



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTUDIO DE LA DESLOCALIZACIÓN DE ELECTRONES EN UNA OXIDASA
MULTICOBRE: IMPLICACIONES EN LA ESTABILIDAD Y LA ACTIVIDAD**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

MAYRA GUADALUPE AVELAR FRAUSTO

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARCELA AYALA ACEVES

Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. CLARITA OLVERA CARRANZA

Instituto de Biotecnología, UNAM

DRA. NINA PASTOR COLÓN

Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM (Morelos)

Cuernavaca, Morelos. Diciembre, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el grupo de Biocatálisis REDOX bajo la asesoría de la Dra. Marcela Ayala Aceves, del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los estudios de doctorado se realizaron con apoyo de la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El presente trabajo fue presentado como ponencia en dos congresos internacionales: V Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry LABIC (México-octubre 2016) y 8th European Meeting on OxiZymes (Holanda-julio 2016). Así como en modalidad cartel en dos congresos nacionales y un internacional. Se agradece el apoyo al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” de la UNAM para la asistencia a estos congresos.

A mis padres...
A mi abuela (hasta el cielo)...

Agradecimientos

A la Dra. Marcela Ayala Aceves por aceptarme como parte de su grupo de trabajo, por todas sus enseñanzas y por transmitir esa alegría por hacer ciencia. Gracias por confiar en todo momento en la realización de este trabajo, por todo el conocimiento transmitido y sobre todo por la calidez humana que la caracteriza. Y también... gracias por tantas risas compartidas!

A los miembros de mi comité tutor: Dra. Clarita Olvera Carranza y Dra. Nina Pastor Colón por sus aportaciones a este proyecto, semestre tras semestre, que contribuyeron a la realización y enriquecimiento de este trabajo.

A los integrantes del jurado revisor de esta tesis: Dr. Enrique Rudiño, Dra. Gloria Saab, Dra. Laura Domínguez, Dra. Liliana Quintanar y Dr. Alejandro Sánchez por todas sus aportaciones que enriquecieron este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de este trabajo, proyecto 179241. Además de la beca otorgada para los estudios de doctorado, becario 245426.

Al PAPIIT por los recursos otorgados para la realización de este trabajo, proyectos 201612 y 209116.

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC) de la UNAM por el acceso a la supercomputadora Miztli a través de los proyectos LANCAD-UNAM-DGTIC-293, SC16-1-S-24, SC15-1-S-29 y SC14-1-S-93.

A la Biol. Rosa Román, M.B. Timoteo Olamendi Portugal, Ing. Leticia Olvera, Dra. Ligia Luz Corrales y Dra. Adelaida Díaz Vilchis por su apoyo técnico. Asimismo, se agradece el apoyo de Mario Alberto Caro Bermúdez y la Ing. Verónica Albiter Hernández, de la planta piloto del Instituto de Biotecnología, por su apoyo durante la producción en biorreactor de la proteína recombinante.

Al Dr. Sergio Águila por su apoyo en el uso del software DESMOND.

A la unidad de cómputo del Instituto de Biotecnología: Arturo Ocádiz Ramírez, Juan Manuel Hurtado Ramírez, Roberto Pablo Rodríguez Bahena y David Santiago Castañeda Carreón por su apoyo técnico. Asimismo, se agradece el apoyo de la Unidad de Biblioteca a cargo de Shirley Elizabeth Ainsworth Gore.

Al M.C Jerome Jean Verleyen de la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la UNAM / Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas por darnos acceso al cluster.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para la asistencia a congresos.

Y en especial...

A mis padres, todo lo que soy se lo debo a ellos. Gracias por ser los padres más exigentes y más cariñosos, por mostrarme el valor de cada momento en la vida y por enseñarme a luchar por cada sueño. Los amo con todo mi ser.

A mis hermanos y sobrinos, por que sin ellos la vida no sería tan bonita. En especial a mi hermano Carlos que ha sido un gran apoyo durante toda esta travesía viviendo lejos de casa.

A mis amigos en Cuernavaca: Oscar Chu, Estefa, Ale, Claudia y Joaquín, por hacer la estancia aquí más agradable. Y a todos mis compañeros y excompañeros de laboratorio, por hacer cada día de trabajo más divertido.

A mis amigos crossfiteros que los últimos dos años hicieron de Cuernavaca el mejor lugar para entrenar, y que se volvieron una familia. En especial a mis grandes amigas: Ana, Andy e Itzel, que han estado todo este tiempo en las buenas y en las malas.

Resumen

Las lacasas catalizan la oxidación de compuestos orgánicos a partir de la reducción de oxígeno molecular, produciendo únicamente agua como sub-producto. Poseen en su sitio activo cuatro átomos de cobre clasificados en tres sitios (T1, T2 y T3) de acuerdo con sus propiedades espectroscópicas. En el sitio T1 es donde se lleva a cabo la oxidación del sustrato, mientras que en el sitio trinuclear T2/3 se da la reducción de oxígeno a agua. Se sabe que las lacasas, al igual que las peroxidasas, se inactivan durante el ciclo catalítico debido a la interacción con los radicales libres provenientes de la reacción que catalizan. El estudio de los procesos electrónicos de las lacasas a un nivel molecular, a partir de metodologías computacionales, son un área de investigación de interés básico y también aplicado, pues se puede mejorar la estabilidad y/o actividad de estas enzimas a través del diseño racional. La ingeniería de proteínas, a partir de la identificación de residuos susceptibles a oxidarse, es una estrategia que puede ser empleada en el mejoramiento la estabilidad operacional de las enzimas, dicha estabilidad se puede definir con base al rendimiento de la enzima durante un proceso catalítico, y que puede ser expresado en términos del número total de recambio o del rendimiento sustrato/enzima para un tiempo o conversión de reacción específicos.

En este trabajo se realizó un estudio de la distribución electrónica de la lacasa de *Coriolopsis gallica* UAMH8260, a partir de herramientas de química computacional, con el objetivo de establecer su relación con la actividad y la estabilidad operacional, y de esta manera proponer variantes con una mejora en el rendimiento de la enzima durante la reacción. El estudio se realizó a partir de la densidad de espín, bajo la hipótesis de que aquellos residuos que deslocalizan densidad de espín serán más susceptibles a oxidarse. A partir de siete conformaciones provenientes de simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo cálculos de la densidad de espín a través de métodos híbridos QM/MM (*Quantum Mechanics-Molecular Mechanics*, por sus siglas en inglés). Para esto se realizó un estudio del tamaño de la zona QM para determinar la región mínima que describiera al sistema; se encontraron, entre otros residuos, tres Phe (F357, F413 y F475) en la cavidad del sitio T1 que son blancos potenciales de oxidación debido a la deslocalización de densidad de espín en el anillo aromático y a su exposición al solvente. Estas posiciones se reemplazaron, con base en un

alineamiento múltiple de secuencias, por aminoácidos menos susceptibles a oxidarse. Se generaron las variantes F357L, F413A y F475I de las cuales las dos primeras mostraron una mejora entre 1.8- 2.4 veces en la estabilidad operacional, respecto a la enzima nativa, durante la oxidación de 4-metoxifenol. La variante F475I no mostró una mejora en la estabilidad operacional, pero presentó un incremento en la eficiencia catalítica de 2.6 veces, durante la oxidación de siringaldazina.

El estudio molecular y electrónico de las proteínas a partir de herramientas computacionales, en combinación con la ingeniería de proteínas, nos ofrecen una estrategia prometedora para el mejoramiento en la eficiencia de las enzimas (en términos de productividad del catalizador) así como en sus propiedades catalíticas, como se mostró en este trabajo al generar variantes de una lacasa fúngica con una mejor estabilidad operacional a partir de simulaciones de dinámica molecular y cálculos QM/MM en conjunto con técnicas de ingeniería genética (mutaciones sitio-dirigidas).

Abstract

Laccases are enzymes that catalyze the oxidation of an organic substrate concomitant with the reduction of molecular oxygen to water. These enzymes contain four copper atoms in the active site classified in three groups (T1, T2 and T3) according to their spectroscopic properties. T1 site is where the substrate oxidation takes place and one radical is produced, while T2/3 site is a trinuclear cluster where oxygen is reduced to water. Laccases, like peroxidases, are inactivated during catalysis due to free radical released during the reaction. Based on electronic processes, it is interesting to study the enzyme at a molecular level to understand the catalytic mechanism and improve its stability and/or activity. Engineering of this type of enzymes, by identifying residues susceptible to the attack of free radicals, is a promising and novel strategy to improve the operational stability. This operational stability could be defined as the yield of an enzyme during a reaction that is related with the total turnover number or with the substrate/enzyme relation for a specific time or conversion.

In this work, we perform a study of the spin density distribution of the *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase through computational chemistry methods in order to enhance the stability towards the attack of free radicals. Since spin density distribution is related to the probability of finding an unpaired electron, we assumed that the residue with most spin density would be susceptible to oxidation. Several enzyme conformations were obtained from molecular dynamics. Calculations of spin density were performed using hybrid quantum mechanics-molecular mechanics methods (QM/MM) for all structures. A study of different QM zones was performed to determine the best description of the system. The QM zone comprise the surroundings of T1 site, because is in this place where the first electron transfer occurs. At least three Phe residues in the cavity of the T1 site showed spin density in their aromatic ring (F357, F413 y F475), so they were considered for mutation. These positions were replaced with aminoacids according to a sequence alignment with less oxidizable residues. F357L, F413A and F475I variants were generated and expressed in *Pichia pastoris* system, F357L and F413A showed better operational stability (1.8-2.4 fold improvement) during the oxidation of 4-metoxyphenol. F475I variant did not showed an improvement in the operational stability, but it presented a better catalytic efficiency against the oxidation of syringaldazine (2.6 fold improvement).

Molecular and electronic studies of proteins using theoretical simulations and protein engineering tools are a promising strategy in the improvement of the enzymatic efficiency (in terms of catalyst spent) or their catalytic properties. As has been found in this work with the designing, through molecular dynamics simulations and QM/MM calculations combined with genetic engineering tools (site-directed mutagenesis), of more stable variants of a fungal laccase with a better operational stability.

Contenido

1	Introducción	1
1.1	La lacasa: características, estructura y mecanismo catalítico	1
1.1.1	Características estructurales de la lacasa	2
1.1.2	Procesos de transferencia electrónica en la lacasa	4
1.2	Métodos computacionales en el estudio molecular y electrónico de las enzimas	7
1.2.1	Mecánica Molecular	8
1.2.2	Mecánica cuántica	8
1.2.3	Métodos híbridos (QM/MM)	9
2	Antecedentes	11
2.1	Factores moleculares y electrónicos involucrados en la actividad y la estabilidad de la lacasa	11
2.2	Simulaciones computacionales en el estudio de oxidasas multicobre	13
2.3	La química computacional en el estudio de la catálisis y en el diseño racional de enzimas	15
3	Hipótesis	18
4	Objetivos	18
5	Metodología	19
5.1	Simulaciones de dinámica molecular	19
5.2.	Cálculos de estructura electrónica (QM/MM)	22
5.3	Microorganismos y reactivos	24
5.4	Medios de cultivo de <i>P. pastoris</i>	24
5.5	Construcción del vector de expresión y transformación en <i>P. pastoris</i>	24
5.6	Expresión de la lacasa de <i>C. gallica</i> en <i>P. pastoris</i>	25
5.7	Purificación de LcCg recombinante	25
5.8	Ensayo de actividad lacasa y medición de concentración de proteína	26
5.9	Mutagénesis sitio-dirigida de LcCg recombinante	26
5.10	Estabilidad operacional de las variantes de la lacasa durante la oxidación de 4-metoxifenol	27
6	Resultados y Discusión	28
6.1	Estudio de la rigidez del sitio activo de la lacasa de <i>C. gallica</i>	28
6.2	Análisis conformacional de la lacasa de <i>C. gallica</i>	31
6.3	Predicción de residuos susceptibles a oxidarse	35

6.4	Diseño de mutantes de los residuos susceptibles a oxidación predichos por cálculos QM/MM	42
6.5	Expresión heteróloga de la lacasa de <i>C. gallica</i> en <i>P. pastoris</i>	43
6.6	Estudio de las variables que afectan la expresión de LcCg en <i>P. pastoris</i>	45
6.6.1	Efecto de la concentración de CuSO₄	46
6.6.2	Efecto de la concentración de metanol	46
6.6.3	Efecto de la temperatura	47
6.7	Producción de LcCg recombinante en matraz	47
6.8	Purificación de la proteína recombinante	49
6.9	Caracterización cinética de LcCg recombinante	50
6.10	De la teoría al experimento. Evaluación de las mutantes predichas por cálculos QM/MM	51
6.11	Estabilidad operacional de las variantes durante la oxidación de fenoles	53
6.12	Factores que modulan la estabilidad y actividad de la lacasa	55
6.12.1	Flexibilidad de la primera y segunda esfera de coordinación del CuT1 en la lacasa de <i>C. gallica</i>	56
6.12.2	Flexibilidad de los dominios estructurales de la lacasa de <i>C. gallica</i>	60
6.12.3	Influencia del tamaño de la región QM en los cálculos de densidad de espín	62
6.12.4	Los aminoácidos de la segunda esfera de coordinación del CuT1 que alojan densidad de espín son importantes para la estabilidad operacional y la actividad de la lacasa de <i>C. gallica</i>	63
7	Conclusiones	67
8	Perspectivas	68
9	Referencias	69
10	Apéndice	77
11	Anexos	79
11.1	Carteles presentados en congresos	79
11.2	Publicaciones producto de esta tesis	82

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1.1. Representación de los procesos de transferencia electrónica. En rojo se muestra el motivo conservado His-Cys-His.....	4
Figura 1.2. Mecanismo propuesto para la reducción de oxígeno a agua por las lacasas. Figura tomada de Jones & Solomon, 2015.....	6
Figura 1.3 Modelo QM/MM para una proteína multicobre. Los átomos en rojo (modelo CPK) representan la región QM (sitio activo de la enzima).....	10
Figura 5.1. Coordinación en el estado oxidado. L y B corresponden a OH ⁻ . Figura tomada de Rulíšek et al. 2005.....	19
Figura 6.1. RMSD (Å), de todos los átomos excluyendo los de hidrógeno, para A) proteína, B) primera esfera de coordinación del CuT1, C) primera esfera de coordinación del CuT2/3, D) segunda esfera de coordinación del CuT1. Dinámica molecular de 100 ns.....	30
Figura 6.2. Dependencia del CuT2 con la constante de fuerza.....	31
Figura 6.3. RMSD (Å), para todos los átomos excluyendo los de hidrógeno, para A) proteína, B) primera esfera de coordinación del CuT1, C) primera esfera de coordinación del CuT2/3, D) segunda esfera de coordinación del CuT1. Dinámica molecular, 100 ns, utilizando los parámetros para la CueO (Hu et al. 2011).....	32
Figura 6.4. Distancia O (carbonilo-Pro414)-CuT1 durante la dinámica molecular.....	33
Figura 6.5. A) RMSD (Å), de todos los átomos excluyendo los de hidrógeno, de la Phe475 durante los 100 ns de simulación, B) representación molecular de la Phe475 respecto al CuT1. Representación en negro corresponde a la estructura cristalográfica (PDB ID: 4A2E) y en rojo la conformación 7, C) distribución conformacional de la dinámica con base en la distancia CuT1-C3 (Phe475).....	34
Figura 6.6. Posición de los residuos que alojaron la mayor densidad de espín: A) residuos aromáticos, B) residuos no aromáticos. En amarillo se muestran los residuos de la primera esfera de coordinación del CuT1. Representación de superficie expuesta al solvente.....	41
Figura 6.7. Frecuencia de residuos proveniente del alineamiento múltiple de secuencias para diferentes lacasas de hongos en las posiciones: A) 357, B) 413, C) 475 y D) oxidorreductasas de plantas de la posición 475. Los alineamientos se generaron con el servidor Clustal Omega y las imágenes con el servidor WebLogo.....	43
Figura 6.8. Ensayo de actividad lacasa en caja. La coloración verde muestra la oxidación de ABTS por la enzima secretada.....	45
Figura 6.9. Efecto de la concentración de CuSO ₄ en A) crecimiento, B) actividad volumétrica de lacasa. Experimentos realizados por triplicado en medio BMM con adición de MeOH cada 24 horas.....	46
Figura 6.10. Efecto de la concentración de MeOH en A) crecimiento, B) actividad volumétrica de lacasa. Experimentos realizados por triplicado en medio BMM con adición de MeOH cada 24 horas, con 0.5 mM de CuSO ₄	47
Figura 6.11. Perfiles de crecimiento y producción de lacasa en matraces Fernbach. Experimentos realizados por triplicado con adición de MeOH cada 24 horas. Condiciones de cultivo: 1 % MeOH, 0.5 mM CuSO ₄ y 28 °C.....	48
Figura 6.12. A) SDS-PAGE de las muestras obtenidas en cada paso de purificación. Tinción con plata. Línea: 1-marcador de masa molecular (kDa), 2-sobrenadante del cultivo, 3-ultrafiltración, 4-DEAE, 5-G75 sephadex. Se cargó 1 µg de proteína. B) Experimento de deglicosilación de la lacasa recombinante. Línea: 1-marcador de peso molecular (kDa), 2-lacasa recombinante, 3-lacasa tratada con PGNase F.....	50
Figura 6.13. Sitio de unión a sustrato para la lacasa TvL IIIb (PDB ID: 1KYA – azul) superpuesta con la lacasa de <i>C. gallica</i> (magenta). Se presenta la numeración de los residuos para 1KYA. Representación de superficie expuesta al solvente.....	52

Figura 6.14. Residuos seleccionados para mutagénesis sitio-dirigida. En verde oscuro se representan los residuos de la segunda esfera de coordinación. Se resaltan las 3 Phe seleccionadas. En amarillo se resalta la primera esfera de coordinación del CuT1 y la proteína se representa como superficie expuesta al solvente.....	53
Figura 6.15. A) Actividad residual (unidades de siringaldazina) de las diferentes variantes durante la oxidación de 4-metoxifenol, B) consumo de metoxifenol de las diferentes variantes. Experimentos realizados por triplicado.....	54
Figura 6.16. Estabilidad operacional de las variantes de la lacasa de <i>C. gallica</i> . El rendimiento corresponde a la relación del sustrato consumido entre la enzima inactiva en unidades de $\mu\text{mol/U}$. Se reporta el promedio de experimentos realizados por triplicado.....	55
Figura 6.17. A) Movimiento de las cadenas laterales de los residuos F352, F413, F417 y F475, basados en las simulaciones de dinámica molecular de 100 ns. Representación en negro corresponde a la estructura cristalográfica (4A2E), B) representación de estas Phe en la cavidad del CuT1. Se presenta la superficie expuesta al solvente.....	58
Figura 6.18. A) Posición de la F475 dentro de la proteína a una distancia de 11 Å del CuT1, B) acercamiento a una distancia de 7 Å del CuT1 y exposición al solvente de la F475. Representación de superficie expuesta al solvente.....	59
Figura 6.19. Primera esfera de coordinación de los sitios T1 y T2/3. En rojo se presentan los residuos que conectan el estos sitios.....	60
Figura 6.20. RMSD (Å), de todos los átomos excluyendo los de hidrógeno, por dominios de la lacasa de <i>C. gallica</i>	61
Figura 6.21. Movimiento del <i>loop</i> (173-187) para tres conformaciones de las simulaciones de dinámica molecular (20, 61 y 84 ns).....	62

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1.1. Sitios de coordinación de los átomos de cobre en las lacasas.....	3
Tabla 5.1. Constantes de fuerza (k) utilizadas para los cálculos de dinámica molecular (Hu et al. 2011).....	20
Tabla 5.2 Parámetros empleados para la dinámica molecular.....	22
Tabla 5.3 Parámetros empleados en los cálculos QM/MM.....	23
Tabla 6.1. Porcentaje de la densidad de espín en la primera esfera de coordinación del CuT1 calculada por métodos QM/MM con el funcional B3LYP para diferentes tamaños de la región QM. Estado basal (doblete, Cu ²⁺). Para todos los casos, 100% de densidad de espín es igual a 1 (1 electrón desapareado).....	36
Tabla 6.2. Secuencia de residuos de la zona QM con 472 átomos.....	37
Tabla 6.3. Densidad de espín en el sitio T1 para siete conformaciones en el estado basal y dos estados activados ($\pm 1 e^-$).....	38
Tabla 6.4. Cambio en la densidad de espín entre el estado activado y el estado basal (sistema más un electrón). Los valores no mostrados representan $\Delta\rho_s=0$	39
Tabla 6.5. Cambio en la densidad de espín entre el estado activado y el estado basal (sistema menos un electrón). Los valores no mostrados representan $\Delta\rho_s=0$	40
Tabla 6.6. Pasos de purificación de LcCg	49
Tabla 6.7. Constantes cinéticas de LcCg (nativa y recombinante), usando siringaldazina como sustrato.....	50
Tabla 6.8. Constantes cinéticas para cada una de las variantes construidas, usando siringaldazina como sustrato.....	51

Abreviaturas

Å	Ångström (1×10^{-10} m)
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico
BSA	Albúmina de suero bovino (por sus siglas en inglés, <i>Bovine serum albumin</i>)
B3LYP	Funcional híbrido
DFT	Teoría de Funcionales de la Densidad (por sus siglas en inglés, <i>Density Functional Theory</i>)
HSA	Albúmina de suero humana (por sus siglas en inglés, <i>Human serum albumin</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano blanco (por sus siglas en inglés, <i>Horseradish peroxidase</i>)
EPR	Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica (por sus siglas en inglés, <i>Electronic Paramagnetic Resonance</i>)
LiP	Lignina peroxidasa
MCO	Oxidasa multicobre (por sus siglas en inglés, <i>Multicopper Oxidase</i>)
MeOH	Metanol
MM	Mecánica Molecular
NI	Intermediario nativo (por sus siglas en inglés, <i>Native Intermediate</i>)
PI	Intermediario Peróxido (por sus siglas en inglés, <i>Peroxide Intermediate</i>)
QM	Mecánica cuántica
SPC	Tipo de modelo de agua (por sus siglas en inglés, <i>Single Point Charge</i>)
VP	Vanadio peroxidasa

1 Introducción

El uso de enzimas que catalizan la oxidación de compuestos contaminantes es una opción prometedora en el campo de la biorremediación. Tal es el caso de las lacasas de hongos, las cuales pertenecen a la familia de las oxidasas multicobre; estas enzimas tienen la capacidad de oxidar contaminantes orgánicos, como por ejemplo los fenoles, a partir de la reducción del oxígeno molecular produciendo únicamente agua como sub-producto. Debido a su uso potencial en procesos de biorremediación, lacasas con alta actividad y estabilidad operacional son deseables. Con base en los factores moleculares que modulan la eficiencia de la lacasa y de los procesos electrónicos que se encuentran relacionados con la estabilidad operacional de la misma, es interesante su estudio a un nivel molecular con el objetivo de diseñar una enzima más activa y estable. En el presente trabajo se propone utilizar metodologías computacionales para mejorar la estabilidad operacional de la lacasa de *C. gallica* a partir de predicciones en la densidad de espín de los residuos cercanos al sitio T1.

1.1 La lacasa: características, estructura y mecanismo catalítico

La lacasa (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxígeno oxidoreductasa) pertenece a la familia de las oxidasas multicobre (MCO's por sus siglas en inglés), fue aislada por primera vez del árbol de laca *Rhus vernicifera* a finales del siglo XIX (Yoshida 1883). Es una glicoproteína con masa molecular que varía entre 50-85 kDa (Rodgers et al. 2010). Una de sus características más importantes es su alto nivel de glicosilación, que consiste principalmente de manosa, galactosa y N-acetilglucosamina; para lacasas de plantas el porcentaje de carbohidratos constituye aproximadamente el 45 % de la masa de la biomolécula, mientras que para lacasas de hongo varía entre 10-20 % (Morozova et al. 2007). Los posibles roles que desempeña la glicosilación pueden estar relacionados con la estabilización, secreción, protección contra proteólisis y aumento en la termoestabilidad (Morozova et al. 2007; Hildén et al. 2009). En cuanto a los sustratos de esta enzima comúnmente se encuentran los fenoles, anilinas y tioles. Los más usados para ensayos de actividad son siringaldazina, 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) y guaiacol; sin embargo, también pueden oxidar sustratos reductores tales como el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico (ABTS) y ferrocianuro de potasio.

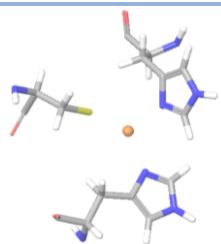
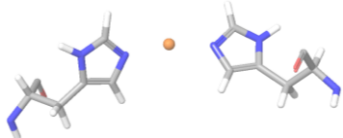
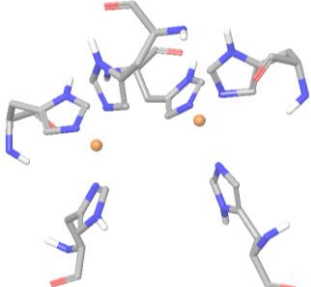
Las lacasas pueden ser encontradas en diferentes organismos como plantas, hongos, bacterias e incluso en algunos insectos. Las que pertenecen a plantas y bacterias son normalmente lacasas de bajo potencial redox, mientras que las lacasas con alto potencial redox provienen comúnmente de hongos. Las lacasas fúngicas han sido las más estudiadas y caracterizadas, tal vez por sus grandes capacidades catalíticas al presentar un alto potencial redox, lo que les permite tener un amplio rango de sustratos a oxidar. La mayoría de éstas son proteínas monoméricas, globulares y extracelulares, con una masa molecular entre 60-70 kDa y un punto isoeléctrico (pI) cercano a 4 (Giardina et al. 2010). En especial la lacasa del basidiomiceto *Corioloropsis gallica* ha sido objeto de estudio para nuestro grupo de trabajo. Esta enzima tiene un pI de 3.4, una masa molecular de 66 kDa determinado por SDS-PAGE y un contenido de carbohidratos del 21 % del peso de la biomolécula. Existen en la literatura reportes de su uso potencial en la oxidación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Pickard et al. 1999; Bressler et al. 2000; Vandertol-Vanier et al. 2002), de plaguicidas (Torres-Duarte et al. 2009) y perturbadores endócrinos (Torres-Duarte et al. 2012); así como en la decoloración de efluentes industriales (Calvo et al. 1998; Rodríguez et al. 1999) y la elaboración de celdas enzimáticas (Martinez-Ortiz et al. 2011; Arrocha et al. 2014).

1.1.1 Características estructurales de la lacasa

Las lacasas presentan en su sitio activo cuatro átomos de cobre en diferentes centros metálicos, clasificados en tres sitios, T1, T2 y T3 de acuerdo con sus propiedades espectroscópicas de UV-Vis y EPR (Solomon et al. 1996), los cuales se presentan en la Tabla 1.1. El sitio T1 tiene una geometría triangular en la que los átomos de nitrógeno de dos histidinas y el azufre de una cisteína se encuentran coordinados al metal. El residuo en la posición axial, situado aproximadamente a 4Å del cobre, puede cambiar de una lacasa a otra y generalmente comprende los siguientes: fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina y glutamina, la naturaleza de este residuo tiene un efecto en el potencial redox de la enzima siendo las lacasas que poseen residuos que donen densidad electrónica al cobre, como en el caso de la metionina, las que generalmente presentan bajos potenciales redox (Rodgers et al. 2010). El CuT1 es detectable por EPR y debido a la transferencia de carga del azufre de la cisteína al cobre ($\text{CysS}^- \rightarrow \text{Cu}^{2+}$) presenta una banda de absorción en el espectro visible aproximadamente a 610 nm ($\epsilon \approx 5300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), lo que confiere el color azul característico de

la enzima. El potencial redox de este sitio puede variar de 430 mV – 780 mV y es el que determina la eficiencia catalítica de la enzima durante la oxidación del sustrato (Xu 1996). El sitio T2 corresponde a un clúster mononuclear, no presenta una banda de absorción en el espectro UV-Vis, pero sí es detectable por EPR. El cobre se encuentra coordinado a los nitrógenos de dos histidinas y al oxígeno de una molécula de agua o un ion hidroxilo (dependiendo del estado de oxidación). El sitio T3 es un clúster binuclear en el que cada átomo de cobre se encuentra unido a los nitrógenos de tres histidinas. Presenta una banda de absorción aproximadamente a 330 nm ($3600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y no es detectable por EPR debido al acoplamiento antiferromagnético entre los cobres. El sitio T3, junto con el sitio T2, forma parte del clúster trinuclear que participa en la reducción de oxígeno a agua. Estas proteínas exhiben una estructura similar, organizada en tres dominios estructurales. El sitio T1 se localiza en el dominio 3 mientras que el clúster trinuclear (T2/3) se encuentra entre los dominios 1 y 3 (Giardina et al. 2010).

Tabla 1.1. Sitios de coordinación de los átomos de cobre en las lacasas.

Sitio	Características principales	Modelo 3D
T1	Unido a dos histidinas y una cisteína, tiene un potencial redox entre 430-780 mV, presenta una banda de absorción a 610 nm y es detectable por EPR.	
T2	Coordinado a dos histidinas, no presenta banda de absorción UV-Vis y es detectable por EPR.	
T3	Centro binuclear, cada átomo está unido a 3 histidinas, presenta una banda de absorción a 330 nm y no es detectable por EPR.	

1.1.2 Procesos de transferencia electrónica en la lacasa

En las lacasas la catálisis está íntimamente ligada a procesos de transferencia de electrones (Figura 1.1):

- Reducción del cobre en el sitio T1 por un sustrato.
- Transferencia del electrón del sitio T1 al sitio T2/3.
- Reducción del oxígeno molecular a agua en el clúster trinuclear T2/3.

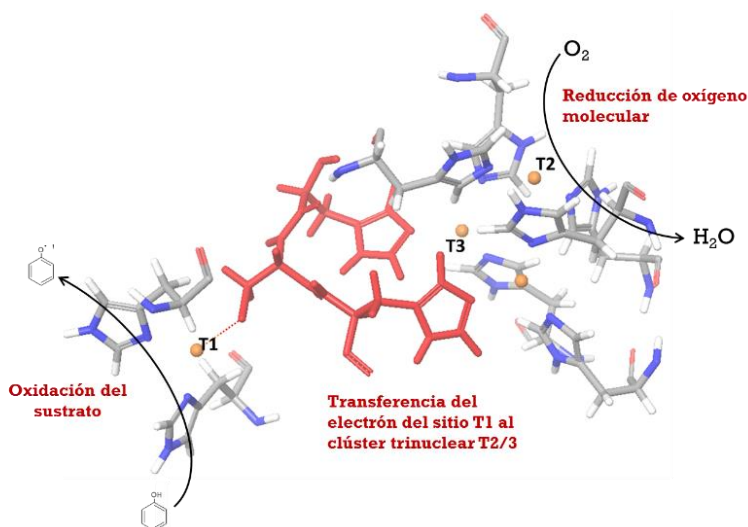


Figura 1.1. Representación de los procesos de transferencia electrónica. En rojo se muestra el motivo conservado His-Cys-His.

La reducción del cobre en el sitio T1 ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$) se da por un mecanismo de transferencia electrónica de esfera externa (Marcus & Sutin 1985) y es el paso limitante del proceso catalítico. La velocidad de la transferencia de electrones está fuertemente determinada por la diferencia en el potencial redox entre el sitio T1 y el sustrato (Xu 1996). Esta velocidad se puede relacionar, de acuerdo con la teoría de Marcus, con parámetros termodinámicos como se representa en la Ecuación 1.1. Aquí, la constante de velocidad se relaciona de manera exponencial con la energía libre del proceso de transferencia electrónica; esta energía libre a su vez se encuentra en función de la energía de reorganización del sistema (λ) y de la energía libre de reacción (ΔG^0), Ecuación 1.2 (Marcus 1993).

$$k = A \exp \left[\frac{-\Delta G^*}{k_B T} \right] \text{ Ecuación 1.1}$$

$$\Delta G^* = \frac{\lambda}{4} \left[1 + \frac{\Delta G^0}{\lambda} \right]^2 \text{ Ecuación 1.2}$$

La energía de reorganización (λ) está relacionada con la energía correspondiente al cambio conformacional generado durante la oxidación/reducción, mientras que la energía libre de reacción es una función de la diferencia entre el potencial redox del aceptor y del donador (Brunschwig & Sutin 1999; Solomon et al. 2004). Una vez que el cobre del sitio T1 ha sido reducido, el electrón tiene que ser transferido una distancia aproximadamente de 13 Å hasta llegar al sitio trinuclear T2/3, que es en donde ocurre la reducción del oxígeno. El paso de electrones entre los dos sitios se lleva a cabo a través del motivo conservado His-Cys-His (Kosman 2010) en un arreglo estructural $[\text{CuT2/3-His}]_2\text{-Cys-CuT1}$ donde dos histidinas se encuentran coordinadas a dos átomos de cobre en el sitio trinuclear y la cisteína al cobre del sitio T1 (Rulíšek & Ryde 2013). Una vez que los electrones han sido transferidos del sitio T1 \rightarrow T2/3, la reducción del oxígeno molecular puede llevarse a cabo. Uno de los mecanismos propuestos para este proceso es el que se esquematiza en la Figura 1.2. Primeramente el sitio activo es reducido (Cu^{1+}), posteriormente el estado reducido de la enzima reacciona con la molécula de oxígeno, lo cual procede en dos pasos secuenciales de transferencia electrónica (Lee et al. 2002; Yoon & Solomon 2005; Jones & Solomon 2015), dando como primer estado la formación del llamado “intermediario peróxido” (PI, *Peroxide Intermediate* por sus siglas en inglés) y consecuentemente el “intermediario nativo” (NI, *Native Intermediate* por sus siglas en inglés). La formación del PI es el paso limitante, esta especie no presenta propiedades paramagnéticas y se sabe que un residuo ácido (D94 para Fet3P, Figura 1.2) es esencial para la reducción de oxígeno (Jones & Solomon 2015). A través de cálculos teóricos del PI se ha observado que una carga negativa cerca de este sitio disminuye el potencial de reducción de los cobres T2 y T3 β , lo que provoca que sea más fácil que éstos donen sus electrones al oxígeno lo que conlleva a la formación de una especie con un intermediario peróxido, cuya geometría es esencial para el rompimiento del enlace O-O (Figura 1.2). El siguiente paso, en el que interviene el rompimiento del enlace O-O, es más rápido que la formación del PI y lleva a la formación del NI. En ausencia del sustrato reductor el NI decae a la forma oxidada a una velocidad muy baja, comparada con la velocidad de formación del estado reducido, lo que hace a este paso no relevante durante la catálisis enzimática, por lo que el NI aparenta ser la forma oxidada de la enzima (Lee et al. 2002). En presencia del sustrato reductor el NI pasa a la forma reducida para seguir con el ciclo catalítico.

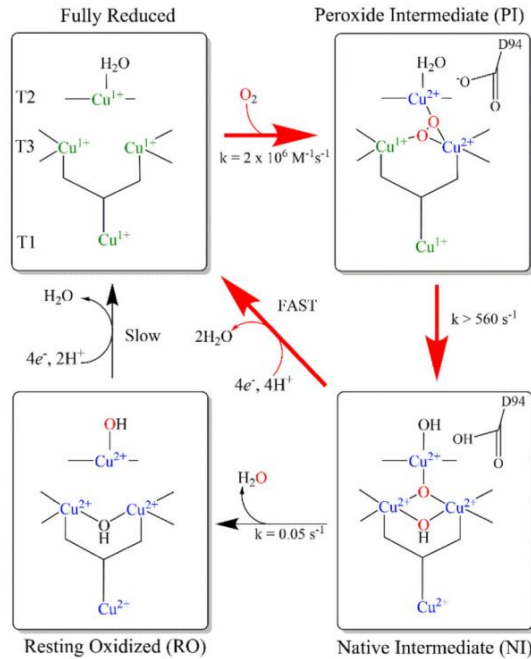


Figura 1.2. Mecanismo propuesto para la reducción de oxígeno a agua por las lacasas. Figura tomada de Jones & Solomon, 2015.

Se ha establecido que existen dos residuos ácidos que son estructuralmente conservados en las MCO's y que juegan un papel muy importante en el rompimiento de la molécula de O₂. Un ácido glutámico (Glu) presente cerca del clúster trinuclear que puede actuar como donador de protones, y un aspartato (Asp) que desprotona el agua que se encuentra como ligando en el sitio T2. Además, existen dos canales dentro de la proteína que permiten el acceso hacia el clúster trinuclear, el primero permite la entrada del O₂ y se encuentra cerca del sitio T3 y el otro cercano al sitio T2, que permite a las moléculas de agua salir del interior de la proteína.

Además de los mecanismos de transferencia de electrones hasta ahora descritos, existen también factores moleculares como la geometría del sitio T1, la hidrofobicidad en la cavidad del sitio T1 y las interacciones electrostáticas de la segunda esfera de coordinación, que pueden modular el potencial redox de la enzima y por lo tanto su eficiencia catalítica. Todos estos procesos pueden ser modelados a partir de herramientas computacionales para entender y explicar los procesos catalíticos de estas enzimas e incluso llevar a cabo ingeniería de proteínas para diseñar o mejorar sus propiedades catalíticas.

1.2 Métodos computacionales en el estudio molecular y electrónico de las enzimas

El modelado molecular, así como la simulación se han convertido en herramientas importantes para proponer hipótesis sobre los procesos catalíticos de las enzimas. Aquí la base principal es el estudio molecular de la proteína a partir de diversos principios de química computacional. Antes de comenzar a establecer qué métodos pueden ayudarnos a realizar esta tarea, es preciso comprender qué es la química computacional, sus alcances y limitaciones.

La química computacional abarca el uso de modelos matemáticos implementados en sistemas computacionales que nos proporcionan información útil sobre algunas propiedades moleculares que no son asequibles experimentalmente; también nos dan la oportunidad de explicar resultados obtenidos experimentalmente. Es importante recordar que la química computacional adquiere una mayor relevancia cuando se respalda con la química experimental. Al comenzar a realizar una simulación molecular es común preguntarse ¿por dónde empezar? De manera general, este proceso está constituido por tres pasos:

1. Construcción del modelo tridimensional.
2. Muestreo conformacional.
3. Mapeo del proceso enzimático.

El primer paso considera la elección del método computacional. Ya que el modelo se ha elegido, es necesario realizar un muestreo conformacional mediante métodos clásicos, como dinámicas moleculares o métodos de Monte Carlo. El último paso consiste en realizar un mapeo del proceso enzimático; es decir, se modela el rompimiento y formación de enlaces, transferencias electrónicas, estados de transición, entre otros (Wallrapp & Guallar 2011).

Al hacer un estudio *in silico* de un proceso enzimático es preciso elegir correctamente los métodos computacionales de acuerdo con el objetivo del proyecto, ya que de esto dependerá la certeza de los resultados. Los métodos computacionales se pueden clasificarlos en:

1. Mecánica molecular
2. Mecánica cuántica

No es posible establecer cuál es mejor que otro ya que dependerá del alcance de la investigación y las preguntas a resolver; así como de las características de las moléculas que

se modelen con estas aproximaciones. A continuación, se describen de manera breve ambos métodos.

1.2.1 Mecánica Molecular

Los métodos de mecánica molecular (MM, *Molecular Mechanics* por sus siglas en inglés) tienen como base las leyes de la física clásica. Estos métodos tratan a las moléculas como una serie de partículas puntuales con masa y carga (átomos) unidos por un potencial armónico representado por resortes (enlaces). Esta metodología construye una expresión para la energía potencial que es función de las posiciones atómicas y que comprende la suma de expresiones matemáticas que modelan la energía de las fuerzas de enlace (tensión de enlace, flexión de enlace, torsiones) y de no enlace (Van der Waals e interacciones electrostáticas), así como una serie de parámetros empíricos para cada una de las mismas (Vanommeslaeghe et al. 2014). A este conjunto de expresiones y parámetros se le denomina campo de fuerza. Ya que estos métodos no tratan explícitamente a los electrones, es posible tratar sistemas de millones de átomos (Zimmer 1995); sin embargo, no puede describir la reactividad de una molécula (formación y rompimiento de enlaces).

Los métodos más utilizados que se basan en la mecánica molecular comprenden las simulaciones de dinámica molecular (MD, *Molecular Dynamics* por sus siglas en inglés) y los métodos de Monte Carlo. Los cálculos MD describen el movimiento de las partículas de un sistema en el tiempo a partir de la segunda ley de Newton. Son ampliamente utilizados para describir la dinámica de proteínas y también se emplean como una aproximación para estudiar la relación estructura-función de las mismas. Por su parte, los métodos de Monte Carlo se basan en una distribución estadística y muestreos aleatorios de conformaciones, pero no dan información relativa al tiempo (Jorgensen & Tirado-Rives 1996).

1.2.2 Mecánica cuántica

Modelar una reacción química requiere de un método capaz de describir el rompimiento y la formación de enlaces, limitante que poseen los métodos MM. Los métodos basados en la mecánica cuántica (QM, *Quantum Mechanics* por sus siglas en inglés), modelan los electrones explícitamente por lo que son útiles para el estudio de geometrías moleculares, estructura electrónica y reactividad; estas metodologías están basadas en la resolución de la

ecuación de Schrödinger, la cual solamente puede ser resuelta de forma exacta para el átomo de hidrógeno. Para moléculas polielectrónicas, con las que tratamos normalmente, es necesario emplear aproximaciones para resolverla. Aunque los cálculos de química cuántica no son exactos para moléculas con más de un electrón, existen diferentes métodos que han sido desarrollados para aproximar la resolución de esta ecuación y que se sabe, describen de una forma adecuada diferentes propiedades de los sistemas químicos (reactividad, propiedades termodinámicas, estructura electrónica y propiedades espectroscópicas) en comparación con su contraparte experimental. Los diferentes métodos QM difieren entre sí por la aproximación que utilizan, de manera general los podemos clasificar en tres: métodos *ab initio* (Hartree Fock), Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT, *Density Functional Theory* por sus siglas en inglés) y los métodos semiempíricos. Aunque se utilicen aproximaciones, el costo computacional de los métodos QM es mayor que el de los métodos MM, sabemos que las proteínas están constituidas por un gran número de átomos, por lo que modelarla por métodos QM es computacionalmente demandante y no sería asequible hasta el momento aún con los avances computacionales de la actualidad. Por otro lado, los métodos MM son rápidos y pueden describir moléculas de miles de átomos, pero no pueden explicar rompimiento y formación de enlaces, por lo que una buena aproximación es conjuntar ambos métodos para el estudio de enzimas.

1.2.3 Métodos híbridos (QM/MM)

Los métodos híbridos (QM/MM) conjuntan dos métodos teóricos distintos para poder resolver el problema de realizar simulaciones de moléculas grandes (miles de átomos), fueron descritos por primera vez en 1976 por Warshel y Levitt, donde se propuso el uso de estas metodologías para el estudio de la lisozima (Warshel & Levitt 1976). Estos métodos describen las propiedades electrónicas de las macromoléculas dividiendo a éstas en dos zonas: la región de mayor interés en el sistema, donde se da el rompimiento, formación de enlaces o transferencia de electrones, se modela con ayuda de métodos QM y el resto de la proteína y las moléculas de solvente se trata con métodos MM (Figura 1.3). Los términos energéticos de ambas zonas no pueden sumarse directamente, ya que como se explicó anteriormente ambos se basan en teorías distintas. En general, existen dos métodos para tratar la interacción en la frontera QM/MM: de adición y de sustracción que incluyen interacciones

de enlace y de no enlace (Van der Waals y electrostáticas). Las metodologías QM/MM han sido utilizadas desde el estudio de reacciones enzimáticas y el diseño de fármacos hasta el diseño *de novo* de enzimas (Baker 2010; Pantazes et al. 2011; Kries et al. 2013; Damborsky & Brezovsky 2014; Sliwoski et al. 2014; García-Guevara et al. 2015).

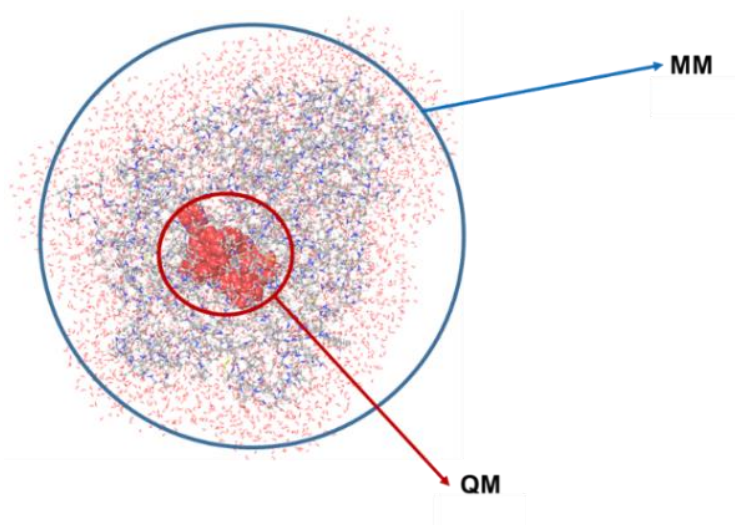


Figura 1.3 Modelo QM/MM para una proteína multicobre. Los átomos en rojo (modelo CPK) representan la región QM (sitio activo de la enzima).

2 Antecedentes

2.1 Factores moleculares y electrónicos involucrados en la actividad y la estabilidad de la lacasa

Existen factores estructurales que son importantes para modular el potencial redox de la lacasa, que en conjunto con los procesos de transferencia electrónica influyen en la eficiencia catalítica de esta enzima. Distintas lacasas, aun teniendo estructuras similares en su sitio activo, muestran divergencias significativas en el potencial redox del sitio T1, que puede variar entre 430-780 mV (Shleev et al. 2004; Cambria et al. 2012). Hablar de un solo factor que determine el potencial redox de estas enzimas es difícil, de hecho el ambiente químico en el que se encuentran los átomos metálicos varía por múltiples factores y por ende, las causas que pueden modular el potencial redox pueden provenir de distintas fuentes. Aunque algunos de los factores moleculares que intervienen en la modulación del potencial redox en las lacasas son conocidos, poco se sabe acerca de su estabilidad respecto a la interacción con radicales libres provenientes de la catálisis. En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado la inactivación de la lacasa de *C. gallica* en sistemas donde existen radicales libres generados continuamente por el proceso catalítico de la enzima, y se propone que estos radicales podrían jugar un papel importante en su inactivación (Ramírez 2014).

