





**MIREN ZUMÁRRAGA URIBESALGO**

**EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE LACASAS  
FÚNGICAS EN *Saccharomyces cerevisiae*:  
TOLERANCIA A DISOLVENTES ORGÁNICOS Y  
ESTUDIOS SEMI-RACIONALES**

MEMORIA

para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas

DIRECTORES:

Dr. MIGUEL ALCALDE GALEOTE y Dr. FRANCISCO JOSÉ PLOU GASCA  
Instituto de Catálisis y Petroleoquímica  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

TUTOR: Prof. Edgardo Catalán



UAM

MADRID, 2007





**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**  
INSTITUTO DE CATÁLISIS Y PETROLEOQUÍMICA

**MIGUEL ALCALDE GALEOTE, DR. EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, INVESTIGADOR CONTRATADO RAMÓN Y CAJAL Y FRANCISCO JOSÉ PLOU GASCA, DR. EN CIENCIAS QUÍMICAS, CIENTÍFICO TITULAR DEL C.S.I.C.**

CERTIFICAN: que el presente trabajo “*Evolución molecular dirigida de lacasas fúngicas en Saccharomyces cerevisiae: tolerancia a disolventes orgánicos y estudios semi-rationales*”, que constituye la Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, Miren Zumárraga Uribealago para optar al grado de Doctora, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Biocatálisis del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del C.S.I.C., Madrid.

Y para que conste, firman el presente certificado en Madrid, a 25 de mayo de 2007.

Dr. Miguel Alcalde Galeote

Dr. Francisco José Plou Gasca



# AGRADECIMIENTOS

*Qué rápido pasa el tiempo cuando se está a gusto y en buena compañía! Después de cuatro años de esta bonita aventura, llega la hora de agradecer a tod@s los que, de una u otra manera, me habéis ayudado en la realización de este trabajo:*

*A mis directores de Tesis, los Drs. Miguel Alcalde y Francisco José Plou por haber confiado desde el primer momento en mí, por su dedicación, apoyo y esfuerzo. Al Prof. Antonio Ballesteros por haberme acogido en su grupo, por su orientación y consejos y por estar siempre dispuesto a ayudar tanto en los aspectos científicos como en los personales.*

*Al actual Director del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, el Dr. Joaquín Pérez Pariente y a la anterior Directora, la Dra. Sagrario Mendioroz, por todas las facilidades dadas.*

*A mi tutor de Tesis en el Dpto. de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, el Prof. Edgardo Catalán, por su interés y su excelente disposición.*

*Al Prof. Lo Gorton y el Dr. Sergey Shleev del Dpto. de Química Analítica de la Universidad de Lund (Suecia) por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos durante mes y medio. En especial a Sergey por su ayuda en todos los aspectos, y por su paciencia a la hora de enseñarme todo lo que sé acerca del complejo mundo de la bioelectroquímica de las lacasas.*

*A la Prof. Frances H. Arnold del Instituto Tecnológico de California, por habernos cedido el gen de la lacasa, herramienta indispensable para el desarrollo de esta Tesis. Al Dr. Julio Polaina del IATA (CSIC), por la realización de los modelos estructurales de las lacasas y sus siempre interesantes aportaciones. Al Dr. Thomas Bulter del Instituto Tecnológico de California, por su constante apoyo en las cuestiones evolutivas que fueron surgiendo en el transcurso del trabajo. Al Dr. Arturo Martínez del ICP (CSIC) por sus medidas de EPR. Al Dr. Antonio López De Lacey y Cristina Vaz del ICP (CSIC) por sus medidas de cinética del O<sub>2</sub>. A los Dres. Victor de Lorenzo y Mario Mencía del CNB (CSIC) por su colaboración y por dejarnos hacer uso de sus equipos cuando comenzamos con este trabajo. A la Dra. Susana Camarero del CIB (CSIC), el Dr. Sergey Shleev de la Universidad de Lund (Suecia) y el Prof. Vázquez-Duhalt de la Universidad Nacional Autónoma de México, por las lacasas cedidas.*

*Al Gobierno Vasco por la beca de Formación de Investigadores (Dpto. de Educación, Universidades e Investigación) concedida entre los años 2003 y 2007. A la Comunidad de Madrid, el Ministerio de Educación y Ciencia, y el CSIC por los proyectos otorgados. Al Dr. Fernando Peláez (Merck, España) por la donación de los entornos robóticos, que resultaron fundamentales para la consecución del trabajo experimental.*

*A todos l@s compañer@s de mi grupo, porque parte de esta Tesis también es vuestra: a Miguel, porque aparte de mi jefe eres un amigo, por ser mi "maestro Jedi" en esta bonita historia de la evolución dirigida; a Kiko por ser tan buena gente; a Eitel por todas las risas y chistes compartidos; a Manolo por tus consejos, por todas nuestras charlas (y alguna bronquilla), por hacerme ver las cosas de otra manera cuando lo necesitaba, porque da gusto cruzarse con gente*

como tú en esta vida; a Nieves por ser como mi madre madrileña, por estar siempre dispuesta a ayudar en lo que sea (nunca cambies); a mis tres maris: Lucía, Pamela y Ana por ser tan loquillas, por vuestra paciencia y ayuda con el ordenador (y tantas otras cosas), por todos los buenos momentos compartidos y porque trajisteis nuevos aires y risas al labo; a Iraj y Azam por vuestras historias siempre interesantes y por acercarnos un poquito vuestra cultura; a Yamal porque aunque no nos ha dado tiempo a conocernos demasiado, pareces un chaval muy bueno; a Arantza por ayudarme cuando llegué al labo y por ser tan majica (como diríamos las patateras); a Lolita y Humberto por enseñarme tantas cosas (no sólo científicas), por vuestra manera de ver la vida y por estar siempre ahí (aunque nos separe el Atlántico). A toda la gente que durante este tiempo ha pasado por el laboratorio: Roseri, Malena, Layla, Fernando y Esther porque ha sido un placer conocerlos.

A l@s compañer@s del Dpto. de Biocatálisis: Chema (echo mucho de menos tu risa), Antonio, Marcos, Cristina, Olaf, Alejandro, Alex, Asun, Mustafa, Fernando, Tamara, Beni, Rodrigo, Claudia, Lorena, etc. por todos los buenos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio y por estar siempre dispuestos a ayudar. Al resto de compañer@s del instituto, en especial a Ana Bahamonde por su apoyo, a Lola por ser la mejor vecina de la calle Cuenca y a Jose Luis por estar tan loco. A todo el personal del Centro: biblioteca, almacén, secretaría, mantenimiento, unidad de apoyo, las chicas de la limpieza (en especial a Carmen) etc. por los servicios prestados.

A t@dos l@s amig@s de Lund: Pablo, Jon, Stefania, Marc, Pauline, Rober, etc. porque hicisteis que mi estancia allí fuera inolvidable.

A Bea, Ana, Isa, Hugo... por vuestra amistad, por enseñarme lo mejor de la vida madrileña, por todos los buenos momentos de cañitas, tapas, rastros, conciertos, bailoteos, viajes, etc. por cuidar tan bien de mí, por tantas y tantas cosas... Os voy a echar mucho de menos.

A mis chicos de la cuadrilla de Gasteiz porque después de tantos años seguimos junticos, porque todos y cada uno de vosotros hacéis que sea un poquito más feliz, y por un montón de razones más, mila esker!!! A Irantzu, porque a pesar de no vernos demasiado sé que siempre estarás ahí.

A Goiatz, la mejor compañera que podría haber tenido por los madriles. Después de todo lo que hemos pasado durante estos siete años, no puedo agradecerte todo en unas pocas líneas, sólo sé que juntas hemos triunfado!!!

A aita y ama por vuestra comprensión y apoyo, por habernos “empujado” en las decisiones importantes y por darnos lo mejor que podíais habernos dado: nuestra educación. A mi hermana Maite, por tu alegría contagiosa, por tu optimismo y por ser mi Trutxita. A mis abuel@s, tí@s y prim@s por vuestro interés, animo y cariño. A Inma, Fernando, Ainara, Javi, Mami, Jose, Itziar y Fernan.

Al Patas, por ser ante todo mi mejor amigo, por tu sonrisa, por estar siempre a mi lado (aunque sea a 350 Km de distancia), porque contigo todo parece más fácil, por darme fuercillas cuando más lo necesitaba (sin ti no sé si hubiera sido capaz de llevar adelante todo esto). En definitiva, por ser como eres.

Bihotzez, mila esker guztioi!!!



