 2014)) se encontrara a menor distancia con el N_{ϵ} de la H458. Esto debido a que en el mecanismo de reacción propuesto el electrón migra a través de esta cadena lateral desde el sustrato al átomo de cobre de tipo T1 (Enguita y col., 2004). En los 3 pasos de *Docking* se encontraron estructuras que cumplían con este criterio, entre las cuales se seleccionaron aquellas con menor energía de unión.

Al comparar las posiciones finalmente obtenidas para la mutante como para la enzima silvestre no se observan diferencias significativas en la geometría ni tampoco en la energía de unión, por lo que se espera que la mutación no perturbe esta característica del sistema. Se observa que el ABTS forma una U en torno al sitio activo,

con un extremo expuesto al solvente y el otro no. Además, se observó una distancia muy baja entre la H458 y la zona reactiva del sustrato. En este aspecto las estructuras modeladas son muy similares a la estructura de CotA de *B. subtilis* (Enguita y col., 2004), en la cual se observa además que el sustrato adopta una conformación curvada, con una región expuesta al solvente y la otra no. El rol de R161 (en la Laccasa α de *T. versicolor*) en la estabilización de uno de los grupos sulfonato, parece ser homóloga con la de R416 (en CotA de *B. subtilis*); sin embargo, esta se encuentra más alejada. En general, el sitio activo de CotA está más abierto que el de TLcca en el cual se encuentran al menos 5 fenilalaninas alrededor del sustrato, las cuales no se encuentran en la secuencia de CotA. Además, el cristal de CotA se obtuvo para la proteína apo y luego se sumergió en el sustrato, por lo que es probable que no adoptara la conformación que se observaría si ésta fuera cristalizada directamente en presencia del sustrato, ya que no podría cambiar su conformación al interactuar con su sustrato debido al empaquetamiento cristalino.

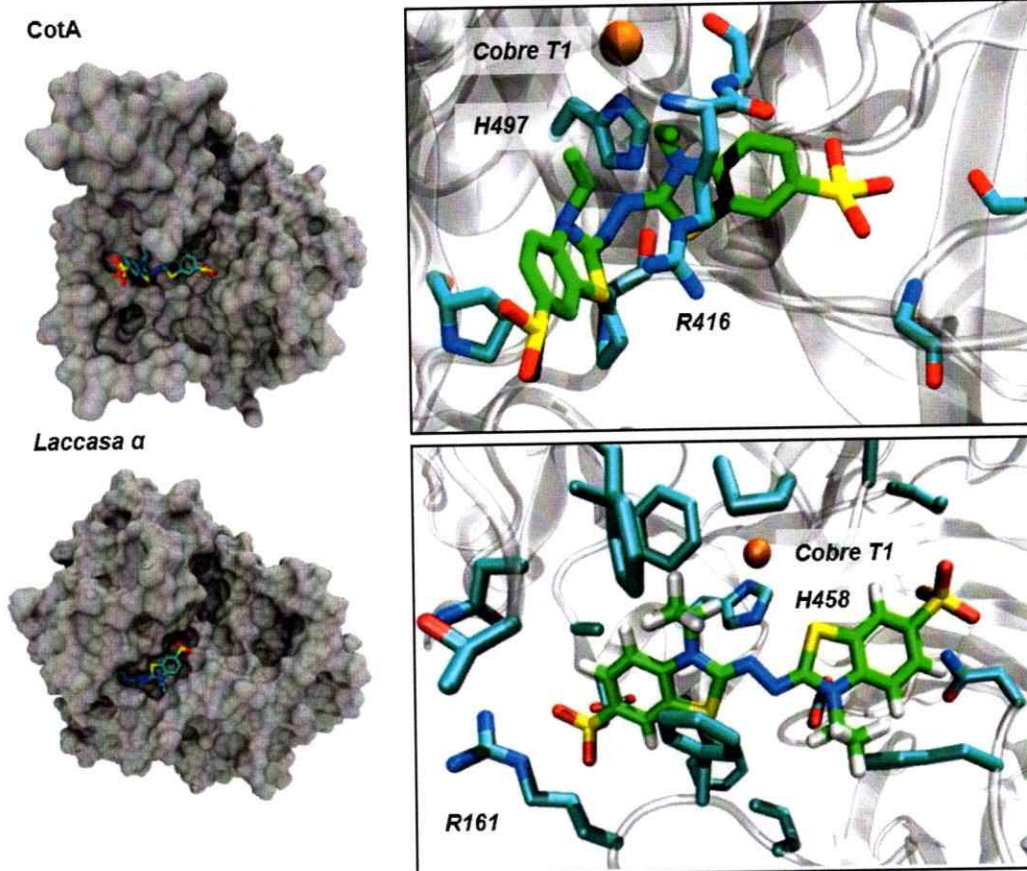


Figura 22 Comparación entre el sitio activo de CotA de *B. subtilis* y del modelo de Laccasa α en complejo con ABTS.

