



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y  
BIOPROCESOS**

**BÚSQUEDA DE LAS DETERMINANTES  
ESTRUCTURALES DE LA INHIBICIÓN POR PH EN LA  
LACASA DE *CORIOLOPSIS GALLICA***

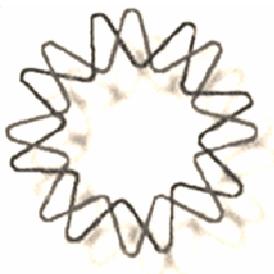
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**BIÓL. EUGENIO DE LA MORA LUGO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA**



CUERNAVACA, MOR

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ÍNDICE

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Introducción .....  | 1  |
| 2     | Antecedentes .....  | 2  |
| 2.1   | El cobre en sistemas vivos.....   | 2  |
| 2.2   | Lacasa .....  | 3  |
| 2.3   | Efecto del pH sobre la actividad oxidante de las lacasas .....                                | 4  |
| 2.4   | Potencial redox de enzima y sustratos .....   | 5  |
| 2.5   | Constantes cinéticas ( $K_M$ y $k_{cat}$ ) .....  | 7  |
| 2.5.1 | Dependencia de $K_M(O_2)$ y $k_{cat}(O_2)$ de la variante enzimática .....                    | 7  |
| 2.5.2 | Dependencia de $K_M(\text{sustrato})$ y $k_{cat}(\text{sustrato})$ con las variaciones de pH. | 8  |
| 2.5.3 | Inhibición .....  | 8  |
| 2.6   | Potencial redox vs. Mecanismo de inhibición .....   | 9  |
| 2.7   | Manipulación del potencial redox .....  | 10 |
| 2.8   | Lacasa de <i>Corioloopsis gallica</i> .....   | 11 |
| 2.9   | Estructura .....  | 11 |
| 2.10  | Mecanismo Molecular para la reducción de $O_2$ a $H_2O$ .....                                 | 14 |
| 3     | Justificación .....   | 15 |
| 4     | Hipótesis .....   | 15 |
| 5     | Objetivos .....   | 16 |
| 5.1   | Objetivo general .....  | 16 |
| 5.2   | Objetivos particulares .....  | 16 |
| 6     | Materiales y Métodos .....  | 16 |
| 6.1   | Caracterización .....   | 16 |
| 6.2   | Purificación .....  | 16 |
| 6.3   | Perfil de actividad-pH .....  | 17 |
| 6.4   | Cristalización .....  | 17 |
| 6.5   | Actividad de los cristales .....  | 17 |
| 6.6   | Colecta de datos .....  | 18 |
| 6.7   | Transporte y criopreservación .....   | 18 |
| 6.8   | Procesamiento de datos .....  | 18 |
| 6.9   | Búsqueda de homólogos, alineamiento y modelo por homología .....                              | 19 |
| 7     | Resultados .....  | 19 |
| 7.1   | Purificación .....  | 19 |
| 7.2   | Ensayos de Actividad .....  | 20 |
| 7.3   | Cristalización .....  | 21 |
| 7.4   | Actividad de los cristales .....  | 23 |
| 7.5   | Difracción .....  | 25 |
| 7.6   | Determinación del grupo espacial .....  | 26 |
| 7.7   | Reemplazo molecular .....   | 27 |
| 7.8   | Afinamiento .....   | 29 |
| 7.9   | Estructuras .....   | 29 |
| 7.10  | Estructura a pH 7 .....   | 31 |
| 7.11  | Estructura a pH 5.5 .....   | 32 |
| 7.12  | Estructura a pH 4.5 .....   | 32 |

|     |                                 |    |
|-----|---------------------------------|----|
| 8   | Discusión .....                 | 36 |
| 8.1 | Sitio T1 .....                  | 36 |
| 8.2 | Sitio T2 .....                  | 37 |
| 8.3 | Sitio T3 .....                  | 40 |
| 8.4 | Acumulación de hidroxilos ..... | 42 |
| 9   | Conclusiones .....              | 45 |
| 10  | Perspectivas .....              | 46 |
| 11  | Referencias .....               | 47 |

## 1 INTRODUCCIÓN

Las lacasas son metaloproteínas redox que contienen cuatro átomos/iones de cobre clasificados en tres diferentes tipos (CuT1, CuT2 y CuT3) por sus propiedades espectroscópicas. Su actividad catalítica consiste en dos reacciones acopladas: la oxidación de un sustrato (donador de electrones) y la concomitante reducción de O<sub>2</sub> (aceptor de electrones) a dos moléculas de H<sub>2</sub>O. Éstas ocurren en diferentes regiones de la proteína. La oxidación del sustrato se lleva a cabo en el sitio de cobre más expuesto al solvente, el cual funge como aceptor de electrones. Los electrones extraídos del sustrato son transferidos al centro trinuclear de cobre que forman los iones restantes y que se localiza en el centro de la proteína, a  $\approx 14$  Å del sitio de oxidación del sustrato. Este mismo sitio es en donde se une y reduce el O<sub>2</sub> con la transferencia secuencial de cuatro electrones.

Si bien la lacasa oxida principalmente sustratos de naturaleza fenólica, su actividad no se restringe a ellos. Es capaz de oxidar un amplio espectro de sustratos que la hace importantes en la industria, pues puede emplearse en una gran variedad de procesos. Un aspecto interesante de su enzimología y limitante de algunas de las aplicaciones, es el comportamiento de la actividad con respecto al pH y al tipo de sustrato oxidado. La oxidación de sustratos fenólicos resulta en un perfil de actividad-pH con forma de campana. En cambio la oxidación de sustratos no fenólicos resulta en un perfil de actividad-pH con decaimiento monotónico. La diferencia en el comportamiento de los perfiles actividad-pH es consecuencia de la suma de efectos del cambio de potencial redox ( $E^\circ$ ) de la enzima y sustratos fenólicos, así como de un proceso de desactivación reversible que, se ha sugerido, ocurre por acumulación de hidroxilos en el centro trinuclear de cobre y no por el cambio de estado de protonación de residuos catalíticos, común en muchas enzimas. El mecanismo por el cual ocurre la desactivación reversible es en realidad una caja negra pues ha sido abordado muy superficialmente evadiendo la descripción de las determinantes estructurales.

En este trabajo resolvimos por cristalografía de rayos X la estructura nativa de la lacasa de *Corioloopsis gallica* a tres distintos valores de pH, correspondientes a tres diferentes estados de actividad de la enzima (pH 4.5 cercano al máximo de actividad, pH 5.5 actividad intermedia y pH 7.0 la forma desactivada). Analizamos las diferencias y a partir de ellas intentamos explicar el fenómeno de desactivación reversible por pH. Encontramos que al pH óptimo para la actividad uno de los cuatro cobres (CuT2) no está presente y otro (CuT1) está con ocupación muy baja. Paradójicamente<sup>□</sup> en las

---

<sup>□</sup> Los cuatro cobres son necesarios para la catálisis.

estructuras correspondientes a los estados de actividad intermedia e inactiva de la enzima sí se encuentran los cuatro cobres. Además, en la estructura a pH intermedio observamos densidad electrónica entre los cobres del centro trinuclear, la cual interpretamos como un intermediario de la reducción del O<sub>2</sub>.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 EL COBRE EN SISTEMAS VIVOS

Las metaloproteínas constituyen la mitad del proteoma de los organismos vivos<sup>1</sup>. De todos los metales presentes en ellas, el cobre es de los más recientes en cuanto a su biodisponibilidad<sup>2</sup>. Hace unos 1,700 millones de años, cuando la atmósfera reductora se transformó en oxidante por la actividad de los organismos fotosintéticos fue que se favoreció la oxidación de Cu(I) a Cu(II), la segunda más soluble y por tanto más bioaccesible<sup>3</sup>. La transformación de la atmósfera provocó cambios en las metaloenzimas redox, entre ellos la necesidad de un metal activo con mayor potencial redox (entre 0-800mV, características del par Cu(I)/Cu(II)<sup>4</sup>).

Actualmente el cobre funge como cofactor clave en varias reacciones biológicas de óxido-reducción. Sobre todo en enzimas que unen, activan y reducen oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) mediante la transferencia de electrones de capas exteriores o interiores<sup>5</sup>. Junto con los centros activos de hierro (Fe), los de cobre dominan el campo de la química biológica del oxígeno, esencial en la catálisis oxidativa tanto biológica como sintética<sup>6</sup>.

Los sitios de cobre se clasifican, de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas, en tipo 1 (CuT1), tipo 2 (CuT2) o tipo 3 (CuT3) (**Tabla1**). Los centros O<sub>2</sub>-reactivos pueden ser mononucleares (CuT1), dinucleares (CuT3) o trinucleares (CuT2 + CuT3), sin que exista correlación entre el número de cobres y la reactividad. Existen, además, iones de cobre involucrados en la transferencia de electrones (tipo 1) o que desempeñan funciones estructurales o incluso aún desconocidas (CueO)<sup>7</sup>.

**Tabla 1.** Características de los cobres de acuerdo a su clasificación<sup>§</sup>.

| Tipo                                | Espectro visible   | EPR <sup>♦</sup>  |
|-------------------------------------|--|---|
| Tipo 1 (CuT1 o azul)                | Máximo de absorción en la región visible a $\lambda \sim 610$ nm ( $\epsilon \sim 4000-5000$ M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ), que le confiere un color azul característico. Esta banda es una transición LMCT (transferencia de carga ligando-metal) entre el azufre de la cisteína y el cobre. | Espectro de EPR con $A_{II} < 95 \times 10^{-4}$ cm <sup>-1</sup> . Producto de la alta covalencia en el sitio. El electrón desapareado está altamente deslocalizado hacia la cisteína, lo que reduce su <i>spin</i> nuclear. |
| Tipo 2 (CuT2 o normal)              | Absorción indetectable   | Forma de línea de EPR de complejos de Cu de bajo peso molecular, $A_{II} > 140 \times 10^{-4}$ cm <sup>-1</sup> . Conocido como 'normal' porque no tiene absorción en el espectro visible pero es activo en EPR.              |
| Tipo 3 (CuT3 o centros binucleares) | Absorción máxima en el UV cercano a $\lambda = 330$ nm, si y solo si el par de cobres se encuentran apareados antiferromagnéticamente mediante un hidroxilo (OH <sup>-</sup> ).  | Sin señal de EPR por el acoplamiento antiferromagnético.  |

## 2.2 Lacasa

El nombre lacasa se deriva del organismo del que fue aislada por primera vez: *Rhus vernicifera* o árbol de laca. Como dato curioso fue una de las primeras enzimas descritas (1883)<sup>11</sup>. La lacasa es una glicoproteína (entre 10-45% de su masa corresponde a glicosilaciones) monomérica, que cataliza la oxidación de una gran variedad de sustratos, predominantemente fenoles<sup>9</sup> (**Figura 1**). Pueden también oxidar sustratos no fenólicos, sólo que para algunos de ellos requieren de la presencia de un mediador<sup>f</sup>.

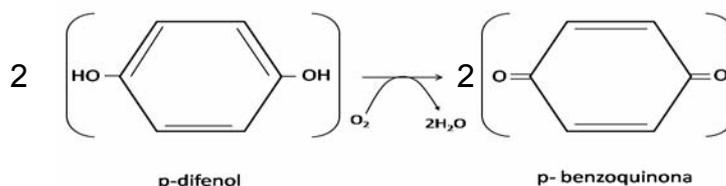
En lo que respecta a su distribución, se les puede encontrar en plantas superiores, hongos, bacterias e insectos. Las vegetales, de distribución es restringida, participan en la síntesis de lignina y en la respuesta a heridas eliminando agentes tóxicos. En hongos su presencia es ubicua. Las hay intra y extracelulares y es común encontrar una o más isoenzimas diferentes en secuencia, número y tipo de glicosilaciones, localización celular y/o tipo de expresión (constitutivo o inducido). Realizan procesos tan diferentes como degradación de lignina, pigmentación de esporas, y detoxificación. Las bacterianas participan en la esporulación<sup>12</sup>, detoxificación<sup>13</sup>, pigmentación<sup>14</sup> y resistencia al Cu<sup>15</sup>. Se encuentran también en insectos pero son las menos estudiadas.

<sup>§</sup> Esta clasificación esta basada en el estado oxidado Cu(II) o Cu<sup>2+</sup>.

<sup>♦</sup> Técnica espectroscópica que detecta especies químicas con electrones desapareados.

<sup>9</sup> La oxidación de compuestos fenólicos es parte de la oxidación celular, protección (formación de pared celular), detoxificación, maduración (fruta) e invasión de hospederos<sup>21</sup>.

<sup>f</sup> Un mediador es una pequeña molécula que funciona como acarreador de electrones entre la enzima y el sustrato. Después de ser oxidado es convertido en radicales estables que a su vez pueden oxidar compuestos de otro modo inaccesibles para la enzima<sup>16</sup>.



**Figura 1.** Reacción general catalizada por la lacasa. Oxidación de un p-difenoL acoplada a la reducción de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . La ecuación quedaría de la siguiente manera:  $\text{O}_2 + 4\text{e}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ .

Su alto potencial biotecnológico ha motivado la búsqueda de diferentes fuentes de enzimas y la síntesis de nuevos mediadores que amplíen su espectro de acción<sup>16,17,18,19</sup>. Además de utilizarse en la biorremediación (degradación de contaminantes tipo clorofenoles, carbazoles, alquenos, fluorenos, fenoles, presentes en colorantes y algunos herbicidas<sup>20,21</sup>) se emplea en procesos industriales que van desde la tinción-decoloración de telas hasta la producción de etanol, incluido su uso en la industria farmacéutica y vitivinícola. Quizá la más desarrollada en la actualidad sea su aplicación en la industria de la pulpa y papel durante la remoción de lignina de tejidos leñosos<sup>22,23</sup>. Se han desarrollado también inmunosensores, microelectrodos y celdas bioenergéticas a partir de estas enzimas. Un ejemplo es el sensor de fase gas-oxígeno que utiliza la lacasa de *Rhus vernicifera* con ascorbato como sustrato reductor. Con él se miden los niveles de oxígeno en productos cuyo empaque requiere bajos niveles del mismo para su conservación<sup>24</sup>.

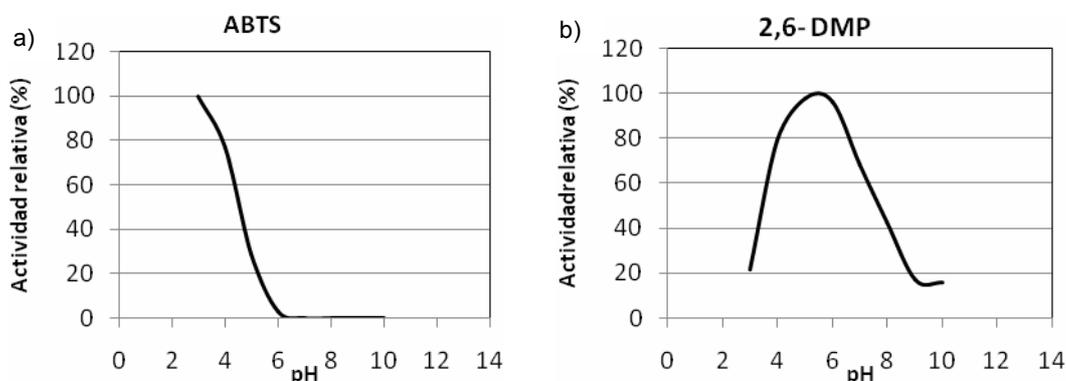
La mayor limitante que enfrenta su uso es la inhibición que sufren en ambientes neutros a alcalinos, en los que se llevan a cabo gran parte de procesos industriales.

### 2.3 Efecto del pH sobre la actividad oxidante de las lacasas

La inhibición por pH es una de las propiedades más llamativas de la enzimología de las lacasas. Lo que la hace interesante es que, a diferencia de la clásica inhibición causada por la protonación/desprotonación de residuos catalíticos que es común en muchas enzimas y que es también producto del cambio de pH, se propone que ocurre mediante un mecanismo de acumulación de hidroxilos en el centro trinuclear.

Este efecto del pH se complica aún más pues el perfil de actividad respecto al pH depende también de la naturaleza del sustrato que se oxide (fenólico o no fenólico). La diferencia entre ambos tipos de sustrato radica en que la oxidación de los no fenólicos, por ejemplo el 2,2'-azino-bis(3-etilbenstiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS), no involucra intercambio de protones y por tanto la protonación del sustrato no interviene en la reacción. En cambio, la oxidación de sustratos fenólicos (2,6-dimetilfenol [2,6-DMP], siringaldazina, etc.) sí involucra intercambio de protones, por lo que el estado de

protonación del sustrato es importante para el perfil de actividad. Si se grafica el perfil actividad-pH para ambos tipos de sustrato se obtienen distintos resultados: una curva monofásica en el caso de los no fenólicos (**Figura 2a**) y una bifásica, con forma de campana, para los fenólicos (**Figura 2b**).



**Figura 2.** Perfiles de actividad relativa y su relación con cambios en el pH en la lacasa de *C. gallica*. a) Oxidación enzimática de sustratos no fenólicos y b) fenólicos (Tomado y modificado de la referencia 20).

Sin embargo, el estado de protonación del sustrato reductor explica solamente el componente de decaimiento de la actividad hacia los valores más ácidos, mas no el decaimiento hacia los pH neutro-básico. Es por esta razón que surge la necesidad de invocar otros elementos. Entre los factores que pueden explicar el comportamiento se encuentran: una disminución del potencial redox ( $E^\circ$ ) del CuT1 ( $E^\circ_{enzima}$ ), cambios en la afinidad tanto por el sustrato reductor como por el  $O_2$ , el mecanismo de desactivación (reversible) por acumulación de hidroxilos e incluso, la protonación ( $pK_a$ ) de residuos en los alrededores de los centros de cobre<sup>25</sup> que ha sido poco estudiada.

## 2.4 Potencial redox de enzima y sustratos

Hay una relación proporcional entre la diferencia de potencial redox del sustrato y la enzima ( $E^\circ_{sustrato} - E^\circ_{enzima}$ ) y la tasa de oxidación del mismo sustrato. Por ello la diferencia de potencial determina la tasa de reacción y el espectro de moléculas que la enzima es capaz de oxidar.