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....	VII
ABREVIATURAS .....	XI
SUMMARY .....	XIII

## 1. INTRODUCCIÓN ..... 1

### 1.1. EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA ..... 3

1.1.1. Elección de un organismo hospedador adecuado: *S. cerevisiae* en protocolos de evolución dirigida ..... 6

1.1.2. Generación de la diversidad ..... 7

1.1.2.1 Mutagénesis aleatoria ..... 8

1.1.2.2 Métodos de recombinación del DNA ..... 9

1.1.3. Desarrollo del método de *screening* ..... 11

### 1.2. ESTUDIOS “SEMI-RACIONALES”: MUTAGÉNESIS SATURADA ..... 14

### 1.3. LACASAS ..... 16

1.3.1. Aspectos generales: distribución y función biológica ..... 16

1.3.2. Sistema lacasa-mediador ..... 19

1.3.3. Estructura ..... 21

1.3.4. Mecanismo catalítico ..... 23

1.3.5. Potencial redox ..... 24

1.3.6. Aplicaciones industriales y biotecnológicas ..... 26

1.3.7. La lacasa de *Myceliophthora thermophila* (MtL) ..... 28

### 1.4. ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS ..... 30

1.4.1. Lacasas en disolventes orgánicos ..... 32

1.4.2. Diseño de enzimas resistentes a disolventes mediante evolución de laboratorio ... 32

## 2. OBJETIVOS..... 35

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS ..... 39

3.1. REACTIVOS, KITS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y ENZIMAS COMERCIALES ..... 43

3.2. MICROORGANISMOS ..... 44

3.3. VECTOR PLASMÍDICO ..... 44

3.4. GEN PARENTAL DE LACASA (MtLT2) ..... 45

3.5. LACASAS ..... 45

<b>3.6. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES</b> .....	<b>46</b>
3.6.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i> .....	46
3.6.2. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i> .....	47
<b>3.7. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS</b> .....	<b>49</b>
<b>3.8. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b> .....	<b>50</b>
3.8.1. Linearización del vector pJRoC30.....	50
3.8.2. Determinación de la concentración de DNA.....	50
3.8.3. Electroforesis analítica y semipreparativa en geles de agarosa.....	50
3.8.4. Oligonucleótidos.....	51
3.8.5. Secuenciación de DNA.....	52
<b>3.9. PRODUCCIÓN DE LAS LACASAS</b> .....	<b>52</b>
3.9.1. Expresión de las lacasas en <i>S. cerevisiae</i> .....	52
3.9.2. Purificación de lacasas.....	52
<b>3.10. DESARROLLO DEL ENSAYO DE HIGH-THROUGHPUT (HTP) SCREENING EN PRESENCIA DE DISOLVENTES ORGÁNICOS</b> .....	<b>53</b>
3.10.1. Inmovilización de la lacasa y generación del radical catiónico ABTS <sup>•+</sup> .....	53
3.10.2. Estabilidad del ABTS <sup>•+</sup> en disolventes orgánicos.....	54
3.10.3. Protocolo de HTP- <i>screening</i> en disolventes orgánicos.....	54
3.10.3.1 Transformación de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	54
3.10.3.2 Preparación de las librerías para el HTP- <i>screening</i> en disolventes orgánicos mediante ensayo de punto final.....	54
<b>3.11. EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE LACASAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS</b> .....	<b>58</b>
3.11.1. Ajuste de las condiciones de PCR propensa a error.....	58
3.11.2. Primera generación: PCR mutagénica con Mutazima.....	59
3.11.3. Segunda generación: creación de dos genotecas mutagénicas independientes con las polimerasas Mutazima y <i>Taq</i> .....	59
3.11.4. Tercera generación: <i>in vivo</i> DNA <i>shuffling</i> de los mejores mutantes de la segunda generación previamente mutagenizados.....	60
3.11.5. Cuarta generación: recombinación por ensamblaje <i>in vivo</i> de genotecas mutagénicas con diferente espectro mutacional.....	60
3.11.6. Quinta generación: mutagénesis dirigida y saturada.....	61
<b>3.12. DISEÑO “SEMI-RACIONAL” DE LACASAS: MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL</b> .....	<b>61</b>
3.12.1. Mutagénesis saturada combinatorial sobre las posiciones 510 y 513.....	62
3.12.2. Mutagénesis saturada combinatorial sobre el tripéptido conservado <sub>509</sub> VSG <sub>511</sub> ....	62
3.12.3. Mutagénesis saturada combinatorial de los residuos G558 y L559.....	62
3.12.4. Mutagénesis saturada combinatorial de cuatro posiciones de la tapa C-terminal ( <sub>556</sub> DSGL <sub>559</sub> ).....	63

<b>3.13. ENSAYOS BIOQUÍMICOS Y CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS LACASAS PURIFICADAS .....</b>	<b>63</b>
3.13.1. Determinación de los parámetros cinéticos .....	63
3.13.2. Medida de la actividad en disolventes orgánicos .....	63
3.13.3. Medida de la estabilidad de las lacasas en diferentes disolventes orgánicos .....	64
3.13.4. Medida de la estabilidad térmica .....	64
3.13.5. Ensayos de actividad a diferentes pHs .....	64
3.13.6. Oxidación de antraceno .....	65
3.13.7. Espectros UV/Vis de los Cu T1 y T3 de las lacasas .....	65
3.13.8. Desglicosilación .....	65
3.13.9. Medidas de la actividad de reducción del O <sub>2</sub> .....	666
<b>3.14. CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA .....</b>	<b>66</b>
3.14.1. Análisis por EPR de los sitios de Cu T1 y T2 .....	66
3.14.2. Potencial redox .....	66
3.14.2.1 Estudios espectro-electroquímicos .....	677
3.14.2.2 Voltamperometrías cíclicas .....	67
<b>3.15. MODELADO ESTRUCTURAL DE LACASAS .....</b>	<b>688</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1. EVOLUCIÓN DIRIGIDA EN DISOLVENTES ORGÁNICOS .....</b>	<b>71</b>
4.1.1. Preparación de un método de <i>screening</i> en disolventes orgánicos .....	71
4.1.1.1 Elección del sustrato .....	71
4.1.1.2 Ajuste de las condiciones iniciales del <i>screening</i> .....	72
4.1.2. Ajuste de las condiciones de las PCR mutagénicas .....	76
4.1.3. Ciclos evolutivos en cosolventes .....	78
4.1.3.1 Primera generación: PCR mutagénica con Mutazima .....	78
4.1.3.2 Segunda generación: creación de dos genotecas mutagénicas independientes con las polimerasas Mutazima y <i>Taq</i> .....	79
4.1.3.3 Tercera generación: <i>in vivo</i> DNA <i>shuffling</i> de los genes parentales previamente mutagenizados .....	81
4.1.3.4 Cuarta generación: recombinación por ensamblaje <i>in vivo</i> de genotecas con diferente espectro mutacional .....	83
4.1.3.5 Quinta generación: mutagénesis dirigida y saturada .....	84
<b>4.2. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS MUTANTES .....</b>	<b>85</b>
4.2.1. Expresión de las lacasas en <i>S. cerevisiae</i> .....	85
4.2.2. Purificación de las lacasas .....	86
<b>4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS LACASAS PURIFICADAS .....</b>	<b>89</b>
4.3.1. Estudio de los mutantes en cosolventes .....	89
4.3.1.1 Estudio comparativo de los mutantes .....	89

4.3.1.2 Tolerancia del mutante final R2 a diferentes cosolventes y comparación de su comportamiento con otras lacasas fúngicas. ....	92
4.3.2. Caracterización bioquímica .....	93
4.3.2.1 Evaluación de la glicosilación.....	93
4.3.2.2 Perfiles de termoestabilidad y pH óptimo.....	95
4.3.3. Caracterización espectro-electroquímica .....	96
4.3.3.1 Determinación de los potenciales redox en los sitios T1 y T2/T3.....	96
4.3.3.2 Estudio de la geometría y entorno químico de los cobres T1 y T2.....	99
<b>4.4. TEST DE OXIDACIÓN DEL ANTRACENO .....</b>	<b>100</b>
<b>4.5. ESTUDIOS “SEMI-RACIONALES” .....</b>	<b>101</b>
4.5.1. Construcción de genotecas mediante IVOE.....	102
4.5.2. Tamaño de la librería y diseño del área de recombinación.....	103
4.5.3. Mutagénesis saturada combinatorial sobre los residuos 510 y 513.....	104
4.5.4. Mutagénesis saturada combinatorial sobre el tripéptido conservado <sub>509</sub> VSG <sub>511</sub> y su relación con la tapa C-terminal <sub>556</sub> DSGL <sub>559</sub> .....	106
4.5.5. Mutagénesis saturada combinatorial de los residuos G558 y L559.....	110
4.5.6. Mutagénesis saturada combinatorial de las cuatro posiciones de la tapa C-terminal ( <sub>556</sub> DSGL <sub>559</sub> ) .....	111
<b>4.6. ESTUDIO DE LA VARIANTE 7E1 .....</b>	<b>112</b>
4.6.1. Caracterización bioquímica de la variante 7E1 .....	112
4.6.2. Caracterización espectro-electroquímica de 7E1 .....	114
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>117</b>
<b>5.1. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LACASAS EN DISOLVENTES .....</b>	<b>119</b>
5.1.1. Diseño de la estrategia evolutiva.....	119
5.1.2. Optimización del experimento de evolución molecular y resumen de la ruta evolutiva.....	120
5.1.3. Mutaciones del proceso evolutivo en disolventes orgánicos.....	122
<b>5.2. ESTUDIOS “SEMI-RACIONALES”: PAPEL DE LA TAPA C-TERMINAL Y SU INTERACCIÓN CON EL TRIPÉPTIDO ALTAMENTE CONSERVADO <sub>509</sub>VSG<sub>511</sub> .....</b>	<b>130</b>
5.2.1. Creación de genotecas mediante mutagénesis saturada combinatorial con IVOE.....	130
5.2.2. Mutagénesis saturada combinatorial sobre MtLT2.....	132
5.2.3. Mutagénesis saturada combinatorial sobre 7E1 .....	133
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>137</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>141</b>