Se muestran a la izquierda las superficies calculadas para las estructuras de la Laccasa α de *T. versicolor* y de la proteína CotA de *B. subtilis*. A la derecha un acercamiento de sus sitios activos.

Esta estrategia de selección de conformaciones, aunque requiere mayor información sobre el mecanismo de reacción de la enzima, y mayores tiempos de cómputo, estaría dando cuenta de conformaciones reactivas. Por lo que sería un modelo más confiable que el resultado de un experimento de Docking que solo presente el mejor puntaje entregado por el programa. Luego, el modelo generado podría optimizarse aún más por simulaciones de tipo QM/MM (Warshel & Levitt, 1976),

en las cuales la energía del sitio activo es analizado por medio de mecánica cuántica y el resto de la proteína por mecánica molecular. Esto permitirá el análisis del sitio de unión a cobre que se encuentra altamente polarizado, y que por lo tanto no puede ser analizado por medio de dinámica molecular. Así se obtendrá el potencial redox teórico tanto para el modelo generado para el mutante como para la enzima silvestre, dando mas información sobre el efecto del momento dipolar causado por el carbonilo en el sitio de unión a cobre. Entonces estos modelos podrían ayudar a esclarecer las determinantes estructurales del potencial redox del sitio de unión (Babu y col., 2013; Olsson y col., 2003), teniendo en cuenta que su control, daría herramientas para controlar la k_{cat} de la enzima (Xu y col., 1996).

Conclusiones

1. El plasmidio pYES2 modificado con el marcador de selección Kanmx permitió expresar el gen de la Laccasa de *T. versicolor* bajo el control del promotor GAL1 en cepas de *S. cerevisiae* que no presentan genotipo *ura3-*.
2. Cambios en las condiciones de cultivo, en la temperatura y el pH de inducción, aumentan la actividad Laccasa en el sobrenadante. La adición de una segunda fuente de carbono al medio de cultivo es un procedimiento efectivo, con etanol presentando un efecto más exacerbado.
3. Se logró un enriquecimiento en más de 400 veces respecto del sobrenadante inicial en la actividad Laccasa. En este proceso la concentración conduce al mayor aumento de actividad Laccasa
4. El modelamiento del complejo Laccasa-ABTS, entrega una herramienta para estudiar los determinantes estructurales de la especificidad del sustrato, no observándose diferencias entre la unión por el sustrato para la enzima silvestre y la mutante, por lo cual es probable que esta mutante presente un mayor potencial redox manteniendo su constante de unión por ABTS.

Bibliografía

- Aliaga, C y Lissi, E A. 2000. Reactions of the radical cation derived from 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) with amino acids. Kinetics and mechanism. *Canadian Journal of Chemistry*, 78, 1052–1059.
- Babu, N S, Tedesse, S, y Lelsho, T A. 2013. Computational and electrochemical studies on the redox reaction of for quinoxalin-2 (H) -one and its derivatives in aqueous solution. *Journal of chemical and pharmaceutical research*, 5, 61–69.
- Berends, E, Scholtmeijer, K, Wösten, H A B, Bosch, D, y Lugones, L G. 2009. The use of mushroom-forming fungi for the production of N-glycosylated therapeutic proteins. *Trends in microbiology*, 17, 439–43.
- Bertrand, T, Jolival, C, Briozzo, P, Caminade, E, Joly, N, Madzak, C, y Mougin, C. 2002. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*, 41, 7325–33.
- Bohlin, C, Jönsson, L J, Roth, R, y van Zyl, W H. 2006. Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 129-132, 195–214.
- Bradford, M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.
- Brown, M a, Zhao, Z, y Grant Mauk, a. 2002. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: Laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorganica Chimica Acta*, 331, 232–238.
- Cambria, M T, Gullotto, D, Garavaglia, S, y Cambria, A. 2012. In silico study of structural determinants modulating the redox potential of *Rigidoporus lignosus* and other fungal laccases. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 30, 89–101.
- Childs, B R E y Bardsley, W G. 1975. The Steady-State Kinetics of Peroxidase with 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulphonic acid) as Chromogen. *Biochemical journal*, 145, 93–103.
- Christensen, N J y Kepp, K P. 2014. Setting the stage for electron transfer: Molecular basis of ABTS-binding to four laccases from *Trametes versicolor* at variable pH and protein oxidation state. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 100, 68–77.
- Claus, H. 2004. Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron*, 35, 93–96.
- Collins, P J y Dobson, A D W. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3444–3450.

