

**MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA LACASA CueO de *Escherichia coli*:
EFECTOS DE LA DELECCIÓN DEL DOMINIO D2 SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMÁTICA**

LEIDY ROCÍO PICO MARTÍNEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2017**

**MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA LACASA CueO de *Escherichia coli*:
EFECTOS DE LA DELECCIÓN DEL DOMINIO D2 SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMÁTICA**

LEIDY ROCÍO PICO MARTÍNEZ

**Trabajo de Grado presentando como requisito para optar al título de
Bióloga**

Director:

JORGE HERNÁNDEZ TORRES, Lic. en BIOLOGÍA, Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2017**

*Al matriarcado que conforma mi hermoso hogar...
Raquel, Edilia, Martha, Johana, Laura y la princesa María Alejandra*

“¡Nunca dejes que el miedo entorpezca tu camino! No tengas miedo de seguir adelante aun cuando parezca imposible, aun cuando digan que es imposible. No tengas miedo de ser independiente, de ser diferente, de equivocarte, de cometer y admitir errores, porque sólo quienes se atreven a fallar a lo grande pueden conseguir la grandeza”.

– Margaret Hamilton

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi familia, por su inmenso amor, comprensión y apoyo. Por ser esa voz de aliento que siempre estuvo a mi lado en los momentos más difíciles. Gracias por creer en mis capacidades y por demostrarme que siempre que se cuenta con la mejor disposición, las cosas pueden ser posibles. Agradezco especialmente a mi madre, Raquel y a mi tía Martha, por ser mi motor, mis guías de vida y ejemplo a seguir, por el esfuerzo durante estos años. Gracias a ustedes soy la mujer que soy.

Gracias a mi padre, Jorge, por querer lo mejor para mí y por su valioso apoyo a pesar de las adversidades.

Agradezco al profesor Jorge Hernández-Torres, por brindarme la oportunidad de pertenecer al laboratorio CINBIN; por su apoyo y acompañamiento incondicional durante la elaboración de este proyecto. Gracias por guiarme por el fascinante mundo de la Biología Molecular; así mismo, gracias por la confianza impuesta en mí, por creer en mis capacidades y por enseñarme que no existen imposibles. Cada una de las palabras oportunas e invaluable enseñanzas de vida, no están plasmadas en este documento, pero si quedaran enmarcadas en mi memoria.

Agradezco a cada una de las personas que conocí durante mi paso por el CINBIN, gracias por la ayuda brindada y por hacer más amena la elaboración de mi proyecto.

Un agradecimiento especial, al Ingeniero Sergio Augusto Gélvez y al grupo de Supercomputación y Cálculo Científico de la Universidad Industrial de Santander, por el apoyo técnico durante la ejecución de las simulaciones bioinformáticas.

Agradezco de todo corazón a: Elizabeth Quintero, John Soracá, Nathalie Ñañez, Daniel Osorio, Juan D. Bayona, Oscar Hernández y Carlos Hernández, por escucharme, aconsejarme y compartir conmigo los momentos más gratos de mi vida, por tener la capacidad de brindarme sonrisas en los tiempos difíciles. Ustedes no se imaginan cuán valiosos son para mí. Los quiero.

Finalmente, a la Universidad Industrial de Santander, profesores y compañeros, por aportar en mi formación como futura Bióloga.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. OBJETIVOS	17
1.1 OBJETIVO GENERAL	17
1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1 DISEÑO <i>IN SILICO</i> DE LAS LACASAS <i>CueOdD2</i> y <i>CueO^{ΔD2}</i>	18
2.1.1 Secuencias y Alineamientos HCA.....	18
2.1.2 Modelado por Homología de <i>CueO^{ΔD2}</i>	18
2.1.3 Dinámica Molecular	19
2.1.4 Acoplamiento Molecular	19
2.1.5 Construcción del Vector pET_ <i>CueOdD2</i>	20
2.1.6 Digestión de pET- <i>CueOdD2</i> con Nco I, Hind III y Eco RI.....	20
2.2 SOBREENPRESIÓN DE <i>CueOdD2</i> Y <i>CueO^{ΔD2}</i> EN <i>E. coli</i>	21
2.2.1 Condiciones de cultivo	21
2.2.2 Expresión Homóloga de <i>CueOdD2</i> y <i>CueO^{ΔD2}</i>	21
2.2.3 Ensayos de Actividad Oxidasa de 2,6-DMP.....	22
2.2.4 Cálculo de la Actividad Enzimática	22
2.2.5 Determinación de la Concentración de Proteínas.....	23
2.2.6 Electroforesis Desnaturalizante de Proteínas (SDS-PAGE).....	23
2.2.7 Efecto del pH y la Temperatura en la Actividad con 2,6-DMP	23
2.2.8 Análisis Estadísticos de los Datos.....	24
3. RESULTADOS	25
3.1.1 Delimitación de los Tres Dominios de CueO y Delección del Dominio D2.....	25
3.1 Modelado por Homología.....	37
3.2 Dinámica Molecular.....	43
3.3 Acoplamiento Molecular.....	45

3.4	Construcción de los Vectores pET_CueOdD2 y pET_CueO ^{ΔD2}	49
3.5	Expresión Homóloga de CueOdD2	49
3.6	Deleción del Dominio D2 en pET-CueOdD2 y Construcción de pET-CueO ^{ΔD2}	54
3.7	Expresión Homóloga de CueO ^{ΔD2}	55
3.8	Variación de la Expresión de CueO ^{ΔD2} Después de Inducción con IPTG ..	56
3.9	Perfil de Proteínas de FM en Geles SDS-PAGE	59
3.10	Efectos del pH y la Temperatura en la Actividad Oxidasa de CueO ^{ΔD2}	61
3.11	Comparación Entre la Actividad Específica de CueO ^{ΔD2} y las Formas Salvajes	64
4.	DISCUSIÓN	67
5.	CONCLUSIONES.....	74
6.	COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN	75
	BIBLIOGRAFÍA	76
	ANEXOS	84

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Delimitación de dominios para el código PDB 4ner (CueO de Escherichia coli), según las bases de datos PDB , PDBe y PDBsum.....	28
Tabla 2. Acoplamiento molecular de los modelos M1 y M2 de CueO Δ D2 con el 2,6-DMP..	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evidencia del plegamiento del dominio D2 de CueO, en un dominio cupredoxina.....	26
Figura 2. Definición de los límites de los dominios D1, D2 y D3 de CueO (4ner)..	30
Figura 3. Alineamiento en HCA de CueO tipo salvaje, CueO $\Delta\alpha 5-7$, i.e., 2yxv (Kataoka et al. 2007) y la versión de tres dominios de CueO de este trabajo (CueOdD2).....	34
Figura 4. Alineamiento mediante HCA del mutante delecionado CueO Δ D2 con SLAC.....	36
Figura 5. Paralelo entre las estructuras secundarias predictivas de los modelos de CueO Δ D2 generados por I-TASSER, i.e., M1 y M2 , y las de los moldes 3cg8 (verde) para M1 y 2yxv (rojo) para M2	38
Figura 6. Representación de las estructuras 3D de a) M1 y b) M2 . A la derecha, las mismas estructuras para visualización con gafas rojo/cian.	41
Figura 7. Superposición de estructuras 3D de los modelos M1 y M2 con sus respectivos moldes a) M1 con 3cg8 y b) M2 con 2yxv. (y).....	42
Figura 8. Estabilidad estructural de los modelos con respecto a la estructura de partida. a) M1 - SLAC, b) M2 - 2yxv c) CueO Δ D2 (M1 y M2) SLAC (3cg8) y CueOdD2 (2yxv).....	44
Figura 9. Detalles de la interacción estructural de los modelos M1 y M2 , y las estructuras moldes con 2,6-DMP. a) M1 ; b) M2 ; c) SLAC; d) 2yxv.	47
Figura 10. Cercanía entre los residuos que conforman los sitios de unión al Cu (celestes) y los aminoácidos que interactúan con el sustrato, para cada una de las estructuras.....	48
Figura 11. Esquema de la construcción del plásmido pET-CueOdD2 (6877 bp). .	50
Figura 12. Estrategia de construcción del vector pET-CueO Δ D2 a partir del plásmido pET-CueOdD2.	51

Figura 13. Actividad oxidasa sobre 2,6-DMP de extractos crudos de <i>E. coli</i> BL21 transformada con pET-CueOdD2.....	53
Figura 14. Delección del dominio D2 en pET-CueOdD2..	55
Figura 15. Actividad oxidasa sobre 2,6-DMP de extractos crudos de <i>E. coli</i> BL21 transformada con pET-CueO ^{ΔD2}	56
Figura 16. Actividad oxidasa de 2,6-DMP, de las fracciones FM (cuadrados verdes) y FP (círculos negros) a 0, 1, 3, 6, 12 y 24 h de inducción.....	57
Figura 17. Actividad oxidasa de FM (barras verdes) y FP (barras negras) a diferentes concentraciones de CuSO ₄	59
Figura 18. Gel SDS-PAGE de las proteínas de la fracción FM de <i>E. coli</i> BL21.....	60
Figura 19. Influencia del pH sobre la actividad específica de CueOdD2 y CueO ^{ΔD2} con 2,6-DMP.....	62
Figura 20. Efecto de la temperatura en la actividad específica de CueOdD2 y CueO ^{ΔD2} a 27 y 70 °C.....	63
Figura 21. Actividad específica de FM de cultivos de <i>E. coli</i> BL-21 transformada con CueO-1.4, CueOdD2 y CueO ^{ΔD2} , inducidos (+) y no inducidos (-) con IPTG...64	
Figura 22. Actividad específica de FP de cultivos de <i>E. coli</i> BL-21 transformada con CueO-1.4, CueOdD2 y CueO ^{ΔD2} , inducidos (+) y no inducidos (-) con IPTG...66	

RESUMEN

TÍTULO: MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA LACASA CueO DE *Escherichia coli*: EFECTOS DE LA DELECCIÓN DEL DOMINIO D2 SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA*.

AUTOR: LEIDY ROCÍO PICO MARTÍNEZ**.

PALABRAS CLAVE: Lacasa, CueO, SLAC, Multicobre Oxidasas, mutagénesis dirigida, *Escherichia coli*, 2,6-Dimetoxifenol (DMP), Mutación.

DESCRIPCIÓN:

Las lacasas son enzimas que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos, junto con la reducción de O₂ en agua. Están ampliamente distribuidas en bacterias, hongos, plantas e insectos. Se ha demostrado que en *Escherichia coli*, la lacasa CueO está involucrada en la homeostasis de cobre gracias a su actividad cuproso oxidasa. CueO actúa como oxidasa de sustratos fenólicos como el DMP, el ABTS, la siringaldazina, etc. Estructuralmente, las lacasas constan de tres dominios cupredoxina D1, D2 y D3. El plegamiento espacial de los tres dominios se ha conservado, sólo D1 y D3 integran átomos de Cu²⁺ en el sitio activo. Los reportes de lacasas de sólo dos dominios han aumentado. Las pruebas de actividad demuestran que las pequeñas lacasas bacterianas oxidan los mismos sustratos que las lacasas de tres dominios. En el presente trabajo se analiza la función del dominio D2 en las lacasas de tres dominios, si en la naturaleza abundan isoformas de dos dominios que cumplen la misma función oxidasa. Por primera vez se evaluó el efecto de la delección del dominio D2 de una lacasa de tres. Como modelo se usó la lacasa de CueO de *E. coli*. Los resultados computacionales y experimentales demostraron que a pesar de la delección del dominio D2, la pequeña lacasa diseñada (CueO^{ΔD2}) mantiene la actividad oxidasa. Se discute, cuál puede ser la función del dominio D2 en las lacasas, si la enzima puede prescindir de este dominio, sin perder su actividad. Finalmente, se diserta sobre las implicaciones evolutivas y funcionales que derivan de los resultados obtenidos. La principal conclusión es que el dominio D2 no ha desaparecido durante la evolución, porque en taxones específicos las lacasas de tres dominios cumplen otras actividades que requieren la presencia del dominio D2, además de garantizar la resistencia a la degradación y la estabilidad estructural

* Proyecto de Investigación

**Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director: Jorge Hernández Torres, Lic. en Biología, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: DIRECTED MUTAGENESIS OF THE *Escherichia coli* CueO LACCASE: EFFECTS OF THE DELETION OF DOMAIN D2 ON ENZYMATIC ACTIVITY*.

AUTHOR: LEIDY ROCÍO PICO MARTÍNEZ**

KEY WORDS: Laccase, CueO, SLAC, Multicopper Oxidases, Directed mutagenesis, *Escherichia coli*, 2,6-Dimethoxyphenol (DMP), Mutation.

DESCRIPTION:

Laccases are enzymes that catalyze the oxidation of phenolic compounds, along with the parallel reduction of O₂ in water. Laccases have broad biotechnological applications. Laccases are widely distributed in bacteria, fungi, plants and insects. It has been shown that in *Escherichia coli*, the CueO laccase is involved in copper homeostasis due to its cuprous oxidase activity. Like the other laccases, CueO acts as oxidase of conventional phenolic substrates such as DMP, ABTS, syringaldazine, etc. Structurally, most of laccases characterized to date have three domains D1, D2 and D3, although the 3D folding of the three domains is essentially the same, only D1 and D3 bind Cu²⁺ atoms in the active site. Recently, there have been increasing reports of two cupredoxin domain laccases. Activity tests demonstrate that small bacterial laccases are able to oxidize the same substrates than three-domain laccases. In the present work, we analyze the function of D2 in the three-domain laccases, since two domain isoforms fulfill the same oxidase function in nature. The functional effect of the D2 domain deletion in a three-domain laccase has been evaluated. The three-domain laccase CueO of *E. coli* was used as a model. The computational and experimental results showed that despite the deletion of the D2 domain, the designed small laccase (CueO^{ΔD2}) maintains the oxidase activity of its three-domain precursor. It is discussed then, which is the function that D2 domain plays in laccases, if the enzyme can work without this domain, without losing its activity. The evolutionary and functional implications that derive from the results are discussed. The main conclusion is that the D2 domain has not disappeared during evolution, because in specific taxa, three-domain laccases fulfill other activities that require the presence of domain D2, in addition to ensuring the resistance to protein degradation and the folding stability.

* Investigation

** Faculty of Sciences, Program of Biology. Director: Jorge Hernández Torres, Biologist, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos de tipo fenólico e inorgánicos, mediante la reducción de oxígeno molecular en agua (Morozova et al. 2007). Gracias a sus propiedades oxidativas, se ha demostrado su uso efectivo en aplicaciones biotecnológicas como la industria alimenticia, el blanqueamiento de pulpa de papel, la industria textil, la química sintética, los cosméticos, la biorremediación de suelos y la biodegradación de contaminantes fenólicos (Xu 2005; Ibarra et al. 2006; Shraddha et al. 2011). En la naturaleza, las lacasas están ampliamente distribuidas en bacterias, hongos, plantas e insectos y juegan diferentes papeles metabólicos. Por ejemplo, las lacasas de las plantas están involucradas en la polimerización de la lignina (Liu et al. 1994), mientras que, en hongos, son activamente secretadas para la degradación de lignina (Youn 1995). Recientemente, en bacterias se han caracterizado lacasas con múltiples funciones: Degradación de lignina (Majumdar et al. 2014; de Gonzalo et al. 2016); CotA, de *Bacillus subtilis*, participa en la biosíntesis del pigmento marrón en las esporas, confiriéndole resistencia al peróxido de hidrógeno y a la luz UV (Wang et al. 2016); CumA, de *Pseudomonas putida* GBI, cataliza la oxidación de Mn^{2+} (Brouwers et al. 1999) y CueO de *Escherichia coli*, involucrada en la homeostasis de cobre gracias a su actividad cuproso oxidasa (Grass & Rensing 2001b). Al igual que las lacasas fúngicas, CueO actúa como oxidasa de sustratos convencionales como el DMP (2,6-dimetoxifenol), el ABTS [2.2'-azino-di (3-etil-benzotiazolin sulfonato)], la siringaldazina [N, N'-bis (3,5-dimetoxi-4 hidroxibenzilideno hidrazina)], etc. (Kataoka et al. 2007). En el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología de la UIS se logró demostrar la actividad catecol oxidasa de la lacasa CueO (Vásquez et al. 2015).

Filogenéticamente, las lacasas son miembros de una familia de proteínas llamada multicobre oxidasas (MCOs). Normalmente, las MCOs contienen un centro catalítico conformado por átomos de Cu^{2+} distribuidos en uno, dos o más dominios, con un

plegamiento de tipo cupredoxin (Murphy et al. 1997; Ribeiro et al. 2011). En las lacasas, los iones de cobre están dispuestos de dos formas: un ion Cu^{2+} mononuclear (Cu tipo T1) y un clúster trinuclear (Cu tipos T2/T3), conformado por un ion Cu^{2+} en T2 y dos iones Cu^{2+} en T3. El sitio de cobre T1 generalmente cataliza la oxidación del sustrato y el clúster trinuclear (T2/T3) se encarga de la reducción de O_2 (Solomon et al. 1996; Claus 2004). Típicamente, las lacasas están compuestas por tres dominios de tipo cupredoxina (Rydén 1988), dos de ellos (D1 y D3) separados por un dominio sin unión a iones cobre (D2). Esta disposición canónica de los dominios es característica de las lacasas de plantas, hongos y bacterias. No obstante, se han descubierto lacasas con sólo dos dominios, e.g., SLAC de *Streptomyces coelicolor* (Machczynski et al. 2004), EpoA de *S. griseus* (Endo et al. 2003) y la lacasa de *Botrytis cinérea*, en hongos (Pezet 1998). Estudiadas en detalle, se encontró que estas pequeñas lacasas comparten propiedades estructurales y funcionales con las lacasas de tres dominios, entre las que se encuentran el posicionamiento del sitio de cobre T1, las vías intermoleculares de transferencia de electrones y la oxidación del amplio rango de sustratos (Endo et al. 2003; Hirofumi & Yoshiki 2010), y especialmente de lignina (Majumdar et al. 2014).

Evolutivamente, todavía existe incertidumbre en el origen de las lacasas de dos y tres dominios. En el primero de los modelos propuestos, los precursores de las lacasas de dos dominios cuya estructura cuaternaria sería un trímero, sufrieron una inserción de un dominio cupredoxina adicional, dando origen a las lacasas de tres dominios (Rydén & Hunt 1993). En cambio, Murphy et al. (1997) propusieron que las lacasas de tres dominios provendrían de la delección sucesiva de tres dominios, por parte de una MCO de seis dominios, i.e., la ceruloplasmina (Ortel et al. 1984). Queda claro que aún no se cuenta con los elementos suficientes para responder a este interrogante, pero por ahora se acepta más el modelo de la inserción (Nakamura & Go 2005). La principal pregunta que surge en este trabajo es que, si las lacasas de dos dominios cumplen con todas las funciones de una lacasa de tres

dominios, ¿por qué son más abundantes en la naturaleza las lacasas de tres y no de dos? La respuesta podría encontrarse al delecionar el dominio D2 de una lacasa de tres dominios y comprobar si dicho mutante sería capaz de mantener la función oxidasa del tipo salvaje. En el presente trabajo de grado se evaluó el efecto funcional de la delección del dominio D2 de la lacasa CueO de *E. coli*, mediante la construcción de una pequeña lacasa de dos dominios. Los resultados computacionales y experimentales demuestran que a pesar de la delección del dominio D2, CueO^{ΔD2} mantiene las propiedades funcionales de la lacasa tipo salvaje. Se discute entonces cuál puede ser la función del dominio D2, si una lacasa puede prescindir de este dominio sin perder su función oxidasa de sustratos convencionales. Dada la creciente diversidad de lacasas de dos dominios, ¿estaríamos frente una tendencia evolutiva hacia la desaparición del dominio D2 en las lacasas de tres dominios?

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de la delección del dominio D2 en la actividad enzimática de la lacasa CueO de *Escherichia coli*.

1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Realizar el diseño *in silico* del gen de una lacasa CueO sin el dominio D2 ($CueO^{\Delta D2}$).
2. Sobreexpresar en *E. coli* los genes tipo salvaje $CueO^{D2}$ y mutante $CueO^{\Delta D2}$.
3. Preparar extractos crudos de proteínas de *E. coli* BL21 (DE3), en fracciones de citoplasma, periplasma y medio de cultivo.
4. Comparar la actividad específica de $CueO^{D2}$ y $CueO^{\Delta D2}$ con sustratos convencionales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DISEÑO *IN SILICO* DE LAS LACASAS *CueOdD2* y *CueO^{ΔD2}*

2.1.1 Secuencias y Alineamientos HCA

Las estructuras primarias de CueO (Komori et al. 2014) de *Escherichia coli* (Genbank *locus* CAQ30638) y SLAC (Skálová et al. 2009) de *Streptomyces coelicolor* (código PDB 3cg8) fueron seleccionadas de la base de datos del NCBI y de la RCSB Protein Data Bank, respectivamente. Se llevaron a cabo alineamientos estructurales mediante HCA (*Hydrophobic Cluster Analysis*), el cual es un método de alineamiento de secuencias altamente divergentes (ID <30%), basado en representaciones 2D (Eudes et al. 2007). En HCA, los aminoácidos hidrofóbicos se agrupan en clústeres. La forma geométrica de estos clústeres está asociada con estructuras secundarias regulares. En la mayoría de los casos, las agrupaciones verticales y horizontales, están directamente relacionadas con α hélices y hojas β , respectivamente (Callebaut et al. 1997). Para los alineamientos, se siguieron las pautas establecidas por los autores mencionados. Producto del análisis HCA, surgieron dos secuencias aminoacídicas, objeto de estudio en este trabajo: *CueOdD2*, correspondiente a la forma salvaje de CueO de tres dominios y *CueO^{ΔD2}*, relativa a la forma delecionada de dos dominios.

2.1.2 Modelado por Homología de *CueO^{ΔD2}*

La construcción del modelo 3D de *CueO^{ΔD2}* se llevó a cabo en el portal web I-TASSER (Yang et al. 2015), con los parámetros por defecto. Como moldes se emplearon las estructuras cristalinas de la pequeña lacasa SLAC de *S. coelicolor* (código PDB 3cg8) (Machczynski et al. 2004) y la estructura de $\Delta\alpha5-7$ CueO

(Kataoka et al. 2007) de *E. coli* (código PDB 2yxv). La similaridad estructural entre el conjunto de modelos y los respectivos moldes se determinó mediante superposición de estructuras, utilizando la extensión MultiSeq del programa VMD (Humphrey et al. 1996) y la aplicación PyMOL 1.7.0 (Delano 2002).

2.1.3 Dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular fueron procesadas utilizando el campo de fuerza OPLS-AA (Jorgensen et al. 1996), incluido en el paquete de GROMACS 4.5.3 (Hess et al. 2008). El sistema fue solvatado dentro de una caja cúbica, utilizando el modelo de agua SPC-216 (*simple point charge*) (Berendsen et al. 1981). Las cargas de cada complejo fueron neutralizadas con 100 mM de NaCl. Se llevó a cabo una minimización de energía para lograr un valor de energía potencial máxima de 1000 (kJ/mol) y el sistema fue equilibrado bajo condiciones isotérmicas e isobáricas a temperatura constante de 300 K (NVT) y presión de 1 bar (NPT), en un tiempo de 1 ns para cada uno. Finalmente, la trayectoria fue obtenida durante 10 ns de simulación, utilizando la opción mdrun de GROMACS. La estabilidad de los modelos fue evaluada mediante la comparación del RMSD.

2.1.4 Acoplamiento Molecular

Para evaluar la interacción de 2,6-Dimetoxifenol (DMP) con los modelos 3D de CueO^{ΔD2} y los controles (2yxv y 3cg8), se llevaron a cabo interacciones de acoplamiento molecular en el software AutoDock 4.2 (Morris & Huey 2009). La estructura del DMP se obtuvo de la base de datos ZINC (Irwin & Shoichet 2005). Los complejos proteína–ligando fueron configurados en el programa AutoDock Tools, con una caja de 20 Å de longitud para las coordenadas X, Y, Z, 1 Å de espaciado y centrada en los residuos que conforman el bolsillo de unión al sustrato: para 2yxv, **M³⁵⁵** - **D⁴³⁹** - **M⁴⁴¹** (Kataoka et al. 2007; Sakurai & Kataoka 2007); para 3cg8 **Y²²⁹**–**Y²³⁰** (Skálová et al. 2011). Dado que CueO^{ΔD2} está basada en la secuencia de 2yxv,

los modelos mantuvieron los mismos sitios de unión. Las búsquedas conformacionales se realizaron con el *Lamarckian Genetic Algorithm* (Morris et al. 1998), utilizando como parámetros 2.500.000 evaluaciones de energía y 100 corridas de Algoritmo Genético. Los parámetros fueron utilizados por defecto. La mejor conformación proteína-ligando fue seleccionada con base en la menor energía libre de interacción (ΔG).