<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>169</b>
<b>ANEXO I</b> Secuencia del gen MtLT2.....	<b>171</b>
<b>ANEXO II</b> Programas del robot manipulador de líquidos .....	<b>175</b>
<b>ANEXO III</b> PCR mutagénica: <i>Taq</i> polimerasa vs. Mutazima.....	<b>177</b>
<b>ANEXO IV</b> Publicaciones científicas y trabajos presentados en congresos .....	<b>179</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.1.</b> Clásico experimento de evolución molecular dirigida.....	5
<b>Figura 1.2.</b> Artículos científicos de evolución dirigida .....	6
<b>Figura 1.3.</b> Algunos métodos de recombinación de DNA .....	11
<b>Figura 1.4.</b> Equipamiento para HTP- <i>screening</i> .....	13
<b>Figura 1.5.</b> Estructura molecular de la lacasa.....	18
<b>Figura 1.6.</b> Mediadores redox de lacasa .....	20
<b>Figura 1.7.</b> Cobres catalíticos en la estructura de la lacasa .....	22
<b>Figura 1.8.</b> PAHs y su toxicidad .....	27
<b>Figura 1.9.</b> Esquema general de la lacasa de <i>M. thermophila</i> .....	29
<b>Figura 1.10.</b> Modelo estructural del mutante MtLT2 .....	30
<b>Figura 3.1.</b> Plásmido pJRoC30 .....	45
<b>Figura 3.2.</b> Esquema del ensayo de HTP- <i>screening</i> en disolventes orgánicos .....	56
<b>Figura 3.3.</b> Esquema del protocolo del primer re- <i>screening</i> .....	57
<b>Figura 4.1.</b> Oxidación del ABTS por la lacasa .....	71
<b>Figura 4.2.</b> Espectro del radical catiónico ABTS <sup>•+</sup> en acetonitrilo 50% (v/v).....	72
<b>Figura 4.3.</b> Estabilidad de las lacasas MtLT2 y de <i>T. versicolor</i> en acetonitrilo .....	73
<b>Figura 4.4.</b> Actividad inicial de las lacasas MtLT2 y de <i>T. versicolor</i> en acetonitrilo .....	73
<b>Figura 4.5.</b> Actividad relativa de MtLT2 en cultivos con diferentes concentraciones de Cu <sup>2+</sup> ...	74
<b>Figura 4.6.</b> Linearidad del ensayo de <i>screening</i> con ABTS en etanol 30% (v/v).....	75
<b>Figura 4.7.</b> Validación del ensayo de <i>screening</i> con ABTS en acetonitrilo 20% (v/v) .....	75
<b>Figura 4.8.</b> Paisajes de las librerías <i>Taq</i> y Mutazima bajo diferentes condiciones de PCR.....	78
<b>Figura 4.9.</b> Paisajes de la primera generación.....	79
<b>Figura 4.10.</b> Paisajes de la segunda generación .....	80
<b>Figura 4.11.</b> Esquema de la estrategia seguida en la tercera generación.....	81
<b>Figura 4.12.</b> Paisajes de la tercera generación.....	82
<b>Figura 4.13.</b> Paisajes de la cuarta generación .....	83
<b>Figura 4.14.</b> Paisajes de la quinta generación .....	85
<b>Figura 4.15.</b> Crecimiento celular y actividad lacasa durante la expresión en <i>S. cerevisiae</i> de MtLT2.....	86
<b>Figura 4.16.</b> Cromatografía de interacción hidrofóbica (Phenyl Sepharose) .....	87
<b>Figura 4.17.</b> Cromatografía de intercambio aniónico débil (DEAE-Sepharose) .....	88
<b>Figura 4.18.</b> Cromatografía de intercambio aniónico fuerte (MonoQ) .....	88
<b>Figura 4.19.</b> Electroforesis SDS-PAGE de los distintos pasos de purificación.....	89
<b>Figura 4.20.</b> Perfiles de actividad relativa de la lacasa tipo parental y los mutantes en etanol y acetonitrilo .....	90

<b>Figura 4.21.</b> Estabilidad de R2 en diferentes disolventes .....	<b>92</b>
<b>Figura 4.22.</b> Actividad inicial de R2 y de otras lacasas fúngicas en etanol y acetonitrilo .....	<b>93</b>
<b>Figura 4.23.</b> Desglicosilación de MtLT2 y R2 .....	<b>94</b>
<b>Figura 4.24.</b> Termoestabilidad de MtLT2 y R2 .....	<b>95</b>
<b>Figura 4.25.</b> Perfiles de la actividad a diferentes pHs de MtLT2 y variantes 6C9, 3D1 y R2 ....	<b>96</b>
<b>Figura 4.26.</b> Caracterización electroquímica de la enzima parental y las diferentes variantes evolucionadas en disolventes .....	<b>98</b>
<b>Figura 4.27.</b> Espectros de la enzima parental y las diferentes variantes evolucionadas en disolventes .....	<b>100</b>
<b>Figura 4.28.</b> Reacción de oxidación del antraceno en presencia de lacasa y mediador .....	<b>100</b>
<b>Figura 4.29.</b> Cromatogramas de la reacción de oxidación del antraceno .....	<b>101</b>
<b>Figura 4.30.</b> Estrategia IVOE para la mutagénesis saturada combinatorial .....	<b>102</b>
<b>Figura 4.31.</b> Paisaje del experimento de mutagénesis saturada combinatorial sobre las posiciones Ser510 y Leu513 .....	<b>105</b>
<b>Figura 4.32.</b> Pre-screening en fase sólida para la exploración de la librería $_{509}VSG_{511}$ .....	<b>107</b>
<b>Figura 4.33.</b> Interacciones locales en la posición 510.....	<b>108</b>
<b>Figura 4.34.</b> Posición relativa de la Ser510 y el Asp556 en MtLT2 y 7E1 .....	<b>108</b>
<b>Figura 4.35.</b> Interacciones de la tapa C-terminal ( $_{556}DSGL_{559}$ ) .....	<b>109</b>
<b>Figura 4.36.</b> Alineamiento parcial de las secuencias de aminoácidos de MtLT2 y 7E1 con otras lacasas de Ascomicetes .....	<b>110</b>
<b>Figura 4.37.</b> Paisaje de la librería combinatorial sobre las posiciones 558 y 559.....	<b>111</b>
<b>Figura 4.38.</b> Caracterización bioquímica de la variante 7E1 .....	<b>112</b>
<b>Figura 4.39.</b> Dispositivo para la medida de la $K_m^{O_2}$ .....	<b>113</b>
<b>Figura 4.40.</b> Caracterización espectroscópica y electroquímica de 7E1 .....	<b>115</b>
<b>Figura 5.1.</b> Esquema del proceso de evolución artificial desarrollado en este trabajo .....	<b>121</b>
<b>Figura 5.2.</b> Modelo estructural de la lacasa R2 madura.....	<b>124</b>
<b>Figura 5.3.</b> Efecto de la mutación L429V .....	<b>125</b>
<b>Figura 5.4.</b> Efecto de la mutación E182K .....	<b>126</b>
<b>Figura 5.5.</b> Efecto de la mutación N552H.....	<b>126</b>
<b>Figura 5.6.</b> Procesamiento de la cola C-terminal de la lacasa MtLT2.....	<b>127</b>
<b>Figura 5.7.</b> Efecto de la mutación S280N.....	<b>130</b>
<b>Figura 5.8.</b> Comparación de los métodos SOE e IVOE .....	<b>131</b>
<b>Figura 5.9.</b> Canal de acceso al agrupamiento trinuclear T2/T3 en MtLT2 .....	<b>135</b>
<b>Figura A.1.</b> Robot manipulador de líquidos empleado en esta Tesis Doctoral .....	<b>175</b>
<b>Figura A.2.</b> Programas diseñados para el robot manipulador de líquidos .....	<b>176</b>



<b>Tabla 1.1.</b> Características generales de algunas lacasas fúngicas.....	<b>17</b>
<b>Tabla 1.2.</b> Alineamiento de secuencias de diferentes lacasas fúngicas y de la ascorbato oxidasa.....	<b>25</b>
<b>Tabla 3.1.</b> Reactivos químicos y Kits de biología molecular .....	<b>43</b>
<b>Tabla 3.2.</b> Enzimas comerciales.....	<b>44</b>
<b>Tabla 3.3.</b> Digestión de pJRoC30 con <i>Bam</i> HI y <i>Xho</i> I.....	<b>50</b>
<b>Tabla 3.4.</b> Oligonucleótidos cebadores .....	<b>51</b>
<b>Tabla 3.4.</b> Ajuste de las condiciones de las genotecas <i>Taq</i> /MnCl <sub>2</sub> .....	<b>59</b>
<b>Tabla 4.1.</b> Condiciones de las diferentes librerías de Mutazima y <i>Taq</i> .....	<b>77</b>
<b>Tabla 4.2.</b> Mutantes de la primera generación .....	<b>79</b>
<b>Tabla 4.3.</b> Mutantes de la segunda generación .....	<b>81</b>
<b>Tabla 4.4.</b> Mutantes de la tercera generación .....	<b>82</b>
<b>Tabla 4.5.</b> Mutante de la cuarta generación .....	<b>84</b>
<b>Tabla 4.6.</b> Mutantes de la quinta generación .....	<b>85</b>
<b>Tabla 4.7.</b> Purificación de MtLT2 .....	<b>87</b>
<b>Tabla 4.8.</b> Actividad y estabilidad de MtLT2 y las variantes evolucionadas en disolventes orgánicos .....	<b>91</b>
<b>Tabla 4.9.</b> Caracterización electroquímica y constantes catalíticas de MtLT2 y los mutantes del proceso evolutivo .....	<b>97</b>
<b>Tabla 4.10.</b> Caracterización EPR de MtLT2 y las variantes evolucionadas.....	<b>99</b>
<b>Tabla 4.11.</b> Análisis estadístico de las librerías generadas mediante randomización NNG/C. ....	<b>103</b>
<b>Tabla 4.12.</b> Características de los oligonucleótidos degenerados utilizados para la mutagénesis saturada combinatorial.....	<b>104</b>
<b>Tabla 4.13.</b> Mutante seleccionado en la librería IVOE en las posiciones 510 y 513 .....	<b>105</b>
<b>Tabla 4.14.</b> Cambios dependientes de una única base en la posición 510 .....	<b>106</b>
<b>Tabla 4.15.</b> Interacciones de la tapa C-terminal de MtLT2.....	<b>109</b>
<b>Tabla 4.16.</b> Mutantes de la librería <sub>558</sub> GL <sub>559</sub> .....	<b>111</b>
<b>Tabla 4.17.</b> Constantes catalíticas de sustratos reductores no fenólicos y fenólicos .....	<b>113</b>
<b>Tabla 4.18.</b> Constantes cinéticas basadas en el consumo de oxígeno molecular.....	<b>114</b>
<b>Tabla 4.19.</b> Caracterización espectro-electroquímica de MtLT2 y 7E1.....	<b>114</b>
<b>Tabla 5.1.</b> Mutaciones del proceso de evolución dirigida en disolventes orgánicos.....	<b>123</b>
<b>Tabla 5.2.</b> Valores pI para las secuencias de la extensión C-terminal del tipo parental MtLT2 y los mutantes .....	<b>129</b>
<b>Tabla 5.3.</b> Potencial redox del sitio T1 en diferentes enzimas multicobre azul.....	<b>132</b>
<b>Tabla A.1.</b> Espectro mutacional de las polimerasas <i>Taq</i> y Mutazima.....	<b>178</b>