Desde los años 90's, del siglo pasado, se han reportado observaciones de la disminución de la actividad de lacasas debido a los productos de oxidación de fenoles (Leatham et al. 1980; Shuttleworth & Bollag 1986). Gianfreda y colaboradores describieron la inactivación de la lacasa de *Cerrena unicolor* durante la oxidación de 2,4-diclorofenol. Propusieron que la inactivación podría ser provocada por atrapamiento de la enzima en el polímero formado o por la interacción con los productos de reacción (Gianfreda et al. 1998). Por otro lado, Li y colaboradores han reportado la inactivación de lacasas durante la oxidación de 1-hidroxibenzotriazol (HBT) y ácido violúrico (VA), este último mostró mayor inactivación bajo las mismas condiciones de reacción (Li et al. 1999). Asimismo, se ha reportado la inactivación irreversible de la lacasa de *Myceliophthora thermophila* durante la oxidación de metil siringato, encontrando que la adición de albúminas (HSA y BSA) al medio de reacción retarda la inactivación de la lacasa. En este trabajo los autores proponen un atrapamiento de los radicales libres por parte de la albúmina, lo que previene la inactivación de la lacasa (Kulys et al. 2002). La estabilidad de la lacasa de *Trametes versicolor* durante la oxidación

de fenol también ha sido investigada, observando inactivación de la enzima en presencia de mediadores tales como: ABTS, VA y HBT. Los autores sugieren que los radicales libres producidos durante la oxidación de los mediadores juegan un papel importante en la inactivación de la lacasa de *T. versicolor* (Kurniawati & Nicell 2007); este mismo grupo de investigación desarrolló un modelo que describe la inactivación de la lacasa durante la oxidación de fenol. Dicho modelo fue validado a partir de resultados experimentales y logró describir la inactivación tomando en cuenta dos mecanismos de inactivación: atrapamiento o adsorción de la enzima en el polímero producto de la catálisis y el ataque por los radicales libres generados (Kurniawati & Nicell 2009). En este caso se encontró que la inactivación por la presencia de radicales libres es el factor principal de la pérdida de actividad.

Aunque la inactivación de las lacasas durante la oxidación de compuestos fenólicos ha sido reportada y atribuida principalmente al ataque de radicales libres, este mecanismo no ha sido elucidado hasta el momento. No obstante, existen reportes de inactivación de algunas peroxidasas durante la oxidación de compuestos fenólicos. Aitken y Heck estudiaron la inactivación de la peroxidasa de *Coprinus cinereus* (CiP). Estos autores proponen que esta inactivación se da posiblemente por reacciones irreversibles entre la enzima y los radicales fenoxilo formados por la oxidación monoelectrónica de los fenoles durante la catálisis (Aitken & Heck 1998). Asimismo, se ha establecido que la peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase, HRP por sus siglas en inglés) en presencia de fenol se inactiva de forma irreversible en un proceso que es dependiente de la concentración de fenol (Baynton et al. 1994). Por otro lado, Buchanan y Nicell modelaron la inactivación enzimática de la HRP tanto por la presencia de radicales libres como por el producto de polimerización de estos radicales (Buchanan & Nicell 1997). En este modelo propuesto, la pérdida de actividad de la enzima está relacionada con la presencia de radicales libres, así como por el polímero formado. Recientemente, Kim y colaboradores estudiaron la inactivación de la HRP durante la oxidación de fenol, encontraron que los radicales fenoxilo producidos durante la reacción son capaces de formar aductos con el anillo aromático de las fenilalaninas, los cuales fueron identificados por medio de espectroscopia de masas. Posteriormente, realizaron mutaciones sitio dirigidas en estas fenilalaninas, reemplazándolas por un residuo menos oxidable (alanina). De esta manera lograron obtener una variante, con cuatro mutaciones Phe→Ala,

que mostró retener el 41 % de la actividad inicial durante la oxidación de fenol, comparado con la enzima nativa, la cual pierde casi el 100 % de la actividad inicial bajo las mismas condiciones (Kim et al. 2015).

Por lo tanto, dado la semejanza de los procesos que catalizan, en las lacasas podrían estar ocurriendo eventos similares durante la oxidación de fenoles. Así pues, resulta interesante y novedoso estudiar este fenómeno, respecto a las propiedades estructurales de la enzima, para comprenderlo mejor y poder manipularlo en un futuro. Estos estudios podrían realizarse combinando metodologías computacionales que nos ayuden a establecer qué residuos son más susceptibles a ser oxidados y así lograr contribuir al diseño racional de enzimas más estables usando metodologías de química teórica junto con comprobaciones experimentales, a partir de la construcción y evaluación de variantes con mutaciones sitio-dirigidas.

2.2 Simulaciones computacionales en el estudio de oxidasas multicobre

Los métodos computacionales se han convertido en una gran herramienta permitiendo analizar aspectos atómicos de las proteínas a un nivel energético y estructural (Sousa et al. 2012). Desde el punto de vista de la química computacional, existen varias razones por las cuales el estudio de las lacasas es interesante. Primeramente, podemos citar la inestabilidad de los intermediarios catalíticos formados a causa de los diferentes estados de óxido-reducción de los cuatro átomos de cobre presentes. El segundo es la estructura electrónica del sitio trinuclear y la tercera razón es el poder conjuntar cálculos teóricos con datos experimentales para establecer posibles interpretaciones a los factores moleculares que influyan en la actividad y la estabilidad de las lacasas, y así poder proponer el diseño de variantes con mutaciones puntuales que presenten mejores propiedades catalíticas. A continuación, se presentan algunas de las investigaciones, basadas en métodos computacionales, realizadas para conocer ciertas propiedades moleculares de las lacasas.

Hong y colaboradores estudiaron los potenciales redox, así como las energías de reorganización del sitio T1 de cuatro diferentes lacasas utilizando sólo herramientas teóricas tales como dinámica molecular y métodos QM/MM. Los resultados de este trabajo presentan un marco de referencia para entender algunos de los parámetros que pueden influir en el

potencial redox del Cu en el sitio T1, que podría ser extrapolado para otras lacasas. Estudiaron la influencia del ligando axial así como de la longitud del enlace entre el átomo de metal y el átomo de N en una His coordinante sobre el potencial redox, encontrando concordancia con lo que se ha observado experimentalmente (Hong et al. 2011). Por otro lado, Hu y colaboradores calcularon la energía de reorganización cuando se transfiere un electrón del Cu del sitio T1 hacia el intermediario peróxido del sitio T2/3 de la oxidasa multicobre CueO. Cabe resaltar que para realizar las dinámicas moleculares fue necesario parametrizar el campo de fuerza debido a la falta de uno para este tipo de proteínas, lo cual es una contribución muy importante ya que dicho campo de fuerza podría ser extrapolado a otras lacasas. En cuanto a los resultados encontrados, se obtuvieron energías de reorganización que variaron entre 91-133 kJ/mol dependiendo del tratamiento teórico, de las cuales el sitio activo solamente contribuyó con 12-22 kJ/mol; asimismo, se encontró que la reducción del intermediario peróxido es un proceso exergónico (Hu et al. 2011). Las propiedades del potencial redox en el sitio T1 de una lacasa han sido estudiadas a partir de modelos reducidos de este sitio. Primeramente Vázquez-Lima & Guadarrama estudiaron por DFT seis complejos inorgánicos que simulaban el sitio T1 y reprodujeron los potenciales de óxido-reducción para estos complejos con un error de 0.095 V respecto a los datos experimentales (Vázquez-Lima & Guadarrama 2012). Posteriormente estos mismos autores realizaron un estudio para evaluar el efecto de las distorsiones geométricas del sitio T1 en el potencial redox, donde proponen que un cambio en el ángulo diedro $C_{\text{metil tiolato}}-S-Cu-N_{\text{His}}$ puede aumentar en gran medida el potencial redox de la lacasa de *Trametes versicolor* (Vázquez-Lima et al. 2012). Por otro lado, se llevaron a cabo cálculos de dinámica molecular para estudiar las propiedades dinámicas de una oxidasa multicobre hipertermofílica, en donde se encontró que la coordinación entre el cobre y la proteína juega un papel muy importante en la movilidad de la enzima (Bello et al. 2012).

Con los estudios hasta aquí reportados es posible observar que existen varios procesos de reactividad de las lacasas que son necesarios entender y que las técnicas computacionales nos pueden ayudar en ello. Conocer la relación estructura- función de estas proteínas es una clave importante que puede ayudarnos a comprender mejor cómo se regula la actividad y su

relación con la estabilidad de estas enzimas y, de esta manera, proponer técnicas para el diseño o modificación racional de lacasas.

2.3 La química computacional en el estudio de la catálisis y en el diseño racional de enzimas

Existen ejemplos en la literatura donde se han realizado estudios computacionales de los factores estructurales y de transferencia electrónica que pudieran ayudar a generar mutantes de una enzima. Funke y colaboradores realizaron el estudio de una lipasa de *Bacillus subtilis* en donde se encontró por métodos computacionales y de biología molecular un residuo importante, His76 (PDB ID: 1R4Z), que afecta la enantioselectividad de la enzima y se propone que los métodos QM/MM pueden ser aplicados para determinar aminoácidos importantes para la enantioselectividad (Funke et al. 2005). Hong y colaboradores estudiaron por medio de metodologías QM/MM el potencial redox de la lacasa de *Streptomyces coelicolor*, y propusieron residuos que pueden ser mutados para aumentar el potencial redox de esta lacasa (Hong et al. 2011); sin embargo, aunque las mutaciones no se realizaron experimentalmente sería interesante comprobar estas predicciones. En otro trabajo, se realizaron estudios de transferencia electrónica en un citocromo P450 mediante métodos QM/MM donde lograron identificar residuos oxidables de la enzima durante su inactivación por peróxido de hidrógeno. Posteriormente, al reemplazar estos residuos por otros menos oxidables a través de mutaciones sitio-dirigidas se generaron mutantes más estables que la enzima nativa, en presencia de peróxido de hidrógeno (Vidal-Limón et al. 2013). Combinando herramientas computacionales con mutagénesis sitio-dirigida Acebes y colaboradores lograron establecer por medio de cálculos QM/MM el flujo de electrones en dos peroxidasas: lignina peroxidasa (LiP) de *Phanerochaete chrysosporium* y versátil peroxidasa (VP) de *Pleurotus eryngii*. Posteriormente estos investigadores realizaron mutagénesis sitio-dirigida de los aminoácidos que encontraron conducen a los electrones, que para estas enzimas corresponden a residuos de Trp y Phe, y de esta manera discernir el camino que siguen los electrones durante el proceso catalítico (Acebes et al. 2017). En este trabajo los autores argumentan que el uso de las herramientas computacionales facilitó los experimentos de mutagénesis, debido a que disminuyeron el número de posibles residuos involucrados en el flujo de electrones, y de esta manera, se redujo el número de experimentos a realizar.

Así como las herramientas teóricas ayudan en el diseño de enzimas con nuevas o mejores propiedades catalíticas, éstas también contribuyen en el estudio molecular de resultados experimentales. Tal es el caso de una lacasa quimérica en la que se mejoró la oxidación del ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico (ácido sinápico), a través de mutagénesis a saturación de seis residuos que forman parte de la cavidad del sitio activo, estos residuos fueron elegidos a partir de un alineamiento múltiple de secuencias y correspondieron a los que mostraron mayor variabilidad (Pardo et al. 2016). Una vez que se encontró la variante con mayor actividad catalítica con el ácido sinápico, se llevaron a cabo cálculos QM/MM para racionalizar el porqué de estas mutaciones. Encontraron que las mutaciones generadas en la quimera ayudaron a una interacción más específica del sustrato en el sitio activo, provocando una transferencia electrónica más eficiente hacia cobre del sitio T1 de esta lacasa. Este trabajo presenta una contribución en la ingeniería de proteínas y en el diseño *in silico* de enzimas específicas para algún sustrato de interés.

Por otro lado, Monza y colaboradores realizaron, a partir de métodos computacionales, un estudio a nivel molecular de cómo las mutaciones acumuladas durante experimentos de evolución dirigida de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* mejoran la actividad catalítica de la enzima. A partir de metodologías que combinan el muestreo conformacional de proteínas (métodos de Monte Carlo) y de cálculo de estructura electrónica (métodos híbridos QM/MM) se logró elucidar que el incremento en la actividad catalítica, debido a las mutaciones acumuladas durante la evolución dirigida de la enzima, está relacionado con una mejor interacción del sustrato con el sitio activo, más que debido a un aumento en el potencial redox de la lacasa. Los resultados de esta investigación aportan una metodología para el diseño *in silico* de enzimas, que contribuye a mejorar la oxidación de algún sustrato de interés en oxidoreductasas (Monza et al. 2015).

Cabe resaltar que para generar mutantes la expresión heteróloga de la proteína es un paso fundamental en este proyecto, ya que la lacasa de *C. gallica* no ha sido expresada en un sistema heterólogo hasta el momento. Desde inicios de los años 90's del siglo pasado, la expresión de lacasas recombinantes ha sido un campo de investigación en diferentes

sistemas: bacterias, levaduras, hongos filamentosos y plantas, siendo las levaduras y los hongos los sistemas más usados (Piscitelli et al. 2010; Mate & Alcalde 2015). Específicamente, las levaduras se han convertido en las cepas de elección para la expresión de lacasas fúngicas, en específico las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Debido a que, en muchas ocasiones los niveles de expresión heteróloga de lacasas en levaduras son muy bajos, se han realizado esfuerzos por mejorar esta expresión. Algunos investigadores han reportado el uso de técnicas de evolución dirigida para mejorar la secreción de la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* expresada en *S. cerevisiae*, utilizando como péptido señal el factor- α de *S. cerevisiae*. Mutaciones acumuladas tras varias rondas de evolución en el péptido señal mejoraron 40 veces la secreción de la proteína al medio extracelular, sin afectar la actividad catalítica de la enzima recombinante (Camarero et al. 2012). Este péptido señal modificado podría ser usado para mejorar la expresión de otras lacasas como la de *C. gallica*.

En resumen, la combinación de herramientas computacionales con técnicas de ingeniería genética constituyen una alternativa para predecir y comprobar el efecto de una o más mutaciones que permitan modular las propiedades catalíticas de las enzimas. A través de este tipo de estudios, pretendemos mejorar la comprensión de los factores moleculares que influyen en la estabilidad y la actividad de las lacasas, para de esta forma, proponer una metodología eficaz para el diseño *in silico* de estas enzimas con mejores propiedades y así aumentar su rango de aplicabilidad en distintos sectores: tanto a los correspondientes a ciencia básica, como a las posibles aplicaciones a nivel industrial.

3 Hipótesis

La mutación de residuos con alta densidad de espín, calculada por métodos computacionales (QM/MM), permitirá obtener una lacasa más estable ante el ataque por radicales libres.

4 Objetivos

General

Estudiar los procesos de transferencia electrónica, en el sitio T1, que modulen la actividad y la estabilidad en una oxidasa multicobre (lacasa de *Corioloropsis gallica*).

Específicos

1. Establecer una metodología para llevar a cabo estudios de química computacional que ayuden a describir los procesos de transferencia electrónica, en el sitio T1, así como el papel de las interacciones intramoleculares en la lacasa de *C. gallica*.
2. Estudiar la distribución electrónica (densidad de espín) en el sitio T1 de la lacasa de *C. gallica* para encontrar residuos susceptibles a oxidación por los radicales libres generados durante el proceso catalítico.
3. Proponer y diseñar mutaciones sitio-dirigidas de los residuos oxidables, predichos por los cálculos computacionales, por residuos menos oxidables para mejorar la estabilidad operacional de la lacasa de *C. gallica*.
4. Diseñar y montar un sistema de expresión heteróloga en *P. pastoris* para la lacasa de *C. gallica* así como de las variantes propuestas para evaluar las propiedades catalíticas y la estabilidad operacional.
5. Conjuntando las herramientas teóricas (dinámica molecular y QM/MM) con técnicas experimentales, establecer los factores moleculares más relevantes que modulan la actividad y la estabilidad de la lacasa de *C. gallica*.

5 Metodología

Metodología computacional

5.1 Simulaciones de dinámica molecular

Los cálculos de dinámica molecular están basados en la estructura cristalográfica de la lacasa del basidiomiceto *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 (PDB ID: 4A2E). El archivo con las coordenadas se preparó con el programa *Protein Preparation Wizard* (Schrödinger Suite) dentro del software MAESTRO 9.3 con el cual se adicionaron átomos de hidrógeno, puentes disulfuro y órdenes de enlace correspondientes. Se seleccionaron las conformaciones que presentan las interacciones más favorables dentro de la proteína de aquellos residuos que pueden generar enlaces de hidrógeno de acuerdo con el ambiente químico en el que se encuentran. Asimismo, en conjunto con el servidor PROPKA (Li et al. 2005; Olsson et al. 2011), se establecieron los estados de protonación al pH de trabajo (4.5). Los residuos de histidina y cisteína que coordinan a los átomos de cobre se establecieron como desprotonados. Se trabajó con el estado oxidado de la molécula (Cu^{2+}) en el que los cobres de los sitios T2 y T3 se encuentran coordinados por un ion hidroxilo, de acuerdo con estudios ya realizados, Figura 5.1 (Rulíšek et al. 2005; Heppner et al. 2013).

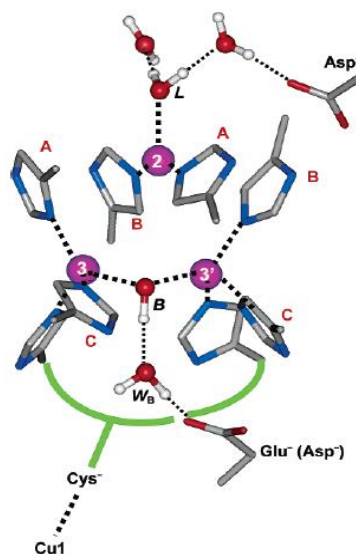


Figura 5.1. Coordinación en el estado oxidado. L y B corresponden a OH^- . Figura tomada de Rulíšek et al. 2005.

La carga neta de la molécula resultó en -10 para este estado de oxidación. Una vez preparadas las coordenadas de la molécula, se construyó el sistema que incluye a la proteína y agua como solvente explícito (modelo SPC), así como 10 iones de Na⁺ como contraiones (carga neta igual a cero). El sistema se conformó por 72027 átomos, de los cuales 64675 son átomos en moléculas de agua. Las condiciones periódicas de frontera se simularon con una caja de geometría cúbica a una distancia de 15 Å entre la proteína y el límite de la caja de simulación. Esto se realizó con el programa *System Builder*, dentro de la aplicación de Desmond (*Desmond Molecular Dynamics System*), en el software MAESTRO 9.3.

Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo en la aplicación Desmond con el campo de fuerza OPLS_2005 (Banks et al. 2005). Ya que hasta ese momento no contamos con un campo de fuerza que permitiera modelar el sitio de coordinación de cobre para nuestra enzima, se utilizaron los parámetros de enlace del campo de fuerza para una oxidasa multicobre de bacteria reportados por Hu et al. 2011. Las constantes utilizadas para este trabajo son las que se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Constantes de fuerza (k) utilizadas para los cálculos de dinámica molecular (Hu et al. 2011).

Tipo de enlace	Constante de fuerza de enlace (k) - kcal/molÅ²
CuT1-S(Cys471)	112.577
CuT1-N(Hs415)	99.88
CuT1-N(His475)	60.818
CuT2-N(His85)	233.547
CuT2-N(His418)	213.863
CuT3-N(His420)	63.724
CuT3-N(His470)	20.503
CuT3-N(His132)	7.288
CuT3'-N(His87)	44.063
CuT3'-N(His130)	191.158
CuT3'-N(His472)	55.272
CuT2-O	55.081
CuT3-O	132.786
CuT3'-O	155.250

Una vez que se introdujeron los parámetros del campo de fuerza reportados en la Tabla 5.1, la molécula se sometió a un proceso de minimización energética para relajarla a un mínimo local con el método *Steepest Descent*, se utilizó un número máximo de iteraciones de 2000 y 1 kcal/mol/\AA^2 como criterio de convergencia. Posteriormente, con la geometría optimizada se realizaron cálculos de dinámica molecular, usando el programa *Simulated annealing* de Desmond. Este tipo de cálculos hace uso de un programa de temperatura para mejorar el proceso de búsqueda conformacional. La estrategia utilizada es la de elevar la temperatura hasta 400 K para posteriormente relajar el sistema a la temperatura de simulación (300 K) a través de seis pasos (Tabla 5.2). Se utilizaron condiciones periódicas de frontera y un ensamble NPT. La temperatura se mantuvo a 300 K y la presión a 1 bar, ambas propiedades se controlaron por el algoritmo de Berendsen (Berendsen et al. 1984) con un tiempo de relajación de 1 ps para la temperatura y 2 ps para la presión. En el ensamble NPT primeramente se realiza una relajación del sistema manteniendo la proteína restringida, como segundo paso se hace una minimización sin restricciones. Posteriormente se simula un ensamble NVT con termostato de Berendsen a 10 K y con restricción en los átomos pesados para después realizar la simulación con un ensamble NPT a 10 K, con baróstato y termostato de Berendsen y restricción en los átomos pesados. Por último, se hace el cálculo con el ensamble NPT con las especificaciones finales del sistema. Las interacciones electrostáticas de corto alcance se modelaron con un radio de corte de 12 \AA , mientras que las de largo alcance se trataron con el modelo *Particle Mesh Ewald* (PME). Para resolver la ecuación de movimiento se utilizó el método de integración RESPA con un paso de 2 fs y un tiempo de simulación de 100 ns. En la Tabla 5.2 se resumen las principales propiedades utilizadas en estos cálculos.

Los resultados se analizaron con el software MAESTRO 9.3, específicamente con la aplicación *Simulation Event Analysis* dentro del paquete DESMOND. Asimismo, se utilizó el programa VMD 1.9.1 (Humphrey et al. 1996) para el análisis de RMSD. Se realizó una distribución conformacional de acuerdo con los movimientos de los residuos en la cavidad del CuT1 durante los 100 ns de simulación.

Tabla 5.2 Parámetros empleados para la dinámica molecular.

System builder	
Condición frontera	Geometría – cúbica, 15 Å
Modelo solvente explícito	Agua-SPC
Contraiones	10 iones Na+
Simulated annealing	
Ensamble	NPT/Berendsen
Campo de fuerza	OPLS_2005
Programa de temperatura	1.10 K(30ps) 2.100 K(100ps) 3.300 K(200ps) 4.400 K (300ps) 5.400 K (500ps) 6.300 K (1000ps)
Presión	1 bar
Tiempo de simulación	100 ns

5.2. Cálculos de estructura electrónica (QM/MM)

Los cálculos QM/MM de las conformaciones provenientes de la dinámica molecular se llevaron a cabo con metodologías híbridas implementadas en Qsite (Qsite, versión 5.8) dentro del programa Schrödinger Suite. El sistema completo consistió en la proteína y una capa esférica de moléculas de agua de 8 Å alrededor de la misma. La zona QM se encuentra formada por el átomo cobre del sitio T1, la primera esfera de coordinación (His415, His476 y Cys471) así como residuos de la segunda esfera de coordinación y de la cavidad del sitio T1, residuos: 348-359; 411-417 y 471-483, sumando un total de 472 átomos. Para realizar un estudio de la influencia del tamaño de la zona cuántica se varió el número de átomos de la zona QM desde 45 hasta 515. La zona mínima utilizada en los cálculos se eligió con base en aquella que modeló la distribución de espín experimental para el sitio T1 de otras proteínas de cobre (Remenyi et al. 2007); además, se buscó que la distribución electrónica no se alojara en los residuos de la frontera QM/MM, que se sabe pueden no ser modelados adecuadamente ya que la polarización de los átomos en esta zona se calcula a partir de una interacción electrostática “artificial” entre los átomos de la frontera MM con los de la zona QM. Esto debido a la introducción de un átomo en la zona QM para satisfacer la valencia faltante (*hydrogen cap*) y a un modelo en la distribución de cargas en la frontera MM, lo que puede conducir a una distorsión en la distribución de cargas en esta región (Reuter et al. 2000; Senn & Thiel 2009).

Todos los cálculos se realizaron con la aproximación de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) (Hohenberg & Kohn 1964; Kohn & Sham 1965; Kohn et al. 1996), con el funcional híbrido B3LYP (Becke 1988; Lee et al. 1988; Miehlich et al. 1989) y el conjunto de función base lacvp*. La función base lacvp* es una combinación de la base 6-31G con el conjunto base LANL2DZ, en la que este último conjunto base describe de forma efectiva el potencial del núcleo de los átomos pesados (mayor peso molecular que el Ne) al tomar en cuenta los efectos relativistas. La zona MM correspondió al resto de la proteína y el solvente. Estos cálculos se realizaron con el campo de fuerza OPLS_2005. Para tratar los enlaces covalentes en la frontera QM/MM se utilizó el método de unión por hidrógeno (*hydrogen cap*) en el que un átomo de hidrógeno sustituye en la frontera QM al átomo que queda en la región MM debido al rompimiento del enlace covalente (Senn & Thiel 2009). Se llevaron a cabo cálculos de punto simple de energía para tres estados electrónicos de la molécula: estado basal (doblete, $S=1/2$, $\text{Cu}=2^+$); sistema menos un electrón (triplete, $S=1$, $\text{Cu}=2^+$) y sistema más un electrón (triplete, $S=1$, $\text{Cu}=2^+$). En la Tabla 5.3 se resumen los parámetros utilizados para estos cálculos. La distribución de espín se calculó a partir del análisis poblacional de Mulliken (Mulliken 1955) en Qsite. Todos los cálculos, dinámica molecular y QM/MM, se realizaron en la supercomputadora Miztli de la Universidad Nacional Autónoma de México (<http://www.super.unam.mx/>).

Tabla 5.3 Parámetros empleados en los cálculos QM/MM

Método	
Mecánica cuántica	Teoría de funcionales de la densidad Nivel de teoría: B3LYP/lacvp*
Mecánica molecular	Campo de fuerza: OPLS_2005 Sin restricciones
Solvatación	Capa de agua esférica de 8 Å

Metodología experimental

5.3 Microorganismos y reactivos

Todos los reactivos utilizados en los medios de cultivo fueron adquiridos en Difco (extracto de levadura, peptona, base nitrogenada de levadura y agar). Metanol y acetonitrilo grado HPLC, glicerol, glucosa y todas las sales fueron de J.T. Baker. Otros reactivos como: biotina, sorbitol, ABTS, Zeocina, 4-metoxifenol, ácido succínico y siringaldazina se adquirieron en Sigma. La cepa de *P. pastoris* X33 (Mut⁺) es de Invitrogen; mientras que la cepa de *E. coli* MC1061 fue donada por la IQ Leticia Olvera (IBt-UNAM).

5.4 Medios de cultivo de *P. pastoris*

A continuación, se describen los medios utilizados. Medio con extracto de levadura, peptona y glucosa (YPD, por sus siglas en inglés) contiene por cada litro: 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de glucosa. Para el medio YPD con sorbitol se le agregó sorbitol hasta alcanzar una concentración 1M. En caso de ser necesario medio sólido, se le agregaron 20 g de agar a las mezclas antes descritas. Medio mínimo con metanol (MM) contiene por cada litro: 13.4 g de extracto de levadura con sulfato de amonio y sin aminoácidos, 400 µg de biotina, 5 mL de metanol, 0.2 mM de ABTS y 0.1 mM de CuSO₄. Medio complejo con metanol (BMGY, por sus siglas en inglés), contiene por litro: 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 13.4 g de base nitrogenada de levadura con sulfato de amonio sin aminoácidos, 400 µg de biotina y 10 g de glicerol, en 100 mM de amortiguador de fosfato de potasio pH 6. Medio mínimo con metanol (BMM, por sus siglas en inglés); contiene por litro: 13.4 g de base nitrogenada de levadura con sulfato de amonio y sin aminoácidos, 400 µg de biotina y 10 mL de metanol, en 100 mM de amortiguador de fosfato de potasio pH 6.

5.5 Construcción del vector de expresión y transformación en *P. pastoris*

La secuencia de la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 (LcCg, GenBank KX932046) se modificó de acuerdo con el uso preferencial de codones de *P. pastoris* por la compañía GenScript en el vector pPICZB. Este vector se encuentra bajo el control del promotor AOX1 de la enzima alcohol oxidasa que se induce en presencia de metanol. El péptido señal utilizado, y también optimizado con el uso de codones de *P. pastoris*, es el factor α de *S. cerevisiae* modificado por evolución dirigida (Camarero et al. 2012). La construcción

insertada en el vector pPICZB se flanqueó por el sitio de restricción EcoRI (α -fLcCg-pPICZB). El vector α -fLcCg-pPICZB se introdujo por electroporación en la cepa X33 de *P. pastoris*. Debido a que en este sistema el vector se recombina en el genoma de la levadura fue necesario linearizarlo con la enzima de restricción SacI. Las transformantes se seleccionaron por resistencia a zeocina en cajas de agar con YPDS; una vez crecidas las colonias, se transfirieron a cajas de agar con medio MM suplementado con 0.2 mM de ABTS y 0.1 mM de CuSO₄. Las transformantes que expresan la lacasa se seleccionan por la aparición de color verde (oxidación de ABTS) alrededor de las colonias.

5.6 Expresión de la lacasa de *C. gallica* en *P. pastoris*

Se eligió una colonia que expresó a la lacasa y se realizaron ensayos de producción en matraces bafleados de 500 mL, variando la concentración de metanol y cobre en el medio con el objetivo de encontrar las mejores condiciones de expresión. Una colonia se cultivó en 25 mL de medio BMGY a 30 °C y 250 rpm hasta que se alcanzó una absorbancia (600 nm) entre 4-6, se centrifugó y la pastilla se resuspendió en 50 mL de medio BMM hasta alcanzar una absorbancia inicial de 1. Se adicionó metanol cada 24 horas a una concentración final del 1 %, el crecimiento (absorbancia a 600 nm) y la actividad de lacasa se midió diariamente. Una vez elegida la mejor condición, se realizaron ensayos a una escala mayor utilizando matraces Fernbach bafleados con 500 mL de medio de cultivo. Una colonia de la transformante se cultivó en 300 mL de medio BMGY a 30 °C y 200 rpm hasta que se alcanzó una absorbancia (600 nm) entre 8-10. Las células se recuperaron por centrifugación a 8,000 rpm y 4 °C durante 15 minutos y la pastilla se resuspendió a una absorbancia final (600 nm) entre 4-5, en 500 mL de medio BMM suplementado con 0.5 mM de CuSO₄ y 0.8 % de alanina (O'Callaghan et al. 2002). El cultivo se incubó a una temperatura de 28 °C y agitación de 250 rpm, añadiendo metanol cada 24 horas a una concentración final de 1 %, asimismo la actividad lacasa y la absorbancia (600 nm) se midió diariamente. La producción de lacasa en matraz, bajo estas condiciones, se realizó por triplicado.

5.7 Purificación de LcCg recombinante

Después de la producción de la enzima en matraces Fernbach, el cultivo se centrifugó en dos pasos: primeramente, a 8,000 rpm y 4 °C durante 15 minutos, posteriormente el sobrenadante

se centrifugó a 14,000 rpm y 4 °C durante 15 minutos. Después de la centrifugación el sobrenadante se concentró por ultrafiltración (30 kDa de corte) para realizar posteriormente una cromatografía de intercambio aniónico. El sobrenadante concentrado se aplicó en una columna empacada con DEAE-celulosa (150 mL) y se eluyó con amortiguador fosfatos 10 mM, pH 6. En este caso no fue necesario realizar un gradiente con NaCl ya que la lacasa, en las condiciones en las que se encuentra en el cultivo (amortiguador fosfatos 100mM), no interacciona con la resina, como se discutirá más adelante en la sección de resultados. Las fracciones con actividad lacasa se juntaron y se concentraron por ultrafiltración (10 kDa de corte). Este concentrado se cargó en una columna de exclusión molecular Sephadex G75 (120 mL) equilibrada con amortiguador fosfatos 60 mM pH 6. Las fracciones que mostraron actividad específica similar se juntaron y se concentraron por ultrafiltración (10 kDa de corte). Las muestras de cada paso se analizaron por SDS-PAGE.

5.8 Ensayo de actividad lacasa y medición de concentración de proteína

La actividad enzimática se midió a partir de la oxidación de siringaldazina. La mezcla de reacción consiste de 50 μM de siringaldazina, 10 % v/v de etanol y amortiguador de succinatos 60 mM pH 4.5. La reacción, a temperatura ambiente, inicia con la adición de la enzima a la mezcla de reacción. Las velocidades iniciales se midieron por el cambio en la absorbancia a 530 nm a través del tiempo debido a la absorción del producto ($\epsilon=64,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce 1 μM de producto por minuto. Los parámetros cinéticos de la enzima recombinante se determinaron variando la concentración de siringaldazina de 1-30 μM . Para analizar los resultados y ajustar los datos a una regresión no lineal se usó el programa GraphPad Prism 5. Se calcularon las constantes catalíticas (k_{cat} and K_{M}) ajustando los datos al modelo de Michaelis Menten. La concentración de proteína se estimó con el ensayo de Bradford con una curva de calibración de BSA (2-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Todas las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro marca Agilent 8453 UV-Vis por triplicado.

5.9 Mutagénesis sitio-dirigida de LcCg recombinante

Las construcciones que dieron lugar a las variantes de la lacasa de *C. gallica* fueron sintetizadas por la compañía Mutagenex usando el vector pPICZB para su expresión en *P.*

pastoris. Las mutantes se diseñaron de acuerdo con los residuos que alojaron densidad de espín en los cálculos QM/MM. El cambio de residuo se eligió a partir de un alineamiento múltiple de secuencias de lacasas de hongos y proteínas de cobre de plantas. Para esto se realizó un *blast* de proteína usando el servidor NCBI; las secuencias arrojadas por este servidor se alinearon usando Clustal Omega (Copyright © EMBL-EBI 2017 (Goujon et al. 2010; Sievers et al. 2011)). La transformación, expresión, producción y purificación de las variantes se hizo de la misma manera que para la enzima nativa.

5.10 Estabilidad operacional de las variantes de la lacasa durante la oxidación de 4-metoxifenol

La estabilidad operacional de las variantes y la enzima nativa purificadas durante la oxidación de 4-metoxifenol se estimó con la medición de la actividad residual de lacasa en el medio de reacción y con el consumo de metoxifenol. La reacción se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 2 mL que contiene: 1 mM de 4-metoxifenol y 60 mM de amortiguador succinatos 60 mM, pH 4.5 en un baño a 30 °C y con agitación a 250 rpm. La reacción comenzó al añadir una cantidad de enzima equivalente a 0.15 U/mL (unidades de siringaldazina). Debido a que se sabe que otras proteínas presentes en el medio pueden proteger a la lacasa de la inactivación, se unificó la cantidad de proteína para todas las variantes añadiendo enzima inactivada a una concentración total de 67.2 nM. Muestras de 40 µL fueron tomadas cada 5 minutos e inmediatamente se les midió actividad residual con siringaldazina, de la misma forma antes descrita. Simultáneamente se tomaron 100 µL de mezcla, la reacción se detuvo añadiendo 1.7 µL de HCl 10.8 M y se mantuvo en hielo hasta su análisis por HPLC, para determinar el consumo de sustrato. Antes de su inyección en el equipo de HPLC, las muestras se centrifugaron por 2 minutos a 13,400 rpm. En análisis se realizó en un equipo Agilent 1220 Infinity a 30 °C usando una columna de fase reversa C-18 Nucleosil ® (tamaño de partícula 5 µm; LxID 25cmx32mm) y un detector de arreglo de diodos. Las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 288 nm. La fase móvil consistió de agua:acetonitrilo con un gradiente de 30 % - 100 % de acetonitrilo con un flujo de 0.4 mL/min. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

6 Resultados y Discusión

6.1 Estudio de la rigidez del sitio activo de la lacasa de *C. gallica*

Ya que como sabemos las enzimas son moléculas en constante movimiento, un paso importante al realizar estudios de transferencia electrónica en proteínas es la elección de conformaciones representativas que proporcionen información acerca de la estructura-función de las mismas (Guallar & Wallrapp 2010; Wallrapp & Guallar 2011), además de que esta conformación estructural puede afectar la distribución electrónica, como se ha demostrado ya en estudios con otras proteínas tales como: peroxidasas (LiP y VP), lacasas fúngicas y citocromo P450 (Vidal-Limón et al. 2013; Monza et al. 2015; Pardo et al. 2016; Acebes et al. 2017). Ya que el objetivo de este trabajo consiste en analizar la distribución de la densidad de espín en la lacasa de *C. gallica*, se realizó como primer paso una exploración conformacional a partir de simulaciones de dinámica molecular. Como se ha mencionado, las simulaciones de dinámica molecular se basan en métodos de mecánica molecular por lo que es necesario un campo de fuerza para el sitio activo de esta enzima. En el caso de la lacasa de *C. gallica*, no se tiene hasta este momento un campo de fuerza que describa la coordinación de los cobres en los sitios T1, T2 y T3; por lo tanto, es necesario establecer una estrategia para modelarla adecuadamente. Primeramente, se realizó un estudio de la rigidez de los sitios T1, T2 y T3 para considerar restringir el movimiento en esta zona. Se sabe que el sitio de cobre T1 presenta rigidez estructural, debido a la similitud de las geometrías entre el estado oxidado y reducido, por lo que presentan bajas energías de reorganización (λ) y altas velocidades de transferencia electrónica desde el sustrato hacia el átomo de cobre (Ryde et al. 2000; Ryde & Olsson 2001). Debido a esto, se espera que al restringir el movimiento de la primera esfera de coordinación durante las simulaciones de dinámica molecular no se afecte la búsqueda conformacional. Sin embargo, es necesario validar esta metodología, con este objetivo se llevaron a cabo simulaciones variando la constante de fuerza (k), que restringe el movimiento de los átomos en el sitio activo (desde 1 hasta 1000 kcal/molÅ²), con el objetivo de observar si el movimiento de los átomos en el sitio de coordinación del metal cambia al tener una restricción mayor o menor. Si el sitio de coordinación es rígido, el movimiento de los átomos será similar para todas las constantes de fuerza ya que la restricción no tendrá un efecto significativo en el movimiento. El análisis de los resultados obtenidos se realizó con base en el RMSD (desviación cuadrática media, por sus siglas en

inglés) de todos los átomos excluyendo únicamente los de hidrógeno. Este RMSD nos indica el movimiento, en Å, de los átomos a lo largo del tiempo respecto a una estructura de referencia. Cuando el RMSD es igual a cero no existe diferencia entre la posición del átomo en la estructura de referencia y la estructura a un tiempo t ; por otro lado, mientras mayor sea este valor, la movilidad del átomo durante la trayectoria será mayor. Asimismo, el valor del RMSD nos proporciona información acerca de la estabilidad de la estructura y de cuándo el sistema ha llegado al equilibrio, es decir el RMSD cambia muy poco. Para este análisis se utilizó como estructura de referencia la estructura inicial (estructura cristalográfica sometida a un proceso de minimización por MM).

En la Figura 6.1 se presenta el RMSD para diferentes zonas de la proteína en las que se excluye solamente el movimiento de los átomos de hidrógeno. Las cuatro dinámicas correspondientes a las diferentes constantes de fuerza muestran un comportamiento similar en el RMSD de la proteína, Figura 6.1A. Por lo tanto, la restricción del sitio activo no afecta de manera global el movimiento de los átomos; sin embargo, ya que el objetivo de este trabajo consiste en estudiar el flujo de electrones en el sitio T1, es necesario realizar un análisis del movimiento de los residuos cercanos al mismo. Al analizar las fluctuaciones de la primera esfera de coordinación de los sitios CuT1 y CuT2/3, es posible establecer que el movimiento (sitio T1 y T2/3, Figuras 6.1B y 6.1C respectivamente) no muestra grandes diferencias cuando se utilizan diferentes valores para las constantes de fuerza ($1-1000 \text{ kcal/mol}\text{Å}^2$). Estos resultados coinciden con la rigidez estructural reportada para el sitio T1 (Ryde et al. 2000; Ryde & Olsson 2001). La mayor divergencia que se presenta es para el RMSD en el sitio T1 con una constante de fuerza de $1 \text{ kcal/mol}\text{Å}^2$, el cual difiere de las demás restricciones en aproximadamente 1 Å .

Por último, aunque hasta este momento se ha determinado que la constante de fuerza no tiene un efecto significativo en la movilidad del sitio de coordinación de los átomos de cobre, es necesario determinar si ésta no restringe el movimiento de los residuos de la segunda esfera de coordinación del CuT1, que es donde se da la transferencia electrónica del sustrato a la enzima. Se estableció como segunda esfera de coordinación aquellos residuos alrededor de 8 Å del CuT1 y que corresponden a los siguientes: A260, F350, F352, F357, A410, P411,

G412, F413, P414, P416, F417, T448, H470, H472, I473, D474, F475, L477, E478 y A479. De acuerdo con los resultados obtenidos, la segunda esfera de coordinación posee una mayor flexibilidad (Figura 6.1D) ya que presenta fluctuaciones del RMSD mayores a 2 Å durante los 100 ns de simulación, con excepción del sistema con la mayor restricción (1000 kcal/molÅ²) en el que la movilidad de los residuos está limitada.

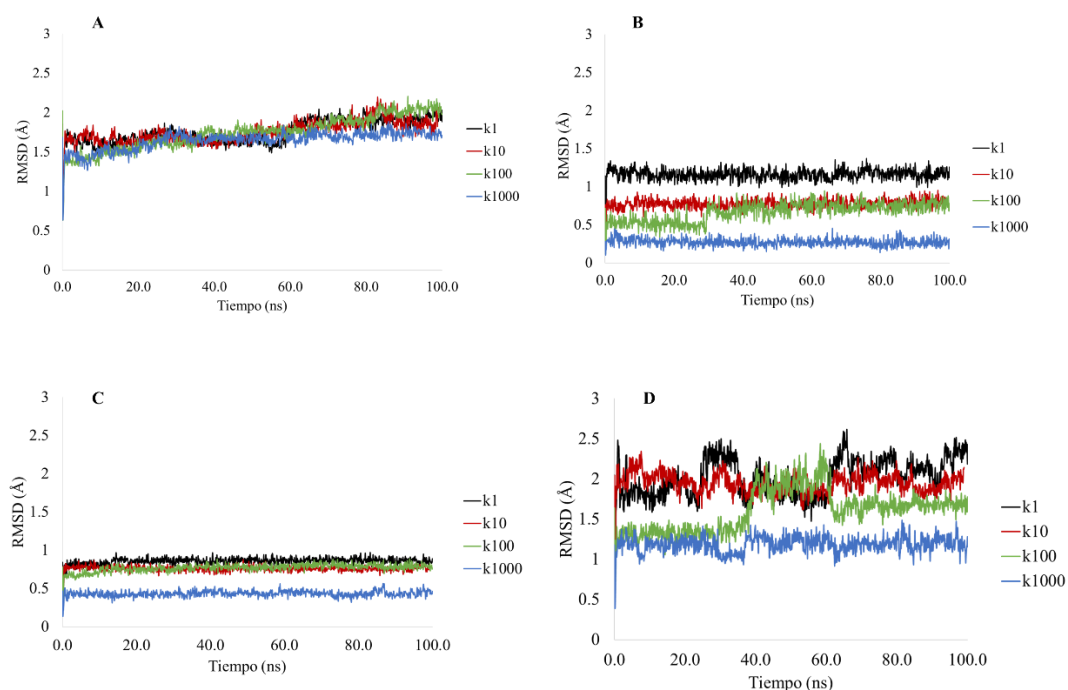


Figura 6.1. RMSD (Å), de todos los átomos excluyendo los de hidrógeno, para A) proteína, B) primera esfera de coordinación del CuT1, C) primera esfera de coordinación del CuT2/3, D) segunda esfera de coordinación del CuT1. Dinámica molecular de 100 ns.

Adicionalmente, la posición del CuT2 también presenta dependencia con la constante de fuerza; cuanto menos está restringido el sistema, el átomo de cobre en este sitio pierde su coordinación (Figura 6.2). Cabe resaltar que el CuT2 ya ha sido reportado como un sitio lábil, debido a la pérdida de este átomo durante estudios cristalográficos de lacasas de hongos (Ducros et al. 2001; De la Mora et al. 2012), lo cual podría correlacionarse con lo encontrado en estas simulaciones de dinámica molecular, ya que el sitio al estar menos restringido los átomos que presentan una coordinación más débil se podrían perder. Para que el CuT2 tenga la coordinación adecuada es necesario restringir el movimiento de los átomos de la primera esfera de coordinación con una constante de 1000 kcal/molÅ², Figura 6.2. Sin embargo, ya que la constante de fuerza influye en el movimiento de los residuos cercanos al CuT1 (Figura

6.1D), y como la posición de éstos podría afectar la distribución electrónica (Vidal-Limón et al. 2013; Monza et al. 2015; Pardo et al. 2016; Acebes et al. 2017), no es posible, de acuerdo con los resultados obtenidos, restringir el movimiento para realizar una búsqueda conformacional. En este punto y dado que la restricción no es una buena estrategia para realizar las simulaciones de dinámica molecular, se decidió utilizar los parámetros del campo de fuerza reportados para una MCO de bacteria, CueO (Hu et al. 2011). Esta enzima presenta los sitios de cobre T1, T2 y T3, al igual que la lacasa de *C. gallica*; la diferencia más significativa en el sitio activo se presenta en el CuT1, y radica en el residuo que ocupa la posición axial, que en la lacasa de *C. gallica* corresponde a un residuo de fenilalanina mientras que en la CueO a una metionina que actúa como donador de densidad electrónica para el CuT1. Por tanto, los parámetros del campo de fuerza de la CueO son una mejor aproximación de los sitios de coordinación, comparado con un sistema restringido que presenta las desventajas analizadas arriba.