El potencial redox en las lacasas se encuentra entre 300-900 mV<sup>26,27,28</sup>, siendo la de mayor potencial descrito la de *Marinomonas mediterranea*<sup>29</sup>. La magnitud del potencial redox de un sitio metálico<sup>□</sup> depende del número y tipo de residuos que lo coordinan y igual de determinante es el entorno del sitio; las interacciones electrostáticas entre el metal y la proteína (p. ej. la existencia de redes internas de puentes de hidrógeno que involucran a los ligandos del sitio), la accesibilidad al solvente y la anisotropía dieléctrica alrededor del metal<sup>30</sup>.

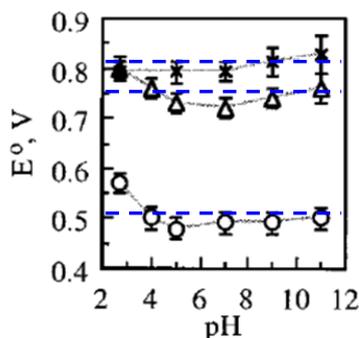
<sup>□</sup> El sitio de oxidación de sustrato en la lacasa es el CuT1.

En todas las oxidasas multicobre azules están conservados los tres residuos que coordinan al CuT1 (dos histidinas y una cisteína) pero hay un cuarto ligando axial que es distinto en las lacasas (**Figura 3**). En ascorbato oxidasa, ceruloplasmina y algunas lacasas hay una metionina, que es reemplazada por leucina o fenilalanina en las lacasas de hongos. Este cambio incrementa el potencial redox del sitio T1 en  $\approx 70$  mV<sup>31</sup>. El aumento del potencial redox no afecta las características del espectro EPR, es decir, la estructura geométrica y electrónica se mantienen sin cambios.

|                  |   |     |
|------------------|---|-----|
| Cgallica         | YRDVVSTG--APGDNVIRFRITDNP--GPWFLHCHIDFHLEAGFAVVM AEDIPDVAATNP | 476 |
| Tversicolor      | FRDVVSTGTPAAGDNVIRFRITDNP--GPWFLHCHIDFHLEAGFAVVF AEDIPDVASANP | 500 |
| Tvillosa         | RRDVVNTG--TVGDNVIRFRITDNP--GPWFLHCHIDFHLEAGFAIVF SEDTADVSNTTT | 500 |
| Rlignosus        | RRDVVSI G--GGGDNVIRFRITDNP--GPWFLHCHIDWHLEAGLAVVFAEDIPNIPIANA | 499 |
| Ccinereus        | KRDVVSLG--VTGDEVIRFRITDNP--GPWFLHCHIEFHLMNGLAIVFAEDMANTVDANN  | 408 |
| Malbomyces       | RRDITMLP---AGGWLLIAFRITDNP--GAWLFHCHIAWHVSGQLSVDFLERPADLRQRIS | 579 |
| Cparasitica      | RRDVMMLP---PKGWLLIAFQTINP--GAWLMHCHIAWHVSAQLNTFLEQPSAFVAGLN   | 560 |
| Phyphochondriaca | AKDIYAVP---NSGYSIIRFWATNP--GYWLFHCHIEFHALMGMTIFHVGEPEDELPPVP  | 665 |
| Fet3p            | RRDILYVR---PQSNFVIRFKADNP--GVWFFHCHIEWHLLQQLLELVLVEDPFGIQDAHS | 510 |
| Rhusverniciflua  | ELNTINLP---RIGWAAIRFVADNP--GVWFLHCHIFERHTEQMATVVIVKDGTTNTSM   | 522 |
| Ecoli            | WKDITVKEG--NVSEVLVKFNHDA PKEHAYMAHCHIELEDTGMLGFTV-----        | 488 |
| Bsubtilis        | WKDTIQAH---AGEVLRIAAATFGPYSGRYVWHCHIELEDYDMRPMDITDPHK-----    | 513 |

**Figura 3.** Alineamiento de secuencias de lacasas. Incluye una secuencia vegetal (*Rhusverniciflua*), una de insectos (*Phyphochondriaca*), una bacteriana (*Bsubtilis*) y las 6 restantes (primeras en la lista) de hongos. También están representadas secuencias de las oxidasas multicobre (MCO) Fet3p y CueO (*Ecoli* en el alineamiento). En el rectángulo morado se señala el tripéptido HCH, conservado en todas las secuencias. En el rectángulo negro punteado se indica el ligando axial del CuT1.

¿Qué pasa con el potencial al acidificarse o alcalinizarse el medio? Al aumentar el pH, el efecto inicial sobre el potencial redox es una disminución de decenas de mV (entre 30-90mV). Ésta se revierte al seguir alcalinizando el medio, regresando al nivel de partida en la mayoría de los casos<sup>32</sup> (**Figura 4**). La magnitud del cambio es especie dependiente.



**Figura 4.** Dependencia del potencial redox ( $E^\circ$ ) de tres lacasas fúngicas a lo largo del intervalo de pH. *Myceliophthora thermophila* (x), *Rhizoctonia solani* ( $\Delta$ ) y *Trametes villosa* (o). (Modificado de la referencia 30).

## 2.5 Constantes cinéticas ( $K_M$ y $k_{cat}$ )

Como toda reacción redox, la catalizada por las lacasas tiene dos componentes: uno de oxidación y otro de reducción. Cada uno de los componentes se puede analizar experimentalmente por separado. Esto nos permite disectar con más precisión en qué momento y cómo afecta el pH al proceso catalítico.

Podemos entonces analizar de manera independiente la oxidación del sustrato reductor y la reducción del  $O_2$ , calcular sus constantes cinéticas ( $k_{cat}(\text{sustrato})$ ,  $K_M(\text{sustrato})$ ,  $k_{cat}(O_2)$  y  $K_M(O_2)$ ) y seguir su comportamiento en un intervalo de pH definido.

### 2.5.1 Dependencia de $K_M(O_2)$ y $k_{cat}(O_2)$ de la variante enzimática

Tanto la reactividad ( $E^\circ$ ) como el pH óptimo de las lacasas varían dependiendo de la fuente u organismo del que provengan, e incluso, de la isoenzima aislada. ¿La variación se debe a una mayor afinidad por el  $O_2$ ? ¿A una mayor velocidad de reacción? O ¿a una combinación de ambas?

Al menos entre lacasas fúngicas, parece no haber diferencias significativas en  $K_M(O_2)$ <sup>25</sup> ( $10 \mu\text{M} < K_M(O_2) < 50 \mu\text{M}$ , a pH 5.5, **Tabla 2**). Los valores de  $K_M(O_2)$  tampoco son dependientes de la naturaleza del sustrato oxidado (**Tabla 2**). Entonces, la interacción con el  $O_2$  es muy similar entre las variantes analizadas.

En el caso de  $k_{cat}(O_2)$  ocurre lo contrario. Sus valores fluctúan hasta en dos órdenes de magnitud. Pero  $k_{cat}(O_2)$  tampoco depende de la naturaleza del sustrato oxidado, pues no hay cambios significativos entre la oxidación de sustratos fenólicos y no fenólicos (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Reactividad del  $O_2$  en diferentes lacasas. (Mes-NaOH, pH 5.5 a 20 °C).

| Organismo                         | ABTS 1 mM (no fenólico)      |                                      |  | Metil Siringato 10 mM (fenólico) |                                      |  |
|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------------|--|
|                                   | $K_M(O_2)$ ( $\mu\text{M}$ ) | $k_{cat}(O_2)$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | $k_{cat}/K_M$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ ) | $K_M(O_2)$ ( $\mu\text{M}$ )     | $k_{cat}(O_2)$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | $k_{cat}/K_M$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ ) |
| <i>Trametes versicolor</i>        | 46 ± 8                       | $(1.2 \pm 0.1) \times 10^3$          | 26.08                                    | 39 ± 11                          | $(1.7 \pm 0.1) \times 10^3$          | 43.59                                    |
| <i>Rhizoctonia solani</i>         | 29 ± 6                       | $(8.4 \pm 0.1) \times 10^2$          | 28.9                                     | 24 ± 4                           | $(4.3 \pm 0.3) \times 10^2$          | 17.19                                    |
| <i>Myceliophthora Thermophila</i> | 24 ± 3                       | $(1.4 \pm 0.1) \times 10^3$          | 58.33                                    | 24 ± 6                           | $(1.0 \pm 0.1) \times 10^3$          | 41.66                                    |
| <i>Scytalidium Thermophilum</i>   | 31 ± 11                      | $(2.1 \pm 0.2) \times 10^1$          | 0.68                                     | 22 ± 2                           | $(1.5 \pm 0.1) \times 10^1$          | 0.68                                     |
| <i>Coprinus cinereus</i>          | 21 ± 2                       | $(2.0 \pm 0.1) \times 10^2$          | 9.52                                     | 34 ± 6                           | $(1.9 \pm 0.1) \times 10^2$          | 5.59                                     |

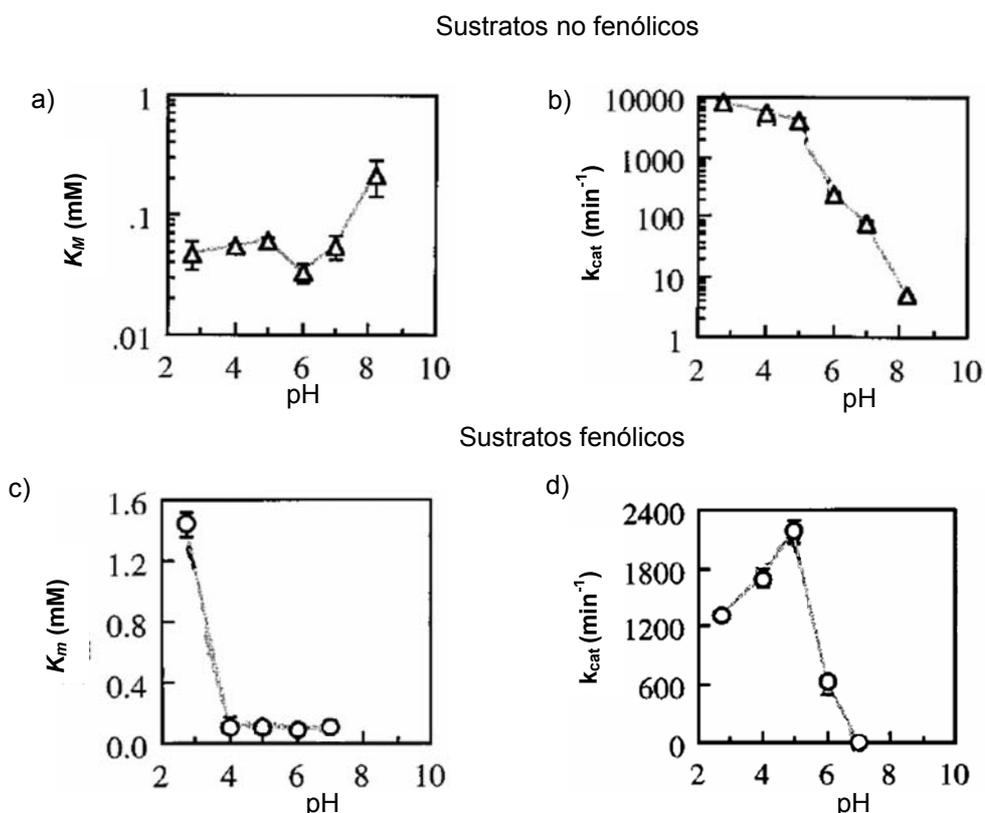
\*Modificado de la referencia 25.

\*1 Los dos sustratos están en concentraciones saturantes.

### 2.5.2 Dependencia de $K_M$ (sustrato) y $k_{cat}$ (sustrato) con las variaciones de pH

Durante la oxidación de sustratos no fenólicos (ABTS) los valores de  $K_M$ (sustrato) aumentan al alcalinizar el medio (**Figura 5a**). En cambio  $k_{cat}$ (sustrato) tiene una relación inversa: disminuye al aumentar el pH (**Figura 5b**). Este comportamiento recuerda la curva monofásica que se obtiene al graficar oxidación de sustratos no fenólicos sobre el intervalo de pH (**Figura 2a**).

En la oxidación de sustratos fenólicos el comportamiento de  $K_M$  y  $k_{cat}$  es totalmente distinto. La primera aumenta en el pH más ácido (**Figura 5c**), mientras que la segunda tiene un comportamiento bifásico cuyo pH óptimo es organismo dependiente (**Figura 5d**).



**Figura 5.** Valores de las constantes cinéticas  $K_M$  y  $k_{cat}$  en relación al pH. a) y b) no fenólicos abajo c) y d) fenólico. (tomado y modificado de la referencia 31).

No han sido reportadas aún las variaciones de  $K_M(\text{O}_2)$  y  $k_{cat}(\text{O}_2)$  sobre el intervalo de pH.

### 2.5.3 Inhibición

Otra forma de obtener información sobre la catálisis es analizar el efecto de inhibidores sobre la actividad catalítica. Entre los inhibidores de las lacasas se encuentran los haluros. Para detallar su mecanismo de inhibición se han calculado los parámetros cinéticos a concentraciones ascendentes de  $\text{NaF}^{31}$ . El valor de  $k_{cat}(\text{O}_2)$  desciende gradualmente conforme aumenta la cantidad de  $\text{F}^-$ , mientras que la afinidad

$K_m(O_2)$  no presenta cambios significativos. Por lo tanto el  $O_2$  y el  $F^-$  no compiten sino que tienen diferentes sitios de unión en el centro trinuclear CuT2/T3. Ya que la unión de  $F^-$  no impide la unión del  $O_2$  al centro trinuclear, debe actuar sobre la transferencia de electrones. De hecho, se ha observado por métodos espectroscópicos que el  $F^-$  se une al CuT2<sup>32,33</sup>, perturbando la configuración del centro CuT2/T3, disminuyendo el potencial redox del centro trinuclear en 200 mV y en consecuencia alterando la transferencia de electrones desde el CuT1

De manera análoga, se propone que el mecanismo de inhibición por aumento de pH procede mediante la acumulación de iones hidroxilo ( $OH^-$ ) en los alrededores del centro trinuclear. Haciendo una analogía con el efecto del  $F^-$ , se sugiere que la unión al CuT2 bloquea la transferencia de electrones, similar a la inhibición por  $F^-$ <sup>20</sup>.

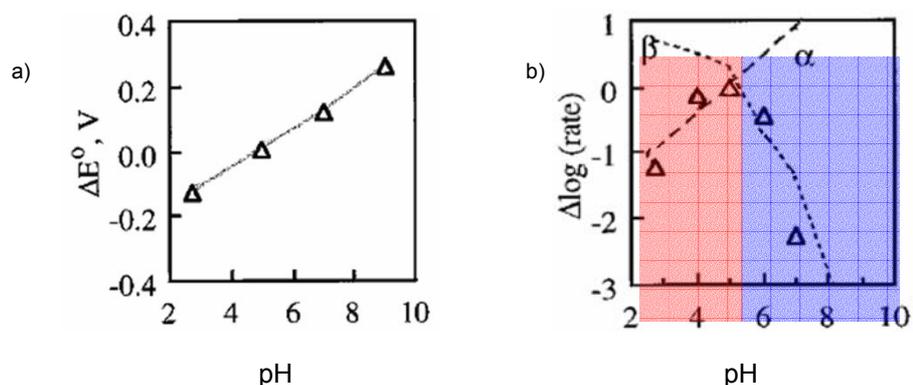
## 2.6 Potencial redox vs. Mecanismo de inhibición

La propuesta inhibición por acumulación de hidroxilos explica el decaimiento monótonico de la oxidación de sustratos no fenólicos o no protonables. Pero no explica el perfil de campana observado durante la oxidación de sustratos protonables. Para ello debemos apelar a la diferencia de potencial entre la enzima y el sustrato ( $\Delta E^\circ = E^\circ_{enzima} - E^\circ_{sustrato}$ )<sup>34,35</sup>.

Una forma muy simple de entender el fenómeno es dividir la curva en dos partes y analizar el comportamiento por separado. La parte ascendente (sombra roja **Figura 6b**) se explica por la liberación oxidativa de un protón del sustrato fenólico. Ésta tiene como consecuencia la disminución de  $E^\circ_{sustrato}$  al aumentar el pH. Puesto que el  $E^\circ_{enzima}$  permanece invariable en el mismo intervalo de pH\* provoca que la diferencia de potencial [ $\Delta E^\circ = E^\circ_{enzima} - E^\circ_{sustrato}$ ] sea mayor al alcalinizar el medio. Con el aumento de la diferencia de potencial aumenta también la fuerza conductora (*driving force*) de la transferencia de electrones. Por ello el incremento de la actividad en esta región de la gráfica. La parte descendente de la curva (en azul **Figura 6b**) es el efecto de la propuesta inhibición por acumulación de hidroxilos.

---

\* Como vimos anteriormente los cambios de  $E^\circ$  de la lacasa son muy bajos  $\leq 0.1$  V.



**Figura 6.** Contribuciones de  $\Delta E^\circ$  y la inhibición por  $\text{OH}^-$  al perfil actividad-pH. **A)** Dependencia de la diferencia de potencial  $\Delta E^\circ = E^\circ(\text{lacasa, CuT1}) - E^\circ(\text{fenol, un electrón como donador})$  de la acidez del medio. **B)** Dependencia de  $\Delta \log(\text{tasa})$  en relación al pH. La contribución de  $\Delta E^\circ$  al perfil actividad-pH está representado por el área roja y la recta  $\alpha$  ( $\log(\text{tasa}) = 7.1 \times \Delta E^\circ + 7.0$ ). El área azul señala la zona de la curva que es determinada por la acumulación de hidroxilos, junto con la línea punteada  $\beta$  que se deriva de las constantes aparentes  $k_{\text{cat}}$  y  $K_m$ . \*Modificado de la referencia 31.

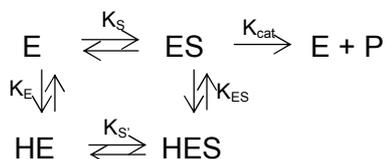
En lo que se refiere a sustratos fenólicos, recordemos que no interviene la protonación del sustrato; simplemente se observa un descenso monótonico en la actividad como consecuencia de la acumulación de hidroxilos.