2.1.5 Construcción del Vector pET_CueOdD2

Para la construcción del gen CueOdD2, se utilizó la secuencia de aminoácidos derivada de los alineamientos HCA, con el uso de codones de *E. coli*. Se hicieron modificaciones en el marco de lectura abierto para facilitar la clonación dentro del vector de expresión y la delección del dominio D2 (ver resultados). Se incluyó la secuencia codificante para una etiqueta de polihistidina [6His]-tag, con el fin de purificar las proteínas en el futuro. La síntesis química del gen *CueOdD2* fue contratada con la empresa General Biosystems. El gen *CueOdD2* fue clonado en el vector de expresión pET-21d, en los sitios Nco I y Hind III.

2.1.6 Digestión de pET-CueOdD2 con Nco I, Hind III y Eco RI

Para la delección de los 510 pb que codifican para el dominio D2, 50 ng de plásmido pET-CueOdD2 fueron digeridos con la enzima Eco RI según los protocolos del proveedor (Fermentas). Para la religación, el producto de la digestión se diluyó con el propósito de desfavorecer la recombinación de los fragmentos de ADN. La reconstitución del marco de lectura abierto se hizo con la T4 DNA ligasa (Sigma-Aldrich) y se transformó *E. coli* BL21 (DE3) siguiendo las recomendaciones del proveedor (Novagen), dando lugar al plásmido pET-CueO^{ΔD2} (Figura 12). Los productos de la digestión fueron visualizados en un gel 0,8% de agarosa y coloreados con EZ-Vision III(R) (Amresco, USA). Todas las demás manipulaciones de ADN se realizaron bajo las condiciones estándar descritas por

Sambrook & Russel (2001).

2.2 SOBREEXPRESIÓN DE *CueOdD2* Y *CueO*^{ΔD2} EN *E. coli*

2.2.1 Condiciones de cultivo

Los precultivos de *E. coli* BL21 (DE3) fueron incubados toda la noche en 5 ml de medio SOB a 37 °C, agitación a 180 rpm y 100 µg/ml ampicilina. 1 ml del precultivo se repicó en 20 ml de medio SOB hasta alcanzar una OD_{600 nm} = 1.0. Se procedió a preparar células competentes para la transformación por el método de tratamiento con CaCl₂, según (Sambrook & Russel 2001).

2.2.2 Expresión Homóloga de *CueOdD2* y *CueO*^{ΔD2}

Células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con los plásmidos pET-*CueOdD2* y pET-*CueO*^{ΔD2}, según el protocolo propuesto por Sambrook & Russel (2001). Las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas fueron cultivadas en 250 ml de medio SOB con 100 µg/ml ampicilina, a 37 °C y agitación a 180 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica OD_{600 nm} = 0.6. Las células fueron sedimentadas mediante centrifugación a 5000 g por 5 min a 4 °C y se resuspendieron en el mismo volumen de medio SOB fresco. La expresión fue inducida mediante la adición de 0.4 Mm IPTG e incubación a 37 °C con agitación, hasta alcanzar una OD_{600 nm} = 0.1. Alícuotas de 50 ml de cultivo fueron recuperadas a 0, 1, 3, 6, 12 y 24 h después de inducción con IPTG. De cada alícuota o de cada tiempo se efectuó la separación de las fracciones de medio (FM) y periplasma (FP), siguiendo el manual de Novagen para el sistema pET (10th Ed.). Para la FM, el cultivo fue centrifugado a 10.000 g durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante (FM) fue recuperado. El sedimento (bacterias concentradas) fue utilizado para llevar a cabo la separación de la FP; las bacterias se resuspendieron en Tris-HCl pH 8.0, 20 % de sacarosa, 0.5 M EDTA, pH 8.0 con agitación leve durante 10 min. La mezcla

fue centrifugada a 10.000 g a 4 °C por 10 min y el sobrenadante fue descartado. Las células fueron resuspendidas en la solución buffer final (la misma del medio de reacción) e incubadas con agitación leve durante 10 min a 4 °C. Finalmente, se sometieron a una centrifugación final a 10.000 g (4 °C, 10 min) para que el contenido periplásmico se liberara a la fase acuosa, la cual constituye la FP.

2.2.3 Ensayos de Actividad Oxidasa de 2,6-DMP

La actividad oxidasa de los extractos FM y FP, fue monitoreada mediante el incremento en la absorbancia a OD_{469nm} (Djoko et al. 2015), usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS UV 1800, por 5 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción de un volumen final de 2 ml contenía: buffer acetato de sodio pH 8.5 o pH 5.5, 100 µl de extracto de FM o 1.5 ml de extracto de FP, 5 mM CuSO₄ y 5 mM 2,6 DMP. La preparación fue pre-incubada con 5 mM CuSO₄ durante 20 min a 37 °C, para facilitar la activación de la enzima.

Para determinar la concentración óptima de iones cobre, la mezcla de reacción con FM y FP fue pre-incubada durante 20 min con las siguientes concentraciones de CuSO₄: 0, 1, 5, 10, 20 y 30 mM. El monitoreo de la actividad enzimática se llevó a cabo siguiendo las especificaciones anteriores.

2.2.4 Cálculo de la Actividad Enzimática

Una unidad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 µmol de 2,6-DMP en 1 min. La actividad específica se calculó con base en el número de unidades enzimáticas por mg de proteína en los extractos. Para el cálculo de las actividades enzimática y específica se empleó la ecuación propuesta por (Galai et al. 2012), excluyendo la concentración de proteína en el cálculo de la actividad enzimática:

$$\text{DMPO (mU mg}^{-1}\text{)} = \Delta\text{DO}_{469 \text{ nm}} * 10^3 / 0.025 * [\text{Concentración de proteína}] * \epsilon_{\text{DMP}}$$

Donde,

$\Delta DO_{469 \text{ nm}}$ = variación de la absorbancia durante 1 min

[Concentración de proteína] = Concentración de la fracción en mg/ml

ϵ_{DMP} = Coeficiente de extinción molar del 2,6-DMP, igual a $14.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2.2.5 Determinación de la Concentración de Proteínas

La concentración de proteína total en los extractos FM y FP (en mg/ml), se determinó mediante el micro-ensayo de Bradford (1976), propuesto en el manual (Ausubel 1992). Como proteína de referencia se usó Albúmina de Suero Bovino (BSA).

2.2.6 Electroforesis Desnaturalizante de Proteínas (SDS-PAGE)

Los extractos proteicos de las fracciones FM fueron separados por electroforesis desnaturalizante en geles 9% SDS-PAGE, de acuerdo con el protocolo sugerido en el manual de (Laemmli 1970). Se empleó el *Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific, USA) como marcador de peso molecular.

2.2.7 Efecto del pH y la Temperatura en la Actividad con 2,6-DMP

Para evaluar el efecto del pH y la temperatura se preparó una mezcla de reacción siguiendo las especificaciones del numeral 2.2.3 en fracciones de FM. Los intervalos de pH evaluados fueron los siguientes: buffer acetato de sodio pH 3.0, 4.5, 5.5, 8.5, buffer fosfato de sodio pH 7.5 y buffer Glicina-NaOH pH 10 (Sambrook & Russel 2001). El efecto de la temperatura sobre la actividad oxidasa de 2,6-DMP fue registrado a 27 °C y 70 °C, con pre-incubación durante 2 min y monitoreando el $\Delta DO_{469 \text{ nm}}$ a las mismas temperaturas respectivas, con un espectrofotómetro Shimadzu UV VIS 1800 con sistema de recirculación de agua.

2.2.8 Análisis Estadísticos de los Datos

En los ensayos de efecto de pH y Temperatura, así como en las comparaciones de la actividad enzimática de CueO^{ΔD2} con respecto a los controles (pET21-d, CueO1.4, y CueOdD2), se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio con tres repeticiones de cada método. De cada uno de los resultados, se calcularon los valores medios de la actividad específica (AE) con sus correspondientes desviaciones estándar. Los datos fueron analizados mediante la prueba Kruskal-Wallis, utilizando el programa SPSS Statistics V. 22.0 y se consideró un valor de significancia $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

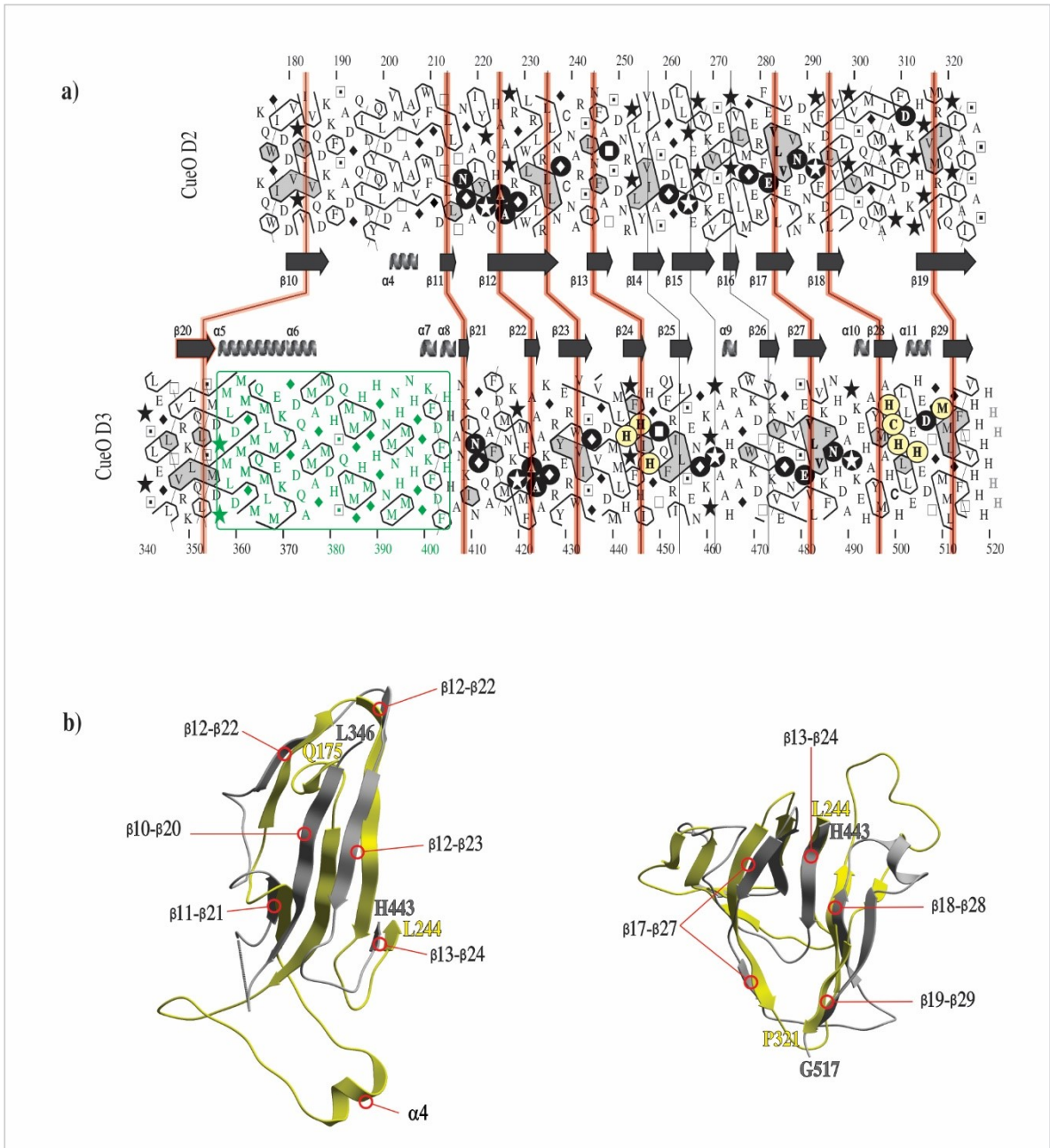
3.1.1 Delimitación de los Tres Dominios de CueO y Delección del Dominio D2

Para diseñar un mutante de CueO con la delección abrupta del dominio **D2** (CueO^{ΔD2}), iniciamos con la demarcación de los tres dominios que componen el tipo salvaje. Las lacasas provienen de la triplicación de un dominio cupredoxina ancestral (Rydén & Hunt 1993). La Figura 1a representa un alineamiento mediante HCA (Callebaut et al. 1997) entre los dominios cupredoxina **D2** y **D3** de CueO. Como puede apreciarse, los agregados hidrofóbicos y aminoácidos no hidrofóbicos conservados en el eje de las estructuras secundarias revelan una relación estructural entre estos dos dominios. Más aún, también se conservan las hojas β asociadas al dominio cupredoxina original (*cupredoxin fold*). Este plegamiento típicamente consta de 8 hojas β antiparalelas (Adman 1991; Murphy et al. 1997): Se corresponden mutuamente las hojas β de los dominios **D2** y **D3** (líneas rojas verticales, Figura 1a), respectivamente, β 10- β 20, β 11- β 21, β 12- β 22, β 12- β 23, β 13- β 24 (unión al Cu²⁺ en **D3**), β 17- β 27, β 18- β 28 (unión al Cu²⁺ en **D3**) y β 19- β 29. Interesantemente, el dominio **D3** ha sufrido cambios sustanciales con respecto al *cupredoxin fold* original. Por una parte, la inserción de una serie de α hélices ricas en metionina (α 5, α 6, [...] α 7 y α 8) (recuadro verde, Figura 1a), de las cuales hablaremos más adelante. Por otra parte, el dominio **D3** adquirió dos hojas β (β 25 y β 26) y tres nuevas α hélices (α 9, α 10 y α 11), análogas en posición de estructuras secundarias en el dominio **D2**. Estas hojas β y α hélices hacen parte de las llamadas regiones estructurales no conservadas (*Structurally Unconserved Regions, SURs*) y son propias de cada lacasa (Murphy et al. 1997). El dominio **D2**, sin estar directamente involucrado en la unión con los átomos de cobre, ha conservado el plegamiento cupredoxina original, a excepción de la inserción de las SURs.

La primera estructura 3D de CueO (1kv7) fue determinada en 2002 (Roberts et al.

2002) y posteriormente fue refinada en 2014 (4ner). Por su mayor resolución, para este trabajo elegimos 4ner (Komori et al. 2014). Una superposición entre las estructuras 3D de los dominios **D2** y **D3** (Clase V, Murphy et al. 1997) corroboran la adopción de una misma conformación espacial y contribuirán a definir los aminoácidos limítrofes. El RMSD entre los dominios **D2** y **D3** fue de 3,74 Å, con una identidad de secuencia de 12,3%. Los dominios **D1** (Clase IV) y **D2** (Clase V) apenas se superponen y la identidad de secuencia es mucho menor (datos no mostrados), lo que es coherente con reportes previos (Murphy et al. 1997). En cambio, a pesar de pertenecer a clases diferentes, los dominios **D1** y **D3** sí se superponen, con un DRMS de 2.7 Å y una identidad de 13.2%. En la Figura 1b se muestra la superposición de las estructuras de los dominios **D2** y **D3**, separada en dos segmentos para facilitar la lectura. La conformación espacial es sorprendentemente similar, bien a pesar de que el evento de duplicación data de muy temprano en la evolución (Rydén & Hunt 1993; Nakamura et al. 2003).

Figura 1. Evidencia del plegamiento del dominio D2 de CueO, en un dominio cupredoxina. **a)** Alineamiento HCA entre los dominios **D2** y **D3** de CueO (Genbank locus CAQ30638). Los agregados hidrofóbicos conservados están sombreados en gris. Las líneas verticales que cruzan las α hélices (espirales) y las hojas β (flechas) surcan regiones equivalentes entre las dos secuencias. Las líneas verticales rojas individualizan las 8 hojas β del dominio cupredoxina original (ver texto). Los aminoácidos conservados se destacan así: hidrofóbicos (negrilla, fondo gris); no hidrofóbicos (caracteres blancos dentro de círculos negros). Los aminoácidos que hacen parte de los centros de cobre (H, C, M) se destacan en negrilla sobre círculos amarillos. Los aminoácidos en verde (recuadro verde) representan las α hélices ricas en metionina ($\alpha 5$, $\alpha 6$, [...] $\alpha 7$ y $\alpha 8$), propias de la lacasa CueO. **b)** Superposición entre las estructuras 3D de los dominios **D2** y **D3** (código PDB 4ner). A la izquierda, representación parcial de los aminoácidos Q¹⁷⁵ hasta L²⁴⁴ (dominio **D2**) con L³⁴⁶ hasta H⁴⁴³ (dominio **D3**). A la derecha, representación parcial de los aminoácidos L²⁴⁴ hasta P³²¹ (dominio **D2**) con H⁴⁴³ hasta G⁵¹⁷ (dominio **D3**). Se omitieron las α hélices ricas en metionina ($\alpha 5$, $\alpha 6$, [...] $\alpha 7$ y $\alpha 8$), exclusivas de **D3** de CueO. La atribución de estructuras secundarias (espirales y flechas) se hizo con base en la PDB.



Para la definición exacta de los dominios recurrimos a la información alojada en las bases de datos de estructuras y a las publicaciones de Roberts et al. (2002) y Komori et al. (2014). En dichas publicaciones no se encontró nada relativo a la individualización de los dominios. Por otra parte, encontramos discrepancias en cuanto a los aminoácidos limítrofes de los dominios, entre las principales bases de datos de estructuras, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Delimitación de dominios para el código PDB 4ner (CueO de *Escherichia coli*), según las bases de datos PDB (Protein Data Bank), PDBe (Protein Data Bank in Europe (EMBL-EBI)) y PDBsum (Pictorial database of 3D structures in the Protein Data Bank). N.D. = No definido.

	PDB	PDBe/Uniprot	PDBsum
Dominio D1	W ⁶⁷ —E ¹⁶³	L ⁴⁰ —K ¹⁶⁹	A ²⁹ —K ¹⁷⁴
Linker	N.D.	N.D.	N.D.
Dominio D2	D ¹⁶⁴ —I ⁴¹⁰	L ¹⁷⁰ —S ³³⁶	Q ¹⁷⁵ —S ³²⁷
Linker	N.D.	N.D.	G ³²⁸ —E ³⁴⁴
Dominio D3	N ⁴¹¹ —V ⁵¹⁶	L ³³⁷ —G ⁵¹⁷	G ³⁴⁵ —G ⁵¹⁷

Por ejemplo, según la PDB el dominio **D1** termina en **E¹⁶³**; para la PDB europea, **D1** termina en **K¹⁶⁹** y en **K¹⁷⁴** para PDBsum (Tabla 1). Como el mismo ejercicio aplica para los demás dominios, fue necesario optar por una de las bases de datos. A diferencia de las demás, PDBsum siempre es muy explícita en la demarcación de dominios y, específicamente para CueO, individualiza una región *linker* entre los dominios **D2** y **D3** (17 aminoácidos, de **G³²⁸** a **E³⁴⁴**). Por esta y por las razones que describimos a continuación, se optó por la demarcación de PDBsum.

En la Figura 2, mostramos un alineamiento 2D entre las secuencias de CueO de *E. coli* y SLAC (Machczynski et al. 2004), la lacasa de dos dominios de *Streptomyces coelicolor*. Entre las pequeñas lacasas bacterianas de dos dominios, SLAC es la

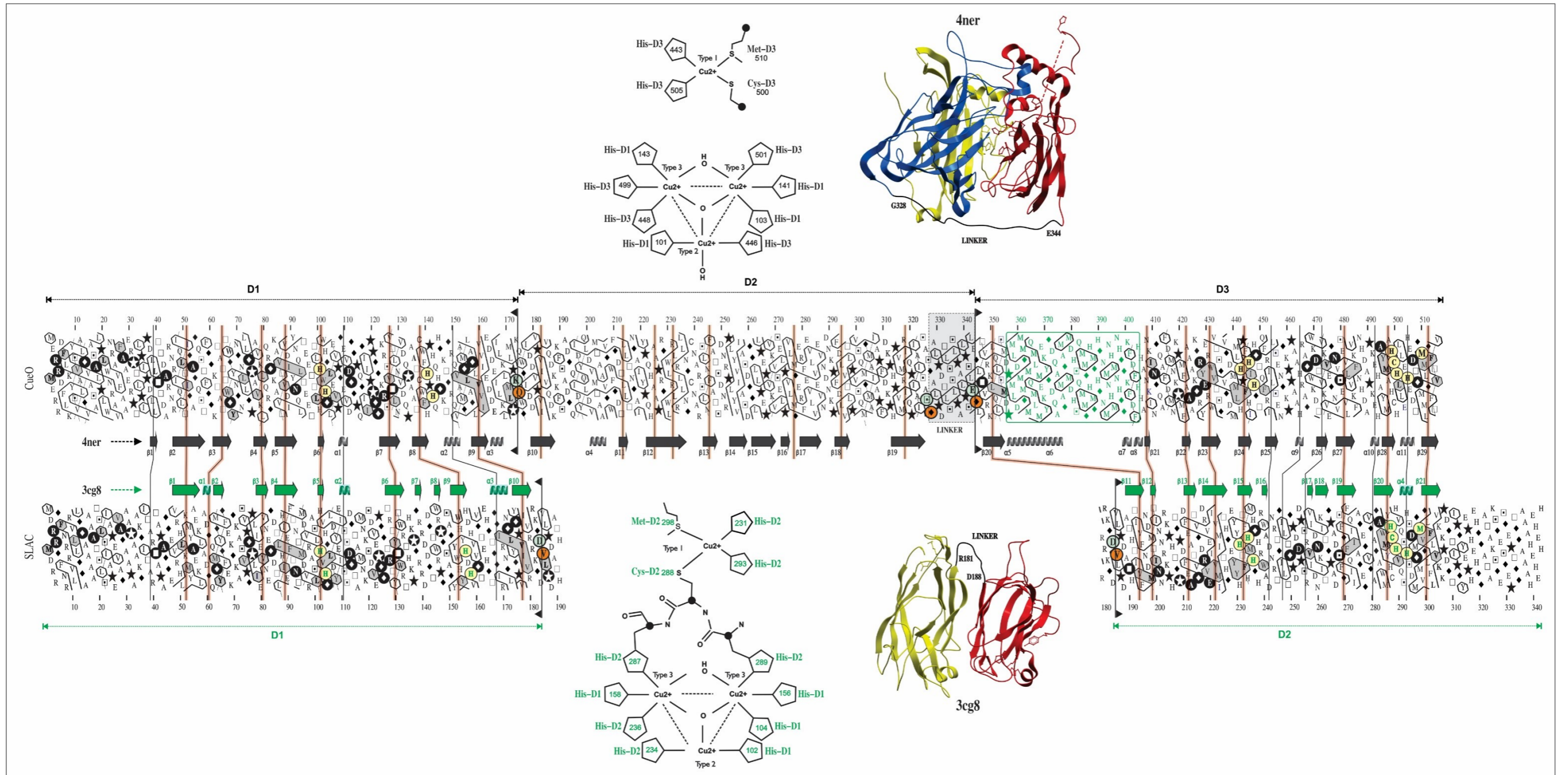
que más ampliamente ha sido caracterizada bioquímica y estructuralmente (Machczynski et al. 2004; Sherif et al. 2013) y decidimos emplearla en el diseño como referente, tanto estructural como funcional. La estructura de otra pequeña lacasa, proveniente de los lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales de coque (mgLAC), con 2.17 Å de RMSD y 25% de identidad con SLAC, fue determinada (Suenaga et al. 2007; Komori et al. 2009). Igualmente, se determinó la estructura 3D de la pequeña lacasa de *Amycolatopsis* sp (Majumdar et al. 2014) y esta proteína presentó una identidad de 61% y 0.84 Å de RMSD con SLAC. Como las conformaciones 3D de SLAC (3cg8), mgLAC (4e9v) y la de la pequeña lacasa de *Amycolatopsis* sp (3t9w) son esencialmente las mismas, adoptamos exclusivamente SLAC como referencia para el diseño. Es conocido que SLAC funciona como un trímero, aunque la forma monomérica también existe (Machczynski et al. 2004), lo mismo que mgLAC. No obstante, la pequeña lacasa de *Amycolatopsis* sp (3t9w) actúa como un monómero funcional, lo cual valida utilizar sólo una subunidad de SLAC para nuestras predicciones estructurales. Otras pequeñas lacasas monoméricas también han sido caracterizadas bioquímicamente (Pezet 1998; Xu et al. 2012).