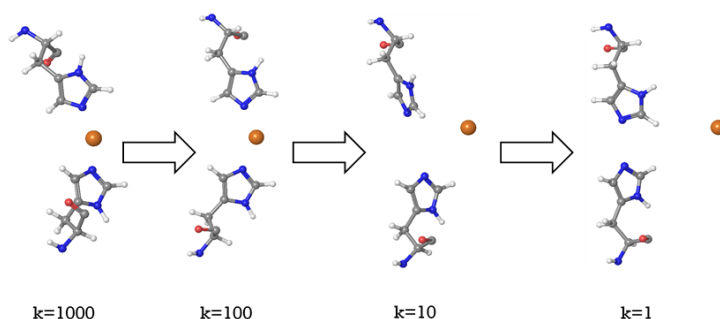


Figura 6.2. Dependencia del CuT2 con la constante de fuerza

6.2 Análisis conformacional de la lacasa de *C. gallica*

Los parámetros reportados para los sitios de cobre T1, T2 y T3 se introdujeron manualmente en el campo de fuerza generado para la lacasa de *C. gallica* por el programa *System Builder* de Desmond. Los resultados obtenidos de la dinámica molecular de 100 ns se presentan en la Figura 6.3. El RMSD global de la proteína, de todos los átomos excluyendo únicamente los de hidrógeno, muestra que la dinámica es estable durante toda la trayectoria con oscilaciones alrededor de 1.5-2 Å (Figura 6.3A). Analizando el movimiento de la primera esfera de coordinación se observa que ambos sitios (T1 y T2/3) son rígidos, de acuerdo con lo reportado para este tipo de enzimas (Ryde et al. 2000; Ryde & Olsson 2001). El RMSD oscila alrededor de 0.5 Å para el sitio CuT1 y alrededor de 0.7 Å para el sitio CuT2 (Figura

6.3B y 6.3C, respectivamente). Por otro lado, la coordinación en el átomo de cobre del sitio T2 se mantiene con las constantes de fuerza utilizadas. Puesto que la rigidez del sitio activo está bien modelada y no existe una pérdida en la coordinación de ninguno de los átomos de cobre, concluimos que los parámetros del campo de fuerza reportados para la CueO sí pueden ser utilizados para realizar simulaciones de dinámica molecular de la lacasa de *C. gallica*, siendo la mejor opción hasta este momento. Los residuos de la segunda esfera de coordinación, aquellos a 8 Å del CuT1, presentan mayor flexibilidad con un RMSD alrededor de 1.5 Å, Figura 6.3D. Sin embargo, aunque tienen mayor movilidad que la primera esfera de coordinación, no se observa globalmente para este conjunto de residuos algún evento importante durante la dinámica. Para determinar si alguna cadena lateral tiene un movimiento significativo, es necesario realizar el análisis de cada uno de los residuos que componen la segunda esfera de coordinación del sitio T1.

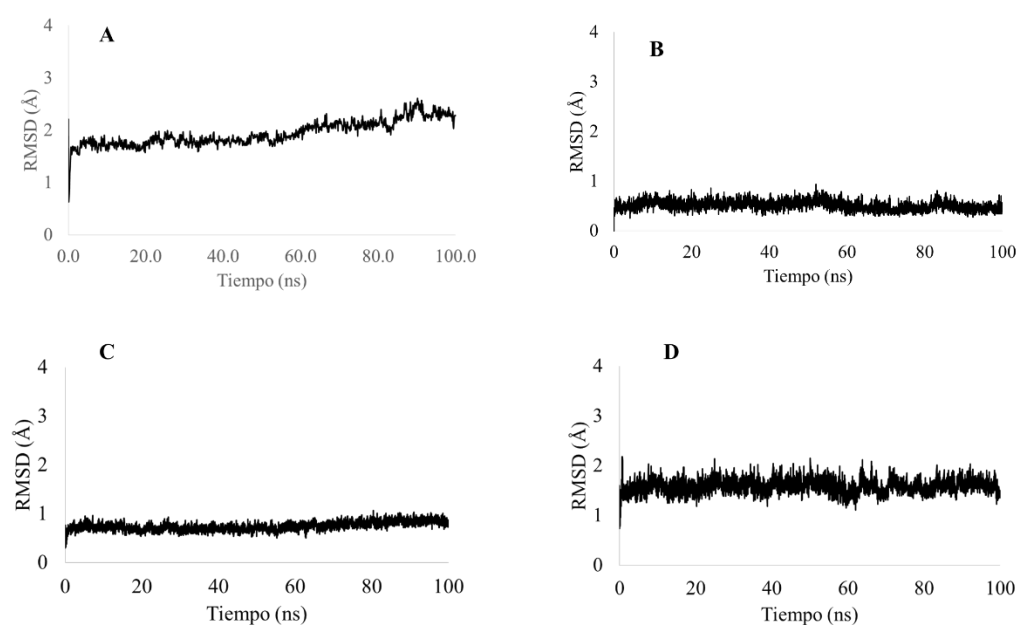


Figura 6.3. RMSD (Å), para todos los átomos excluyendo los de hidrógeno, para A) proteína, B) primera esfera de coordinación del CuT1, C) primera esfera de coordinación del CuT2/3, D) segunda esfera de coordinación del CuT1. Dinámica molecular, 100 ns, utilizando los parámetros para la CueO (Hu et al. 2011).

Se obtuvo el RMSD por separado para cada uno de los residuos que componen la segunda esfera de coordinación del sitio T1 (Apéndice, Figura A1). De los 20 residuos de esta zona, solamente F350, F352, F413, F417, F475, E478 y A479 presentan flexibilidad, al mostrar valores de RMSD entre 2-4 Å aproximadamente; por tanto, estos residuos serán incluidos en

la zona cuántica para evaluar si las diferentes posiciones de las cadenas laterales afectan la distribución de la densidad de espín durante la transferencia de electrones.

Asimismo, analizando la cadena principal correspondiente a los residuos de la segunda esfera de coordinación, encontramos que la P414 presenta un movimiento que acorta la distancia entre el oxígeno del carbonilo de la cadena principal y el átomo de cobre en T1. En la Figura 6.4 se muestra esta distancia O (carbonilo-Pro414)-CuT1 durante la dinámica de 100 ns. El promedio de la distancia durante los primeros 60 ns se encuentra aproximadamente en 5.5 Å, similar al encontrado en la estructura cristalográfica de esta enzima (PDB ID: 4A2E, 5.45 Å). Después de 60 ns la distancia se mantiene en un promedio de 5 Å. La variabilidad en la distancia es notable durante toda la dinámica, oscilando hasta en ± 1 Å (Figura 6.4). Cabe resaltar que la distancia más corta que se encontró fue de 3 Å, pero solamente en 2 estructuras de 20835, sugiriendo que esta conformación no es muy estable. Hasta el momento, no se ha descrito el papel de este residuo en la función de las lacasas; si bien, este aminoácido se encuentra conservado en oxidasas multicobre de hongos; en las de plantas la posición es variable incluyendo residuos como serina o treonina. Por otro lado, podría no ser tan importante en la estabilidad operacional, debido que las prolinas, al tener altas energías de ionización, no serían susceptibles a interactuar con radicales libres. Aunque sí podría ser importante para los procesos de transferencia electrónica durante la catálisis, al encontrarse cerca del CuT1.

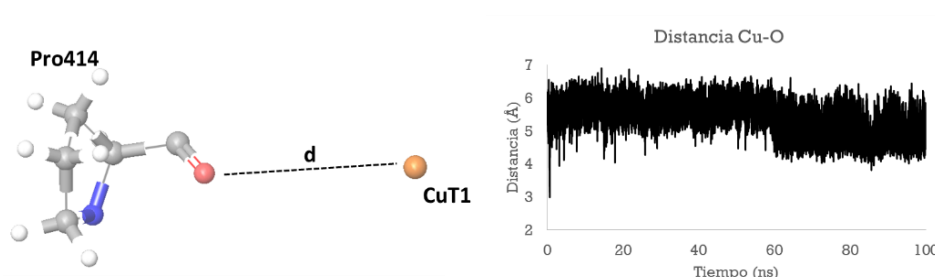


Figura 6.4. Distancia O (carbonilo-Pro414)-CuT1 durante la dinámica molecular.

Por otro lado, de los residuos con mayor flexibilidad durante la dinámica, F475 mostró movimientos importantes en periodos cortos durante los 100 ns de simulación, Figura 6.5A. El anillo aromático de esta fenilalanina presenta una máxima desviación de 5.7 Å respecto a la estructura de referencia (Figura 6.5B). Inicialmente, este residuo no se encuentra expuesto

al solvente y la distancia del átomo de cobre al anillo aromático se encuentra alrededor de 11.6 Å (misma distancia que se presenta en la estructura cristalográfica, PDB ID: 4A2E), después de 60 ns de simulación la cadena lateral de F475 se acerca al átomo de cobre a una distancia alrededor de 7.6 Å y se expone al solvente en la cavidad del sitio T1. Basados en esta observación, se hizo una distribución conformacional a partir de la distancia del cobre del sitio CuT1 al C3 del anillo de esta fenilalanina, en la que se obtuvieron diferentes poblaciones durante la dinámica molecular y que se presentan en la Figura 6.5C. Este análisis mostró que existen dos poblaciones de conformaciones, basadas en la distancia del CuT1 a la F475, en las que la mayor parte de las estructuras corresponden a aquellas en las que este residuo se encuentra más cerca del CuT1 y no está expuesto al solvente, mientras que la población con menor número de estructuras es en la que la F475 está más alejada del CuT1 exponiéndose al solvente. Con el fin de continuar los estudios de QM/MM, y dado que la F475 tuvo mayor movilidad durante la dinámica, optamos por usar esta distribución conformacional para seleccionar al azar cinco conformaciones que corresponden a la población con mayor número de estructuras y dos correspondientes a la población con menos estructuras. Las conformaciones elegidas están distribuidas durante toda la trayectoria y se encuentran marcadas con flechas en las Figuras 6.5A y 6.5C.

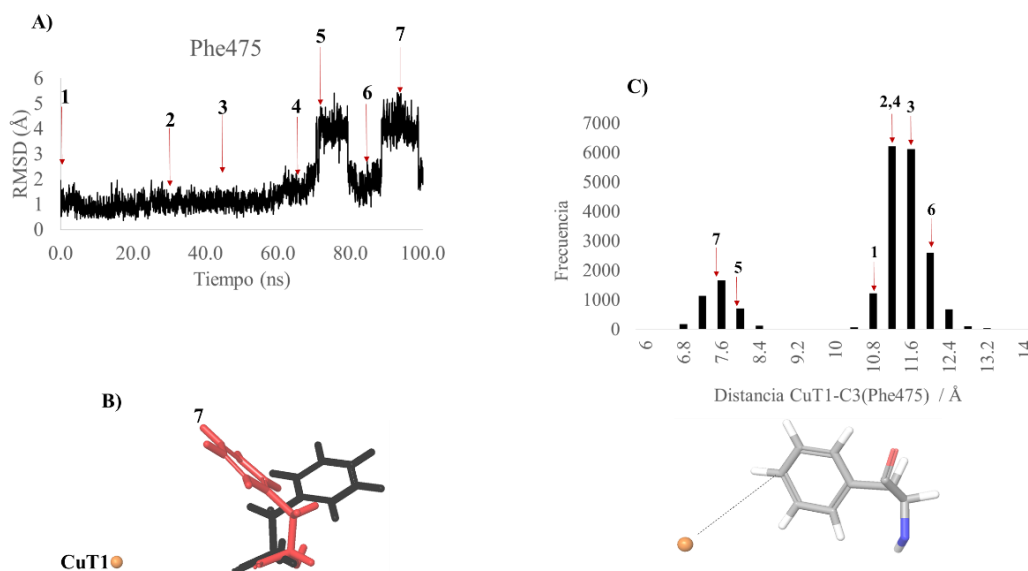


Figura 6.5. A) RMSD (Å), de todos los átomos excluyendo los de hidrógeno, de la Phe475 durante los 100 ns de simulación, B) representación molecular de la Phe475 respecto al CuT1. Representación en negro corresponde a la estructura cristalográfica (PDB ID: 4A2E) y en rojo la conformación 7, C) distribución conformacional de la dinámica con base en la distancia CuT1-C3 (Phe475).

6.3 Predicción de residuos susceptibles a oxidarse

Durante la oxidación de fenoles por la lacasa de *C. gallica* se generan radicales libres que interactúan con la enzima inactivándola (Ramírez 2014). Para que el sustrato sea oxidado tiene que acercarse a la enzima a una distancia tal que permita la transferencia de un electrón por efecto túnel ($< 10\text{-}12 \text{ \AA}$) (Gray & Winkler 1996; Gray & Winkler 2010), a través de un mecanismo de esfera externa (Marcus & Sutin 1985; Solomon et al. 2004; Kosman 2008; Jones & Solomon 2015). Ya que el sustrato no necesita entrar en contacto directo con el átomo de CuT1, en el sitio activo solamente existe una cavidad formada por un conjunto de residuos hidrofóbicos que benefician la interacción sustrato-enzima, haciendo que la transferencia sea favorable. Algunos residuos hidrofóbicos que conforman esta cavidad corresponden a residuos de Phe. De acuerdo con reportes previos sobre otras enzimas, como la HRP, que catalizan reacciones similares, se ha detectado la formación de aductos entre los radicales libres de la enzima y residuos de Phe, provocando la inactivación de la enzima (Kim et al. 2015). Basados en este antecedente, es posible que las Phe en la cavidad del sitio activo sean oxidadas por los radicales libres formados durante la reacción. Con el objetivo de encontrar qué residuos son más susceptibles a ser oxidados, y reemplazarlos por residuos menos oxidables para generar variantes más estables al ataque por radicales libres, se utilizaron herramientas computacionales. Los cálculos de estructura electrónica pueden ayudarnos en la predicción de sitios oxidables en un ambiente proteico a través del modelamiento de la densidad de espín. La densidad de espín es la probabilidad de encontrar un electrón desapareado; de acuerdo con esto, podríamos intuir que un residuo que aloja densidad será susceptible a oxidarse; es decir, interactuará más fácilmente con los radicales libres generados.

Se realizaron cálculos QM/MM de todas las conformaciones seleccionadas a partir del análisis de las simulaciones de dinámica molecular (Figura 6.5C). El tamaño de la zona QM es un componente importante al realizar cálculos de estructura electrónica en proteínas ya que los residuos en la frontera entre las regiones QM y MM, se sabe, no siempre se modelan adecuadamente (Reuter et al. 2000). En general, la estrategia consiste en establecer esta frontera lejos de los residuos que son cruciales para la catálisis. Con base en esto, se realizó un estudio de la influencia del tamaño de la zona cuántica para establecer el tamaño mínimo

de la misma, considerando que nos interesa estudiar la distribución de electrones en la segunda esfera de coordinación (a 8 Å del átomo de Cu en T1). Se modeló el estado basal de la enzima (doblete, Cu^{2+}) para regiones QM que variaron entre 45 y 515 átomos. Los resultados obtenidos para el estado basal son los que se muestran en la Tabla 6.1, en la que se reporta el porcentaje de la densidad de espín que se aloja en cada uno de los átomos comparando con los datos reportados para la azurina, calculada con el mismo funcional B3LYP (Remenyi et al. 2007). Las densidades obtenidas en este trabajo, para la primera esfera de coordinación del CuT1, son semejantes a las de la literatura, en donde se ha reportado que el funcional híbrido B3LYP puede subestimar la densidad de espín en este sitio debido a una deficiencia de este funcional al modelar la covalencia del azufre de la cisteína con el cobre; sin embargo, aunque la densidad de espín se subestima respecto a la densidad obtenida experimentalmente por EPR (Remenyi et al. 2007), los resultados son comparables siempre y cuando se utilice siempre el mismo funcional.

Tabla 6.1. Porcentaje de la densidad de espín en la primera esfera de coordinación del CuT1 calculada por métodos QM/MM con el funcional B3LYP para diferentes tamaños de la región QM. Estado basal (doblete, Cu^{2+}). Para todos los casos, 100% de densidad de espín es igual a 1 (1 electrón desapareado).

**% densidad de espín en zonas de
diferente tamaño**

Tamaño zona QM Residuo	45 átomos	331 átomos	472 átomos	515 átomos	Azurina (B3LYP)*
CuT1	26.4	24.6	23.7	23.9	27.0
Cys471	60.5	61.2	61.9	61.8	62.0
His415	4.3	4.0	4.1	4.1	4.0
His476	3.4	3.2	3.2	3.2	3.0

*Datos obtenidos de (Remenyi et al. 2007)

De acuerdo con los valores calculados en la Tabla 6.1 podemos observar que la distribución de la densidad de espín no muestra dependencia con el tamaño de la zona cuántica, por lo que se realizó el estudio de esta distribución de un estado activado para determinar si existe alguna diferencia cuando hay un electrón desapareado extra. Para este caso, se agregó un electrón (tripleto, Cu^{2+}) al sistema y se modelaron tres regiones QM con 331, 472 y 515

átomos, encontrando que la distribución sí depende del tamaño de la región QM a excepción de los sistemas con mayor número de átomos (472 y 515) donde ya no se observa diferencia en cómo se distribuye la densidad de espín. En el sistema con 331 átomos la densidad de espín se deslocaliza en la cadena lateral de los residuos F413, H472 y F481. Por otro lado, en el sistema con 472 átomos se aloja en los residuos I359, F413, F417, H472 y V483. El sistema con 515 átomos mostró la misma deslocalización electrónica que el sistema con 472 átomos. En los tres sistemas además de estos residuos, el átomo de cobre del sitio T1 y la primera esfera de coordinación alojan densidad de espín pero aquí, igual que en el estado basal, no se observaron diferencias. De acuerdo con estos resultados se eligió realizar los cálculos utilizando una zona cuántica de 472 átomos. Los residuos que conforman esta zona QM son los que se presentan en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Secuencia de residuos de la zona QM con 472 átomos.

Número de residuo	Secuencia
348-359	348 Met-Ala-Phe-Gly-Phe-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Thr-Ile 359
411-417	411 Pro-Gly-Phe-Pro-His-Pro-Phe 417
471-483	471 Cys-His-Ile-Asp-Phe-His-Leu-Glu-Ala-Gly-Phe-Ala-Val 483

Una vez establecida la zona cuántica con la que se trabajaría, se realizaron los cálculos de la densidad de espín de las 7 conformaciones seleccionadas (ver Figura 6.5C). Se modelaron dos estados activados del sistema: añadiendo y sustrayendo un electrón. La lógica detrás de esta decisión es la siguiente: lo que se busca es modelar un sistema en el que ocurre una oxidación; es decir, la pérdida de un electrón, por lo que el sistema en el que se sustrae un electrón pareciera ser la mejor opción para modelarlo. Sin embargo, existen reportes en los que se añade un electrón al sistema para determinar así los residuos que pueden estabilizar dicha carga. Esta estrategia, de hecho, ha sido utilizada con éxito para mapear el camino de los electrones en otras metaloproteínas (Guallar 2008; Guallar & Wallrapp 2008; Vidal-Limón et al. 2013; Monza et al. 2015; Acebes et al. 2017). Primeramente, se analizó la densidad de espín en el sitio T1 (primera esfera de coordinación + CuT1) para todas las conformaciones y los dos sistemas modelados (± 1 electrón, Tabla 6.3). La distribución es similar en el estado basal y el estado activado, lo cual se esperaba debido a que el sitio T1 es

rígido y la distribución electrónica no debe alterarse debido a un cambio conformacional en la proteína. Sin embargo, encontramos un sistema (Conf1, en el estado +1 electrón) en el que se encontró una gran diferencia en la densidad de espín respecto a las demás conformaciones. Ésta corresponde a una conformación en la que el oxígeno del carbonilo de la P414 se acerca a una distancia de 2.99 Å al CuT1 (ver Figura 6.4). Se ha reportado que un enlace de coordinación Cu-O se encuentra entre 1.9-2.8 Å (Harris et al. 2005), por lo que el acercamiento del oxígeno de la P414 al CuT1 podría alterar la distribución electrónica para dicho estado electrónico. Cabe resaltar que la densidad electrónica faltante en el sitio T1 se deslocalizó en la cadena principal de una de las fronteras QM/MM (I359). Los modelos computacionales pueden, en algunas ocasiones, predecir de manera inexacta las propiedades electrónicas de las moléculas. Para el caso de la Conf1 no es confiable obtener conclusiones acerca de la distribución de espín en la segunda esfera de coordinación.

Tabla 6.3. Densidad de espín en el sitio T1 para siete conformaciones en el estado basal y dos estados activados ($\pm 1 e^-$)

Conformación	ρ_s (estado basal)	$\rho_s (+ 1e^-)$	$\rho_s (- 1e^-)$
Conf1	0.924	0.283	0.945
Conf2	0.928	0.951	0.933
Conf3	0.857	0.908	0.913
Conf4	0.958	0.959	0.956
Conf5	0.967	0.966	0.967
Conf6	0.970	0.968	0.950
Conf7	0.961	0.961	0.965

Los resultados obtenidos para ambos sistemas se presentan como el cambio en la densidad de espín ($\Delta\rho_s$) relativo al estado basal. En la Tabla 6.4 se muestran los valores que corresponden al sistema “más un electrón” y en la Tabla 6.5, los valores del sistema “menos un electrón”. La densidad de espín aquí reportada corresponde a la que se deslocaliza únicamente en las cadenas laterales de los residuos; es decir, no se tomó en cuenta aquel residuo en el que la densidad de espín se deslocaliza en la cadena principal ya que la densidad alojada aquí no representa un sitio susceptible a oxidarse, sino más bien podría tratarse de un artefacto del modelo cuando se trata de aminoácidos que se encuentran en la frontera QM/MM, debido a que la densidad en estos límites generalmente, se sabe, no se modela adecuadamente (Reuter et al. 2000; Senn & Thiel 2009). Los valores negativos representan

una pérdida en la densidad de espín (ρ_s) después de la adición o sustracción de un electrón, mientras que los valores positivos representan una ganancia de ρ_s . De acuerdo con los datos obtenidos, la densidad de espín sí depende de la conformación de la lacasa utilizada (Tabla 6.4 y 6.5), como ya se ha reportado para la deslocalización electrónica en otras proteínas (Vidal-Limón et al. 2013; Monza et al. 2015; Pardo et al. 2016; Acebes et al. 2017). Asimismo, esta distribución depende del sistema que se modela (agregar o sustraer un electrón).

Tabla 6.4. Cambio en la densidad de espín entre el estado activado y el estado basal (sistema más un electrón). Los valores no mostrados representan $\Delta\rho_s=0$.

Posición	Conf1	Conf2	Conf3	Conf4	Conf5	Conf6	Conf7
CuT1	-0.264	0.001	-0.138	0.014	-0.016	-0.013	-0.024
His415	-0.063	-0.005	0.001	0.009	-0.008	-0.002	-0.006
His476	-0.009	0.000	0.009	-0.008	0.002	-0.003	0.000
Cys471	-0.304	0.027	0.179	-0.014	0.021	0.017	0.030
Phe481	---	---	0.039	---	---	---	---
His472	---	0.029	0.064	---	---	---	---
Phe417	---	---	0.024	---	---	0.018	0.330
Phe413	---	0.202	---	---	---	---	0.156
Phe357	---	---	0.104	0.230	0.055	0.054	---
Phe352	---	---	0.177	0.091	---	0.077	---
Phe350	---	---	---	0.039	---	0.028	---

Para el sistema en el que se agrega un electrón, los residuos que alojan mayor densidad de espín, con diferencias ($\Delta\rho_s$) mayores a 0.1, corresponden a F352, F357 y F413 (Tabla 6.4). Estos residuos forman parte de los grupos más poblados, con 60 % de las conformaciones analizadas, de la distribución conformacional proveniente del estudio de dinámica molecular (conformaciones 2-4 de la Figura 6.5C). Por lo que estas posiciones son consideradas como susceptibles a oxidación. En algunos casos, como se mencionó, la densidad de espín se deslocalizó en el grupo carbonilo de la cadena principal. La mayor densidad de espín alojada en el carbonilo se presentó en los residuos I359, F417 y V483 con los mayores valores de

$\Delta\rho_s$ de 1.48 (Conf1), 0.39 (Conf5) y 0.27 (Conf7), respectivamente. En el caso de I359, se observó un $\Delta\rho_s$ mayor a 0.12 en todas las conformaciones estudiadas, mientras que F417 solamente presenta en cinco conformaciones y V483 en cuatro conformaciones. A pesar de alojar densidad de espín, estos residuos no son considerados como susceptibles a oxidarse ya que el carbonilo en el que se aloja la densidad de espín no necesariamente representa un sitio que pueda deslocalizar electrones desapareados, más bien podría ser un artefacto del modelo debido a efectos en zonas cercanas a la frontera QM/MM (Reuter et al. 2000).

Por otro lado, en el sistema menos un electrón los residuos en los que se aloja mayor densidad de espín (con $\Delta\rho_s > 0.1$) y en más conformaciones corresponden a M348, F475 y E478 (Tabla 6.5). De éstos, el que podría interaccionar más fácilmente con los radicales libres generados es F475, debido a su exposición hacia el solvente, a diferencia de M348 que se encuentra en el interior de la proteína (Figura 6.6).

Tabla 6.5. Cambio en la densidad de espín entre el estado activado y el estado basal (sistema menos un electrón). Los valores no mostrados representan $\Delta\rho_s=0$.

Posición	Conf1	Conf2	Conf3	Conf4	Conf5	Conf6	Conf7
CuT1	-0.105	-0.010	-0.123	-0.016	-0.014	-0.036	-0.014
His415	-0.037	-0.004	0.012	-0.007	-0.004	-0.004	-0.004
His476	0.017	0.000	0.004	0.002	0.001	-0.024	0.003
Cys471	0.147	0.019	0.164	0.019	0.017	0.045	0.018
Phe481	0.045	0.020	---	---	---	---	---
Phe475	0.112	0.170	0.427	0.104	0.023	0.075	---
Phe357	---	---	---	---	---	0.097	0.127
Phe350	---	0.031	---	---	---	---	---
Glu478	---	0.142	0.142	0.184	0.331	0.282	0.201
Asp474	---	0.107	0.051	0.066	---	---	---
Pro411	0.059	0.187	---	0.088	---	0.035	---
Met348	0.146	0.113	0.172	0.016	---	0.071	0.145

Otros residuos que inesperadamente alojaron densidad de espín en la cadena lateral son P411, D474 y E478. La posición P411 se encuentra en la frontera QM/MM por lo que la densidad de espín podría deberse a un artefacto del modelo ya que las prolinas no presentan propiedades redox y este residuo se encuentra en el límite de la región QM/MM donde, como se ha dicho, la densidad de espín puede no modelarse adecuadamente. Por otro lado, D474 y E478 no se encuentran cerca de ninguna de las fronteras y la deslocalización de densidad de espín en la cadena lateral en éstos es difícil de interpretar ya que los residuos ácidos tampoco presentan propiedades redox.

De acuerdo con los resultados obtenidos, al modelar siete conformaciones y dos sistemas distintos, los residuos F357, F413 y F475 son susceptibles a oxidarse. Los tres son parte de la cavidad hidrofóbica del sitio T1 (Figura 6.6), por lo que podrían jugar un papel importante durante el proceso catalítico. Adicionalmente, como se mostró, F475 presenta una dinámica muy interesante con movimientos que exponen su cadena lateral al solvente. Por otro lado, se ha reportado la importancia de la posición F413 para la modulación de la hidrofobicidad y el tamaño de la cavidad del sitio T1 para una lacasa quimérica (Pardo et al. 2016). Esto sostiene la importancia de estos residuos predichos por los cálculos computacionales; sin embargo, la contribución de éstos en la estabilidad operacional de la lacasa no ha sido estudiada.

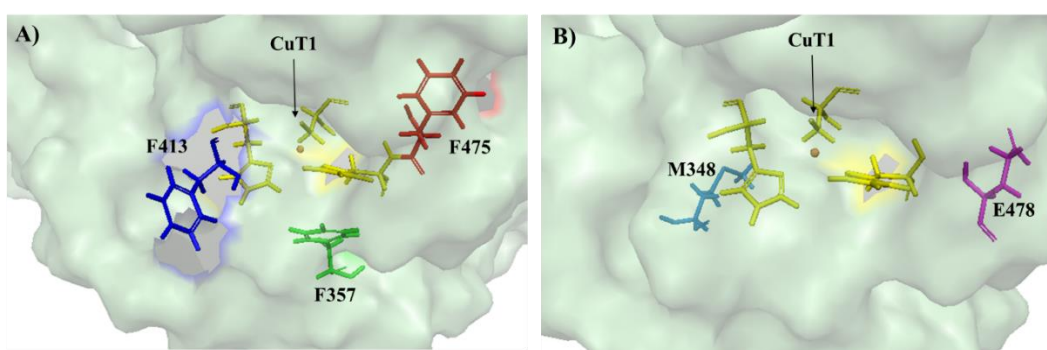


Figura 6.6. Posición de los residuos que alojaron la mayor densidad de espín: A) residuos aromáticos, B) residuos no aromáticos. En amarillo se muestran los residuos de la primera esfera de coordinación del CuT1. Representación de superficie expuesta al solvente.

6.4 Diseño de mutantes de los residuos susceptibles a oxidación predichos por cálculos QM/MM

Una vez que se han predicho los residuos susceptibles a ser oxidados por la presencia de radicales libres, la estrategia fue reemplazarlos por residuos que sean menos propensos a reacciones de oxidación y así, generar variantes con una estabilidad operacional mejor. Para elegir los residuos por los que se van a mutar los sitios predichos por QM/MM se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con lacasas de hongos y oxidorreductasas que contienen cobre de plantas, con el fin de favorecer el plegamiento de la proteína después de la mutación. Aquellos residuos menos susceptibles a oxidarse y que sean más comunes son los que serán considerados para reemplazar las posiciones F357, F413 y F475.

De acuerdo con los resultados del alineamiento, la posición 357 aunque está altamente conservada en las lacasas de hongos, en algunas se presenta leucina que es menos oxidable (Figura 6.7A) por lo que se consideró como reemplazo en esta posición. Por otro lado, F413 tiene más variabilidad en el alineamiento de lacasas de hongos (Figura 6.7B). En este caso se eligió a la alanina como reemplazo ya que es un residuo poco oxidable y es de los más comunes en esta posición. Para la F475, se observa que residuos aromáticos son los que se encuentran conservados para lacasas de hongos por lo que, al ser igualmente oxidables, no resultaba conveniente proponer un residuo para la mutación (Figura 6.7C). Se realizó un alineamiento con oxidorreductasas que contienen cobre y lacasas de plantas, Figura 6.7D, en el que se encontró una gran variabilidad con residuos como valina, alanina, leucina e isoleucina en esta posición.

Basándonos en los resultados de estos alineamientos, se optó por realizar las siguientes mutaciones: F357L, ya que es el residuo más común después de la fenilalanina y que es poco oxidable; F413A, por ser una posición variable y la alanina mostró ser uno de los residuos más frecuentes; F475I, se eligió en esta posición la isoleucina debido a que la cadena lateral de este aminoácido es un buen reemplazo del anillo aromático de la fenilalanina por su hidrofobicidad y tamaño.

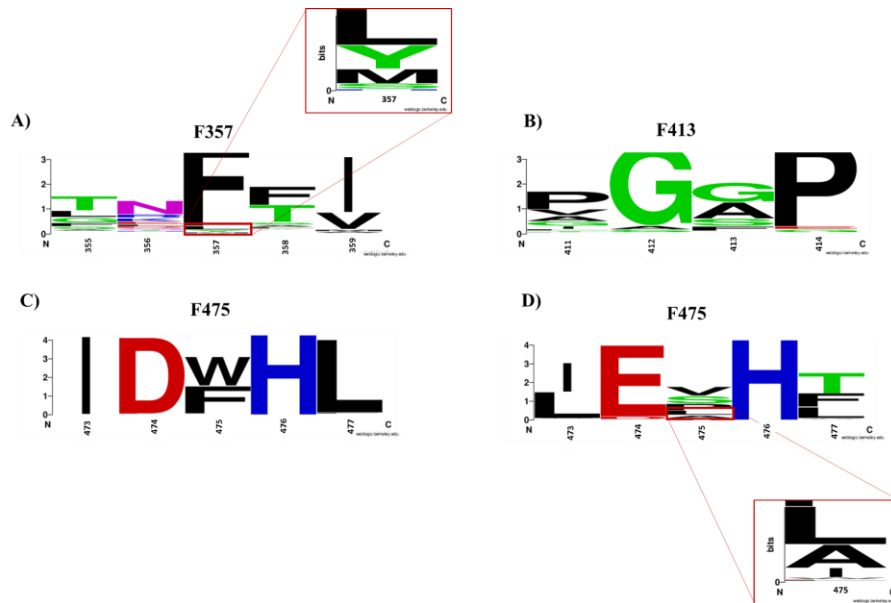


Figura 6.7. Frecuencia de residuos proveniente del alineamiento múltiple de secuencias para diferentes lacasas de hongos en las posiciones: A) 357, B) 413, C) 475 y D) oxidorreductasas que contienen cobre de plantas para la posición 475. Los alineamientos se generaron con el servidor Clustal Omega y las imágenes con el servidor WebLogo.

6.5 Expresión heteróloga de la lacasa de *C. gallica* en *P. pastoris*

Para realizar las mutaciones propuestas en la lacasa de *C. gallica* es necesario tenerla en un sistema de expresión heterólogo. Para este trabajo se utilizó la secuencia de la lacasa de *C. gallica* (LcCg) obtenida a partir del cDNA de *C. gallica* UAMH8260 (GenBank KX932046) por parte del grupo del Dr. Jorge Luis Folch de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Se diseñó una construcción en la que el gen LcCg se introdujo en el vector de expresión pPICZB para *P. pastoris*, bajo el promotor de la alcohol oxidasa (AOX1) y utilizando como péptido señal el factor α de *S. cerevisiae* modificado genéticamente por evolución dirigida por otro grupo de trabajo (Camarero et al. 2012); la construcción denominada α -fLcCg-pPICZB fue sintetizada comercialmente por la compañía GenScript.

No se consideró utilizar el péptido señal sin mutaciones ya que se han reportado bajos niveles de expresión de lacasas en levadura usando el factor α de *S. cerevisiae*. Por ejemplo, los niveles de expresión para la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* expresada en *S. cerevisiae* es de 0.03 U/L (Camarero et al. 2012); mientras que para la lacasa del basidiomiceto PM1 es de 0.035 U/L (Maté et al. 2010). Debido a que la lacasa de *C. gallica* presenta un 75 % de

identidad con la de *P. cinnabarinus* y un 95 % con la del basidiomiceto PM1 los problemas de secreción podrían también presentarse en este caso. Ya que el péptido señal modificado ha sido utilizado con éxito en la lacasa de *P. cinnabarinus*, aumentando 40 veces la secreción de la proteína, se optó por utilizarlo para expresar heterológamente nuestra enzima.

Una vez que se transformó el vector α -fLcCg-pPICZB en *P. pastoris* se eligieron las clonas que expresan la enzima funcional basándonos en la formación de un halo verde alrededor de colonias que crecieron en medio mínimo con metanol en presencia de ABTS. Esta coloración aparece debido a que el ABTS es un sustrato de la enzima que al oxidarse forma un compuesto colorido (Figura 6.8). Se realizó un experimento control transformando el vector pPICZB sin el gen de la lacasa y se crecieron las colonias en el mismo medio de expresión con ABTS donde no se observó la aparición de coloración verde alrededor de las colonias. A partir de estos resultados, se puede establecer que el uso del péptido señal modificado sí es factible para la expresión del gen LcCg. El factor α de *S. cerevisiae* está formado por dos regiones: la primera denominada “pre-leader” encargado de llevar a la proteína al retículo endoplasmático (RE); la segunda región es la denominada “pro-leader” que se piensa ayuda en el paso de la proteína del RE al aparato de Golgi. El factor α utilizado en este trabajo presenta cambios en las posiciones A9D, F48S, S58G, G62R y E86G. Se ha reportado que la mutación en la posición F48S (que pertenece a la región pro) mejora la secreción de otras proteínas como anticuerpos y HRP, esta mejora se atribuye a un aumento en la polaridad y la flexibilidad del polipéptido (Rakestraw et al. 2009). Por otro lado, la mutación A9D que se encuentra en la región pre, no se sabe exactamente la razón por la que aumenta la secreción de la proteína ya que esta posición forma parte de una región hidrofóbica y la disminución de la hidrofobicidad en este sitio se esperaba afectara la secreción, debido a que la presencia de una carga disminuye la interacción con la membrana durante la translocación de la proteína; sin embargo, de acuerdo a los resultados encontrados por Camarero et al. 2012 la hidrofobicidad en esta región, parece no ser tan importante para la secreción.



Figura 6.8. Ensayo de actividad lacasa en caja. La coloración verde muestra la oxidación de ABTS por la enzima secretada.

Con los resultados hasta aquí obtenidos, solamente se ha determinado que LcCg se expresa en *P. pastoris*; sin embargo, es necesario establecer los niveles de expresión para su posterior producción. Hasta el momento, existe solamente un reporte de la expresión de la lacasa de *C. gallica* en *Kluyveromyces lactis* (Arana-Cuenca et al. 2010); sin embargo, los investigadores no miden los niveles de expresión y no puede ser comparado con este trabajo.

6.6 Estudio de las variables que afectan la expresión de LcCg en *P. pastoris*

Se eligió una colonia que secreta la lacasa para realizar estudios de expresión en medio líquido. Existen diferentes factores que intervienen en la expresión heteróloga de proteínas en *P. pastoris* como son: la concentración de inductor (en este caso metanol), el oxígeno disuelto, el pH, la temperatura (Jahic et al. 2006; Li et al. 2007) y específicamente para la expresión de lacasas es importante la concentración de CuSO_4 . La expresión heteróloga de lacasas de otros hongos en *P. pastoris* ya ha sido reportada con éxito (Hong et al. 2002; Lu et al. 2009) tanto en producción en matraz como en bioreactor. Algunos investigadores han realizado la expresión heteróloga de la lacasa de *Pycnoporus sanguineus* en *P. pastoris* estudiando el efecto del pH, la temperatura, la concentración de metanol y la concentración de CuSO_4 . Encontraron que para ese sistema las variables que provocan un efecto mayor en la actividad de la proteína son la temperatura y la concentración de metanol (Lu et al. 2009). Asimismo, en otro reporte se estudiaron estrategias de fermentación en la expresión heteróloga de la lacasa de *Trametes versicolor* en *P. pastoris*, se encontró que la actividad obtenida en el bioreactor es al menos 7 veces mayor que en matraz. Particularmente, para este trabajo se encontró que al disminuir la temperatura de inducción se mejoraba la actividad y que la concentración de metanol tiene un efecto marcado en la producción de enzima (Hong

et al. 2002). De acuerdo con estos antecedentes, se decidió realizar el estudio de algunos de estos factores. Se llevaron a cabo cultivos en matraz cambiando la concentración de CuSO_4 , la concentración de metanol y la temperatura.

6.6.1 Efecto de la concentración de CuSO_4

En la Figura 6.9 se muestran los perfiles de crecimiento celular y producción de lacasa al variar la concentración de cobre de 0-0.5 mM. En ausencia de cobre no se detectó producción de lacasa pero sí crecimiento de la levadura. Al aumentar la concentración de 0.05 mM hasta 0.5 mM no se observa dependencia con el crecimiento de la levadura ni con la producción de lacasa. Para este sistema, una concentración mínima de CuSO_4 de 0.05 mM es suficiente para detectar lacasa en el sobrenadante; como se ha reportado ya para otras lacasas expresadas en *P. pastoris*, en las que concentraciones de 0.004 mM – 0.5 mM son suficientes para la expresión (Collins & Dobson 1997; O'Callaghan et al. 2002; Lu et al. 2009).

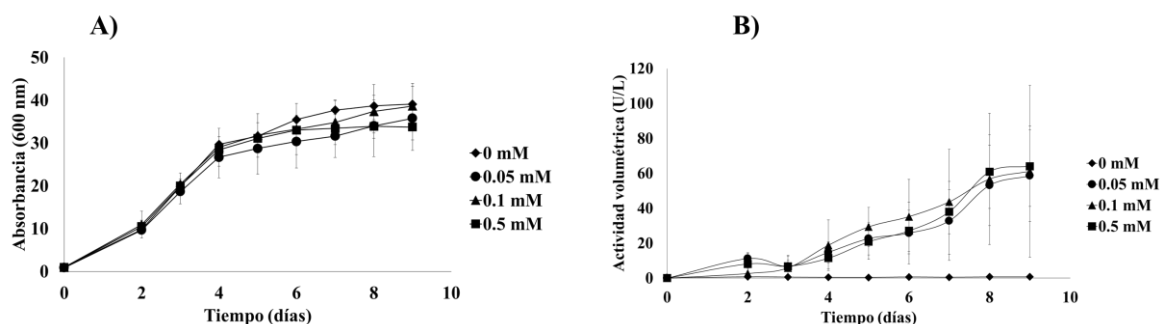


Figura 6.9. Efecto de la concentración de CuSO_4 en A) crecimiento, B) actividad volumétrica de lacasa. Experimentos realizados por triplicado en medio BMM con adición de MeOH cada 24 horas.

6.6.2 Efecto de la concentración de metanol

Como se ha mencionado, el vector utilizado en este trabajo tiene como promotor el gen AOX1 de la enzima alcohol oxidasa inducible por metanol. Debido a que el metanol además de actuar como inductor es la única fuente de carbono para el crecimiento de la levadura, es una de las variables más importantes en la expresión de proteínas utilizando este sistema. Se llevaron a cabo experimentos en los que se varió la concentración de metanol desde 0.5-2%. Los resultados obtenidos (Figura 6.10) muestran la dependencia que existe entre la concentración de metanol, la producción de lacasa y el crecimiento de la levadura. La concentración óptima, de las aquí probadas, se encontró en 2%. De acuerdo con lo reportado

en la literatura, la concentración de metanol es usual que varíe entre 0.4-2 % para cultivos en matraz (Hong et al. 2002; Lu et al. 2009; Li et al. 2014).

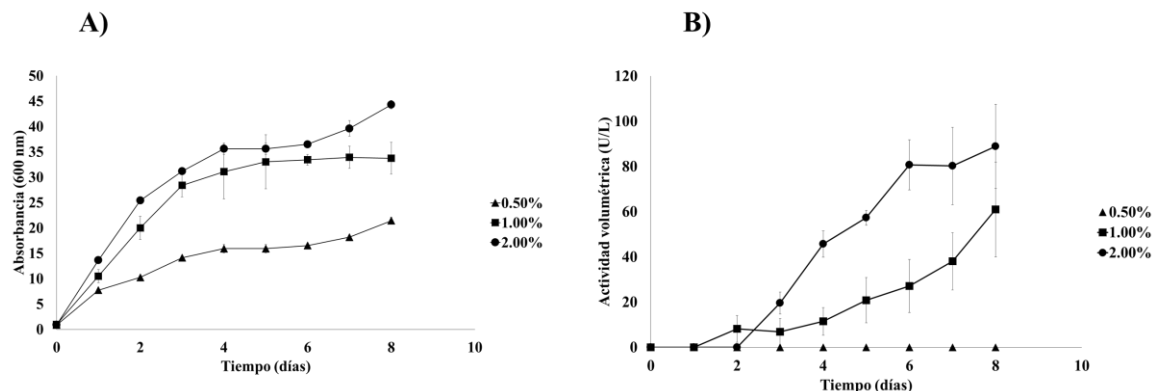


Figura 6.10. Efecto de la concentración de MeOH en A) crecimiento, B) actividad volumétrica de lacasa. Experimentos realizados por triplicado en medio BMM con adición de MeOH cada 24 horas, con 0.5 mM de CuSO_4 .

6.6.3 Efecto de la temperatura

Por último, utilizando las condiciones de 1 % de metanol y 0.5 mM de CuSO_4 se analizó el efecto de disminuir la temperatura. Se utilizó 20 °C como temperatura de inducción ya que de acuerdo con reportes se sabe que a esta temperatura aumenta la secreción de la lacasa en *P. pastoris* y *S. cerevisiae* (Cassland & Jönsson 1999; Hong et al. 2002; Camarero et al. 2012; You et al. 2014). Aunque se ha reportado que la disminución de la temperatura tiene un efecto positivo en la expresión heteróloga de proteínas para nuestro sistema no dio resultados positivos ya que la producción de lacasa fue tan poca que no pudo ser cuantificada. Cabe resaltar que el crecimiento de la levadura no se vio afectado en este caso, a 20 °C se obtuvo una densidad óptica comparable con la obtenida a 28 °C (27 vs 32) como se ha visto en la expresión de proteínas en *P. pastoris* donde el efecto en el crecimiento no es significativo al disminuir la temperatura (Li et al. 2001; Hong et al. 2002; Wang et al. 2009).

6.7 Producción de LcCg recombinante en matraz

Al comparar los resultados aquí obtenidos con lo reportado en la literatura observamos que los niveles de expresión de las lacasas en estos sistemas dependen de la proteína; es decir, aunque pertenezcan a la misma familia no todas las lacasas se expresan con la misma

eficiencia. En este estudio se alcanzaron niveles de 80 U/L que comparado con otras lacasas no es de los más altos reportados. Dos lacasas de *Coprinus comatus* se expresaron en *P. pastoris* obteniendo 1400 y 600 U/L (Gu et al. 2014), mientras que la lacasa de *Trametes versicolor* expresada igualmente en *P. pastoris* fue expresada en niveles alrededor de 12,000 U/L (Li et al. 2014). Por otro lado la lacasa de *Trametes troggi* fue expresada en *P. pastoris* y producida en fermentador alcanzando 2,500 U/L (Colao et al. 2006). La lacasa de *Ganoderma lucidum* se expresó heterológamente también en niveles bajos, alrededor de 650 U/L (You et al. 2014).

Los niveles de expresión obtenidos fueron muy bajos (alrededor de 80 U/L, ver Figura 6.10B) por lo que se decidió realizar un cultivo en un volumen mayor, utilizando matraces Fernbach bafleados. Las condiciones utilizadas para la producción de la enzima recombinante fueron 1 % de metanol, 0.5 mM de CuSO₄ y 28 °C. En la Figura 6.11 se presentan los resultados obtenidos del crecimiento de *P. pastoris* y la producción de lacasa. Bajo estas condiciones se alcanzaron 250 U/L lo que representa un incremento de alrededor de 3 veces respecto a lo obtenido en el matraz, probablemente debido a que en el matraz Fernbach existe una mayor transferencia de oxígeno que se sabe es uno de los factores limitantes en la producción heteróloga de la proteína (Villatte et al. 2001).

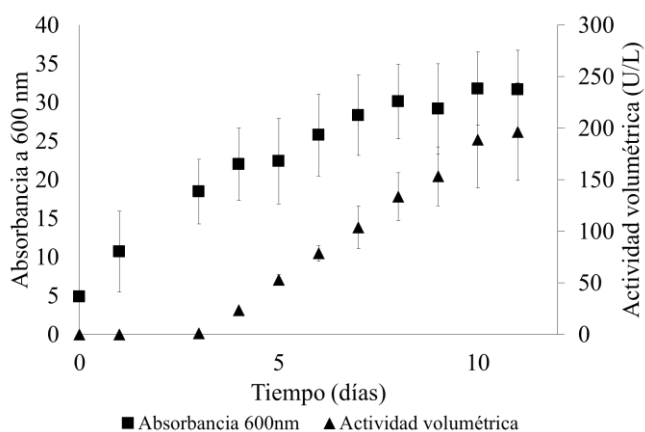


Figura 6.11. Perfiles de crecimiento y producción de lacasa en matraces Fernbach. Experimentos realizados por triplicado con adición de MeOH cada 24 horas. Condiciones de cultivo: 1 % MeOH, 0.5 mM CuSO₄ y 28 °C.