## 2.7 Manipulación del potencial redox

Respecto a modificar el óptimo de actividad se han realizado un par de trabajos<sup>36,37</sup> ambos enfocados en el CuT1. Para ser más precisos mutando los ligandos axiales del sitio. Ninguno de ellos habla de modificaciones sobre residuos de los alrededores del centro trinuclear (donadores de protones, los residuos en los canales de entrada y salida del  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  respectivamente). Tampoco se ha explorado el potencial redox del centro trinuclear CuT2/T3. Éste fluctúa entre 344 mV (ascorbato oxidasa de *Cucurbita pepo medullosa*)<sup>38</sup> y 782 mV (lacasa de *Polyporus versicolor*)<sup>39</sup>. Siendo lo más probable que varíe también entre las mismas lacasas.

Aunque la descripción del mecanismo enzimático ha sido abordada a nivel estructural aún quedan muchas cuestiones por resolver, en particular sobre cómo ocurre la inhibición. ¿Hay residuos de aminoácido involucrados en la estabilización de los hidroxilos? De ser así ¿cuáles son? Y ¿es posible modificar el potencial redox y el perfil de actividad mediante ingeniería de proteínas? En lacasas fúngicas el pH óptimo para la oxidación de sustratos fenólicos fluctúa en el intervalo de 3-7<sup>40</sup> (*Coriolus hirsutus* ~ 3.5-4; *Schinus molle* ~ 6.2; *Schizophyllum commune* de ~ 5.4-6; *Rhizoctonia praticola* ~ 6-7, *C. gallica* ~ 4), mientras que en enzimas vegetales puede ser tan alcalino como 9<sup>41</sup>. La variabilidad del óptimo de actividad sugiere que existen determinantes estructurales, distintas a los residuos conservados en los sitios de cobre, involucradas en el proceso de inhibición y en la relación de la actividad con el pH.

Por todo lo anterior, la reacción planteada en la **Figura 1** es una representación muy simplificada de la reacción. Para representar la participación del pH es necesario considerar los estados de protonación tanto de la enzima como del sustrato. El caso más sencillo que es el del modelo de Michaelis-Menten<sup>42</sup> el mecanismo debiera ser como sigue:



en donde  $K_E$ , y  $K_{ES}$  son las constantes de ionización de la enzima libre y del complejo enzima sustrato mientras que  $K_S$  y  $K_{S'}$  son las constantes de disociación del complejo  $ES$  y  $HES$ . Con este enfoque es posible calcular la dependencia de  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_m$  y  $1/K_m$ . Puesto que el modelo de Michaelis-Menten es una sobresimplificación y asume la reversibilidad en el complejo enzima-sustrato, cosa que no ocurre en la reacción catalizada por la lacasa, se han publicado varios trabajos<sup>43,44,45</sup> tratando de modelar la reacción, aunque aún presentan inconsistencias.

No desarrollaremos más el tema porque la elaboración de un mecanismo catalítico rebasa los objetivos de esta tesis.

Retomando el mecanismo de la desactivación por hidroxilos, éste se apoya en evidencias derivadas de estudios espectroscópicos, mientras que las estructuras cristalográficas de lacasas no han mostrado ni al  $F^-$  ni al o los  $OH^-$  unidos al  $CuT2$ . Entonces, el objetivo de esta tesis es, a través de la cristalografía de rayos X, reforzar la evidencia espectroscópica o de lo contrario proponer un mecanismo de inhibición distinto y extrapolarle a las demás oxidasas multicobre azules.

## 2.8 Lacasa de *Coriopsis gallica*

En un trabajo previo se caracterizó el perfil actividad-pH de la lacasa de *C. gallica*<sup>20</sup>. Para la oxidación de sustratos fenólicos (2,6-DMP, siringaldazina y catecol) la máxima actividad ocurre a pH 4, mientras que si el pH es menor a 2 y mayor a 7 la enzima se encuentra inhibida prácticamente al 100%. En la oxidación de sustratos no fenólicos (ABTS y ferrocianuro de potasio) la inhibición también ocurre a pH mayor de 7. La caracterización de la enzima no fue más allá de los perfiles de actividad, pues se utilizó como punto de comparación para la lacasa de *Marinomonas mediterranea*.

## 2.9 Estructura

Al momento de comenzar este trabajo en el banco de datos de Proteínas (PDB)<sup>46</sup> se habían depositado 17 estructuras de lacasas. Ahora la cifra asciende a 23. De ellas 13

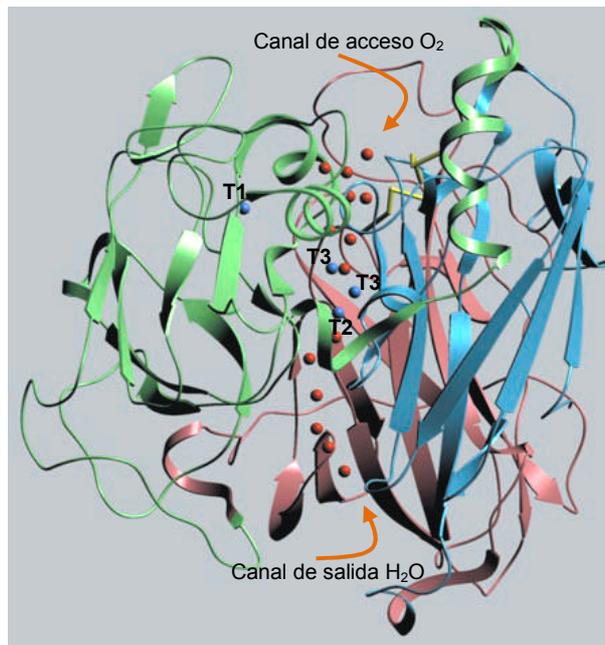
son bacterianas: 12 de *Bacillus subtilis* en diferentes condiciones y una de *Streptomyces antibioticus*. Las 11 restantes son proteínas provenientes de hongos (**Tabla 3**). Una búsqueda de homólogos (con la secuencia proteica) utilizando como blanco la de *C. gallica* (realizada en el servidor BLAST<sup>47</sup>) muestra más de 50 secuencias con porcentaje de identidad mayor al 70%. Los residuos involucrados en la coordinación de los cuatro cobres están conservados en todas ellas.

**Tabla 3.** Estructuras de lacasas depositadas en el PDB.

| pH  | Fuente   | Resolución (Å) | R/Rfree (%) | ID   | I/σ         | Compleción  | Redundancia |
|-----|--|----------------|-------------|------|-------------|-------------|-------------|
| 4.2 | <i>B. subtilis</i>                             | 1.7            | 18 / 20     | 1GSK | 26.4 (2.5)  | 99.9 (100)  | 3.5 (2.5)   |
| 5.5 | <i>B. subtilis</i> <sup>48</sup>               | 2.2            | 0.16 / 0.20 | 1W6W | 8.98 (3.3)  | 99.9 (99.5) | 4.3 (4.3)   |
| 5.5 | <i>B. subtilis</i> <sup>48</sup>               | 2.2            | 0.16 / 0.20 | 1W8E | 21.7 (3.89) | 99.9 (100)  | 4.3 (4.3)   |
| 5.5 | <i>B. subtilis</i> <sup>48</sup>               | 2.5            | 0.18 / 0.21 | 2BHF | 28.2 (3.44) | 99.5 (98.9) | 3.63 (3.69) |
| 6   | <i>B. subtilis</i> <sup>49</sup>               | 2.5            | 0.20 / 0.25 | 1OF0 | 5.9 (1.95)  | 99.9 (93.8) | 5 (2)       |
| 6   | <i>B. subtilis</i> <sup>49</sup>               | 2.7            | 0.20 / 0.23 | 1OGR | 4 (1.5)     | 99.7 (98.9) | 3 (1.5)     |
| 7   | <i>B. subtilis</i> <sup>50</sup>               | 2.5            | 0.20 / 0.26 | 1HKZ | 4.5 (2.3)   | 95.9 (90.3) | 3.5 (3)     |
| 7   | <i>B. subtilis</i> <sup>49</sup>               | 2.8            | 0.20 / 0.25 | 1HL0 | 5 (2)       | 95.5 (91.6) | 2.5 (1)     |
| 7   | <i>B. subtilis</i> <sup>49</sup>               | 2.7            | 0.19 / 0.24 | 1HL1 | 4.7 (4.7)   | 99 (90.1)   | 5 (5)       |
| 7   | <i>B. subtilis</i> <sup>50</sup>               | 2.5            | 0.12 / 0.15 | 1UVW | 6.6 (2)     | 99.9 (100)  | 5 (2)       |
| 7   | <i>B. subtilis</i> <sup>49</sup>               | 2.3            | 0.20 / 0.22 | 1HKP | 6.4 (2.2)   | 95.5 (91.6) | 3.1 (3.1)   |
| 5.5 | <i>Cerrena maxima</i> <sup>51</sup>            | 1.9            | 0.19 / 0.24 | 2H5U | ---         | ---         | ---         |
| 5.5 | <i>Coprinus cinereus</i> <sup>52</sup>         | 1.7            | 0.18 / 0.21 | 1HFU | 22.2 (10)   | 96 (91.9)   | 4.6 (2.3)   |
| 5.5 | <i>C. cinereus</i> <sup>53</sup>               | 2.2            | 16 / 22     | 1A65 | 8.4 (4.8)   | 99.6 (98.5) | 5.4 (5.2)   |
| 4.2 | <i>Melanocarpus albomyces</i> <sup>54</sup>    | 2.4            | 0.19 / 0.25 | 1GW0 | 7.5 (---)   | 95 (86.7)   | 1.9 (1.8)   |
| 5   | <i>M. albomyces</i> <sup>55</sup>              | 2              | 0.18 / 0.21 | 2IH8 | 17.1 (3.2)  | 99.8 (100)  | 3.8 (3.8)   |
| 5   | <i>M. albomyces</i> <sup>55</sup>              | 2              | 0.26 / 0.30 | 2IH9 | 11.8 (5.6)  | 99.3 (99.2) | 3.7 (3.6)   |
| 6.5 | <i>Rigidoporus lignosus</i> <sup>56</sup>      | 1.7            | 0.23 / 0.27 | 1V10 | 6.6 (2)     | 99.9 (100)  | 2.9 (---)   |
| 5   | <i>Streptomyces antibioticus</i> <sup>57</sup> | 2.3            | 0.16 / 0.23 | 2G23 | 11.6 (2.6)  | 86.3 (72.4) | 2.4 (2.2)   |
| 5.6 | <i>Tametes versicolor</i> <sup>58</sup>        | 1.9            | 0.16 / 0.21 | 1GYC | 15.1 (---)  | 99.4 (---)  | 4.4 (---)   |
| 6.5 | <i>T. versicolor</i> <sup>59</sup>             | 2.4            | 0.25 / 0.28 | 1KYA | 22.2 (10)   | 96 (91.9)   | 22 (---)    |

\*Entre paréntesis los datos de la franja de mayor resolución

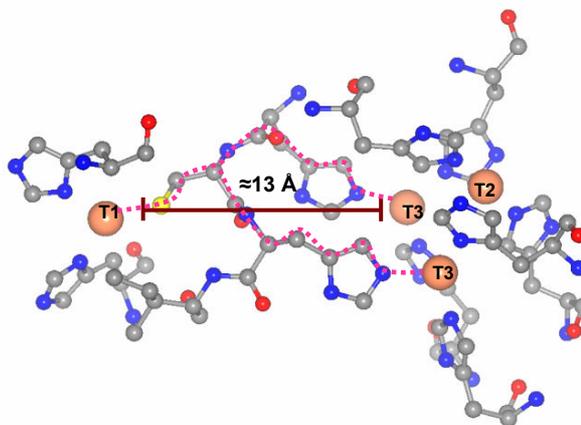
El plegamiento de la lacasa (**Figura 7a**) consiste en tres dominios globulares secuenciales con arquitectura de sandwich  $\beta$ <sup>54,60</sup>. El CuT1 se localiza en una cavidad del dominio 3. El centro trinuclear CuT2/T3 está en la interfase de los dominios 2 y 3. Los residuos que coordinan a los cobres están distribuidos equitativamente en cada dominio. En las enzimas de hongos, la estructura es estabilizada por dos puentes disulfuro que unen a los dominios 1-3 y 1-2. El sustrato se une en una pequeña cavidad en la superficie cercana al cobre CuT1. El O<sub>2</sub> difunde por un canal de entrada que desemboca en los dos CuT3 (**Figura 7b**). Cuando el dióxigeno ha sido reducido a dos moléculas agua, éstas son liberadas por un canal de salida que va del CuT2 hacia la región del solvente (**Figura 7b**).



**Figura 7.** a) Plegamiento de la Lacasa de *Trametes versicolor* mostrando los tres dominios y los cuatro sitios de Cu (esferas azules). b) Canales de acceso y salida al y centro trinuclear. El solvente está representado como esferas rojas y los sitios de cobre como esferas azules (tomada y modificada de la referencia 58).

Los CuT3 están coordinados por tres histidinas cada uno, mientras que el CuT2 está por dos histidinas y una molécula de agua o hidroxilo. Debido a la menor fuerza de sus coordinaciones y a su mayor exposición al solvente, el CuT2 es el más lábil de los cuatro cobres.

Como mencionamos anteriormente, la oxidación del sustrato ocurre en el CuT1 y la reducción del O<sub>2</sub> en el centro trinuclear. Los electrones extraídos del sustrato deben ser transferidos del CuT1 al centro CuT2/CuT3 que se encuentra a una distancia de ~13 Å. El transporte se realiza por la vía CuT1-Cys-His-CuT3: la conexión más directa entre los sitios de oxidación del sustrato y de reducción del oxígeno molecular (**Figura 8**).



**Figura 8.** Vía CuT1-Cys-His-CuT3 para el transporte de electrones (representada por las líneas punteadas color magenta).

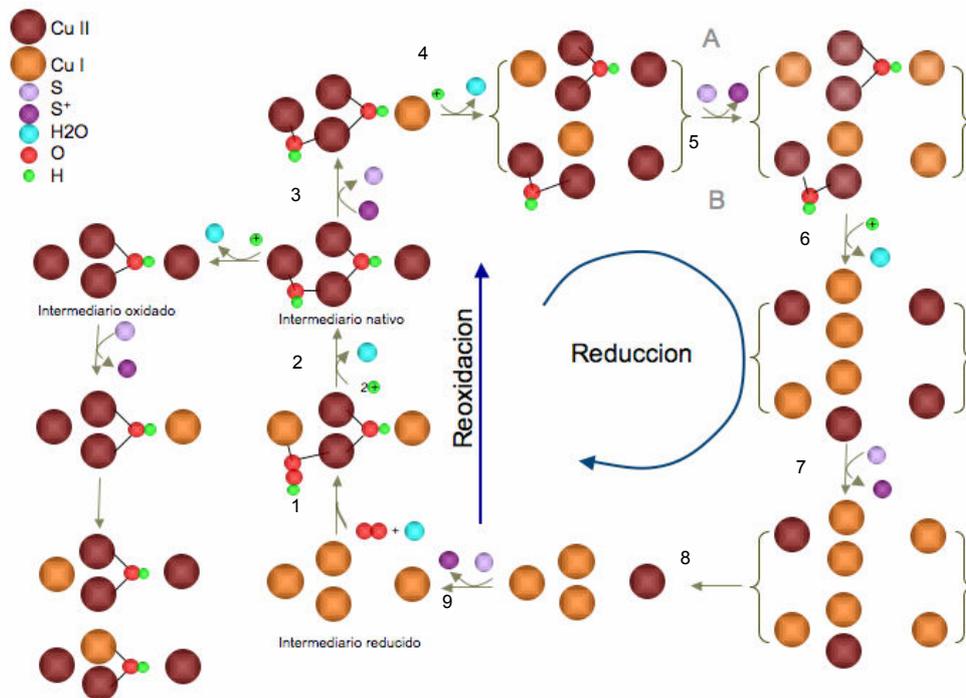
## 2.10 Mecanismo Molecular para la reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O.

El estudio de un sistema muy complejo, como lo es la lacasa, ha sido abordado por diversos acercamientos. Por enzimología, sobre la que ya hemos hablado. Por espectroscopía, caracterizando diferentes formas de la enzima: una en la que se ha sustituido el CuT1 por mercurio (Hg)<sup>61</sup> (para eliminar la señal del sitio y tener datos más informativos de los sitios restantes), otra carente del cobre T2<sup>62,63</sup> y la forma con el complemento completo de cobres. Y por último, por cristalografía de rayos X (**Tabla 3**). Si bien no se conoce con detalle el mecanismo catalítico, la combinación de estos enfoques en la familia de oxidasas multicobre ha proporcionado información suficiente para aproximarnos a él<sup>64</sup>.

El primer paso es la entrada del dióxígeno hacia el centro trinuclear. El O<sub>2</sub> difunde y se une entre los dos cobres tipo 3 de la enzima en su forma reducida (**Figura 9** paso 1). La forma en que se une no se conoce, pero se propone que se posiciona simétricamente entre los CuT3, con uno de los oxígenos más cercano al Cu T2. En la estructura determinada en este estadio<sup>65</sup>, las distancias cobre-oxígeno están en el intervalo 2.2-2.6 Å y aunque no pudo determinarse el estado de oxidación por cristalografía, los cobres deberían de encontrarse en el estado oxidado Cu<sup>+2</sup>.

Tras la transferencia de dos electrones<sup>61</sup> se forma el intermediario peróxido (O<sub>2</sub><sup>2-</sup>). Este se inclina hacia el eje imaginario entre los dos cobres T3 disminuyendo las distancias Cu-O a 1.95 Å (Cu T3) y 2.01 Å (CuT2). Otros dos electrones son asimilados junto con dos protones, dando lugar a la ruptura del peróxido y la formación de dos grupos hidroxilo (**Figura 9** paso 2). Los donadores de protones no se conocen pero se piensa que son residuos ácidos que rodean al canal de acceso<sup>66</sup>. Uno de los hidroxilos se mantiene formando un puente entre los dos CuT3, mientras que el segundo migra al lado opuesto del CuT2 formando un enlace Cu-OH. Esta estructura es la equivalente al estado de reposo en la ascorbato oxidasa. Ese cambio de posición del hidroxilo requeriría un cambio de conformación de las dos histidinas que coordinan al CuT2<sup>48</sup>.