- Durão, P, Chen, Z, Silva, C S, Soares, C M, Pereira, M M, Todorovic, S, Hildebrandt, P, Bento, I, Lindley, P F, y Martins, L O. 2008. Proximal mutations at the type 1 copper site of CofA laccase: spectroscopic, redox, kinetic and structural characterization of I494A and L386A mutants. *The Biochemical Journal*, 412, 339–346.
- Dwivedi, U N, Singh, P, Pandey, V P, y Kumar, A. 2011. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, 117–128.
- Eggert, C, Temp, U, y Eriksson, K E. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and environmental microbiology*, 62, 1151–8.
- Eisenberg, D, Lothy, R, y Bowie, J U. 1997. VERIFY3D: Assessment of Protein Models with Three-Dimensional Profiles. *Methods in enzymology*, 277, 396–404.
- Enguita, F J, Marçal, D, Martins, L O, Grenha, R, Henriques, A O, Lindley, P F, y Carrondo, M A. 2004. Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry*, 279, 23472–6.
- Ernst, O y Zor, T. 2010. Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 1–6.
- Essmann, U, Perera, L, Berkowitz, M L, Darden, T, Lee, H, y Pedersen, L G. 1995. A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, 103, 8577–8593.
- Eswar, N, Eramian, D, Webb, B, Shen, M-Y, y Sali, A. 2008. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 426, 145–159.
- Forte, S, Polak, J, Valensin, D, Taddei, M, Basosi, R, Vanhulle, S, Jarosz-Wilkolazka, A, y Pogni, R. 2010. Synthesis and structural characterization of a novel phenoxazinone dye by use of a fungal laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63, 116–120.
- Gelo-Pujic, M, Kim, H H, Butlin, N G, y Palmore, G T. 1999. Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*. *Applied and environmental microbiology*, 65, 5515–21.
- Gomes, S a S S y Rebelo, M J F. 2003. A New Laccase Biosensor For Polyphenols Determination. *Sensors*, 3, 166–175.
- Goujon, M, McWilliam, H, Li, W, Valentin, F, Squizzato, S, Paern, J, y Lopez, R. 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 38, 695–699.
- Gübitz, G M y Paulo, A C. 2003. New substrates for reliable enzymes: Enzymatic modification of polymers. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 577–582.
- Guo, M, Lu, F, Du, L, Pu, J, y Bai, D. 2006. Optimization of the expression of a laccase gene from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 848–852.

- Gupta, N y Farinas, E T. 2009. Narrowing laccase substrate specificity using active site saturation mutagenesis. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 12, 269–274.
- Han, M-J, Han, M-J, Choi, H-T, y Song, H-G. 2005. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 43, 555–60.
- Hoegger, P J, Kilaru, S, James, T Y, Thacker, J R, y Kües, U. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *The FEBS journal*, 273, 2308–26.
- Hong, F, Meinander, N Q, y Jönsson, L J. 2002. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 79, 438–449.
- Hovland, P, Flick, J, Johnston, M, y Sciafani, R A. 1989. Galactose as a gratuitous inducer of GAL gene expression in yeasts growing on glucose. *Gene*, 83, 57–64.
- Hu, L, Farrokhnia, M, Heimdal, J, Shleev, S, Rulíšek, L, y Ryde, U. 2011. Reorganization energy for internal electron transfer in multicopper oxidases. *The journal of physical chemistry. B*, 115, 13111–26.
- Huang, D y Shusta, E V. 2005. Secretion and surface display of green fluorescent protein using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, 21, 349–357.
- Jolival, C, Madzak, C, Brault, A, Caminade, E, Malosse, C, y Mougín, C. 2005. Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 450–456.
- Jones, E W. 1991. Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*, 194, 428–53.
- Jönsson, L J, Saloheimo, M, y Penttilä, M. 1997. Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of lcc1 and expression in *Pichia pastoris*. *Current genetics*, 32, 425–30.
- Kallio, J P, Auer, S, Jänis, J, Andberg, M, Kruus, K, Rouvinen, J, Koivula, a, y Hakulinen, N. 2009. Structure-function studies of a *Melanocarpus albomyces* laccase suggest a pathway for oxidation of phenolic compounds. *Journal of molecular biology*, 392, 895–909.
- Kenzom, T, Srivastava, P, y Mishra, S. 2014. Structural Insights into 2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) (ABTS)-Mediated Degradation of Reactive Blue 21 by Engineered *Cyathus bulleri* Laccase and Characterization of Degradation Products. *Applied and environmental microbiology*, 80, 7484–95.
- Kiiskinen, L y Saloheimo, M. 2004. Molecular Cloning and Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a Laccase Gene from the Ascomycete *Melanocarpus albomyces* Molecular Cloning and Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a Laccase Gene from the

- Ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *American Society for Microbiology*, 70, 137–144.
- Koschorreck, K, Richter, S M, Swierczek, A, Belfuss, U, Schmid, R D, y Urlacher, V B. 2008. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs. *Archives of biochemistry and biophysics*, 474, 213–9.
- Kues, U y Ruhl, M. 2011. Multiple Multi-Copper Oxidase Gene Families in Basidiomycetes - What for? *Current Genomics*, 12, 72–94.
- Laar, T van de, Visser, C, Holster, M, Lopez, C G, Kreuning, D, Sierkstra, L, Lindner, N, y Verrips, T. 2006. Increased Heterologous Protein Production by *Saccharomyces cerevisiae* Growing on Ethanol as Sole Carbon Source. *Biotechnology and Bioengineering*, 96.
- Larkin, M a, Blackshields, G, Brown, N P, Chenna, R, Mcgettigan, P a, McWilliam, H, Valentin, F, Wallace, I M, Wilm, a, Lopez, R, Thompson, J D, Gibson, T J, y Higgins, D G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947–2948.
- Larsson, S, Cassland, P, y Jonsson, L. 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain with Enhanced Resistance to Phenolic Fermentation Inhibitors in Lignocellulose Hydrolysates by Heterologous Expression of Laccase. *American Society for Microbiology*., 67, 1163–1170.
- Lee, I Y, Jung, K H, Lee, C H, y Park, Y H. 1999. Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. *Biotechnology Letters*, 21, 965–968.
- Liu, H, Zhu, L, Bocola, M, Chen, N, Spiess, A C, y Schwaneberg, U. 2013. Directed laccase evolution for improved ionic liquid resistance. *Green Chemistry*, 15, 1348–1355.
- Luo, H, Jin, S, Fallgren, P H, Park, H J, y Johnson, P a. 2010. A novel laccase-catalyzed cathode for microbial fuel cells. *Chemical Engineering Journal*, 165, 524–528.
- Madhavi Sastry, G, Adzhigirey, M, Day, T, Annabhimoju, R, y Sherman, W. 2013. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27, 221–234.
- Mate, D M y Alcalde, M. 2014. Laccase engineering: from rational design to directed evolution. *Biotechnology advances*, 33, 25–40.
- Matera, I, Gullotto, A, Tilli, S, Ferraroni, M, Scozzafava, A, y Briganti, F. 2008. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluolate. *Inorganica Chimica Acta*, 361, 4129–4137.
- McWilliam, H, Li, W, Uludag, M, Squizzato, S, Park, Y M, Buso, N, Cowley, A P, y Lopez, R. 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research*, 41, 597–600.
- Minussi, R C, Pastore, M, y Dura, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 205–216.
- Miyazaki, K. 2005. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 9, 415–425.