6.8 Purificación de la proteína recombinante

Después de 12 días de cultivo (Figura 6.11), se recuperó el sobrenadante para llevar a cabo la purificación de la enzima recombinante. En la Tabla 6.6 se presentan los resultados de cada uno de los pasos de purificación.

Tabla 6.6. Pasos de purificación de LcCg recombinante

Paso	Actividad total (U)	Concentración de proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	FP*
Sobrenadante	98	40.3	2.4	100	1
Ultrafiltración	93	13.0	7.2	95	3
DEAE	59	3.2	18.8	61	8
G75 Sephadex	44	0.6	71.0	45	29

*FP=Factor de Purificación

Se logró un factor de purificación de 29, con un rendimiento del 45 %. La proteína mostró un 90 % de pureza electroforética (Figura 6.12A). En el paso de purificación por cromatografía de intercambio aniónico la lacasa recombinante no interaccionó con la resina, eluyendo únicamente con amortiguador; debido a que esta enzima tiene un punto isoeléctrico teórico de 4.62 se esperaba que a pH 6 interaccionara con la resina pero no fue así; esto es posible explicarlo debido a que el sobrenadante se encuentra en un amortiguador con alta concentración de sales (100 mM de fosfatos) por lo que los iones de la sal puede también interactuar con la resina compitiendo con la proteína. Aunque no es un resultado esperado, es algo que beneficia el proceso de purificación ya que no es necesario utilizar otras sales (NaCl) para eluir la enzima y de esta manera se necesita un paso menos de purificación incrementando la actividad específica 2.6 veces.

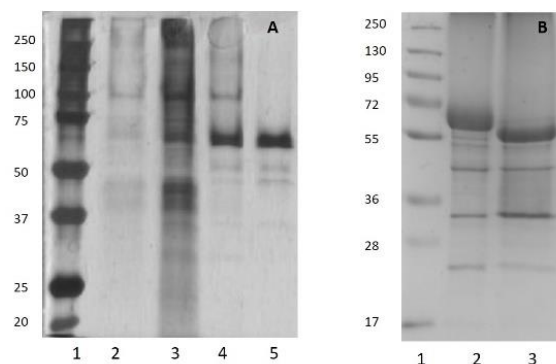


Figura 6.12. A) SDS-PAGE de las muestras obtenidas en cada paso de purificación. Tinción con plata. Línea: 1-marcador de masa molecular (kDa), 2-sobrenadante del cultivo, 3-ultrafiltración, 4-DEAE, 5-G75 sephadex. Se cargó 1 μg de proteína. B) Experimento de deglicosilación de la lacasa recombinante. Línea: 1-marcador de masa molecular (kDa), 2-lacasa recombinante, 3-lacasa tratada con PGNase F.

6.9 Caracterización cinética de LcCg recombinante

La lacasa recombinante mostró una masa molecular un poco más alta que la enzima nativa (63.7 vs 60.4 kDa); se sabe que *P. pastoris* no hiperglicosila a las proteínas que se expresan de manera heteróloga, por lo que no se esperaba una gran diferencia entre la masa molecular de la enzima nativa y la heteróloga. En la lacasa proveniente del hongo existen únicamente dos sitios de glicosilación que corresponden a las posiciones Asn 51 y 433. El tratamiento de la enzima recombinante con la glicosidasa (PGNase F) mostró una enzima con un peso molecular 8 kDa menor (55 kDa-Figura 6.12B) que corresponde a la masa molecular teórica de la enzima sin glicosilación (53 kDa). Esta pequeña diferencia no afectó las propiedades catalíticas de la enzima, como se muestra a continuación.

Tabla 6.7. Constantes cinéticas de LcCg (nativa y recombinante), usando siringaldazina como sustrato

Enzima	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Lacasa recombinante	106	9.6 ± 1.3	1.1×10^7
Lacasa nativa de <i>C. gallica</i> UAMH8260	165 ± 10	10 ± 1.8	1.7×10^7

En la Tabla 6.7 se muestran las constantes catalíticas determinadas tanto para la enzima nativa como para la recombinante, utilizando un sustrato estándar de las lacasas. El modelo de Michaelis-Menten fue adecuado para representar los datos experimentales, con una R^2

mayor a 0.9 en los dos casos. La eficiencia catalítica es muy similar para ambas enzimas por lo que concluimos que el comportamiento cinético es prácticamente el mismo y la glicosilación no afecta en propiedades.

6.10 De la teoría al experimento. Evaluación de las mutantes predichas por cálculos QM/MM

Una vez contando con el sistema de expresión heteróloga, se generaron las mutantes predichas por las herramientas computacionales para evaluarlas y así establecer la importancia de las posiciones F357, F413 y F475 en la estabilidad operacional de la lacasa de *C. gallica*. Las mutantes diseñadas a partir de los cálculos QM/MM y por el alineamiento múltiple de secuencia (F357L, F413A y F475I) fueron sintetizadas comercialmente por la compañía MUTAGENEX. Se expresaron, produjeron y purificaron las mutantes de igual manera que se hizo para LcCg. En la Tabla 6.8 se muestran las constantes catalíticas, obtenidas con siringaldazina, para cada una de las mutantes comparadas con la enzima recombinante LcCg. Las variantes F413A y F475I mostraron una eficiencia catalítica 1.4 y 2.6 veces mayor que la enzima recombinante, mientras que la variante F357L presenta una reducción del 46 % en la eficiencia catalítica.

Tabla 6.8. Constantes cinéticas para cada una de las variantes, usando siringaldazina como sustrato

Variante	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} M^{-1}$)
Lacasa recombinante	106.0	9.6±1.3	11.3 x10 ⁶
F357L	74.0	12.2±2.1	6.1 x10 ⁶
F413A	181.0±13.0	10.8±1.8	16.3 x10 ⁶
F475I	316.0±23.0	10.3±1.8	30.8 x10 ⁶

En la literatura existen reportes acerca de mutaciones en posiciones equivalentes a las estudiadas en este trabajo. Por ejemplo, se ha observado que la posición F357 (equivalente a la posición F337 en la lacasa TvL IIIb de *T. versicolor*) forma parte del sitio de interacción del sustrato con la enzima, y por consiguiente tiene un papel importante en la afinidad del sustrato. Algunos autores sugieren que puesto que este residuo forma parte de la segunda esfera de coordinación, ya que su reemplazo desestabiliza todo el sitio al eliminar interacciones tipo π con el grupo imidazol del residuo de histidina que coordina al CuT1 (H478) y la F463 (Yanagisawa et al. 2008). Se ha reportado que la variante F337A presenta

muy baja actividad, y su k_{cat}^{app} es 100 veces menor con respecto a la enzima nativa para la oxidación de 2,6-dimetoxifenol (Galli et al. 2011). En la Figura 6.13 se muestra esta región para la lacasa TvL IIIb (Bertrand et al. 2002) y la lacasa de *C. gallica*.

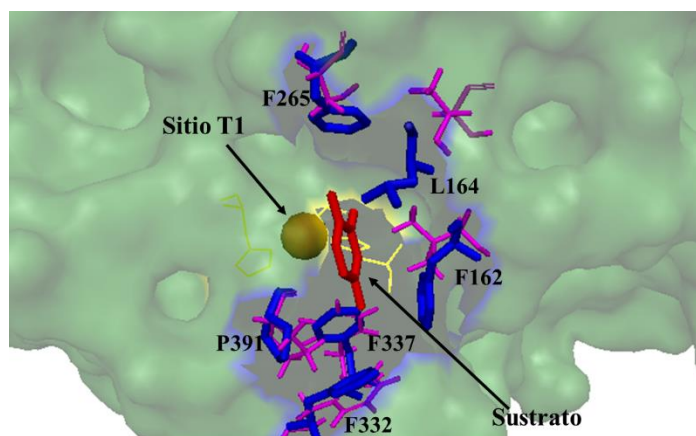


Figura 6.13. Sitio de unión a sustrato para la lacasa TvL IIIb (PDB ID: 1KYA – azul) superpuesta con la lacasa de *C. gallica* (PDB ID: 4A2E-magenta). Se presenta la numeración de los residuos para 1KYA. Representación de superficie expuesta al solvente.

Por otro lado, en un reporte reciente en el que se realizó evolución dirigida para la lacasa del basidiomiceto PM1, se encontró que la sustitución de F454 (posición F475 en la lacasa de *C. gallica*) por un residuo de serina produce una variante más activa que la enzima parental. La posición F454 se encuentra contigua a la H455 que coordina al CuT1 y la mutación F454S genera la formación de un nuevo enlace de hidrógeno con el carbonilo de la cadena lateral de la A161, los autores proponen que este nuevo enlace de hidrógeno podría incrementar la distancia del enlace de coordinación entre el nitrógeno de la H454 y el CuT1 alterando de esta manera el potencial del CuT1 a ser reducido (Maté et al. 2010). Por su parte, la posición F413 también forma parte del sitio de interacción con el sustrato y se encuentra expuesta al solvente; se ha reportado que su reemplazo por residuos más pequeños conlleva a un menor impedimento estérico y por lo tanto se favorece la interacción de sustratos grandes en el sitio T1 (Pardo et al. 2016). En la Figura 6.14 se muestra la posición de estos tres residuos dentro de la segunda esfera de coordinación del sitio T1.

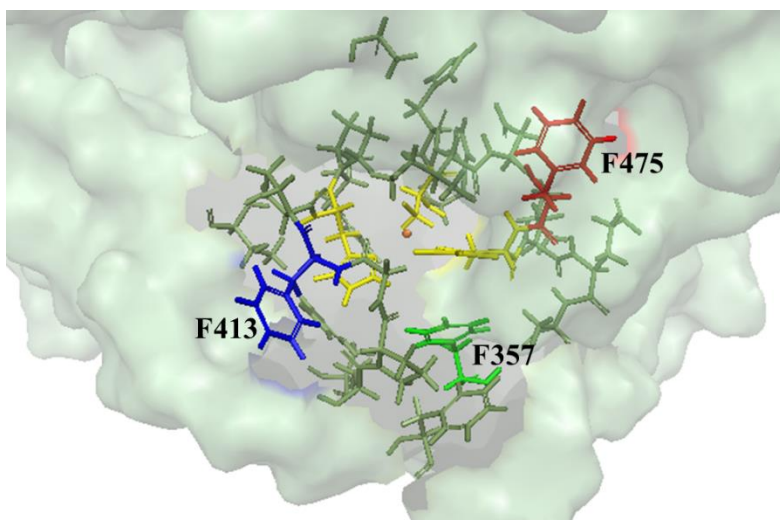


Figura 6.14. Residuos seleccionados para mutagénesis sitio-dirigida. En verde oscuro se representan los residuos de la segunda esfera de coordinación. Se resaltan las 3 Phe seleccionadas. En amarillo se resalta la primera esfera de coordinación del CuT1 y la proteína se representa como superficie expuesta al solvente.

6.11 Estabilidad operacional de las variantes durante la oxidación de fenoles

Para determinar si las variantes generadas en este trabajo presentan una mejora en la estabilidad operacional se realizaron determinaciones de conversión y actividad residual en reacciones de oxidación de 4-metoxifenol. En el laboratorio hemos observado que este fenol inactiva rápidamente a la enzima, posiblemente debido a la rápida conversión que se traduce en alta concentración de radicales libres (Ramírez 2014). Durante el tiempo de reacción se midieron tanto la actividad residual de la enzima como el consumo de sustrato, usando la misma concentración de proteína y las mismas unidades de actividad enzimática (medidas con siringladazina) para de esta manera establecer de una forma equitativa entre todas las variantes el consumo de 4-metoxifenol y la inactivación de la enzima. De acuerdo con los resultados obtenidos, y con base en la actividad residual, todas las variantes mostraron perder menos actividad que la enzima nativa en 30 minutos de reacción (Figura 6.15A), por lo que pudieran establecerse como más estables; sin embargo, al medir el consumo de sustrato observamos que las variantes F357L y F413A presentan velocidades de consumo similares a la enzima nativa, 0.051, 0.057 vs 0.063 mM min⁻¹, mientras que la velocidad de consumo de la variante F475I es 2.6 veces menor que la nativa, 0.024 mM min⁻¹ (Figura 6.15B). Ya que las velocidades de consumo no son iguales entre las variantes, y como la inactivación por

radicales libres depende de la concentración de sustrato consumido, es necesario comparar la actividad residual a una misma conversión.

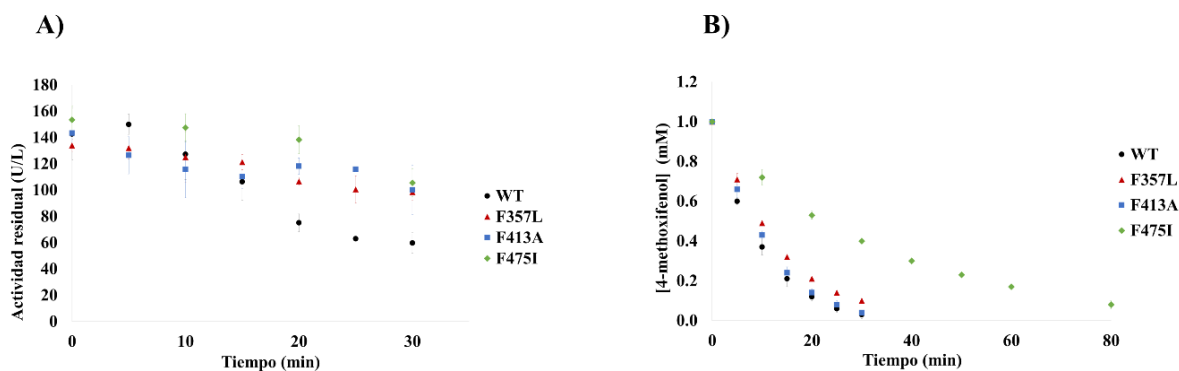


Figura 6.15. A) Actividad residual (unidades de siringaldazina) de las diferentes variantes durante la oxidación de 4-metoxifenol, B) consumo de metoxifenol de las diferentes variantes. Experimentos realizados por triplicado.

Para determinar si la estabilidad operacional de las variantes mejoró, se realizó una comparación con base en el rendimiento de la enzima durante la reacción. Este rendimiento fue calculado a partir de la concentración del sustrato consumido entre las unidades de enzima inactiva, expresado en $\mu\text{mol}/\text{U}$. La enzima inactiva se calculó como una diferencia de la actividad inicial y la actividad residual a una misma conversión de sustrato. El rendimiento ha sido reportado como un parámetro que permite determinar la estabilidad operacional de las enzimas (Rogers & Bommarius 2010). Generalmente se expresa con el número total de recambio (TTN, *Total Turnover Number* por sus siglas en inglés) que se define como la relación entre los moles de producto por moles de catalizador utilizado (sea un catalizador químico o biológico), y que ha sido utilizado en estudios de enzimas como la cloroperoxidasa (Seelbach et al. 1997; Ayala et al. 2012). Al trabajar con enzimas, con el fin de tomar en cuenta la inactivación durante el proceso catalítico, se ha propuesto un método para estimar el TTN relacionando las velocidades de conversión de sustrato y la velocidad de inactivación a partir de mediciones de actividad específica y tiempo de vida media de la enzima, medidos ambos bajo las mismas condiciones en un proceso isotérmico (Rogers & Bommarius 2010). Otra manera de estimar este rendimiento, es como una relación entre la concentración de producto y la concentración de enzima inactiva para un tiempo o una

conversión determinado, como se ha reportado para la enzima HRP (Kim et al. 2015). La estabilidad operacional, en este trabajo, se realizó a una conversión del 90 % para las variantes y para la enzima nativa, debido a que, como se mostró anteriormente poseen eficiencias catalíticas diferentes. Los resultados son los que se muestran en la Figura 6.16. Las variantes F357L y F413A presentan una estabilidad operacional mayor que la enzima nativa mientras que el comportamiento para la variante F475I no es significativamente diferente a la de la enzima nativa.

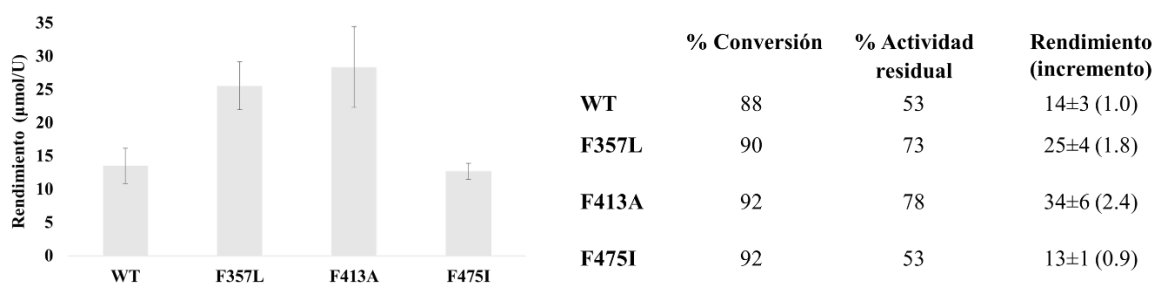


Figura 6.16. Estabilidad operacional de las variantes de la lacasa de *C. gallica*. El rendimiento corresponde a la relación del sustrato consumido entre la enzima inactiva en unidades de $\mu\text{mol}/\text{U}$. Se reporta el promedio de experimentos realizados por triplicado.

6.12 Factores que modulan la estabilidad y actividad de la lacasa

Algunos de los factores moleculares que modulan el potencial redox de las lacasas son bien conocidos y han sido reportados (Cambria et al. 2012). Tales factores comprenden interacciones en la primera y segunda esfera de coordinación del sitio T1 como: la naturaleza química del ligante axial del CuT1, enlaces de hidrógeno que pudieran modificar la distancia de los ligantes al CuT1, así como el ambiente hidrofóbico y las interacciones electrostáticas en la segunda esfera de coordinación. Aunque estos factores moleculares intervienen en la eficiencia catalítica de las lacasas, no hay estudios de aquellos que tengan un efecto en la estabilidad operacional de estas enzimas. Este es un campo de estudio muy importante ya que, al ser enzimas con uso potencial en la industria, es necesario conocer su productividad durante el proceso catalítico. En este trabajo, a través de simulaciones moleculares de estados activados (± 1 electrón) del sitio activo de una lacasa fúngica, logramos identificar varios residuos susceptibles a oxidarse, entre los que se encontraron residuos de fenilalanina que han sido descritos como relevantes para la interacción con el sustrato. Al reemplazar estos

residuos observamos un efecto positivo sobre la estabilidad operacional, lo que permite concluir que la presencia de estos residuos genera sitios débiles desde el punto de vista del rendimiento sustrato/enzima.

6.12.1 Flexibilidad de la primera y segunda esfera de coordinación del CuT1 en la lacasa de *C. gallica*

Ya que la distribución electrónica en las proteínas depende de su conformación (Vidal-Limón et al. 2013; Monza et al. 2015; Pardo et al. 2016; Acebes et al. 2017), se realizaron dinámicas moleculares con el fin de encontrar diferentes conformaciones que nos pudiesen ayudar a identificar residuos susceptibles a oxidarse. Sin embargo, además de poder contar con diferentes estructuras de la lacasa de *C. gallica*, las simulaciones de dinámica molecular nos arrojaron información interesante acerca del movimiento de los residuos cercanos al CuT1. La primera esfera de coordinación de los sitios de cobre mostró ser rígida; es decir, no se observaron fluctuaciones importantes en los átomos que coordinan a los cobres. Esto se explica de acuerdo con las evidencias experimentales ya que se sabe que para el sitio T1 la energía de reorganización (que es aquella energía que interviene en los cambios estructurales en un sitio redox durante la transferencia de electrones) es muy baja debido a la rigidez estructural en este sitio (Ryde et al. 2000; Ryde & Olsson 2001), tal como se observa en las dinámicas moleculares (ver Figuras 6.1 y 6.3). Cuando el átomo de cobre cambia de estado de oxidación la geometría del CuT1 no presenta cambios importantes en ángulos o distancias. Este efecto ha sido propuesto para las proteínas que contienen el CuT1 como un estado entático (Holm et al. 1996), en el que la estructura de la proteína confiere una geometría inusual en el sitio de coordinación del metal que provoca que éste sea más reactivo. Sin embargo; a través de metodologías teóricas se ha planteado que el estado entático no es el que confiere esta rigidez al sitio T1 (Ryde et al. 1996; Ryde et al. 2000; Ryde & Olsson 2001), lo que contrasta con lo encontrado experimentalmente por cristalografía de rayos X en donde se ha visto que el sitio T1 de las formas apo y holo de las proteínas de cobre presentan la misma geometría, lo que apoya la teoría de que existe un estado entático (Baker et al. 1991; Nar et al. 1992; Durley et al. 1993). Aunque este tema es controversial, sería interesante estudiar a partir de cálculos de dinámica molecular este fenómeno.

Por otro lado, globalmente la segunda esfera de coordinación (que para este trabajo se definió como todos los residuos a una distancia de 8 Å del CuT1) tiene una flexibilidad mayor con fluctuaciones alrededor de 1.5 Å (RMSD de todos los átomos excluyendo los de hidrógeno) observando movimientos grandes de algunos aminoácidos en específico. Como se mostró anteriormente (ver Figura 6.4), la cadena principal del residuo P414 presenta un acercamiento del oxígeno del carbonilo al CuT1 a una distancia tal que podría actuar como un cuarto ligando. Aunque este acercamiento únicamente se presenta en 2 de alrededor de 20,000 conformaciones analizadas, es interesante dicho comportamiento ya que la densidad electrónica aportada por el oxígeno hacia el CuT1 podría hacer al metal menos susceptible a reducirse y de esta manera modular el proceso catalítico de la enzima. Cabe resaltar que dicha posición se encuentra altamente conservada en lacasas fúngicas no siendo así para las oxidasas multicobre de plantas, las cuales presentan en esta posición residuos polares como serina y treonina. Se ha reportado que el reemplazo de este residuo por una histidina mejora la actividad catalítica de la enzima para dos lacasas (PM1 y *Pycnoporus cinnabarinus*) tal vez debido a la introducción de un nuevo enlace de hidrógeno en la segunda esfera de coordinación (Maté et al. 2010; Camarero et al. 2012). Este nuevo enlace de hidrógeno podría causar un aumento en la distancia del CuT1 hacia uno de los nitrógenos que lo coordinan aumentando la eficiencia catalítica.

En cuanto al movimiento de las cadenas laterales se encontró que existen al menos seis residuos en la cavidad del sitio T1 (F350, F352, F413, F475, E478 y A479) que presentan las mayores fluctuaciones en el RMSD (de todos los átomos excluyendo únicamente los de hidrógeno), entre 2 y 4 Å (Apéndice, Figura A1). De estos residuos los que mostraron movimientos grandes en las cadenas laterales corresponden a: F352, F413, F417 y F475, con desviaciones máximas entre 3.7-5.7 Å respecto a la estructura cristalográfica (Figura 6.17A). De estos cuatro residuos, F352, F413 y F475 forman parte de la cavidad del sitio T1, mientras que F417 se encuentra inmersa en la proteína a una distancia aproximada de 7 Å del CuT1 (Figura 6.17B).

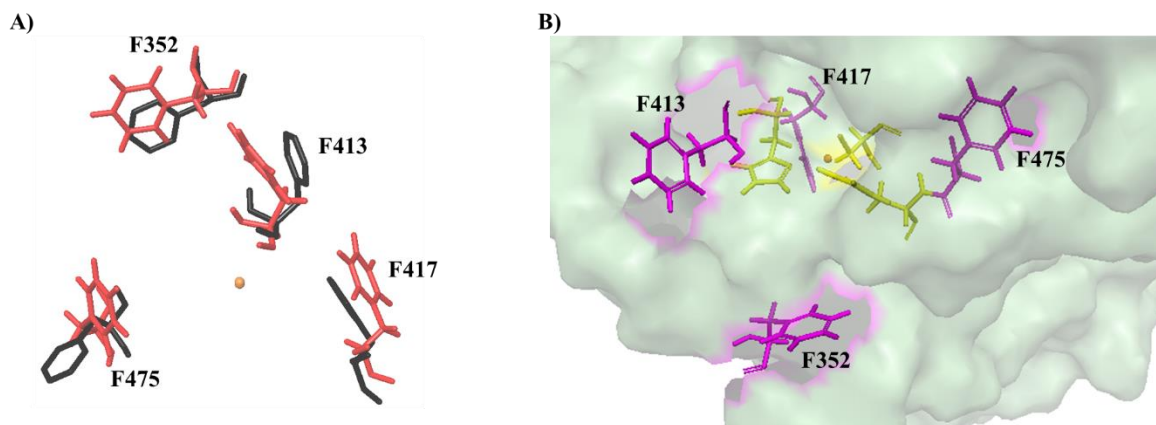


Figura 6.17. A) Movimiento de las cadenas laterales de los residuos F352, F413, F417 y F475, basados en las simulaciones de dinámica molecular de 100 ns. Representación en negro corresponde a la estructura cristalográfica (4A2E), B) representación de estas Phe en la cavidad del CuT1. Se presenta la superficie expuesta al solvente.

Los residuos F352 y F413 se encuentran expuestos al solvente en la cavidad del sitio T1 (Figura 6.17B). Se ha reportado la importancia de F352 como uno de los aminoácidos que delimitan la topología del sitio de unión al sustrato (Bertrand et al. 2002; Galli et al. 2011) mientras que F413 se sabe que es un aminoácido importante que modula la especificidad del tamaño de los sustratos (Pardo et al. 2016). La posición F352 se encuentra altamente conservada en lacasas de hongos lo que señala su importancia en la unión a sustratos. Mientras que la posición F413 es variable en hongos siendo los residuos Ala, Gly, Ser y Phe los que pueden ocuparla, lo que podría modular el tamaño de los sustratos a oxidar por diferentes lacasas.

El aminoácido en el que se observó el mayor movimiento de la cadena lateral, después de 60 ns (Apéndice, Figura A1), fue la F475 que no se encuentra expuesta al solvente (Figura 6.18A) y está alejada del CuT1, pero presenta un movimiento del anillo aromático que provoca un acercamiento al CuT1 exponiéndose al solvente (Figura 6.18B). La dinámica mostrada por esta Phe es muy interesante ya que, aunque las conformaciones en las que la cadena lateral permanece cerca del CuT1 son pocas (ver Figura 6.5C), esta conformación podría ser importante durante la transferencia de electrones. El anillo aromático al encontrarse cerca del CuT1 y al ser capaz de deslocalizar una carga podría contribuir a que

el átomo de cobre sea menos susceptible a reducirse y de esta manera modular la transferencia de electrones del sustrato a la enzima.

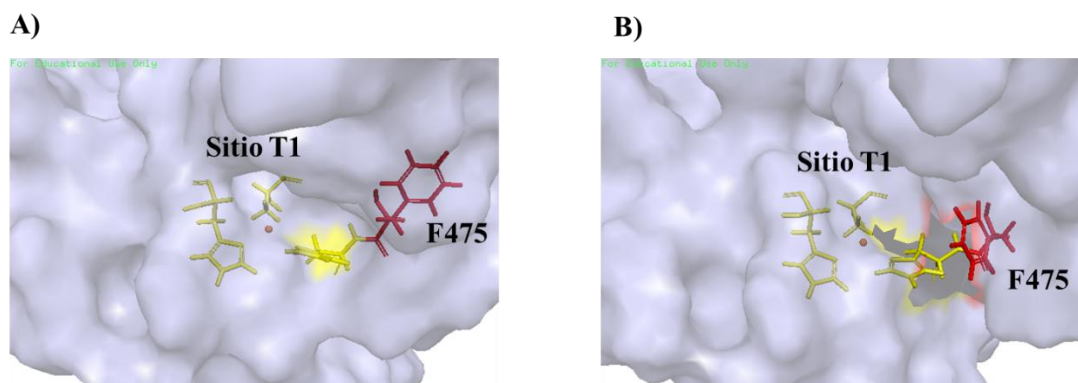


Figura 6.18. A) Posición de la F475 dentro de la proteína a una distancia de 11 Å del CuT1, B) acercamiento a una distancia de 7 Å del CuT1 y exposición al solvente de la F475. Representación de superficie expuesta al solvente.

Se ha reportado que el cambio de esta posición (equivalente a la F454 de la lacasa del basidiomiceto PM1) por un residuo polar, serina, genera una variante más activa, lo cual se atribuye a la generación de nuevos enlaces de hidrógeno en la segunda esfera de coordinación (Maté et al. 2010). Una variante obtenida por evolución dirigida de esta misma lacasa, se sometió a mutagénesis a saturación en esta posición encontrando que la variante F454E también genera una enzima más activa (Mate et al. 2013), proponiendo este efecto a la formación de un nuevo enlace de hidrógeno con una histidina que coordina al CuT1. Debido a la dinámica mostrada por la F475 y a su importancia en la actividad, es interesante su estudio a través de dinámicas moleculares para establecer si el movimiento de este residuo se encuentra correlacionado con el movimiento de otras regiones de la enzima que pudiesen dar información acerca de su papel en el proceso catalítico. Cabe resaltar que esta posición se encuentra conservada en hongos con la presencia de residuos aromáticos como Phe y Trp, lo que pone de manifiesto la importancia de la aromaticidad en esta posición, en contraste con las lacasas de plantas en las que la posición 475 es variable con residuos como: valina, isoleucina y leucina.

Por último, aunque no se encuentra en la cavidad del CuT1, la F417 también mostró movimientos importantes de la cadena lateral. Este residuo se encuentra altamente

conservado en lacasas de hongos; sin embargo, se ha reportado que la mutación F417I (posición 396, equivalente para la lacasa del basidiomiceto PM1) provoca un aumento de 157 veces en la actividad (Mate et al. 2013). Por lo que, a pesar de estar altamente conservada en hongos, esta Phe tiene una influencia en la eficiencia catalítica de la enzima por lo que sería interesante estudiar los movimientos de su cadena lateral y cómo podrían estar relacionados con el proceso catalítico de la enzima ya que este residuo se encuentra conectando los sitios T1 y T2/3 en conjunto con el residuo P416 (Figura 6.19).

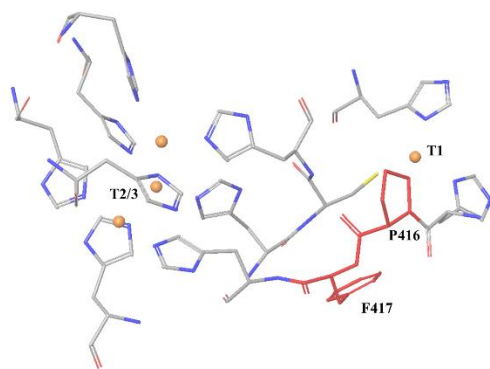


Figura 6.19. Primera esfera de coordinación de los sitios T1 y T2/3. En rojo se presentan los residuos que conectan el estos sitios.

6.12.2 Flexibilidad de los dominios estructurales de la lacasa de *C. gallica*

La lacasa de *C. gallica* está formada por tres dominios estructurales. Analizando el movimiento de estos dominios, con base en el RMSD (de todos los átomos excluyendo los de hidrógeno), se observa que el dominio 2 presenta fluctuaciones a partir de 60 ns, mientras que los dominios 1 y 3 no muestran oscilaciones en el RMSD (Figura 6.20). Se ha reportado que para otra lacasa (*Thermus thermophilus*) el dominio 2, al igual que para la de *C. gallica* en este trabajo, presenta las mayores fluctuaciones de los 3 dominios (Bello et al. 2012). Asimismo, el movimiento en el dominio 2 se observa en los mismos tiempos en los que los residuos F413 y F475 muestran fluctuaciones (ver ángulos diedros, Apéndice Figura A2).

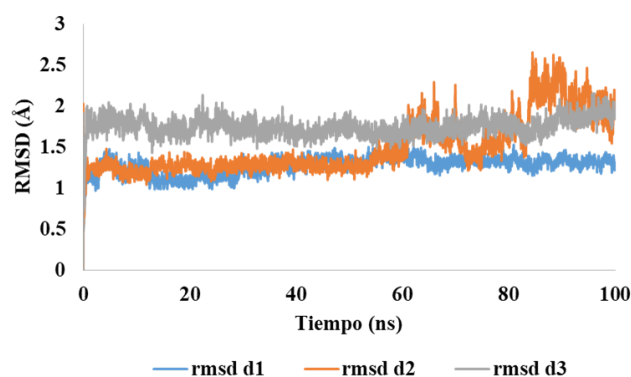


Figura 6.20. RMSD (Å), de todos los átomos excluyendo los de hidrógeno, por dominios de la lacasa de *C. gallica*.

En el dominio 2 no se encuentran ninguno de los sitios de cobre y el único residuo de la segunda esfera de coordinación que se localiza aquí corresponde a A260. Analizando el movimiento del dominio 2, se encontró que el *loop* formado por los residuos 173-187 (que se encuentra adyacente a la cavidad del CuT1) es el que contribuye más a las oscilaciones en este dominio (Figura 6.21) por lo que resulta interesante realizar estudios de correlación del movimiento de los residuos de la segunda esfera de coordinación con los del dominio 2. Se ha reportado que para la lacasa de *Thermus thermophilus* existe un *loop*, perteneciente al dominio 2 y también cercano de la cavidad del CuT1 que, debido al movimiento mostrado durante simulaciones de dinámica molecular, se propone está relacionado con la modulación durante la oxidación del sustrato a partir de dos conformaciones de la enzima: cerrada y abierta (Bello et al. 2012). La lacasa de *C. gallica* no presenta este *loop*; sin embargo, el *loop* que mostró movimientos importantes también se encuentra en la misma región y podría tener relevancia en la modulación del proceso catalítico. Como se observa en la Figura 6.20, la dinámica para el dominio 2 no llega al equilibrio durante 100 ns, por lo tanto se propone llevar a cabo una simulación más larga para poder realizar los estudios de correlación.

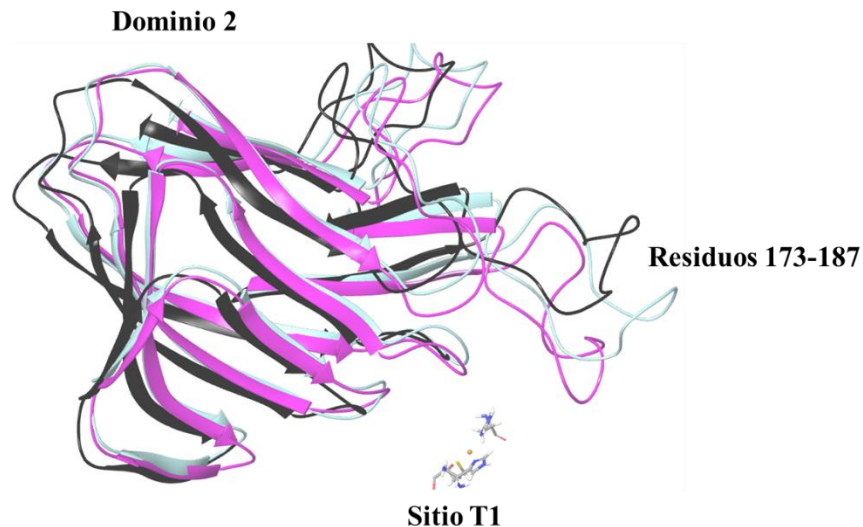


Figura 6.21. Movimiento del *loop* (173-187) para tres conformaciones de las simulaciones de dinámica molecular (20, 61 y 84 ns).

6.12.3 Influencia del tamaño de la región QM en los cálculos de densidad de espín

Para realizar los cálculos de estructura electrónica de las diferentes conformaciones de la lacasa de *C. gallica* fue necesario, como se explicó anteriormente, realizar un estudio del tamaño de la región QM a modelar. Este es un paso importante ya que, como se sabe, los cálculos híbridos QM/MM pueden presentar deficiencias en el cálculo en las fronteras (Reuter et al. 2000). Es cierto que, la zona cuántica deseada comprendería toda la proteína; sin embargo, computacionalmente no es asequible realizar un cálculo cuántico de miles de átomos.

Para modelar los estados activados ($\pm 1e^-$) se comenzó con una zona cuántica que incluía la mayoría de los residuos de la cavidad del sitio T1, además de la primera esfera de coordinación del CuT1 y que abarcó un total de 331 átomos. Posteriormente se aumentó la región tomando en cuenta los residuos de la segunda esfera de coordinación (excluyendo únicamente los residuos A260 y T448 que son los más externos y su inclusión requería un aumento considerable en la zona QM), esta región comprendió un total de 472 átomos. Como se explicó anteriormente, se observó diferencia en la distribución de la densidad de espín entre estos dos sistemas. Ya que el segundo sistema incluye los residuos de la segunda esfera de coordinación y no solamente los de la cavidad del sitio T1, la distribución de la densidad

podría ser modelada de mejor manera debido a las interacciones de los residuos de la segunda esfera de coordinación. Por último, se modeló un sistema en el que se aumentaron dos aminoácidos más en la región QM, ya que se observó que una gran parte de la densidad de espín se alojó en la cadena lateral del residuo M348 (que se encontraba en la frontera) y era necesario descartar un artefacto del cálculo. Esta nueva región comprendió un total de 515 átomos y no se observó diferencia en la distribución de la densidad de espín respecto a la región con 472 átomos, quizás debido a que en ambas regiones se tomaron en cuenta los residuos de la segunda esfera de coordinación.

6.12.4 Los aminoácidos de la segunda esfera de coordinación del CuT1 que alojan densidad de espín son importantes para la estabilidad operacional y la actividad de la lacasa de *C. gallica*

Ya que se contaba con el sistema a modelar, se realizaron los cálculos de estructura electrónica de las diferentes conformaciones seleccionadas de las simulaciones de dinámica molecular. Se encontraron varios residuos que alojaron densidad de espín en la cadena lateral como: M348, F352, F357, F413, F475 y E478. El rol de las fenilalaninas en la cavidad del sitio T1 ha sido estudiado para otras lacasas; sin embargo, estos estudios se encuentran mayormente enfocados en la especificidad de los sustratos y no hay estudios acerca del papel de estas fenilalaninas u otros residuos en la estabilidad operacional. Variantes de la lacasa de *T. versicolor*, obtenidas por mutagénesis sitio-dirigida (Galli et al. 2011), muestran que en la variante F162A el impedimento estérico enzima-sustrato es menor, lo cual favorece la oxidación de compuestos aromáticos de gran tamaño. La posición F265 tiene un papel importante en la interacción de la enzima con sustratos fenólicos y no fenólicos ya que la variante F265A muestra un aumento en la K_m de la enzima de 2 veces haciéndola menos eficiente. Estas posiciones no se encuentran conservadas entre las lacasas de hongos, teniendo la lacasa de *C. gallica* en las posiciones equivalentes una valina (F162) y una serina (F265).

Por otro lado, la posición F475 en lacasas fúngicas se encuentra conservada con residuos aromáticos (Figura 6.6). Por experimentos de evolución dirigida en la lacasa del basidiomiceto PM1 se observó que una mutación generada en esta posición por una serina genera un aumento en la actividad pero un decremento en la termoestabilidad (Maté et al.

2010). Así mismo, a partir de mutagénesis a saturación se encontró que el cambio de esta fenilalanina en la lacasa del basidiomiceto PM1 por un residuo ácido (Glu) genera una variante más activa (Mate et al. 2013). En ambos estudios, los investigadores proponen que el aumento de la actividad se debe a la formación de un nuevo enlace de hidrógeno que provoca que un ligante del CuT1 se aleje de éste; sin embargo, el potencial redox de estas variantes no se estimó para poder comprobar esta hipótesis. Aunque existe una influencia de este residuo en la eficiencia catalítica de la enzima, no existen reportes acerca de su papel en la estabilidad operacional. En nuestro estudio encontramos que la mutante F475I es más eficiente oxidando siringaldazina, aunque este aumento en la eficiencia catalítica no puede ser descrito en relación a la formación de nuevos enlaces de hidrógeno. Una posible explicación podría basarse en la deslocalización de la carga en el anillo aromático de la fenilalanina que al reemplazarla por un residuo no polar ocasiona que se rompa con la deslocalización electrónica cerca del CuT1, lo que podría provocar que el cobre sea más susceptible a reducirse. Para comprobar dicha hipótesis es necesario medir el potencial redox de esta variante. Por otro lado, durante la oxidación de 4-metoxifenol la velocidad de conversión decae y la estabilidad operacional no cambia respecto a la enzima nativa.

En lo que respecta a la posición F357 se ha establecido que este residuo en conjunto con la F481 (que se encuentran en la segunda esfera de coordinación del CuT1) forman interacciones π con la cadena lateral de la His476 que coordina al CuT1 (Yanagisawa et al. 2008) y que dicha His puede interactuar con el sustrato al tener cierta exposición al solvente (Jeuken et al. 2000; Bertrand et al. 2002; Quintanar et al. 2007). La posición F481 corresponde a la posición axial del CuT1 y los resultados de estructura electrónica muestran deslocalización de densidad de espín en el anillo de esta fenilalanina en algunas conformaciones; sin embargo, se sabe que este residuo está relacionado con el potencial redox de la enzima más que con algún aspecto de estabilidad operacional. Por otra parte, la posición F357 (que mostró densidad de espín en el sistema en el que se agregó un electrón, Tabla 6.3) ha mostrado tener influencia en la especificidad en el tamaño del sustrato para la lacasa TvL IIIb (posición equivalente F337). Se ha reportado que la variante F337A pierde la capacidad de oxidar 2,6-DMP sin perder la capacidad de oxidar ABTS (Galli et al. 2011). En nuestro caso, la variante en la posición equivalente F357L es menos eficiente al oxidar

siringaldazina pero muestra la misma capacidad oxidante frente a 4-metoxifenol. Aunque al reemplazar la posición F357 por una leucina se rompen las interacciones π con la His476, el ambiente hidrofóbico se mantiene lo que podría significar una menor desestabilización de la segunda esfera de coordinación, tal que la capacidad de oxidar el 4-metoxifenol se mantuviera. Además de oxidar este fenol a la misma velocidad que la enzima nativa, la velocidad de inactivación de la variante F357L es menor confiriendo a la enzima una mayor estabilidad operacional, lo que sugiere que F357 es una posición susceptible a la oxidación como lo determinó el modelo computacional.

La posición F413 (que se encuentra expuesta al solvente) también presenta una estabilidad operacional mayor que la enzima nativa y una misma velocidad de conversión de 4-metoxifenol y siringaldazina. En cuanto a lo reportado en la literatura, a partir de mutaciones sitio-dirigidas se determinó que la fenilalanina en esta posición puede introducir impedimento estérico durante la oxidación de compuestos de gran tamaño (Pardo et al. 2016); sin embargo, en este trabajo no se realizaron pruebas con sustratos que pudiesen recrear este escenario ya que no era el objetivo del mismo, pero se logró generar una mutante más estable operacionalmente lo que sugiere también a la F413 como una posición susceptible a oxidarse. En los cálculos de estructura electrónica, la posición F413 únicamente alojó densidad de espín en dos conformaciones del sistema en el que se agregó un electrón (Tabla 6.3). Considerando que esta variante generada es más estable (2.4 veces) que la enzima nativa se muestra la importancia de realizar un análisis conformacional antes de realizar los cálculos QM/MM ya que cada conformación de la enzima nos puede proporcionar información diferente del sistema que puede ser crucial para el estudio a realizar.

Por último, existen otros residuos que también alojaron densidad de espín y que, aunque en este trabajo no fueron explorados, no se descarta su estudio posterior. La posición F352 mostró poca densidad de espín en tres conformaciones del sistema más un electrón. Este aminoácido forma parte de los residuos que delimitan el sitio de unión a sustrato (ver Figura 6.13) y a través de mutaciones sitio-dirigidas se observó que la variante F332A (en la lacasa TvL IIIb) no tiene influencia en la especificidad del tamaño de los sustratos (Galli et al. 2011). Cabe resaltar que esta posición se encuentra altamente conservada en hongos; sin

embargo, también pueden presentarse residuos como: valina, leucina e isoleucina, por lo que al ser un residuo expuesto al solvente en la cavidad del sitio T1 también resulta interesante su estudio en términos de estabilidad operacional.

En cuanto a los residuos no aromáticos que presentaron densidad de espín tenemos a M348 y E478. El residuo M348 presentó densidad de espín en seis conformaciones del sistema menos un electrón. Este residuo no se encuentra en la cavidad del sitio T1, ni en la segunda esfera de coordinación del CuT1 por lo que no fue considerado como candidato en este trabajo. Pero, ya que son varias las conformaciones en las que este residuo deslocaliza densidad de espín en la cadena y descartando que fuera un artefacto del cálculo, es interesante su estudio en la estabilidad operacional, ya que es un residuo con bajo potencial redox y por tanto, susceptible a la oxidación (Sanaullah et al. 1994; Brunelle & Rauk 2004). En la lacasa de *C. gallica* este residuo se localiza a una distancia de 13.9 Å del CuT1 y no está expuesto al solvente (ver Figura 6.6B). Es un residuo que no se encuentra conservado en las lacasas de hongos, siendo el más común la leucina, seguido de metionina y fenilalanina. Ya que es una posición variable, podría ser modificada para estudiar su papel tanto en la eficiencia catalítica como en la estabilidad operacional de la enzima. Como se mencionó antes, la posición E478 también alojó densidad de espín en la cadena lateral de seis conformaciones del sistema menos un electrón. La densidad alojada en este residuo no es fácil de explicar ya que los residuos ácidos no presentan propiedades redox; es decir, no son residuos oxidables. Esta posición se encuentra conservada en lacasas de hongos con residuos ácidos y se encuentra a una distancia de 10 Å del CuT1 y expuesta al solvente, cerca del D474 que se sabe participa como donador de protones en el proceso catalítico (Jones & Solomon 2015). Sin embargo, en otras enzimas, se ha sugerido que los carboxilatos pueden tener un rol en el transporte de electrones. En particular, en las hemo-proteínas se ha calculado que los grupos carboxilatos de la porfirina pueden deslocalizar la carga durante el transporte de electrones desde el sustrato hacia el sitio activo de la enzima (Guallar et al. 2003; Guallar & Olsen 2006). Por tanto, sería interesante estudiar este residuo desde otra perspectiva, no tanto como un residuo que podría conferir estabilidad operacional tal y como se ha definido en este trabajo, sino como un factor que pudiera influir sobre la capacidad de transporte de electrones en el ciclo catalítico de esta enzima.