En la PDB se encuentra alojada la estructura cristalina de SLAC (código PDB 3cg8) (Skálová et al. 2009). Para una comprensión ágil de la Figura 2 y las demás, la alusión a posiciones específicas se hará con base en colores. Toda referencia a la secuencia o la estructura de CueO (4ner) se escribirá con color negro (e.g. **D1—D3**). Así mismo, toda referencia a la secuencia o estructura de SLAC se escribirá con color verde (e.g., **D1—D3**). Finalmente, la secuencia o estructura de la lacasa CueO $\Delta\alpha 5-7$ (código PDB 2yxv), es decir, CueO sin las α hélices del recuadro verde de la Figura 1 (Kurose et al. 2007; Kataoka et al. 2007), se representarán en color rojo (ver más adelante). Nuestra CueO de tres dominios (CueOdD2) estará muy cercana a CueO $\Delta\alpha 5-7$ en la estructura primaria, por lo cual mantendremos el color rojo, ya que son presumiblemente idénticas. Para el mutante CueO de dos dominios (CueO ^{Δ D2}), objeto de estudio de este trabajo, se mantuvieron en rojo las secuencias

o estructuras potenciales, las cuales deben entenderse como una inferencia con respecto al tipo salvaje 2yxv o CueOdD2 (Figura 4).

Figura 2. Definición de los límites de los dominios D1, D2 y D3 de CueO (4ner). Se alinean mediante HCA la secuencia aminoacídica de CueO (Genbank locus CAQ30638) con la de la lacasa de dos dominios SLAC de *S. coelicolor* (3cg8). Las convenciones y símbolos son los mismos de la Figura 1. Los aminoácidos limítrofes se destacan en negrilla sobre círculos de fondo verde o naranjado, según estén al final o al inicio del dominio, respectivamente. Arriba y abajo, a la izquierda se esquematizan las fórmulas moleculares de los centros de cobre y los residuos que los conforman. A la derecha, estructuras 3D de CueO (4ner) y SLAC (3cg8), en las que se destacan los dominios **D1** (amarillo), **D2** (azul) y **D3** (rojo) con las regiones linker (cadenas en color negro). Los aminoácidos $\approx 1-45$ corresponden a los péptidos señal para la secreción de las lacasas y probablemente son removidos de las proteínas maduras (Skálová et al. 2009). Las líneas verticales rojas cruzan las 8 hojas β del dominio cupredoxina original.

Iniciamos por determinar la correspondencia estructural entre los dominios **D1** y **D3** de CueO (4ner), con **D1** y **D2** de SLAC (3cg8), respectivamente (Figura 2). Según PDBsum, CueO cubre: **D1**, desde **A**²⁹ hasta **K**¹⁷⁴ (K en negrilla sobre círculo verde); **D2**, desde **Q**¹⁷⁵ (Q en negrilla sobre círculo naranjado) hasta **S**³²⁷ (cuadrado-punto negro sobre círculo verde); *linker*, desde **G**³²⁸ (rombo negro sobre círculo naranjado) hasta **E**³⁴⁴ (en negrilla sobre círculo verde); y **D3**, desde **G**³⁴⁵ (rombo negro sobre círculo naranjado) hasta **G**⁵¹⁷. Como se aprecia en la Figura 2, los dominios **D1** y **D3** de CueO se alinean bien con los dominios **D1** y **D2** de SLAC, respectivamente. Una visión general del alineamiento refleja una evidente conservación de los agregados hidrofóbicos y aminoácidos no hidrofóbicos entre las dos proteínas, en particular aquellos relacionados con las estructuras secundarias y los centros de cobre. Los porcentajes de identidad fueron de 21% para los dominios **D1-D1** y 26% para **D3-D2** (excluyendo $\alpha 5$ a $\alpha 8$), valores que reflejan la relación estructural de todos los dominios con un único dominio cupredoxina ancestral (Morozova et al. 2007). Entre los dominios **D1-D1** y **D3-D2** se conserva la mayoría de estructuras secundarias, especialmente aquellas que están asociadas a los ligandos del sitio activo (*cupredoxin fold*).



La correspondencia de las 8 hojas β canónicas entre **D1-D1** es así: **$\beta 2, \beta 3, \beta 4, \beta 5, \beta 6$** (unión al Cu^{2+}), **$\beta 7, \beta 8$** (unión al Cu^{2+}) y **$\beta 9$** con **$\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4, \beta 5$** (unión al Cu^{2+}), **$\beta 6, \beta 9$** (unión al Cu^{2+}) y **$\beta 10$** (Figura 2). Entre los dominios **D3-D2**, el *cupredoxin fold* consta de las hojas **$\beta 20, \beta 21, \beta 22, \beta 23, \beta 24$** (unión al Cu^{2+}), **$\beta 27, \beta 28$** (unión al Cu^{2+}) y **$\beta 29$** con **$\beta 11, \beta 12, \beta 13, \beta 14, \beta 15$** (unión al Cu^{2+}), **$\beta 19, \beta 20$** (unión al Cu^{2+}) y **$\beta 21$** . Las demás estructuras secundarias se consideran regiones estructurales no conservadas SURs (Murphy et al. 1997). Además, puede apreciarse en la Figura 2 que las posiciones de interacción con los átomos de cobre están estrictamente conservadas entre las dos enzimas (residuos verdes en negrilla sobre fondo amarillo y estructuras moleculares), incluyendo los ligandos axiales **M^{510}** y **M^{298}** , respectivamente (Kumar et al. 2003). Como dicho anteriormente, PDBsum es la única base de datos de estructuras que reconoce una región *linker* entre los dominios **D2** y **D3**. Al mirar la estructura 4ner (estructura 3D arriba a la derecha, Figura 2), efectivamente los aminoácidos **$^{328}\text{GALPDTLSSLPALPSLE}^{344}$** establecen un largo segmento no estructurado de aprox. 1/4 del perímetro de la proteína y que conecta los dominios **D2** y **D3**. Es igualmente importante anotar que ninguna base de datos define una región *linker* para SLAC. No obstante, los residuos **$^{181}\text{RKGDVLPD}^{188}$** manifiestamente cumplen esta función (Figura 2, estructura 3D abajo a la derecha).

Anteriormente, mencionamos que las α hélices **$\alpha 5, \alpha 6, \dots, \alpha 7$** y **$\alpha 8$** (4ner) hacen parte de estructuras secundarias adicionales al *cupredoxin fold* que surgieron durante la evolución de CueO (SURs). En trabajos anteriores (Kurose et al. 2007; Kataoka et al. 2007) se evaluó la repercusión de estas α hélices sobre la función oxidasa de CueO sobre sustratos orgánicos (recuadro verde, posiciones **P^{357} — H^{406}** , Figura 2), las cuales no se encuentran en ninguna otra lacasa procariota o eucariota. Los experimentos funcionales y estructurales de un mutante deleciónado CueO $\Delta\alpha 5-7$ (PDB 2yxv) permitieron concluir que dichas α hélices ricas en metionina constituyen una barrera que bloquea el acceso a los sustratos orgánicos. De esta manera, CueO puede concentrarse en la actividad cuprosa oxidasa, ya que esta es

la función enzimática que se le atribuye a CueO en *E. coli* (Outten et al. 2001). Tomadas en conjunto las anteriores observaciones, se establecieron los límites de los tres dominios de la forma final de CueO que se expresarían en *E. coli* como tipo salvaje (CueOdD2) y por consiguiente quedó así definida la estructura primaria de la versión delecionada CueO^{ΔD2} (Figura 3):

- El dominio **D1** va desde **M¹** hasta **K¹⁷⁴**. Los primeros ≈45 residuos forman parte de una secuencia líder que permite la secreción dentro del periplasma por la vía Tat (Grass & Rensing 2001). La secuencia **¹⁶⁸ILKLMLPK¹⁷⁴**, al final del dominio **D1** de CueOdD2 (recuadro vertical amarillo, Figura 3), fue seleccionada como *linker* entre los dos dominios del mutante delecionado (CueO^{ΔD2}), en lugar de la secuencia *linker* entre los dominios **D2** y **D3** **³²⁸GALPDTLSSLPALPSLE³⁴⁴** de 4ner y 2yxv (recuadro gris punteado). En nuestras predicciones de modelamiento (ver más adelante), notamos que el *linker* **G³²⁸—E³⁴⁴** es demasiado largo para una pequeña lacasa (ver estructura 4ner, Figura 2 arriba a la derecha). En contraste, la secuencia **¹⁶⁸LKLMLPK¹⁷⁴** apareció no estructurada en las modelizaciones y consideramos que podría adoptar la función de *linker*.

- El dominio **D2** inicia y termina con los aminoácidos **NS** (Figura 3), ya que es la secuencia codificada por los nucleótidos GAATTC, sitio de corte de la enzima de restricción Eco RI y que permitirá construir el clon delecionado CueO^{ΔD2} (ver más adelante). De esta manera, el dominio **D2** va desde el aminoácido **N¹⁷⁵** hasta **N³⁴⁵**.

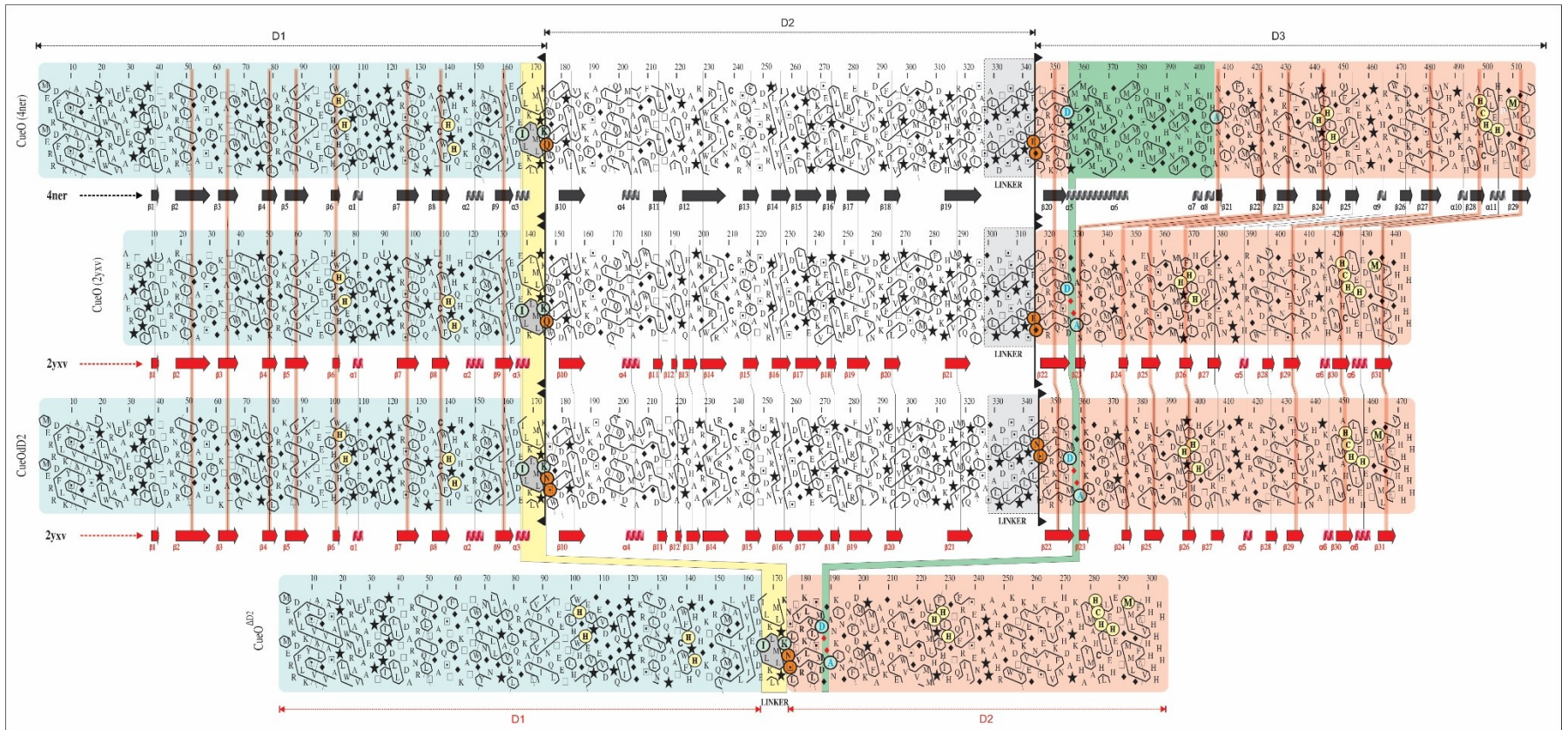
- El dominio **D3** va desde el aminoácido **S³⁴⁶** hasta **V⁴⁶⁹**. Como puede apreciarse en la Figura 3, se eliminaron las hélices **α5**, **α6**, [...] **α7** y **α8** (**P³⁵⁸** hasta **H⁴⁰⁶**) tal como el mutante que dio lugar a la estructura 2yxv (Kataoka et al. 2007). La región delecionada fue reemplazada por dos **G** (dos rombos rojos) que conectan las láminas **β22** y **β23**, para evitar la deformación de la estructura (recuadro vertical verde, Figura 3).

Finalmente, tal como a 2yxv, a CueOdD2 se le adicionó una secuencia polihistidina ([6His]-tag) en el extremo C-terminal, para posterior purificación con columnas de

afinidad. En la parte inferior de la Figura 3 se representa la secuencia consolidada del mutante CueO^{ΔD2}, para posterior evaluación mediante herramientas bioinformáticas. Mediante colores se destacan los aminoácidos comunes con las secuencias de referencia para el diseño (4ner y 2yxv). A manera de resumen, se puede afirmar que nuestro tipo salvaje de CueO de tres dominios (CueOdD2) contiene la misma secuencia que el código PDB 2yxv (51.904 Da y pI=6.51), con la única diferencia de los aminoácidos **NS** que conectan los dominios **D1** y **D2**, y **D2** y **D3**. La proteína CueO tipo salvaje (4ner) tiene un peso molecular de 53.477 Da y un pI=6.07.

Figura 3. Alineamiento en HCA de CueO tipo salvaje, CueO Δα5–7, i.e., 2yxv (Kataoka et al. 2007) y la versión de tres dominios de CueO de este trabajo (CueOdD2). Abajo al final, se representa la secuencia del mutante con el dominio **D2** deletado (CueO^{ΔD2}). Todos los dominios D1 y D2, están sombreados en la vertical con celeste y rosado, respectivamente. El recuadro verde vertical corresponde a la región rica en metioninas (α5, α6, [...] α7 y α8) de CueO tipo salvaje, las cuales se reducen a **DGGA** (doble ♦) en 2yxv, CueOdD2 y CueO^{ΔD2}. La región linker del mutante CueO^{ΔD2} se encierra en el recuadro amarillo vertical. Los aminoácidos limítrofes se destacan en negrilla sobre círculos de fondo verde o naranjado, según esté al final o al inicio del dominio, respectivamente. La delección del dominio **D2** se hará entre los aminoácidos **NS** (círculos anaranjados). Se grafican las estructuras secundarias según la PDB 4ner (en negro) y 2yxv (rojo). Como la estructura primaria de nuestro tipo salvaje es prácticamente la misma de 2yxv, se repiten las estructuras secundarias en rojo debajo de CueOdD2. El resto de convenciones son las mismas de las figuras precedentes.

En la Figura 4 se alinean mediante HCA la pequeña lacasa CueO^{ΔD2} (sin dominio **D2**) y la pequeña lacasa SLAC de *S. coelicolor*. CueO^{ΔD2} contiene 305 residuos (33.544 Da y pI=7.92), a diferencia de SLAC que contiene 344 aminoácidos (36.875 Da, pI= 6.23), es decir 39 residuos más que nuestro mutante. La identidad para el alineamiento de la Figura 4 se calculó en 23%. Una visión global de la superposición evidencia la similitud entre la pequeña lacasa CueO^{ΔD2} y SLAC, reflejada en la correlación parcial de los agregados hidrofóbicos y la conservación de la mayoría de las estructuras secundarias asociadas al *cupredoxin fold*.



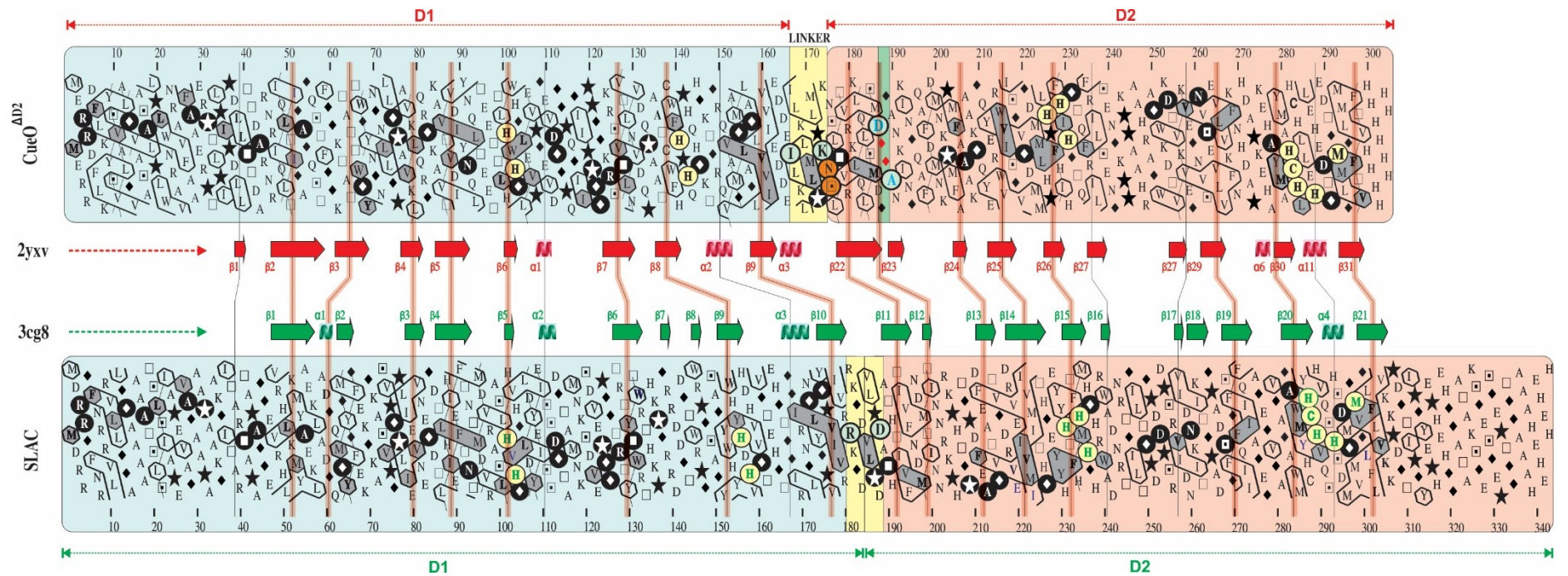


Figura 4. Alineamiento mediante HCA del mutante delecionado CueO Δ D2 con SLAC. Las estructuras secundarias asociadas a CueO Δ D2 (rojo) fueron inferidas a partir de 2yxv. En verde, las estructuras secundarias relativas a SLAC (3cg8). El resto de convenciones son las mismas de las figuras precedentes.

3.1 Modelado por Homología

Para determinar qué tan probable sería que la pequeña lacasa diseñada adoptara una conformación de una lacasa funcional, se procedió al modelado por homología de la estructura primaria de CueO^{ΔD2} con el programa I-TASSER (Yang et al. 2015). Dado que el diseño de CueO^{ΔD2} se basó en un monómero de SLAC, se consideró que lo más apropiado sería construir el modelo 3D con base en su estructura (3cg8). Este punto es esencial para la construcción de un modelo finamente preciso (Herrera & Gómez 2008). El resultado fue un modelo que denominamos **M1**. Adicionalmente, se construyó un segundo modelo tomando como referencia la estructura de referencia 2yxv, con el fin visualizar la flexibilidad de la región *linker* en el correcto acoplamiento de los dominios **D1** y **D3**. El resultado fue un segundo modelo **M2**.

I-TASSER generó 5 modelos por cada simulación. El mejor por cada molde, i.e., **M1** y **M2** fueron seleccionados con base en el C-score (normalmente entre -5 y 2), el cual es un valor de confianza que estima la calidad de las predicciones (Yang et al. 2015). Dado que los C-scores obtenidos fueron > -1.5 para tener un plegamiento correcto (-0,83 para **M1** y -0,18 para **M2**), se consideró que los modelos cumplían con las condiciones necesarias para continuar.

Con base en los modelos construidos, evaluamos la similitud en la organización de las estructuras secundarias con respecto a los moldes 3cg8 y 2yxv. La forma más práctica de establecer este paralelismo fue mediante representaciones bidimensionales utilizadas para los análisis HCA (Figura 5). En la Figura 5, se aprecia un alineamiento HCA entre CueO^{ΔD2} y SLAC, junto con las estructuras secundarias de los códigos PDB 2yxv y 3cg8, respectivamente. Justo en el medio del alineamiento, se representan las estructuras secundarias predictivas de los modelos **M1** y **M2**, según I-TASSER.

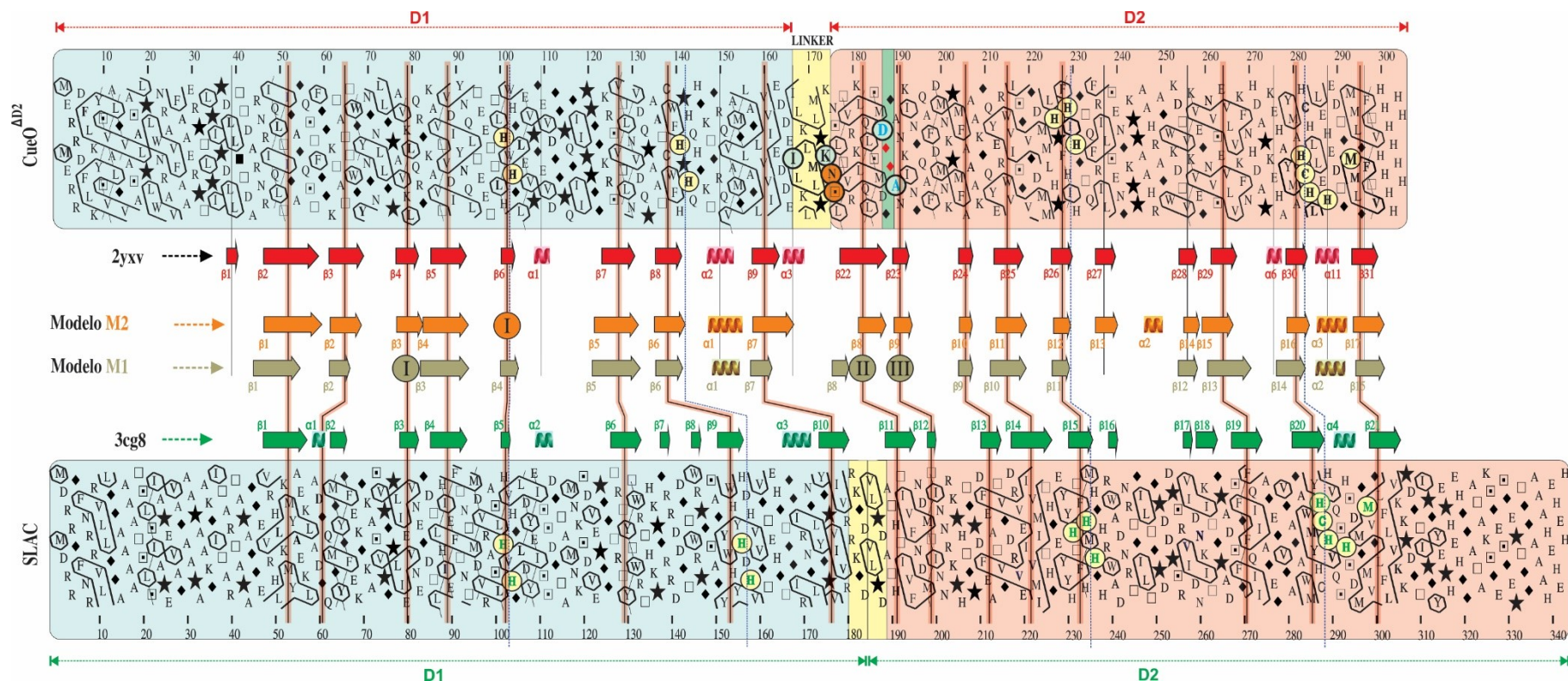


Figura 5. Paralelo entre las estructuras secundarias predictivas de los modelos de CueO^{ΔD2} generados por I-TASSER, i.e., **M1** y **M2**, y las de los moldes 3cg8 (verde) para **M1** y 2yxv (rojo) para **M2**. La correspondencia entre secuencias y estructuras secundarias se mantiene con los mismos colores; se añadieron el color marrón (modelo **M1**) y anaranjado (modelo **M2**). Las convenciones son las mismas de las figuras anteriores. Los aminoácidos de los centros de cobre se representan en negro sobre círculos amarillos y centros equivalentes se interconectan con líneas verticales punteadas. Números romanos dentro de círculos: Estructuras secundarias omitidas por I-TASSER.