## ABREVIATURAS

<b><math>A_{  }</math></b>	componente del tensor de desdoblamiento hiperfino <i>A</i> (paralelo al eje z)
<b>Abs</b>	absorbancia
<b>ABTS</b>	2,2'azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato)
<b>AcN</b>	acetonitrilo
<b>BSA</b>	albumina de suero bovino
<b>CgL</b>	lacasa de <i>Coriopsis gallica</i>
<b>dATP</b>	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
<b>dCTP</b>	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
<b>dGTP</b>	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
<b>DMP</b>	2,6-dimetoxifenol
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>DO</b>	densidad óptica
<b>DPPH</b>	1,1-difenil-2-picryl-hidrazilo
<b>dTTP</b>	2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
<b><math>E^{\circ}</math></b>	potencial redox estándar
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b><math>E_m</math></b>	potencial redox medio
<b>ENH</b>	electrodo normal de hidrógeno
<b>EPR</b>	<i>electron paramagnetic resonance</i> (espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica)
<b>epPCR</b>	<i>error prone PCR</i> (PCR propensa a error)
<b>EtOH</b>	etanol
<b>FPLC</b>	<i>fast protein liquid chromatography</i> (cromatografía líquida de proteínas de alta resolución)
<b><math>g_{  }</math></b>	componente del tensor de desdoblamiento paramagnético <i>g</i> (paralelo al eje z)
<b>HBT</b>	1-hidroxibenzotriazol
<b><math>H_{DA}</math></b>	elemento matriz de acoplamiento electrónico
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta resolución)

<b>HTP</b>	<i>high-throughput</i> (alto rendimiento)
<b>IVOE</b>	<i>in vivo overlap extension</i>
$k_{\text{cat}}$	constante catalítica
$k_{\text{e1}}$	coeficiente de transmisión de electrones
$K_{\text{m}}$	constante de Michaelis-Menten
<b>MRT</b>	<i>mediated redox titration</i> (valoración redox mediada)
<b>MtL</b>	lacasa de <i>Myceliophthora thermophila</i>
<b>PAGE</b>	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida)
<b>PAH</b>	hidrocarburo aromático policíclico
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PcL</b>	lacasa de <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
<b>PoL</b>	lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i>
<b>SCE</b>	<i>saturated calomel electrode</i> (electrodo de calomelanos saturado)
<b>SDS</b>	dodecil sulfato sódico
<b>SOE</b>	<i>sequence overlap extension</i> (extensión por solapamiento <i>in vivo</i> )
<b>SPGE</b>	<i>spectroscopic graphite electrodes</i> (electrodo de grafito espectroscópico)
<b>ThL</b>	lacasa de <i>Trametes hirsuta</i>
<b>TvL</b>	lacasa de <i>Trametes versicolor</i>
<b>UV/Vis</b>	ultravioleta/visible
<b>VC</b>	voltamograma cíclico

## **SUMMARY**



Mimicking the darwinist algorithm of natural selection, through several rounds of random mutagenesis and/or DNA recombination coupled to massive high-throughput screenings, directed molecular evolution allows to tailor enzymes more robust, stable, efficient and in general with many improved features. In this evolutionary scenario, semi-rational analysis - where researches are taking advantage from protein structural information to create and explore libraries constructed by saturation mutagenesis- constitutes also a powerful methodology.

Laccases from white-rot fungi are remarkable biocatalysts due to their broad substrate specificity, with potential applications in bioremediation, lignocellulose processing, organic synthesis and more. Most of these transformations must be carried out at high concentrations of organic cosolvents where laccase undergoes unfolding, therefore losing its catalytic performance.

We have evolved the thermostable laccase from the Ascomycete *Myceliophthora thermophila* to tolerate high concentrations of cosolvents. The genetic product of five rounds of directed evolution expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, variant R2, was capable to resist a wide array of miscible cosolvents of biotechnological significance at concentrations as high as 50% (v/v). Intrinsic electrochemical laccase features such as the redox potential at the T1 and T2/T3 sites and the geometry and electronic structure of the catalytic coppers were altered during the course of the *in vitro* evolution experiment. Some mutations located at the surface of protein contributed to the reinforcement of the protein architecture at different key-denaturation regions by establishing new hydrogen bonds and salt bridges. Moreover, the mutations introduced at the C-terminal extension affected the protein folding at the post-translational maturation steps.

Additionally, we have developed a new methodology named *in vivo* overlap extension (IVOE) which is based on the high homologous recombination frequency of *Saccharomyces cerevisiae*. This methodology provides a simple manner to build combinatorial saturation mutagenesis libraries avoiding extra PCR reactions, by-products formation and *in vitro* ligation steps. Several positions that seem to be related with the redox potential at the T1 site were targeted for combinatorial saturation mutagenesis. After exploring over 170000 clones, the best variant revealed a direct relationship between the highly conserved tripeptide  $_{509}\text{VSG}_{511}$ , located in the vicinity of the T1 site, and the C-terminal plug. The  $K_m^{\text{O}_2}$  value of the mutant was increased 1.5-fold and the electron transfer pathway between the reducing substrate and the T1 copper ion was altered, thus improving catalytic efficiencies about 3- and 8-fold towards non-phenolic and phenolic substrates, respectively. Although the copper geometry at the T1 site was perturbed upon mutation, paradoxically the laccase redox potential was not significantly altered. Taking together, the present study suggests that  $_{509}\text{VSG}_{511}$  tripeptide may play a hitherto-unrecognized role in regulating the traffic of  $\text{O}_2$  to the T2/T3 copper cluster, in combination with the C-terminal plug, which is dependent on the binding of the reducing substrate at the copper T1.





## **1. INTRODUCCIÓN**

<b>1.1. EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Elección de un organismo hospedador adecuado: <i>S. cerevisiae</i> en protocolos de evolución dirigida .....	6
1.1.2. Generación de la diversidad .....	7
1.1.2.1 Mutagénesis aleatoria .....	8
1.1.2.2 Métodos de recombinación del DNA.....	9
1.1.3. Desarrollo del método de <i>screening</i> .....	11
<b>1.2. ESTUDIOS “SEMI-RACIONALES”: MUTAGÉNESIS SATURADA .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3. LACASAS .....</b>	<b>16</b>
1.3.1. Aspectos generales: distribución y función biológica .....	16
1.3.2. Sistema lacasa-mediador .....	19
1.3.3. Estructura.....	21
1.3.4. Mecanismo catalítico .....	23
1.3.5. Potencial redox .....	24
1.3.6. Aplicaciones industriales y biotecnológicas.....	26
1.3.7. La lacasa de <i>Myceliophthora thermophila</i> (MtL).....	28
<b>1.4. ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS .....</b>	<b>30</b>
1.4.1. Lacasas en disolventes orgánicos.....	32
1.4.2. Diseño de enzimas resistentes a disolventes mediante evolución de laboratorio....	32

## 1.1. EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA

Las enzimas han evolucionado durante millones de años adquiriendo diferentes propiedades para desarrollar funciones metabólicas muy específicas en contextos celulares determinados. Estos catalizadores biológicos exhiben un poder catalítico exquisito pudiendo ser altamente quimio-, regio- y estéreo-selectivos y llegando a acelerar las reacciones más complejas muchos ordenes de magnitud (hasta  $10^{19}$  veces) (Plou y cols., 1999). En la mayoría de los organismos las enzimas están habituadas a funcionar en unas condiciones de reacción suaves (en soluciones acuosas, temperatura ambiente y pH neutro) lo que lleva asociado un impacto medioambiental muy reducido (Cherry y Fidantsef, 2003). Sin embargo, para la eficiente aplicación biotecnológica e industrial de los biocatalizadores se requieren enzimas activas y estables bajo las drásticas condiciones del proceso (presencia de disolventes orgánicos u otros medios no acuosos, elevadas temperaturas, pHs extremos, etc.) (Schmid y cols., 2001; Kirk y cols., 2002;). Lamentablemente, la mayor parte de las enzimas -a excepción de unas pocas procedentes de ambientes extremos (Ferrer y cols., 2005; Alcalde y cols., 2006a)- terminan inactivándose o desnaturalizándose bajo las exigentes condiciones industriales.

Durante los últimos 25 años la investigación en el campo de la ingeniería de proteínas se ha visto impulsada por los avances en la tecnología del DNA recombinante, genómica y proteómica, y más recientemente por el desarrollo de herramientas de *high-throughput* (Wahler y Reymond, 2001) que ha multiplicado el diseño, a nivel molecular, de nuevos biocatalizadores y procesos biocatalíticos (Zhao y cols., 2002; Tao y Cornish, 2002). De esta manera, se han generado múltiples métodos para la creación o mejora de nuevas actividades y propiedades enzimáticas de relevancia biotecnológica al tiempo que se ha aportado luz sobre la relación estructura/función de muchas proteínas (Arnold, 2001).