7 Conclusiones

- Las simulaciones de dinámica molecular mostraron que la primera esfera de coordinación de los sitios T1 y T2/3 es rígida. Por otro lado, la segunda esfera de coordinación presenta flexibilidad con movimientos importantes tal como la cadena lateral de la Phe475 que oscila en la cavidad del sitio T1 exponiéndose al solvente y acercándose al cobre.
- Los cálculos de estructura electrónica (QM/MM) reflejaron la importancia de realizar un muestreo conformacional previo. La distribución de la densidad de espín, en la segunda esfera de coordinación, tuvo dependencia con la conformación y el sistema modelado (agregar/sustraer un electrón). Así mismo, la selección de la zona QM fue crucial, pues fue necesario explorar diferentes tamaños de regiones con el fin de reducir los artefactos.
- La densidad de espín deslocalizada en los residuos de la cavidad del sitio T1 nos arrojó información acerca de los residuos, teóricamente, susceptibles a oxidarse. Esta deslocalización electrónica se alojó principalmente en los anillos aromáticos de fenilalaninas (357, 413 y 475), aunque también existen aminoácidos diferentes a éstos como Met348 y E478, que pudiesen ser blanco de oxidación.
- Para poder comprobar experimentalmente que los residuos predichos por los cálculos QM/MM favorecen la inactivación de la enzima, se estableció un sistema de expresión para la lacasa de *C. gallica*. El sistema diseñado con el factor α de *S. cerevisiae* modificado por evolución dirigida fue utilizado con éxito en la producción heteróloga de la lacasa de *C. gallica* y sus variantes.
- Los residuos oxidables predichos por los cálculos QM/MM (Phe) se reemplazaron por otros menos oxidables (Ala, Leu, Ile) obteniendo variantes con una mejor estabilidad operacional durante la oxidación de 4-metoxifenol.
- De los sistemas simulados, aquel con un electrón adicional modeló mejor la susceptibilidad de los residuos a ser oxidados ya que las variantes mostraron tener una estabilidad operacional hasta dos veces mayor que la enzima nativa. Esto sugiere que las posiciones F357 y F413 son sitios susceptibles a oxidación por los radicales libres generados. Con los cálculos realizados también es posible establecer residuos importantes para la transferencia de electrones, como la posición F475 (predicha en el sistema “menos un electrón”) que al ser reemplazada por Ile mostró mayor actividad frente a siringaldazina pero no una mejor estabilidad operacional durante la oxidación de 4-metoxifenol.

8 Perspectivas

- Durante la dinámica molecular, fue posible observar un acercamiento de la prolina al átomo de cobre T1. Este residuo se encuentra conservado en las lacasas fúngicas y no se ha descrito que tenga ningún rol en la actividad de la enzima, por lo que es un blanco a estudiar en cuanto a su papel en la modulación del potencial redox de la enzima
- Generar una doble mutante F357L/F413A para determinar si el efecto positivo sobre la estabilidad operacional de la enzima respecto a las mutantes simples se potencia.
- Explorar variantes de las posiciones M348 y E478, residuos que alojan densidad de espín a partir de los cálculos QM/MM, para determinar su importancia en la estabilidad operacional y la actividad de la lacasa de *C. gallica*.

9 Referencias

- Acebes S, Ruiz-Dueñas FJ, Toubes M, Sáez-Jiménez V, Pérez-Boada M, Lucas MF, Martínez AT, Guallar V (2017) Mapping the Long-Range Electron Transfer Route in Ligninolytic Peroxidases. *The Journal of Physical Chemistry B* 121(16):3946-3954 doi:10.1021/acs.jpcc.7b00835
- Aitken MD, Heck PE (1998) Turnover Capacity of *Coprinus cinereus* Peroxidase for Phenol and Monosubstituted Phenols. *Biotechnology Progress* 14(3):487-492 doi:10.1021/bp980034z
- Arana-Cuenca A, Téllez-Jurado A, Yagüe S, Fermián E, Carbajo JM, Domínguez A, González T, Villar JC, González AE (2010) Deslignificación de pasta kraft de *Pinus radiata* con una levadura genéticamente modificada para producir lacasa. *Forest Systems* 19(2):234-240
- Arrocha AA, Cano-Castillo U, Aguila SA, Vazquez-Duhalt R (2014) Enzyme orientation for direct electron transfer in an enzymatic fuel cell with alcohol oxidase and laccase electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* 61:569-574 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.009>
- Ayala M, Hernandez-Lopez EL, Perezgasga L, Vazquez-Duhalt R (2012) Reduced coke formation and aromaticity due to chloroperoxidase-catalyzed transformation of asphaltenes from Maya crude oil. *Fuel* 92(1):245-249 doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.06.067>
- Baker D (2010) An exciting but challenging road ahead for computational enzyme design. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 19(10):1817-1819 doi:10.1002/pro.481
- Baker EN, Anderson BF, Blackwell KE, Kingston RL, Norris GE, Shepard WEB (1991) The relative rigidity of the type 1 copper site in azurin, as seen in high resolution X-ray analyses of various forms of the protein. *Journal of Inorganic Biochemistry* 43(2):162 doi:[https://doi.org/10.1016/0162-0134\(91\)84154-2](https://doi.org/10.1016/0162-0134(91)84154-2)
- Banks JL, Beard HS, Cao Y, Cho AE, Damm W, Farid R, Felts AK, Halgren TA, Mainz DT, Maple JR, Murphy R, Philipp DM, Repasky MP, Zhang LY, Berne BJ, Friesner RA, Gallicchio E, Levy RM (2005) Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). *Journal of Computational Chemistry* 26(16):1752-1780 doi:10.1002/jcc.20292
- Baynton KJ, Bewtra JK, Biswas N, Taylor KE (1994) Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1206(2):272-278 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90218-6](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838(94)90218-6)
- Becke AD (1988) Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A* 38(6):3098-3100
- Bello M, Valderrama B, Serrano-Posada H, Rudiño-Piñera E (2012) Molecular Dynamics of a Thermostable Multicopper Oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: Structural Differences between the Apo and Holo Forms. *PLOS ONE* 7(7):e40700 doi:10.1371/journal.pone.0040700
- Berendsen HJC, Postma JPMv, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of chemical physics* 81(8):3684-3690
- Bertrand T, Jolival C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Madzak C, Mougin C (2002) Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics. *Biochemistry* 41(23):7325-7333 doi:10.1021/bi0201318
- Bressler DC, Fedorak PM, Pickard MA (2000) Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Corioliopsis gallica*. *Biotechnology Letters* 22(14):1119-1125 doi:10.1023/A:1005633212866
- Brunelle P, Rauk A (2004) One-Electron Oxidation of Methionine in Peptide Environments: The Effect of Three-Electron Bonding on the Reduction Potential of the Radical Cation. *The Journal of Physical Chemistry A* 108(50):11032-11041 doi:10.1021/jp046626j

- Brunschwig BS, Sutin N (1999) Energy surfaces, reorganization energies, and coupling elements in electron transfer. *Coordination Chemistry Reviews* 187(1):233-254 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545\(98\)00255-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545(98)00255-0)
- Buchanan ID, Nicell JA (1997) Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. *Biotechnology and Bioengineering* 54(3):251-261 doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19970505)54:3<251::AID-BIT6>3.0.CO;2-E
- Calvo AM, Copa-Patiño JL, Alonso O, González AE (1998) Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Corioloropsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Archives of Microbiology* 171(1):31-36 doi:10.1007/s002030050674
- Camarero S, Pardo I, Cañas AI, Molina P, Record E, Martínez AT, Martínez MJ, Alcalde M (2012) Engineering Platforms for Directed Evolution of Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 78(5):1370-1384 doi:10.1128/AEM.07530-11
- Cambria MT, Gullotto D, Garavaglia S, Cambria A (2012) In silico study of structural determinants modulating the redox potential of *Rigidoporus lignosus* and other fungal laccases. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 30(1):89-101 doi:10.1080/07391102.2012.674275
- Cassland P, Jönsson L (1999) Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Applied microbiology and biotechnology* 52(3):393-400
- Colao MC, Lupino S, Garzillo AM, Buonocore V, Ruzzi M (2006) Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microbial Cell Factories* 5(1):31 doi:10.1186/1475-2859-5-31
- Collins PJ, Dobson A (1997) Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(9):3444-3450
- Damborsky J, Brezovsky J (2014) Computational tools for designing and engineering enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* 19:8-16 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.12.003>
- De la Mora E, Lovett JE, Blanford CF, Garman EF, Valderrama B, Rudino-Pinera E (2012) Structural changes caused by radiation-induced reduction and radiolysis: the effect of X-ray absorbed dose in a fungal multicopper oxidase. *Acta Crystallographica Section D* 68(5):564-577 doi:10.1107/S0907444912005343
- Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, Ostergaard P, Schneider P, Svendsen A, Davies GJ (2001) Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different 'type 2 Cu-depleted' isoforms. *Acta Crystallographica Section D* 57(2):333-336 doi:10.1107/S0907444900013779
- Durley R, Chen L, Scott Mathews F, Lim LW, Davidson VL (1993) Crystal structure analysis of amicyanin and apoamicyanin from *paracoccus denitrificans* at 2.0 Å and 1.8 Å resolution. *Protein Science* 2(5):739-752 doi:10.1002/pro.5560020506
- Funke SA, Otte N, Eggert T, Bocola M, Jaeger K-E, Thiel W (2005) Combination of computational prescreening and experimental library construction can accelerate enzyme optimization by directed evolution. *Protein Engineering, Design and Selection* 18(11):509-514 doi:10.1093/protein/gzi062
- Galli C, Gentili P, Jolivald C, Madzak C, Vadalà R (2011) How is the reactivity of laccase affected by single-point mutations? Engineering laccase for improved activity towards sterically demanding substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(1):123 doi:10.1007/s00253-011-3240-4
- García-Guevara F, Avelar M, Ayala M, Segovia L (2015) Computational Tools Applied to Enzyme Design— a review. *Biocatalysis* 1(1):109-117
- Gianfreda L, Sannino F, Filazzola MT, Leonowicz A (1998) Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 4(1):13-23 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177\(97\)00016-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177(97)00016-7)

- Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G (2010) Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(3):369-385 doi:10.1007/s00018-009-0169-1
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. *Nucleic Acids Research* 38(Web Server issue):W695-W699 doi:10.1093/nar/gkq313
- Gray HB, Winkler JR (1996) Electron Transfer in Proteins. *Annual Review of Biochemistry* 65(1):537-561 doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.002541
- Gray HB, Winkler JR (2010) Electron flow through metalloproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797(9):1563-1572 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.05.001>
- Gu C, Zheng F, Long L, Wang J, Ding S (2014) Engineering the Expression and Characterization of Two Novel Laccase Isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by Fusing an Additional Ten Amino Acids Tag at N-Terminus. *PLOS ONE* 9(4):e93912 doi:10.1371/journal.pone.0093912
- Guallar V (2008) Heme Electron Transfer in Peroxidases: The Propionate e-Pathway. *The Journal of Physical Chemistry B* 112(42):13460-13464 doi:10.1021/jp806435d
- Guallar V, Baik M-H, Lippard SJ, Friesner RA (2003) Peripheral heme substituents control the hydrogen-atom abstraction chemistry in cytochromes P450. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(12):6998-7002 doi:10.1073/pnas.0732000100
- Guallar V, Olsen B (2006) The role of the heme propionates in heme biochemistry. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100(4):755-760 doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.019>
- Guallar V, Wallrapp F (2008) Mapping protein electron transfer pathways with QM/MM methods. *Journal of The Royal Society Interface* 5(Suppl 3):233
- Guallar V, Wallrapp FH (2010) QM/MM methods: Looking inside heme proteins biochemistry. *Biophysical chemistry* 149(1):1-11
- Harris SE, Orpen AG, Bruno IJ, Taylor R (2005) Factors Affecting d-Block Metal–Ligand Bond Lengths: Toward an Automated Library of Molecular Geometry for Metal Complexes. *Journal of Chemical Information and Modeling* 45(6):1727-1748 doi:10.1021/ci0500785
- Hepner DE, Kjaergaard CH, Solomon EI (2013) Molecular Origin of Rapid versus Slow Intramolecular Electron Transfer in the Catalytic Cycle of the Multicopper Oxidases. *Journal of the American Chemical Society* 135(33):12212-12215 doi:10.1021/ja4064525
- Hildén K, Hakala TK, Lundell T (2009) Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnology Letters* 31(8):1117 doi:10.1007/s10529-009-9998-0
- Hohenberg P, Kohn W (1964) Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review* 136(3B):B864-B871
- Holm RH, Kennepohl P, Solomon EI (1996) Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chemical Reviews* 96(7):2239-2314 doi:10.1021/cr9500390
- Hong F, Meinander NQ, Jönsson LJ (2002) Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 79(4):438-449 doi:10.1002/bit.10297
- Hong G, Ivnitcki DM, Johnson GR, Atanassov P, Pachter R (2011) Design Parameters for Tuning the Type 1 Cu Multicopper Oxidase Redox Potential: Insight from a Combination of First Principles and Empirical Molecular Dynamics Simulations. *Journal of the American Chemical Society* 133(13):4802-4809 doi:10.1021/ja105586q
- Hu L, Farrokhnia M, Heimdal J, Shleev S, Rulišek L, Ryde U (2011) Reorganization Energy for Internal Electron Transfer in Multicopper Oxidases. *The Journal of Physical Chemistry B* 115(45):13111-13126 doi:10.1021/jp205897z
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics* 14(1):33-38

- Jahic M, Veide A, Charoenrat T, Teeri T, Enfors S-O (2006) Process Technology for Production and Recovery of Heterologous Proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress* 22(6):1465-1473 doi:10.1021/bp060171t
- Jeuken LJC, van Vliet P, Verbeet MP, Camba R, McEvoy JP, Armstrong FA, Canters GW (2000) Role of the Surface-Exposed and Copper-Coordinating Histidine in Blue Copper Proteins: The Electron-Transfer and Redox-Coupled Ligand Binding Properties of His117Gly Azurin. *Journal of the American Chemical Society* 122(49):12186-12194 doi:10.1021/ja0006144
- Jones SM, Solomon EI (2015) Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72(5):869-883 doi:10.1007/s00018-014-1826-6
- Jorgensen WL, Tirado-Rives J (1996) Monte Carlo vs Molecular Dynamics for Conformational Sampling. *The Journal of Physical Chemistry* 100(34):14508-14513 doi:10.1021/jp960880x
- Kim SJ, Joo JC, Song BK, Yoo YJ, Kim YH (2015) Engineering a horseradish peroxidase C stable to radical attacks by mutating multiple radical coupling sites. *Biotechnology and Bioengineering* 112(4):668-676 doi:10.1002/bit.25483
- Kohn W, Becke AD, Parr RG (1996) Density Functional Theory of Electronic Structure. *The Journal of Physical Chemistry* 100(31):12974-12980 doi:10.1021/jp960669l
- Kohn W, Sham LJ (1965) Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review* 140(4A):A1133-A1138
- Kosman DJ (2008) Substrate entasis and electronic coupling elements in electron transfer from Fe(II) in a multicopper ferroxidase. *Inorganica chimica acta* 361(4):844-849 doi:10.1016/j.ica.2007.10.013
- Kosman DJ (2010) Multicopper oxidases: a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 15(1):15-28 doi:10.1007/s00775-009-0590-9
- Kries H, Blomberg R, Hilvert D (2013) De novo enzymes by computational design. *Current Opinion in Chemical Biology* 17(2):221-228 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.012>
- Kulys J, Krikstopaitis K, Ziemys A, Schneider P (2002) Laccase-catalyzed oxidation of syringates in presence of albumins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 18(1):99-108 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00073-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00073-5)
- Kurniawati S, Nicell JA (2007) Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Enzyme and Microbial Technology* 41(3):353-361 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.03.003>
- Kurniawati S, Nicell JA (2009) A comprehensive kinetic model of laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Biotechnology Progress* 25(3):763-773 doi:10.1002/btpr.111
- Leatham GF, King V, Stahmann MA (1980) In vitro protein polymerization by quinones or free radicals generated by plant or fungal oxidative enzymes. *Phytopathology* 70:1134-1140
- Lee C, Yang W, Parr RG (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* 37(2):785-789
- Lee S-K, George SD, Antholine WE, Hedman B, Hodgson KO, Solomon EI (2002) Nature of the Intermediate Formed in the Reduction of O₂ to H₂O at the Trinuclear Copper Cluster Active Site in Native Laccase. *Journal of the American Chemical Society* 124(21):6180-6193 doi:10.1021/ja0114052
- Li H, Robertson AD, Jensen JH (2005) Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK_a values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 61(4):704-721 doi:10.1002/prot.20660
- Li K, Xu F, Eriksson K-EL (1999) Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6):2654-2660
- Li P, Anumanthan A, Gao X-G, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüneş N, Renugopalakrishnan V (2007) Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied biochemistry and biotechnology* 142(2):105-124

- Li Q, Pei J, Zhao L, Xie J, Cao F, Wang G (2014) Overexpression and characterization of laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 50(2):140-147 doi:10.1134/S0003683814020124
- Li Z, Xiong F, Lin Q, d'Anjou M, Daugulis AJ, Yang DSC, Hew CL (2001) Low-Temperature Increases the Yield of Biologically Active Herring Antifreeze Protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 21(3):438-445 doi:<http://dx.doi.org/10.1006/prep.2001.1395>
- Lu L, Zhao M, Liang SC, Zhao LY, Li DB, Zhang BB (2009) Production and synthetic dyes decolourization capacity of a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Microbiology* 107(4):1149-1156 doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04291.x
- Marcus RA (1993) *Electron Transfer Reactions in Chemistry: Theory and Experiment* (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English* 32(8):1111-1121 doi:10.1002/anie.199311113
- Marcus RA, Sutin N (1985) Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* 811(3):265-322 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0304-4173\(85\)90014-X](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4173(85)90014-X)
- Martinez-Ortiz J, Flores R, Vazquez-Duhalt R (2011) Molecular design of laccase cathode for direct electron transfer in a biofuel cell. *Biosensors and Bioelectronics* 26(5):2626-2631 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.11.022>
- Maté D, García-Burgos C, García-Ruiz E, Ballesteros AO, Camarero S, Alcalde M (2010) Laboratory Evolution of High-Redox Potential Laccases. *Chemistry & Biology* 17(9):1030-1041 doi:<http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.07.010>
- Mate DM, Alcalde M (2015) Laccase engineering: From rational design to directed evolution. *Biotechnology Advances* 33(1):25-40 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.007>
- Mate Diana M, Gonzalez-Perez D, Falk M, Kittl R, Pita M, De Lacey Antonio L, Ludwig R, Shleev S, Alcalde M (2013) Blood Tolerant Laccase by Directed Evolution. *Chemistry & Biology* 20(2):223-231 doi:<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.01.001>
- Miehlich B, Savin A, Stoll H, Preuss H (1989) Results obtained with the correlation energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr. *Chemical Physics Letters* 157(3):200-206 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0009-2614\(89\)87234-3](http://dx.doi.org/10.1016/0009-2614(89)87234-3)
- Monza E, Lucas MF, Camarero S, Alejandre LC, Martínez AT, Guallar V (2015) Insights into Laccase Engineering from Molecular Simulations: Toward a Binding-Focused Strategy. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 6(8):1447-1453 doi:10.1021/acs.jpcclett.5b00225
- Morozova OV, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV, Yaropolov AI (2007) "Blue" laccases. *Biochemistry (Moscow)* 72(10):1136-1150 doi:10.1134/S0006297907100112
- Mulliken RS (1955) Electronic Population Analysis on LCAO-MO Molecular Wave Functions. I. *The Journal of Chemical Physics* 23(10):1833-1840 doi:10.1063/1.1740588
- Nar H, Messerschmidt A, Huber R, van de Kamp M, Canters GW (1992) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* apo-azurin at 1.85 Å resolution. *FEBS Letters* 306(2-3):119-124 doi:10.1016/0014-5793(92)80981-L
- O'Callaghan J, O'Brien MM, McClean K, Dobson ADW (2002) Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29(2):55-59 doi:10.1038/sj.jim.7000268
- Olsson MHM, Søndergaard CR, Rostkowski M, Jensen JH (2011) PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation* 7(2):525-537 doi:10.1021/ct100578z
- Pantazes RJ, Grisewood MJ, Maranas CD (2011) Recent advances in computational protein design. *Current Opinion in Structural Biology* 21(4):467-472 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2011.04.005>

- Pardo I, Santiago G, Gentili P, Lucas F, Monza E, Medrano FJ, Galli C, Martinez AT, Guallar V, Camarero S (2016) Re-designing the substrate binding pocket of laccase for enhanced oxidation of sinapic acid. *Catalysis Science & Technology* 6(11):3900-3910 doi:10.1039/C5CY01725D
- Pickard MA, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 65(9):3805-3809
- Piscitelli A, Pezzella C, Giardina P, Faraco V, Sanna G (2010) Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioengineered Bugs* 1(4):252-262 doi:10.4161/bbug.1.4.11438
- Quintanar L, Stoj C, Taylor AB, Hart PJ, Kosman DJ, Solomon EI (2007) Shall We Dance? How A Multicopper Oxidase Chooses Its Electron Transfer Partner. *Accounts of Chemical Research* 40(6):445-452 doi:10.1021/ar600051a
- Rakestraw JA, Sazinsky SL, Piatasi A, Antipov E, Wittrop KD (2009) Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 103(6):1192-1201 doi:10.1002/bit.22338
- Ramírez J (2014) Estudio de la inactivación de la lacasa de *Coriolopsis gallica* durante la oxidación de fenoles. Universidad Nacional Autónoma de México
- Remenyi C, Reviakine R, Kaupp M (2007) Density Functional Study of EPR Parameters and Spin-Density Distribution of Azurin and Other Blue Copper Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B* 111(28):8290-8304 doi:10.1021/jp071745v
- Reuter N, Dejaegere A, Maigret B, Karplus M (2000) Frontier Bonds in QM/MM Methods: A Comparison of Different Approaches. *The Journal of Physical Chemistry A* 104(8):1720-1735 doi:10.1021/jp9924124
- Rodgers CJ, Blanford CF, Giddens SR, Skamnioti P, Armstrong FA, Gurr SJ (2010) Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends in Biotechnology* 28(2):63-72 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.11.001>
- Rodríguez E, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R (1999) Industrial Dye Decolorization by Laccases from Lignolytic Fungi. *Current Microbiology* 38(1):27-32 doi:10.1007/PL00006767
- Rogers TA, Bommarius AS (2010) Utilizing Simple Biochemical Measurements to Predict Lifetime Output of Biocatalysts in Continuous Isothermal Processes. *Chemical engineering science* 65(6):2118-2124 doi:10.1016/j.ces.2009.12.005
- Rulišek L, Ryde U (2013) Theoretical studies of the active-site structure, spectroscopic and thermodynamic properties, and reaction mechanism of multicopper oxidases. *Coordination Chemistry Reviews* 257(2):445-458 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.019>
- Rulišek L, Solomon EI, Ryde U (2005) A Combined Quantum and Molecular Mechanical Study of the O₂ Reductive Cleavage in the Catalytic Cycle of Multicopper Oxidases. *Inorganic Chemistry* 44(16):5612-5628 doi:10.1021/ic050092z
- Ryde U, Olsson MHM (2001) Structure, strain, and reorganization energy of blue copper models in the protein. *International Journal of Quantum Chemistry* 81(5):335-347 doi:10.1002/1097-461X(2001)81:5<335::AID-QUA1003>3.0.CO;2-Q
- Ryde U, Olsson MHM, Pierloot K, Roos BO (1996) The Cupric Geometry of Blue Copper Proteins is not Strained. *Journal of Molecular Biology* 261(4):586-596 doi:<https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0484>
- Ryde U, Olsson MHM, Roos BO, De Kerpel JOA, Pierloot K (2000) On the role of strain in blue copper proteins. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 5(5):565-574 doi:10.1007/s007750000147
- Sanaullah, Wilson GS, Glass RS (1994) The effect of pH and complexation of amino acid functionality on the redox chemistry of methionine and X-Ray structure of [Co(en)₂(L-

- Met)](ClO₄)₂.H₂O. *Journal of Inorganic Biochemistry* 55(2):87-99
doi:[https://doi.org/10.1016/0162-0134\(94\)85031-3](https://doi.org/10.1016/0162-0134(94)85031-3)
- Seelbach K, van Deurzen MPJ, van Rantwijk F, Sheldon RA, Kragl U (1997) Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed oxidation. *Biotechnology and Bioengineering* 55(2):283-288 doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19970720)55:2<283::AID-BIT6>3.0.CO;2-E
- Senn HM, Thiel W (2009) QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angewandte Chemie International Edition* 48(7):1198-1229 doi:10.1002/anie.200802019
- Shleev SV, Morozova OV, Nikitina OV, Gorshina ES, Rusinova TV, Serezhenkov VA, Burbaev DS, Gazaryan IG, Yaropolov AI (2004) Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie* 86(9):693-703 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2004.08.005>
- Shuttleworth KL, Bollag J-M (1986) Soluble and immobilized laccase as catalysts for the transformation of substituted phenols. *Enzyme and Microbial Technology* 8(3):171-177 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90108-0](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(86)90108-0)
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karpplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7:539-539 doi:10.1038/msb.2011.75
- Sliwoski G, Kothiwale S, Meiler J, Lowe EW (2014) Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews* 66(1):334-395 doi:10.1124/pr.112.007336
- Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE (1996) Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews* 96(7):2563-2606 doi:10.1021/cr950046o
- Solomon EI, Szilagyí RK, DeBeer George S, Basumallick L (2004) Electronic Structures of Metal Sites in Proteins and Models: Contributions to Function in Blue Copper Proteins. *Chemical Reviews* 104(2):419-458 doi:10.1021/cr0206317
- Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ (2012) Computational enzymatic catalysis - clarifying enzymatic mechanisms with the help of computers. *Physical Chemistry Chemical Physics* 14(36):12431-12441 doi:10.1039/C2CP41180F
- Torres-Duarte C, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R (2009) Halogenated pesticide transformation by a laccase–mediator system. *Chemosphere* 77(5):687-692 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.039>
- Torres-Duarte C, Viana MT, Vazquez-Duhalt R (2012) Laccase-Mediated Transformations of Endocrine Disrupting Chemicals Abolish Binding Affinities to Estrogen Receptors and Their Estrogenic Activity in Zebrafish. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168(4):864-876 doi:10.1007/s12010-012-9825-2
- Vandertol-Vanier HA, Vazquez-Duhalt R, Tinoco R, Pickard MA (2002) Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Corioloropsis gallica* laccase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29(5):214-220 doi:10.1038/sj.jim.7000308
- Vanommeslaeghe K, Guvench O, MacKerell AD (2014) Molecular Mechanics. *Current pharmaceutical design* 20(20):3281-3292
- Vázquez-Lima H, Guadarrama P (2012) Analysis of structural factors related to spectroscopic data and redox potentials of CuT1 models through DFT tools. *International Journal of Quantum Chemistry* 112(5):1431-1438 doi:10.1002/qua.23130
- Vázquez-Lima H, Guadarrama P, Martínez-Anaya C (2012) Geometric distortions on a three-coordinated T1 Cu site model as a potential strategy to modulate redox potential. A theoretical study. *Journal of Molecular Modeling* 18(2):455-466 doi:10.1007/s00894-011-1063-y
- Vidal-Limón A, Águila S, Ayala M, Batista CV, Vazquez-Duhalt R (2013) Peroxidase activity stabilization of cytochrome P450BM3 by rational analysis of intramolecular electron transfer.

- Villatte F, Hussein A, Bachmann T, Schmid R (2001) Expression level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55(4):463-465 doi:10.1007/s002530000479
- Wallrapp FH, Guallar V (2011) Mixed quantum mechanics and molecular mechanics methods: looking inside proteins. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 1(2):315-322
- Wang Y, Wang Z, Xu Q, Du G, Hua Z, Liu L, Li J, Chen J (2009) Lowering induction temperature for enhanced production of polygalacturonate lyase in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry* 44(9):949-954 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.019>
- Warshel A, Levitt M (1976) Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *Journal of Molecular Biology* 103(2):227-249 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90311-9](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(76)90311-9)
- Xu F (1996) Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as Well as Halide Inhibition. *Biochemistry* 35(23):7608-7614 doi:10.1021/bi952971a
- Yanagisawa S, Crowley PB, Firbank SJ, Lawler AT, Hunter DM, McFarlane W, Li C, Kohzuma T, Banfield MJ, Dennison C (2008) π -Interaction Tuning of the Active Site Properties of Metalloproteins. *Journal of the American Chemical Society* 130(46):15420-15428 doi:10.1021/ja8038135
- Yoon J, Solomon EI (2005) Ground State Electronic and Magnetic Properties of a $\mu(3)$ -Oxo Bridged Trinuclear Cu(II) Complex: Correlation to the Native Intermediate of the Multicopper Oxidases. *Inorganic chemistry* 44(22):8076-8086 doi:10.1021/ic0507870
- Yoshida H (1883) LXIII.-Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 43(0):472-486 doi:10.1039/CT8834300472
- You L-F, Liu Z-M, Lin J-F, Guo L-Q, Huang X-L, Yang H-X (2014) Molecular cloning of a laccase gene from *Ganoderma lucidum* and heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Basic Microbiology* 54(S1):S134-S141 doi:10.1002/jobm.201200808
- Zimmer M (1995) Bioinorganic Molecular Mechanics. *Chemical Reviews* 95(8):2629-2649 doi:10.1021/cr00040a002

10 Apéndice

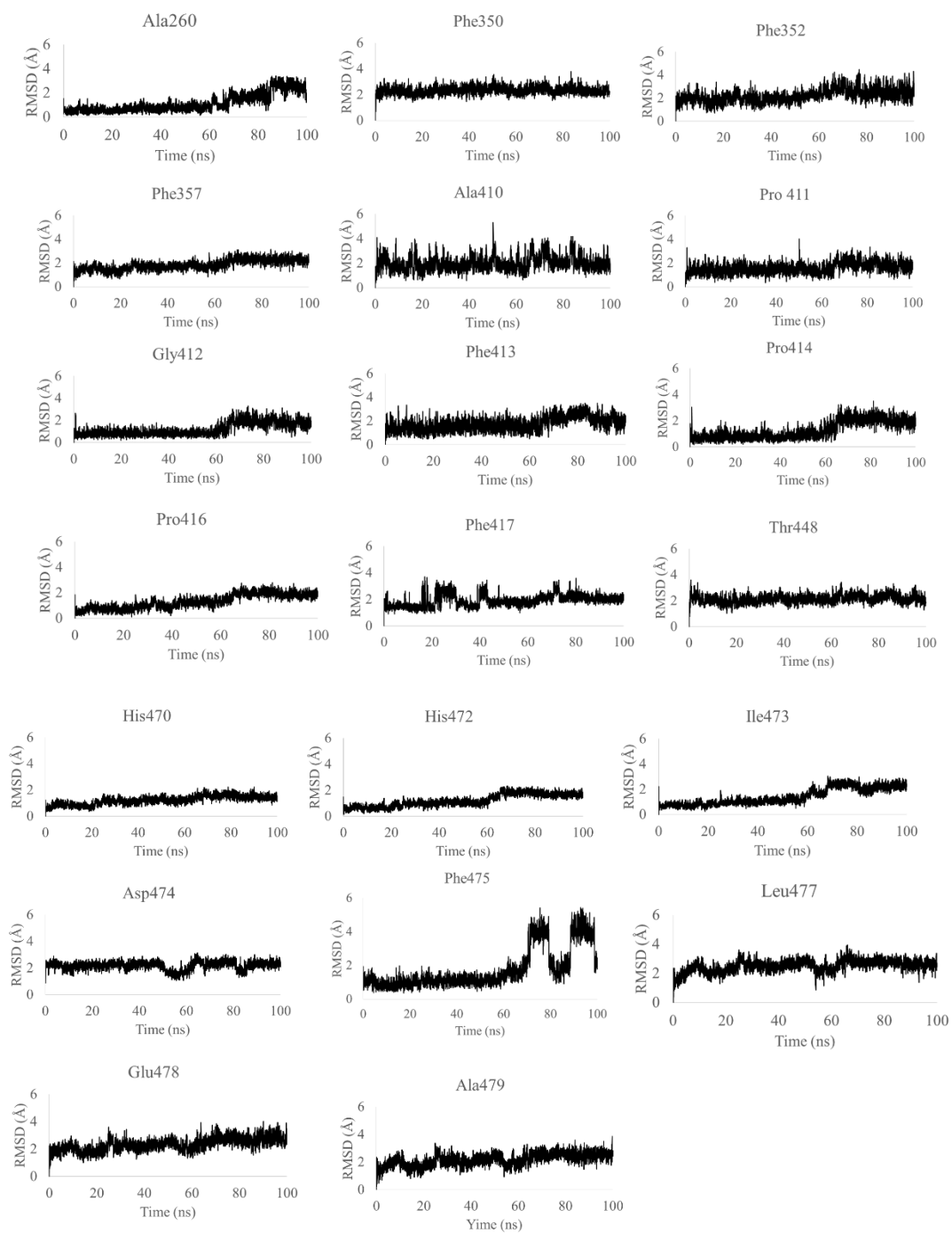


Figura A1. RMSD (Å) de los residuos que conforman la segunda esfera de coordinación del CuT1.

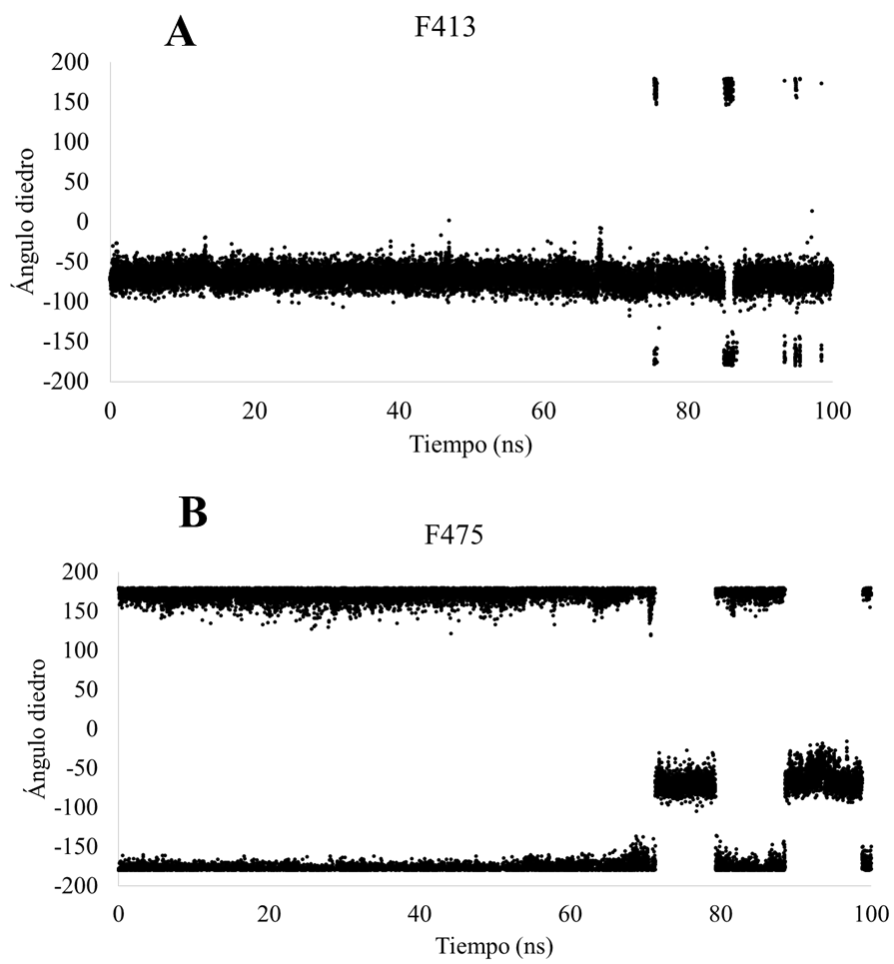


Figura A2. Ángulo diedro entre los átomos C-C_α-C_β-C_γ para: A) F413 y B) F475

11 Anexos

Carteles presentados en congresos

XXX Congreso Nacional de Bioquímica. México. Noviembre 2014



Insight of the active site of a fungal laccase: A molecular dynamic simulation.



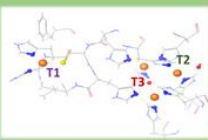
Mayra Guadalupe Avelar Frausto, Carmen Nina Pastor Colón, Sergio Andrés Águila Puentes, Marcela Ayala Aceves.
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
Avenida Universidad # 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos. C.P. 62210. Tel. +52(777)3291619. Correo electrónico: avelar@ibt.unam.mx

Introduction

Laccases are multicopper oxidases that contain four copper atoms in the active site, classified according to their spectroscopic properties in three groups¹ (T1, T2 and T3).

These enzymes catalyze the oxidation of an organic substrate concomitant with the reduction of molecular oxygen to water, thus are considered as green catalysts. For metalloproteins, modeling the active site is a crucial step for theoretical calculations, as the flexibility and electronic properties of the metal ions and coordinating groups modulate the redox potential and the catalytic power of the enzyme. The study of the dynamics in the active site of a fungal laccase is interesting due to its specific characteristics. During catalysis, Cu ions are reduced from Cu (II) to Cu (I). The Cu coordination in the T1 site is similar in the oxidized and the reduced state, resulting in no conformational changes during the electron transfer and thus small reorganization energies and high electron transfer rate are observed^{2,3}.

The aim of this work is to study the dynamics in the active site of a fungal laccase by molecular simulations. Laccase from *Corioliopsis gallica* was selected as model due to its efficiency for pollutant removal and high redox potential⁴.



Results

In order to study the flexibility of the T1 site, we restrained the movement of the active site (both T1 and T2/3 sites) varying the force field constant. The following figures represent the backbone root-mean-square-deviation (RMSD/Å) of first coordination sphere of the T1 and T2/3 sites.

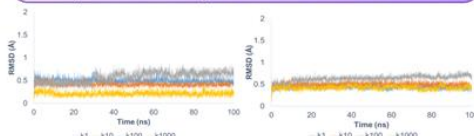
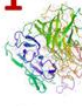


Figure 1. RMSD of the 1st coordination sphere of T1Cu. 100ns of simulation. Figure 2. RMSD of the 1st coordination sphere at T2/3 site. 100ns of simulation.

The backbone RMSD of the 1st coordination sphere of CuT1 (Figure 1) shows that the magnitude of k has no significant effect on the mobility of this region. The same was observed for T2/3 site (Figure 2). However, as k becomes smaller the Cu atom at T2 loses its coordination and leaves the site through a water channel, Figures 3 and 4 respectively. Regarding the 2nd coordination sphere the backbone RMSD of the second coordination sphere, around 8 Å of CuT1, indicates that the mobility of this region is dependent of the force field constant (Figure 5).

Methodology

1 Protein preparation



All calculations are based on the crystal structure of *Corioliopsis gallica* laccase UAMH 8260. The macromolecule was prepared with the protein preparation wizard program inside Maestro 9.3 package (Schrödinger Suite 2011). The pH of the system was set to 4.5. Protonation state were analyzed with the PROPKA web interface. Glycosylation was excluded for all calculations.

2 Molecular Dynamics Simulation



Molecular dynamics simulations were carried out with *Desmond* software.

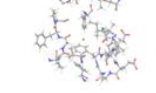
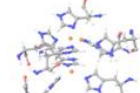
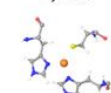
- ✓ Simulated annealing method
- ✓ Cubic periodic boundary conditions
- ✓ OPLS_2005 force field
- ✓ Explicit solvent (SPC)
- ✓ NPT ensemble / Berendsen algorithm.
- ✓ 100ns simulation

3 Simulation strategies

Four simulations were carried out with restrains in the movement of the active site (T1 and T2/3) varying the force field constant (k) from 1000 to 1 kcal/molÅ².

4 Trajectory analysis

VMD software was used for analysis of the trajectory. Backbone RMSD were calculated from three different systems.



CuT1 first coordination sphere CuT2/3 first coordination sphere CuT1 second coordination sphere

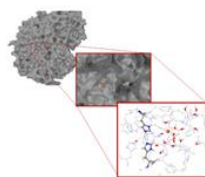
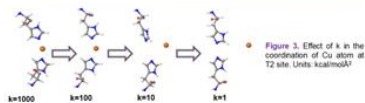


Figure 4. Coordination of Cu atom at T2 is lost (k=1 kcal/molÅ²)

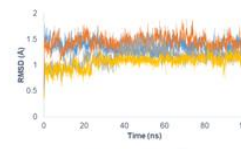


Figure 5. RMSD of the 2nd coordination sphere of T1Cu. 100ns of simulation.

Conclusions

In this work we studied the dynamics of the active site of a fungal laccase. According to our results, the 1st coordination sphere at T1 site is rigid, in accordance with the small reorganization energies observed in this group of enzymes due to the small conformational change during catalysis. On the other hand, the movement of the residues in the 2nd coordination sphere depends on the magnitude of the force field constant, k . The mobility of the residues in the 1st coordination sphere of the T2/3 sites is also low, however Cu atom at T2 is highly mobile, losing coordination at low values of k . This results agrees with experimental results, suggesting that this position is more labile than the others⁵.

References

- ¹Solomon, E.I.; Sundaram, U.M.; Machonkin, T.E., 1996, *Chem. Rev.*, 96, 2563-2605.
- ²Fryde, U.; Olsson, M.; Roos, B.J.; De Kerpel, J. & Pierloot, K., 2000, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 5, 565-574.
- ³Marcus, R. A. & Sutin, N., 1985, *Biochim. Biophys. Acta*, 811, 285-322.
- ⁴Vanderhol-Vanier, H.A.; Vazquez-Duhalt, R.; Tinoco, R. & Pickard, M.A., 2002, *J. Ind. Microb. Biotech.*, 29, 214-220.
- ⁵Rosas, E., 2013, *Preservación de la información cristalográfica en los centros metálicos de la oxidasa multicopre de Thermus thermophilus (MCO-Tth)*, Tesis de Maestría, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Acknowledgements. Authors thank the computing resources provided by Cluster IBT UNAM and Supercomputer Mizli UNAM SC14-1-S-93. We also thank financial support from Conacyt, Grant 179241 and scholarship 245426.



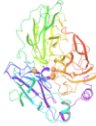
EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA LACASA DE *CORIOLOPSIS GALLICA* EN *PICHA PASTORIS*

Mayra Guadalupe Ávelar Frausto, Clarita Olvera Carranza, Marcela Ayala Aceves. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, C.P. 62210, avelar@ibt.unam.mx



Palabras clave: lacasa, expresión heteróloga, *Pichia pastoris*.

Introducción

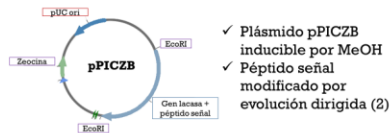


Enzimas con alta actividad y estabilidad son deseables en procesos de biorremediación. El estudio de estas propiedades, relacionadas con la estructura molecular y electrónica de las proteínas, como las lacasas que tienen la propiedad de oxidar sustratos orgánicos, es relevante para el diseño racional de enzimas con mejores propiedades catalíticas. Para esto se requiere de su expresión en un sistema heterólogo. La levadura *Pichia pastoris* ha sido utilizada con éxito en la expresión de lacasas fúngicas (1). Es un sistema con ventajas, tales como altos niveles de expresión, modificaciones post-traduccionales y eficiencia en la secreción de proteínas.

El **objetivo** de este trabajo es llevar a cabo la expresión heteróloga de la lacasa de *Corioloopsis gallica* en *P. pastoris*, estudiando los factores que la afectan.

Metodología

1 Construcción



2 Transformación

Cepa X33 de *P. pastoris* → Electroporación

3 Selección

Resistencia a Zeocina → Selección en medio mínimo con MeOH, ABTS y CuSO₄

4 Cultivos en matraz

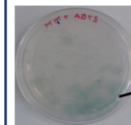
Se eligieron 4 transformantes → Efecto de [MeOH] y [CuSO₄]

5 Cultivos en biorreactor

La transformante con mayor actividad se creció en un fermentador de 5 lts.

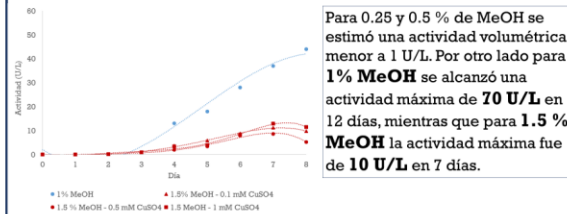
Resultados

El plásmido pPICZB/Lcg fue transformado por electroporación en la cepa X33 de *P. pastoris*.

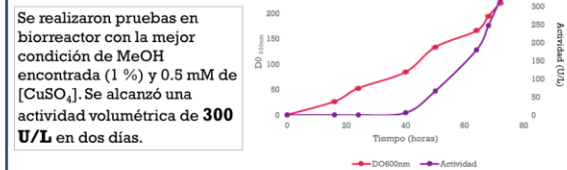


Las colonias que expresaron el gen de la lacasa se seleccionaron por la presencia de coloración verde alrededor de las mismas.

La concentración de MeOH sí mostró una influencia en la expresión de la enzima mientras que la concentración de CuSO₄ no mostró un efecto.



Para 0.25 y 0.5 % de MeOH se estimó una actividad volumétrica menor a 1 U/L. Por otro lado para **1% MeOH** se alcanzó una actividad máxima de **70 U/L** en 12 días, mientras que para **1.5 % MeOH** la actividad máxima fue de **10 U/L** en 7 días.



Se realizaron pruebas en biorreactor con la mejor condición de MeOH encontrada (1 %) y 0.5 mM de [CuSO₄]. Se alcanzó una actividad volumétrica de **300 U/L** en dos días.

Referencias

1. Liu L., Zhao M., Liang S.C., Zhao L.Y., Li D.B., Zhang, B.B. (2009). J. Appl. Micro. 107 (4): 1149-1156.
2. Camarero S., Pardo I., Cañas A.I., Molina P., Record E., Martínez A.T., Martínez M.J., Alcalde M. (2012). Appl. Environ. Microbiol. 78 (5): 1370-1384.

Conclusiones

Se logró expresar heterológamente la lacasa de *C. gallica* en el sistema de *P. pastoris*. Se obtuvo enzima soluble y activa. El factor que mostró mayor influencia en la expresión fue [MeOH]. Los niveles de actividad lacasa alcanzados en matraz fueron muy bajos (70 U/L). En la producción en biorreactor se logró aumentar esta actividad aproximadamente cuatro veces (300 U/L).

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Jorge Luis Folch-Mallol por la secuencia del gen de la proteína expresada en este trabajo. También agradecen el apoyo de Conacyt 179241 y el apoyo técnico del Biol. Mario Alberto Caro y la Ing. Verónica Albitzer Hernández de la Planta Piloto del Instituto de Biotecnología, UNAM.