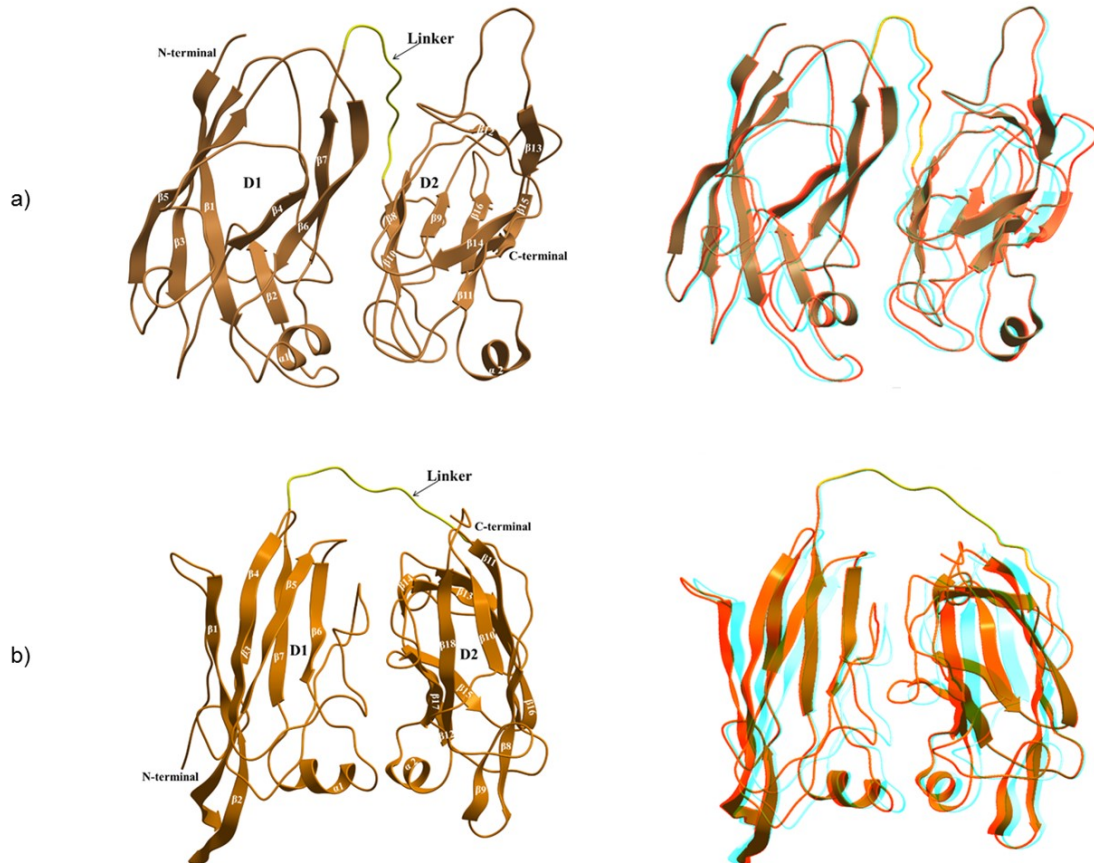
Una visión global de las estructuras secundarias de los modelos revela que el ordenamiento en hojas β de los dominios **D1** y **D3** (de ahora en adelante, **D2**) de CueO ^{Δ D2} es muy cercano al de la pequeña lacasa SLAC y el tipo salvaje CueOdD2. Las hojas β correspondientes al *cupredoxin fold* fueron modeladas en su mayoría. En el dominio **D1** de **M1**, las hojas β se mantienen con respecto a sus homólogas en SLAC: β 1- β 1; β 2 ligeramente desfasada con α 1+ β 2; β 3- β 4; β 4- β 5; β 5- β 6, β 6- β 9 y β 7- β 10. La hoja β 3 del dominio cupredoxina **D1** no fue considerada en **M1** (número romano I sobre círculo marrón). Tampoco lo fueron las hélices α 1 y α 2 que quedaron como regiones no estructuradas. Así mismo, en el dominio **D1**, las hojas β 7 y β 8 no aparecen, debido al déficit de aminoácidos en esta región de CueO ^{Δ D2}. En cambio, la hoja β 9, parte del *cupredoxin fold* (y de unión a Cu²⁺) en SLAC, fue correctamente construida en **M1** por I-TASSER (β 6). Finalmente, la hélice α 3 se alinea con α 1 y la hoja β 10 se alinea perfectamente con β 7. Para el dominio **D2**, se modelaron exitosamente las hojas β del *cupredoxin fold*, β 9, β 10, β 11 (unión a Cu²⁺), β 13, β 14 (unión al Cu²⁺) y β 15, que son equivalentes de β 13, β 14, β 15 (unión a Cu²⁺), β 19, β 20 (unión al Cu²⁺) y β 21, en SLAC. Apareció un equivalente de la lámina β 11 (β 8), pero desviada atrás, hacia el límite entre la región N-terminal del dominio **D2** y el linker (Figura 5). Así, el vacío dejado por el equivalente de β 11 se representa por el número romano II sobre círculo marrón. Finalmente, la hoja β 12, segunda hoja β del *cupredoxin fold* no tuvo equivalente en **M1** (número romano III sobre círculo marrón).

Por otra parte, el paralelo entre CueO ^{Δ D2} (teórica) y **M2**, refleja que la predicción fue acertada para la mayoría de estructuras secundarias. En el dominio **D1**, el equivalente de la hoja β 6 (unión al Cu²⁺) no fue modelada (número romano I sobre círculo anaranjado); ésta fue reemplazada por una larga región no estructurada. Las láminas β 5 y β 9, aunque presentes, son más anchas en **M2** (β 4 y β 7, respectivamente). Para el dominio **D2**, todas las láminas β de CueO (2yxv) fueron modeladas en su totalidad, lo que es un resultado satisfactorio (Figura 5). Finalmente, una inesperada hélice α fue modelada para **M2** (α 2), la cual no está

presente en 2yxv ni en SLAC. Está ubicada entre una región amplia no estructurada entre $\beta 27$ y $\beta 28$. En conclusión, los resultados de modelación molecular permitieron concluir que el plegamiento de CueO $\Delta D2$, al menos a nivel predictivo, se ajusta mayormente al ordenamiento de estructuras secundarias de una pequeña lacasa.

En la Figura 6 se representan las estructuras 3D de **M1** y **M2**. Se puede presumir que CueO $\Delta D2$, al igual que SLAC, constaría de 2 dominios bien definidos y separados por regiones *linker* (color amarillo). Dicha región fue concebida en el diseño como $^{168}\text{LKLMLPK}^{174}$; no obstante, el *linker* de los modelos se expande un poco más, lo que hace sospechar que podría requerir unos aminoácidos adicionales. Sin embargo, parece que el *linker* actual confiere la suficiente flexibilidad a los dominios como para lograr acoplarse funcionalmente. En **M1** (Figura 6a) la región *linker* entre $\beta 7$ y $\beta 8$ cubre los aminoácidos $^{164}\text{DDEILKLMLPK}^{174}$, lo que es cercano a lo previsto en el diseño (Figuras 5 y 6a). En cambio, en **M2** (Figura 6b) la región *linker* resultó mucho más larga, i.e., $^{164}\text{DDEILKLMLPKNSLTVR}^{180}$, comprometiendo también los primeros residuos del dominio **D2** (hoja $\beta 22$). Dado que $\beta 22$ se encuentra bastante alejada del tercer centro de cobre (Figura 5), es posible que no llegue a afectar la funcionalidad del dominio **D2**. Globalmente, cada dominio se ajustó al plegamiento característico del *cupredoxin fold* de las MCO (Figuras 5 y 6), el cual consiste en un patrón de conectividad llamado *Greek-key*, conformado por barriles β dispuestos en forma paralela (Ribeiro et al. 2011).

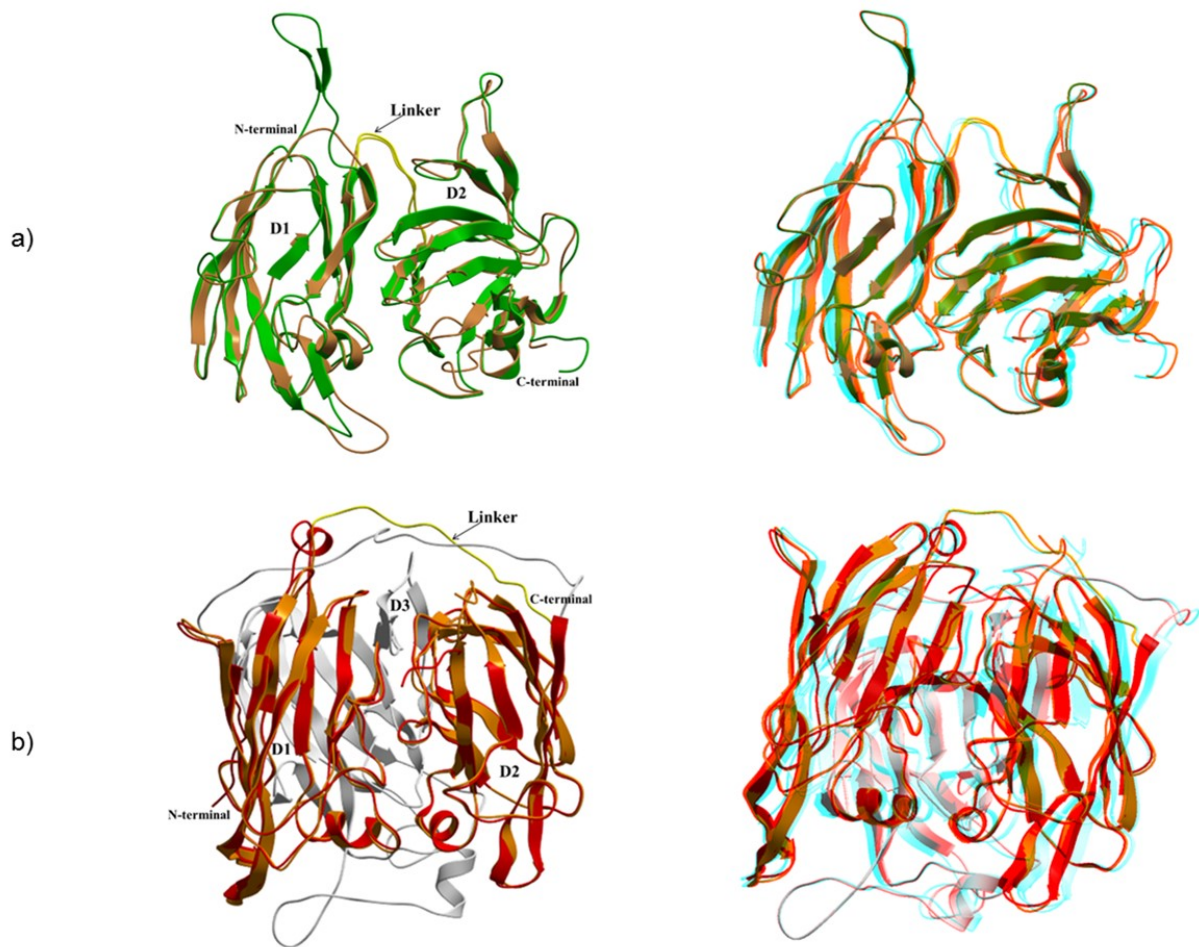
Figura 6. Representación de las estructuras 3D de a) **M1** y b) **M2**. A la derecha, las mismas estructuras para visualización con gafas rojo/cian.



A pesar de las diferencias en la estructura primaria de CueO Δ D2 y el molde 3cg8, se observa gran similitud estructural al superponer las estructuras con el programa VMD (Humphrey et al. 1996). **M1** y SLAC arrojan un RMSD de 0,84 Å (Figura 7a); lo mismo ocurre entre **M2** y la estructura 2yxv con un RMSD de 0,77 Å (Figura 7b). Obviamente, estos valores son bajos, ya que las estructuras fueron modeladas por I-TASSER lo más cercanamente posible a los códigos PDB citados. Sin embargo, en vista de que la cobertura de las dos cadenas es total y que 2yxv corresponde a una lacasa de 3 dominios, estas cifras ganan significado. Mejor aún, la

superposición entre **M1** y **M2** arroja un RMSD de 2,14 Å y este valor sí es altamente relevante, ya que proviene de estructuras basadas en modelos diferentes.

Figura 7. Superposición de estructuras 3D de los modelos **M1** y **M2** con sus respectivos moldes a) **M1** con 3cg8 y b) **M2** con 2yxv. (y). La correspondencia entre secuencias y estructuras secundarias se mantiene con los mismos colores. A la derecha, las mismas estructuras para visualización con gafas rojo/cian.



3.2 Dinámica Molecular

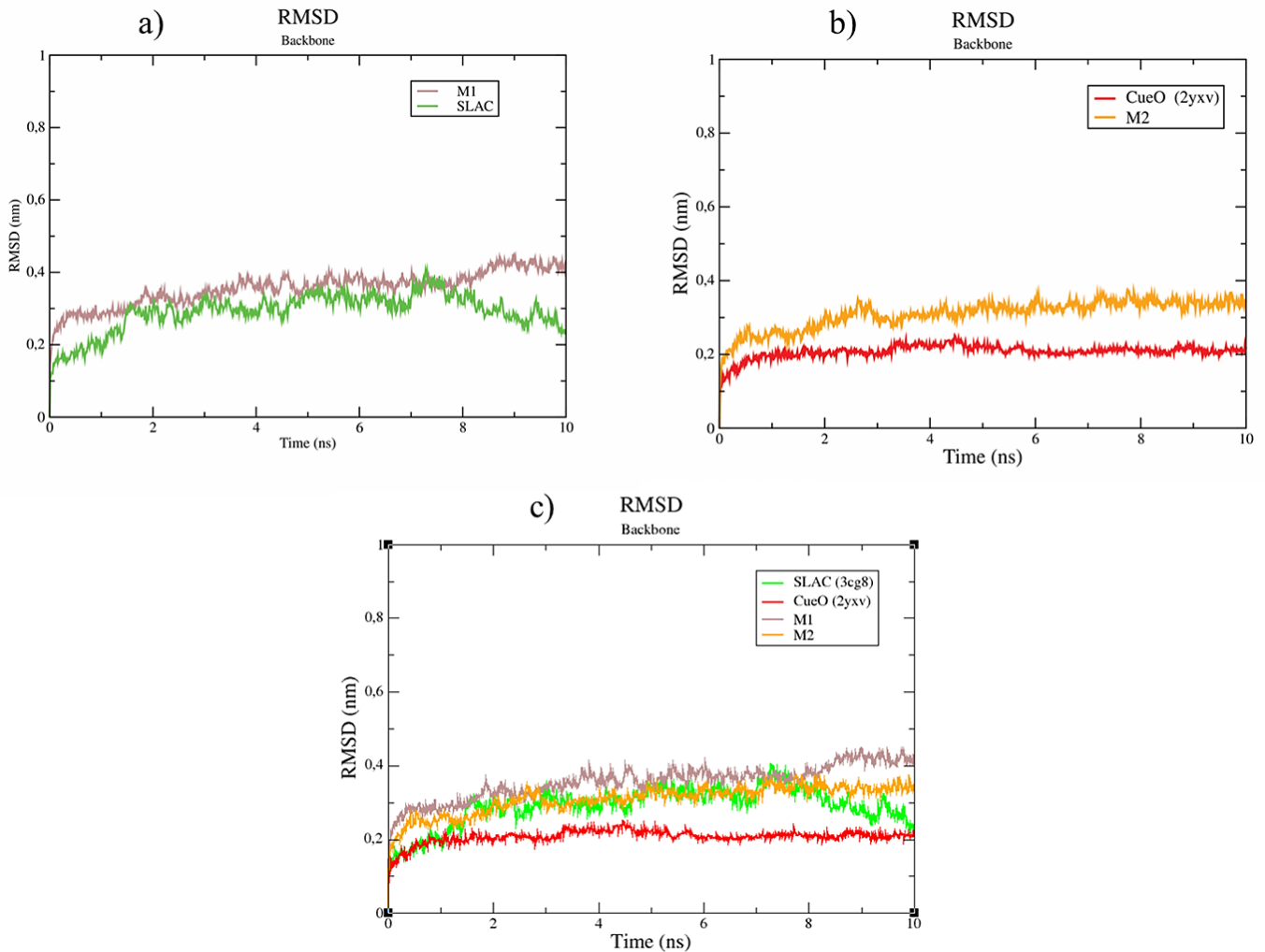
Con el fin de determinar *in silico* la estabilidad de las estructuras 3D y obtener la conformación estructural más estable de los modelos **M1** y **M2** (Furtado et al. 2013), se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular. Obtenida la minimización de energía (1000 kJ/mol) y equilibrado el sistema a 300 K y presión de 1 bar, la calidad de cada estructura fue evaluada mediante la trayectoria de RMSD en 10 ns de simulación (trayectoria en Anexos A). En la Figura 8 se relaciona la estabilidad estructural de los modelos con respecto a la estructura de partida. Se puede observar que **M1** mantiene su equilibrio entre 2 a 8 ns de simulación (Figura 8a), con un valor de $0,3 \pm 0,1$ nm. Se presenta una ligera fluctuación al final, entre 8 y 10 ns (valor máximo de 0,4 nm). El molde 3cg8 (SLAC) presenta un equilibrio entre 1.7 y 7 ns con $0,3 \pm 0,4$ nm e igualmente mantiene fluctuaciones al final de la simulación. Es decir, las dos estructuras exhiben un comportamiento similar *in silico* y son igualmente estables.

En cuanto al paralelo entre **M2** y 2yxv (i.e., CueOdD2), es notable que ambas estructuras alcancen el equilibrio aproximadamente a partir de 1 ns (Figura 8b). A diferencia de 2yxv, **M2** presenta ligeras fluctuaciones entre 2 y 3 ns de simulación y un aumento en el valor de RMSD en $0,3 \pm 0,05$ nm. En comparación, 2yxv presenta un aumento en el valor de RMSD en $0,2 \pm 0,025$ nm, lo que significa una ligera disminución de la estabilidad en **M2**.

Un comparativo entre CueOdD2 (2yxv) y CueO^{ΔD2} (**M1** y **M2**) revela un incremento en el valor de RMSD en **M1** y **M2** de $\pm 0,1$ nm en relación con 2yxv (Figura 8c). Estas fluctuaciones pueden atribuirse a la inestabilidad en el acoplamiento entre los dominios **D1** y **D3**, tras la delección del dominio **D2**; específicamente, por el comportamiento conformacional de la región *linker* con el medio y las fuerzas que estabilizan la interacción entre los dominios **D1** y **D3**. Sin embargo, CueO^{ΔD2} presenta un patrón de variaciones durante la simulación y de RMSD semejantes al

observado en SLAC (Figura 8c); estas similitudes significan que CueO^{ΔD2} debe ser estable tan estable como SLAC. En conclusión, las simulaciones de dinámica molecular indican que la mutación producto de la remoción del dominio **D2**, no impactó significativamente la estabilidad estructural de la interacción **D1** - **D3**. Al menos *in silico*, nuestros modelos presentan patrones de trayectoria similar al de una la pequeña lacasa.

Figura 8. Estabilidad estructural de los modelos con respecto a la estructura de partida. a) **M1** - SLAC, b) **M2** - 2yxv c) CueO^{ΔD2} (**M1** y **M2**) SLAC (3cg8) y CueOdD2 (2yxv).



3.3 Acoplamiento Molecular

La función principal de CueO en *E. coli* es la homeostasis del cobre (Grass & Rensing 2001b). No obstante, también es capaz de oxidar los sustratos convencionales de las lacasas. Con el fin de predecir la capacidad de acoplamiento entre los modelos **M1** y **M2** de CueO^{ΔD2} con el 2,6 dimetoxifenol (2,6-DMP), simulamos esta interacción *in silico*. La energía libre de unión, los residuos involucrados en el acoplamiento y los átomos del ligando se resumen en la Tabla 2. Como referentes, se calcularon las interacciones entre las lacasas molde y el mismo sustrato.

Tabla 2. Acoplamiento molecular de los modelos **M1** y **M2** de CueO^{ΔD2} con el 2,6-DMP. Las lacasas molde fueron usadas como control. Resultados obtenidos con el software AutoDock 4 (Morris & Huey 2009).

Estructura	ΔG (kcal/mol)	Residuo – Átomo	Átomos (2,6-DMP)	Distancia (Å)
M1	- 3.85	Q ^{183/HN} – Q ^{183/HE21} – G ^{292/O}	O ¹ – O ² – H ⁷	1.97– 2.136 – 2.2
M2	- 2.82	S ^{185/O} – M ^{186/HN}	O ¹ – H ⁷	2.1 – 2.2
3cg8	- 2.55	Y ^{230/HN}	O ³	1.957
2yxv	- 4.28	M ^{441/O} – M ^{441/HN} V ^{475/O} – G ^{477/HN}	H ⁷ -O ² -H ⁷ -O ²	2.046 – 2.2

En la Tabla 2, se puede apreciar que el modelo **M1** y obtuvo una energía de unión inferior (más negativa) con respecto a su molde SLAC, lo cual sugiere interacciones más favorables entre el modelo y el ligando, que en una pequeña lacasa autentica. La interacción de **M1** con 2,6-DMP (ΔG = - 3.85 kcal/mol) involucra la unión de **Q¹⁸³** y **G²⁹²**, con la formación de tres puentes de hidrógeno (Figura 9a). Estos residuos quedan expuestos en la superficie de la proteína y espacialmente corresponden al dominio **D2**. Por otra parte, **M2** presenta una energía de unión superior a la obtenida

para 2yxv, reflejando que la conformación adoptada por **M2**, proporciona interacciones menos favorables con el 2,6-DMP, en comparación con la estructura nativa (2yxv). La interacción de **M2** con el 2,6-DMP ($\Delta G = -2.82$ kcal/mol) se debería a la formación de dos puentes de hidrógeno con los aminoácidos **S¹⁸⁵** y **M¹⁸⁶** (Figura 9b). En todos los casos, las interacciones corresponden a puentes de hidrógeno formados entre las cadenas laterales y el grupo OH del 2,6-DMP, proveedor de los electrones durante la oxidación del sustrato.

En la Figura 10 se evidencia la cercanía entre los residuos (en círculos) potenciales (**M1** y **M2**) o reales (SLAC y 2yxv) que conforman los sitios de unión al Cu^{2+} y los aminoácidos que interactúan con el sustrato. Así como **H²³¹** y **Cys²⁸⁸** (SLAC), y **H⁴⁴³** (2yxv) conforman los sitios de unión al Cu^{2+} en el centro T1 (Figura 2), los aminoácidos **H²⁸⁸** (**M1**) y **H²²⁶** (**M2**), deben cumplir esta función en CueO Δ D2 y muy probablemente estarán entre los primeros residuos en iniciar la vía de transferencia electrónica hacia el *cluster* trinuclear T2/T3, en donde finalmente ocurre la reducción del O_2 . Los análisis de acoplamiento molecular evidencian una afinidad favorable entre el sustrato 2,6-DMP y una de las conformaciones (**M1**) para la proteína CueO Δ D2. Por lo tanto, tomados en conjunto todos los resultados de análisis bioinformático, se puede concluir que los diseños de CueOdD2 y CueO Δ D2 cumplen con las condiciones teóricas para ser probadas experimentalmente.

Figura 9. Detalles de la interacción estructural de los modelos **M1** y **M2**, y las estructuras moldes con 2,6-DMP. a) M1; b) M2; c) SLAC; d) 2yxv.