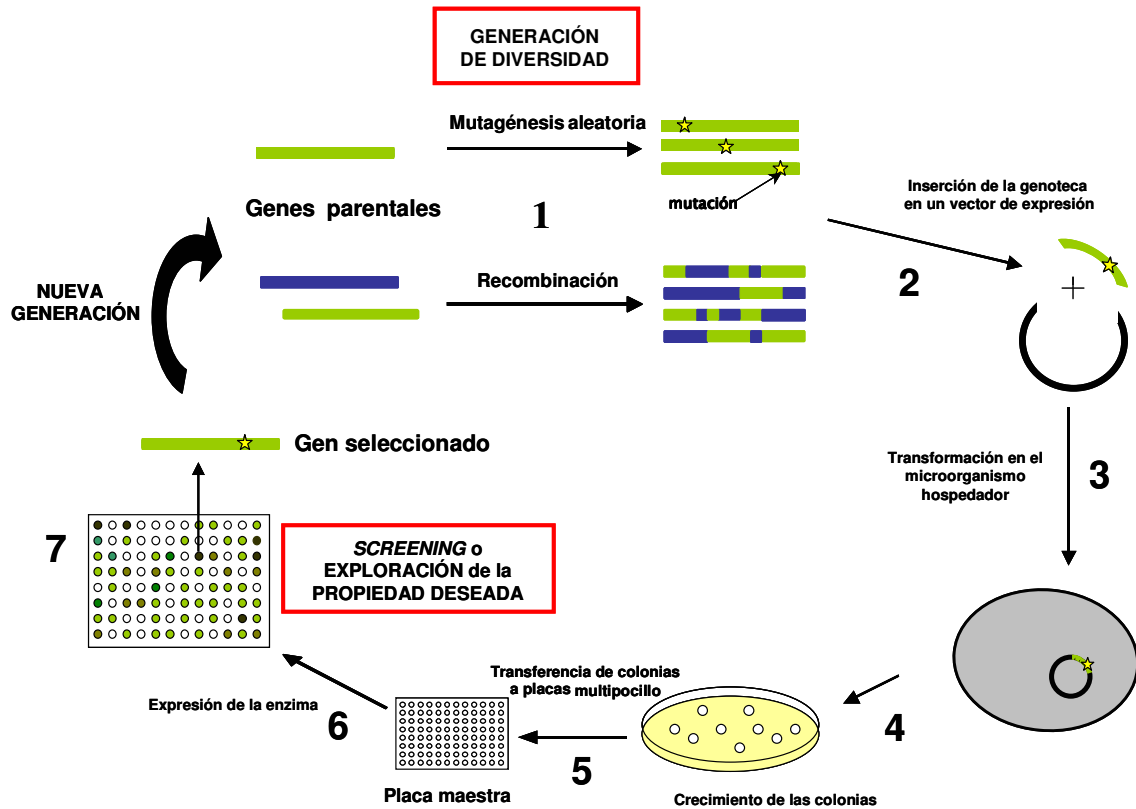
Desafortunadamente, las enzimas son moléculas extremadamente complejas y a menudo la relación entre su secuencia, estructura y mecanismo/función se escapa al conocimiento científico. El enfoque más tradicional en el campo de la ingeniería de enzimas se sustenta en el denominado diseño "*racional*" (mutagénesis dirigida a posiciones concretas del catalizador, en base a modelos o estructuras cristalográficas). Este abordaje, sin embargo, muchas veces se ha visto limitado por la ausencia de información estructural y mecanística requerida (Arnold y Volkov, 1999). A pesar del progreso en la resolución de proteínas por técnicas de cristalografía de rayos X o espectroscopía RMN, así como de la disponibilidad de programas informáticos cada vez más potentes y el apoyo de bases de datos de genes y proteínas (Bornscheuer y Pohl, 2001), el diseño "*racional*" se ve frenado en la práctica por la complejidad de la función proteica. Se debe tener en cuenta que las enzimas son moléculas dinámicas, plásticas, en las cuales la entrada de sustratos y formación de productos siempre va acompañada de cambios locales y/o conformacionales con los correspondientes establecimientos o rupturas de interacciones que un modelo cristalográfico no puede recoger con exactitud en toda su dimensión. En cierto sentido, un modelo cristalográfico representa con precisión tan sólo un momento determinado de la intrincada cinética enzimática, y a pesar del

esfuerzo por obtener modelos más completos en presencia de análogos estructurales y del desarrollo exhaustivo de herramientas de modelado molecular, la predicción de la función catalítica sigue siendo limitada (Alcalde, 2003).

La estrategia alternativa más adecuada para la ingeniería de enzimas en ausencia de suficiente información estructural es la denominada evolución molecular dirigida o evolución *in vitro* (Arnold, 1998). Se trata de una efectiva herramienta que está revolucionando la biotecnología, permitiendo el diseño de nuevas funciones enzimáticas nunca antes requeridas en ambientes naturales (Zhao y cols., 1999). Esta metodología recrea en el laboratorio los procesos claves de la evolución natural (mutación, recombinación y selección) de manera que es posible diseñar enzimas de gran interés científico y tecnológico. Existen, sin embargo, diferencias sustanciales entre el simplificado proceso de evolución dirigida de enzimas y la evolución natural postulada por Darwin y sus contemporáneos (Darwin, 1859; Maynard Smith, 1984).

- La evolución natural puede tener lugar a niveles extremadamente complejos -de organismos completos- mientras que la evolución dirigida se limita a un único gen, o en el mejor de los casos a rutas metabólicas relativamente simples (Schmidt-Dannert y cols., 2000; Parales y Ditty, 2005).
- En la evolución natural, las adaptaciones más sobresalientes aparecen de manera espontánea durante la reproducción y supervivencia de los organismos, mientras que en la evolución dirigida, la presión selectiva es estrictamente estipulada por el investigador en busca de una mejora en particular (Zhao y cols., 1999; Affholter y Arnold, 1999).
- La evolución dirigida comprime la escala temporal de la evolución natural desde miles de millones de años, hasta tan sólo meses de trabajo en el laboratorio (Alcalde, 2003).

En la evolución *in vitro*, mediante mutagénesis aleatoria inducida y/o recombinaciones en el material genético que codifica para una o varias proteínas, se crea una diversidad genética que posteriormente se expresa y explora bajo las condiciones en las que se quiere mejorar la enzima (altas temperaturas o medios no convencionales, pHs extremos, etc.) (Williams y cols., 2004). De esta manera, sometiendo los genes seleccionados a ciclos sucesivos de evolución molecular, las diferentes mutaciones puntuales beneficiosas se irán acumulando y combinando hasta adquirir la propiedad deseada, que se ve mejorada de manera exponencial, generación tras generación (**Figura 1.1**) (Kuchner y Arnold, 1999; Arnold y Volkov, 1999).



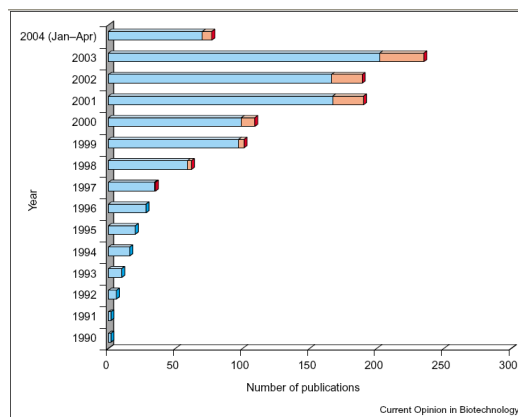
**Figura 1.1.** Esquema general de un clásico experimento de evolución molecular dirigida (Alcalde, 2003).

Hoy en día, las enzimas mejoradas por evolución de laboratorio son cada vez más abundantes, incluso ya se comercializan productos desarrollados por esta vía. Empresas como Genencor, Dow Chemical, Maxygen, Diversa o Novozymes entre otras tienen líneas punteras de evolución dirigida, al tiempo que el número de artículos científicos sobre esta metodología crece rápidamente (**Figura 1.2**) (Alcalde, 2003; Zhao y Zha, 2004).

La mayoría de las características enzimáticas -regioespecificidad (Sun y cols., 2002), enantioespecificidad (May y cols., 2000; Jaeger y Eggert, 2004), quimioespecificidad (Glieder y cols., 2002), termoestabilidad (Salazar y cols., 2003), estabilidad en disolventes orgánicos (Wong y cols., 2004a), expresión génica (Bulter y cols., 2003), incluso la búsqueda de actividades *de novo* en el caso de anticuerpos catalíticos (Tao y Cornish, 2002)- pueden ser sometidas a experimentos de evolución dirigida.

Los tres requisitos más importantes e indispensables a la hora de desarrollar una estrategia de evolución *in vitro* son:

- Disponer de un organismo hospedador adecuado para la expresión funcional de la enzima a evolucionar (generalmente *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*).
- Contar con métodos de generación de diversidad lo suficientemente variados como para abordar de manera eficaz el estudio del vasto espacio proteico.
- Diseñar un método de *screening* o exploración robusto y fiable para mejorar la característica enzimática marcada como objetivo evolutivo por el investigador.



**Figura 1.2.** Número de artículos científicos publicados entre los años 1990 y 2004 sobre evolución dirigida. En naranja, se indica los trabajos en los que se ha mejorado la enantioselectividad mediante evolución *in vitro* (Jaeger y Eggert, 2004).