La última etapa es la unión de otro protón al hidroxilo que permanece unido al CuT2 y la posterior liberación de la primera molécula de agua al interior del canal. El hidroxilo que queda enlazando a los CuT3 migra al CuT2, acepta un protón y se libera como la segunda molécula de agua, dejando el sitio desocupado para el inicio del siguiente ciclo catalítico. En ausencia de O<sub>2</sub> la estructura permanecerá en estado reducido (**Figura 9** paso 9).



**Figura 9.** Ciclo catalítico de la lacasa mostrando los dos mecanismos propuestos para la reducción y reoxidación de los sitios de cobre. **A)** Los sitios T1 y T2 juntos reducen el par T3, alternativamente **B)** cada cobre en el centro trinuclear es secuencialmente reducido por la transferencia de electrones desde el sitio T1 en cuyo caso los cobres T3 no actúan como aceptores de dos electrones. Del lado izquierdo se observa el lento decaimiento del intermediario nativo que conduce a la forma completamente oxidada en estado de reposo, forma en la que el T1 puede todavía ser reducido por el sustrato pero la transferencia de electrones al centro trinuclear es muy lenta para ser relevante catalíticamente. (Modificado de la referencia 64).

En resumen, la reducción del  $O_2$  por la enzima completamente reducida ocurre en dos etapas, separadas entre sí por la barrera energética que hay entre la segunda y tercera transferencia de electrones, determinada por la ruptura del enlace O-O.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

Siendo la inactivación por pH una de las mayores limitantes para las aplicaciones tecnológicas de las lacasas, es de suma importancia comprender las determinantes estructurales que la provocan.

### **4 HIPÓTESIS**

La forma cristalina de la lacasa corresponde a la forma activa de la enzima, por lo que la difracción a diferente pH nos permitirá encontrar diferencias que nos conduzcan a la descripción de las determinantes estructurales que llevan a la inhibición de la enzima.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Encontrar las determinantes estructurales de la inhibición por pH a partir de cristales difractados a tres diferentes valores de pH: cercano al óptimo de actividad, a un pH de actividad intermedia y al pH de inhibición.

### 5.2 Objetivos particulares

- i. Caracterizar a la lacasa de *C. gallica*; determinar su punto isoeléctrico, peso molecular y estado de oligomerización.
- ii. Obtener la enzima a una pureza  $\geq 95\%$  previo a los experimentos de cristalización.
- iii. Encontrar y optimizar las condiciones de cristalización.
- iv. Obtener *data-sets* completos de cristales a tres pH distintos.
- v. Resolver las fases por el método de reemplazo molecular y afinar los modelos de los datos obtenidos a diferentes valores de pH.
- vi. A partir de los modelos describir las determinantes estructurales de la inhibición causada por el aumento de pH.

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Caracterización**

Antes de cualquier paso de purificación caracterizamos a la lacasa de *C. gallica* (AltaEnzymes<sup>®</sup>, extraída directamente del hongo) por punto isoeléctrico, peso molecular y estado de oligomerización. El isoelectroenfoque se realizó en un equipo Phast System (Pharmacia). Los geles de poliacrilamida (al 12%) para electroforesis se hicieron en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y sin agregar agentes reductores, con y sin calentar la proteína a 96°C durante 2 minutos.

### **6.2 Purificación**

Antes de purificar se dializaron entre 100-400  $\mu$ L de proteína (~10 mg/ml) en 500 mL de MES (Sigma) 50 mM pH 5.5, durante 6 y 8 horas con un cambio de solución amortiguadora fresca entre ambos intervalos de tiempo. La muestra dializada fue llevada a un volumen de 5mL del mismo amortiguador para ser inyectada en una columna de exclusión molecular (HiLoad 26/60 Superdex 200 *prep grade* de Pharmacia). Concentramos el eluido en tubos Amicon Ultra (Millipore) con membrana de 10 kDa hasta alcanzar una concentración final de proteína de 10-15 mg/mL. Cuantificamos concentración de proteína por el método Bradford<sup>67</sup> y por

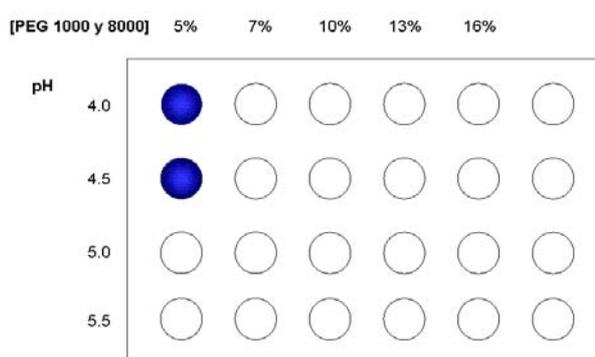
absorbancia a 280 nm ( $\epsilon = 62590 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) utilizando un espectrofotómetro Helios Gamma UV-Vis (Thermo).

### 6.3 Perfil de actividad-pH

El perfil de actividad vs. pH se realizó utilizando como referencia trabajos anteriores del grupo<sup>20</sup>. Para los ensayos cualitativos de actividad realizados en el intervalo de pH 3-7 utilizamos las siguientes soluciones amortiguadoras: succinatos 50 mM pH 3, acetatos 60 mM pH 4, fosfatos 100 mM pH 5, fosfatos 60 mM pH 6, fosfatos 100 mM pH 7 (todos de Sigma). Incubamos la enzima durante una hora en la solución amortiguadora antes de agregar el sustrato (no fenólico= ABTS, fenólico= 2,6-DMP). La oxidación de ABTS (5 mM) se siguió por la aparición de producto a 436 nm ( $\epsilon = 29.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y la de 2,6-DMP (2 mM) a 468 nm ( $\epsilon = 14.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente (25°C) en un volumen de 1 mL con 1  $\mu\text{L}$  ( $\approx 0.15 \text{ mg/mL}$ ) de enzima. Cada medición se realizó por triplicado.

### 6.4 Cristalización

Las pruebas de cristalización se montaron bajo el método de la gota colgante. Para ello utilizamos los kit *Crystal screen 1 y 2* (Hampton Research). Para la optimización de las condiciones de cristalización diseñamos una matriz con [PEG] y pH como variables (**Figura 10**), montadas a dos temperaturas distintas (4 y 18 °C). En todas las condiciones se utilizó agua tetradestilada, soluciones al 50% (w/v) de PEG 1000 y 8000 (Hampton Research) y MES 50 mM ajustado a los diferentes valores de pH.



**Figura 10.** Matriz de optimización. Sobre el eje 'x' variación de la concentración de PEG 1000 y PEG 8000 (5-16%). Sobre 'y' la variación del pH (4.0-5.5). En azul los pozos en donde encontramos cristales.

### 6.5 Actividad de los cristales

Las pruebas de actividad con la enzima cristalizada se realizaron mediante reacciones cualitativas. Para ello disolvimos cristales en una solución amortiguadora de acetatos 50 mM pH 4.5 o MES 50 mM pH 4.5. En ambos casos seguimos la aparición del producto oxidado de 2,6-DMP como se explicó anteriormente.

Las pruebas de actividad *in situ* se realizaron previa transferencia de los cristales crecidos a pH 4.5 a una gota de líquido madre, agregando 1  $\mu$ L de 2,6-DMP 2 mM disuelto en la misma solución madre y seguimos los cambios de coloración en el cristal en el tiempo.

## 6.6 Colecta de Datos

Las primeras pruebas de difracción se realizaron en el Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas (LUEP) del Instituto de Química (U.N.A.M.) utilizando un generador Rigaku RU200 y un detector RAXIS IIc. La distancia del cristal al detector fue de 110 mm y la longitud de onda ( $\lambda$ ) de los rayos X de 1.54 Å. Las demás colectas se realizaron en las instalaciones del Instituto de Biotecnología, U.N.A.M. (generador Rigaku RU200,  $\lambda$ = 1.54 Å, detector Raxis IV y sistema de enfriamiento de Oxford Cryosystems). Todas las colectas se realizaron a 100 K.

## 6.7 Transporte y Crioprotección

Transportamos los cristales del cuarto de 4°C al cuarto de difracción sumergidos en nitrógeno líquido, previa crioprotección, colocándolos lo más rápido posible en el haz de nitrógeno (100 K).

Como primer criopreservador utilizamos una solución de PEG 1000 y PEG 8000 al 20% (w/v) cada uno. Debido a la alta mosaicidad de los cristales y la presencia de anillos de hielo probamos nuevas soluciones y métodos de criopreservación. Intentamos sin éxito con dos soluciones de los aceites Al's Oil (mezcla 1:1 de parafina y silicón) y Paratone-N (ambos de Hampton Research), una al 50% cada uno y la segunda con 70 % de Al's oil y 30% de Paratone-N. Probamos también agregar 20 % y 30% de glicerol al líquido madre sin obtener buenos resultados. Por último, como sugerencia de la Dra. Elspeth Garman, intentamos con éxito la solución criopreservadora formada por 25% (w/v) PEG 1000, 15% (v/v) PEG 400 y 5% (w/v) PEG 8000.

## 6.8 Procesamiento de datos

La determinación del grupo espacial, la estimación de mosaicidad y la integración de datos se realizaron con el programa `Mosflm`<sup>68</sup>. El ordenamiento y escalamiento de los datos se efectuó en `Scala`<sup>69</sup>, mientras que el reemplazo molecular fue resuelto en `Molrep`<sup>70</sup> utilizando como plantilla un modelo por homología de la lacasa de *C. gallica* (construido durante esta tesis). El afinamiento de cuerpos rígidos y restricción geométrica se llevaron a cabo en `Refmac`<sup>71</sup> versión 5. Todos los programas anteriores funcionando bajo la *suite* `CCP4`<sup>72</sup> versión 6.0.0. De acuerdo a la densidad electrónica calculada realizamos modificaciones manuales de la secuencia original, asas y

cadena laterales con el programa `COOT`<sup>73</sup>. Por último, ajustamos la ocupación<sup>¶</sup> de los sitios de cobre con dos criterios: 1) que el valor de los valores  $B^\diamond$  del metal fuera similar al de los residuos que lo coordinan, y 2) que el número de electrones modelados coincidiera con la densidad experimental.

### 6.9 Búsqueda de homólogos, alineamiento y modelo por homología

Buscamos en el GeneBank<sup>74</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) los genes correspondientes a la lacasa de *C. gallica*. Hay 10 depósitos de los cuales sólo 4 son la secuencia completa. De ellas tomamos la secuencia depositada bajo el número AAK02068 para elaborar un modelo basado en homología y usarlo como blanco en el reemplazo molecular.

La búsqueda de homólogos se hizo con el programa `WU-BLAST2`<sup>75</sup> y los alineamientos en `CLUSTALW`<sup>76</sup>, ambos en el servidor del EBI (*European Bioinformatics Institute*, <http://www.ebi.ac.uk>), utilizando los parámetros *default*.

El modelo por homología se construyó utilizando SWISS-MODEL<sup>77</sup> en el servidor ExpASY (<http://www.expasy.org/>) a partir de la secuencia de la lacasa de *C. gallica* y utilizando como molde los archivos de coordenadas tridimensionales de lacasas fúngicas depositados en el PDB.

---

<sup>¶</sup> Ocupación se refiere al promedio de sitios ocupados por un átomo X en todas las moléculas del cristal.

<sup>♦</sup> Factores B o valores de temperatura. Mejor definidos como valores de desplazamiento térmico.

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 Purificación**

Para evaluar el grado de pureza de la enzima realizamos un gel de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). En él observamos tres bandas. La de mayor concentración correspondió al peso calculado de acuerdo a la secuencia de *C. gallica* ( $\approx 50$  KDa). La más masiva de las tres ( $>100$  KDa) la interpretamos como una dimerización (recordemos que las lacasas son monoméricas). La de menor tamaño ( $<30$  KDa) la interpretamos como un contaminante o producto de autólisis.

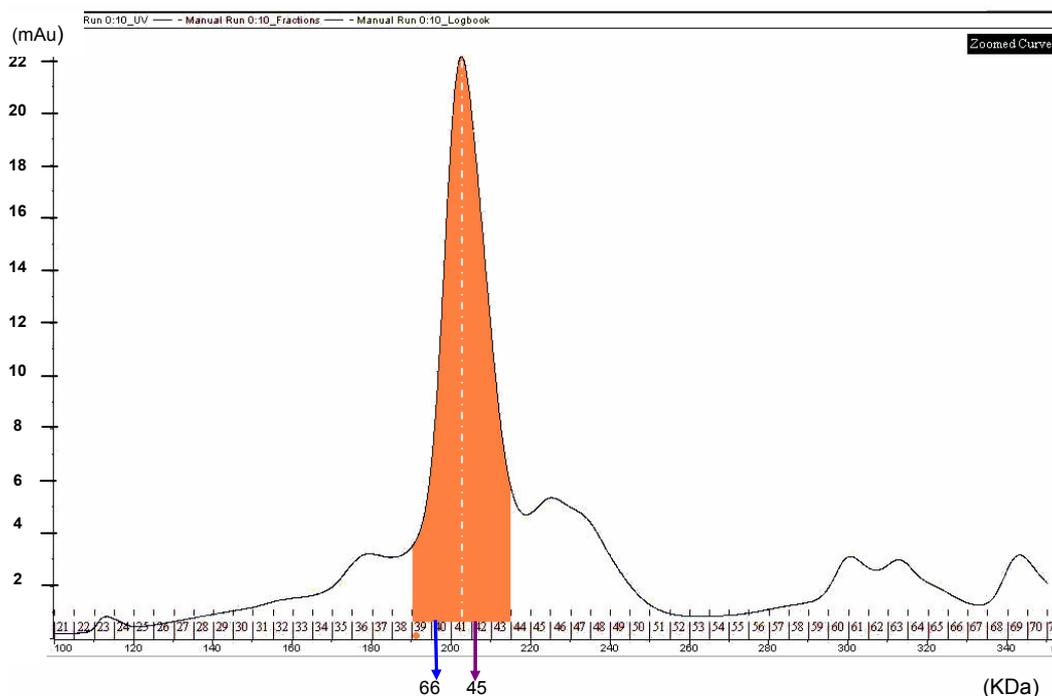
La banda superior desapareció cuando eliminamos del protocolo la incubación de la enzima a  $96^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Pero la banda de menor talla no desapareció.

Con la misma muestra realizamos un gel de isoelectroenfoque. Tras teñir el gel observamos nuevamente dos bandas, ahora correspondientes a  $\text{pI}=3.5$  y  $\text{pI}=4.5$ . La primera en una proporción considerablemente mayor que la segunda (dato no mostrado).

Elegimos la cromatografía de exclusión molecular como método para purificar la proteína. Tras pasar la muestra por la columna obtuvimos un pico bien definido

alrededor de los 50 KDa (**Figura 11**); dentro del intervalo de peso esperado para nuestra enzima (56KDa).

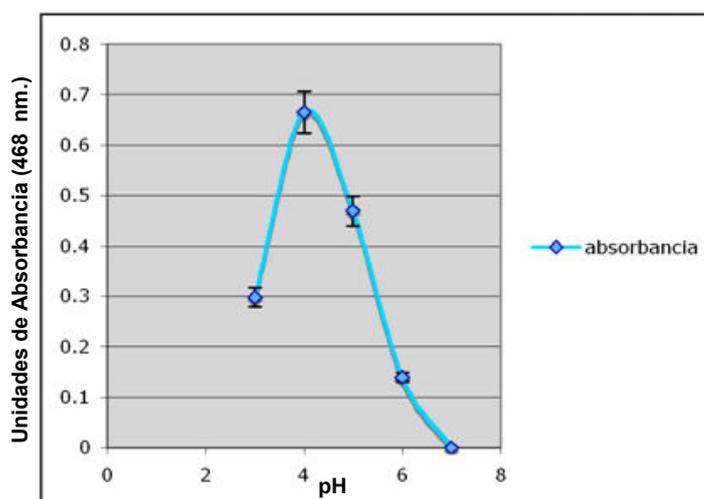
Tomamos el eluido de la columna correspondiente a la lacasa (sección naranja **Figura 11**) y concentramos la proteína en tubos Amicon Ultra (Milipore). Realizamos un nuevo gel de electroforesis desnaturalizante (PAGE-SDS) con el protocolo modificado. En esta ocasión obtuvimos una sola banda dentro del intervalo de masa molecular de la lacasa (no mostrado). También realizamos un segundo isoelectroenfoco en el que sólo observamos la banda de  $pI = 3.5$ . Es decir, eliminamos la banda de menor peso molecular que correspondía al  $pI$  de 4.5 y obtuvimos así una muestra de una pureza mayor de 95 %.



**Figura 11.** Cromatograma de la columna de exclusión molecular (HiLoad 26/60 Superdex 200 *prep grade* de Pharmacia). En naranja se muestran los tubos colectados tras la purificación.

## 7.2 Ensayos de Actividad

Antes de pasar a la cristalización debíamos mostrar que la proteína purificada se encontraba en la forma activa. Para ello hicimos una prueba de actividad con 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) como sustrato, a lo largo del intervalo de pH 3-7. El perfil de actividad obtenido es bifásico o de campana, típico de la oxidación de sustratos fenólicos. El máximo de actividad se encuentra a pH 4, mientras que la actividad es nula a pH neutro (**Figura 12**).



**Figura 12.** Perfil actividad vs pH durante la oxidación de 2,6-DMP siguiendo la aparición de producto oxidado a 468 nm.

### 7.3 Cristalización

Comenzamos la búsqueda de condiciones de cristalización basándonos en una revisión de aquellas lacasas homólogas cuyas estructuras cristalógicas habían sido reportadas. A pesar de que las fuentes son distintas, encontramos en común la presencia de PEG 8000 en tres de ellas y el que dos de ellas partieron de los *kits Crystal screen I y II* (Hampton Research) (**Tabla 4**). Con base en esas observaciones, las primeras pruebas de cristalización se hicieron con las 98 soluciones de dichos *kits* a una temperatura de 18 °C.