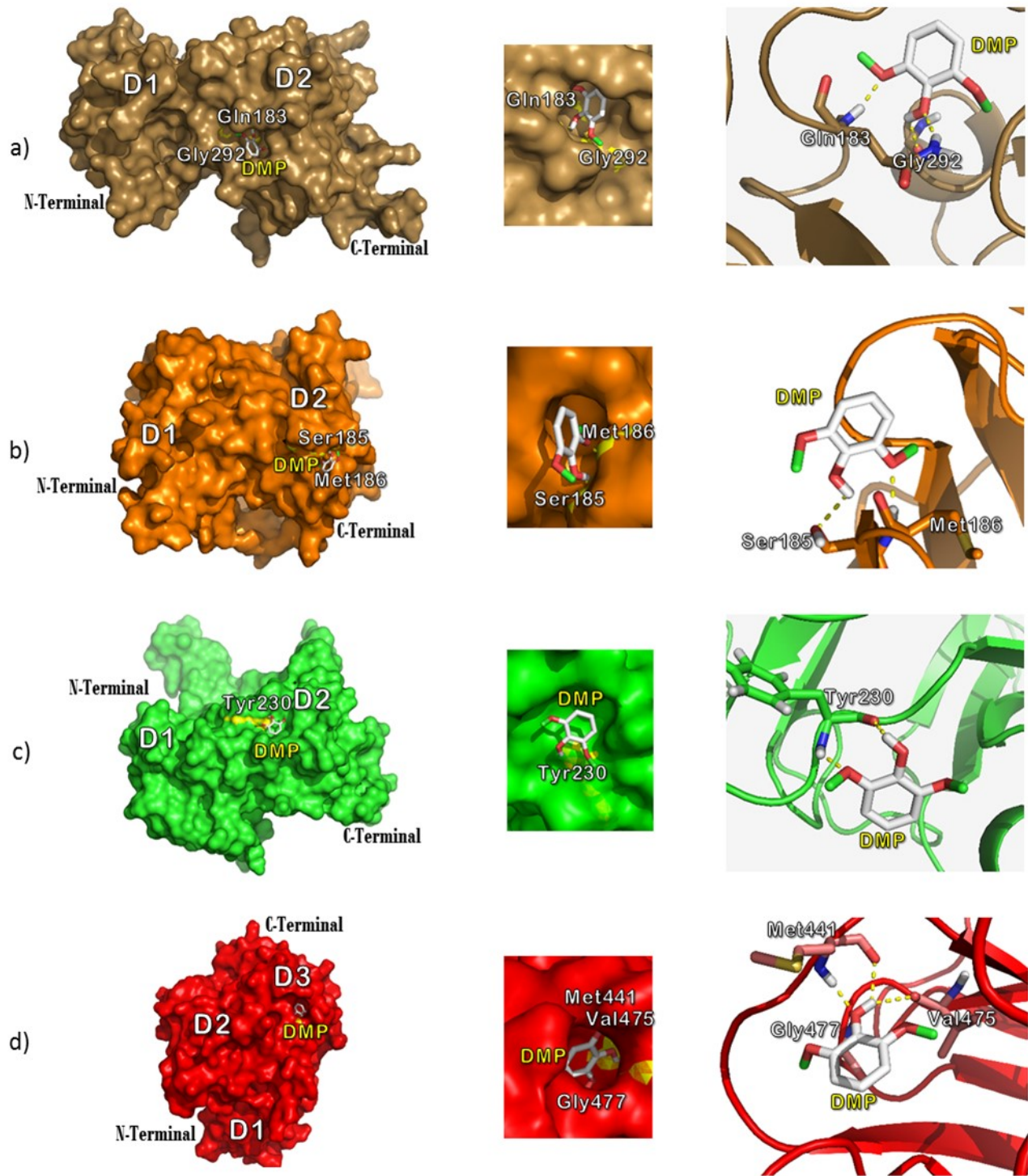
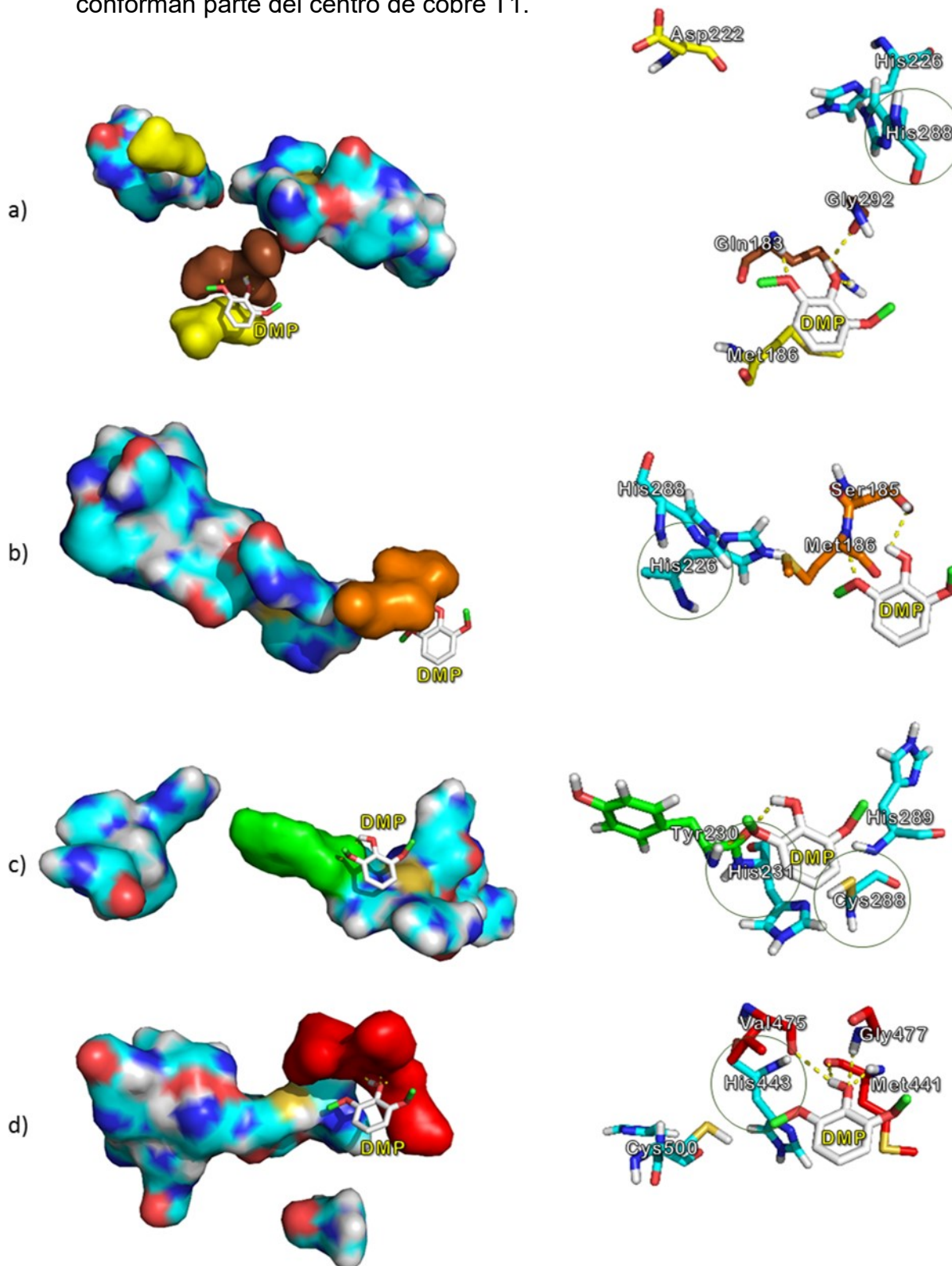


Figura 10. Cercanía entre los residuos que conforman los sitios de unión al Cu (celestes) y los aminoácidos que interactúan con el sustrato, para cada una de las estructuras. a) M1; b) M2; c) SLAC; d) 2yxv. En M1 la región amarilla corresponde a los sitios teóricos de unión al sustrato. Se rodean en círculos los residuos que conforman parte del centro de cobre T1.



3.4 Construcción de los Vectores pET_CueOdD2 y pET_CueO^{ΔD2}

Para caracterizar *in vitro* el mutante deletado CueO^{ΔD2}, iniciamos con el diseño de un gen *CueOdD2* tipo salvaje; es decir, una lacasa CueO de tres dominios. La síntesis del gen, contratada con la empresa General Biosystems, se basó en la secuencia aminoacídica de la proteína CueOdD2 (Figuras 4 y 5) y con el uso de codones de *E. coli*. El marco de lectura abierto de CueOdD2 fue modificado de manera que incluyera en sus extremos sitios de restricción apropiados para la clonación en el vector pET-21d. En 5', se añadió un sitio Nco I, portador del codón de iniciación ATG, lo cual significó una mutación en la región N-terminal de **Q** por **E** (M**Q**RRDFLK → M**E**RRDFLK). En 3', se añadió un sitio Hind III y se le dio continuidad a la secuencia en fase con los nucleótidos codificantes para el [6His]-tag (Figura 11). Para añadir los sitios Eco RI entre dominios (letras azules), se modificó el marco de lectura así:

D1-D2: ⁵²⁰aa **cag tgg** ggt atc gat⁵³⁶ (¹⁷⁴K**QW**GID¹⁶¹) → aag **aat tcg** tgg ggt atc gat (K**NS**WGID)

D2-D3: ¹⁰²⁷ctg **gaa ggg** ctg acg¹⁰⁴¹ (³⁴³L**EGLT**³⁴⁷) → ctg **aat tcg** ctg acg (L**NS**LT)

El plásmido recombinante construido se denominó pET-CueOdD2 (6877 bp). La idea fue simplificar la construcción de CueO^{ΔD2} (924 pb) a partir del gen tipo salvaje. Se incluyeron dos sitios Eco RI en *CueOdD2* (1434 bp) justo en las uniones entre los dominios **D1** y **D2**, y **D2** y **D3** con el fin de cortar el plásmido pET_CueOdD2 con Eco RI y religar (ver Anexo B), previa remoción del pequeño fragmento de 510 pb codificante para **D2** (Figura 12).

3.5 Expresión Homóloga de CueOdD2

En conformidad con la literatura, la proteína CueO se caracteriza por tener localización periplásmica. No obstante, un trabajo sobre CueO realizado

previamente en nuestro laboratorio (Vásquez et al. 2015), reportó también actividad oxidasa en muestras de sobrenadante (fracción del medio). Por lo tanto, para evaluar la expresión y funcionalidad de CueOdD2, se tuvo en cuenta monitorear la actividad oxidasa tanto en la fracción periplásmica (FP) como en el medio de cultivo (FM). La cepa *E. coli* BL21 fue transformada con pET-CueOdD2 e inducida con IPTG (24 h para FM y 6 h para FP). Se llevaron a cabo pruebas de actividad *in vitro* con extractos crudos de cada cepa de *E. coli* BL21 y 5 mM 2,6-DMP como sustrato, mediante toma de lectura de ΔA_{469nm} (Djoko et al. 2015).

Figura 11. Esquema de la construcción del plásmido pET-CueOdD2 (6877 bp).

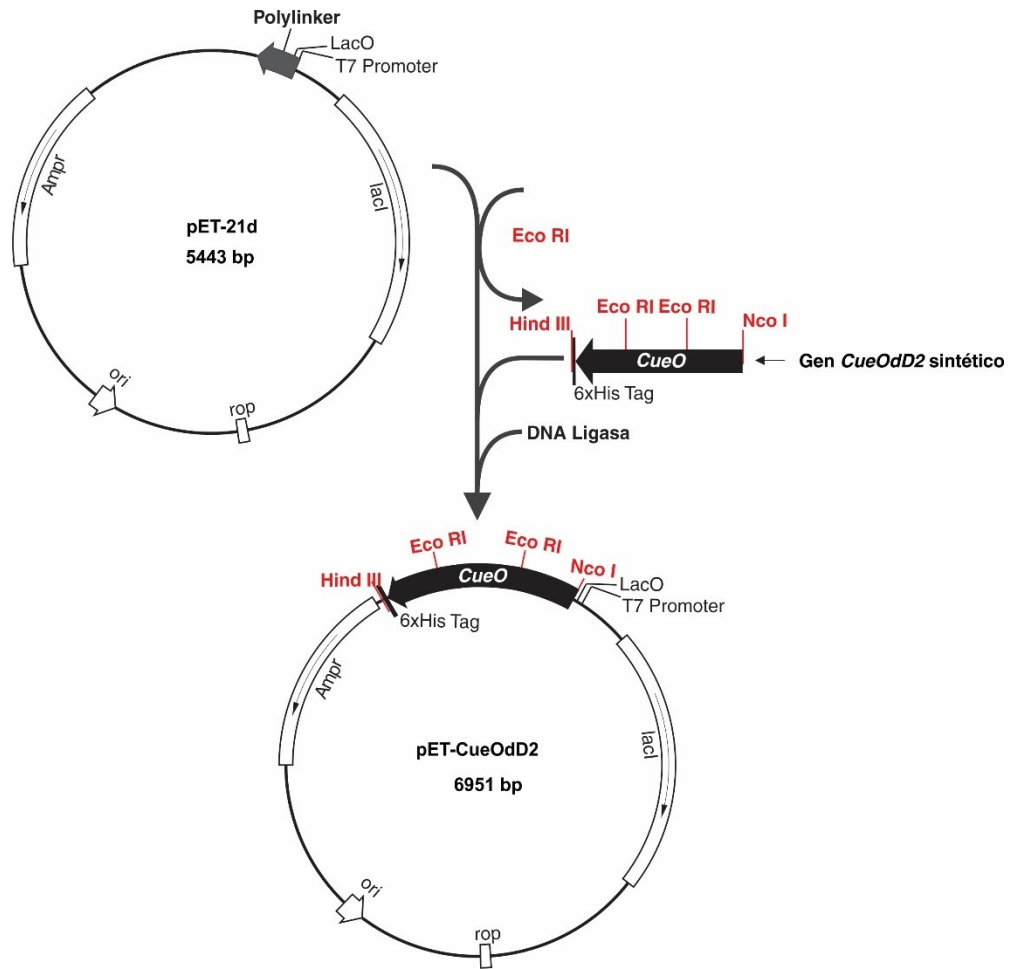
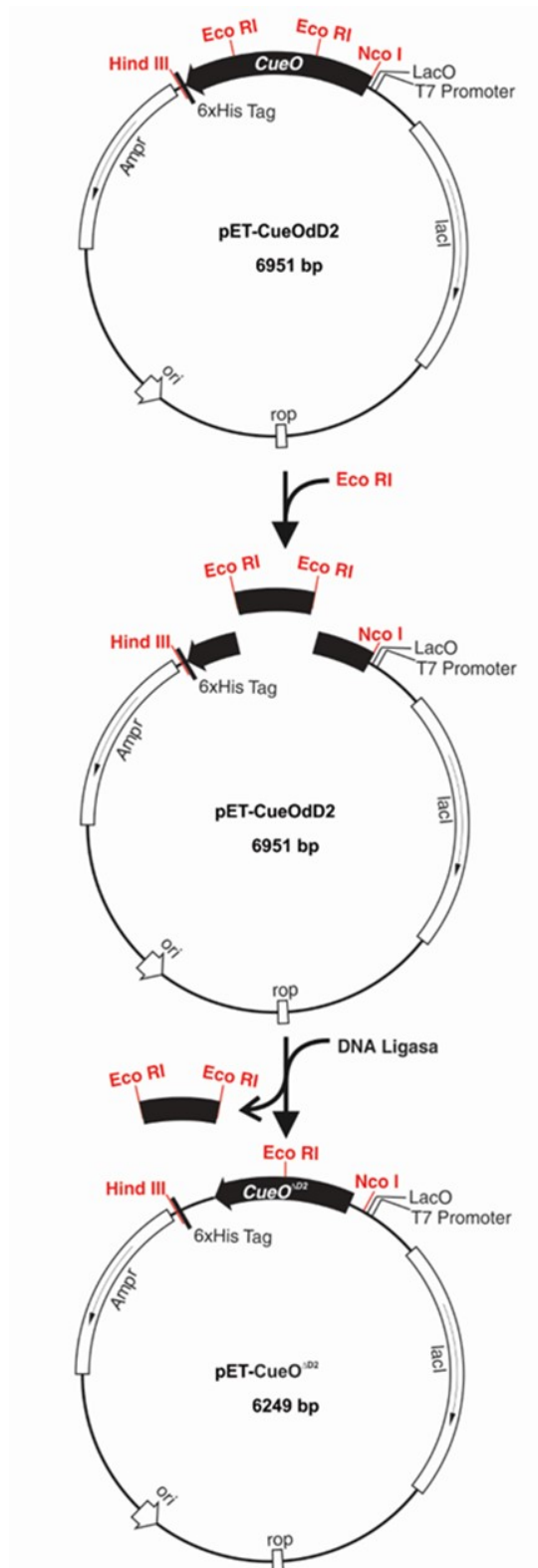


Figura 12. Estrategia de construcción del vector pET-CueO^{ΔD2} a partir del plásmido pET-CueOdD2.

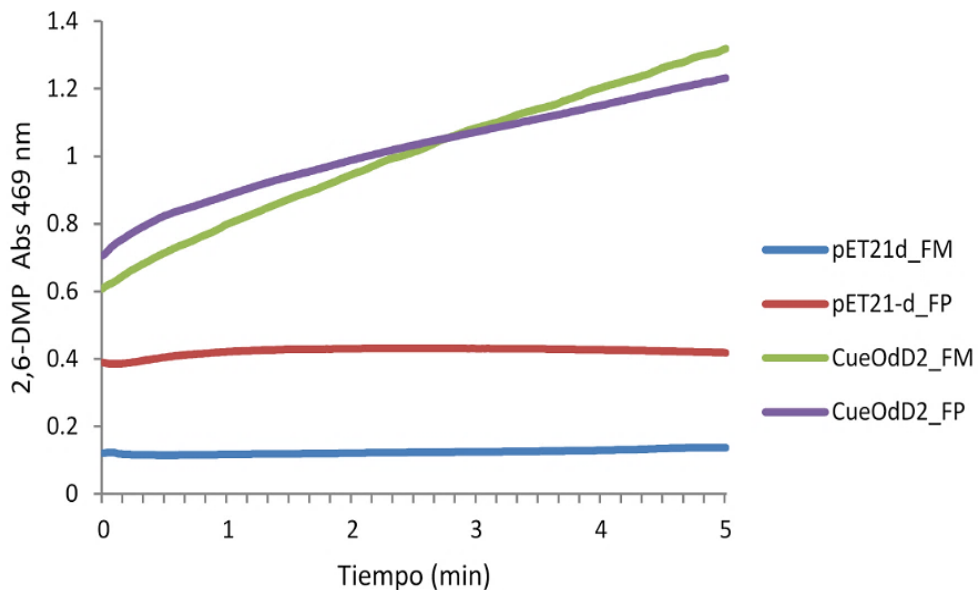


Se adoptaron las condiciones de reacción preliminares (pH, concentración de CuSO_4 y volumen de reacción), previamente estandarizadas en nuestro laboratorio por Vásquez et al. (2015), para la oxidación de catecol y de concentración de 2,6-DMP (Kim et al. 2001). La actividad oxidasa de CueO con sustratos convencionales de lacasas ocurre imperativamente en presencia de iones cobre (Outten et al. 2001). Adicionar iones Cu^{2+} al medio de cultivo induciría la expresión del gen *CueO* endógeno de *E. coli* BL21, lo cual añadiría un ruido de fondo inconveniente (Grass & Rensing 2001). Por consiguiente, no se añadió cobre a los cultivos, sino a los extractos crudos de proteína recombinante, para activar la enzima. El cobre se adicionó en forma de 5 mM CuSO_4 por 20 min, antes de agregar el sustrato. El pH óptimo para la oxidación de catecol fue de 8.5 (Vásquez et al. 2015); nuestras pruebas preliminares de actividad se llevaron a cabo a este pH, mientras evaluábamos la influencia del pH en la actividad de las formas salvaje y delecionada, en paralelo. Aunque está bien establecido que el 2,6-DMP sufre autooxidación a pH alcalino o altas concentraciones de cobre, pudimos eliminar el ruido de fondo de la autooxidación con pruebas paralelas de sólo CuSO_4 y 2,6-DMP a pH 8.5, en ausencia de extracto proteico (Roberts et al. 2002). Los valores de $\Delta A_{469\text{nm}}$ (llamada reacción blanco) fueron sustraídos de la tasa de oxidación final, para cada prueba. Fracciones de *E. coli* BL21 transformada con pET-21d no recombinante fueron utilizadas como control negativo.

En la Figura 13 se muestra la actividad oxidasa de CueOdD2 con el 2,6-DMP, reflejada en el incremento en $\text{Abs}_{469\text{nm}}$ en muestras de fracción de periplasma (FP) y de medio de cultivo (FM). Es importante aclarar que los valores iniciales de $\text{Abs}_{469\text{nm}}$, se deben a la extrema rapidez con que se desencadena la oxidación del sustrato, lo que provoca un cambio instantáneo de coloración (datos no mostrados). Como era de esperarse, las muestras de pET-21d no presentan un aumento significativo en los valores de absorbancia (Figura 13). En cambio, es evidente la actividad oxidasa de CueOdD2 en las muestras FP y FM. Interesantemente, de manera preliminar, el valor máximo de actividad ocurrió en la FM con $\Delta A_{469\text{nm}} = 0,71$

a 5 min de reacción y no en la FP ($\Delta A_{469\text{nm}} = 0,53$) como se esperaría. Bastaron 100 μl de FM/2ml de reacción para alcanzar la actividad observada en la Figura 13, mientras que para FP se requirieron 1,5 ml/2ml finales. Esto se discutirá posteriormente, pero queda claro que la enzima está siendo secretada abundantemente en el medio de cultivo. Se concluyó que CueOdD2 se expresó exitosamente y fue capaz oxidar el sustrato 2,6-DMP.

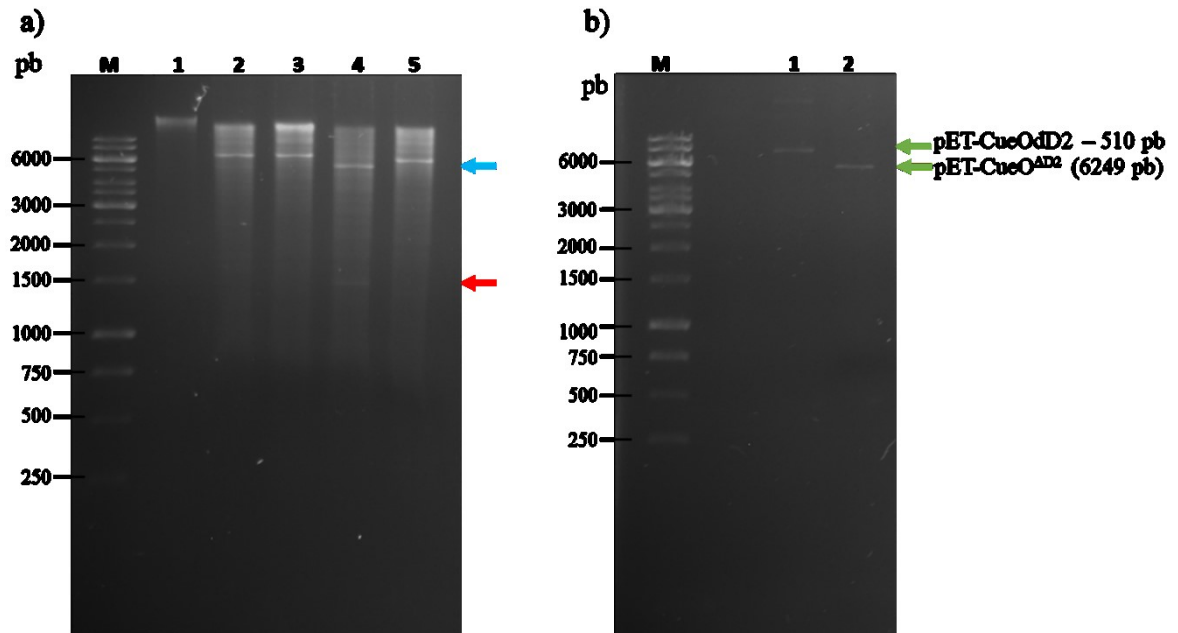
Figura 13. Actividad oxidasa sobre 2,6-DMP de extractos crudos de *E. coli* BL21 transformada con pET-CueOdD2. FM: fracción del medio; FP: fracción del periplasma. Se usaron fracciones de *E. coli* BL21 transformada con pET-21d como control negativo. Condiciones: 6 h de inducción con IPTG, pH 8.5, 20 min de activación con CuSO_4 . La actividad se registró como $\Delta A_{469\text{nm}}$ durante 5 min.