### 1.1.1. ELECCIÓN DE UN ORGANISMO HOSPEDADOR ADECUADO: *S. cerevisiae* EN PROTOCOLOS DE EVOLUCIÓN DIRIGIDA

La expresión funcional heteróloga de los genes que codifican la proteína de interés es el primer requerimiento para llevar a cabo un experimento de evolución dirigida.

Los organismos hospedadores más utilizados en experimentos de evolución dirigida son *E. coli* y *S. cerevisiae* aunque también hay trabajos en los que se ha empleado *Bacillus subtilis* (You y Arnold, 1996) o como el caso de la evolución de una cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* donde la transformación de las genotecas se realizó en el mismo organismo productor (Rai y cols., 2001).

En cualquier caso, considerando la eficiencia de transformación, la estabilidad del DNA plasmídico y la tasa de crecimiento, *E. coli* es el organismo hospedador más frecuentemente utilizado. Sin embargo, la expresión bacteriana de genes eucarióticos puede estar limitada por la diferencia entre los sistemas de expresión bacterianos y los nativos. El diferente uso de codones, y las modificaciones post-traduccionales como el procesamiento proteolítico o las

glicosilaciones pueden causar bajos niveles de expresión, o un plegamiento inapropiado, con la consiguiente formación de cuerpos de inclusión (Romanos y cols., 1992).

Algunos de estos problemas pueden evitarse si estos genes se expresan en hospedadores eucarióticos cuya maquinaria celular sea más próxima a la nativa, como es el caso de las levaduras. En especial, el uso de *S. cerevisiae* es de gran interés ya que posee la habilidad de glicosilar y secretar las proteínas al medio extracelular (lo cual evita en muchos casos pasos intermedios de lisis celular) y tiene una elevada eficiencia de transformación. Además, haciendo uso de un vector episómico adecuado no integra el plásmido dentro de su genoma, tal y como hace *Pichia pastoris* (Vedvick, 1991), facilitando así su posterior manipulación. Otra ventaja muy interesante desde un punto de vista evolutivo es su elevada frecuencia de recombinación de DNA, la cual a diferencia de *E. coli* permite la construcción de genotecas *in vivo* a través de la recombinación homóloga de diferentes genes (conocido como *in vivo* DNA *shuffling* o barajeo, ver apartado 1.1.2). Por último, la ligación de los genes mutados en vectores de expresión es, en muchos casos, un paso laborioso que requiere un ajuste fino. En levaduras, el mecanismo reparador de huecos (*in vivo gap repair*) puede sustituir la ligación *in vitro* de una manera rápida y precisa (Bulter y Alcalde, 2003). Los insertos de genes mutados son co-transformados con el plásmido linearizado que contiene secuencias homólogas (con al menos 15 bases de homología) con ambos extremos del inserto (Orr-Weaver y cols., 1981; Muhlrud y cols., 1992). La propia maquinaria celular los recombina homológamente para recrear un plásmido circular de replicación autónoma (Cherry y cols., 1999).

### 1.1.2. GENERACIÓN DE LA DIVERSIDAD

El éxito en la optimización de una proteína mediante evolución molecular dirigida depende en gran parte del tamaño de la genoteca (que debe ajustarse a la capacidad de *screening*) y de su calidad (la frecuencia y el tipo de mutaciones/recombinaciones introducidas). En una proteína de 300 aminoácidos existen 5700 maneras diferentes de cambiar un sólo residuo, 16 millones de maneras de cambiar dos y más de 30000 millones de cambiar tres. Por lo tanto, es imposible investigar todo el espacio proteico con las herramientas actualmente disponibles (Arnold, 1999). Además si tenemos en cuenta que las mutaciones beneficiosas son muy poco frecuentes (la mayoría son neutras o deletéreas), y mucho menos las combinaciones de éstas, es preferible desarrollar una estrategia de pasos pequeños, cambiando aproximadamente de uno a tres o cuatro aminoácidos por generación (Williams y cols., 2004). En definitiva, una estrategia en la que mutaciones puntuales beneficiosas se vayan acumulando y recombinando en generaciones consecutivas hasta adquirir la propiedad enzimática deseada.

En general, se suelen emplear dos alternativas para la generación de diversidad: la mutagénesis aleatoria a partir de un único gen parental, y los métodos de recombinación de DNA de varios genes parentales.

### 1.1.2.1 Mutagénesis aleatoria

Existen numerosos métodos para producir mutaciones puntuales al azar en el gen que codifica la enzima de interés. El método más utilizado es la reacción de PCR propensa a error (*error-prone* PCR o epPCR) que genera mutaciones deliberadamente mediante el empleo de una DNA polimerasa que carece de actividad correctora o bien induce la aparición de mutaciones bajo unas determinadas condiciones de reacción (Zhao y cols., 1999; Vanhercke y cols., 2005).

Uno de los factores más importantes a considerar en las reacciones epPCR es la frecuencia de mutación o promedio de mutaciones por gen. La frecuencia de mutación total es el producto de tres parámetros: la tasa de error (fidelidad) de la DNA polimerasa en las condiciones de reacción, el tamaño del gen a mutar, y el número de ciclos de duplicación efectiva. La fidelidad de la polimerasa también depende de la naturaleza de la secuencia diana, ya que se pueden observar diferentes tasas de mutación en secuencias distintas incluso bajo las mismas condiciones de reacción.

Para el estudio de la relación estructura-función, una frecuencia de mutación que induzca un cambio de un aminoácido por gen parece lo más deseable. Sin embargo, los estudios de evolución dirigida para mejorar actividad o estabilidad de enzimas utilizan frecuencias mayores, induciendo 1-4 cambios de aminoácidos (2-7 sustituciones nucleotídicas) por proteína. Sorprendentemente, también se han obtenido proteínas con propiedades mejoradas a partir de genotecas altamente mutagenizadas con más de 20 mutaciones por gen (Zaccolo y cols., 1996; Drummond y cols., 2005). Típicamente, una tasa de error es adecuada cuando el 30-40% de los mutantes de la librería presenta menos del 10% de la actividad de la enzima parental; sin embargo, este valor puede cambiar, dependiendo de la enzima y de la función (Cirino y cols., 2003).

Aunque simples y versátiles, los métodos de epPCR son limitados en su habilidad de crear diversidad a nivel genético. El mayor de los inconvenientes de la epPCR deriva de la intrínseca redundancia del código genético. Existen 61 codones que se traducen en los 20 aminoácidos esenciales. En términos prácticos, únicamente se puede acceder, de promedio, a aproximadamente 5.6 aminoácidos de los 20 posibles a través del cambio de una única base por codón (Bloom y cols. 2006).

Otra característica de la estructura del código genético es que un único cambio de base frecuentemente genera sustituciones de aminoácidos conservativas, reemplazando un aminoácido por otro de propiedades físico-químicas similares (Miyazaki y Arnold, 1999). Por este motivo, los aminoácidos que son traducidos a partir de 4 o 6 codones son más frecuentes en una colección de mutantes que aquellos que sólo codifican por uno o dos codones. Este desequilibrio es aún más importante en genotecas con una tasa de error pequeña. Todo esto, unido a la tendencia mutacional de las polimerasas, especialmente hacia las transiciones (cambios de bases púricas por púricas y pirimidínicas por pirimidínicas) (Vanhercke y cols.,



2005), hace que se reduzca significativamente la diversidad de los nucleótidos sustituidos y por lo tanto una amplia fracción del espacio proteico quede inexplorado.

Como alternativas mutagénicas a la epPCR algunas de las metodologías que se emplean son, entre otras: (1) mutágenos físico/químicos (radiación UV, agentes desaminantes o alquilantes) (Zhao y Zha, 2004; Wong y cols., 2006); (2) cepas mutadoras (Jaeger y Eggert, 2004); (3) métodos basados en la mutagénesis saturada como la mutagénesis de cassette, mutagénesis de codón o la mutagénesis de secuencia saturada (Wong y cols., 2004b y 2005); (4) técnicas que posibilitan la delección y posterior inserción de un número arbitrario de bases consecutivas en posiciones al azar (Murakami y cols., 2002); (5) o estrategias más recientes como la permutación circular en la que tras fusionar los extremos N y C terminal de una proteína y circularizar la construcción, se promueven cortes al azar para conseguir una proteína con la misma secuencia y estructura en términos generales pero en la que la cadena polipeptídica empieza y acaba en posiciones muy diferentes (Qian y Lutz, 2005).

#### 1.1.2.2 Métodos de recombinación del DNA

En la naturaleza, la recombinación del DNA mediante los procesos de reproducción sexual juega un papel muy importante en la supervivencia y evolución de los organismos vivos porque permite reparar los genes dañados y aumentar la diversidad genética de una población dada (Zhao y Zha, 2004).

En el laboratorio, mediante la recombinación del material genético de diferentes genes se acelera el proceso evolutivo facilitando la acumulación de mutaciones beneficiosas y eliminando aquellas que se presentan como deletéreas o neutrales (Arnold, 1999).

Es importante tener en cuenta que durante la mutagénesis aleatoria sólo las mutaciones del gen seleccionado son transmitidas a la siguiente generación, descartando otras variantes posiblemente útiles y haciendo que sus mutaciones beneficiosas deban ser re-descubiertas para acumularse en posteriores ciclos de evolución (Kagami y cols., 2004). Por este motivo, los métodos de recombinación de DNA se convierten en herramientas realmente poderosas puesto que permiten la incorporación de las mejores mutaciones de diversas variantes en un mismo ciclo.