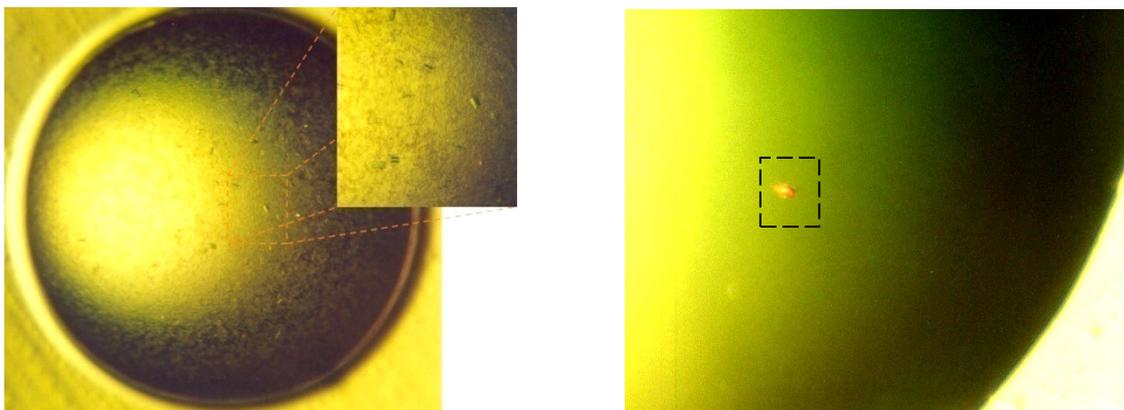
**Tabla 4** Condiciones de cristalización de lacasas fúngicas.

| Especie                                      | Condiciones de cristalización  |   |   |
|--|--|---|---|
|  | Solución Amortiguadora   | Sal                                     | Precipitante  |
| <i>Coriolus hirsutus</i> <sup>78</sup>       | Optimizadas a partir del <i>Crystal screen II</i> de Hampton Research. |   |   |
| <i>Melanocarpus albomyces</i> <sup>54*</sup> | Acetato de sodio 0.1 M pH 4.2.   | Sulfato de litio 0.2 M                  | Polietilenglicol monometil éter (PMME) 200 25 % (p/v) |
| <i>Trametes versicolor</i> <sup>79</sup>     | Citrato de sodio 100mM a pH= 5.6                                       | ---                                     | <b>PEG 8000</b> 20%, isopropanol 20%.                 |
| <i>Trametes versicolor</i> <sup>80</sup>     | Cacodilato de sodio 0.1 M pH 6.5.                                      | Acetato de zinc 0.16 M                  | <b>PEG 8000</b> 18 %                                  |
| <i>Coprinus cinereus</i> <sup>81</sup>       | Acetatos 0.1 M buffer pH 5.5.  |   | <b>PEG 8000</b> 13-15%.                               |
| <i>Rigidoporus lignosus</i> <sup>82</sup>    | MES 0.1 M pH 6.5.  | Sulfato de amonio 1.6 M, 2 % (v/v) DMSO | Polivinil pirrolidina 0.125 % (p/v).                  |

\*Optimizados con *microseeding*.

De las 98 pruebas que montamos, sólo en dos condiciones se formaron microcristales. En la primera (10% PEG 1000, 10% PEG 8000 (w/v)), encontramos microcristales con forma de bastón y de color azul, característico del CuT1 en estado oxidado (**Figura 13a**). En la segunda (2.0 M de formato de amonio y 0.1 M HEPES pH 7.5), apareció un microcristal (**Figura 13b**). Por la falta de coloración azul y la alta

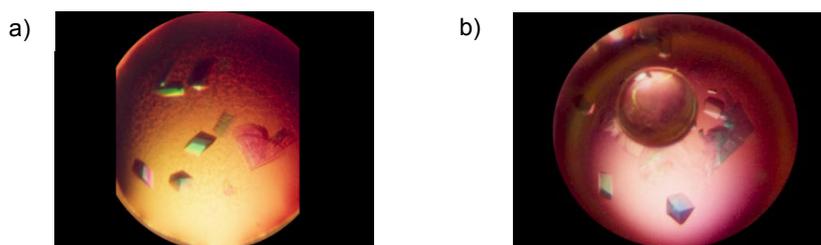
concentración de formato de amonio pensamos que podría ser un cristal de sal, aunque la única prueba fehaciente de ello sería la difracción misma.



**Figura 13.** Microcristales obtenidos de las condiciones a) PEG 1000 y 8000 10% c/u y b) 2.0 M formato de amonio, 0.1 M HEPES pH 7.5.

Nos enfocamos entonces en optimizar la primera condición. Diseñamos una matriz en la que variamos el pH y la concentración de PEG 1000/8000. El intervalo de pH seleccionado fue de 4-5.5 (**Figura 10**). La concentración de los precipitantes varió entre 5-15% (**Figura 10**). Antes de realizar la matriz notamos que los cristales crecidos en la solución del kit se disolvieron al tercer día de haber crecido, como consecuencia de los cambios de temperatura ocasionados al sacarlos del cuarto de 18 °C para observarlos al microscopio a temperatura ambiente. Entonces, a la matriz anterior añadimos como variable la temperatura<sup>φ</sup>, duplicando las pruebas a 4 y 18°C.

Pasadas 48 horas, observamos cristales de muy buena apariencia y tamaño ( $\approx$ 200-300  $\mu$ m en su eje mayor) en las gotas A1 y A2 (pH 4 y 4.5 respectivamente, ambas con 5% de PEG 1000 y 5% PEG 8000) (**Figura 14**). Tratando de reproducir las condiciones montamos 32 pruebas más bajo las mismas condiciones. Sin embargo sólo en dos de ellas encontramos cristales. Probamos el método de crecimiento de cristales a partir de la siembra de núcleos, como alternativa para resolver el problema de la reproducibilidad. La siembra se realiza en las mismas gotas colgantes. Consiste en tocar con un cabello de crin de caballo uno de los cristales y con él trazar una línea transversal sobre las gotas recién montadas. El cabello siembra porciones del cristal que actúan como semillas (núcleos) en una gota nueva. Como resultado obtuvimos cristales pero demasiado pequeños para difractarlos.



<sup>φ</sup> A menor temperatura menor solubilidad.

**Figura 14.** Cristales crecidos en las condiciones PEG 1000 y 8000 al 5% c/u. a) pH 4 y b) pH4.5

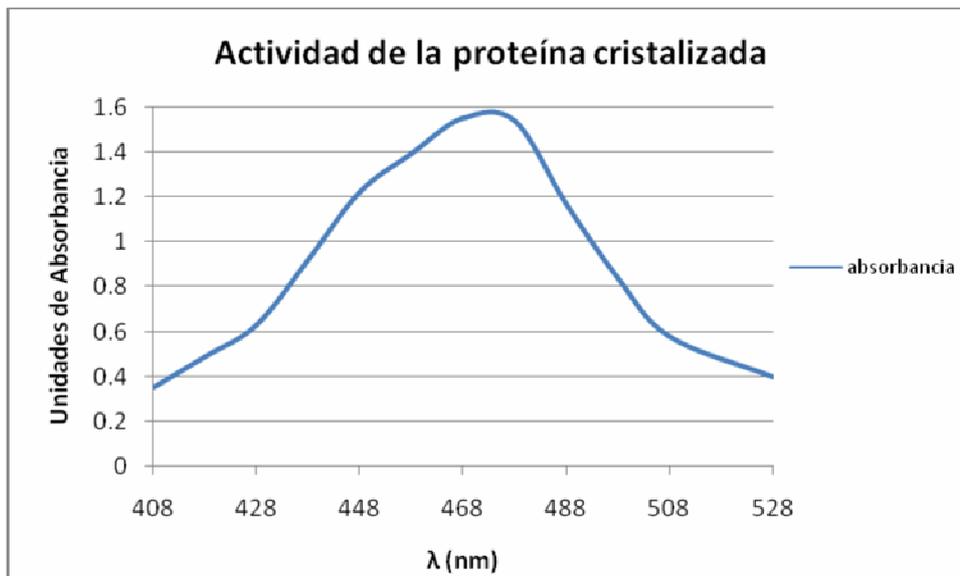
Después de analizar todas las variables de los experimentos, concluimos que lo único que pudiera cambiar en cada experimento era la concentración de proteína (debido a errores experimentales durante la cuantificación). Luego, probamos una matriz variando concentración de proteína en la que encontramos cristales de muy buen tamaño a 20 mg/mL. Cuando tratamos de repetir estas condiciones resurgió el problema de la reproducibilidad.

La baja reproducibilidad de las condiciones a pH 4 y 4.5 nos obligó a buscar alternativas para obtener cristales difractables. La primera, sin resultados, fue cambiar la solución amortiguadora a acetatos (antes MES). Paralelo a este proyecto, en nuestro mismo laboratorio, Álvaro Resines desarrollaba un proyecto sobre entrecruzamiento de cristales con la misma lacasa de *C. gallica*. El entrecruzamiento debe realizarse a pH neutro o básico, por lo que es necesario obtener cristales en esas condiciones. A partir de las condiciones de cristalización que encontramos, Álvaro logró crecer cristales a pH 7. Con esos antecedentes, nos dimos a la tarea de probar la reproducibilidad de estas condiciones. Realizamos otra matriz, para encontrar las condiciones exactas de cristalización, variando la concentración de los dos PEG (8-13%) manteniendo constante la solución amortiguadora (Tris 50 mM pH7). A los dos días de montadas las pruebas observamos cristales en la condición 10% de PEG 1000, 10% de PEG 8000, Tris 50 mM pH 7.

Tras estas pruebas montamos 24 gotas más bajo las mismas condiciones. En tres de ellas crecieron cristales. Para descartar que hubiera habido cambios en la concentración de proteína o alguna otra variable repetimos las pruebas a pH 4.5 con MES o acetatos como solución amortiguadora. No creció ningún cristal. Si bien la eficiencia no fue la esperada sí encontramos condiciones más reproducibles.

#### **7.4 Actividad de los cristales**

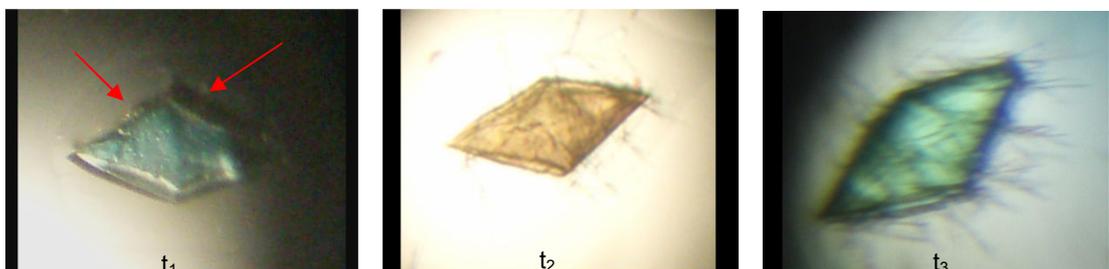
Comprobamos que los cristales crecidos a pH 4.5 son activos redisolviéndolos en MES 50 mM pH 5.5 y siguiendo la oxidación de 2,6-DMP por medio de la aparición de producto a 468 nm. Realizamos un barrido de absorbancia en el intervalo 400-520 nm, observando el máximo a 468 nm correspondiente al sustrato oxidado (**Figura 15**).



**Figura 15.** Actividad de los cristales crecidos a pH4.5. Espectro cualitativo de oxidación del 2,6-DMP, el producto oxidado tiene un máximo de absorción a 468 nm.

Sustentamos el experimento anterior mostrando que los cristales son activos *in situ*. Seguimos el cambio de coloración de los cristales al difundir 2,6-DMP a través del microscopio (a un aumento de 4X). Recordemos que la lacasa y por tanto los cristales, es de color azul debido al CuT1 (oxidado), mientras que el producto de oxidación del 2,6-DMP es naranja. Por lo tanto si el sustrato difunde y se oxida en el interior del cristal, observaremos un cambio de coloración.

Por razones de estabilidad de los cristales, la prueba fue realizada a 4°C (PEG 1000 y 8000 al 10%, MES 50 mM pH 4.5). Al  $t_1$  (10 minutos) observamos los primeros cambios: los bordes del cristal se tornaron naranjas mientras que el núcleo permanecía azul (**Figura 16 t1**). En  $t_2$  ( $\approx$ 60 minutos) el color naranja abarcaba todo el cristal (**Figura 16 t2**) y comenzaron a formarse unas espículas que suponemos corresponde al producto polimerizado. Al  $t_3$  ( $\approx$ 120 minutos) el cristal recuperó su tonalidad azul, pero estaba rodeado del polímero del producto de oxidación del 2,6-DMP (**Figura 16 t3**).



**Figura 16.** Actividad *in situ* de los cristales de lacasa de *C. gallica* crecidos a pH 4.5, t1) difunde el sustrato y comienza a aparecer el producto (naranja) en los bordes del cristal. Las flechas rojas indican la formación de producto en los bordes del cristal. t2) El producto ha difundido por todo el cristal, ha cambiado su coloración de azul a naranja. t3) Se formaron espículas de polímero del producto y el cristal retoma el color azul del T1.

## 7.5 Difracción

En la primera prueba de difracción, realizada en el Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas (LUPEP) del Instituto de Química, U. N. A. M., difractamos dos de los cristales crecidos a pH 4.5. Como criopreservador utilizamos una solución 20% PEG 1000, 20% PEG 8000 en MES 50 mM pH 4.5. El mejor de ellos difractó a  $\approx 1.8 \text{ \AA}$  de resolución, pero por cuestiones de tiempo sólo pudimos coleccionar cinco imágenes ( $0^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $180^\circ$ ,  $270^\circ$  y  $360^\circ$ , con  $0.5^\circ$  de rotación en cada una). Utilizamos las imágenes para caracterizar el cristal; determinar el grupo espacial, dimensiones de celda y mosaicidad<sup>3</sup>.

Si bien no pudimos coleccionar suficientes marcos de difracción para resolver la estructura, probamos que los cristales crecidos en esas condiciones difractaban a buena resolución e identificamos el grupo espacial como perteneciente al sistema ortorrómbico. Puesto que la mosaicidad fue alta ( $\approx 1^\circ$ ) y observamos anillos de hielo, decidimos probar nuevas condiciones de criopreservación.

Ya en el difractómetro del Instituto de Biotecnología probamos más cristales crecidos a pH 4.5 y los crecidos a pH 7. El cuello de botella fue encontrar un buen criopreservador para ambas condiciones. En un principio sustituimos el utilizado en la primera difracción por aceites: primero una solución 50% Paratone-N y 50% Al's oil, otra con 70 % de Al's oil y 30% de Paratone-N. En ambas soluciones los cristales se disolvieron. Tampoco hubo buenos resultados con aceite de Parafina. El mejor crioprotector resultó ser una solución 25% de PEG 1000, 15% de PEG 400 y 5% de PEG 8000 (sugerencia de la Dra. Elspeth Garman). La mosaicidad disminuyó ligeramente ( $\approx 0.7^\circ$ ) pero eliminamos la formación de hielo.

Los siguientes dos experimentos obtuvimos datos a  $2.3 \text{ \AA}$  de resolución para los cristales crecidos a pH 4.5 y para los crecidos a pH 7, ambos con mosaicidad de  $\approx 0.75$ . Faltaba entonces un cristal al valor de pH de actividad intermedia. Para obtenerlo, intentamos un método para reemplazar la solución de la gota de cristales crecidos a pH 7, lo cual debiera también modificar el ambiente al interior del mismo cristal<sup>3</sup>.

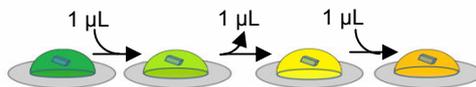
Para no dañar los cristales cambiamos gradualmente la solución de la gota<sup>83</sup>. Preparamos tres soluciones con la misma concentración de precipitantes que la del líquido madre (10%) pero en amortiguador gradualmente más ácido (MES 50 mM a pH 6.5, 6.0 y 5.5). En el inicio agregamos dos microlitros de la solución de la mezcla de menor pH inmediata (de 7 a 6.5, 6.5 a 6.0 y 6.0 a 5.5, por ejemplo) a los cristales para

---

<sup>3</sup> Mosaicidad es una medida del promedio en la distribución de los ángulos en todas las celdas unitarias al interior de un cristal. Como no todas las celdas unitarias tienen la misma orientación en el cristal, es necesario calcular este parámetro de ajuste. Como regla no escrita, se aceptan valores menores a  $0.5^\circ$ .

<sup>3</sup> La cantidad de solvente en cristales de proteína varía entre 20-70% por lo que es posible difundir un gran número de moléculas. Para este momento ya habíamos caracterizado los cristales (grupo espacial, parámetros de celda, monómeros por unidad asimétrica, cantidad de solvente) y sabíamos que los cristales tenían  $>60\%$  de solvente.

llevar a la gota a un volumen de 4  $\mu\text{L}$ . Tras mezclar retiramos 2  $\mu\text{L}$ , de 1  $\mu\text{L}$  en 1  $\mu\text{L}$ , para regresar al volumen original de la gota. Agregamos 1  $\mu\text{L}$  de la misma solución de menor pH, siempre mezclando con la pipeta, y retiramos el mismo volumen agregado (**Figura 17**). Este paso se repite 10 veces para asegurarnos de que hemos sustituido la solución de la gota que contiene al cristal. Seguimos los mismos pasos para llevarla a pH 6.0 y 5.5.

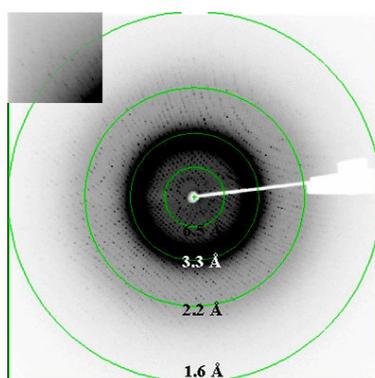


**Figura 17.** Cambio gradual del líquido madre en gotas colgantes.

Algo fundamental del método es que los cristales no se destruyan o empeoren su estructura interna. Al menos en lo que respecta a la estructura externa de los cristales no observamos daño alguno.

No intentamos disminuir más el pH porque implicaba un cambio de amortiguador (acetatos por MES) y el primer objetivo era solamente comprobar que se mantenía el orden interno. Es decir, que el cristal difractara por lo menos igual que en las condiciones de crecimiento.