3.6 Delección del Dominio **D2** en pET-CueOdD2 y Construcción de pET-CueO^{ΔD2}

Habiendo comprobado la expresión y la actividad oxidasa de CueOdD2, se procedió a la delección del ADN codificante para el dominio **D2**. En la Figura 14a se observa el patrón de bandas producto de la digestión del plásmido pET-CueOdD2, con las enzimas de restricción Nco I, Hind III y Eco RI, cuyos resultados comprueban la correcta estructura del plásmido recombinante. En los carriles 2 y 3 se evidencia una banda de aprox. 7 kb, correspondiente al plásmido de pET-CueOdD2 linearizado con Nco I y Hind III, respectivamente, o con las dos enzimas al tiempo (carril 4). Esta tercera digestión libera el gen *CueOdD2* de 1434pb (a nivel de la flecha roja derecha) del vector pET_21d (5.4 kb, flecha azul). En el carril 5, se observa una banda de 6 kb que corresponde a pET-CueOdD2 sin 510 pb del dominio **D2** (digestión con Eco RI). Aunque la banda de 510 pb no es visible, se alcanza a notar la diferencia de tamaño con los demás plásmidos. Para la religación, el producto de la digestión (carril 5) se diluyó con el propósito de desfavorecer la recombinación de los fragmentos de ADN. La reconstitución del marco de lectura abierto se hizo con la DNA ligasa y se transformó *E. coli* BL21, dando lugar al plásmido pET-CueO^{ΔD2} (Figura 12). Finalmente, la correcta secuencia del gen *CueO^{ΔD2}* fue verificada mediante digestión de los plásmidos pET-CueOdD2 y pET-CueO^{ΔD2} con Eco RI (Figura 14b, flechas verdes). Igualmente, se hizo una minuciosa lectura de la secuencia del vector pET-CueO^{ΔD2} contratada con la empresa MacroGen Inc (datos no mostrados). El vector pET-CueO^{ΔD2} contiene el gen *CueO^{ΔD2}* con un marco de lectura abierto de 924 pb que codifica para la pequeña lacasa CueO^{ΔD2} de 305 residuos (Ver Anexo C).

Figura 14. Delección del dominio **D2** en pET-CueOdD2. a) 1. pET-CueOdD2 no digerido. 2. Corte con Nco I. 3. Corte con Hind III. 4. Corte con Nco I + Hind III. 5. Corte con Eco RI. Flecha roja: gen *CueOdD2*. Flecha azul: pET-21d. b) pET-CueOdD2 y pET-CueO^{ΔD2} digeridos con Eco RI. Flechas verdes: Vectores pET-CueOdD2 sin 510 pb (dominio **D2**) y pET-CueO^{ΔD2}. M: Thermo Scientific™ O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

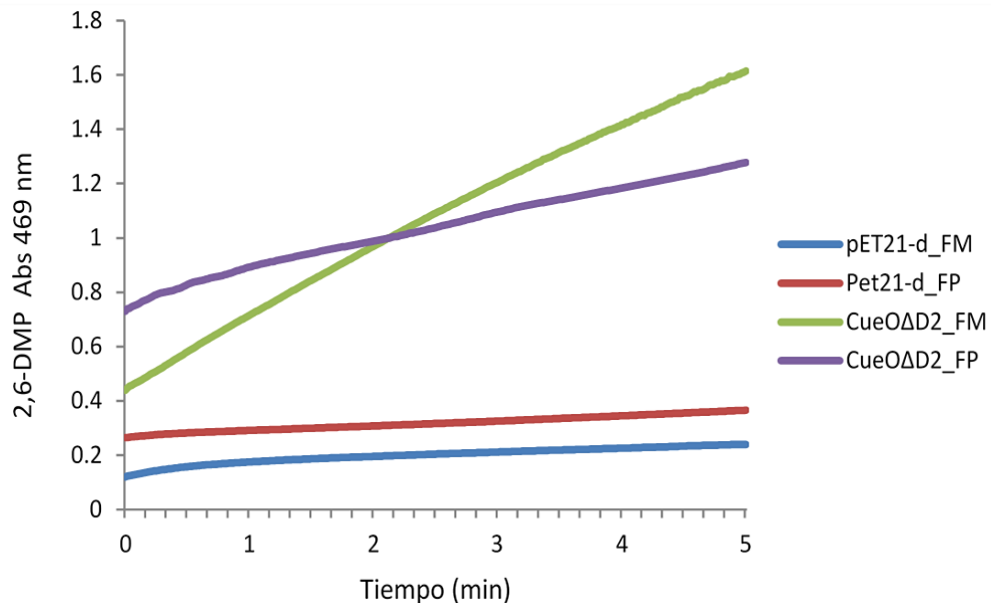


3.7 Expresión Homóloga de CueO^{ΔD2}

Al igual que con CueOdD2, la expresión funcional de la pequeña lacasa CueO^{ΔD2} fue inicialmente comprobada mediante ensayos de actividad *in vitro* con el sustrato 2,6 DMP. Las pruebas se realizaron con extractos crudos de FM y FP, obtenidos de *E. coli* BL21 transformada con pET-CueO^{ΔD2}, a 24 h de inducción con IPTG. Las condiciones de reacción fueron las mismas que se utilizaron para la expresión de CueOdD2. La primera evidencia de la actividad oxidasa de la pequeña lacasa CueO^{ΔD2} se representa en la Figura 15 mediante el $\Delta A_{469\text{nm}}$, tanto en FP ($\Delta A_{469\text{nm}} = 0,55 \text{ nm}$) como en FM ($\Delta A_{469\text{nm}} = 1,17 \text{ nm}$). De nuevo, la actividad es mayor en FM

que en FP y se mantiene la hipótesis de una secreción abundante de la enzima hacia el medio. Como era de esperarse, los extractos de pET-21d no presentaron incremento en el valor de absorbancia. Este control evidencia de manera contundente que la actividad oxidasa detectada corresponde a CueO Δ D2 y no a la expresión del gen *CueO* endógeno de *E. coli* BL21 (DE3). Por lo tanto, podemos concluir que CueO Δ D2 no solamente se expresa, sino que logra catalizar la oxidación de 2,6 DMP; todo esto, a pesar de la delección del dominio **D2**.

Figura 15. Actividad oxidasa sobre 2,6-DMP de extractos crudos de *E. coli* BL21 transformada con pET-CueO Δ D2. FM: fracción del medio; FP: fracción del periplasma. Se usaron fracciones de *E. coli* BL21 transformada con pET-21d como control negativo. Condiciones: 24 h de inducción con 0,4 mM IPTG, pH 8.5, 20 min de activación con CuSO₄. La actividad se registró como ΔA_{469nm} durante 5 min.

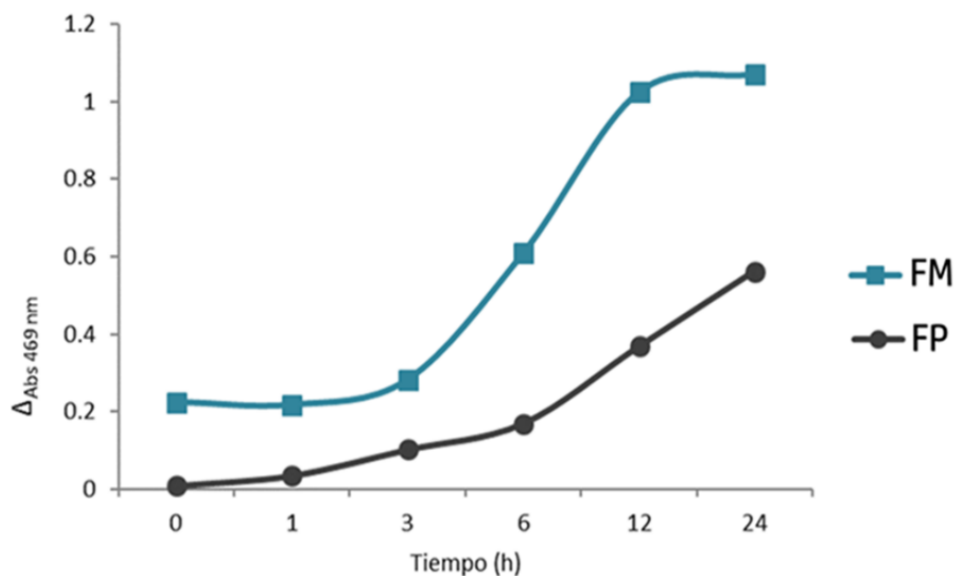


3.8 Variación de la Expresión de CueO Δ D2 Después de Inducción con IPTG

Para evaluar la actividad de CueO Δ D2 en función de la expresión durante el tiempo después de añadir el inductor, se tomaron fracciones de FM y FP a 0, 1, 3, 6, 12 y

24 h. En la Figura 16, se observa una comparación de la actividad relativa de las fracciones FM y FP ($\Delta A_{469\text{nm}}$). Como puede apreciarse, durante los primeros tiempos de inducción (0, 1 y 3 h) la producción de la enzima es baja en FM, pero a partir de 6 h la expresión aumenta exponencialmente hasta alcanzar un máximo a 24 h de inducción ($\Delta A_{469\text{nm}} = 1,07$). En cambio, la actividad relativa de CueO $\Delta D2$ en FP reveló un incremento notorio después de 12 h ($\Delta A_{469\text{nm}} = 0,37$). Al igual que con FM, a 24 h de inducción se logró la mayor actividad ($\Delta A_{469\text{nm}} = 0,56$), pero sin alcanzar los valores de FM. Es decir, la actividad encontrada en FP sólo alcanzó el 52.3% de FM, lo que apoya la hipótesis de una secreción abundante hacia el medio. Con estos resultados queda demostrado que la actividad oxidasa es una consecuencia de la adición del inductor y no de la expresión del gen *CueO* endógeno. También, se definió para futuros experimentos, un tiempo de activación de 24 h antes de proceder a las extracciones.

Figura 16. Actividad oxidasa de 2,6-DMP, de las fracciones FM (cuadrados verdes) y FP (círculos negros) a 0, 1, 3, 6, 12 y 24 h de inducción. Condiciones: Extractos crudos de *E. coli* BL21 transformada con pET-CueO $\Delta D2$ y cultivada con 4 mM IPTG. Sustrato: 5 mM 2,6-DMP, pH 8.5, 20 min de activación con CuSO₄. La actividad se registró como $\Delta A_{469\text{nm}}$ durante 5 min.

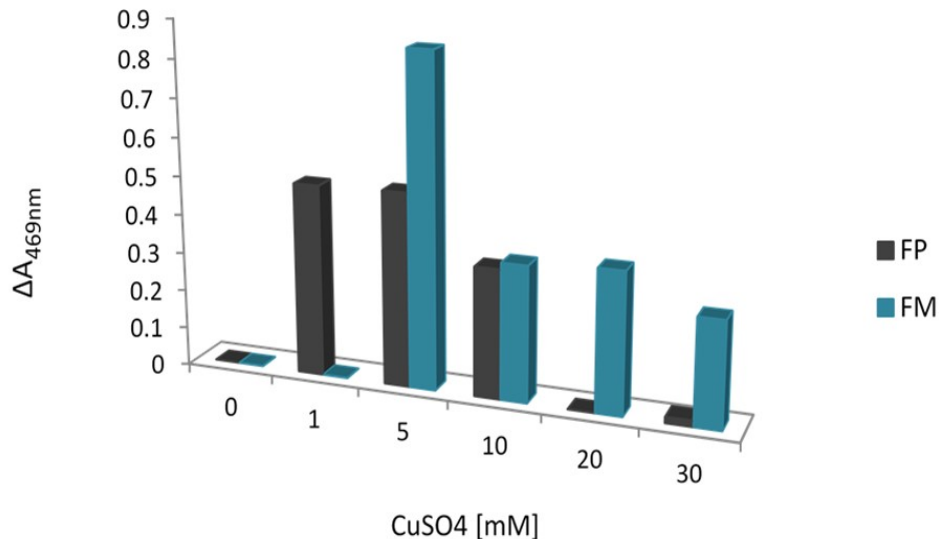


Como mencionamos anteriormente, los iones Cu^{2+} tienen como función la activación de la enzima. Por referencias previas, nuestras pruebas de actividad se han llevado a cabo a una concentración de 5 mM CuSO_4 (Kim et al. 2001; Vásquez et al. 2015). No obstante, se consideró oportuno confirmar la concentración óptima de iones Cu^{2+} con $\text{CueO}^{\Delta\text{D}2}$. Se evaluaron muestras de FM y FP de 24 h de inducción y se calculó la actividad relativa a diferentes concentraciones de CuSO_4 (0, 1, 5, 10, 20 y 30 mM) para cada fracción.

Como lo muestra la Figura 17, ninguna de las dos fracciones mostró actividad a 0 mM CuSO_4 , lo cual confirma la dependencia de $\text{CueO}^{\Delta\text{D}2}$ hacia los iones cobre para su actividad. Llama la atención que la FM exhibe cero actividad a 1 mM CuSO_4 , mientras que a esa misma concentración FM registró un $\Delta A_{469\text{nm}} = 0,5$. La explicación más plausible sería que se trató de un error de manipulación. No obstante, se podría especular que en la fracción de medio podría haber un efecto quelante de iones Cu^{2+} u otro tipo de interacciones que acaparan el Cu^{2+} disponible. La concentración 5 mM demostró ser la más efectiva y curiosamente, la actividad relativa de FM casi duplica a FP, lo cual es coherente con los resultados anteriores. A 10 mM CuSO_4 la actividad relativa decrece un 30%, manifestándose un efecto inhibitorio por el exceso de iones Cu^{2+} .

Interesantemente, valores iguales o superiores a 20 mM tienen un efecto inhibitorio en la fracción FP más no en FM. La explicación podría encontrarse en el hecho de que a esas concentraciones de CuSO_4 se forma un sedimento oscuro (datos no mostrados), probablemente formado por la precipitación del producto junto con la suspensión de proteína. Este fenómeno ya ha sido reportado previamente y no constituye una novedad (Dekker & Barbosa 2001; Mattinen et al. 2011). El hecho de que exista mayor cantidad de proteína en FP que FM fortalece esta hipótesis. Con los resultados obtenidos, podemos concluir que 5 mM es la mejor concentración de CuSO_4 para la oxidación de 2,6-DMP por parte de $\text{CueO}^{\Delta\text{D}2}$, al igual que lo reportado para CueO .

Figura 17. Actividad oxidasa de FM (barras verdes) y FP (barras negras) a diferentes concentraciones de CuSO_4 . Las fracciones crudas de *E. coli* BL21 transformada con pET-CueO Δ^{D2} fueron activadas durante 20 min con cada una de las concentraciones de CuSO_4 , antes de adicionar el sustrato. La actividad relativa se registró como $\Delta A_{469\text{nm}}$ durante 5 min. Sustrato: 5 mM 2,6-DMP, pH 8.5.



3.9 Perfil de Proteínas de FM en Geles SDS-PAGE

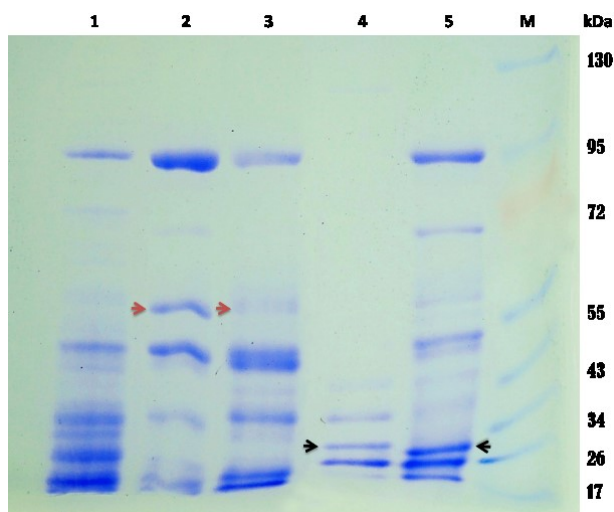
Desafortunadamente, no contamos con anticuerpos para revelar la presencia de CueO Δ^{D2} mediante western blot. Sin embargo, el sólo perfil de bandas en geles SDS-PAGE podría aportar algo de evidencia sobre la expresión de la enzima. En la Figura 18 se muestra una separación electroforética de extractos de FM de *E. coli* BL21 transformada con pET-CueO Δ^{D2} , a 24 h de inducción con IPTG.

En vista de que la actividad de CueO Δ^{D2} es mayor en FM, preferimos visualizar esta fracción, ya que la cantidad de proteínas liberadas al medio de cultivo sería mucho menor que las contenidas en el periplasma. También se incluyeron extractos de FM de *E. coli* BL21 transformada con pET-21d como control negativo (carril 1), pET-CueO1.4 (carril 2) que expresa el gen que codifica para CueO código PDB 4ner

(Komori et al. 2014; Vásquez et al. 2015) y pET-CueOdD2, nuestro CueO tipo salvaje (carril 3). En el gel de la Figura 18, carril 2, se observa una banda de aprox. 55 kDa que coincide con el peso molecular de CueO código PDB 4ner (flecha roja). Otra banda del mismo peso molecular pero un poco menos visible se observa en el carril 3, la cual correspondería a nuestro CueO tipo salvaje (flecha roja).

Finalmente, en los carriles 4 y 5 se puede apreciar una banda de un poco menos de 34 kDa que pertenecería a la proteína CueO^{ΔD2}, ya que sólo se encuentra en los extractos de pET-CueO^{ΔD2} y el peso molecular coincide perfectamente (flechas negras). Interesantemente, algunas bandas del carril 4 con respecto al carril 5 son menos visibles, aclarándose que se trata de dos ensayos de expresión diferentes de CueO^{ΔD2}. La razón podría encontrarse preliminarmente, en pequeñas variaciones en el procedimiento de extracción y precipitación de las proteínas antes de depositar el gel SDS-PAGE. En cualquier caso, en ambos se extractos se aprecia una proteína del peso molecular esperado.

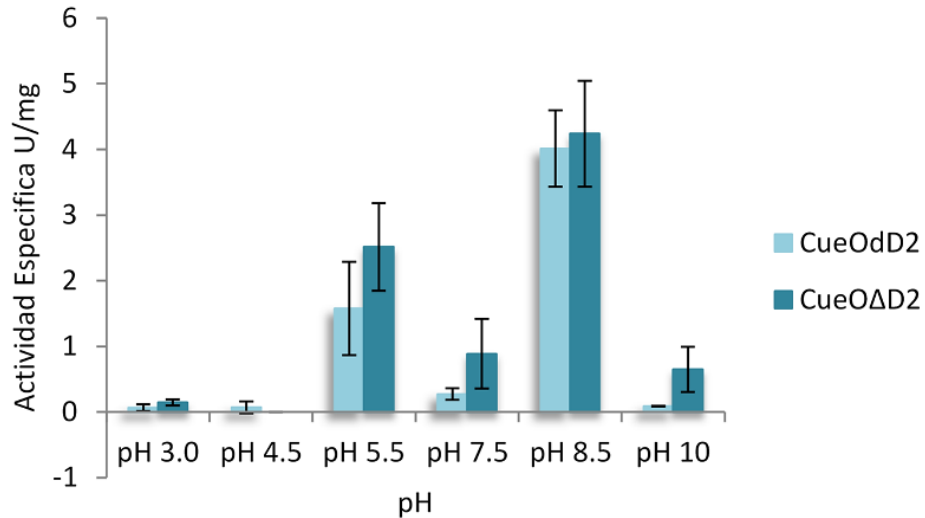
Figura 18. Gel SDS-PAGE de las proteínas de la fracción FM de *E. coli* BL21 transformada con: Carril 1: pET-21d (control negativo). Carril 2: pET-CueO1.4 (Vásquez et al. 2015); Carril 3: pET-CueOdD2; Carriles 4 y 5: pET-CueO^{ΔD2}. M: Referencia de peso molecular 10-170 kDa (Fermentas). Las flechas rojas señalan las isoformas de CueO 2yxv y CueOdD2. Las flechas negras señalan la pequeña lacasa CueO^{ΔD2}.



3.10 Efectos del pH y la Temperatura en la Actividad Oxidasa de CueO^{ΔD2}

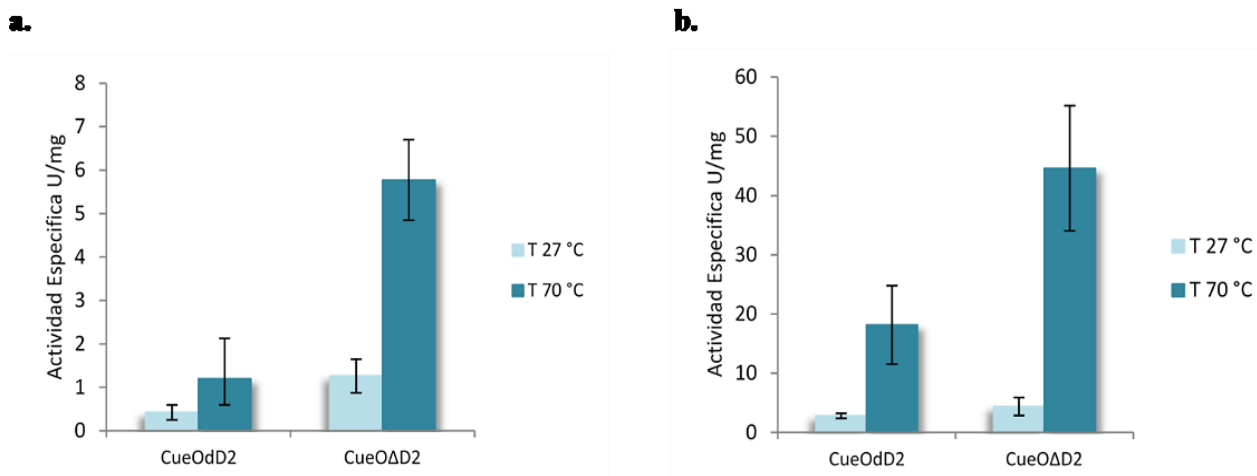
Un trabajo previo demostró que el pH óptimo de CueO para la oxidación de catecol fue de 8.5 Vásquez et al. (2015). Aunque CueO^{ΔD2} logró oxidar el 2,6-DMP a pH 8.5, era obvio que se debía volver a determinar el pH óptimo para esta reacción, con la forma salvaje y delecionada, en paralelo. Por consiguiente, se evaluó la actividad oxidasa de CueOdD2 y CueO^{ΔD2} con 2,6-DMP, utilizando diferentes valores de pH en el rango 3 a 10. Para efectos prácticos y dado que la actividad de CueO^{ΔD2} se da preferiblemente en muestras de FM, los ensayos se realizaron utilizando esta fracción. En la Figura 19 se representa la actividad específica de cada enzima en función del pH y se observa que las dos lacasas se comportan esencialmente de la misma manera. CueOdD2 y CueO^{ΔD2} presentan mayor actividad a pH alcalino (P=0,009), alcanzando el valor máximo de actividad específica a pH 8.5 (4,01 y 4,23 U/mg, respectivamente), cifra similar a lo reportado por Vásquez et al. (2015) para catecol. Los valores de actividad específica de las proteínas disminuyen a pH ácido; sin embargo, a pH=5.5, la actividad alcanza aprox. 60% del pH= 8.5. Estas cifras de actividad resultan interesantes, al considerar que el pI teórico de CueOdD2 es de 6.5, mientras que el del mutante delecionado CueO^{ΔD2} es de 7.9. Este cambio en el pI de 1.4 unidades podría justificar el ligero incremento en la actividad de CueO^{ΔD2}, en todos los valores de pH (Figura 19). No obstante, otras razones que serán tratadas más adelante podrían explicar igualmente este fenómeno.

Figura 19. Influencia del pH sobre la actividad específica de CueOdD2 y CueO Δ D2 con 2,6-DMP, usando extractos de FM de *E. coli* BL21 transformada con pET-CueOdD2 y pET-CueO Δ D2.



Según la literatura, CueO tipo salvaje y CueO-1.4 ($\Delta\alpha 5-7$ CueO) son enzimas termoestables que toleran temperaturas hasta 75 °C, sin perder actividad (Roberts et al. 2003; Kataoka et al. 2007; Vásquez et al. 2015). Con el fin de determinar si la delección del dominio **D2** tuvo alguna repercusión en la termoestabilidad de la enzima, CueOdD2 y CueO Δ D2 fueron sometidas a 70 °C por 2 min e inmediatamente se hizo medición de la actividad oxidasa a la misma temperatura. En la Figura 20 se observan los valores de actividad específica de CueOdD2 y CueO Δ D2 a las temperaturas de 27 y 70 °C, a pH 5.5 y 8.5.

Figura 20. Efecto de la temperatura en la actividad específica de CueOdD2 y CueO Δ D2 a 27 y 70 °C. a) pH 5.5. b) pH 8.5. Condiciones: 2,6-DMP como sustrato, usando extractos de FM de *E. coli* BL21 transformada con pET-CueOdD2 y pET-CueO Δ D2.