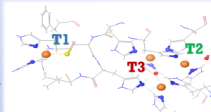
STUDYING THE ACTIVE SITE OF A FUNGAL LACCASE BY MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS



Mayra Avelar^{a,*}, Nina Pastor^b and Marcela Ayala^a, ^aInstitute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, 62210 Cuernavaca, Mexico, ^b Faculty of Science, Morelos State Autonomous University. *avelar@ibt.unam.mx

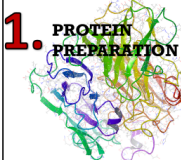
Introduction

Laccases catalyze the oxidation of an organic substrate concomitant with the reduction of molecular oxygen to water. These enzymes contain four copper atoms in the active site classified in three groups (T1, T2 and T3) according to their spectroscopic properties [1]. **Molecular dynamics** simulations are a powerful tool for understanding the role of conformational transitions in the structure-function relationship of proteins [2, 3]. The study of the dynamics of laccase's active site by molecular simulations is interesting due to its specific characteristics: the **electronic properties** of metal ions and coordinating groups that modulate the redox potential of the enzyme and the **small reorganization energies** due to little conformational change in the active site during catalysis [4]. In this work we studied the dynamics of the active site in a fungal laccase from *Coriopsis gallica*.



Methodology

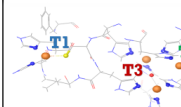
1. PROTEIN PREPARATION



- ✓ Crystal structure of *Coriopsis gallica* laccase UAMH 8260.
- ✓ Glycosylation was excluded and protonation states (pH=4.5) were analyzed with PROPKA server.

2. MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS

- ✓ Simulation Annealing method (Desmond software).
- ✓ 100 ns simulation.
- ✓ Force field: OPLS_2005.
- ✓ Cubic boundary conditions / SPC explicit solvent.
- ✓ NPT ensemble / Berendsen algorithm.



3. SIMULATION STRATEGIES

a) Active site flexibility

- ✓ Variations in the force field constant (k) of the metal coordination sphere, from 1 to 1000 kcal/molÅ²

b) Movement of residues near T1 site.

- ✓ Use parameters from Cu₂O, multicopper oxidase [5].

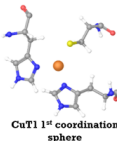
4. TRAJECTORY ANALYSIS

- ✓ For active site flexibility analysis four systems were analyzed.

Zone 1. CuT1 first coordination sphere (3 residues).

Zone 2. CuT2/3 first coordination sphere (10 residues).

Zone 3. CuT1 cavity (10 residues).



Conclusions

In this work we studied the **dynamics** of the **active site** of *C. gallica* laccase, the 1st coordination sphere of CuT1 is **rigid** accordingly to little conformational changes during catalysis and small reorganization energies observed for this group of enzymes. According to our results, **Phe residues** in the cavity of CuT1, where the electron transfer from the substrate to the enzyme occurs, presented interesting dynamics, **moving up to 5 Å**. On the other hand, near the T1 site we found **movement** of the carbonyl group of **Pro414** towards the **Cu atom**, which could be important for electron transfer.

Results

Figures 1 and 2 represent the RMSD of all atoms, except hydrogen, of residues in the first coordination sphere. According to our results the magnitude of k has not **significant effect on the movement** of atoms in the first coordination sphere; this result supports the idea of a **rigid T1 site**.

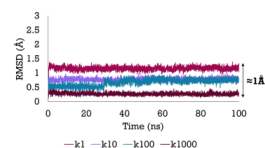


Fig 1. RMSD of the first coordination sphere of CuT1 (zone 1) with different force field constants (k), 100 ns simulation.

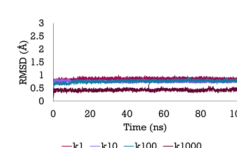


Fig 2. RMSD of the first coordination sphere of CuT2/3 (zone 2) with different force field constants (k), 100 ns simulation.

We also studied the **movement of residues** in the **CuT1 cavity** that could be important for the catalytic process (Fig 3). The magnitude of k has an influence in this region, showing more mobility as k decreases.

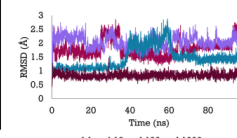


Fig 3. RMSD of the CuT1 cavity (zone 3) with different force field constants (k), 100 ns simulation.

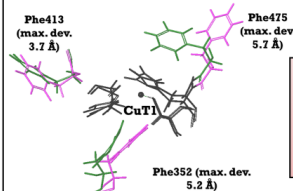


Fig 4. Movement of Phe residues in the CuT1 cavity (zone 3) during MD, t=0 (pink). Max. Deviation are referred to the initial structure.

In order to study the movement of residues near the T1 site, we extrapolated force field parameters reported for a multicopper oxidase. We found that **Phe residues** in the **CuT1 cavity** site showed a **significant movement** (Fig 4).

Interestingly, **carbonyl group** of the backbone of **Pro414** approached **CuT1** atom (Fig 5). The distance oscillated around 5 Å, (Fig 6), but could be as small as 3 Å.

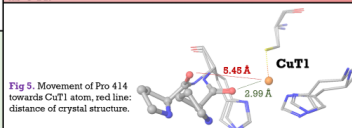


Fig 5. Movement of Pro 414 towards CuT1 atom, red line: distance of crystal structure.

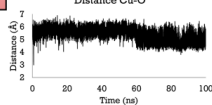


Fig 6. Carbonyl backbone (Pro414)-CuT1 atom distance oscillation during 100 ns simulation.

References

- [1] Solomon, E.I.; Sundaram, U.M.; Machonkin, T.E., 1996, *Chem. Rev.*, 96, 2563-2605.
- [2] Karpplus, M.; McCammon, J.A., 2002, *Nature Struct. Biol.*, 9, 646-652.
- [3] Adcock, S.A.; McCammon, J.A., 2006, *Chem. Rev.*, 106, 1589-1615.
- [4] Ryde, U.; Olsson, M.; Roos, B.J.; De Kerpel, J.; Pienlot, K., 2000, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 5, 565-574.
- [5] LiHong, H.; Farrokhi, M.; Heimdal, J.; Shleev, S.; Rullsek, L.; Ryde, U., 2011, *Phys. Chem. B*, 115, 13111-13126.

Acknowledgements Authors thank the computing resources provided by Cluster IBT UNAM and Supercomputer Miztli UNAM SC14-1-S-93. We also thank financial support from Conacyt, Grant 179241 and scholarship 245426



Replacement of oxidizable residues predicted by QM-MM simulation of a fungal laccase generates variants with higher operational stability



Mayra Avelar^a, Nina Pastor^b, Joaquin Ramirez-Ramirez^a, Marcela Ayala^{a,*}

^a Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología UNAM, Av. Universidad 2001 Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

^b Centro de Investigación en Dinámica Celular, IICBA, UAEM, Av. Universidad 1001 Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Molecular dynamics
QM-MM
Laccase
Protein engineering
Stability

ABSTRACT

In this work, we sought to obtain a more stable laccase with higher operational stability for the oxidation of phenols. During this reaction, phenoxy free radicals are produced that gradually inactivate the enzyme; the inactivation rate depends on the phenol chemical nature. In order to predict residues prone to oxidize within the active site, we simulated activated states of the catalytic region of a fungal laccase using QM-MM tools (Quantum Mechanics-Molecular Mechanics). After simulating the electron distribution in both the basal and activated state (plus or minus one electron) of several conformations of *Coriolopsis gallica* laccase, residues that could be susceptible to oxidation were identified, according to the values of spin density obtained from calculations. Three targets were selected (F357, F413, and F475) to be replaced by site-directed mutagenesis with less oxidizable residues such as leucine, alanine, and isoleucine. The resulting variants displayed a higher specific activity (from 1.5- to 4-fold) than the parental enzyme. Catalyst depletion during phenol oxidation was 2.5-fold lower for the variants, reflecting a higher operational stability.

1. Introduction

Laccases (EC. 1.10.3.2) catalyze the oxidation of several organic compounds through one-electron oxidation, using oxygen as final electron acceptor. Due to their high redox potential, laccases from fungal origin are the most attractive for biotechnological application in fields such as bioremediation but also applications in the medical, food, materials and fine chemical field [1–4]. The enzymatic oxidation relies on a network of Cu atoms coordinated to the protein classified in three sites according to their spectroscopic properties [5]. The T1 site contains one Cu atom coordinated by at least two histidine and one cysteine residue in a trigonal planar geometry; sometimes a fourth ligand (Met) may be present in some laccases in the axial position forming a trigonal pyramid geometry [6]. In this site, substrate oxidation takes place. The T2/T3 site, contains a trinuclear Cu cluster in which T2 site is coordinated by two histidine residues, whilst T3 copper atoms are coordinated by three histidine residues each one; here is where oxygen reduction takes place [7]. Regarding the substrate oxidation mechanism, it has been elucidated that laccases are able to catalyze different types of oxidation, proceeding through electron transfer (ET) or hydrogen atom transfer (HAT) [8]. In the former, an electron is subtracted from the organic substrate (of phenolic but also non-phenolic nature, such as ABTS), leading to the formation of free radical species.

In the case of ET reactions, an exquisite structural complementarity between the active site and the substrate is not essential. In fact, it has been shown that laccase-catalyzed reactions are well described by the outer sphere electron transfer mechanism, in which the electron transfer is “tunneled” in a quantic fashion between the redox species [6,9–11]. The rate constant in these processes depends heavily on the difference between the redox potential of the species and the distance between them, as described by Marcus theory; it has been established that the distance for electron tunneling must be shorter than 10–12 Å in order for the electron transfer to proceed efficiently [12,13]. Thus, in principle, the substrate could approach the laccase active site and transfer its electron via a tunneling phenomenon instead of requiring substrate partition into the protein interior to interact with the Cu ion. The region considered appropriate for substrate approach to the T1 site is composed of several Phe residues forming a hydrophobic patch that modulate the redox potential of the enzyme and could favor substrate approximation to the vicinity of the active site ([14] and references therein). For example, it has been reported that the substrate can interact with residues of a hydrophobic cavity in the *Trametes versicolor* laccase [15], formed by F162, L164, F332, F337 and P391 according to crystallographic data (PDB ID: 1KYA).

As mentioned above, as a result of electron subtraction from substrates, free radicals are produced. In the case of phenolic and phenolic-

* Corresponding author.

E-mail address: maa@ibt.unam.mx (M. Ayala).

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.10.007>

Received 19 July 2017; Received in revised form 9 October 2017; Accepted 10 October 2017

Available online 12 October 2017

0162-0134/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

like substrates such as aromatic amines and thiols, it has been reported that oligomers and polymers are usually generated as final products [2,16–18]. An undesired event is that, as a consequence of exposure to free radicals, the enzyme gradually inactivates during the reaction. The instability of laccases during the oxidation of organic molecules has been reported before [19–23]. The mechanism of inactivation may include the oxidation of aromatic residues by phenol-derived free radicals, as has been reported for horseradish peroxidase [24].

The aim of this study was to design a more stable laccase by replacing oxidizable residues in the second coordination sphere, defined as the region 8 Å around T1 Cu, as predicted by QM-MM tools (Quantum Mechanics-Molecular Mechanics). We based our study on a laccase from *Corioliopsis gallica*; this protein is a high-redox potential enzyme capable of catalyzing the oxidation of industrial dyes and other organic pollutants [25–29]. Through theoretical tools such as molecular dynamics and QM-MM simulations, we studied the spin density distribution of the active site, that is, several residues within and in the vicinity of the catalytic T1 site. Spin density is the probability of finding an unpaired electron and depends on the ability of the molecule to stabilize a charge. Thus, the value of spin density calculated with this method may predict the oxidation susceptibility of residues, specifically those near the T1 site. These theoretical tools have been utilized to study intra and intermolecular electron transfer pathways and energetics in proteins, with reasonable accuracy [30–34]. After identifying several Phe residues as possible targets, we replaced them with less oxidizable ones through site-directed mutagenesis. The obtained variants showed a specific activity similar or higher than the parental enzyme, and more importantly, a higher efficiency in terms of reduced catalyst depletion was found for the oxidation of 4-methoxyphenol.

2. Materials and methods

2.1. Chemical and biological reagents

4-methoxyphenol, syringaldazine and succinic acid were purchased from Sigma. Acetonitrile of HPLC grade and salts were from JT Baker. Culture media reagents were purchased from Difco (yeast extract, peptone, yeast nitrogen base, agar). Laccase from *Corioliopsis gallica* UAMH 8260 was produced and purified as previously reported [35].

2.2. Site-directed mutagenesis on recombinant laccase

Variants of the laccase from *Corioliopsis gallica* were synthesized by Mutagenex in the pPICZB vector, under the control of AOX1 (alcohol oxidase) promoter and with preferential use of codons for *Pichia pastoris*. A modified version of the α -factor preproleader from *Saccharomyces cerevisiae* [36] was used as signal peptide, as previously reported for the expression of *C. gallica* laccase UAMH8260 [37]. Mutants were designed to replace residues that allocate spin density according to QM-MM calculations. The replacement residue was selected after an alignment of the *C. gallica* laccase with other laccases from plants and fungi. Protein blast was performed using NCBI server; retrieved sequences were aligned using Clustal Omega server (Copyright © EMBL-EBI 2017).

2.3. Enzyme production and purification

Protein production and purification were carried out following already reported procedures. Briefly, all variants were expressed in *P. pastoris* X33 using the pPICZB vector under the control of AOX1 promoter. Fernbach flasks were used to cultivate the yeast; methanol was periodically added to induce laccase production in a growth medium supplemented with Cu salts, as previously described [37]. After cultivation, the supernatant was recovered by centrifugation, concentrated by ultrafiltration and finally purified by anionic exchange chromatography followed by size exclusion chromatography. Electrophoretic

purity > 90% was determined through image analysis of SDS-PAGE using ImageJ.

2.4. Laccase activity assay and protein quantification

Laccase activity assays were performed following standard protocols. The reaction was started by addition of the enzyme into a 1 mL-reaction containing 50 μ M syringaldazine and 60 mM succinate buffer pH 4.5. Initial rate was calculated from change in the absorbance of the product (530 nm, $\epsilon = 64,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) over time. One unit is defined as the amount of enzyme that produced 1 μ mol of product per minute. Kinetic parameters were determined varying the concentration of syringaldazine from 1 to 30 μ M. GraphPad Prism 5 software was used to calculate, through non-linear regression, catalytic constants (k_{cat} and K_{M}) from the Michaelis-Menten model. Protein concentration was determined by the Bradford assay using a bovine serum albumin calibration curve (2–20 μ g/mL). All measurements were carried out at room temperature and in triplicate using an Agilent 8453 UV-Visible Spectroscopy System.

2.5. Stability of the laccase from *C. gallica* during oxidation of 4-substituted phenols

Residual activity of the laccase from *C. gallica* was measured in 5 mL-reactions containing 1 mM phenol in 60 mM succinate buffer pH 4.5 at 23 °C. The reaction was started by adding the enzyme (0.08 U/mL). 10 μ L samples were withdrawn every 5 min, centrifuged and immediately assayed for residual activity with syringaldazine, as described above. All measurements were performed at least in triplicate.

2.6. Operational stability of laccase variants during oxidation of 4-methoxyphenol

Residual activity of purified recombinant enzymes was assayed during the oxidation of 4-methoxyphenol, and simultaneously, substrate consumption was determined. Yield was defined as the amount of converted substrate over the amount of inactivated enzyme. Reactions were carried out in 2 mL containing 1 mM 4-methoxyphenol and 60 mM succinate buffer, pH 4.5 at 30 °C and 250 rpm. An enzyme amount equivalent to 0.15 U/mL (syringaldazine units) was used. In order to avoid artifacts due to different protein amounts (such as an apparently more stable variant, due to the presence of more protein), inactivated enzyme was added such that in all reactions a concentration of 67.2 nM of protein was present. Samples (40 μ L) were periodically withdrawn and immediately assayed for residual activity with syringaldazine. Simultaneously, 100 μ L-samples were also withdrawn and the reaction was stopped by adding 1.7 μ L of 10.8 M of HCl and kept on ice until HPLC runs were performed to determine substrate consumption. Before injection into the HPLC, samples were centrifuged for 2 min at 13,400 rpm. Analysis was performed in an Agilent 1220 Infinity LC at 30 °C using a reverse phase Nucleosil® C-18 column (5 μ m particle size, LxID 25 cm \times 32 mm) and a diode array detector set to 288 nm. The mobile phase was a water:acetonitrile mixture, employing a gradient from 30% to 100% of acetonitrile at a flow rate of 0.4 mL/min. The experiment was performed in triplicate.

2.7. Protein preparation for computational simulations

The crystallographic structure of the *C. gallica* laccase (PDB 4A2E) was used as template to model the laccase from *C. gallica* UAMH8260 (GenBank accession number KX932046). The proteins share 97% identity. The macromolecule was prepared with the Protein Preparation Wizard tool in Maestro 9.3 package (Schrödinger Suite 2011). The pH of the system was set to 4.5 (the optimum pH for laccase activity, also used in all experiments). The protonation state was analyzed with the

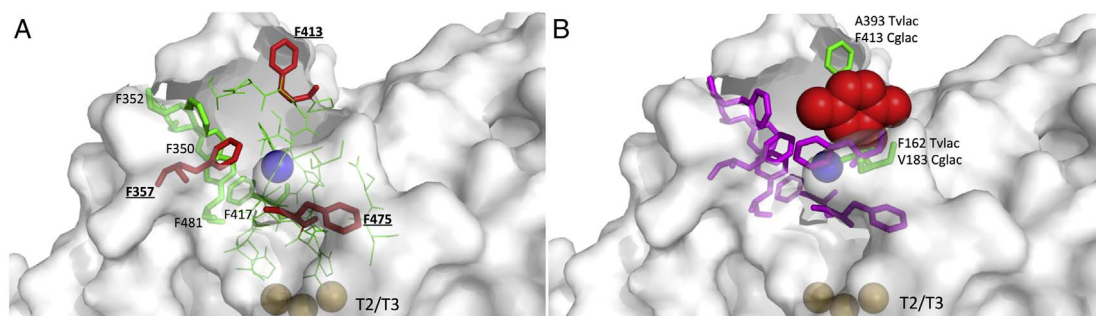


Fig. 1. First and second coordination sphere in T1 site of laccase from *C. gallica* (Cglac); mutated phenylalanine residues are underlined and T1 Cu is shown as a blue sphere (A). Xylidine-binding region in laccase from *T. versicolor* laccase (Tvlac) (1KYA); residues that differ from those at the equivalent position in Cglac are marked (B). Xilidine is shown as red spheres. T2/T3 Cu atoms are shown as orange spheres.

PROPKA [38,39] web interface followed by visual inspection. The net charge of the molecule after preparation was -10 . His residues coordinating the T1, T2, and T3 Cu were protonated on the N atom not coordinated to the Cu ions, likewise the Cys residue coordinating the T1 Cu was deprotonated. 10 sodium ions (Na^+) were added as counterions. We considered the oxidized state of the protein (Cu^{2+}), and T2 and T3 Cu were coordinated to a hydroxyl ion according to [40]. The structures did not include glycosylation moieties in any of the calculations.

2.8. Molecular dynamics simulations

Molecular dynamics simulations were carried out with Desmond module of Schrödinger suite, using OPLS_2005 [41] force field for all calculations. Cubic periodic boundary conditions were set 15 \AA from molecule surface and explicit solvent molecules were treated using the SPC water model. The RESPA integrator was used with a time step of 2 fs and a NPT ensemble. Pressure was maintained at 1 atm using the Berendsen algorithm with a time step of 2 ps. Temperature was applied with the Berendsen thermostat method and a relaxation time of 1 ps. The electrostatic component was treated using the particle-mesh Ewald method with a tolerance of 10^{-9} , while short range interactions were modeled with 12 \AA cutoff. A simulated annealing method was used comprising 6 steps. First, the full system was heated to 10 K for 30 ps, following to 100 K for 100 ps, 300 K for 100 ps, 300 K for 200 ps, two steps of 400 K for 300 and 500 ps, and finally a cooling step at 300 K for 1000 ps. A linear interpolation of the temperature between two adjacent time steps was employed. After the full system was cooled, 100 ns simulation was recorded. The simulation was performed using the parameters for the Cu coordination sphere reported for the bacterial multicopper oxidase CueO [42]. Parameters were inserted in the input file manually. A conformational distribution was obtained with 20% of the frames (20,835 frames), according to the movements registered by the residues in the cavity of the T1 Cu site, based on the distance of T1 Cu and the C3 carbon atom of the Phe 475 aromatic ring, as explained in the results section.

2.9. QM/MM simulations

Six conformations were selected from the molecular dynamics simulations, as described in Results and Discussion. QM/MM calculations were carried out with the Qsite module of Schrödinger Suite. The complete system included the protein with an 8 \AA spherical layer of water. Considering that the second coordination sphere for T1 comprises the following residues: Ala260, Phe350, Phe352, Phe357, Ala410, Pro411, Gly412, Phe413, Pro414, Pro416, Phe417, Thr448, His470, His472, Ile473, Asp474, Phe475, Leu477, Glu478 and Ala479, different QM regions were studied, ranging from 45 to 515 atoms: 45 atoms region (residues 415, 476, 471); 331 atoms region (residues 350–357, 413–415, 471–481); 472 atoms region (348–359, 411–417,

471–483) and 515 atoms region (345–359, 411–417, 471–483). All of the regions contained the T1 Cu. The minimum QM region was selected such that it reproduced the experimental electronic distribution for T1 Cu-containing proteins in the basal state [43] (see Table 1S); moreover, care was taken that no spin density was allocated in the atoms near the QM/MM boundary [44]. QM region comprising 472 atoms was selected; the only residues belonging to the second coordination sphere that were not part of this QM region are Ala260, Ala410, Thr448 and His470. Spin-unrestricted Density Functional Theory (UDFT) was used for all QM calculations with the hybrid functional B3LYP [45–47] and lacvp* as the basis set. The MM region was modeled with the OPLS_2005 force field [41]. The hydrogen cap method (link-atom method) was used to treat covalent bonds in the QM/MM boundary [48]. Single point energy calculations were performed for three electronic states: basal state in the doublet state ($S = 1/2$, $\text{Cu} = 2^+$), system minus one electron in the triplet state ($S = 1$, $\text{Cu} = 2^+$), and system plus one electron in the triplet state ($S = 1$, $\text{Cu} = 2^+$). Spin density calculations were based on Mulliken population analysis (Atomic Mulliken spin density).

3. Results and discussion

In this work, we made use of QM-MM simulations to predict amino acid residues in the second coordination sphere of the T1 Cu site (defined as the residues within 8 \AA of copper atom) prone to be oxidized. The rationale was that residues near the site of free radical production would be targets for oxidation and consequently lead to enzyme inactivation. The goal was to replace those residues with less oxidizable ones in order to improve operational stability of the laccase in reactions involving the formation of free radicals, such as oxidation of phenols, amines and thiols. In Fig. 1A, the T1 site of laccase from *C. gallica* is depicted, highlighting the first and second coordination spheres. T1 Cu atom (in blue) is coordinated by H415, Cys471 and H476 (in cyan), while T2/T3 Cu atoms (in orange) are coordinated by histidine residues.

As shown in Fig. 2, laccase from *C. gallica* rapidly gets inactivated during the oxidation of several 4-substituted phenols, albeit at different rates. We would expect that high redox potential substrates would produce more inactivating radicals, i.e., a few radicals would be needed to inactivate the enzyme. In the case of phenol ($E = 0.97 \text{ V}$), the relative slower inactivation (compared to 4-methoxyphenol, $E = 0.72 \text{ V}$) may be due to the slower conversion of the substrate: the initial conversion rate for 4-methoxyphenol is $1.0 \times 10^{-2} \text{ mM min}^{-1}$, while in the case of phenol it is $1.4 \times 10^{-3} \text{ mM min}^{-1}$; i.e., 4-methoxyphenol is converted ten times faster than phenol, and thus fewer phenol-derived free radicals of high redox potential are generated. Yield, defined as the amount of converted substrate over the amount of inactivated enzyme, showed that 700 molecules of phenol must be converted to inactivate one molecule of laccase, while $> 29,000$ 4-methoxyphenol molecules are needed to inactivate a molecule of laccase. This

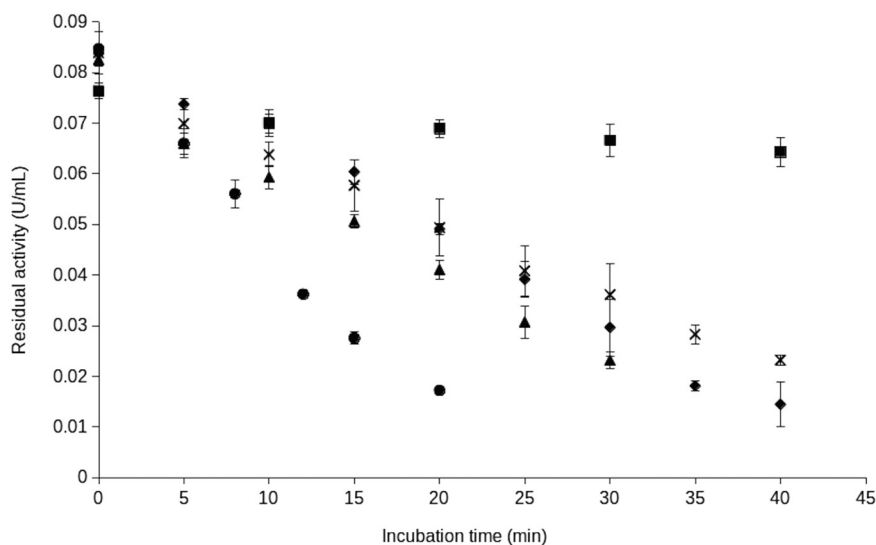


Fig. 2. Inactivation profile of *Corioliopsis gallica* laccase during oxidation of ■ phenol (0.97 V), ◆ 4-bromophenol (0.96 V), × 4-chlorophenol (0.94 V), ▲ 4-methylphenol (0.87 V) and ● 4-methoxyphenol (0.72 V). Residual activity was determined with the standard syringaldazine spectrophotometric assay. In parenthesis, redox potential of each phenol is shown. The bars represent the standard deviation of three independent measurements.

phenomenon has been observed not only for laccases but also for other oxidoreductases such as heme-peroxidases [49–52].

As we mentioned in the introduction, there is a hydrophobic region in the cavity of T1 Cu site that can interact with the substrate. In Fig. 1B, xylydine bound to the active site for *T. versicolor* laccase (PDB ID 1KYA) is shown, along with the equivalent positions of *C. gallica* laccase. As observed, there are several Phe residues that interact with the substrate and that could also be important for protein stability as they would be targets for oxidation by free radicals formed upon substrate transformation. It has been reported for horseradish peroxidase (HRP) that free radicals produced from phenolic substrates react with the side chain of certain Phe residues to form adducts [24]. In order to test this hypothesis, we performed QM-MM simulations of residues in the second coordination sphere of the T1 Cu (around 8 Å) to predict residues susceptible to oxidation.

3.1. Conformational search by molecular dynamics simulations

QM-MM modeling is a useful tool to analyze chemical processes during biocatalysis; however, enzymes are not static entities. Thus, an important consideration for electronic studies in proteins would be to perform a conformational exploration prior to quantum analysis, instead of directly using the crystallographic structure [53,54]. It is well known that the structural conformation of proteins, even the relative positions of residue side chains, could affect the electronic distribution [30,33,55,56]; thus, we decided to obtain a series of representative configurations of the enzyme and performed a 100 ns molecular dynamics (MD) simulation. Analysis of the first coordination sphere in both T1 and T2/T3 sites showed that these sites are rigid (Supplementary material, Fig. 1SA and 1SB respectively), with an RMSD smaller than 1 Å, in accordance with a specific arrangement of Cu ions needed to maintain optimal catalytic activity. It is considered that small reorganization energies and electron transfer rates derive from this rigidity ([57,58] and references cited therein). On the other hand, the second coordination sphere, defined as the region 8 Å around T1 Cu, is more flexible (Fig. 1SC), with oscillations of 1.5 Å. When analyzing in detail the movement of individual residues in the second coordination sphere (Supplementary material, RMSD Fig. 2S), we found that only residues Phe350, Phe352, Glu478, and Ala479 exhibit modest side chain mobility during all the simulation time. These are not residues located in loops and are not expected to show great flexibility; however, given their proximity to T1 Cu, their relative position could influence the electronic distribution. The most remarkable movement was that of the Phe475 side chain. The aromatic ring of this residue showed noticeable displacement after 60 ns, as large as 5.7 Å relative to the initial

position (Fig. 3A). Interestingly, this large movement of the side chain in Phe475 shortened the distance between the aromatic moiety and the T1 Cu, thus exposing the side chain to the solvent (Fig. 3B). A conformational distribution based on the distance of T1 Cu and the C3 carbon atom of the Phe aromatic ring was performed. According to this criterion, two distributions were observed: the most populated, with Phe475–T1 Cu distances around 11 Å (found in the crystallographic structure), and a less populated group with Phe475–T1 Cu distances around 7 Å (Fig. 3C). Four conformations were selected randomly, as well as two conformations from the population in which the large movement of Phe475 was observed, to perform further QM-MM simulations (selected conformation are marked in Fig. 3A and C).

3.2. Prediction of oxidizable residues by spin density distribution

QM-MM simulations were performed on the selected conformations. The selection of the QM zone was carefully performed as described in the experimental section. Residues shown in Table 1 and the T1 Cu comprised the QM zone. Seven phenylalanine residues are present in the second coordination sphere of T1 Cu: F350, F352, F357, F413, F417, F475, F481. As shown in Table 1, all of these residues are included in the studied QM region.

Two strategies were followed in order to assess the probability of finding an unpaired electron in the QM zone: subtracting and adding an electron to the system. Subtracting an electron better reflects the process under study, that is, the oxidation of a residue in the active site; a higher spin density value of a residue would predict that residue acts as an electron source. On the other hand, another strategy to study electron transfer processes is to add electrons to the QM region, in order to predict the final electron sink that would be a residue prone to stabilize a charge. This approach has been successfully used to simulate electron transfer pathways [30–33,55]. As expected, the spin density in the basal state was allocated only in the first sphere of coordination (Table 2S). For the activated states (± 1 electron), spin density also allocated in the second coordination sphere. The change in spin density ($\Delta\rho_s$) of these activated states relative to the basal state were obtained from QM-MM simulations and is shown in Table 2 (plus one electron system) and Table 3 (minus one electron system) and corresponds only to the spin density allocated in the side chain of each amino acid, excluding the backbone. A negative value represents loss of spin density (ρ_s) in the residue after the addition or subtraction of one electron, while a positive value means gain of ρ_s . The absolute values of spin density are shown in the supplementary material (Tables 3S and 4S).

Spin density values and the residues in which it is allocated vary, depending on the particular laccase conformation and whether an

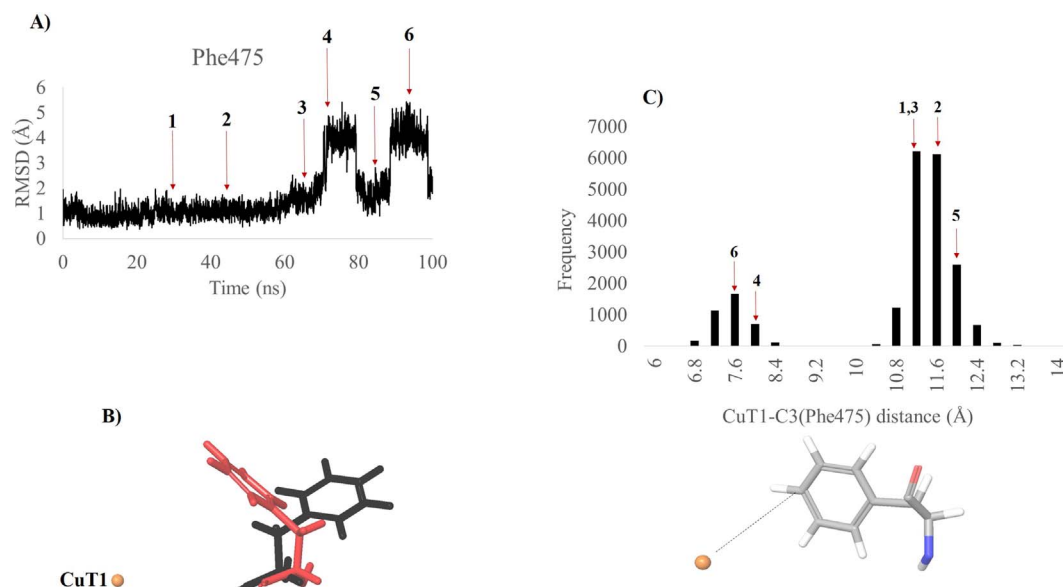


Fig. 3. A) RMSD of Phe475 along 100 ns molecular dynamics simulation B) Molecular representation of the position of Phe475 relative to T1 Cu. Crystallographic structure (black) and structure 6, (red) with a Phe475-T1 Cu distance of 11 and 7.6 Å, respectively. C) Conformational distribution of structures in the 100 ns simulation relative to the Phe475-T1 Cu distance. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Residues comprising QM zone for QM-MM simulations. In bold, residues coordinating the T1 Cu atom.

Residue number	Sequence of QM zone
348–359	348Met-Ala-Phe-Gly-Phe-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Thr-Ile359
411–417	411Pro-Gly-Phe-Pro- His -Pro-Phe417
471–483	471Cys-His-Ile-Asp-Phe- His -Leu-Glu-Ala-Gly-Phe-Ala-Val483

Table 2

Change in spin density values between basal and activated state (plus one electron) of different laccase conformations, calculated through QM-MM methods. No value indicates $\Delta\rho_s = 0$.

Position	Conf1	Conf2	Conf3	Conf4	Conf5	Conf6
1st sphere	0.023	0.051	0.001	-0.001	-0.001	0.000
Phe481	-	0.039	-	-	-	-
His472	0.029	0.064	-	-	-	-
Phe417	-	0.024	-	-	0.018	0.330
Phe413	0.202	-	-	-	-	0.156
Phe357	-	0.104	0.230	0.055	0.054	-
Phe352	-	0.177	0.091	-	0.077	-
Phe350	-	-	0.039	-	0.028	-

Table 3

Change in spin density values between basal and activated state (minus one electron) of different laccase conformations, calculated through QM-MM methods. No value indicates $\Delta\rho_s = 0$.

Position	Conf1	Conf2	Conf3	Conf4	Conf5	Conf6
1st sphere	0.005	0.056	-0.002	0.000	-0.019	0.004
Phe481	0.020	-	-	-	-	-
Phe475	0.170	0.427	0.104	0.023	0.075	-
Phe357	-	-	-	-	0.097	0.127
Phe350	0.031	-	-	-	-	-
Glu478	0.142	0.142	0.184	0.331	0.282	0.201
Asp474	0.107	0.051	0.066	-	-	-
Pro411	0.187	-	0.088	-	0.035	-
Met348	0.113	0.172	0.016	-	0.071	0.145

electron is added or subtracted. For the “plus one electron” system, residues F352, F357, and F413 allocated a higher value of spin density ($\Delta\rho_s > 0.1$). This occurred in conformations belonging to highly populated groups, containing 60% of analyzed conformations (conformations 1, 2 and 3, see Fig. 2C), suggesting these positions are prone to electron exchange compared to others contained in the QM region. Interestingly, F413 was the only residue allocating spin density in conformation 6, which belongs to a less populated group of conformations (8% of analyzed conformations).

It was observed that in the “plus one electron” system, spin density could be found in the backbone carbonyl group and not in the side chain of residues located at amino terminal of the QM-MM boundaries; thus, the backbone carbonyl groups of I359, F417 and V483 showed the highest $\Delta\rho_s$ of 0.34 (Conf4), 0.39 (Conf4) and 0.27 (Conf6), respectively (data not shown). Spin density in the backbone ($\Delta\rho_s > 0.12$) appears in all conformations for I359; in five conformations for F417; and in four conformations for V483. This unexpected charge distribution does not necessarily represent a tendency of the atoms to allocate unpaired electrons, but it rather reflects the difficulties in describing QM-MM boundary atoms that could lead to artifacts in that specific zone, as has been observed in other systems [44]. For this reason, these residues were not considered for replacement. Also, large spin density changes in the first sphere of coordination should not be present, as is the case for the data shown in Table 2 and also Table 3 (discussed below).

On the other hand, in the “minus one electron” system the residues that allocated more spin density and in more conformations are M348 and F475 (Table 3). To a lesser extent, the side chain of F357 allocated spin density in some conformations. Remarkably, P411 and E478 allocated some spin density in the side chain; this result is unexpected, as proline and acidic residues have not been described as redox active residues. In terms of exposure to free radicals, F475 could be a potential target; M348 is buried inside the protein matrix and in principle is inaccessible to diffusible species, and it does not belong to the second coordination sphere (the distance to T1 Cu is 13.9 Å) but could represent an interesting site for further study given it is an oxidizable residue.

From these theoretical calculations, F357, F413, and F475 are possible, oxidizable targets of laccase-catalyzed phenol oxidation. These Phe residues are part of the T1 hydrophobic cavity, and thus could be playing an important role during catalysis. As mentioned

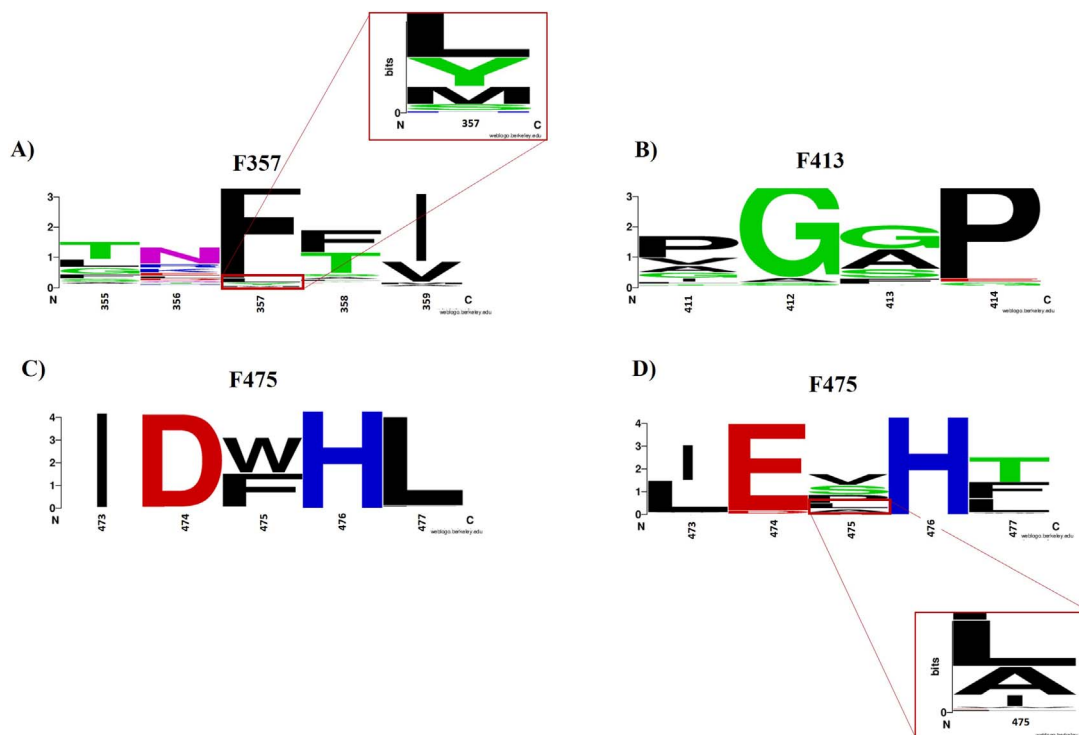


Fig. 4. Residue frequency in selected positions of fungal MCO's: A) position 357, B) position 413, C) position 475. D) Residue frequency in position 475 of plant MCO's. Logos were generated with WebLogo server.

before, the F475 side chain showed a remarkable displacement approaching the T1 site and gaining exposure to the solvent, as observed from molecular dynamics simulations (Fig. 2A and C). On the other hand, position F413 has been reported to play an important role in modulating the size and hydrophobicity of the cavity during substrate binding in a chimeric laccase [56]. Nevertheless the contribution of these residues from the point of view of operational stability of laccase has not been studied.

3.3. Mutation of oxidizable residues predicted by QM-MM methods

To study the effect of these residues on the operational stability during a free radical-producing reaction, site-directed mutagenesis was performed to replace them by less oxidizable residues; in order to favor protein folding, replacement residues were selected among frequently found residues in other multicopper oxidases (MCO's) from fungi and plants. Sequence alignment shows that F357 is highly conserved among fungal MCO's, with leucine being a less common but also less oxidizable residue (Fig. 4A). On the other hand, aliphatic residues such as alanine are frequently present in F413 position (Fig. 4B). High preference for aromatic residues was observed in position 475, tryptophan being most frequent residue in fungal MCO's (Fig. 4C). Due to the oxidizable character of tryptophan, an alignment with MCO's from plants was performed to select a better candidate, finding that residues such valine, alanine, leucine, and isoleucine are frequently present in the equivalent position (Fig. 4D). Based on this analysis, we decided to construct F357L and F413A variants. For position 475 we selected isoleucine, given that the isoleucine side chain is a good replacement for phenylalanine in terms of hydrophobicity and bulkiness, and could help to preserve a proper folding of the mutant protein.

Control simulations of mutants were performed, and the spin density values confirm that after residue replacement, electronic density is not allocated in a particular residue and is evenly distributed among many atoms in different residues, suggesting there is no specific electron sink or electron source in the variants (data available upon request).

3.4. Catalytic properties and operational stability of laccase variants

The laccase variants were produced in *P. pastoris* and purified as previously reported [37]. Kinetic characterization with a standard substrate showed F413A and F475I mutants to be 1.4 and 2.7-fold more efficient than the parental enzyme, respectively, while the F357L mutant showed a 46% reduction in catalytic efficiency (Table 4). Compared with other reports, it has been observed that replacement of F357 (equivalent to F337 in *T. versicolor* laccase, TvL IIIb) produced a variant with slightly higher Km for standard substrates such as ABTS, but unable to oxidize 2,6-dimethoxyphenol; the authors estimate that k_{cat}^{app} is 100-fold smaller for this reaction than the parental enzyme [59]. Regarding position 475, Mate et al. reported that replacement with a Ser residue lead to a more active albeit less thermostable variant of PM1 laccase [60]. As mentioned before, position 413 shows variability among fungal laccases, and a replacement of a Phe residue in that position has not been reported before. It is worth mentioning, however, that Gly and Ala are the preferred residues at this position. Given that Phe413 is at the outermost region of the substrate binding site, it is possible that its replacement removes steric impediments and favors substrate interaction with the T1 Cu, as has been reported for Phe residues of other solvent-exposed positions in fungal laccases [56,59].

In order to evaluate the operational stability of the variants, residual activity of the laccases during 4-methoxyphenol oxidation and substrate consumption were simultaneously measured; the results are shown in Fig. 5. It is observed that all mutants retain a higher activity after 30 min of reaction. Although an equal amount of enzymatic units

Table 4
Kinetic constants for the oxidation of syringaldazine of recombinant laccase and variants.

Variant	k_{cat} (s^{-1})	Km (μM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} M^{-1}$)
rlaccase	105.9 ± 5.8	9.6 ± 1.3	11.3×10^6
F357L	74.4 ± 5.0	12.2 ± 2.1	6.1×10^6
F413A	180.8 ± 12.7	10.8 ± 1.8	16.3×10^6
F475I	315.9 ± 22.6	10.3 ± 1.8	30.8×10^6

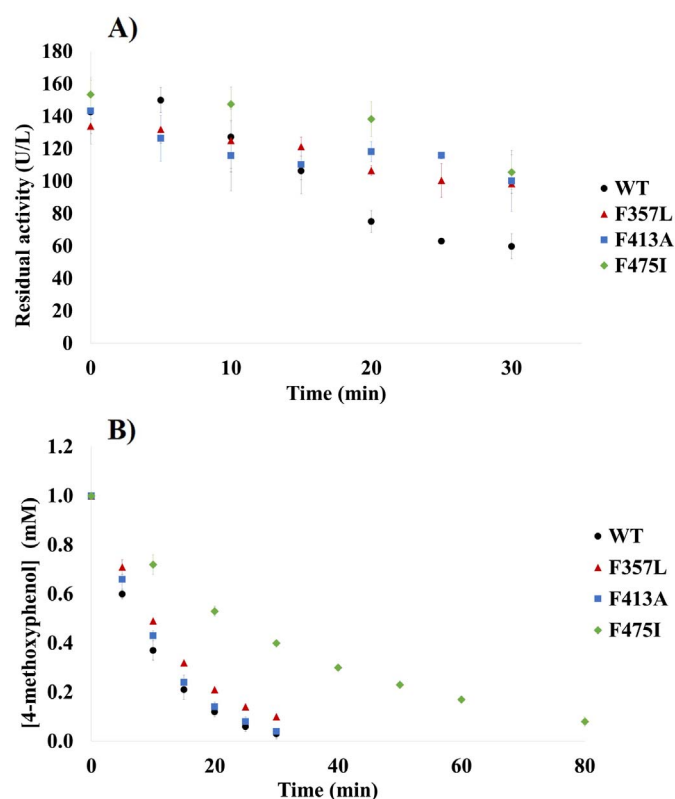


Fig. 5. A) Residual laccase activity during the oxidation of 4-methoxyphenol. B) Substrate consumption for different variants. All experiments were performed at least in triplicate.

(measured with syringaldazine) was used for the reactions, 4-methoxyphenol consumption rate varies among mutants. The wild type enzyme as well as F357L and F413A mutants showed comparable initial rates of 4-methoxyphenol consumption (0.063 , 0.051 and 0.057 mM min^{-1} , respectively) whereas the F475I mutant catalyzed the reaction at lower initial rates (0.0235 mM min^{-1}).

Because enzyme exposure to free radicals ultimately depends on substrate conversion, this was taken into account to compare operational stability among the variants. Yield was defined as the amount of converted substrate over the amount of inactivated enzyme and it was calculated from data in Fig. 4 at similar 4-methoxyphenol conversion, for each variant (Fig. 6). The value of the yield reflects operational stability of the variants, as less oxidizable, more stable variants would be able to convert a higher amount of substrate before becoming inactivated. From data presented in Fig. 6, it is clear that F357L and F413A mutants are inactivated at a lower rate than the wild type enzyme, thus resulting in a higher yield: more substrate molecules are converted per enzyme molecule before it becomes inactive. On the other hand, the F475I mutant behaves in a similar fashion to the wild type enzyme.