El primer cristal llevado a pH 5.5 difractó bastante mal ( $\approx 3 \text{ \AA}$ ). El segundo es el mejor de los que hemos difractado a la fecha. La resolución final fue de  $1.6 \text{ \AA}$  (**Figura 18**). La única diferencia con los anteriores fue que este estuvo toda la noche atemperándose en una charola con hielo. Aún no sabemos si la mejora se debió a ese evento o simplemente a las propiedades intrínsecas del cristal. Lamentablemente no hemos podido probar más cristales.



**Figura 18.** Patrón de difracción a  $1.6 \text{ \AA}$  (pH 5.5) de la lacasa de *C. gallica*.

## 7.6 Determinación del grupo espacial

Las dimensiones de la celda unitaria se obtienen midiendo las distancias entre los puntos del patrón en ciertas direcciones correspondientes a los ejes recíprocos a la celda real. De acuerdo a la celda, en particular a sus longitudes y ángulos, es posible

clasificar el tipo de sistema cristalino que se tiene (por ejemplo en un sistema cúbico los ángulos  $\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$  y las tres longitudes  $a=b=c$ ). Hasta este punto se tiene toda una familia de grupos, de los que el más probable es el de mayor simetría. Una forma de definir cuál de ellos es el grupo real es mediante el análisis de las ausencias sistemáticas.

A cada punto del patrón de difracción corresponden tres índices ( $h, k, l$ ) que definen al plano que dio origen al punto. Los planos en los que dos de los índices, cualquiera de ellos, tienen valor de 0 se denominan planos axiales ( $h = [h, 0, 0]$ ,  $k = [0, k, 0]$  y  $l = [0, 0, l]$ ). Las ausencias sistemáticas indican condiciones de difracción para las difracciones axiales, que dependen del grupo espacial (ver **Tabla 5**). En nuestro caso sabíamos que el grupo espacial era alguno de la familia P222 pero teníamos cuatro opciones. Para el grupo P222 no hay restricciones en las axiales, pero conforme aumenta la simetría, en particular los componentes traslacionales, aparecen las condiciones de difracción. En todos los ejemplos incluidos en la **Tabla 5** la condición para que haya reflexión es que  $h, k$  o  $l$  sean pares. Por ejemplo si el grupo es P222<sub>1</sub>, habrá difracciones axiales en  $l$ , si y sólo si, el valor de la misma es par ([0,0,2], [004], [006], etcétera).

**Tabla 5.** Condiciones de difracción para la familia P222.

| Sistema Cristalino        | Grupos Posibles                               | Condiciones de difracción    |
|---------------------------|---|------------------------------|
|                           |   | ( $h, k$ y $l$ )             |
| Ortorrómbico<br>Primitivo | P222  | Ninguna                      |
|                           | P222 <sub>1</sub>                             | -- -- (0,0,2n)               |
|                           | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2              | (2n,0,0), (0,2n,0) --        |
|                           | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | (2n,0,0), (0,2n,0), (0,0,2n) |

En el primer experimento de difracción sólo observamos axiales en  $h$  y  $k$ , pero no en  $l$ ; por lo que se cumplían con las condiciones de difracción del grupo P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2. Hasta este punto teníamos dos posibilidades: el grupo espacial era P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 o era P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, pero habíamos orientado uno de los ejes del cristal de tal manera que las axiales en  $l$  se encontraron en la zona ciega. Para decidir cuál de las dos era la opción verdadera utilizamos los datos de los tres cristales (misma celda) difractados a diferente pH y graficamos las axiales. Confirmamos que no habíamos medido las axiales en  $l$  por la orientación del cristal y que por lo tanto el grupo espacial era P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>.

## 7.7 Reemplazo molecular

Una vez definido el grupo espacial continuamos con la búsqueda de fases. Para ello utilizamos el método de reemplazo molecular, aprovechando el alto porcentaje de identidad con las demás proteínas fúngicas.

En el reemplazo molecular se utiliza una estructura homóloga (>25% de identidad en secuencia) que se rota y traslada en la celda unitaria problema hasta encontrar la

orientación y posición relativa de los ejes moleculares. La mejor solución será aquella que explique mejor los datos experimentales. Con esa solución se puede aproximar un conjunto de fases iniciales que se van afinando iterativamente hasta llegar al modelo más acorde con el patrón de difracción<sup>84</sup>.

El reemplazo molecular partió del modelo por homología que hicimos en el servidor EXPASy y que obtuvimos a partir de la secuencia de la lacasa de *C. gallica*, utilizando como molde las estructuras de diez de los homólogos.

Aunque ya conocíamos el grupo espacial, probamos el reemplazo con los grupos P222, P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 y P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>. Los resultados se muestran en las **Tablas 6-8**. Los valores  $\theta$ ,  $\varphi$  y  $\chi$  describen los tres ángulos de rotación para cada solución, mientras que tx, ty y tz describen la traslación. Los que más información proporcionan son R<sub>fac</sub>, Score y Contrast. El primero compara las reflexiones observadas con las teóricas, calculadas a partir de la primera aproximación de fases. Mientras menor sea R<sub>fac</sub> mejor será el ajuste del modelo con los datos experimentales y viceversa. El Score es el producto de un par de valores: coeficiente de correlación y valor máximo de empaquetamiento, mientras más cercano a uno mejor es el ajuste. El más importante de los tres es el Contrast, definido como la proporción del primer pico (máxima probabilidad) con respecto al siguiente; no es más que una comparación entre la mejor solución encontrada y la que le secunda. A mayor contraste mayor probabilidad de que la solución sea la correcta.

En las tablas siguientes vemos que el reemplazo con el grupo P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> es el mejor de los tres. Su R<sub>fac</sub> es 10% menor que los otros, su Score 20 y 11% mayor que P222 y P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2, respectivamente y el contraste casi tres veces mayor que en P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2.

**Tabla 6. Reemplazo Molecular para P222**

| S_RF   | TF | $\theta$ | $\varphi$ | $\chi$ | tx   | Ty   | Tz   | TFcnt | R <sub>fac</sub> | Score       |
|--------|----|----------|-----------|--------|------|------|------|-------|------------------|-------------|
| S_1_15 | 1  | 0.00     | 0.00      | 179.73 | 0.32 | 0.23 | 0.22 | 2.16  | <b>0.56</b>      | <b>0.25</b> |
| S_9_5  | 2  | 90.67    | -153.71   | 84.71  | 0.42 | 0.76 | 0.30 | 2.20  | 0.59             | 0.19        |
| S_5_9  | 3  | 46.27    | 27.90     | 142.57 | 0.14 | 0.79 | 0.25 | 2.16  | 0.59             | 0.17        |

Contrast = 3.55

**Tabla 7. Reemplazo Molecular para P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2**

| S_RF  | TF | $\theta$ | $\varphi$ | $\chi$ | tx    | ty   | tz   | TFcnt | R <sub>fac</sub> | Score       |
|-------|----|----------|-----------|--------|-------|------|------|-------|------------------|-------------|
| S_1_1 | 1  | 0.00     | 0.00      | 179.73 | 0.406 | 0.25 | 0.12 | 3.79  | <b>0.53</b>      | <b>0.33</b> |
| S_9_2 | 2  | 90.67    | -153.71   | 84.71  | 0.34  | 0.80 | 0.33 | 2.46  | 0.59             | 0.18        |
| S_2_8 | 3  | 43.60    | 23.39     | 145.22 | 0.13  | 0.80 | 0.17 | 2.58  | 0.60             | 0.17        |

Contrast = 6.42

**Tabla 8. Reemplazo Molecular para P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>**

| S_RF   | TF | $\theta$ | $\varphi$ | $\chi$ | tx   | ty    | tz   | TFcnt | R <sub>fac</sub> | Score       |
|--------|----|----------|-----------|--------|------|-------|------|-------|------------------|-------------|
| S_1_1  | 1  | 0.00     | 0.00      | 179.73 | 0.16 | 0.63  | 0.37 | 18.84 | <b>0.45</b>      | <b>0.54</b> |
| S_7_9  | 2  | 141.84   | -173.74   | 177.75 | 0.07 | 0.70  | 0.12 | 2.47  | 0.59             | 0.20        |
| S_6_11 | 3  | 16.36    | 150.73    | 169.54 | 0.37 | 0.700 | 0.38 | 2.32  | 0.59             | 0.20        |

Contrast = **16.26**

## 7.8 Afinamiento

Todos los pasos del afinamiento se hicieron en el programa *Refmac*<sup>71</sup> en su versión 5.0, siguiendo el mismo procedimiento, explicado en la sección Materiales y Métodos, para todas las estructuras. El proceso concluyó cuando alcanzamos los valores menores de R y  $R_{free}^{\Psi}$  posibles, y con mayor convergencia. La **Tabla 9** muestra las estadísticas finales de los tres cristales difractados.

**Tabla 9.** Estadística de los tres cristales difractados.

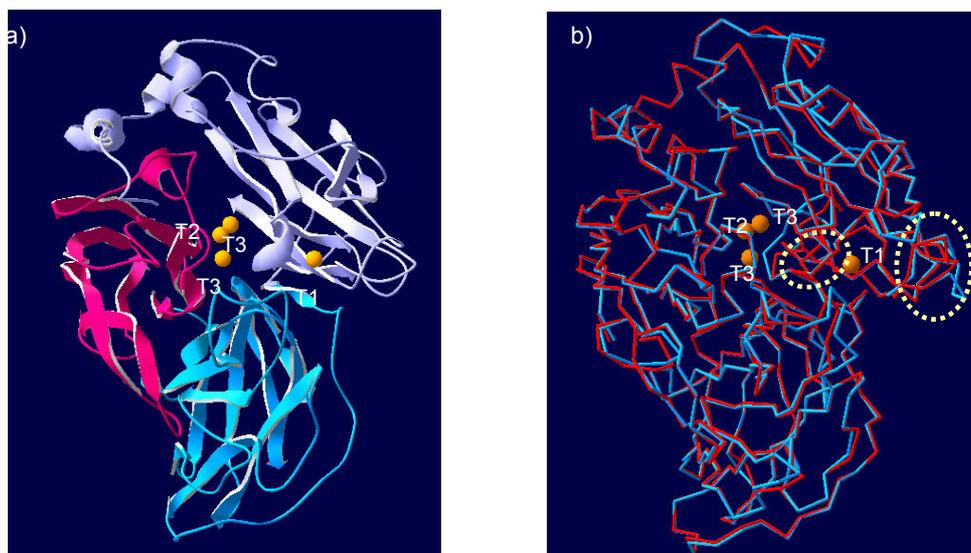
| Cristal  | pH 4.5  | pH 5.5  | pH7   |
|--|---|---|---|
| Grupo espacial   | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> |
| Parámetros de la celda unitaria (Å) / (°)  | 56.28, 85.83, 151.74<br>90.00, 90.00 90.00    | 56.38 86.13 152.64<br>90.00, 90.00, 90.00     | 56.38, 86.82, 153.42<br>90.00, 90.00, 90.00   |
| Residuos por monómero / Monómeros por ua <sup>a</sup>                                  | 496/1   | 496 / 1                                       | 496/1   |
| Coefficiente de Matthews (Å <sup>3</sup> Da <sup>-1</sup> ) / cantidad de solvente (%) | 3.28 / 62.53                                  | 3.28 / 62.53                                  | 3.28 / 62.53                                  |
| Fuente de rayos X  | Rigaku RU 200                                 |   |   |
| Detector   | Raxis IV Image plate                          |   |   |
| Longitud de onda (Å)   | 1.5418  |   |   |
| Intervalo de resolución (Å)  | 34.69 - 2.3                                   | 24.45 -1.7                                    | 34.72 -2.3                                    |
| Reflexiones únicas   | 32466   | 87114   | 36847   |
| Multiplicidad  | 3.6 (3.5)                                     | 3.2 (2.5)                                     | 3.6 (2.8)                                     |
| Integridad (%)   | 96.7 (97.6)                                   | 93.7 (79.5)                                   | 94 (79.3)                                     |
| I/σ(I)   | 6.8 (1.5)                                     | 9.8 (2.3)                                     | 6.5 (1.6)                                     |
| R <sub>merge</sub> <sup>c</sup> (%)  | 9.8 (48)                                      | 5.1 (27)                                      | 9.7 (45)                                      |
| Valor B del Wilson plot(Å <sup>2</sup> )   | 38.34   | 17.68   | 37.57   |
| R <sub>work</sub> <sup>f</sup> / R <sub>free</sub> <sup>g</sup> (%)                    | 23.7 / 26.9                                   | <b>15 / 17.3</b>                              | <b>17.54/22.31</b>                            |
| Proteína / Cobres  | 496 / 3                                       | 496 / 4                                       | 496 / 4                                       |
| Enlaces Rmsd (Å)   | 0.015   | 0.012   | 0.013   |
| Ángulos Rmsd (°)   | 1.93  | 1.50  | 1.82  |
| Más favorecidas (%)  | 81.9  | 87  | 84.4  |
| Adicionales (%)  | 15.5  | 12  | 13.7  |
| Mosaicidad   | 0.75  | <b>0.47</b>                                   | 0.75  |

\*En negro las diferencias más significativas.

## 7.9 Estructuras

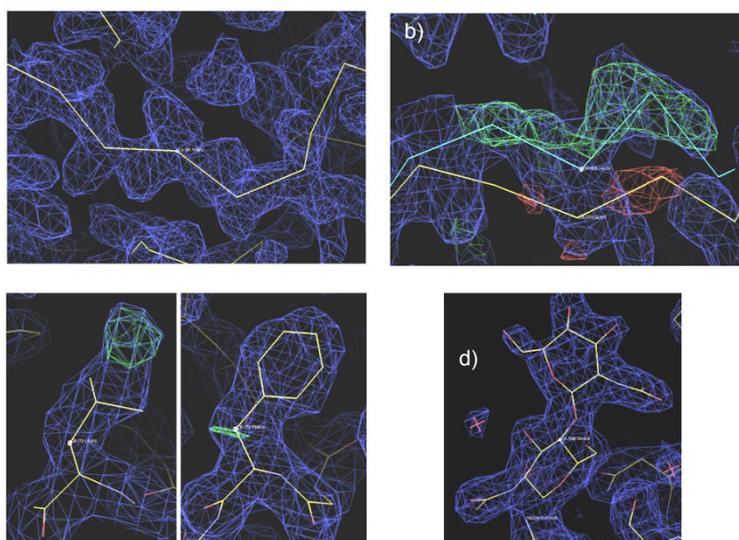
El plegamiento global es el mismo que en las estructuras homólogas: tres dominios globulares secuenciales con arquitectura de sándwich β (**Figura 19a**). La superposición con la estructura de *Trametes versicolor* da un r.m.s.d.= 0.56 Å para la cadena principal de 495 residuos. Las mayores diferencias se observan en asas externas alejadas del centro trinuclear (**Figura 19 b**, círculos amarillos).

<sup>Ψ</sup> Superficialmente, R y  $R_{free}$  miden la congruencia entre las reflexiones experimentales y las que se calculan a partir el último modelo afinado.  $R = \sum_h ||F_o|_h - |F_c|_h| / \sum_h |F_o|_h$ , en donde h define las reflexiones únicas



**Figura 19.** Estructura de la lacasa de *C. gallica*. a) Plegamiento y b) sobreposición con la estructura de *T. versicolor* (en azul). Las elipses amarillas punteadas señalan las regiones de menor similitud en las estructuras superpuestas.

Tras el afinamiento por cuerpos rígidos hicimos el primer análisis del ajuste modelo-densidad. El mapa de densidad  $2fo-fc$  ajusta muy bien sobre todos los átomos de cadena principal en todas las regiones menos una: el asa 313-319 (**Figura 20** a y b). En algunas cadenas laterales la densidad no correspondía con el residuo modelado; la secuencia con la que hicimos el reemplazo no era la correcta, por lo que los modificamos manualmente en el programa `Coot`<sup>69</sup>. Para ello nos basamos en la forma de la densidad electrónica y en un alineamiento con los 10 homólogos más cercanos ( $\geq 82\%$  de identidad), seleccionando los residuos consenso que ajustaran en la densidad electrónica. El proceso seguido para afinar los modelos fue el mismo para los tres modelos a diferente pH.



**Figura 20.** a) Ajuste del asa 313-319 después de la modificación manual y b) antes de la misma (en amarillo se representan los C $\alpha$  del modelo inicial y en azul del modelo final). c) Reemplazo de una fenilalanina por una leucina en el residuo 73, se observa el mejor ajuste de la densidad electrónica. d) Ajuste de las glicosilaciones (moléculas de N-acetilglucosamina). Mapas de densidad  $2fo-fc= 1.2 \sigma$  y  $fo-fc= 3.1 \sigma$ .

Tras ajustar todos los residuos las secuencias final e inicial. El resultado fue de tan sólo 64% de identidad. Realizamos una nueva búsqueda en el GeneBank de los genes depositados como lacasa de *C. gallica*. Alineamos las cuatro secuencias completas reportadas y pudimos identificar dos isoformas con similitud entre ellas de 64%, el mismo que el que obtuvimos nosotros tras las modificaciones. Concluimos entonces que habíamos utilizado como modelo la isoforma menos parecida a la nuestra. Y así fue, al comparar nuestra secuencia final con la otra isoforma obtuvimos un 94% de identidad, mucho mayor al 64% anterior. Vale mencionar que ninguno de los residuos modificados se encontraba cerca de los centros de cobre. Finalmente modelamos las glicosilaciones (cuatro moléculas de N-acetilglucosamina, (**Figura 20 d**) e hicimos búsqueda automatizada de moléculas de agua.

Puesto que las diferencias más significativas se encontraron en los centros de cobre y sus alrededores, el grueso de los Resultados y Discusión que a continuación se presentan se enfocan en dichas regiones.

### 7.10 Estructura a pH 7

Analizamos los sitios hipotéticos de cobre observando el mapa de diferencias calculado a partir de un modelo que incluía solamente átomos de proteína, es decir, del que omitimos los cuatro sitios de cobre. Tanto en el sitio CuT1 como en los dos CuT3 se observa una nube de mayor densidad electrónica que los azufres (representada en color verde en la **Figura 21** iii y ix), lo que indica que los tres sitios están ocupados por un cobre. Aunque también hay densidad positiva<sup>Ω</sup> en el sitio T2 (**Figura 21** vi), la densidad es mucho menor que la de los otros sitios. Esto se puede interpretar como que la ocupación de este sitio es menor en relación a los otros o que el cobre está muy deslocalizado. Nos inclinamos por la primera opción puesto que una deslocalización a ese nivel es poco probable cuando hay tres enlaces de coordinación (dos de las histidinas y uno del agua).