- Mohorčič, M, Teodorovič, S, Golob, V, y Friedrich, J. 2006. Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths. *Chemosphere*, 63, 1709–1717.
- Necochea, R, Valderrama, B, Díaz-Sandoval, S, Folch-Mallol, J L, Vázquez-Duhalt, R, y Iturriaga, G. 2005a. Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. *FEMS Microbiology Letters*, 244, 235–241.
- Necochea, R, Valderrama, B, Díaz-Sandoval, S, Folch-Mallol, J L, Vázquez-Duhalt, R, y Iturriaga, G. 2005b. Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. *FEMS microbiology letters*, 244, 235–41.
- Nicotra, S, Cramarossa, M R, Mucci, A, Pagnoni, U M, Riva, S, y Forti, L. 2004. Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron*, 60, 595–600.
- Niku-Paavola, M L, Karhunen, E, Salola, P, y Raunio, V. 1988. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *The Biochemical journal*, 254, 877–883.
- Olsson, M H M, Hong, G, y Warshel, A. 2003. Frozen density functional free energy simulations of redox proteins: computational studies of the reduction potential of plastocyanin and rusticyanin. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 5025–39.
- Osipov, E, Polyakov, K, Kittl, R, Shleev, S, Dorovatovsky, P, Tikhonova, T, Hann, S, Ludwig, R, y Popov, V. 2014. Effect of the L499M mutation of the ascomycetous *Botrytis aclada* laccase on redox potential and catalytic properties. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 70, 1–11.
- Pardo, I y Camarero, S. 2015a. Exploring the Oxidation of Lignin-Derived Phenols by a Library of Laccase Mutants. *Molecules*, 20, 15929–15943.
- Pardo, I y Camarero, S. 2015b. Laccase engineering by rational and evolutionary design. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- Partow, S, Siewers, V, Bjørn, S, Nielsen, J, y Maury, J. 2010. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 27, 955–964.
- Piontek, K, Antorini, M, y Choinowski, T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 37663–37669.
- Piscitelli, A, Pezzella, C, Giardina, P, Faraco, V, y Giovanni, S. 2010. Heterologous laccase production and its role in industrial applications, 1, 252–262.
- Rivera-Hoyos, C M, Morales-Álvarez, E D, Poutou-Piñales, R a, Pedroza-Rodríguez, A M, Rodríguez-Vázquez, R, y Delgado-Boada, J M. 2013. Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, 27, 67–82.
- Rodgers, C J, Blanford, C F, Giddens, S R, Skamnioti, P, Armstrong, F a, y Gurr, S J. 2010.

- Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends in biotechnology*, 28, 63–72.
- Ruijssenaars, H J y Hartmans, S. 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Applied microbiology and biotechnology*, 65, 177–82.
- Salony, Garg, N, Baranwal, R, Chhabra, M, Mishra, S, Chaudhuri, T K, y Bisaria, V S. 2008. Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1784, 259–268.
- Sanchez-Amat, a, Lucas-Elfo, P, Fernández, E, García-Borrón, J C, y Solano, F. 2001. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochimica et biophysica acta*, 1547, 104–16.
- Shivakumar, D, Williams, J, Wu, Y, Damm, W, Shelley, J, y Sherman, W. 2010. Prediction of Absolute Solvation Free Energies using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6, 1509–1519.
- Shleev, S, Christenson, A, Serezhenkov, V, Burbaev, D, Yaropolov, A, Gorton, L, y Ruzgas, T. 2005. Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode. *The Biochemical Journal*, 385, 745–54.
- Soden, D M, O'Callaghan, J, y Dobson, a D W. 2002. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology*, 148, 4003–4014.
- Suite 2012: Glide, version 58, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012. 2012.
- Téllez-Jurado, a, Arana-Cuenca, a, González Becerra, a E, Viniegra-González, G, y Loera, O. 2006. Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 665–669.
- Terrón, M C, González, T, Carbajo, J M, Yagüe, S, Arana-Cuenca, A, Téllez, A, Dobson, A D W, y González, A E. 2004. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes sp.* 1-62. *Fungal genetics and biology*, 41, 954–62.
- Tøsttrup, H V y Carlsen, S. 1990. A Process for the Production of Human Proinsulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, 35, 339–348.
- Vite-Vallejo, O, Palomares, L à, Dantán-González, E, Ayala-Castro, H G, Martínez-Anaya, C, Valderrama, B, y Folch-Mallol, J. 2009. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 233–239.
- Wach, a, Brachat, A, Pöhlmann, R, y Philippsen, P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10, 1793–1808.
- Warshel, a y Levitt, M. 1976. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic

- and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *Journal of molecular biology*, 103, 227–249.
- Widsten, P y Kandelbauer, A. 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 293–307.
- Xu, F, Shin, W, Brown, S H, Wahleithner, J a, Sundaram, U M, y Solomon, E I. 1996. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1292, 303–311.