The role of phenylalanine residues present in the T1 Cu cavity has been studied before by site-directed mutagenesis of the *Trametes versicolor* laccase [59]; substrate specificity (K_m) was measured for several single-point mutants, in which phenylalanines were replaced by alanine residues. It was found that F162 posed a steric restriction for access to the active site of bulky aromatic substrates; when replaced by alanine, the mutants were able to convert a slightly higher percentage of larger substrates. On the opposite, F265 appeared to be important for interacting with phenolic and non-phenolic substrates, as replacement by alanine residue generated a negative impact in the activity of the mutant (2-fold increase of K_m). The residues in these two positions are variable among fungal laccases, which could explain the relatively low impact of these mutations; for instance, in *C. gallica* laccase the

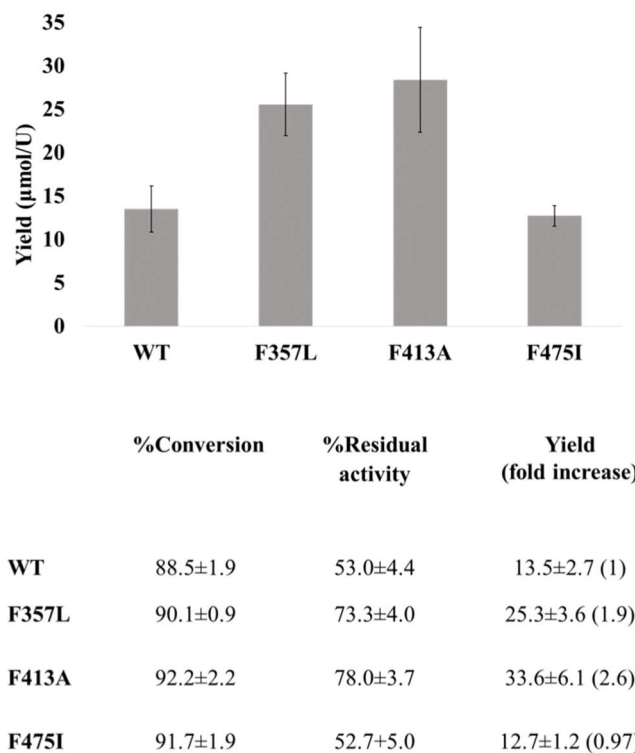


Fig. 6. Operational stability of laccase variants. Yield is defined as the amount of converted substrate over the amount of inactivated enzyme, and is expressed as $\mu\text{mol/U}$.

equivalent residues are V179 (F162) and S285 (F265).

A more conserved position is that corresponding to F475; as shown in Fig. 4D this position is frequently occupied by phenylalanine or tryptophan residues in fungal laccases, and by valine, serine and proline residues, and to a lower extent, by leucine, alanine and isoleucine residues in plant laccases. Few reports on the effect of replacing this residue are available. In a directed evolution study aiming to obtain a thermostable variant of a basidiomycete laccase [60], it was found that the equivalent mutation F454S is responsible for increasing the activity but results detrimental for thermostability. The authors suggest that new interactions formed between Ser and surrounding residues could increase the redox potential of the enzyme (by increasing the length of certain coordination bonds and thus increasing electron deficiency in T1 Cu), although it was not experimentally proven. Given it is a buried residue, it was puzzling to observe from the QM-MM simulations it could allocate spin density (see Table 3). It may be that this residue (which is a conserved aromatic residue in fungal laccases) is able to delocalize charge, to some extent, during turnover (i.e. electron transfer) and in the absence of the aromatic moiety, the T1 Cu may become a more avid electron acceptor. However, to test this hypothesis further experimental confirmation is needed, for example, by measuring the redox potential of the F475I variant. The F475I mutant was more active than the wild type enzyme towards the substrate model syringaldazine. However, in terms of rendering a more stable variant for 4-methoxyphenol conversion, we observe that it is practically equivalent to the wild type enzyme. Thus, probably due to its low exposure to phenoxy free radicals, Phe475 may not be a residue as oxidizable as others, and neither an electron sink prone to donate electrons to other residues.

On the other hand, other aromatic residues are highly conserved among fungal laccases. Particularly, F337 and F463 in *T. versicolor* laccase (equivalent to F357 and F481 in *C. gallica* laccase) are located in the second coordination sphere of T1 Cu and it has been proposed that these residues establish π interactions with the imidazole moiety of H476, which in turn coordinates the T1 Cu [61]. Negligible spin density

was detected in F481 after QM-MM simulations. However, F357 showed spin density when simulated in the activated state (plus one electron), in two of the most abundant conformations (2 and 3, see Table 2). It has been previously reported that the equivalent F337A mutant of *T. versicolor* laccase, although able to oxidize ABTS, completely lost the ability to oxidize 2,6-DMP. However, in our case the F357L mutant resulted in a less efficient variant (according to kinetic parameters determined for syringaldazine) that nevertheless retained good activity towards 4-methoxyphenol. Perhaps not only π interactions but also local hydrophobicity of this site is essential, as Cu-coordinating His residue bears certain exposure to the solvent and has been observed to interact with the substrate [15,62,63]. By replacing Phe with a Leu residue, the activity may be preserved as a long aliphatic side chain better maintains electronic density and hydrophobicity in that particular site. As mentioned, this mutant was able to transform 4-methoxyphenol at a slightly lower rate than the wild type enzyme. However, the residual activity during 4-methoxyphenol oxidation was higher, thus resulting in a more efficient catalyst in terms of showing a higher operational stability, suggesting this was indeed an oxidizable position.

Regarding the F413A variant, our results suggest that solvent exposure may be the most important factor leading to oxidation susceptibility, as the mutant was as active as the wild type enzyme (1.5-fold higher catalytic efficiency with syringaldazine and similar initial rate with 4-methoxyphenol) however it displayed a 2.5-fold increase in operational stability. As mentioned above, other works suggest the residue present in this position may influence substrate binding through steric effects [56]. In fungal laccases this position is usually occupied by small apolar residues, such as glycine and alanine. Nevertheless, its removal seems to affect the operational stability in a more pronounced fashion that the activity towards phenolic substrates. In the QM-MM simulations, F413 allocated spin density only in the “plus one electron” system (Table 2) and in two conformations: a highly frequent (conformation 1, Fig. 3C) and a less frequent (conformation 6, Fig. 3C) conformation, thus highlighting the importance of sampling the protein conformational space for simulating chemical processes such as electron transfer.

4. Conclusions

Theoretical tools are progressively used as complementary tools for designing proteins, including enzymes, with novel or enhanced properties [64–66]. QM-MM based strategies in combination with protein engineering tools have been used before to reduce turnover-derived or so called “suicide inactivation” of oxidoreductases [33]. In this work we aimed to design more stable variants of a fungal laccase, with a higher efficiency (in terms of spent catalyst) for the oxidation of phenols, which proceeds through the generation of free radical species. Our results show that the simulation of activated states (plus and minus one electron) of the enzyme, concentrating on the first and second coordination sphere of T1 Cu, led to the identification of residues prone to oxidation. This was experimentally observed after replacing such residues by less oxidizable ones, which resulted in variants that were more than or as active as the wild type enzyme and showed a higher operational stability during the oxidation of a substituted phenol. Interestingly, QM-MM simulations based on considering the activated state as a species with one extra electron seemed to produce better predictions. Also, it became important to explore different protein conformations (obtained through MD simulations) to better predict target residues. Finally, through these simulations it may be possible to also detect important residues for productive electron transfer (i.e. from substrate through T1, T2 and T3 sites to oxygen), as one variant (F475I) displayed higher activity than wild type enzyme with a model substrate, albeit low operational stability. Following this reasoning, possible targets for site-directed mutagenesis in order to elucidate their role in laccase activity and stability may be Met348 and Glu478, which in spite

of being relatively far away from the T1 site (12.9 and 12.8 Å), it allocated a significant amount of spin density in the side chain.

Acknowledgments

The authors thank Biol. Rosa Román, M.B. Timoteo Olamendi Portugal and Dra. Adelaida Diaz Vilchis for technical support, and acknowledge Dr. Sergio Andrés Águila Puentes for his support with Desmond software usage. For all simulations, UNAM-DGTIC granted access to supercomputer Miztlil through LANCAD-UNAM-DGTIC-293, SC16-1-S-24, SC15-1-S-29 y SC14-1-S-93. This work was supported by the people of Mexico through Conacyt 179241, PAPIIT IN201612 and IN209116. Fuerza Mexico. M. Avelar is grateful for scholarship number 245426 from CONACYT-Mexico for her PhD studies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.10.007>.

References

- [1] D.M. Mate, M. Alcalde, *Microb. Biotechnol.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12422>.
- [2] E. Sierra, A. Miranda-Molina, E. Castillo, H. Hu, M. Ayala, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92 (2017) 2691–2698.
- [3] P. Upadhyay, R. Shrivastava, P.K. Agrawal, *3 Biotech* 6 (2016) 15.
- [4] P. Zucca, G. Cocco, F. Sollai, E. Sanjust, *Biocatalysis* 1 (2015) 82–108.
- [5] E.I. Solomon, U.M. Sundaram, T.E. Machonkin, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2563–2606.
- [6] S.M. Jones, E.I. Solomon, *Cell. Mol. Life Sci.* 72 (2015) 869–883.
- [7] E.I. Solomon, A.J. Augustine, J. Yoon, *Dalton Trans.* (2008) 3921–3932.
- [8] C. Galli, P. Gentili, *J. Phys. Org. Chem.* 17 (2004) 973–977.
- [9] D.J. Kosman, *Inorg. Chim. Acta* 361 (2008) 844–849.
- [10] R.A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Bioenergetics* 811 (1985) 265–322.
- [11] E.I. Solomon, R.K. Szilagy, S. DeBeer George, L. Basumallick, *Chem. Rev.* 104 (2004) 419–458.
- [12] H.B. Gray, J.R. Winkler, *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996) 537–561.
- [13] H.B. Gray, J.R. Winkler, *Biophys. Acta Bioenerg.* 1797 (2010) 1563–1572.
- [14] M.T. Cambria, D. Gullotto, S. Garavaglia, A. Cambria, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 30 (2012) 89–101.
- [15] T. Bertrand, C. Jolival, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak, C. Mougín, *Biochemistry* 41 (2002) 7325–7333.
- [16] F. de Salas, I. Pardo, H.J. Salavagione, P. Aza, E. Amougí, J. Vind, A.T. Martínez, S. Camarero, *PLoS One* 11 (2016) e0164958.
- [17] J. Su, J. Fu, Q. Wang, C. Silva, A. Cavaco-Paulo, *Crit. Rev. Biotechnol.* (2017) 1–14.
- [18] X. Sun, R. Bai, Y. Zhang, Q. Wang, X. Fan, J. Yuan, L. Cui, P. Wang, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171 (2013) 1673–1680.
- [19] L. Gianfreda, F. Sannino, M.T. Filazzola, A. Leonowicz, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 4 (1998) 13–23.
- [20] J. Kulyk, K. Krikstopaitis, A. Ziemys, P. Schneider, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 18 (2002) 99–108.
- [21] S. Kurniawati, J.A. Nicell, *Enzym. Microb. Technol.* 41 (2007) 353–361.
- [22] S. Kurniawati, J.A. Nicell, *Biotechnol. Prog.* 25 (2009) 763–773.
- [23] K. Li, F. Xu, K.-E.L. Eriksson, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 2654–2660.
- [24] S.J. Kim, J.C. Joo, B.K. Song, Y.J. Yoo, Y.H. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* 112 (2015) 668–676.
- [25] D.C. Bressler, P.M. Fedorak, M.A. Pickard, *Biotechnol. Lett.* 22 (2000) 1119–1125.
- [26] M.A. Pickard, R. Roman, R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 3805–3809.
- [27] C. Torres-Duarte, R. Roman, R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, *Chemosphere* 77 (2009) 687–692.
- [28] C. Torres-Duarte, M.T. Viana, R. Vazquez-Duhalt, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168 (2012) 864–876.
- [29] H.A. Vandertol-Vanier, R. Vazquez-Duhalt, R. Tinoco, M.A. Pickard, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29 (2002) 214–220.
- [30] S. Acebes, F.J. Ruiz-Dueñas, M. Toubes, V. Sáez-Jiménez, M. Pérez-Boada, M.F. Lucas, A.T. Martínez, V. Guallar, *J. Phys. Chem. B* 121 (2017) 3946–3954.
- [31] V. Guallar, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 13460–13464.
- [32] V. Guallar, F. Wallrapp, *J. R. Soc. Interface* 5 (2008) 233.
- [33] A. Vidal-Limón, S. Águila, M. Ayala, C.V. Batista, R. Vazquez-Duhalt, *J. Inorg. Biochem.* 122 (2013) 18–26.
- [34] F. Wallrapp, D. Masone, V. Guallar, *J. Phys. Chem. A* 112 (2008) 12989–12994.
- [35] R. Roman, C. Torres-Duarte, M. Ayala, R. Vazquez-Duhalt, *Rev. Mex. Micol.* 32 (2010) 19–27.
- [36] S. Camarero, I. Pardo, A.I. Cañas, P. Molina, E. Record, A.T. Martínez, M.J. Martínez, M. Alcalde, *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (2012) 1370–1384.
- [37] M. Avelar, C. Olvera, D. Aceves-Zamudio, J.L. Folch, M. Ayala, *Protein Expr. Purif.* 136 (2017) 14–19.

- [38] H. Li, A.D. Robertson, J.H. Jensen, *Proteins Struct. Funct. Bioinformatics* 61 (2005) 704–721.
- [39] M.H.M. Olsson, C.R. Søndergaard, M. Rostkowski, J.H. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.* 7 (2011) 525–537.
- [40] L. Rulíšek, E.I. Solomon, U. Ryde, *Inorg. Chem.* 44 (2005) 5612–5628.
- [41] J.L. Banks, H.S. Beard, Y. Cao, A.E. Cho, W. Damm, R. Farid, A.K. Felts, T.A. Halgren, D.T. Mainz, J.R. Maple, R. Murphy, D.M. Philipp, M.P. Repasky, L.Y. Zhang, B.J. Berne, R.A. Friesner, E. Gallicchio, R.M. Levy, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1752–1780.
- [42] L. Hu, M. Farrokhnia, J. Heimdal, S. Shleev, L. Rulíšek, U. Ryde, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 13111–13126.
- [43] C. Remenyi, R. Reviakine, M. Kaupp, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 8290–8304.
- [44] N. Reuter, A. Dejaegere, B. Maigret, M. Karplus, *J. Phys. Chem. A* 104 (2000) 1720–1735.
- [45] A.D. Becke, *Phys. Rev. A* 38 (1988) 3098–3100.
- [46] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785–789.
- [47] B. Miehlich, A. Savin, H. Stoll, H. Preuss, *Chem. Phys. Lett.* 157 (1989) 200–206.
- [48] H.M. Senn, W. Thiel, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 1198–1229.
- [49] M.D. Aitken, P.E. Heck, *Biotechnol. Prog.* 14 (1998) 487–492.
- [50] K.J. Baynton, J.K. Bewtra, N. Biswas, K.E. Taylor, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1206 (1994) 272–278.
- [51] H.S. Kim, D.H. Cho, K. Won, Y.H. Kim, *Enzym. Microb. Technol.* 45 (2009) 150–155.
- [52] S.J. Kim, J.C. Joo, H.S. Kim, I. Kwon, B.K. Song, Y.J. Yoo, Y.H. Kim, *J. Biotechnol.* 189 (2014) 78–85.
- [53] V. Guallar, F.H. Wallrapp, *Biophys. Chem.* 149 (2010) 1–11.
- [54] F.H. Wallrapp, V. Guallar, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 1 (2011) 315–322.
- [55] E. Monza, M.F. Lucas, S. Camarero, L.C. Alejaldre, A.T. Martínez, V. Guallar, *J. Phys. Chem. Lett.* 6 (2015) 1447–1453.
- [56] I. Pardo, G. Santiago, P. Gentili, F. Lucas, E. Monza, F.J. Medrano, C. Galli, A.T. Martínez, V. Guallar, S. Camarero, *Cat. Sci. Technol.* 6 (2016) 3900–3910.
- [57] U. Ryde, M.H.M. Olsson, *Int. J. Quantum Chem.* 81 (2001) 335–347.
- [58] U. Ryde, M.H.M. Olsson, B.O. Roos, J.O.A. De Kerpel, K. Pierloot, *J. Biol. Inorg. Chem.* 5 (2000) 565–574.
- [59] C. Galli, P. Gentili, C. Jolivald, C. Madzak, R. Vadalà, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91 (2011) 123.
- [60] D. Maté, C. García-Burgos, E. García-Ruiz, A.O. Ballesteros, S. Camarero, M. Alcalde, *Chem. Biol.* 17 (2010) 1030–1041.
- [61] S. Yanagisawa, P.B. Crowley, S.J. Firkbank, A.T. Lawler, D.M. Hunter, W. McFarlane, C. Li, T. Kohzuma, M.J. Banfield, C. Dennison, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 15420–15428.
- [62] L.J.C. Jeuken, P. van Vliet, M.P. Verbeet, R. Camba, J.P. McEvoy, F.A. Armstrong, G.W. Canters, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 12186–12194.
- [63] L. Quintanar, C. Stoj, A.B. Taylor, P.J. Hart, D.J. Kosman, E.I. Solomon, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 445–452.
- [64] J. Damborsky, J. Brezovsky, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19 (2014) 8–16.
- [65] F. García-Guevara, M. Avelar, M. Ayala, L. Segovia, *Biocatalysis* 1 (2014) 109–117.
- [66] G. Kiss, N. Çelebi-Ölçüm, R. Moretti, D. Baker, K.N. Houk, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 5700–5725.



Recombinant expression of a laccase from *Coriolopsis gallica* in *Pichia pastoris* using a modified α -factor preproleader



Mayra Avelar^a, Clarita Olvera^a, Denise Aceves-Zamudio^b, Jorge Luis Folch^b,
Marcela Ayala^{a,*}

^a Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología UNAM, Av. Universidad 2001 Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

^b Centro de Investigación en Biotecnología UAEM, Av. Universidad 2001 Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2017

Received in revised form

27 April 2017

Accepted 3 June 2017

Available online 5 June 2017

Keywords:

Laccase

Fungal enzyme

Yeast

Recombinant protein

Kinetic characterization

Metalloenzyme

ABSTRACT

In this work we communicate the heterologous expression of a laccase from *Coriolopsis gallica* in *Pichia pastoris*. This enzyme has been reported to efficiently degrade a variety of pollutants such as industrial dyes. The expression strategy included using a previously reported modified α -factor preproleader for enhanced secretion and pAOX1, a methanol-responsive promoter. Methanol concentration, copper salts concentration and temperature were varied in order to enhance laccase expression in this heterologous system. A volumetric activity of 250 U/L was achieved after 12-day culture in Fernbach flasks. The protein was recovered from the supernatant and purified, obtaining a preparation with 90% electrophoretic purity. The catalytic constants of the recombinant enzyme are almost identical to the fungal enzyme, thus rendering this system a useful tool for protein engineering of laccase from *C. gallica*.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Laccases are enzymes with biotechnological applications ranging from bioremediation to synthesis of pharmaceutically relevant molecules. The most efficient laccases come from fungi, particularly from basidiomycetes because of their high redox potential. Fungal laccases are able to catalyze the oxidation of a wide range of organic substrates. Protein engineering of laccases is desirable to improve properties such as operational stability, pH stability, solvent stability and thermostability. Heterologous expression of fungal laccases has been carried out in various systems, although yeasts and other fungi have been the most successful to date (for a recent review, see Ref. [1] and references therein). Although high expression levels of fungal laccase have been attained in filamentous fungi such as *Aspergillus* and *Trichoderma* sp (800–1000 mg/L), yeasts represent a more adequate alternative for protein engineering of enzymes. Due to low expression levels of fungal laccases in yeasts, one original and successful strategy to enhance expression is the optimization of the

secretion level by means of directed evolution. The most significant example is the extracellular expression of a laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* in *Saccharomyces cerevisiae* [2]. Mutations in the signal peptide (α -factor preproleader) and in the protein sequence were accumulated through rounds of directed evolution when selecting for higher activity in the supernatant. Apparently, these mutations were beneficial for the secretion of the enzyme into the culture medium and did not affect its catalytic behavior. In this paper we made use of this evolved signal peptide for the recombinant expression of the laccase from *Coriolopsis gallica* (LcGg) using *Pichia pastoris* as host. Laccase from *C. gallica* has received attention for applications in enzyme-based fuel cells [3,4] and has been reported to efficiently degrade a wide range of industrial dyes [5,6]; other applications in the environmental field include oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) [7–9], endocrine disruptors [10] and pesticides [11]. In general, fungal laccases show great potential for a number of biotechnological applications (for recent reviews, see Refs. [12–14]).

The effect of variables such as copper content, temperature and methanol concentration for induction on laccase activity was explored. A simple purification procedure was established rendering a recombinant enzyme with 90% electrophoretic purity. Kinetic characterization was performed and it was established that

* Corresponding author.

E-mail address: maa@ibt.unam.mx (M. Ayala).

the recombinant enzyme is similar to the wild type laccase, thus opening the possibility to perform protein engineering using this expression system.

2. Material and methods

2.1. Reagents and microorganisms

Culture media reagents were purchased from Difco (yeast extract, peptone, yeast nitrogen base, agar) and (biotin, sorbitol) Sigma. HPLC grade methanol, glycerol, glucose and salts were from JT Baker. Other reagents such as 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), zeocin, syringaldazine, etc. were acquired from Sigma. *Pichia pastoris* strain X33 wild type (Mut⁺) was from Invitrogen. *E. coli* strain MC1061 was used as host for recombinant plasmid production and was kindly donated by Leticia Olvera (IBT-UNAM).

2.2. *Pichia pastoris* culture media

The following culture media were utilized. Yeast extract, peptone and dextrose medium (YPD) contained (per liter): 10 g yeast extract, 20 g peptone and 20 g glucose. For YPD medium containing sorbitol (YPDS), 1 M sorbitol was added. YPD/YPDS slants were prepared by adding 20 g agar. Mineral medium (MM contained (per liter)): 13.4 g yeast nitrogen base with ammonium sulfate and without amino acids, 400 µg biotin, 5 mL methanol, 0.2 mM ABTS and 0.1 mM CuSO₄. BMGY medium contained (per liter): 10 g yeast extract, 20 g peptone, 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6), 13.4 g yeast nitrogen base with ammonium sulfate and without amino acids, 400 µg biotin and 10 g glycerol. BMM medium containing per liter: 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6), 13.4 g yeast nitrogen base with ammonium sulfate and without amino acids, 400 µg biotin and 10 mL methanol.

2.3. Laccase (LcCg) gene sequencing from *Coriopsis gallica* cDNA

Laccase from *C. gallica* (LcCg) UAMH8260 was produced and purified according to Román et al. [15]. Amino terminal sequence (15 residues) was obtained through Edman sequencing. Alignments of several *C. gallica* laccase DNA sequences were performed using the Clustal W program [16]. Amino terminal sequence with accession number DQ431715 was identical to the sequenced amino terminal, thus oligonucleotides were designed using this sequence. Primers were as follows: Fwd primer: **TCT AGA** ATG GCC AGG TTC CAA TCT CT and reverse primer: **GAA TTC** TTA CTG GTC AGG CGA GA, with *Xba*I and *Eco*RI sites (in bold, respectively) for further cloning.

For RNA purification, *C. gallica* UAMH8260 was grown as previously described [15] in an agitated flask using commercial bran flakes as carbon and energy source, at pH6, 28 °C and under an agitation of 180 rpm. After 6 days, when maximum laccase expression was attained, the mycelia was recovered by centrifugation and frozen at –70 °C. RNA extraction was performed using Trizol[®] according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesis was performed using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, #Cat. K1631) following the manufacturer's instructions. The PCR conditions to amplify the cDNA were 94 °C 5' followed by 30 cycles of 94 °C 30"; 58 °C, 1'; 68 °C 5' and a final step of 68 °C 5'. The cDNA was cloned in the pJet[®] vector for Sanger sequencing. Sequencing was performed at the Instituto de Biotecnología of the National Autonomous University of Mexico (IBT-UNAM).

2.4. Construction of expression vector and transformation into *Pichia pastoris*

LcCg gene sequence was modified to account for preferential codon usage of *Pichia pastoris* (supplementary data). The optimized sequence was provided by GenScript in the pPICZB vector, under the control of an AOX1 promoter. The signal peptide was a previously reported modified version of the α-factor preproleader from *Saccharomyces cerevisiae* [2]; mutations obtained by directed evolution according to this report were included in the signal peptide, in order to test the level of active protein secretion. The construction was flanked by *Eco*RI sites. The vector α-fLcCg-pPICZB was introduced by electroporation into *P. pastoris* strain X33. *Sac*I restriction enzyme was used to linearize the plasmid before transformation. Transformants were selected by zeocin resistance in YPDS agar plates and transferred to MM medium agar plates supplemented with 0.2 mM ABTS and 0.1 mM CuSO₄. Laccase-producing colonies developed a green halo around them and were selected for further studies.

2.5. Effect of copper concentration, temperature and methanol addition

Cultures were performed using 500 mL baffled flasks with 50 mL of medium, at 250 rpm. A colony was incubated in 25 mL of BMGY as described above until an absorbance (600 nm) of 4–6 was reached, the pellet was re-suspended to an absorbance around 1. Methanol additions were performed every 24 h. Laccase activity and absorbance at 600 nm were measured on a daily basis. All measurements were performed at least in triplicate.

2.6. Recombinant laccase production

A laccase-producing colony was transferred from YPD plates into 300 mL of BMGY and cultured at 30 °C and 200 rpm, until an absorbance (600 nm) of 8–10 was reached. Cells were recovered after centrifugation at 8000 rpm and 4 °C during 15 min and re-suspended in 500 mL of BMM expression medium with 0.5 mM CuSO₄ and 0.8% alanine [17] to a final absorbance of 4–5. The culture was incubated in baffled Fernbach flasks at 28 °C and 250 rpm. Laccase activity and absorbance at 600 nm were measured on a daily basis. All measurements were performed at least in triplicate.

2.7. Laccase activity assay and protein concentration measurements

Enzyme assays were performed following standard protocols [18]. Briefly, the reaction was measured in a mixture containing 50 µM syringaldazine, 10% v/v ethanol and succinate buffer 60 mM, pH 4.5 at room temperature. The reaction was started by addition of the enzyme; initial rate was calculated from the change in absorbance at 530 nm over time due to product formation ($\epsilon = 64,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) with an Agilent 8453 UV–visible spectrophotometer. One unit is defined as the amount of enzyme that produced 1 µM of product per minute. All measurements were performed in triplicate. Protein concentration was measured by Bradford assay using a calibration curve based on bovine serum albumin (2–20 µg/mL).

2.8. Purification of recombinant LcCg

The culture was centrifuged in two steps: first at 8000 rpm and 4 °C for 15 min, then the cell free supernatant was centrifuged at 14,000 rpm at 4 °C during 15 min. After centrifugation the supernatant was concentrated by ultrafiltration (30 kDa cut off). The

concentrate was loaded into a DEAE-cellulose anion exchange column (150 mL) and eluted with phosphate buffer 10 mM, pH 6. Fractions with laccase activity were pooled and concentrated by ultrafiltration (10 kDa cut off). The sample was further purified by size exclusion chromatography using a G75 Sephadex column (120 mL) equilibrated with phosphate buffer 60 mM, pH = 6. Fractions with laccase activity and similar specific activity were pooled and concentrated by ultrafiltration (10 kDa cut off). Samples from each purification step were analyzed by SDS-PAGE.

2.9. Deglycosylation of recombinant LcCg

Recombinant laccase was N-deglycosylated with PNGaseF from Biolabs. 10 µg of protein were denatured at 100 °C for 10 min. After denaturation, deglycosylation reaction was performed adding 500 U of PNGaseF and incubating at 37 °C for 1 h. Deglycosylation was confirmed by SDS-PAGE.

3. Results and discussion

Gene sequence of LcCg was obtained from cDNA of *Corioliopsis gallica* UAMH 8260 grown under laccase-producing conditions and deposited in GenBank (accession number KX932046). Laccase sequences from *C. gallica* genomic DNA and mRNA (complete cds) are available in databases; it has been reported that most *C. gallica* strains produce only one laccase [5,19]. The laccase sequence obtained in this work is practically identical both at the nucleotide and amino acid sequence (upon translation) levels to other reported sequences from *C. gallica*, as expected (Table 1). It also shows remarkable similarity to laccases from other basidiomycetes, such as *Trametes* sp., *Corioliopsis caperata* and *Corioliopsis trogii*.

GenScript provided a vector with LcCg gene sequence preceded by a modified version of the α -factor preproleader and under the control of the methanol inducible alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter; according to previous reports centered on developing engineering platforms for recombinant expression of laccases, accumulated mutations in the sequence of the α -factor preproleader could account for 40-fold improvement in *S. cerevisiae* secretion of recombinant laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* [2]. This approach has been successfully applied for the recombinant expression of fungal laccases and peroxidases [2,20,21], which has been a challenge for several decades in the protein engineering field precisely because of a lack of efficient heterologous expression systems.

The *C. gallica* laccase used in this work is 75% and 95% identical to the laccases from *P. cinnabarinus* and PM1 (at the amino acid sequence level), respectively. According to previous reports on the heterologous production in *S. cerevisiae*, *P. cinnabarinus* and PM1 laccase expression level with the α -factor preproleader was 0.03 U/L [2] and 0.035 U/L [22], respectively, barely detectable with the screening assay. Thus, similar secretion problems could be encountered for heterologous expression of laccase from *C. gallica*



Fig. 1. Plate activity assay with ABTS to detect laccase-producing (bluish halo) *P. pastoris* colonies.

in *P. pastoris*. Given the similarities between these particular fungal laccases and in order to overcome secretion hurdles, we utilized the previously reported evolved α -factor preproleader harboring the following mutations: A9D, F48S, S58G, G62R and E86G [2]. This signal peptide is comprised by two regions: the pre-leader region (first 19 residues) directs the nascent polypeptide into the endoplasmic reticulum (ER) and is cleaved off by a peptidase. The pro-leader region is thought to aid in the protein transfer from the ER to the Golgi compartment, and is further removed by the Kex2p protease [23].

The beneficial effects of some of these mutations may be rationalized based on other reports. For example, the F48S mutation becomes favored in directed evolution studies aimed at improving secretion levels in *S. cerevisiae* of different proteins, such as single-chain antibodies, full IgG, horseradish peroxidase and an interleukin-2 mutant [24], presumably by conferring a higher polarity and flexibility to the pro-leader region [23]. Similarly, the G62R mutation flanks the hydrophobic LLFI motif; the inclusion of polar amino acids in this region has been associated with increased heterologous protein secretion in *S. cerevisiae* [24]. The A9D mutation is puzzling, as the alanine residue in this position is predicted to conform a hydrophobic core in the α -helix of the pre-leader region. Disruption of this hydrophobic core could certainly lead to decreased protein secretion, or perhaps only alter the translocation kinetics along the endoplasmic reticulum, decreasing the time the nascent polypeptide remains arrested [25].

This modified signal peptide allowed the production of an extracellular, functional fungal laccase using *Pichia pastoris* as host. After transformation of vector α -fLcCg-pPICZB in *P. pastoris*, several colonies were detected able to create a bluish halo signaling the oxidation of ABTS (Fig. 1), a standard laccase substrate. Transformation of *P. pastoris* with pPICZB plasmid without LcCg gene was performed as a control; none of these colonies showed a bluish

Table 1
Sequence comparison between LcCg and other laccases, as obtained from BLAST (translated nucleotide sequences, only data obtained from genomic and mRNA analysis are shown).

Protein sequence ID	Organism	Query cover (%)	Identity (%)	Remarks
CAC13040.1	<i>Corioliopsis trogii</i>	99	96	Strain DSM 11919, from genomic DNA
AVJ90967.1	<i>Corioliopsis gallica</i>	99	95	Strain TCK, from mRNA
ABD93940.1	<i>Corioliopsis gallica</i>	99	95	Strain SAH-12, from genomic DNA
CAA78144.1	Basidiomycete Pm1	99	95	From genomic DNA
AAF06967.1	<i>Trametes</i> sp C30	99	95	From genomic DNA
AJV90966.1	<i>Corioliopsis gallica</i>	99	94	Strain TCK, from mRNA
ACS26245.1	<i>Corioliopsis gallica</i>	99	94	From mRNA
AAW65489.1	<i>Corioliopsis gallica</i>	95	93	From mRNA, partial cds
AGE13770.1	<i>Corioliopsis caperata</i>	99	90	From mRNA

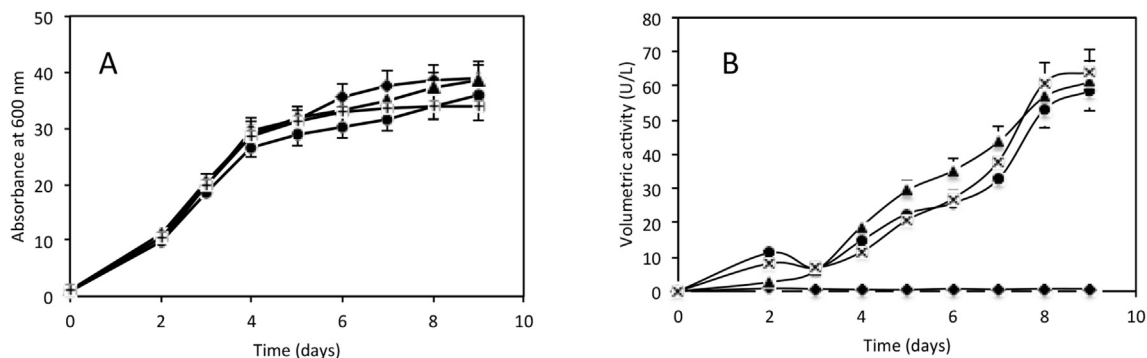


Fig. 2. Effect of copper concentration on *P. pastoris* growth (A) and laccase volumetric activity (B). Without copper (diamond), 0.05 mM (circle), 0.1 mM (triangle) and 0.5 mM (square). Culture conditions are: BMM medium, adding 1% methanol every 24 h, at 250 rpm and 28 °C.

halo. To the best of our knowledge, there is only one report on heterologous expression of laccase from *C. gallica* [26] and it was expressed in *Kluyveromyces lactis*; however, volumetric activity was not measured and unfortunately cannot be compared with the results shown here.

One colony secreting active laccase was selected for further protein production in liquid culture. In order to find culture conditions that would favor laccase production, temperature, copper concentration and methanol additions were varied and both growth and laccase activity were monitored for several days in shake flasks cultures. According to the results (Fig. 2), in the absence of copper no laccase activity could be detected for the LcCg transformant; in this case, a low copper concentration (0.05 mM) is sufficient to support laccase production. Similarly, low copper concentrations (0.004 mM–0.5 mM) are required for heterologous production of other laccases in *P. pastoris* [17,27,28]. No inhibitory effect on yeast growth was observed under the assayed copper concentrations. For other systems such as *S. cerevisiae*, copper concentration of around 0.1–2 mM is required for optimal enzyme production [2,29]. In general, heterologous laccase production in *P. pastoris* shows low expression levels [30,31].

As an inductor and a carbon source for *P. pastoris*, methanol concentration is another important variable that should be optimized. We found that for the expression system described in this work, there was an optimum methanol concentration of 2% as shown in Fig. 3. According to literature, methanol concentration may vary between 0.4 and 2% for cultures performed in flasks [28,32,33]. Finally, using 0.5 mM Cu^{+2} and 1% methanol, we lowered the culture temperature to 20 °C, as a decreased temperature has been reported to favor fungal laccase expression in *P. pastoris* (2–6-fold) [32,34] and *S. cerevisiae* (16-fold) [2,35]. However, in our case lowering the temperature resulted in a negative effect;

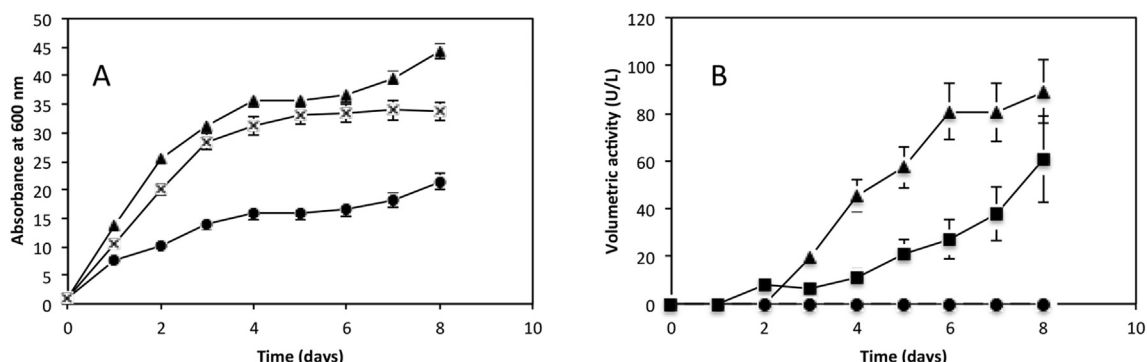


Fig. 3. Effect of methanol concentration on *P. pastoris* growth (A) and laccase volumetric activity (B). 0.5% v/v (circle), 1% v/v (square) and 2% v/v (triangle) were added every 24 h.

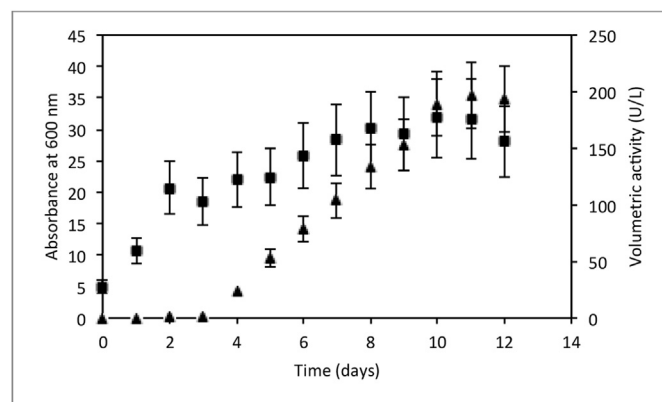


Fig. 4. Yeast growth (square) and laccase volumetric activity (triangle) profile for a culture carried out in Fernbach flasks, at 0.5 mM copper, 1% methanol, 28 °C and 250 rpm.

although growth was not affected, no activity in the supernatant could be detected.

A successful heterologous expression is highly dependent on the protein, as even homologous proteins may be produced with drastically different efficiencies [1]. For example, two laccases from *Coprinus comatus* were expressed in *P. pastoris* at levels of 0.6 and 1.4 U/mL [36], whereas a laccase-encoding gene of *Trametes versicolor* was expressed in *P. pastoris* at levels around 12 U/mL [33]. A laccase from *Pycnoporus sanguineus* was expressed in the same system reaching 4.7 U/mL after optimization of the culture conditions [28]. A laccase from *Trametes troggi* was expressed in *P. pastoris* using a bench-top fermentor, at levels of 2.5 U/mL [37].

On the other hand, a low volumetric activity of 0.6858 U/mL was obtained for the expression of *Ganoderma lucidum* laccase [34]. Other strategies could be included in order to improve production levels, such as: controlling medium pH, including alanine into the medium; and varying initial biomass for induction. In this case, albeit a low volumetric activity was observed, it was sufficient to attempt enzyme purification and further characterization.

Recombinant yeast was cultivated in Fernbach flasks at 0.5 mM copper, 1% methanol and 28 °C in order to obtain enough protein for biochemical and kinetic characterization. A typical profile of both growth and extracellular laccase activity is shown in Fig. 4. In this system, a higher volumetric activity of 0.25 U/mL was obtained compared to 0.1 U/mL in smaller flasks. Previous observations demonstrate higher protein expression is obtained when mass transfer of oxygen to the liquid phase is enhanced [38], which could be the case in the Fernbach system. After 12 days, supernatant was recovered by centrifugation and purification was performed as described in the experimental section. We observed that although the enzyme should have interacted with the DEAE resin (theoretical $pI = 4.62$) it was not retained in the column and instead it eluted with low concentration buffer. This may be due to the

competing effect of salts in the medium (100 mM phosphate salts); in this case, it was actually beneficial from the purification perspective, as impurities were retained in the column and after this purification step, specific activity increased by 2.6-fold. Yield and purification factors for each step are shown in Table 2. According to image analysis, LcCg shows at least 90% electrophoretic purity (Fig. 5A).

The recombinant enzyme showed a slightly higher molecular weight compared to the native enzyme (60.4 kDa vs 63.7 kDa). *Pichia pastoris* is not a hyperglycosylating host, so a recombinant laccase with similar molecular weight to the fungal enzyme was expected. Only two glycosylation sites are present in the fungal enzyme, corresponding to Asn 51 and 433, when compared to crystal structure of *Corioloropsis caperata* laccase, PDB 4JHU and *Corioloropsis gallica* laccase, PDB 4A2H. Treatment of the recombinant enzyme with PGNase F results in a smaller band of approximately 55 kDa (Fig. 5B) that corresponds with the expected molecular weight of deglycosylated laccase (approx. 53 kDa). Thus, a slightly longer glycosyl moiety at the mentioned positions could be responsible for the observed increase in molecular weight of the recombinant enzyme. These subtle differences did not affect the

Table 2
Purification factor and yield of LcCg upon different purification steps.

Step	Total activity (U)	Total protein concentration (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification factor (-fold)
Cell-free supernatant	97.7	40.3	2.41	100	1
Ultrafiltration	93	12.98	7.16	95.2	3
DEAE	59.3	3.15	18.82	60.7	7.8
G75 Sephadex	43.7	0.62	70.48	44.7	29.2

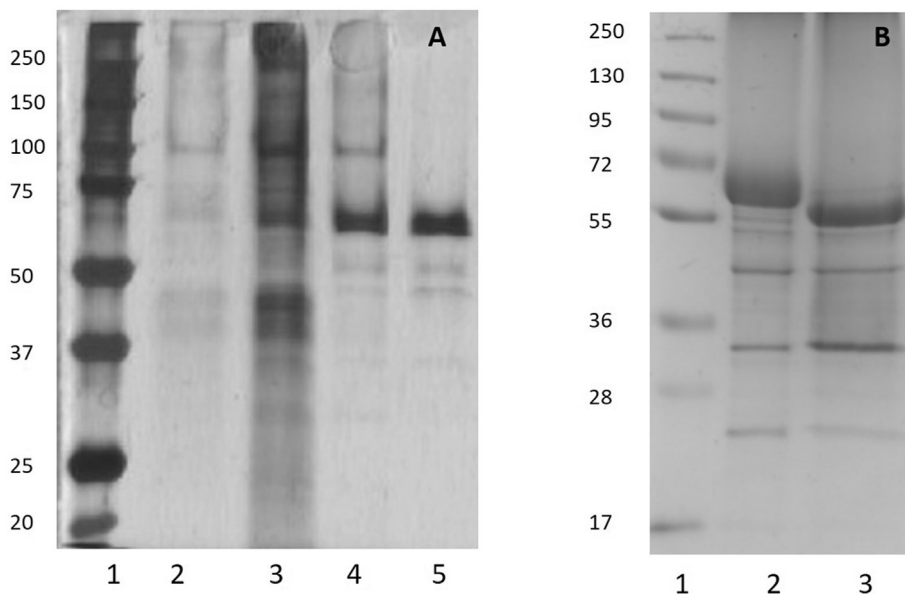


Fig. 5. A) SDS-PAGE (silver stained) of different purification steps. Lane 1: molecular weight marker (kDa); lane 2: culture supernatant; lane 3: concentrated culture supernatant (25-fold); lane 4: pooled fractions from DEAE; lane 5: pooled fractions from G75 Sephadex. 1 μ g of total protein was loaded on each lane. B) SDS-PAGE (Coomassie stained) of deglycosylation experiment. Lane 1: molecular weight marker (kDa); lane 2: recombinant laccase; lane 3: recombinant laccase treated with PGNase F.

Table 3
Kinetic constants for syringaldazine of recombinant LcCg produced by *Pichia pastoris*.

Enzyme	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μ M)	k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)
Recombinant laccase	106 \pm 6	9.6 \pm 1.3	1.1 $\times 10^7$
Wild-type laccase from <i>C. gallica</i> UAMH8260	165 \pm 12	10 \pm 1.8	1.7 $\times 10^7$

catalytic properties of the recombinant enzyme, as the catalytic constants for syringaldazine are similar to those of the fungal enzyme, as shown in Table 3.

4. Conclusions

In this work we achieved the recombinant production and purification of a fungal laccase from *Corioliopsis gallica* UAMH8260 using *Pichia pastoris*, a heterologous host producing no laccases. In order to favor extracellular secretion we selected a modified α -factor preproleader that has been reported to enhance laccase secretion in other yeast systems. By optimizing some culture conditions such as temperature, methanol concentration and copper concentration, we were able to achieve a volumetric activity of 250 U/L, corresponding to approximately 3.75 mg/L of laccase in the crude supernatant. This production level is enough for producing, purifying and characterizing variants arising from protein engineering studies, which was our main goal. The recombinant protein is functionally similar to the wild type enzyme, as reflected in the values of the catalytic constants, suggesting proper copper coordination and protein folding.

Acknowledgments

Authors wish to acknowledge Timoteo Olamendi-Portugal for assistance in Edman sequencing, and Biol. Rosa Román, Ing. Leticia Olvera and Dra. Adelaida Diaz Vilchis for technical support. We also acknowledge UNAM-DGTIC for access to supercomputer Miztli. This work was supported by Conacyt 179241, PAPIIT 201612 and 209116. MA is grateful for scholarship number 245426 from CONACYT-Mexico for her PhD studies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2017.06.001>.