Incluimos entonces a los cuatro átomos en el modelo y afinamos nuevamente. Analizamos el mapa de densidad y ajustamos la ocupación de los tres sitios. Las ocupaciones finales fueron 0.7 (CuT1), 0.3 (CuT2) y 0.9 y 0.7 (CuT3) respectivamente (**Tabla 10**).

---

<sup>Ω</sup> Durante el afinamiento se modifica la geometría del modelo y se calculan nuevas fases a partir de él, hasta obtener el mejor ajuste del modelo con la densidad electrónica (calculada a partir de los datos experimentales). Eso nos da un nuevo archivo de coordenadas con mejores fases. A partir de ellas se puede calcular un mapa de densidad electrónica que tiene dos formas de representación. Una que incluye la densidad de todos los átomos modelados *2fo- $f_c$* . Y un mapa de diferencia *fo- $f_c$*  en el que se representan la densidad electrónica positiva y negativa. La densidad electrónica positiva es la que se ha calculado a partir de los datos experimentales pero no ha sido representada en el modelo. La negativa es lo opuesto: densidad modelada que no explican los datos experimentales.

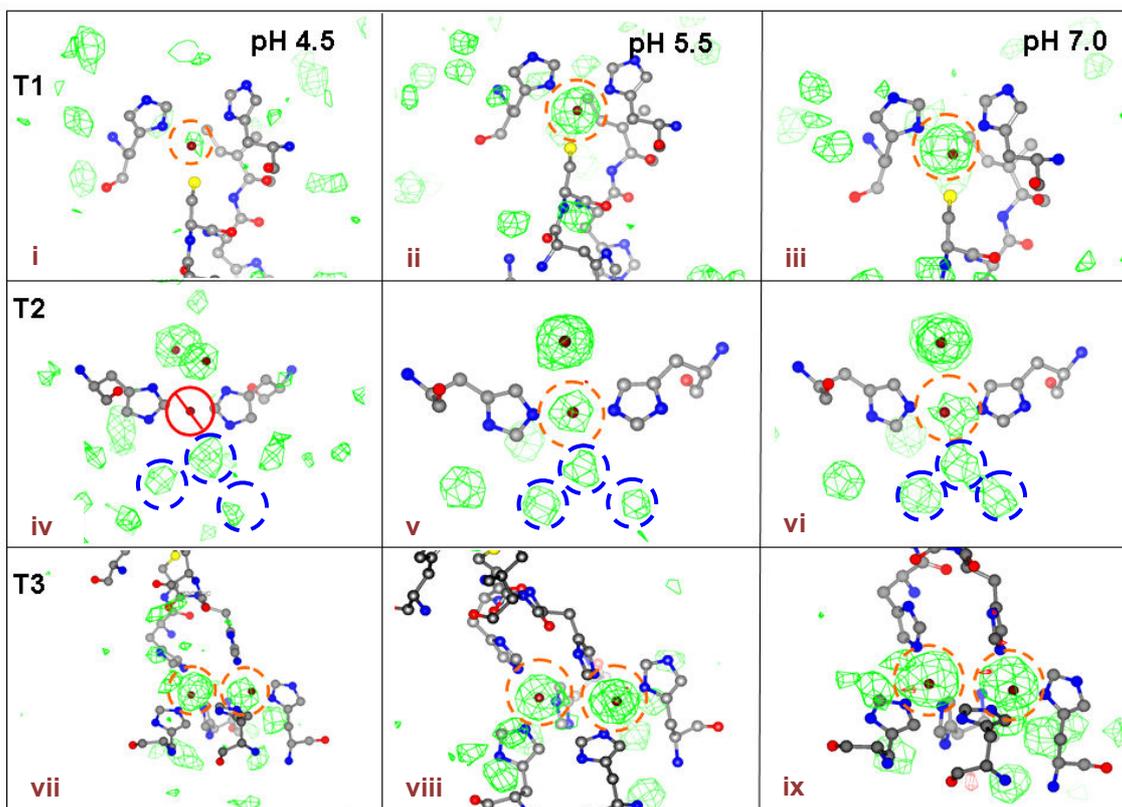
## 7.11 Estructura pH 5.5

Seleccionamos el pH 5.5 por ser un valor de pH intermedio entre la inhibición y el óptimo de actividad; teóricamente hay inhibición parcial ocasionada por hidroxilos pero la actividad se mantiene en un 50% con respecto al máximo.

El mapa de diferencias (fo-fc) revela densidad en los cuatro sitios de cobre (**Figura 21** ii, v y viii). Una vez más la ocupación del Cu T2 es menor que la de los otros tres sitios (T1= 0.7, T2= 0.5 y ambos T3= 0.8, **Tabla 10**).

**Tabla 10.** Ocupación de los 4 sitios de cobre a los diferentes valores de pH.

| Sitio | pH4.5   | pH 5.5  | pH 7.0  |
|-------|---------|---------|---------|
| T1    | 0.2     | 0.7     | 0.7     |
| T2    | --      | 0.5     | 0.3     |
| T3    | 0.7/0.7 | 0.8/0.8 | 0.9/0.7 |



**Figura 21.** Densidad electrónica en los sitios de cobre de los cristales difractados a diferente pH. Mapa *fo-fc* a 4.5  $\sigma$ . En círculos de color naranja la densidad correspondiente a los cobres. El círculo rojo cruzado representa la ausencia de CuT2. Y los azules la red de puentes de hidrógeno alrededor del sitio CuT2.

## 7.12 Estructura pH 4.5

El cristal crecido y difractado a pH 4.5 debe corresponder a una forma enzimática en la que la inhibición por acumulación de hidroxilos es mínima o despreciable.

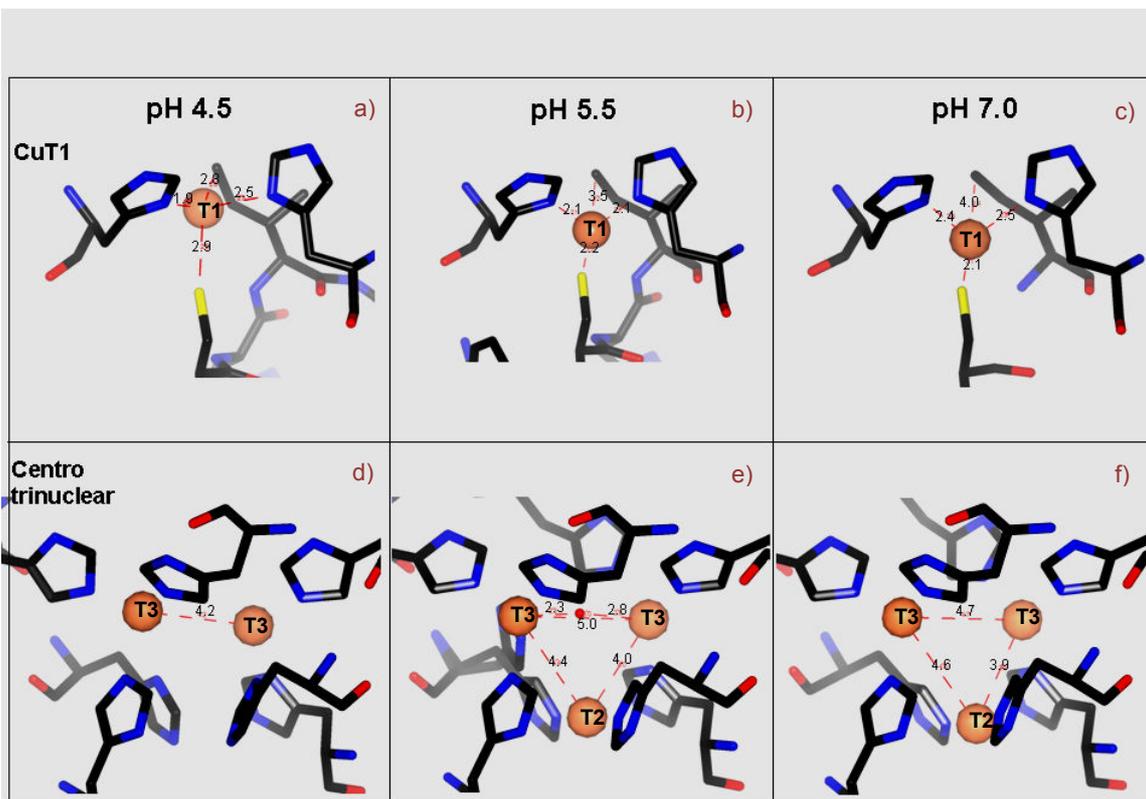
Tras el afinamiento por cuerpos rígidos revisamos el ajuste del modelo con el mapa de densidad. En el sitio del CuT1 se ve una nube de densidad electrónica muy pequeña en comparación con los sitios CuT3 (**Figura 21** i y vii respectivamente) y con el mismo sitio CuT1 de las anteriores estructuras. No podemos decir que no hay cobre porque la densidad, aunque poca, es clara. En cambio podemos suponer que su ocupación es muy baja o que se ha deslocalizado. Para este caso lo que hicimos fue modelar un cobre con ocupación de 0.2 que ajustó bastante bien en la densidad. En donde no hay densidad electrónica es en el sitio CuT2. Aunado a la ausencia del metal, las histidinas que debieran coordinarlo muestran una conformación alterna, en la que los cuatro nitrógenos apuntan hacia fuera del CuT2. Los CuT3 están presentes y con alta ocupación como en las anteriores (0.7 ambos, **Tabla 10**).

La pregunta inmediata es si la deslocalización del CuT1 y la desocupación del sitio CuT2 provocan cambios en la geometría de los sitios.

A pH 7 la geometría del T1 es ligeramente distinta en comparación con la de *Trametes versicolor* (pdb 1GYC, a 1.9 Å de resolución), el homólogo más cercano, pero están dentro del intervalo de error (0.14-0.22 Å). En *T. versicolor* las distancias de coordinación con el cobre son: Cys-CuT1= 2.2 Å, His-CuT1= 2.0 Å (ambas histidinas) e Ile-CuT1= 3.7. En *C. gallica* (pH7) son: Cys-CuT1= 2.3 Å, His-CuT1= 2.3/2.4 Å e Ile-CuT1=3.5 (**Tabla 11** y **Figura 22** c). En cambio, en el centro trinuclear las distancias cambian considerablemente entre nuestro modelo y el de *T. versicolor*. En este último forma un triángulo cuyas distancias son 3.91 Å entre los dos CuT3 y 3.81 Å entre los CuT3a/b y el CuT2. En *C. gallica* a pH7, la distancia entre los dos CuT3 aumenta 0.9 Å (de 3.9 Å a 4.8 Å), mientras que la distancia CuT3a-CuT2 aumenta 0.8 Å (de 3.8 a 4.6 Å) (**Figura 22** f). En el CuT2 las diferencias están en dentro del intervalo de error.

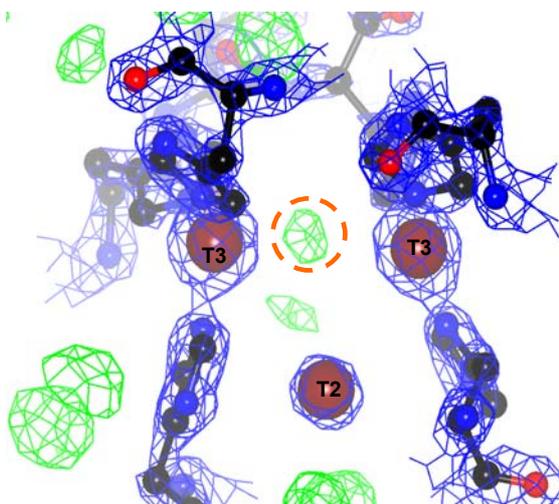
**Tabla 11.** Distancias entre los sitios cobres y sus enlaces de coordinación.

| Distancias           | <i>T. versicolor</i> | pH 4.5 (Å)       | pH 5.5         | pH 7             |
|----------------------|----------------------|------------------|----------------|------------------|
| CuT1-H399/460        | 2.02/2.04            | <b>1.92/2.51</b> | 2.10/2.11      | <b>2.36/2.48</b> |
| CuT1-Cys455          | <b>2.19</b>          | <b>2.93</b>      | 2.23           | 2.09             |
| CuT1-Ile457          | <b>3.7</b>           | <b>2.81</b>      | 3.5            | 3.41             |
| CuT3a-His454/116/404 | 2.23/2.12/2.16       | 2.16/2.06/2.35   | 2.03/2.23/2.22 | 2.01/1.99/2.13   |
| CuT3b-His71/114/456  | 2.15/2.12/2.17       | 2.20/2.42/2.37   | 2.07/2.06/2.03 | 2.09/2.37/2.12   |
| CuT3-CuT3            | <b>3.91</b>          | <b>4.15</b>      | 5.02           | 4.68             |
| CuT3a-CuT2           | 3.81                 | --               | 4.38           | 4.59             |
| CuT3b-CuT2           | 3.82                 | --               | 3.98           | 3.88             |
| CuT2-His69/402       | 2.01/1.97            | --               | 1.80/1.86      | 1.76/1.71        |
| His69-His402 (CuT2)  | 3.97                 | <b>3.29</b>      | 3.66           | 3.44             |



**Figura 22.** Geometría del CuT1 y el centro trinuclear de cobre en las diferentes condiciones. En el eje horizontal se representan el CuT1 y el centro trinuclear, mientras que verticalmente la conformación de los mismos en las estructuras resueltas a distintos pHs.

A pH 5.5 Las distancias de coordinación en el CuT1 son prácticamente las mismas que a pH 7 (Cys-CuT1= 2.2 Å His-CuT1 = 2.1 Å (ambas histidinas) y Ile-CuT1= 3.5 Å) (**Figura 22 b**). Algo muy interesante ocurrió cuando afinamos el modelo tras incluir los cobres. Entre los dos CuT3, a pH 5.5, se observa una nube de densidad que no aparece en los otros modelos y que modelamos como una molécula de agua (**Figura 23**). Era de esperarse que al unirse algo entre los dos CuT3 cambiaran las distancias entre los CuT3. Comparamos entonces con la estructura a pH 7. La distancia CuT3-CuT3 es de 5.0 Å, sólo 0.2 Å más que a pH 7 (4.8 Å CuT3-CuT3), es decir no es un cambio significativo puesto que está dentro del error experimental. Lo mismo ocurrió con las distancias CuT3-T2 que pasaron de 4.6 Å y 3.9 Å (pH 7) a 4.4 Å y 4.0 Å (pH 5.5). En el sitio CuT2 las distancias fueron prácticamente las mismas (de His-CuT2= 1.9 Å y 1.8 Å a pH 7 a 1.9 Å y 1.7 Å a pH 5.5) (**Figura 22 e**). Por lo tanto, la única diferencia considerable es la molécula de agua que se une a los CuT3 (**Figura 23**).



**Figura 23.** Densidad electrónica entre los dos sitios T3 (densidad verde rodeada por el círculo naranja). La densidad fue modelada como una molécula de agua que forma un puente entre los dos CuT3 (mapa fo-fc a  $3.5 \sigma$ ).

En la estructura resuelta a pH 4.5 sí observamos cambios. La distancia Cys-CuT1 se incrementa de 2.2-2.3 Å a 3.0 Å. Las distancias His-CuT1 pasan de 2.1-2.4 Å a 2.1 y 2.7. Por último la distancia Ile-CuT1 disminuye de 3.4-3.5 Å a 2.9 Å.

En resumen, la geometría del sitio T1 es la misma a pH 7 y pH 5.5 pero se modifica considerablemente a pH 4.5. Acompañado con los cambios geométricos, la ocupación del cobre es mucho menor (0.2 a pH 4.5 vs 0.7 a pH 5.5 y 7, **Tabla 10**). Por lo tanto la baja ocupación y/o deslocalización del CuT1 produce cambios en la geometría del sitio.

En lo que se refiere al CuT2 tampoco hay diferencia entre el pH 5.5 y el neutro a pesar de las diferencias en la ocupación. En cambio, en el pH más ácido 4.5 el cobre no se encuentra y las histidinas del CuT2 cambian de conformación, apuntando sus nitrógenos hacia fuera del sitio de unión del metal.

En el CuT3 también hay cambios importantes. A pH 5.5 hay una molécula de agua que no vemos en las otras dos. En tanto que a pH 4.5 los dos cobres se acercan entre sí: pasan de a 4.8-5.0 Å a 4.0 Å. Esta conformación se asemeja más a la estructura de *T. versicolor* cuya distancia T3-T3 es de 3.9 Å.

## 9 CONCLUSIONES

Es posible cambiar el pH de los cristales mediante el reemplazo gradual de la solución amortiguadora. Las diferencias en el pH se manifiestan directamente en la geometría y estructura de los centros de cobre:

El CuT1 presenta una ocupación muy baja en comparación con las dos estructuras restantes. Paradójicamente el CuT2, necesario para la actividad, no se encuentra en la estructura correspondiente al máximo de actividad y sí en las correspondientes al estado de actividad intermedia y al de enzima inactiva. En ausencia CuT2 los dos CuT3 del centro trinuclear se acercan 0.5 Å entre sí, reduciendo así el espacio en el sitio de unión del O<sub>2</sub>.

En las estructuras obtenidas a pH 5.5 y 7.0 se encuentran los cuatro átomos de cobre. Además, en la primera, se observa un intermediario de la reducción del O<sub>2</sub> que no aparece en las otras estructuras. En la misma estructura la His402 que coordina al CuT2 presenta una conformación alterna que se acerca a distancia de coordinación a uno de los CuT, cambiando su estado de tetra a penta-coordinado.

La ausencia del CuT2 y la baja ocupación del CuT1 a pH 4.5 no es consecuencia del proceso de cristalización ni de purificación, puesto que la enzima es activa a pH 4.5 tanto en solución como en los cristales.

Es común en las estructuras cristalográficas de lacasa encontrar el sitio T2 con una ocupación  $\leq 50\%$ , lo cual ha sido explicado como pérdida del sitio durante el proceso de purificación, siendo que el CuT2 es el más lábil de los 4 cobres. Nuestros resultados muestran que la ocupación del sitio T2 no es únicamente consecuencia de

la purificación ni del proceso de cristalización sino del ambiente (pH de la solución) en que se encuentre el cristal y quizá del efecto de los rayos X.