En 1994 Pim Stemmer desarrolló el primer método de recombinación *in vitro* de DNA conocido como *in vitro* DNA *shuffling* (Stemmer, 1994). Se basa en la fragmentación aleatoria del DNA mediante la acción de una DNAsa, seguida de una reacción de PCR en ausencia de oligonucleótidos cebadores para el reensamblaje de los fragmentos, la cual gradualmente produce secuencias recombinadas completas con nuevas combinaciones.

A raíz de los experimentos de Stemmer, se han desarrollado multitud de nuevas técnicas para la creación de diversidad mediante la recombinación de genes (**Figura 1.3**) (Zhao y cols., 2002; Williams y cols., 2004; Zhao y Zha, 2004; Kagami y cols., 2004; Bommarius y Riebel, 2004).

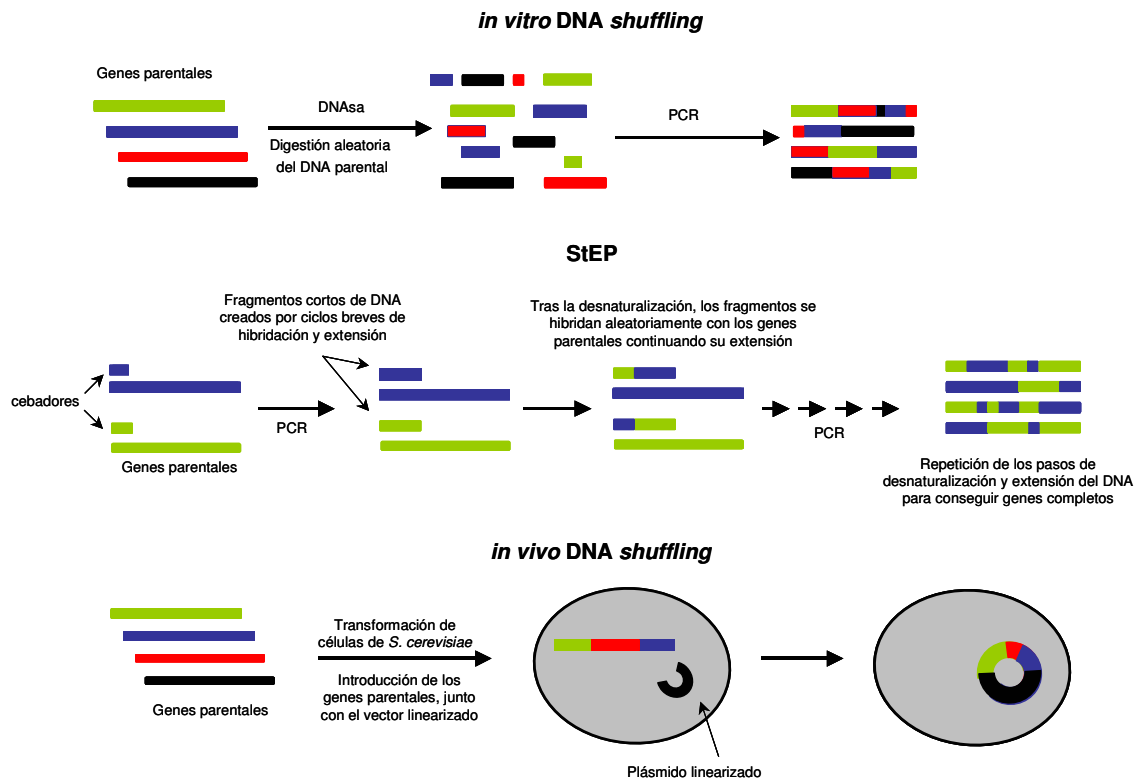
### a) Métodos *in vitro*

- Métodos basados en la recombinación homóloga del DNA: StEP (*Staggered Extension Process*) (Zhao y cols., 1998) y RACHITT (*Random Chimeragenesis on Transient Templates*) (Coco y cols., 2001).
- Métodos basados en el *Family shuffling* (Cramer y cols., 1998) o recombinación de genes de una misma familia o relacionados con una homología de secuencia superior al 60%: DOGS (*Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling*) (Gibbs y cols., 2001) y variedades del *family shuffling* haciendo uso de DNAs de cadena sencilla o enzimas de restricción (Kikuchi y cols., 1999 y 2000).
- Métodos basados en la recombinación de genes con una homología de secuencia inferior al 60%: ITCHY (*Incremental Truncation for The Creation of Hybrid enzymes*) (Ostermeier y cols., 1999), THIO-ITCHY (Lutz y cols., 2001a), SCRATCHY (combina ITCHY y DNA *shuffling*) (Lutz y cols., 2001b), SHIPREC (*Sequence Homology-Independent Protein Recombination*) (Sieber y cols., 2001) e *in vivo Exon Shuffling* (Kolkman y Stemmer, 2001).

### b) Métodos *in vivo*: *S. cerevisiae* como herramienta para la generación de diversidad

La mayoría de las técnicas de recombinación *in vitro* de DNA requieren una manipulación precisa del material genético (fragmentación, ligación a vectores de expresión, etc.) y a menudo resultan ser mutagénicas debido a las diferentes reacciones de amplificación que se deben llevar a cabo (Cherry y cols., 1999; Wong y cols., 2006). En *S. cerevisiae*, la recombinación *in vivo* es un método sencillo, rápido y no mutagénico. En efecto, la elevada frecuencia de recombinación y la fácil manipulación de *S. cerevisiae* hace que la recombinación homóloga *in vivo* sea una valiosa herramienta para crear genotecas altamente diversas a partir de genes de la misma familia (Bulter y Alcalde, 2003; Okkels, 2004). Una de las ventajas del *in vivo shuffling* es que durante la recombinación el aparato corrector de errores de la célula de levadura previene la aparición de mutaciones adicionales que son comunes en los métodos *in vitro* (Cherry y cols., 1999). Además, estudios sobre la identidad de secuencia requerida para la recombinación homóloga en levadura sugieren que secuencias de DNA que compartan de 15 a 30 pares de bases contiguas pueden recombinar (Manivasakam y cols., 1995). Por lo tanto se antoja factible aplicar el *in vivo shuffling* para crear genes quiméricos a partir de familias de genes homólogos y así explotar la diversidad funcional natural.

Otros métodos de recombinación *in vivo* empleados con éxito son: CLERY (*Combinatorial Libraries Enhanced by Recombination in Yeast*) que hace uso del *in vitro* DNA *shuffling* y la recombinación *in vivo* de levadura (Abecassis y cols., 2000); y el *Random Chimeragenesis by Heteroduplex* basado en el sistema reparador de errores en el DNA de *E. coli* (Volkov y cols., 1999).



**Figura 1.3.** Algunos métodos de recombinación de DNA (Alcalde, 2003).

### 1.1.3. DESARROLLO DEL MÉTODO DE *SCREENING*

La puesta a punto de un método eficiente para la detección de las propiedades deseadas es probablemente el elemento más determinante en un experimento de evolución *in vitro* (Zhao y cols., 1999). Existen dos alternativas ampliamente utilizadas:

La **selección biológica** es la generación de una función que confiere crecimiento o ventaja de supervivencia al organismo hospedador. La enzima se encuentra vinculada a la supervivencia del hospedador, de tal forma que sólo los organismos que posean la característica deseada podrán crecer (Arnold y Volkov, 1999). Normalmente son métodos muy específicos y difíciles de implementar productivamente. Sin embargo, la selección puede ser un mecanismo muy eficiente de análisis permitiendo una exhaustiva búsqueda de librerías de  $10^6$  e incluso más variantes. La principal desventaja es que la propiedad o proteína de interés no puede desacoplarse de la función biológica y que la actividad enzimática diana no debe interferir con el metabolismo celular. Por lo tanto, puede ser difícil, incluso imposible, su uso para explorar nuevas funciones como la actividad/estabilidad en ambientes no-naturales o a altas temperaturas (Williams y cols., 2004).

La exploración o **screening** es un método más versátil y flexible, donde cada uno de los miembros de la librería es analizado individualmente para la propiedad catalítica a estudiar (Zhao y Arnold, 1997). Al contrario que en los procesos de selección, en el *screening* las condiciones experimentales pueden ajustarse para satisfacer el criterio deseado. El mayor inconveniente del *screening*, sin embargo, es que el tamaño de la librería que puede explorarse es limitado, normalmente alrededor de  $10^4$  clones, aunque con la ayuda de robots se pueden lograr incrementos de hasta un par de órdenes de magnitud.

El *screening* de actividad enzimática normalmente se hace mediante detección de la absorbancia o mediante la emisión de fluorescencia (Salazar y Sun, 2003). Los métodos colorimétricos son menos sensibles y selectivos que los fluorimétricos. Por norma general, los colorimétricos tienen su límite de detección en  $10^{-7}$  g/mL (pocas sustancias pueden ser detectadas a concentraciones más bajas), y los fluorimétricos pueden llegar de  $10^{-8}$  hasta  $10^{-10}$  g/mL.

Algunos métodos de *screening* se hacen directamente en fase sólida conteniendo el correspondiente sustrato. En estos casos, las variantes se detectan directamente por visualización de halos en torno a las colonias (coloración o decoloración) o la generación de color en el interior del hospedador. Estos estudios pueden acoplarse a analizadores digitales, aumentando la exploración de las librerías hasta  $10^5$ - $10^6$  variantes (Turner, 2003). En cualquier caso, son métodos cualitativos. Por este motivo, el *screening* en fase líquida es el más empleado habitualmente, ya que son métodos cuantitativos, lo que permite valorar los pequeños cambios en las actividades como consecuencia de las mutaciones introducidas. En términos generales, este tipo de *screening* implica la transferencia de colonias individuales a microplacas -generalmente en formato de 96 o 384 pocillos-, creciendo las células hasta la fase estacionaria, e induciendo a partir de estos microcultivos la expresión de la proteína (Salazar y Sun, 2003). Es importante destacar que el *screening* en fase líquida facilita la inclusión del tipo parental bajo las mismas condiciones que los clones de la librería, obteniéndose datos más uniformes y fiables al contar cada microplaca con su propio estándar interno (Zhao y cols., 1999). Si la proteína en estudio es intracelular, se debe hacer un paso adicional de lisis celular para liberar los contenidos celulares. Finalmente, la actividad enzimática se cuantifica en un espectrofotómetro/fluorímetro lector de microplacas, o bien mediante el empleo de técnicas de cromatografía en *high-throughput* (Goddard y Raymond, 2004).