References

- [1] D.M. Mate, M. Alcalde, Laccase engineering: from rational design to directed evolution, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 25–40.
- [2] S. Camarero, I. Pardo, A.I. Cañas, P. Molina, E. Record, A.T. Martínez, M.J. Martínez, M. Alcalde, Engineering platforms for directed evolution of laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (2012) 1370–1384.
- [3] A.A. Arrocha, U. Cano-Castillo, S.A. Aguila, R. Vazquez-Duhalt, Enzyme orientation for direct electron transfer in an enzymatic fuel cell with alcohol oxidase and laccase electrodes, *Biosens. Bioelectron.* 61 (2014) 569–574.
- [4] J. Martínez-Ortiz, R. Flores, R. Vazquez-Duhalt, Molecular design of laccase cathode for direct electron transfer in a biofuel cell, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2626–2631.
- [5] A.M. Calvo, J.L. Copa-Patiño, O. Alonso, A.E. González, Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Corioliopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents, *Archives Microbiol.* 171 (1998) 31–36.
- [6] E. Rodríguez, M.A. Pickard, R. Vazquez-Duhalt, Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi, *Curr. Microbiol.* 38 (1999) 27–32.
- [7] D.C. Bressler, P.M. Fedorak, M.A. Pickard, Oxidation of carbazole, N-ethyl-carbazole, fluorene, and dibenzothioephene by the laccase of *Corioliopsis gallica*, *Biotechnol. Lett.* 22 (2000) 1119–1125.
- [8] M.A. Pickard, R. Roman, R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioliopsis gallica* UAMH 8260 laccase, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 3805–3809.
- [9] H.A. Vandertol-Vanier, R. Vazquez-Duhalt, R. Tinoco, M.A. Pickard, Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Corioliopsis gallica* laccase, *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 29 (2002) 214–220.
- [10] C. Torres-Duarte, M.T. Viana, R. Vazquez-Duhalt, Laccase-mediated transformations of endocrine disrupting chemicals abolish binding affinities to estrogen receptors and their estrogenic activity in zebrafish, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168 (2012) 864–876.
- [11] C. Torres-Duarte, R. Roman, R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, Halogenated pesticide transformation by a laccase–mediator system, *Chemosphere* 77 (2009) 687–692.
- [12] D.M. Mate, M. Alcalde, Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology, *Microb. Biotechnol.* (In Press), <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12422>
- [13] P. Upadhyay, R. Shrivastava, P.K. Agrawal, Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase, *3 Biotech.* 6 (2016) 15.
- [14] P. Zucca, G. Cocco, F. Sollai, E. Sanjust, Fungal laccases as tools for biodegradation of industrial dyes, *Biocatalysis* 1 (2015) 82–108.
- [15] R. Roman, C. Torres-Duarte, M. Ayala, R. Vazquez-Duhalt, Producción a escala piloto de la lacasa de *Corioliopsis gallica*, *Rev. Mex. Micol.* 32 (2010) 19–27.
- [16] M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, Clustal W and clustal X version 2.0, *Bioinformatics* 23 (2007) 2947–2948.
- [17] J. O'Callaghan, M.M. O'Brien, K. McClean, A.D.W. Dobson, Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*, *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 29 (2002) 55–59.
- [18] A. Leonowicz, K. Grzywnowicz, Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate, *Enzyme Microb. Technol.* 3 (1981) 55–58.
- [19] J.M. Carbajo, H. Junca, M.C. Terrón, T. González, S. Yagüe, E. Zapico, A.E. González, Tannic acid induces transcription of laccase gene *cglc1* in the white-rot fungus *Corioliopsis gallica*, *Can. J. Microbiol.* 48 (2002) 1041–1047.
- [20] E. Garcia-Ruiz, D. Gonzalez-Perez, Francisco J. Ruiz-Dueñas, Angel T. Martínez, M. Alcalde, Directed evolution of a temperature-, peroxide- and alkaline pH-tolerant versatile peroxidase, *Biochem. J.* 441 (2011) 487.
- [21] P. Molina-Espeja, E. Garcia-Ruiz, D. Gonzalez-Perez, R. Ullrich, M. Hofrichter, M. Alcalde, Directed evolution of unspecific peroxygenase from *Agrocybe aegerita*, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (2014) 3496–3507.
- [22] D. Maté, C. García-Burgos, E. García-Ruiz, A.O. Ballesteros, S. Camarero, M. Alcalde, Laboratory evolution of high-redox potential laccases, *Chem. Biol.* 17 (2010) 1030–1041.
- [23] M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, H. Schwab, Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 5301–5317.
- [24] J.A. Rakestraw, S.L. Sazinsky, A. Piatasi, E. Antipov, K.D. Wittrup, Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.* 103 (2009) 1192–1201.
- [25] S.F. Nothwehr, J.I. Gordon, Targeting of proteins into the eukaryotic secretory pathway: signal peptide structure/function relationships, *BioEssays* 12 (1990) 479–484.
- [26] A. Arana-Cuenca, A. Téllez-Jurado, S. Yagüe, E. Ferminán, J.M. Carbajo, A. Domínguez, T. González, J.C. Villar, A.E. González, Designificación de pasta kraft de *Pinus radiata* con una levadura genéticamente modificada para producir lacasa, *For. Syst.* 19 (2010) 234–240.
- [27] P.J. Collins, A. Dobson, Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 3444–3450.
- [28] L. Lu, M. Zhao, S.C. Liang, L.Y. Zhao, D.B. Li, B.B. Zhang, Production and synthetic dyes decolorization capacity of a recombinant laccase from *Pichia pastoris*, *J. Appl. Microbiol.* 107 (2009) 1149–1156.
- [29] H. Hoshida, T. Fujita, K. Murata, K. Kubo, R. Akada, Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (2005) 1090–1097.
- [30] L.-L. Kiiskinen, M. Saloheimo, Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a laccase gene from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 137–144.
- [31] S. Larsson, P. Cassland, L.J. Jönsson, Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 1163–1170.
- [32] F. Hong, N.Q. Meinander, L.J. Jönsson, Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Bioeng.* 79 (2002) 438–449.
- [33] Q. Li, J. Pei, L. Zhao, J. Xie, F. Cao, G. Wang, Overexpression and characterization of laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*, *Appl. Biochem. Microbiol.* 50 (2014) 140–147.
- [34] L.-F. You, Z.-M. Liu, J.-F. Lin, L.-Q. Guo, X.-L. Huang, H.-X. Yang, Molecular cloning of a laccase gene from *Ganoderma lucidum* and heterologous expression in *Pichia pastoris*, *J. Basic Microbiol.* 54 (2014) S134–S141.
- [35] P. Cassland, L. Jönsson, Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 (1999) 393–400.
- [36] C. Gu, F. Zheng, L. Long, J. Wang, S. Ding, Engineering the expression and characterization of two novel laccase isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by fusing an additional ten amino acids tag at N-Terminus, *PLoS One* 9 (2014) e93912.
- [37] M.C. Colao, S. Lupino, A.M. Garzillo, V. Buonocore, M. Ruzzi, Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme, *Microb. Cell Factories* 5 (2006) 31.
- [38] F. Villatte, A. Hussein, T. Bachmann, R. Schmid, Expression level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55 (2001) 463–465.

Review

Open Access

Fernando García-Guevara, Mayra Avelar, Marcela Ayala, Lorenzo Segovia*

Computational Tools Applied to Enzyme Design – a review

DOI 10.1515/boca-2015-0009

Received August 11, 2015; Accepted November 10, 2015

Abstract: The protein design toolbox has been greatly improved by the addition of enzyme computational simulations. Not only do they warrant a more ambitious and thorough exploration of sequence space, but a much higher number of variants and protein-ligand systems can be analyzed *in silico* compared to experimental engineering methods. Modern computational tools are being used to redesign and also for *de novo* generation of enzymes. These approaches are contingent on a deep understanding of the reaction mechanism and the enzyme's three-dimensional structure coordinates, but the wealth of information produced by these analyses leads to greatly improved or even totally new types of catalysis.

Keywords: protein engineering, enzyme design, molecular dynamics, quantum mechanics

1 Introduction

Modern experimental techniques lack the resolution to analyze phenomena as rapid as proton or electron transfer that take place in the 10^{-10} to 10^{-15} s range yet extremely solid theoretical methods have been developed to study these chemical reactions. These techniques have been refined to complement (and confirm) experimental studies and to predict undetectable events at an atomic or subatomic scale. The development of modern theoretical algorithms concurrent to the improvement of computer power has

greatly increased the practicality and effectiveness of computational chemistry for the study of biocatalysis. These methods are contingent on the knowledge of the enzyme's three-dimensional structure and of the reaction mechanism, but nowadays it is much easier to obtain this kind of information.

Computational simulations of enzymes are a powerful addition to the protein design toolbox. Not only do simulations allow for a more ambitious and tentative exploration of the sequence space, compared to experimental engineering methods, but also a respectable number of variants and protein-ligand systems can be analyzed *in silico*. Nowadays, computational tools have been applied for the re-design and *de novo* generation of enzymes. When *de novo* or re-designed enzymes are not very efficient catalysts, further refinement by protein engineering tools such as directed evolution can increase the catalytic parameters. At the moment, simulation tools such as molecular dynamics (MD) and hybrid methods combining quantum mechanics and molecular mechanics (QM-MM) have been utilized mainly to rationalize the success (or failure) of designed enzymes, or to reduce the universe of possibilities by ranking feasible designs [1,2]; however, as calculation methods improve and computing power increases, they could become a cornerstone for a whole new wave of modern biocatalysts [3].

2 *De novo* computational enzyme design

The research on natural enzyme mechanisms allows understanding, and ultimately proposing mechanisms to create artificial molecules with catalytic activity. One of the better-known enzymatic mechanisms is transition state stabilization; rationally designed transition-state analogs (haptens) have been employed with success to produce antibody molecules that catalyze numerous reactions. Catalytic antibodies are valuable tools for the study of biological catalysis. Analysis of representative antibody catalysts suggest a cause of their modest

*Corresponding author: Lorenzo Segovia, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, CP 62210, Cuernavaca, Morelos, México, Email: lorenzo@ibt.unam.mx

Fernando García-Guevara, Mayra Avelar, Marcela Ayala, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, CP 62210, Cuernavaca, Morelos, México

efficiency, compared to natural enzymes, is a consequence of imperfect hapten design and indirect selection [4].

A different path to create artificial enzymatic activity involves rational design of molecules with particular structure, which in turn determines activity. Rational enzyme design pursues two central goals, the first is to propose a mechanism for speeding up the desired reaction, the second – closely related to the previous – is to find (or create) a scaffold to construct the proposed mechanism.

Any accomplishment on any of the previous objectives translates into growth of the enzyme design field (a thorough review can be found in [5]). In recent years, many achievements have been accomplished: design of buried polar interactions, oligomeric structures and novel topologies; introduction of diverse functional groups, like haem groups, metal-ions or artificial amino acids; creation of new enzymatic reactions not previously found in nature. A remarkable advance in enzyme design are newly developed tools, among those: employment of sequence binary patterns and secondary structure proneness, computational modeling and design of protein structure, evaluation of model structures using force fields, search algorithms for finding a proper scaffold to a modeled transition state among natural structures and quantum mechanics calculations for modeling transition states. The following examples illustrate the progress and strategies employed for protein design:

The initial reported enzyme designs took advantage of binary patterns in amino acid sequences to design peptides with secondary structures, particularly alpha helix, as scaffolds for positioning catalytic groups. In 1988 Tomikazu Sasaki reported the design and characterization of an artificial hemoprotein, called helichrome. In helichrome design a porphyrin ring attaches to four peptides, each an amphiphilic alpha helix, and together the four helices create a hydrophobic pocket for substrate binding above the ring. Helichrome is soluble, has high alpha helical content, and has hydroxylase activity. The work highlights the simplification of the folding process by the introduction of an appropriate organic compound [6].

Some years later, Johnson designed polypeptides that catalyze the decarboxylation of oxaloacetate via imine intermediate four orders of magnitude faster than simple amines. They studied the mechanism in amine-catalyzed decarboxylation and listed the active site characteristics required for catalysis; a lysine provides the functional amine group, and positively charged residues stabilize negative charges of the intermediate. An amphiphilic alpha helix constitutes the scaffold holding the active site and the helix form bundles but the bundles lack a unique three-dimensional structure. Understanding of the mechanism guided the design and interpretation of the results [7].

The introduction of artificial amino acids expands the possibilities for design. Rossi *et al.* developed a

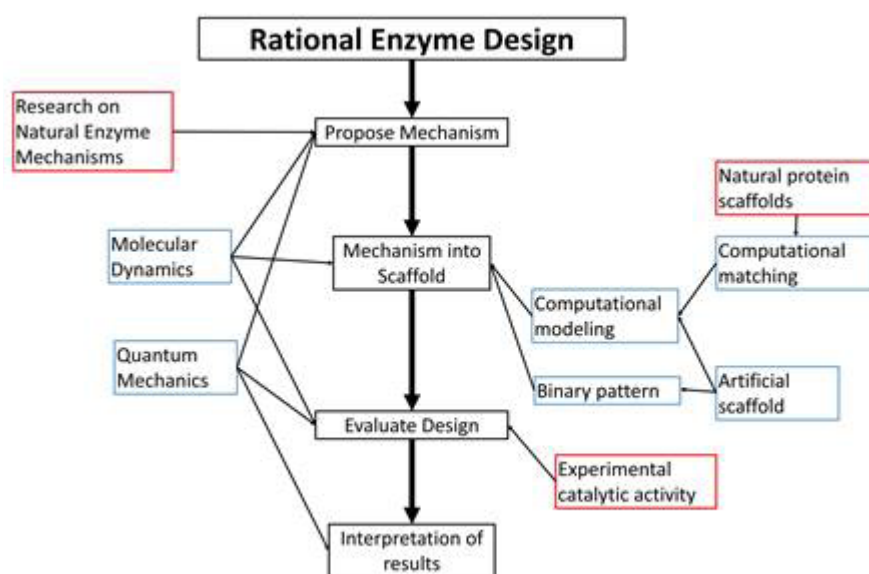


Figure 1. General process followed for rational enzyme design (the main steps are inside black squares and follow the thick arrows). Computational tools (blue squares) and wet lab experiments (red squares) aid along the process (thin arrows).

metallonuclease, for this they inserted two or more copies of the artificial amino acid ATANP into a proper position of a helix-loop-helix motif, the artificial amino acid bears a metal-ion binding site. The peptides show helical structure dependent on pH and metal-ion binding. The peptide and metal-ion complex catalyze the transesterification of the RNA model substrate [8]. Harbury et al. accomplished great progress on the design of protein structure. Their work describes the construction of oligomeric structures using alpha helical proteins as building monomers; they obtained dimers, trimers, or tetramers according to their initial goals. Hydrophobic-Polar residue patterning specified the overall fold; computational methods allowed control of oligomerization state, detailed main chain conformation, and interior side chain rotamer orientation [9].

The first designed alpha-helix scaffolds had strong secondary structure but lacked defined tertiary structure, the group of Koder found that buried polar interactions and correct placement of hydrophobic and hydrophilic side chain induce native-like structure in helical bundle proteins [10]. The same group used this progress to create an O₂ binding protein; for this they assembled a four-helix bundle, positioned histidines to bind haem groups, and harnessed helical rotation. Packing of the protein interior reduces helical-interface mobility, excludes water and stabilizes oxygen binding without haem oxidation. O₂ binds tighter than CO and has similar affinity compared to natural globins with similar mechanism. The approach used develops a simple initial model, then progressively adds up the desired characteristics of the proposed enzyme mechanism, and allowed manipulation of protein motion by keeping low complexity [11].

2.1 Design of new folds

A remarkable achievement is the creation of novel topologies. The Baker group used a computational strategy that iterates between sequence design and structure prediction to create a ninety-three-residue protein with a novel topology called Top7. The protein is extremely stable and the crystal structure confirms the atomic level accuracy of the design. The ability to create new folds expands the possibilities on enzyme design in creating new scaffolds [12]

Structures present in natural proteins also serve as scaffolds for designed enzymes. Following a similar approach as Johnson 1993, mentioned above, the Taylor group proposed the use of a small size natural protein with stable structure as a scaffold – the bovine pancreatic polypeptide or bPP – for the active site and constructed a conformational stable oxaloacetate decarboxylase.

One solvent exposed face of the bPP presents the three active site lysines, the design adopted a stable structure in solution, and showed improved stability [13]. Nicoll et al. used the previous bPP scaffold to introduce an artificial esterase activity; they introduced two histidines near to each other; one histidine would act as the nucleophile of the reaction while the other could stabilize the anionic transition state. The knowledge of the reaction mechanism allowed them to predict the dependence of activity on pH, and the design revealed the feasibility of getting enzyme like behavior through interaction of several amino residues without the need of an active site pocket shielded from the solvent [14].

Introduction of computational design methods has shown helpful for design on natural scaffold proteins, aiding in the design of a zinc binding sensor or an enzyme with histidine-mediated nucleophilic attack. Marvin et al. converted a maltose binding protein into a zinc sensor. The maltose binding protein presents two domains, the interface between the two domains lodges the binding site. The protein adopts an open conformation without the ligand and a closed conformation with bound maltose. The DEZYMER program generated initial designs that contained a tetrahedral zinc coordination site spanning the maltose-binding site. Then an iterative approach increased zinc affinity by combination of initial designed binding sites, optimization of the ion coordination sphere and modification of conformational equilibrium between open and closed states. They found that introduction of a new function sometimes implies the removal of vestigial interactions [15]. Bolon and Mayo identified enzyme-like active sites within a thioredoxin protein scaffold using a computational method; the target reaction was histidine-mediated nucleophilic attack [16]. They modeled rotamers of the histidine-substrate transition state, then looked for a place in the scaffold where to place the models in a proper orientation and optimized the surrounding residues to increase the affinity to the substrate. In separate calculations, the ORBIT computational design program tested each position of the thioredoxin scaffold with the transition state models, and allowed to vary the remaining positions to other amino acids to form better interactions with the substrate. The top two sequences from the scanning were selected for experimental analysis and both proteins showed activity above background [16].

2.2 Design of *de novo* activities

Enzyme design also developed new functions not previously found in natural enzymes. The Baker lab developed algorithms (most of them implemented in the

Rosetta software) to construct active sites for multistep reactions, examples of those reactions are: retro-aldol reaction, carbon-carbon bond breaking in a non-natural substrate; Kemp elimination, proton transfer from carbon and Diels-Alder reaction, carbon-carbon bond formation. The protocol followed for the enzyme they design is as follows: in the first step they choose a catalytic mechanism and use quantum mechanical transition state calculations to create a theoretical active site with functional groups of the protein residues to stabilize the transition state, it is advisable to choose various catalytic mechanisms to increase the success probability; the second step is to accommodate the theoretical active site (or active sites in multiple step reactions) into a protein scaffold, using a hashing technique it is possible to explore a large set of possible active site in an efficient way; for each match in the previous step a gradient-based minimization optimizes the orientation of the transition state and the catalytic side chains; then residues surrounding the transition state are redesigned to maximize the stability of the active site conformation, the affinity to the transition state and the protein stability; finally the best designs are selected for experimental characterization on the basis of satisfaction of catalytic geometry, transition state binding energy and complementary shape.

Thirty two out of seventy two designs characterized have detectable retro-aldolase activity, eight out of 59 showed measurable activity in Kemp elimination assays and only two out of eighty four showed detectable Diels-Alder activity; the success rate on the Diels-Alder reaction might seem low although considering the two substrates involved it is an unprecedented achievement in enzyme design. The X-ray crystal structure confirmed the atomic accuracy of the designs and mutational analysis confirms the detected activity depends on the computationally designed active sites [17-19].

The knowledge of how a reaction happens provides the tools for enzyme design, at the same time enzyme design also provides tools to deepen our knowledge on how enzymes work. Tommos *et al.* constructed two small globular proteins, each protein contains a single tryptophan or a single tyrosine buried inside the core, this model allowed them to gain insight into the catalytically essential side-chain radicals present in some redox enzymes. They found aromatic amino acids raise their reduction potential when moved from a solution environment to an ordered one, like the interior of a protein. Design provides the tools for understanding enzyme mechanisms, an initial step for enzyme design [20]. Rational enzyme design still has a long way to go for reaching the acceleration rates found in natural enzymes,

the solid advances presented so far present a promising panorama.

3 Molecular dynamics for protein engineering of *de novo* enzymes

We present in this section the role of molecular dynamics (MD), highlighting its predictive power for ranking designs during the development of *de novo* enzymes. Other examples where MD simulations are exploited for protein engineering are described elsewhere [21,22]. The movements of solvated proteins during a hundred nanoseconds and up to one millisecond can be simulated with MD. These simulation times cover the time scale of a number of relevant molecular events for protein function (e.g. catalysis, ligand recognition, folding). Some of these molecular events can be captured by some experimental techniques, as illustrated in Fig. 2, but these techniques are usually “blind” to the most rapid events. In these cases, MD proves a unique tool for the study of protein function and also for protein design.

During MD simulations, the interactions between atoms are used to calculate the energy of the molecule; atoms in the molecule are assigned an initial velocity, making possible a fluctuation in the spatial position of atoms. The extent of the fluctuation depends on the interactions forces and influences the potential energy. Thus, every certain period the position and velocity of atoms are recalculated, by solving Newton’s equations of motion, as well as the potential energy at that point in time. Through MD simulations a set of microstates of the protein can be obtained, and from them, some properties may be calculated. The most common calculated property is potential energy, which is usually sought to be minimal as this suggests a highly stable structure; but MD simulations can also give quantitative information on the number, type and duration of different interactions (hydrogen bonds, electrostatic and polar interactions, etc.), as well as changes on properties (size, polar vs non polar) of solvent accessible surface, as a function of time and of other factors such as salt concentration, pH and temperature.

MD simulations have been successfully used to evaluate the orientation of a substrate in the active site of the protein and to analyze the fluctuations of critical substrate-protein interactions [23]. MD simulations are sometimes utilized for predicting beneficial point mutations during re-design of active sites, both by *in silico* studying the dynamics of the catalytic residues of experimentally challenging systems [24-26], as well

as predicting the role of substitutions within the active site cavity [27]. Regarding *de novo* designed enzymes, two main obstacles have been identified: low catalytic activities of the designed enzymes and a high percentage of design fails, where the variants might show no catalytic activity at all [2]. It is proposed that these failed designs result from an improper orientation between the substrate and critical residues in the active site, related to a higher flexibility of residues within the active site of the designed enzyme, compared to wild type enzymes. In these cases, directed evolution has been used to confer local rigidity; however analysis of MD simulations might help reduce the design failure rate [28].

Remarkable examples of the important role of MD simulations in protein engineering are the *de novo* design of enzymes catalyzing Kemp eliminations, which is a chemical reaction not found in Nature. Catalysis of this reaction is favored in non-polar environments and in the presence of a strong base [29,30]. Enzymes have been designed and improved to catalyze this reaction and increase the reaction rate millions of times ($k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}} \leq 10^8$). Following the strategy described by Lassila [31], ORBIT software was used to design a KE-catalyzing enzyme; however, the initial design showed no KE activity [32]. The cause of inactivity was apparent after performing X-ray crystallography experiments and MD simulations. The major conclusion after the analysis of this failed design was that side chains of residues composing the active site showed higher flexibility than predicted, thus leading

to the absence of the predicted binding interactions, as well as improper orientation of the substrate within the catalytic pocket. Moreover, the flexibility of these side chains allowed the entrance of water molecules into the catalytic cavity, leading to unfavorable conditions for catalysis: water molecules must be displaced in order for substrate binding to occur; and water molecules might disrupt the non polar environment which is favorable to KE catalysis, as well as decrease the pKa of the residue acting as the catalytic base. The authors proposed an iterative procedure to improve the design; a second design was obtained after selecting (after visual inspection of the structure) a more buried catalytic residue (7 Å deeper into the protein than the first design); a computational active site search was performed aiming to reduce the polarity of the new catalytic cavity while maintaining the same geometrical constraints used for the first design. The second design, differing by 19 mutations from the first design, was again simulated through MD and predicted to be active, based on the conservation of critical interactions during the simulation time. This design was experimentally proven to catalyze KE reactions, showing a catalytic efficiency ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 123 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) comparable to other *de novo* designed KE-catalyzing enzymes [18]. After another round of MD simulations, a third design was obtained containing one additional mutation that was predicted to confer better packing around the substrate, and turned out to be 3 times more active ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 425 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) than the second design. This protein is the most active

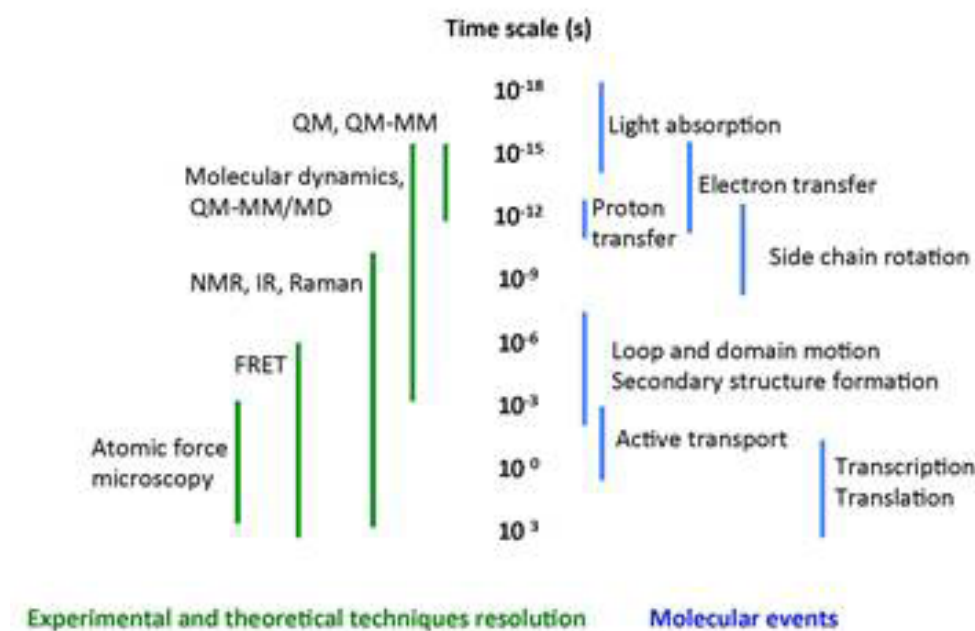


Figure 2. Time scale of molecular events captured by MD and experimental techniques.

computationally designed KE-catalyzing enzyme reported to date, although more active variants ($k_{\text{cat}}/K_m = 2.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) have been obtained after several rounds of directed evolution [33,34]. The work exemplifies the power of MD for *in silico* evaluation of designs, but also points out the present need to combine computational strategies with refinements steps, usually based on directed evolution strategies (leading to dramatic increases in activity, as recently shown for a *de novo* retro-aldolase [35]) but also rational design as the example just discussed.

Improvements in computational power allowing for explicitly modeled water-containing long simulations (aprox. 1 ms) could favor the routine use of MD simulations for design ranking, thus reducing rates of failed or low activity designs; also, better force fields and more accurate energy functions (e.g. as those found in QM-MM/MD simulations) could render more realistic simulations.

4 QM/MM tools applied to biocatalysis

The modelling of an enzymatic reaction is challenging due to the electronic changes during catalysis. To date, the most accurate description of these electronic changes is based on quantum mechanics. Quantum Mechanical (QM) methods can describe changes in the electronic structure of molecules and thus can describe chemical reactions; however, at present these methods are difficult to apply to molecules with a large number of atoms, like proteins. On the other hand, theoretical methods such as Molecular Mechanics (MM) can model systems of hundreds of atoms

but cannot describe electronic changes. Therefore to model the catalysis of an enzyme, a clever approach combines QM and MM methodologies. This approach is called hybrid QM-MM method and was first described by Warshel and Levitt, who presented in 1976 a study in which they proposed the use of these hybrid methods to study a reaction catalyzed by lysozyme [36]. Since this seminal contribution and the development of computational resources, several studies of enzymes using QM-MM approaches have been developed in the last years. Hybrid QM-MM methods describe the energetics of a macromolecule dividing it in two zones [37]. The region where chemical reactions or electronic rearrangements occur (e.g. active site, reactive groups, cofactors, and substrates) are treated with QM methods, whereas the rest of the enzyme and the solvent are treated with MM methods [38], Fig. 3. The energetics terms of both regions cannot be added directly, thus interaction terms between QM and MM regions are required. In general, there are two different ways to deal with the interactions couple of the energetics terms of both regions: additive and subtractive methods that include electrostatic, Van der Waals, and bonded interactions [39-41]. Different theory levels of QM calculations can be used in QM-MM methodologies; in their pioneer work on QM-MM, Warshel and Levitt used a semi-empirical approach. However, with the advances in computational power, more sophisticated methods can be used like Density Functional Theory (DFT) and *ab initio* (e.g. Hartree-Fock) methods. Although not widely applied to enzyme design, QM-MM has been used mainly to rationalize the results (both positive and negative) in significant current design efforts, particularly those devoted to *de novo* design of enzymes, but in some

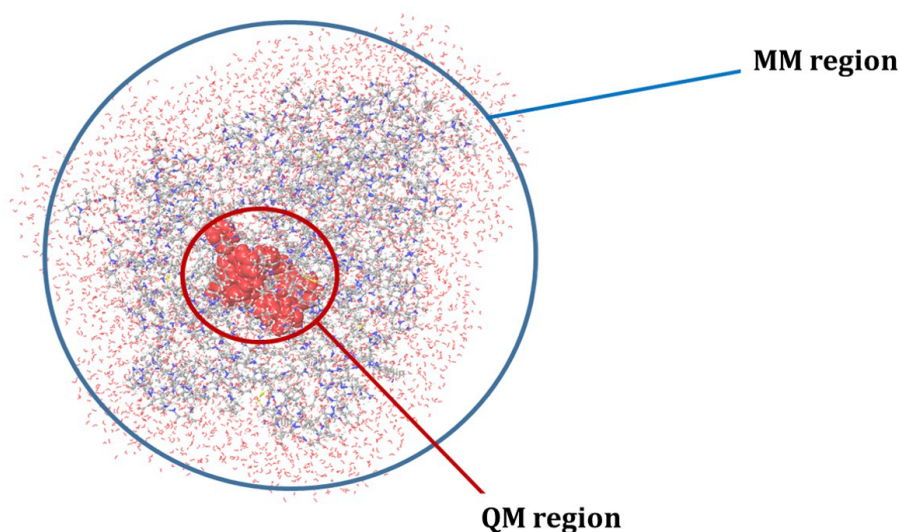


Figure 3. Hybrid QM/MM model of a copper enzyme. Red atoms (CPK model) represents QM region and the rest of the protein and water molecules are included in the MM region.

cases predictions are also extracted from this type of calculations.

4.1 Modeling enzymes with QM/MM methods. Some examples.

The first example of an enzyme mechanism study with QM-MM methods refers to Warshel and Levitt's work [36]. They studied the mechanism of lysozyme during catalysis. In accordance with their results, they described that the mechanism of lysozyme depends of an "electrostatic strain" rather than a "steric strain" due to the charge distribution in the substrate during the reaction. This is the first example of an enzyme mechanism described with QM/MM methods where a semi empirical approach was used [36]. In the last few years, the use of these hybrid methods with high level theories, like DFT or Hartree-Fock, have been reported. Although in some cases only the high level theories gave accurate results (e.g. comparable to experimental observations), semi empirical methods such as empirical valence bond (EVB) are quite successful [1].

A group of enzymes that are ideal for studies with QM-MM methodologies is metalloenzymes [42], in which the metal may play a catalytic and/or structural role. This type of enzyme finds application in several fields, particularly the pharmaceutical industry [43]. Thus, the study of their catalytic mechanism through theoretical simulations is relevant for drug discovery and design [44]. A very recent study about zinc proteases with QM-MM methods and DFT theory was reported [45]. In this investigation, authors studied the matrix metalloproteinase 3, a Zn protease that is a promising drug target. These enzymes are involved in the degradation of the extracellular matrix; therefore, they could be a key element in cancer metastasis. In this work, the authors studied the structure and energetics of different hydrolysis paths of the enzyme mechanism. They found that substrate polarization is important for the reaction mechanism and a substantial change in the metal coordination environment was observed. These results support water-mediated peptide hydrolysis. Also, the authors proposed a new role for one histidine in the metal coordination. These results can provide strategies for the design of Zn metalloprotein inhibitors. Some other examples of use of QM-MM methodologies in this area are described in [46-49].

On the other hand, many enzymatic mechanisms involve electron transfer processes; the study of electron transfer pathway is a complex task in both experimental and theoretical investigations [50,51]. Vidal-Limón et al. [52] used the QM-MM methodology described in Wallrapp et al. [51] to find the electron pathways involved

in the suicide inactivation, a common process in heme peroxidases, of a cytochrome P450BM3 from *Bacillus megaterium* with biotechnological potential [53]. Based on QM-MM calculations with a DFT theory level, they identified key residues in the second coordination sphere of the heme iron group of CYPBM3. The aim of this strategy was to reduce electron delocalization from oxidizable residues and mutate those positions to obtain a more stable protein against H₂O₂-mediated inactivation [54]. According to their results, this method allowed a rational identification of key oxidizable targets; mass spectrometry assays confirmed the oxidized sites predicted by QM-MM. They replaced the key targets for less oxidizable residues by site-directed mutagenesis generating a variant that was 260 times more stable against H₂O₂ inactivation [52].

Regarding hydrolases, an important source of biocatalysts, an illustrative example of QM-MM role in enzyme design is the quantification of the electrostatic factors governing the enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase A (lipA), a serine hydrolase, during the hydrolysis of a model ester (55). The enantioselectivity of wild-type lipA and mutants with reversed enantioselectivity was reproduced through QM-MM calculations based on EVB theory. There was an acceptable agreement between calculated and experimental values of activation free energies for the hydrolysis of R and S enantiomers; the approach allowed the calculation of the energetic contribution (through linear response approximation) of each residue to the enantioselectivity. Interestingly, prediction of mutants leading to an improved enantiomeric excess were shown to be calculated in a reasonable time, thus highlighting the potential of including these types of strategies into enzyme design without too much computing expense. A similar approach was used to study both active and inactive designs of *de novo* KE-catalyzing enzymes discussed in the previous section [56]. High activation free energies were observed for the inactive designs, reinforcing the predictive power of QM-MM tools.

So far, we have treated QM-MM and MD simulations as independent strategies for studying enzymes; but these two methodologies can be performed together to investigate the reaction mechanisms of enzymes and study the protein-inhibition interactions facilitating the search of suitable active enzymes [57]). For example, due to drug resistance the design of new anti-tuberculosis drugs are required. Silva et al. [58] studied the *Mycobacterium tuberculosis* L,D-transpeptidase that catalyze the cell wall formation of peptidoglycans that help in the resistance against β -lactams (a therapeutic class of antibacterial). In this work, QM-MM MD methods were used to clarify

the reaction mechanism of the L,D- transpeptidase with DFTB theory level. According to their results, it is a two step mechanism: an acylation and deacylation. They concluded that the acylation step is the rate-limiting step, in accordance to experimental results obtained for cysteine proteases. Also, with energy decomposition methods they could find the residues responsible for binding the substrate in a proper orientation for the reaction, the importance of these residues for binding the substrate were identified previously through experimental methods, therefore the theoretical methodology used in this example is appropriate. It is worth noting that the energy decomposition methods can help to understand the substrate enzyme interaction by evaluating the difference in the energies when a residue is mutated, thus important residues in catalysis can be identified. The results described in this work may be useful for the theoretical design of compounds that could be used as therapeutic products to inhibit *M. tuberculosis* [58].

5 Final remarks

Modern computational chemistry algorithms coupled to the impressive computing power nowadays found in most research facilities is opening the door to very thorough and realistic analyses. As shown throughout this review it is now possible to successfully design not only specific folds, but also *de novo* enzymatic activities; yet these *tours de force* are still fraught with difficulty because of our lack of understanding and the heuristic nature of the computational approaches. The careful selection of the residues or proteins to be investigated and a good knowledge of the biochemistry of the enzymatic reaction greatly increase the chances of success. The rapidly increasing body of publications and the development of novel techniques are a clear indication of the importance these techniques have for the study of biocatalysis.

Acknowledgements: The authors wish to thank CONACyT and DGAPA UNAM for funding (Grant Numbers 132580 and IN213511 respectively) and Mitzli supercomputer for computational resources

References

- [1] Barrozo A, Borstnar R, Marloie G, Kamerlin SC. Computational protein engineering: bridging the gap between rational design and laboratory evolution. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(10), 12428-60.
- [2] Wijma HJ, Janssen DB. Computational design gains momentum in enzyme catalysis engineering. *FEBS Journal*, 2013, 280(13), 2948-60.
- [3] Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 2012, 485(7397), 185-94.
- [4] Hilvert D. Critical analysis of antibody catalysis. *Annual review of biochemistry*, 2000, 751-93.
- [5] Nanda V, Koder RL. Designing artificial enzymes by intuition and computation. *Nature chemistry*, 2010, 2(1), 15-24.
- [6] Sasaki T, Kaiser ET. Helichrome: synthesis and enzymic activity of a designed heme protein. *Journal of the American Chemical Society*, 1989, 111, 380-1.
- [7] Johnsson K, Allemann RK, Widmer H, Benner Sa. Synthesis, structure and activity of artificial, rationally designed catalytic polypeptides. *Nature*, 1993, 365(6446), 530-2.
- [8] Rossi P, Tecilla P, Baltzer L, Scrimin P. De novo metallonucleases based on helix-loop-helix motifs. *Chemistry - A European Journal*, 2004, 10(17), 4163-70.
- [9] Harbury PB, Plecs JJ, Tidor B, Alber T, Kim PS. High-resolution protein design with backbone freedom. *Science*, 1998, 282(5393), 1462-7.
- [10] Koder RL, Valentine KG, Cerda J, Noy D, Smith KM, Wand AJ, et al. Nativelike structure in designed four α -helix bundles driven by buried polar interactions. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(45), 14450-1.
- [11] Koder RL, Anderson JLR, Solomon La, Reddy KS, Moser CC, Dutton PL. Design and engineering of an O(2) transport protein. *Nature*, 2009, 458(7236), 305-9.
- [12] Kuhlman B, Dantas G, Ireton GC, Varani G, Stoddard BL, Baker D. Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. *Science*, 2003, 302(5649), 1364-8.
- [13] Taylor SE, Rutherford TJ, Allemann RK. Design of a folded, conformationally stable oxaloacetate decarboxylase. *Journal of the Chemical Society, Perkin Trans 2*, 2002, (4), 751-5.
- [14] Nicoll AJ, Allemann RK. Nucleophilic and general acid catalysis at physiological pH by a designed miniature esterase. *Org Biomol Chem*, 7, 2(15), 2175-80.
- [15] Marvin JS, Hellinga HW. Conversion of a maltose receptor into a zinc biosensor by computational design. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(9), 4955-60.
- [16] Bolon DN, Mayo SL. Enzyme-like proteins by computational design. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(25), 14274-9.
- [17] Jiang L, Althoff EA, Clemente FR, Doyle L, Rothlisberger D, Zanghellini A, et al. De novo computational design of retro-aldol enzymes. *Science*, 2008, 319(5868), 1387-91.
- [18] Rothlisberger D, Khersonsky O, Wollacott AM, Jiang L, DeChancie J, Betker J, et al. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature*, 2008, 453(7192), 190-5.
- [19] Siegel JB, Zanghellini A, Lovick HM, Kiss G, Lambert AR, Clair JLS, et al. Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder. *Science*, 2010, 105(2004), 309-13.
- [20] Tommos C, Skalicky JJ, Pilloud DL, Wand aj, Dutton PL. De novo proteins as models of radical enzymes. *Biochemistry*, 1999, 38(29), 9495-507.
- [21] Damborsky J, Brezovsky J. Computational tools for designing and engineering enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, 2014, 4, 19, 8-16.
- [22] Chovancova E, Pavelka A, Benes P, Strnad O, Brezovsky J, Kozlikova B, et al. CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport

- Pathways in Dynamic Protein Structures. *PLoS Comput Biol*, 2012, 8(10), e1002708.
- [23] Bhabha G, Biel JT, Fraser JS. Keep on Moving: Discovering and Perturbing the Conformational Dynamics of Enzymes. *Accounts Chem Res*, 2015, 48(2), 423-30.
- [24] Ion BF, Bushnell EAC, Luna PD, Gauld JW. A Molecular Dynamics (MD) and Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) Study on Ornithine Cyclodeaminase (OCD): A Tale of Two Iminiums. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(10), 12994.
- [25] Chu Y, Li G, Guo H. QM/MM MD and free energy simulations of the methylation reactions catalyzed by protein arginine methyltransferase PRMT3. *Can J Chem*, 2013, 91(7), 605-12.
- [26] Hargis JC, White JK, Chen Y, Woodcock HL. Can Molecular Dynamics and QM/MM Solve the Penicillin Binding Protein Protonation Puzzle? *J Chem Inf Model*, 2014, 54(5), 1412-24.
- [27] Monza E, Lucas MF, Camarero S, Alejaldre LC, Martínez AT, Guallar V. Insights into Laccase Engineering from Molecular Simulations: Toward a Binding-Focused Strategy. *J Phys Chem Lett*, 2015, 6(8), 1447-53.
- [28] Kiss G, Celebi-Olcum N, Moretti R, Baker D, Houk KN. Computational enzyme design. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(22), 5700-25.
- [29] Casey ML, Kemp DS, Paul KG, Cox DD. Physical organic chemistry of benzisoxazoles. I. Mechanism of the base-catalyzed decomposition of benzisoxazoles. *J Org Chem*, 1973, 38(13), 2294-301.
- [30] Kemp DS, Cox DD, Paul KG. Physical organic chemistry of benzisoxazoles. IV. Origins and catalytic nature of the solvent rate acceleration for the decarboxylation of 3-carboxybenzisoxazoles. *J Am Chem Soc*, 1975, 97(25), 7312-8.
- [31] Lassila JK, Privett HK, Allen BD, Mayo SL. Combinatorial methods for small-molecule placement in computational enzyme design. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(45), 16710-5.
- [32] Privett HK, Kiss G, Lee TM, Blomberg R, Chica RA, Thomas LM, et al. Iterative approach to computational enzyme design. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(10), 3790-5.
- [33] Khersonsky O, Kiss G, Röthlisberger D, Dym O, Albeck S, Houk KN, et al. Bridging the gaps in design methodologies by evolutionary optimization of the stability and proficiency of designed Kemp eliminase KE59. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(26), 10358-63.
- [34] Blomberg R, Kries H, Pinkas DM, Mittl PRE, Grutter MG, Privett HK, et al. Precision is essential for efficient catalysis in an evolved Kemp eliminase. *Nature*, 2013, 503(7476), 418-21.
- [35] Giger L, Caner S, Obexer R, Kast P, Baker D, Ban N, et al. Evolution of a designed retro-aldolase leads to complete active site remodeling. *Nat Chem Biol*, 2013, 9(8), 494-8.
- [36] Warshel A, Levitt M. Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J Mol Biol*, 1976, 103(2), 227-49.
- [37] Alderson RG, Ferrari LD, Mavridis L, McDonagh JL, Mitchell JBO, Nath N. Enzyme Informatics. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(17), 1911-23.
- [38] Mulholland Adrian J. Computational enzymology: modelling the mechanisms of biological catalysts. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36(1), 22-6.
- [39] Senn H, Thiel W. QM/MM Methods for Biological Systems. In: Reiher M, editor. *Atomistic Approaches in Modern Biology*. Top Curr Chem, 2007, 268, 173-290.
- [40] Hu H, Yang W. Development and application of ab initio QM/MM methods for mechanistic simulation of reactions in solution and in enzymes. *J Mol Struct*, 2009, 898(1-3), 17-30.
- [41] Groenhof G. Introduction to QM/MM Simulations. In: Monticelli L, Salonen E, editors. *Biomolecular Simulations*. Met Mol Biol, 2013, 924, 43-66.
- [42] Vidossich P, Magistrato A. QM/MM Molecular Dynamics Studies of Metal Binding Proteins. *Biomolecules*, 2014, 4(3), 616.
- [43] Torres E, Ayala M., *Biocatalysis by Metalloenzymes*. In: Poepplmeier JR, editor. *Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition)*. Amsterdam: Elsevier; 2013, 685-735.
- [44] Lodola A, De Vivo M., *The Increasing Role of QM/MM in Drug Discovery*. In: Christo C, Tatyana K-C, editors. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Academic Press, 2012, 337-62.
- [45] Feliciano GT, da Silva AJR. Unravelling the reaction mechanism of matrix metalloproteinase 3 using QM/MM calculations. *J Mol Struct*, 2015, 1091(0), 125-32.
- [46] Hermann JC, Hensen C, Ridder L, Mulholland AJ, Höltje H-D. Mechanisms of Antibiotic Resistance: QM/MM Modeling of the Acylation Reaction of a Class A β -Lactamase with Benzylpenicillin. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(12), 4454-65.
- [47] Hermann JC, Ridder L, Holtje H-D, Mulholland AJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance: QM/MM modelling of deacylation in a class A [small beta]-lactamase. *Org Biomol Chem*, 2006, 4(2), 206-10.
- [48] Kong X, Ouyang S, Liang Z, Lu J, Chen L, Shen B, et al. Catalytic Mechanism Investigation of Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1): A Computational Study. *PLoS ONE*, 2011, 6(9), e25444.
- [49] Palermo G, Rothlisberger U, Cavalli A, De Vivo M. Computational insights into function and inhibition of fatty acid amide hydrolase. *Eur J Med Chem*, 2015, 91(0), 15-26.
- [50] Guallar V, Wallrapp FH. QM/MM methods: Looking inside heme proteins biochemistry. *Biophys Chem*, 2010, 149(1-2), 1-11.
- [51] Wallrapp F, Masone D, Guallar V. Electron Transfer in the P450cam/PDX Complex. The QM/MM e-Pathway. *J Phys Chem A*, 2008, 18, 112(50), 12989-94.
- [52] Vidal-Limón A, Águila S, Ayala M, Batista CV, Vazquez-Duhalt R. Peroxidase activity stabilization of cytochrome P450BM3 by rational analysis of intramolecular electron transfer. *J Inorg Biochem*, 2013, 122(0), 18-26.
- [53] Jung ST, Lauchli R, Arnold FH. Cytochrome P450: taming a wild type enzyme. *Curr Opin Biotech*, 2011, 22(6), 809-17.
- [54] Valderrama B, Ayala M, Vazquez-Duhalt R. Suicide Inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering More Robust Enzymes. *Chem Biol*, 2002, 9(5), 555-65.
- [55] Frushicheva MP, Warshel A. Towards Quantitative Computer Aided Studies of Enzymatic Enantioselectivity: The case of *Candida antarctica* lipase A. *Chembiochem*, 2012, 13(2), 215-23.
- [56] Frushicheva MP, Cao J, Warshel A. Challenges and Advances in Validating Enzyme Design Proposals: The Case of Kemp Eliminase Catalysis. *Biochemistry*, 2011, 50(18), 3849-58.
- [57] Kries H, Blomberg R, Hilvert D. De novo enzymes by computational design. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17(2), 221-8.
- [58] Silva JRA, Roitberg AE, Alves CN. Catalytic Mechanism of L,D-Transpeptidase 2 from *Mycobacterium tuberculosis* Described by a Computational Approach: Insights for the Design of New Antibiotics Drugs. *J Chem Inf Model*, 2014, 54(9), 2402-10.