No fue posible aumentar la ocupación de los sitios de cobre difundiendo sales de cobre en los cristales, a pesar de que su porcentaje de solvente está alrededor del 60%.

## 10 PERSPECTIVAS

Para completar el rompecabezas de las alteraciones que produce el pH en la enzima al interior del cristal, será necesario difractar un cristal crecido a pH 7 pero llevado a pH 4.5 y viceversa; uno crecido a pH 4.5 pero difractado a pH 7. De mantenerse la conformación de los sitios de cobre como hemos descrito (geometría y ocupaciones) reforzaríamos la tesis que ha resultado de este trabajo y que propone que los cambios en los sitios activos de la lacasa de *C. gallica* son consecuencia de las diferencias en pH del entorno.

Sería interesante también determinar la estructura y caracterizar la enzimología de los estados oxidado y reducido de la enzima, incubando con peróxido y con ditionita de sodio, respectivamente. Con la intención de extrapolar las diferencias que encontramos con los estados de oxidación y con los efectos de la radiación.

Lo más importante será cuantificar el número de cobres por molécula de lacasa en solución. Para ello es posible utilizar métodos bioquímicos (reacción con 2,2-biquinolina) y/o biofísicos (MicroPIXE\* y EPR).

En lo que a la catálisis se refiere resta por hacer las medidas de actividad de la proteína purificada y de la cristalizada cuantificando el consumo de O<sub>2</sub> en lugar de hacerlo por la aparición de producto. De igual forma sería útil determinar el comportamiento de las constantes  $K_m$  y  $k_{cat}$  sobre el intervalo de pH.

Resolviendo las cuestiones anteriores podremos proponer un mecanismo de reacción distinto a los actuales o concluir que la difracción de rayos X modifica notablemente las estructuras de proteínas redox.

---

\* Micropixe es una técnica en la que se bombardean las muestras con protones y se detecta la dispersión. Los protones excitan a los electrones que a su vez emiten uno o más fotones característicos del átomo que los liberó. Esto permite cuantificar el número de átomos por molécula en una muestra cualquiera.

## 11 REREFENCIAS

1. Dal Peraro, M., Ruggerone, P., Raugei, S., Gervasio, F.L and Carloni, P. Investigating biological systems using first principles Car–Parrinello molecular dynamics simulations. *Current Opinion in Structural Biology* **17**, 149–156 (2007).
2. Frausto da Silva, J.J.R. and Williams, R.J.P. 2001. The Biological Chemistry of the Elements. Oxford University Press.
3. Ochiai, E.I. Iron versus copper II. Principles and applications in bioinorganic chemistry. *Journal of Chemical Education* **63**, 942-944 (1986).
4. Kaim, W. and Rall, J. Copper – a “modern bioelement”. *Angewandte Chemie Internatioanl Edition* **35**, 43-60 (1996).
5. Solomon, E. I., Baldwin, M. J. and Lowery, M. D. Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. *Chemical Reviews* **92**, 521-542 (1992).
6. Kitajima, N. and Moro-oka, Y.. Copper-Dioxygen Complexes. Inorganic and Bioinorganic Perspectives. *Chemical Reviews* **94**, 737-757 (1994).
7. Roberts, S.A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J.T., Tollin, G., Rensing, C. and Montfort, W.R. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science* **99**, 2766-2771 (2002).
8. Solomon, E. I., Chen, P., Metz, M., Lee, S.-K. and Palmer A.E. Oxygen binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins. *Angewandte Chemie International Edition* **40**, 4570-4590 (2001).
9. Malkin, R. and Malmstrom, B.G. The state and function of copper in biological systems. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **33**, 177-244 (1970).
10. Call, H.P. and Mücke, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology* **53** 163–202 (1997).
11. Yoshida, H. Chemistry of laquer (urushi). *Journal of the Chemical Society* **43** 193-188 (1883).
12. Takami, H., Takaki, Y. and Chee, G. Genome sequence of *Oceanobacillus iheyensis* isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments. *Nucleic Acids Research* **30**, 3927–3935 (2002).
13. Okazaki, M., Sugita, T., Shimizu, M., Ohode, Y., Iwamoto, K., de Vrind-deJong, E.W., de Vrind, J.P.M. and Corstjens, P. Partial purification and characterization of manganeseoxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1. *Applied Environmental Microbiology* **63**:4793–4799 (1997).
14. Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M.L. and Bally, R. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere : evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters* **108**, 205–210 (1993).
15. Lee, Y., Hendson, M., Panopoulos, N.J., Schroth, M.N. Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. juglandis: homology with small copper proteins and multicopper oxidases. *Journal of Bacteriology* **176**, 173–188 (1994).
16. Xu, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **212**, 55 (1996).
17. Mayer, A. M. and Staples, R. C. Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**, 551-565 (2002).
18. Durán, N. and Esposito, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental* **28**, 83-99 (2000).
19. Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N.S., Hofrichter, M. and Rogalski J. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics Biology* **27**, 175-185 (1999).
20. Jiménez, N. 2003. Purificación y caracterización bioquímica de una polifenoloxidasa bacteriana con actividad de lacasa. Tesis de Maestría por el Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
21. Leontievsky, A. A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J. K., Pozdnyakova, N.N., Myasoedova, N. M., Kalkkinen, N., Golovleva, L. A., Cammack, R., Thurston, C. F. and Hatakka, A. Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiology Letters* **156**, 9-14(1997).
22. Niku, P.M.L. and Viikari, L. Enzymatic oxidation of alkenes. *Journal of Molecular Catalysis: B Enzymatic* **10**, 435-444 (2000).
23. Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolavska, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszeuska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D. and Rogalski, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology* **41**, 185–227 (2001).
24. Gardiol, A.E., Hernandez, R.J., Reinhammar, B. and Harte, B.R. Development of a gas-phase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase. *Enzyme and Microbial Technology* **18**, 347-352 (1996).
25. Xu, F. Dioxygen reactivity of laccase: Dependence on laccase source, pH, and anion inhibition. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* **95**, 125-133 (2001).
26. Xu, F., Berka, R.M., Wahleithner, J.A., Nelson, B.A., Shuster, J.R., Brown, S.H., Palmer, A.E. and Solomon, E.I. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochemical Journal* **334**, 63-70 (1998).
27. Reinhammar, B. Purification and properties of laccase and stellacyanin from *Rhus vernicifera*. *Biochimica et Biophysica Acta* **205**, 35-47 (1970).

28. Reinhammar, B. and Malmstrom, B.G. 1981. Metal ions in biology: copper proteins, ed. T.G. Spiro, ed. Vol. 3., New, York, NY. 109-149.
29. Jimenez-Juarez N, Roman-Miranda R, Baeza A, Sánchez-Amat A, Vazquez-Duhalt R, Valderrama B. Alkali and halide-resistant catalysis by the multipotent oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Journal Biotechnology* **20**, 73-82 (2005).
30. Xu, F., Shin, W., Brown, S.H., Wahleithner, H.H., Sundaram, U.M. and Solomon, E.I. A study of a series of recombinant fungal laccase and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochimica et Biophysica Acta* **1292**, 303-311 (1996).
35. Karlsson, B.G., Pascher, T., Nordling, M., Arvidsson, R.H., Lundberg, L.G. Expression of the blue copper protein azurin from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **246**, 211-7 (1989).
31. Xu, F. Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 924-928 (1997).
32. Farver, O. and Pecht, I. (1984) in *Copper Proteins and Copper Enzymes*, Lontie, R., ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 184-189.
33. Messerschmidt, A. (1997), *Multi-Copper Oxidases*, World Scientific, Singapore, pp. 23-80.
34. Koudelka, G. B., Hansen, F. B., and Ettinger, M. J. Solvent isotope effects and the pH dependence of laccase activity under steady-state conditions. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 561-565 (1985).
35. Xu, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* **35**, 7608-7614 (1996).
- Protein Folding. 3<sup>rd</sup> Edition. W.H. Freeman. New York, NY, USA.
36. Madzak, C., Mimmi, M.C., Caminade, E., Brault, A., Baumberger, S., Briozzo, P. Mougín, and Jolival, C. Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis. *Protein Engineering, Design & Selection* **19**, pp. 77-84 (2006).
37. Xu, F., Palmer, A.E., Yaver, D.S., Berka, R.M., Gambetta, G.A., Brown, S.H. and Solomon, E.I. Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase: Axial perturbations of the T1 copper. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 12372-12375 (1999).
38. Mondovi, B.; Avigliano, L. In *Copper Proteins and Copper Enzymes*; Lontie, R., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1984; Vol. 3; pp 101. En: Solomon, E. I., Sundaram, U. M. and Machonkin, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews* **96**, 2563-2605 (1999).
39. Reinhammar, B. Oxidation-Reduction Potentials of the Electron Acceptors in Laccases and Stellacyanin. *Biochimica et Biophysica Acta* **275** (1972) 245-259
40. Gianfreda, L., Xu, F. and Bollag, J.-M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* **3** 1-25 (1999).
41. Bollag, J.-M. and Leonowicz, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied Environmental Microbiology* **48**, 849-854 (1984).
42. Fersht, R.A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W.H. Freeman and Company, New York, 631 pp.
43. Kurniawati, S.; Nicell, J. A. Kinetic model of laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Biotechnol. Bioeng.* 2005, **91** (1), 114- 123.
44. Kurniawati, S.; Nicell, J. A. A pseudo-steady state model of the kinetics of laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Chem. Technol. Biotechnol.* 2006, **81** (7), 1198-1208.
45. Selvia Kurniawati and James A. Nicell. Variable Stoichiometry during the Laccase-Catalyzed Oxidation of Aqueous Phenol. *Biotechnology Progress* **23**, 389-397 (2007).
46. H.M. Berman, K. Henrick, H. Nakamura. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nature Structural Biology* **10**, 980 (2003)
47. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410 (1990).
48. Bento, I., Martins, L. O., Gato Lopes, G., Carrondo, M. A. and Lindley, P. Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Transactions* **21**, 3507-3513 (2005).
49. Enguita, F. J., Marcal, D., Grenha, R., Martins, L. O., Henriques, A. O. and Carrondo, M. A. Structural Characterization of a Bacterial Laccase Reaction Cycle. *To be Published*.
50. Enguita, F. J., Marc, D., Martins, L. O., Greña, R., Henriques, A. O., Lindley, P. F. and Carrondo, M. A. Substrate and Dioxygen Binding to the Endospore Coat Laccase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 23472-23476 (2004).
51. Lyashenko, A. V., Zhukhlistova, N. E., Gabdoulkhakov, A. G., Zaitsev, V. N., Bento, I., Lamzin, V. S., Betzel, C., Lindley, P. F., Koroleva, O. V., Zhukova, Y. N., Stepanova, E. V., Morgunova, E. Y., Voelter, W., Schirwitz, K., Tishkov, V. I., Kachalova, G. S., Cherkashyn, E. A. and Mikhailov, A. M. Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the fungal laccase from *Cerrena maxima*. *Acta Crystallographica F* **62**, 954-957 (2006).
52. Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Ostergaard, P., Schneider, P., Svendsen, A. and Davies, G.J. Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different 'type 2 Cu-depleted' isoforms. *Acta Crystallographica D* **57**, 333-336 (2001).
53. Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H. and Davies, G.J. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Structural Biology* **5**, 310-316 (1998).
54. Hakulinen, N., Kiiskinen, L.L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A. and Rouvinen, J. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural Biology* **9**, 601-605 (2002).

55. Hakulinen, N., Kruus, K., Koivula, A. and Rouvinen, J. A crystallographic and spectroscopic study on the effect of X-ray radiation on the crystal structure of *Melanocarpus albomyces* laccase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **350**, 929-934 (2006).
56. Garavaglia, S., Cambria, M.T., Miglio, M., Ragusa, S., Iacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A. and Rizzi, M. The structure of *Rigidoporus lignosus* Laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *Journal of Molecular Biology* **342**, 1519-1531(2004).
57. Smith, A.W., Camara-Artigas, A., Wang, M., Allen, J.P. and Francisco, W.A. Structure of Phenoxazinone Synthase from *Streptomyces antibioticus* Reveals a New Type 2 Copper Center. *Biochemistry* **45**, 4378-4387(2006).
58. Piontek, K., Antorini, M. and Choinowski, T. 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 (2002).
59. Bertrand, T., Jolivald, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C. and Mougín, C. (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* **41**: 7325-7333
60. Piontek, K., Antorini, M. and Choinowski, T. 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 (2002).
61. Morie-Bebel, M.M., Morris, M.C., Menzie, J.L. and McMillin, D.R. A mixed-metal derivative of laccase containing mercury(II) in the type 1 binding site. *Journal of the American Chemical Society* **106**, 3677 - 3678 (1984).
62. Severns, J. C. and McMillin, D. R. Temperature and anation studies of the type 2 site in *Rhus vernicifera* laccase. *Biochemistry* **29**, 8592-8597 (1990).
63. Graziani, M. T., Morpurgo, L., Rotilio, G. and Mondovi, B. Selective removal of type 2 copper from *Rhus vernicifera* laccase. *FEBS Letters* **70**, 87-90 (1997).
64. Solomon, E. I., Sundaram, U. M. and Machonkin, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews* **96**, 2563-2605 (1999).
65. Messerschmidt, A., Ladenstein, R., Huber, R., Bolognesi, M., Avigliano, L. and Petruzzelli R. Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **224**, 179-205 (1992).
66. Reinhammar, B. Malkin, R., Jensen, P., Karlsson, B., Andréasson, L.E., Aasa, R., Vänngård, T. and Malmström, B.G. A new copper(II) electron paramagnetic resonance signal in two laccases and in cytochrome c oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **255**, 5000-5003 (1980).
67. Bradford, M.M. 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 (1976).
68. Leslie, A.G.W. Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography, No. 26 (1992).
69. Evans, P.R. "Data reduction", Proceedings of CCP4 Study Weekend, 1993, on Data Collection & Processing, p. 114-122.
70. Vagin, A. and Teplyakov, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *Journal of Applied Crystallography* **30**, 1022-1025 (1997).
71. Murshudov, G.N., Vagin, A.A. and Dodson, E.J. Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallographica D* **53**, 240-255 (1997).
72. Collaborative Computational Project, Number 4. "The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography". *Acta Crystallographica D* **50**, 760-763 (1994).
73. Emsley, P. and Cowtan, K. Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. *Acta Crystallographica Section D* **60**, 2126-2132 (2004).
74. Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L. GenBank. *Nucleic Acids Research* **34**, D16-20 (2006).
75. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-402 (1997).
76. Higgins D., Thompson J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680 (1994).
77. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M.C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* **31**, 3381-3385 (2003).
78. Pegasova, T.V., Zwart, P., Koroleva, O.V., Stepanova, E.V., Rebrikov, D.V. and Lamzin, V.S. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a four-copper laccase from *Coriolus hirsutus*. *Acta Crystallographica D* **59**, 1459-1461 (2003).
79. Antorini, M., Herpoel-Gimbert, I., Choinowski, T., Sigoillot, J.-C., Asther, M., Winterhalter, K. and Piontek, K. Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1594**, 109-114 (2002).
80. Bertrand, T., Jolivald, C., Caminade, E., Joly, N., Mougín, C. and Briozzo, P. Purification and preliminary crystallographic study of *Trametes versicolor* laccase in its native form. *Acta Crystallographica D* **58**, 319-321 (2002).

81. Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Østergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H. and Davies, G.J. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Structural Biology* **5**, 310-316 (1998).
82. Garavaglia, S., Teresa Cambria, M., Miglio, M., Ragusa, S., Iacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A. and Rizzi, M. The structure of Rigidoporus lignosus laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *Journal of Molecular Biology* **342**, 1519-1531 (2004).
83. Heras, B. and Martin, J.L. Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals. *Acta Crystallographica D* **61**, 1173-1180 (2005).
84. Rossmann, M. The Molecular Replacement Method. *Acta Crystallographica A* **46**, 73-82 (1990).
85. Durão, P., Bento, I., Fernandes, A.T., Melo, E.P., Lindley, P.F. and Martins, L.O. Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: Structural, biochemical, enzymatic and stability studies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **11**, 514-526 (2006).
86. Shin, W., Sundaram, U. M., Cole, J. L., Zhang, H. H., Hedman, B., Hodgson, K. O. and Solomon, E. I. Chemical and spectroscopic definition of the peroxide-level intermediate in the multicopper oxidases: Relevance to the catalytic mechanism of dioxygen reduction to water. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 3202-3215 (1996).
87. Ennifar, E. Carpentier, P., Ferrer, J.-L., Walter, P. and Dumas P. X-ray-induced debromination of nucleic acids at the Br K absorption edge and implications for MAD phasing. *Acta Crystallographica D* **58**, 1262-1268 (2002).
88. K. Fütterer, R. B. G. Ravelli, S. A. White, A. J. Nicoll and R. K. Allemann. Differential specific radiation damage in the Cu<sup>II</sup>-bound and Pd<sup>II</sup>-bound forms of an  $\alpha$ -helical foldamer: a case study of crystallographic phasing by RIP and SAD. *Acta Crystallographica D* **64**, 264-272 (2008).
89. Carugo, O. and Carugo, K. D. (2005). When X-rays modify the protein structure: radiation damage at work. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 213-219.
90. Quintanar, L., Yoon, J., Azmar, C., Palmer, A. E., Anderson, K., Brito, D. and Solomon, E.I. Spectroscopic and electronic structure studies of T1 mercury laccase: the nature of the trinuclear Cu cluster and its coordination unsaturation. *Journal of the American Chemical Society* **108**, 5318 (2004).
91. Vöet, J. and Vöet, D. 1995. Biochemistry. 2<sup>nd</sup> Edition. Wiley; p.p.1392.
92. Chang, R. 1999. Química. 6<sup>ta</sup> Edición. McGraw Hill. pp351.
93. Augustine, A.J., Quintanar, L., Stoj, C.S., Kosman, D.J. and Solomon, E.I. Spectroscopic and Kinetic Studies of Perturbed Trinuclear Copper Clusters: The Role of Protons in Reductive Cleavage of the O-O Bond in the Multicopper Oxidase Fet3p. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 13118-13126 (2007).