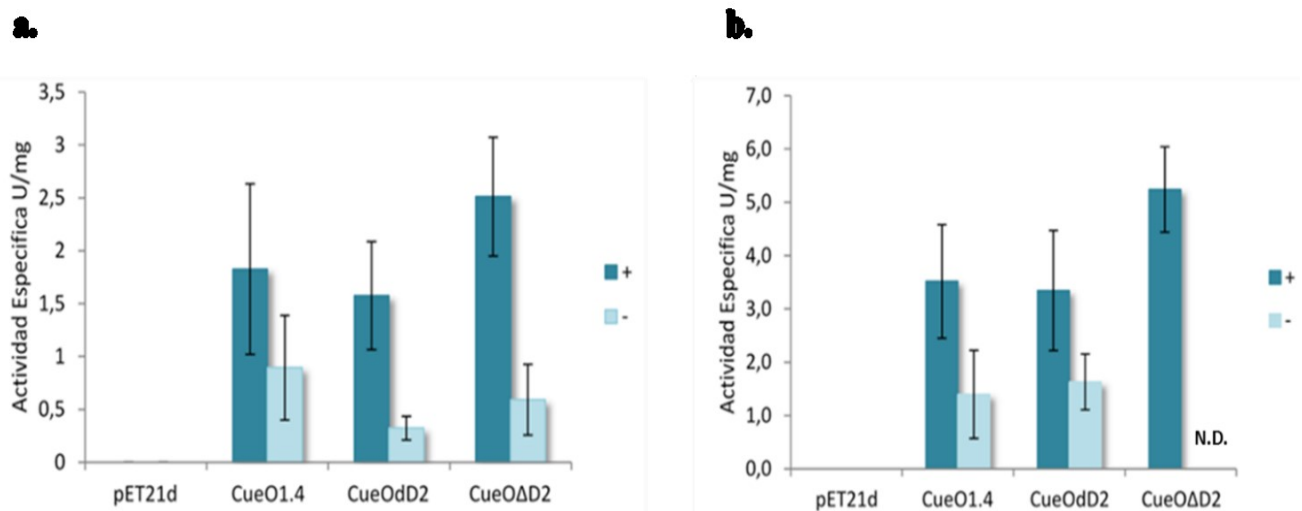


Por una parte, se confirma que la actividad oxidasa de las enzimas aumenta significativamente a 70 °C en relación con 27 °C, para ambos valores de pH ($P_{5.5}=0,025$ y $P_{8.5}=0,004$). Para los extractos a pH 5.5, la actividad específica incrementó en 2.8 y 6.4 veces a 70 °C para CueOdD2 y CueO Δ D2, respectivamente. Este mismo comportamiento se evidenció a pH 8.5, con una actividad 4.6 veces mejor para CueOdD2 y 10.18 veces para CueO Δ D2. Los resultados demuestran que a pesar de la remoción del dominio **D2**, la enzima conserva la termoestabilidad. Se puede concluir que, como otras pequeñas lacasas, e.g., Trubitsina et al. (2015) CueO Δ D2 actúa como una pequeña lacasa termoestable, con valores óptimos de actividad con 2,6-DMP bajo las siguientes condiciones: 70 °C, 5 mM CuSO₄ y pH=8.5.

3.11 Comparación Entre la Actividad Específica de CueO^{ΔD2} y las Formas Salvajes

Habiendo determinado las condiciones óptimas para la actividad enzimática de CueO^{ΔD2}, procedimos a contrastar la actividad específica del mutante en relación con las formas salvajes de 3 dominios, a saber, CueO-1.4 (Vásquez et al. 2015) y CueOdD2 (este trabajo). Se llevaron a cabo ensayos de actividad de extractos crudos de FM de *E. coli* transformada con las tres isoformas de CueO, junto con pET-21d no recombinante como control. Cada cultivo fue inducido (+) o no inducido (-) con IPTG por 24 h. Las pruebas fueron realizadas a pH ácido, i.e., 5.5 y básico, i.e., 8.5, y 27 °C (Figura 21).

Figura 21. Actividad específica de **FM** de cultivos de *E. coli* BL-21 transformada con CueO-1.4, CueOdD2 y CueO^{ΔD2}, inducidos (+) y no inducidos (-) con IPTG. Condiciones: 2,6-DMP como sustrato, ±0.4 mM IPTG por 24 h y pre-incubación con 5 mM CuSO₄ por 20 min. Se empleó pET-21d no recombinante como control negativo. a) Reacción a pH 5.5. b) Reacción a pH 8.5. N.D.: No Determinado.



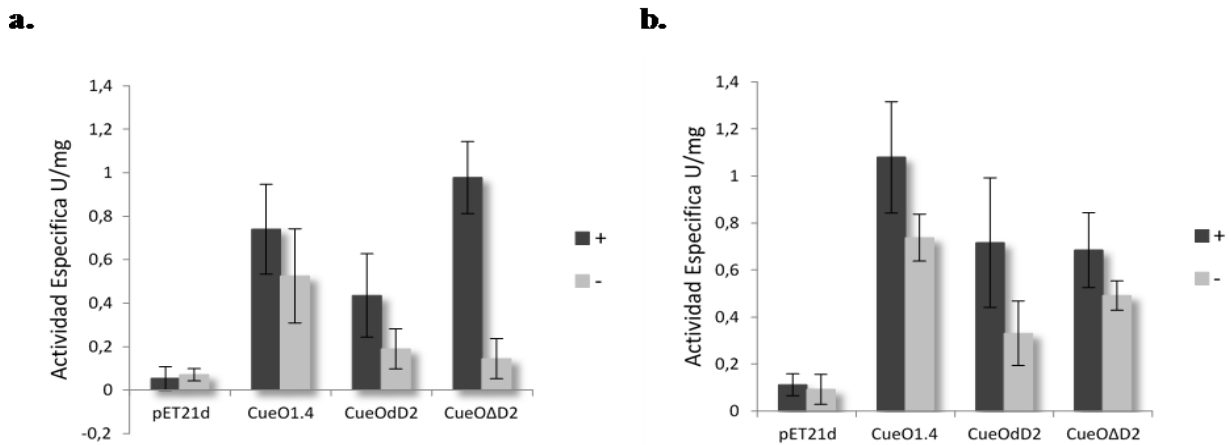
Como se aprecia en la Figura 21, aunque todos los extractos evidencian actividad oxidasa (excepto pET-21d no recombinante), fue CueO^{ΔD2} la que presentó los mayores valores de actividad específica en ambos valores de pH, aunque

prácticamente el doble a pH=8.5. En otras palabras, la delección tuvo un efecto favorable al incrementar en aprox. 30% la actividad oxidasa. Obviamente, hay varios factores a considerar para explicar este fenómeno. La delección misma del dominio **D2**, los niveles de expresión génica, la facilidad de secreción y la estabilidad de cada enzima son todos plausibles. Interesantemente, CueO-1.4 superó ligeramente en actividad específica a CueOdD2, a pesar de que las diferencias en la estructura primaria de las dos proteínas son ínfimas. Las razones anteriores también aplican para explicar esta observación, a excepción de la delección. En cualquiera de los casos, queda plenamente demostrado que la pequeña lacasa CueO^{ΔD2} es tan funcional como CueO de tres dominios (P = 0,927). También se evidencia en la Figura 21, que la FM de los cultivos sin IPTG presentaron actividad oxidasa para CueO-1.4, CueOdD2 y CueO^{ΔD2}. Este comportamiento también fue encontrado por Vásquez et al. (2015) y fue atribuido a una expresión basal de los genes recombinantes, como otras proteínas producidas con el sistema de expresión pET (Grossman et al. 1998). No obstante, los valores de actividad específica en las muestras de FM inducidas con IPTG son significativamente mayores (P = 0,008).

Por otra parte, se realizaron los mismos ensayos de actividad, pero con la fracción FP (Figura 22). Lo primero que se puede observar es que los valores de actividad específica en FP decaen visiblemente en relación con la fracción FM, aunque los valores relativos \pm IPTG se mantienen proporcionalmente. Es decir, en todos los casos, los cultivos con IPTG ostentan mayores valores de actividad específica que los no inducidos (P = 0,03). Los análisis estadísticos indican que las tres enzimas presentaron valores significativamente similares de actividad en FP, para los dos pH analizados (pH=5.5, P=0,491 y pH=8.5, P=0,957). Esta es una observación interesante, al comparar los valores máximos entre las fracciones FM y FP. Por ejemplo, para el mutante CueO^{ΔD2} en la fracción FM + IPTG pH=5.5, la actividad específica alcanza aprox. 2.5 U/mg y a pH=8.5 casi llega a 6 U/mg. En cambio, en la fracción FP + IPTG, CueO^{ΔD2} escasamente alcanza 0.8 U/mg en ambos valores de pH. Esta diferencia se puede explicar por el hecho de que la fracción FP alberga

muchas más proteínas del espacio periplásmico, lo cual hace caer drásticamente el valor de actividad específica de las isoformas de CueO. Además, los altos valores de FM hacen sospechar una secreción activa de CueO hacia el medio.

Figura 22. Actividad específica de **FP** de cultivos de *E. coli* BL-21 transformada con CueO-1.4, CueOdD2 y CueO^{ΔD2}, inducidos (+) y no inducidos (-) con IPTG. Condiciones: 2,6-DMP como sustrato, ±0.4 mM IPTG por 24 h y pre-incubación con 5 mM CuSO₄ por 20 min. Se empleó pET-21d no recombinante como control negativo. a) Reacción a pH 5.5. b) Reacción a pH 8.5.



La hipótesis de la secreción también podría explicar el hecho de que CueO-1.4 fue la lacasa que alcanzó el mayor valor de actividad específica, en relación con CueOdD2 y CueO^{ΔD2} a pH 8.5 (Figura 22b). En efecto, bajo el supuesto de que todos los extractos de periplasma contienen la misma cantidad de proteínas de *E. coli*, el hecho de que CueO^{ΔD2} tenga menor valor de actividad específica en FP (que es muy alta) soporta la idea de que la proteína se está secretando al medio. Además, previamente se demostró que CueO-1.4 es de localización periplásmica, aunque cierta actividad se encuentre en FM (Vásquez et al. 2015). Finalmente, a partir de las diferentes comparaciones podemos concluir que la delección del dominio **D2** no redujo, sino que incrementó la actividad oxidasa con el 2,6-DMP. Nuestra pequeña lacasa CueO^{ΔD2} es funcionalmente activa al igual que la enzima nativa de tres dominios.

4. DISCUSIÓN

En el presente estudio se logró demostrar, por primera vez, que una lacasa de dos dominios, producto de la delección del dominio D2, es totalmente funcional como las pequeñas lacasas encontradas en hongos, bacterias y algas (e.g., Pezet 1998; Wang & Ng 2006; Nakamura et al. 2003). Esta conclusión es de gran relevancia, ya que tiene incidencias en aspectos evolutivos, biotecnológicos y en la ingeniería de nuevas lacasas (Mate & Alcalde 2015). Las predicciones bioinformáticas, fundamentales para el diseño, permitieron evaluar anticipadamente las probabilidades de éxito de una meta que no estaba garantizada. Según nuestros resultados computacionales, CueO^{ΔD2} adoptaría una conformación 3D similar al de una pequeña lacasa como SLAC y, al menos *in silico*, lograría acoplarse a un sustrato convencional de las lacasas y oxidarlo. En contra, se hallaba todo tipo de cuestionamientos que la sola virtualización no podría responder: Entre otros, ¿Adoptaría apropiadamente la estructura 3D, específicamente en la región linker? ¿Lograría estabilizarse el duplo D1-D3 con el vacío dejado por D2? ¿Lograrían reunirse los centros de cobre para conformar un sitio activo funcional? ¿Alcanzaría el potencial redox suficiente para oxidar el sustrato? ¿Se mantendría como un monómero o formaría un trímero? Las respuestas a muchas de estas preguntas se hallarán si en el futuro, si se continúa con la purificación de CueO^{ΔD2} y la determinación de su estructura tridimensional.

Por ahora, los resultados de este trabajo demuestran que las lacasas de 3 dominios sí pueden prescindir del dominio D2 sin perder su función. En el curso del diseño surgieron obstáculos computacionales. En los modelos estructurales, las regiones del *cupredoxin fold* no modeladas (e.g., Figura 5, números romanos), se deben posiblemente a errores ocasionales de alineación o empaquetamiento de la cadena lateral durante el modelado (Baker & Sali 2001). Para el modelo **M1**, una posible explicación de la omisión de algunas hojas β sería la baja identidad de secuencia

con SLAC en esas regiones (Figuras 4 y 5). Igualmente, la desigualdad en la secuencia y la deformación en la región modificada para los sitios de restricción Eco RI y el duplo G-G que reemplazó a la seguidilla de α hélices, exclusivas de CueO (Figuras 1, 2 y 5). Los bajos valores de RMSD entre los moldes y los modelos (Kufareva & Abagyan 2011) fueron fundamentales para confiar en que CueO^{AD2} mantendría la arquitectura 3D característica de las lacasas (Figura 7). Aunque no se han reportado estudios computacionales de referencia acerca de la estabilidad estructural de CueO, nuestros resultados reflejaron que los patrones de trayectoria de RMSD entre CueO^{AD2} y una pequeña lacasa real serían similares, indicando que CueO^{AD2} lograría estabilizarse. Aunque es prematuro afirmarlo, los resultados nos llevan a especular que los cambios de estabilidad de las lacasas analizadas parecen estar estrechamente relacionados con el tamaño estructural. Así, los valores de RMSD tenderían a decrecer a medida que disminuye el tamaño proteico, como se evidencia en estudios de dinámica realizados en lacasas (Awasthi et al. 2015).

En las oxidasas multicobre, es primordial que los aminoácidos que conforman el bolsillo de unión al sustrato se encuentren cerca de las His que coordinan con el Cu de T1 (**C**⁵⁰⁰ y **M**⁵¹⁰ en CueO, Figura 2). Esta es la vía efectiva para la transferencia de electrones entre el sustrato y el Cu de T1 (Bello et al. 2012; Bertrand et al. 2002). En nuestros análisis de acoplamiento molecular, las interacciones entre **M2** y el 2,6-DMP coinciden parcialmente con lo reportado en la literatura (Kataoka et al. 2007). Según el modelo **M2** (Figura 10b), el residuo **M**¹⁸⁶ de CueO^{AD2}, (**M**³⁵⁵ en CueO, Figura 3) se encuentra ubicado en la superficie de la proteína y mantiene gran cercanía con **H**²²⁶ y **H**²⁸⁸ (**H**⁴⁴³ y **H**⁵⁰⁵ en CueO). **M**¹⁸⁶ podría funcionar como el aceptor inicial de electrones y de esta manera asegurar la transferencia electrónica hacia el Cu de T1 y el clúster trinuclear. Por otra parte, los residuos de interacción entre el modelo **M1** y el 2,6-DMP fueron aún más diferentes de los reportados para CueO (Figura 10a). No obstante, los nuevos sitios de unión **Q**¹⁸³ y **G**²⁹² se proyectan cerca de **H**²²⁶ y **H**²⁸⁸. Por lo tanto, **Q**¹⁸³ y **G**²⁹² adoptaron una ubicación más cercana a **H**²⁸⁸ en comparación con el sitio de unión teórico **M**¹⁸⁶ (Figura 10a). Estos nuevos

residuos son en su mayoría de naturaleza hidrofílica y se caracterizan por estar expuestos al solvente, aumentando de esta manera la interacción directa con los sustratos. Otro factor que podría estar influenciado este patrón, es que CueO^{ΔD2} adopte una organización en trímero, al igual que su estructura molde (SLAC). Por lo tanto, Cu de T1 estará localizado en el dominio **D2** y el clúster T2/T3 en **D1** de la subunidad adyacente (lacasa tipo B, Lawton et al. 2010). El hecho de considerar el cambio de los sitios de unión a sustrato en **M1** es válido, ya que comparaciones entre dichas regiones en lacasas revelan que existen diferencias con respecto a la conformación y unión del ligando, primariamente reflejado en diferencias sustanciales en la forma y dimensiones del bolsillo de unión y de los ligandos (Zhukhlistova et al. 2008).

A juzgar por los resultados experimentales *in vitro*, nuestras predicciones bioinformáticas permitieron un diseño exitoso de CueO^{ΔD2}. Los reportes previos revelan que CueO es una proteína de exportación exclusiva al periplasma en *E. coli* (Grass & Rensing 2001). La actividad oxidasa de CueO fue previamente encontrada en el sobrenadante por Vásquez et al. 2015), pero en valores muy bajos. Contrariamente, en nuestros ensayos se detectó la actividad de CueOdD2 y CueO^{ΔD2} preferiblemente en el sobrenadante, sugiriendo una abundante secreción enzimática al medio. No se ha reportado a la fecha que CueO sea secretada al sobrenadante. El hecho de encontrar la actividad oxidasa en esta fracción haría suponer que sí se está secretando al medio; sin embargo, no se puede descartar que podría tratarse de detritos celulares, con CueO^{ΔD2} aún activa. No obstante, nuestros resultados evidencian una secreción profusa al medio, la cual podría atribuirse a una fuga del contenido proteico del periplasma. Este tipo de secreción está bien documentado, en particular en cultivos de larga duración como los nuestros (24 h) y se explica por la acumulación masiva de proteína recombinante en el periplasma (Mergulhão et al. 2005). La presión osmótica podría ser la fuerza motriz para el transporte a través de la membrana externa (Hasenwinkle et al. 1997).

La caracterización de las condiciones óptimas de reacción demuestra, en primer lugar, que al igual que CueO y SLAC, la función fenol oxidasa de CueO^{ΔD2} también es dependiente de iones cobre (Figura 17). La concentración óptima de 5 mM CuSO₄, para la oxidación de 2,6-DMP, resultó ser la misma que lo reportado para CueO nativa (Kim et al. 2001; Vásquez et al. 2015) y para la pequeña lacasa SLAC (Machczynski et al. 2004). Lo anterior, revela que la delección del dominio **D2** no afectó la configuración funcional de los centros de cobre para unirse iones Cu²⁺. Este resultado permite hipotetizar que cada dominio podría incluso expresarse individualmente, sin que pierdan su afinidad por los iones Cu²⁺ y logren conformar los centros T1 y T2/T3.

La influencia del pH en los parámetros cinéticos de CueO^{ΔD2} con el 2,6-DMP como sustrato mostró dos picos principales de actividad a pH 8.5 (más alto) y pH 5.5 (más bajo). CueOdD2 evidencia incremento de la actividad oxidasa en los mismos valores de pH (Figura 19) y coincide con lo encontrado por Vásquez et al. (2015). Las dos proteínas ostentan actividad óptima a pH alcalinos y una disminución de la actividad en valores de pH ácido (excepto pH 5.5). La acidez probablemente incide por inhibición de hidróxido en el clúster trinuclear (Machczynski et al. 2004), afectando el potencial redox (Xu 1997). Por otra parte, se ha demostrado que diversas lacasas procariontas presentan una actividad oxidasa óptima a temperaturas altas (≥ 70 °C), sin perder estabilidad: CotA de *B. subtilis* (Martins et al. 2002), *S. lavendulae* (Suzuki et al. 2003), SLAC de *S. coelicolor* (Machczynski et al. 2004) y CueO (Kataoka et al. 2007). Nuestros experimentos evidencian que la actividad oxidasa de CueO^{ΔD2} a 70 °C no solo se mantiene, sino que se acrecienta significativamente en comparación con CueOdD2 (Figura 20). Este incremento en la estabilidad podría atribuirse a diversos factores: i) El nuevo empaquetamiento estructural (*protein packing*) por los cambios en la estructura primaria (Hildén et al. 2009); ii) Un aumento en las interacciones hidrofóbicas (Hildén et al. 2009); y iii) Por la flexibilidad de la región *linker* incluida en el diseño.

Los análisis bioinformáticos predicen que CueO^{ΔD2} debe tener un peso molecular de ~34 kDa. Aunque no contamos con anticuerpos para una identificación precisa de CueO^{ΔD2}, en los geles SDS-PAGE se logró observar una banda justamente a ese peso molecular y exclusivamente en los extractos de *E. coli* transformada con pET-CueO^{ΔD2}. Dicha banda podría corresponder a la organización monomérica de CueO^{ΔD2}. Sin embargo, no descartamos la formación de dímeros o trímeros, característicos de las pequeñas lacasas (Endo et al. 2003; Machczynski et al. 2004; Wang & Ng 2006). El tamaño del monómero de CueO^{ΔD2} (~34 kDa) en comparación con otras pequeñas lacasas caracterizadas en la literatura, se encuentra dentro del rango: SLAC, con un peso molecular de ~32 kDa (Machczynski et al. 2004); *laccase-like* de *Botrytis cinérea*, ~32 kDa (Pezet 1998); Ssl1 de *S. sviveus*, ~33 kDa (Gunne et al. 2012); EpoA de *S. griseus*, ~38 kDa (Endo et al. 2003); lacasa de *Pleurotus eryngii*, ~34 kDa (Wang & Ng 2006); NeMCO de *Nitrosomas europea*, ~40.1 kDa (Lawton et al. 2009); entre otras.

Las pruebas de actividad demostraron que CueO^{ΔD2} es capaz de oxidar el 2,6-DMP y en algunos casos esta actividad fue mayor en relación con las formas nativas CueO y CueOdD2 (Figuras 21 y 22). El incremento en la actividad podría ser producto de altos niveles de expresión del gen o de estabilidad de la proteína CueO^{ΔD2} ante la degradación por proteasas. Igualmente, podría atribuirse a la conformación espacial de CueO^{ΔD2}, que favorecería el acceso de sustratos orgánicos a la superficie de la proteína, debido a una mayor cercanía del sustrato al centro de cobre T1 (Sakurai & Kataoka 2007). Los resultados de acoplamiento molecular, especialmente la conformación M1, favorecen esta hipótesis (Tabla 2). La actividad específica en FM a pH = 8.5 alcanzó 6 U/mg, con 2,6-DMP como sustrato. En comparación con CueO y Δα5–7 CueO (29 y 30 U/mg respectivamente, (Kataoka et al. 2007), CueO^{ΔD2} alcanzó 1/5 de la actividad de la proteína sin purificar. Si se hace una sumatoria del total de las bandas de la Figura 18, carril 5, tendríamos que *grosso modo* CueO^{ΔD2} representa no menos de 1/5 de las proteínas presentes. Es probable entonces que el incremento sea aparente, así que sólo la evaluación

de la actividad específica de la proteína pura podría aclarar este punto. Lo cierto es que la actividad específica en extractos crudos fue superior que las formas nativas de tres dominios.

Tomadas en conjunto las anteriores afirmaciones, es válido concluir que CueO puede prescindir del dominio D2 sin afectarse su actividad fenol oxidasa. Es decir, nuestra pregunta de investigación obtuvo una respuesta satisfactoria. Desde luego, surgen nuevas incógnitas: La primera de ellas, ¿Cuál es entonces la verdadera función del dominio D2 en las lacasas? Según la literatura científica, la función del dominio D2 es incierta. Machczynski et al. (2004) sugieren que el dominio D2, así como los bucles de interacción entre los dominios, posiblemente contribuyan con la formación del bolsillo de unión al sustrato. Específicamente en hongos, el dominio D2 otorga estabilidad a la estructura general, gracias a la formación de puentes disulfuro entre los dominios D1 y D2 (Hakulinen et al. 2002). Así mismo, el dominio D2 es objeto de glicosilación, lo cual influye en la secreción, actividad y estabilidad térmica de la enzima (Hildén et al. 2009). En bacterias, por ahora, el dominio D2 se considera un puente de unión y acoplamiento entre el dominio D1 y D3 (Dwivedi et al. 2011). Interesantemente, las lacasas bacterianas de tres dominios, se han desviado un poco de su principal función oxidasa; en efecto, las lacasas bacterianas han asumido otro tipo de actividades. Por ejemplo, CueO se ocupa de la homeostasis del cobre en *E. coli*, gracias a su actividad como cuproso oxidasa (Grass & Rensing 2001a). CotA, la cual hace parte del componente de las esporas de *B. subtilis*, le confiere resistencia al peróxido de hidrógeno y la luz UV (Wang et al. 2016). Se podría especular el dominio D2 en bacterias podría estar cumpliendo un papel adicional para las nuevas funciones de estas proteínas. En este sentido, sería interesante comprobar si CueO^{ΔD2} es capaz de conferir la tolerancia al cobre de la misma manera que lo hace el tipo salvaje, en una cepa de *E. coli* ΔCueO.

La segunda pregunta sería: Si las lacasas pueden funcionar sin el dominio D2, ¿por qué se llegó evolutivamente a lacasas de tres dominios? Como dicho en la

introducción, los modelos evolutivos apuntan a que las oxidasas multicobre surgieron de la duplicación en tándem de un dominio cupredoxina primordial (Rydén 1988), hasta formar una amplia gama de MCOs (Rydén & Hunt 1993). No se explica aún, si las lacasas de tres dominios surgieron como producto de la inserción de un dominio cupredoxina adicional en una lacasa de dos dominios, o de la delección sucesiva de dominios de una MCO como la ceruloplasmina (Ortel et al. 1984). Basados en los trabajos anteriores, Nakamura et al. (2003) propusieron un modelo evolutivo bastante completo para explicar el origen de las MCOs, pero de nuevo, queda la incertidumbre sobre la aparición de las lacasas de tres dominios, cuando las de dos pueden asumir las mismas funciones. Es probable que la respuesta a esta pregunta se encuentre al analizar las funciones alternas que las lacasas de tres dominios han asumido en grupos taxonómicos específicos, i.e., CueO, CotA, etc.

Finalmente, ¿por qué la mayoría de lacasas actuales continúan teniendo tres dominios, si dos dominios consecutivos son suficientes para llevar a cabo la función redox? Posiblemente, el surgimiento del dominio D2 estaría justificado, como planteamos anteriormente, por actividades enzimáticas específicas imprescindibles, además de garantizar la resistencia a la degradación y la estabilidad estructural. Interesantemente, la ausencia del dominio D2 en las pequeñas lacasas es compensada por la reorganización cuaternaria en dímeros y trímeros, lo cual las hace más activas y estables a alta temperatura y pH (Held et al. 2005), al igual que algunas lacasas fúngicas. Ya se han descubierto bastantes lacasas de dos dominios en hongos y algas (Nakamura et al. 2003), lo que hace probable que una gran diversidad de lacasas de dos dominios esté aún por descubrir. Los resultados de este trabajo invitan a replicar este modelo con otras lacasas bacterianas o eucariotas para nuevos desarrollos a nivel biotecnológico. La determinación de la estructura 3D y la capacidad de reemplazar a CueO en la función cuproso oxidasa en *E. coli* son preguntas que aún quedan por resolver.

5. CONCLUSIONES

Los análisis bioinformáticos demostraron que, a nivel predictivo, CueO^{ΔD2} adquirió una conformación estructural similar e igualmente estable al de una pequeña lacasa. Los dominios se ajustaron al plegamiento del *cupredoxin fold* característico de las MCOs.

La delección del dominio D2, no afectó la conformación de los centros de cobre. Los resultados obtenidos en el análisis de acoplamiento molecular, así como las pruebas de actividad, indican que CueO^{ΔD2} es una pequeña lacasa funcional, al catalizar la oxidación de un sustrato convencional de lacasa como el 2,6-DMP.

CueO^{ΔD2} actúa como una pequeña lacasa funcional bajo las siguientes condiciones óptimas de reacción: 5 mM de CuSO₄ para la activación enzimática, pH 8.5 y 5.5 y una temperatura óptima de 27 °C. Además, mantiene la condición de termoestabilidad al igual que CueO y otras pequeñas lacasas.

CueO^{ΔD2} puede prescindir del dominio D2 para llevar a cabo su función como fenol oxidasa hacia el 2,6-DMP. La actividad se vio mejorada en relación con CueO_{D2} nativa.

Se puede afirmar que el dominio D2 sí es prescindible para llevar a cabo la función fenol oxidasa en lacasas bacterianas de tres dominios. Como la literatura científica reporta que el dominio D2 es glicosilado al menos en hongos, es de suponer que su presencia podría no tener que ver con la función oxidasa sino con la estabilidad de la proteína.

6. COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN

- Utiliza las herramientas de búsqueda y análisis de secuencias en las bases de datos *Genbank*, *RCSB Protein Data Bank*, *I-TASSER* y *PDBsum*.
- Diseña los marcos de lectura abiertos de *CueO^{WT}* y *CueO^{ΔD2}*, con los sitios de restricción y los '(His₆) tag' necesarios para su purificación.
- Construye modelos proteicos predictivos, mediante el uso de herramientas bioinformáticas como *I-TASSER*, *GROMACS* y *Autodock*.
- Sobreexpresa genes con el vector pET-21d, en *E. coli* BL21 (DE3).
- Realiza geles desnaturizantes SDS-PAGE para visualizar los perfiles de proteínas.
- Compara la actividad específica de las proteínas expresadas, con sustratos convencionales.

BIBLIOGRAFÍA

ADMAN, E. T. Copper protein structures. *Advances in Protein Chemistry*. 1991, 42, 145–97.

AUSUBEL, F. M. Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. *Greene Pub. Associates*. 1992.

AWASTHI, M., JAISWAL, N., SINGH, S., et al., Molecular docking and dynamics simulation analyses unraveling the differential enzymatic catalysis by plant and fungal laccases with respect to lignin biosynthesis and degradation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2015, 33(9), 1835–1849.

BAKER, D., & SALI, A. Protein Structure Prediction and Structural Genomics. *Science*. 2001, 294(5540), 93–96.

BELLO, M., VALDERRAMA, B., SERRANO-POSADA, H., et al.,. Molecular Dynamics of a Thermostable Multicopper Oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: Structural Differences between the Apo and Holo Forms. *PLoS ONE*. 2012, 7(7), e40700.

BERENDSEN, H. J. C., POSTMA, J. P. M., VAN GUNSTEREN, W. F., et al., Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. *Springer Netherlands*. 1981, (pp. 331–342).

BERTRAND, T., JOLIVALT, C., BRIOZZO, P., et al.,. Crystal structure of a four copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*. 2002, 41(23), 7325–33.

BROUWERS, G. J., de VRIND, J. P., CORSTJENS, P. L., et al. cumA, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn²⁺ oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65(4), 1762-8.

CALLEBAUT, I., LABESSE, G., DURAND, P., et al.,. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*. 1997, 53(8), 621–45.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron (Oxford, England : 1993)*. 2004, 35(1–2), 93–6.

De GONZALO, G., COLPA, D. I., HABIB, M. H. M., et al. Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *Journal of Biotechnology*. 2016, 236, 110–119.

DEKKER, & BARBOSA. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 2001, 28(1), 81–88.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. 2002.

DJOKO, K. Y., CHONG, L. X., WEDD, A. G., et al. Reaction Mechanisms of the Multicopper Oxidase CueO from. 2015, (8), 2005–2015.

DWIVEDI, U. N., SINGH, P., PANDEY, V. P., et al. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011, 68(2), 117–128.

ENDO, K., HAYASHI, Y., HIBI, T., et al. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *Journal of Biochemistry*. 2003, 133(5), 671–7.

EUDES, R., LE TUAN, K., DELETTRE, J., et al. A generalized analysis of hydrophobic and loop clusters within globular protein sequences. *BMC Structural Biology*. 2007, 7(1), 2.

FURTADO, G. P., RIBEIRO, L. F., LOURENZONI, M. R., et al. A designed bifunctional laccase/ β -1,3-1,4-glucanase enzyme shows synergistic sugar release from milled sugarcane bagasse. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*. 2013, 26(1), 15–23.

GALAI, S., TOUHANI, Y., & MARZOUKI, M. N. Response surface methodology applied to laccase activities exhibited by *Stenotrophomonas maltophilia* AAP56 in different growth conditions. *BioResources*. 2012, 7(1), 706–726.

GRASS, G., & RENSING, C. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001a., 286(5), 902–8.

GRASS, G., & RENSING, C. Genes Involved in Copper Homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183(6). 2001b., 2145–7.

GROSSMAN, T. H., KAWASAKI, E. S., PUNREDDY, S. R., et al. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*. 1998, 209(1–2), 95–103.

GUNNE, M., URLACHER, V. B., FESTA, G., et al. Characterization of the Alkaline Laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus* with Unusual Properties Discovered by Genome Mining. *PLoS ONE*. 1998, 7(12), e52360.

HAKULINEN, N., KIISKINEN, L.-L., KRUUS, K., et al. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural Biology*. 2002, 9(8), 601–5.

HASENWINKLE, D., JERVIS, E., KOPS, O., et al. Very high-level production and export in *Escherichia coli* of a cellulose binding domain for use in a generic secretion-affinity fusion system. *Biotechnology and Bioengineering*. 1997, 55(6), 854–863.

HELD, C., KANDELBAUER, A., SCHROEDER, M., et al. Biotransformation of phenolics with laccase containing bacterial spores. *Environmental Chemistry Letters*. 2005, 3(2), 74–77.

HERRERA, OF, & GÓMEZ, J. Las Herramientas Del Modelado Molecular. *XXXII*. 2008, 95–134.

HESS, B., KUTZNER, C., VAN DER SPOEL, D et al. GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2008, 4(3), 435–447.

HILDÉN, K., HAKALA, T. K., & LUNDELL, T. Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnology Letters*. 2009, 31(8), 1117–28.

HIROFUMI, K. ;, & YOSHIKI, H. Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins. 2010, 1, 31–40.

HUMPHREY, W., DALKE, A., & SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 1996, 14(1), 33–38.

IBARRA, D., CAMARERO, S., ROMERO, J., et al. Integrating laccase–mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine-free bleaching of eucalypt kraft pulp. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2006, 81(7), 1159–1165.

IRWIN, J. J., & SHOICHET, B. K. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2005, 45(1), 177–82.

JONES, S. M., & SOLOMON, E. I. Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*. 2015, 72(5), 869–83.

JORGENSEN, W. L., MAXWELL, D. S., & Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*. 1996, 118(45), 11225–11236.

- KATAOKA, K., KOMORI, H., UEKI, Y., et al. Structure and function of the engineered multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli*--deletion of the methionine-rich helical region covering the substrate-binding site. *Journal of Molecular Biology*. 2007, 373(1), 141–52.
- KIM, C., LORENZ, W. W., HOOPES, J. T., et al. Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* *yacK* gene. *Journal of Bacteriology*. 2001, 183(16), 4866–4875.
- KOMORI, H., MIYAZAKI, K., & HIGUCHI, Y. X-ray structure of a two-domain type laccase: A missing link in the evolution of multi-copper proteins. *FEBS Letters*, 583(7). 2009, 1189–1195.
- KOMORI, H., SUGIYAMA, R., KATAOKA, K., et al. New insights into the catalytic active-site structure of multicopper oxidases. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*. 2014, 70(Pt 3), 772–9.
- KUFAREVA, I., & ABAGYAN, R. Methods of Protein Structure Comparison. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2011, Vol. 857, pp. 231–257.
- KUMAR, S. V. S., PHALE, P. S., DURANI, S., et al. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003, 83(4), 386–394.
- KUROSE, S., KATAOKA, K., OTSUKA, K., et al. Promotion of Laccase Activities of *Escherichia coli* Cuprous Oxidase, CueO by Deleting the Segment Covering the Substrate Binding Site. *Chemistry Letters*. 2007, 36(2), 232–233.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227(5259), 680–685.
- LAWTON, T. J., ROSENZWEIG, A. C., LAWTON, T. J., et al. Two-Domain Multicopper Oxidase. In *Handbook of Metalloproteins*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. 2010.
- LAWTON, T. J., SAYAVEDRA-SOTO, L. A, ARP, D. J., et al. Crystal structure of a two-domain multicopper oxidase: implications for the evolution of multicopper blue proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009, 284(15), 10174–80.
- LIU, L., DEAN, J. F. D., FRIEDMAN, W. E., et al. A laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. *The Plant Journal*. 1994, 6(2), 213–224.
- MACHCZYNSKI, M. C., VIJGENBOOM, E., SAMYN, B., et al. Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity.

Protein Science : A Publication of the Protein Society. 2004b.,13, 2388–2397.

MAJUMDAR, S., LUKK, T., SOLBIATI, J. O., et al. Roles of Small Laccases from *Streptomyces* in Lignin Degradation. *Biochemistry*. 2014, 53(24), 4047–4058.

MARTINS, L. O., SOARES, C. M., PEREIRA, M. M., et al. Molecular and Biochemical Characterization of a Highly Stable Bacterial Laccase That Occurs as a Structural Component of the *Bacillus subtilis* Endospore Coat. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277(21), 18849–18859.

MATE, D. M., & ALCALDE, M. Laccase engineering: From rational design to directed evolution. *Biotechnology Advances*. 2015, 33(1), 25–40.

MATTINEN, M.-L., MAIJALA, P., NOUSIAINEN, P., et al. Oxidation of lignans and lignin model compounds by laccase in aqueous solvent systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011, 72(3), 122–129.

MERGULHÃO, F. J. M., SUMMERS, D. K., & MONTEIRO, G. A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*. 2005, 23(3), 177–202.

MOROZOVA, O. V, SHUMAKOVICH, G. P., GORBACHEVA, M. A., et al. “Blue” laccases. *Biochemistry. Biokhimiia*. 2007, 72(10), 1136–50.

MORRIS, G., & HUEY, R. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. 2009, 30(16), 2785–2791.

MORRIS, G. M., GOODSELL, D. S., HALLIDAY, R. S., et al., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*. 1998,19(14), 1639–1662.

MURPHY, M. E., LINDLEY, P. F., & ADMAN, E. T. Structural comparison of cupredoxin domains: domain recycling to construct proteins with novel functions. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. 1997, 6(4), 761–70.

NAKAMURA, K., & GO, N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005, 62(18), 2050–2066.

NAKAMURA, K., KAWABATA, T., YURA, K., et al. Novel types of two-domain multi-copper oxidases: Possible missing links in the evolution. *FEBS Letters*. 2003, 553, 239–244.

ORTEL, T. L., TAKAHASHI, N., & PUTNAM, F. W. Structural model of human ceruloplasmin based on internal triplication, hydrophilic/hydrophobic character, and

secondary structure of domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984, 81(15), 4761–5.

OUTTEN, F. W., HUFFMAN, D. L., HALE, J. A, ET AL. The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001, 276(33), 30670–7.

PEZET, R. Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. *FEMS Microbiology Letters*. 1998, 167(2), 203–208.

RIBEIRO, L. F., FURTADO, G. P., LOURENZONI, M. R., et al. Engineering Bifunctional Laccase-Xylanase Chimeras for Improved Catalytic Performance. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, 286(50), 43026–43038.

ROBERTS, S. A, WEICHSEL, A., GRASS, G., et al. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, 99(5), 2766–71.

ROBERTS, S. A, WILDNER, G. F., GRASS, G., et al. A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278(34), 31958–63.

RYDÉN, L. Evolution of blue copper proteins. *Progress in Clinical and Biological Research*. 1988, 274, 349–66.

RYDÉN, L. G., & HUNT, L. T. Evolution of protein complexity: the blue copper-containing oxidases and related proteins. *Journal of Molecular Evolution*. 1993, 36(1), 41–66.

SAKURAI, T., & KATAOKA, K. Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. *The Chemical Record*. 2007, 7(4), 220–229.

SAMBROOK, J., & RUSSEL, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001. Third Ed.

SHERIF, M., WAUNG, D., KORBEKI, B., et al. Biochemical studies of the multicopper oxidase (small laccase) from *Streptomyces coelicolor* using bioactive phytochemicals and site-directed mutagenesis. *Microbial Biotechnology*. 2013, 6(5), 588–97.

SHRADDHA, SHEKHER, R., SEHGAL, S., KAMTHANIA, M., et al. Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Research*. 2011, 1–11.

SKÁLOVÁ, T., DOHNÁLEK, J., ØSTERGAARD, L. H., et al. The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases. *Journal of Molecular Biology*. 2009, 385(4), 1165–78.

SKÁLOVÁ, T., DUŠKOVÁ, J., HAŠEK, J., et al. Structure of laccase from *Streptomyces coelicolor* after soaking with potassium hexacyanoferrate and at an improved resolution of 2.3 Å. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*. 2011, 67(1), 27–32.

SOLOMON, E. I., SUNDARAM, U. M., & MACHONKIN, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews*. 1996, 96(7), 2563–2606.

SUENAGA, H., OHNUKI, T., & MIYAZAKI, K. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. *Environmental Microbiology*. 2007, 9(9), 2289–2297.

SUZUKI, T., ENDO, K., ITO, M., et al. A Thermostable Laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, Characterization, Nucleotide Sequence, and Expression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2003, 67(10), 2167–2175.

TRUBITSINA, L. I., TISHCHENKO, S. V., GABDULKHAKOV, A. G., et al. Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes*. *Biochimie*. 2015, 112, 151–159.

VÁSQUEZ, S., HERNÁNDEZ, J., & SERNA, O. *Caracterización Bioquímica de la Actividad Catecol Oxidasa de Escherichia coli BL21 (DE3)*. Universidad Industrial de Santander. 2015.

WANG, C., CUI, D., LU, L., et al. Cloning and characterization of CotA laccase from *Bacillus subtilis* WD23 decoloring dyes. *Annals of Microbiology*. 2016, 66(1), 461–467.

WANG, H. X., & NG, T. B. A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 72(3), 508–513.

XU, F. Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, 272(2), 924–928.

XU, F. Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnology*. 2005, 1(1), 38–50.

XU, J., ZHANG, J., ZHANG, W., et al. The novel role of fungal intracellular laccase: used to screen hybrids between *Hypsizygus marmoreus* and *Clitocybe maxima* by protoplasmic fusion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012, 28(8),

2625–2633.

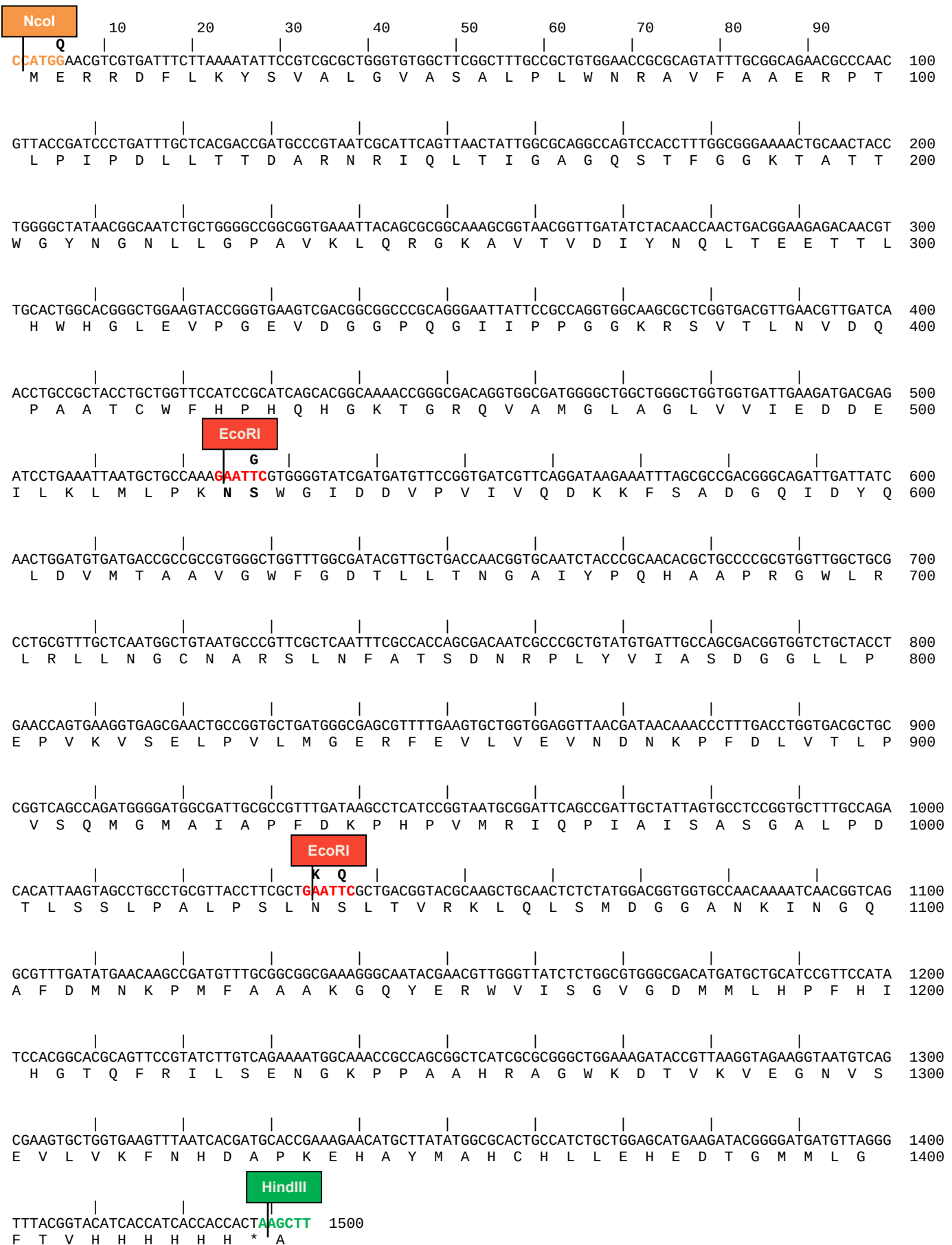
YANG, J., YAN, R., ROY, A., et al. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*. 2015, 2(1), 7–8.

YOUN, H. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 1995, 132(3), 183–188.

ZHUKHLISTOVA, N. E., ZHUKOVA, Y. N., LYASHENKO, A. V., et al. Three-dimensional organization of three-domain copper oxidases: A review. *Crystallography Reports*. 2008, 53(1), 92–109.

ANEXOS

A. Secuencia de CueOdD2 + Sitios de Restricción



B. Secuencia CueO^{AD2} + Sitios de Restricción

NcoI

10 20 30 40 50 60 70 80 90

CCATGG AACGTCGTGATTTCTTAAAATATTCGTCGCGCTGGGTGTGGCTTCGGCTTTGCCGCTGTGGAACCGCGCAGTATTTGCGGCAGAACGCCAAC 100
M E R R D F L K Y S V A L G V A S A L P L W N R A V F A A E R P T 100

GTTACCGATCCCTGATTTGCTCACGACCGATGCCCGTAATCGCATTAGTTAACTATTGGCGCAGGCCAGTCCACCTTTGGCGGGAAAACGCAACTACC 200
L P I P D L L T T D A R N R I Q L T I G A G Q S T F G G K T A T T 200

TGGGGCTATAACGGCAATCTGCTGGGGCCGGCGGTGAAATTACAGCGCGGCAAAGCGGTAACGGTTGATATCTACAACCAACTGACGGAAGAGACAACGT 300
W G Y N G N L L G P A V K L Q R G K A V T V D I Y N Q L T E E T T L 300

TGCACTGGCACGGGCTGGAAGTACCGGGTGAAGTCGACGGCGGCCCGCAGGGAATTATTCGCCAGGTGGCAAGCGCTCGGTGACGTTGAACGTTGATCA 400
H W H G L E V P G E V D G G P Q G I I P P G G K R S V T L N V D Q 400

ACCTGCCGCTACCTGCTGGTTCCATCCGCATCAGCACGGCAAACCGGGCGACAGGTGGCGATGGGGCTGGCTGGGCTGGTGGTGATTGAAGATGACGAG 500
P A A T C W F H P H Q H G K T G R Q V A M G L A G L V V I E D D E 500

EcoRI

ATCCTGAAATTAATGTGCCAAA**GAATTC**GCCTGACGGTACGCAAGCTGCAACTCTCTATGGACGGTGGTGCCAACAAAATCAACGGTCAGGCGTTTGATA 600
I L K L M L P K N S L T V R K L Q L S M D G G A N K I N G Q A F D M 600

TGAACAAGCCGATGTTTGGCGGGCGAAAGGGCAATACGAACGTTGGGTTATCTCTGGCGTGGGCGACATGATGCTGCATCCGTTCCATATCCACGGCAC 700
N K P M F A A A K G Q Y E R W V I S G V G D M M L H P F H I H G T 700

GCAGTTCGGTATCTTGTGAGAAAATGGCAAACCGCCAGCGGCTCATCGCGGGGCTGGAAAAGATACCGTTAAGGTAGAAGGTAATGTCAGCGAAGTGCTG 800
Q F R I L S E N G K P P A A H R A G W K D T V K V E G N V S E V L 800

GTGAAGTTTAAATCACGATGCACCGAAAGAACATGCTTATATGGCGCACTGCCATCTGCTGGAGCATGAAGATACGGGGATGATGTTAGGGTTTACGGTAC 900
V K F N H D A P K E H A Y M A H C H L L E H E D T G M M L G F T V H 900

HindIII

ATCACCATCACCACCACT**AAGCTT** 1000
H H H H H * A

6HisTag →

C. Simulación de la trayectoria de cada una de las estructuras: CueO, SLAC, M1 y M2.

Ver en CD.