El sistema de *screening* debe permitir *high-throughput* (HTP) a coste moderado, y ser fiable y reproducible. En este aspecto, el desarrollo de la tecnología de robots manipuladores de líquidos mejora mucho la reproducibilidad, reduce la dispersión de los datos y facilita sobremanera la labor del investigador (**Figura 1.4**). Un sistema HTP-*screening* debe ser lo suficientemente preciso para detectar las pequeñas mejoras (de 1.5 a 4 veces, por norma general) y lo suficientemente sensible para detectar los bajos niveles de actividad en los primeros ciclos. Es decir, las condiciones de *screening* deben asegurar que las pequeñas mejoras esperadas a partir de sustituciones de un único aminoácido puedan ser detectadas. Esto se consigue mediante el ajuste de las condiciones del ensayo en un punto en el que la

actividad de la enzima nativa o parental está cerca (y nunca por debajo) del límite de detección. Si la actividad de la enzima nativa se encuentra por debajo del límite de detección, las pequeñas mejoras no van a ser detectables (Cirino y cols., 2003).



**Figura 1.4.** Equipamiento para HTP-screening. **a)** Robot picador de colonias. **b)** Lector de microplacas. **c)** Robot manipulador de líquidos. **d)** Inyector automático HTP para HPLC.

Las reacciones más convenientes de analizar en HTP son aquellas que implican sustratos cromogénicos o fluorogénicos. Sin embargo, este tipo de análisis no es posible con muchos biocatalizadores y por ello en los últimos años ha habido un constante desarrollo de técnicas para el *screening* de actividades enzimáticas variadas (Wahler y Reymond, 2001; Goddard y Reymond, 2004; Williams y cols., 2004); desde el uso de ensayos basados en el principio de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) acoplado a FACS (*Fluorescente-Activated Cell Sorting*); experimentos de compartimentalización *in vitro*; registro de cambios físico-químicos (por ejemplo pH o temperatura); o uso de marcadores isotópicos,

hasta las más novedosas técnicas que hacen uso de *fingerprinting* de enzimas y *microarrays* (Joo y cols., 1999; Farinas y cols., 2001).

## 1.2. ESTUDIOS “SEMI-RACIONALES”: MUTAGÉNESIS SATURADA

Tal como se ha comentado en el apartado 1.1.2.1, las limitaciones derivadas de los métodos mutagénicos actualmente disponibles son obvias, por lo que se está realizando un enorme esfuerzo para ampliar la exploración del espacio de secuencia proteica mediante los llamados -coloquialmente- estudios “*semi-racionales*”. Mediante la técnica de mutagénesis saturada, donde un único codón que codifica para un determinado aminoácido de interés es mutado por todos los codones que codifican los 20 aminoácidos naturales, se logra expandir el número de sustituciones aminoacídicas accesibles por mutagénesis aleatoria. Además, también puede utilizarse para mutagenizar simultáneamente varios codones (mutagénesis saturada combinatorial) tanto en bloques contiguos como en posiciones separadas. De esta forma se exploran todas las posibles combinaciones y permutaciones de aminoácidos de interés para identificar sus óptimas interacciones y sinergias en el estudio las propiedades proteicas deseadas (Sun y cols., 2002; Alcalde y cols., 2006b). Sin embargo aparecen de nuevo limitaciones en la exploración, y es que la *randomización* de sólo 5 residuos generaría librerías de hasta  $3.2 \times 10^6$  mutantes, inabordables con las actuales tecnologías de HTP-*screening*.

Los estudios “*semi-racionales*” de proteínas son métodos que se sitúan entre el diseño “*racional*” y el evolutivo. Esto se debe a que hacen uso del análisis estructural de la enzima para la elección de los residuos a estudiar someténdolos a mutagénesis saturada combinatorial y acoplado el estudio a ensayos en HTP-*screening*. Por ello se llaman métodos “*semi-racionales*”, puesto que hacen uso de la estructura (diseño *racional*) aunque al tiempo permiten el análisis exhaustivo de un gran número de variantes que se comparan con el parental (tal como sucede en los protocolos de evolución molecular) (Chica y cols., 2005).

Asimismo, la combinación experimental de la mutagénesis dirigida con la aleatoria o saturada puede resultar muy útil en el diseño de biocatalizadores. Dependiendo de la cantidad y el tipo de información estructural y funcional del que se dispone, la estrategia experimental a seguir puede variar:

- Creación de librerías combinatoriales: es el caso más frecuente. Cuando se dispone de información estructural, se puede dirigir la mutagénesis saturada a varios residuos específicos (por ejemplo, aminoácidos en contacto directo con el sustrato o cerca del sitio activo).
- Mutagénesis aleatoria y saturada simultáneamente: con este tipo de enfoque se pretenden potenciar en un sólo paso las propiedades del biocatalizador. Para ello, se hace mutagénesis saturada en residuos específicos, y el gen se amplifica finalmente

mediante mutagénesis aleatoria descubriendo nuevas posiciones involucradas en el proceso catalítico.

- Mutagénesis aleatoria seguida de mutagénesis saturada: se localizan por mutagénesis aleatoria residuos de interés catalítico y se expande su estudio mediante una posterior mutagénesis saturada.

En una vertiente paralela, se están desarrollando novedosos métodos computacionales. Generalmente son métodos basados en *screening in silico* (virtual) de librerías del tamaño de hasta  $10^{80}$  variantes, permitiendo la obtención de información de mutaciones que son inconsistentes con el plegamiento de la proteína. De esta manera se reduce considerablemente el trabajo experimental y en especial el espacio proteico susceptible de ser explorado. Los ejemplos más destacados son el PDA (*Protein Design Automation*) (Hayes y cols., 2002) y el SCHEMA (Voigt y cols., 2002). PDA genera mutaciones a nivel de aminoácido y no de nucleótido, y permite la predicción de la secuencia óptima que puede adoptar un plegamiento deseado a partir del rastreo de secuencias. En principio el PDA permite la exploración de librerías de hasta  $10^{23}$  mutantes, escogiéndose las secuencias óptimas en base a la energía conformacional más baja. Las mutaciones que aparecen con más frecuencia son las que se deben analizar experimentalmente, permitiendo identificar múltiples sitios de mutación y la evaluación de sinergismos. Con el SCHEMA se identifican sitios proteicos que son tolerantes a mutaciones o que toleran entrecruzamientos sin alteraciones significativas. Aparte de los citados métodos computacionales existen también otros como el *Evolutionary Trace Method* (Lichtarge y cols., 1996) donde se escogen los residuos a mutar en base a estudios filogenéticos con genes relacionados; o métodos que predicen mutaciones que son necesarias para la introducción de sitios catalíticamente activos en moldes proteicos no catalíticos (Dwyer y cols., 2004); y más recientemente, el análisis estadístico mediante ProSAR (*Protein Sequence Activity Relationships*) para aumentar estrategias de recombinación en protocolos de evolución molecular (Fox y cols., 2007).

## 1.3. LACASAS

### 1.3.1. ASPECTOS GENERALES: DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN BIOLÓGICA

Las lacasas (EC 1.10.3.2, bencenodiol:oxígeno oxidorreductasas) son metaloenzimas que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos fenólicos (orto y para difenoles, polifenoles, fenoles sustituidos); aminas aromáticas e incluso algunos elementos y complejos inorgánicos ( $Mn^{2+}$ ,  $I_2$ ,  $Fe(EDTA)^{2-}$ ), acoplada a la reducción del oxígeno molecular a agua, sin producir peróxido de hidrógeno (Thurston, 1994; Mayer y Staples, 2002).

Las lacasas pertenecen a la familia de enzimas “oxidasa multicobre azul”, entre las que se incluyen la ascorbato oxidasa de plantas, la ceruloplasmina de plasma de mamíferos y la bilirrubina oxidasa, entre otras (Solomon y cols., 1996; Nakamura y Go, 2005). Desde el descubrimiento de las lacasas hace más de un siglo (1883) en el árbol japonés de la laca *Rhus vernicifera*, estas enzimas se han descrito en multitud de hongos, plantas superiores, algunas bacterias e incluso en insectos (Gianfreda y cols., 1999). La actividad lacasa se ha demostrado en más de 60 variedades de hongos pertenecientes a Basidiomicetes, Ascomicetes y Deuteromicetes (**Tabla 1.1**). Su presencia en plantas superiores es más limitada. Además de en la resina de la familia Anacardiaceae (a la cual pertenece *Rhus vernicifera*), también se han encontrado lacasas principalmente en tejidos celulares de *Acer pseudoplatanus*, *Pinus tadea*, *Aesculus parviflora* y *Populus euramericana* (Mayer y Staples, 2002). La primera lacasa procariótica se describió en *Azospirillum lipoferum* y posteriormente se han hallado en bacterias Gram negativas y positivas incluyendo especies de hábitats extremos como *Oceanobacillus iheyensis* o *Aquifex aeolicus*, en Actinomicetes como *Streptomyces griseus*, en bacterias marinas como *Marinomonas mediterranea* o como parte de la endospora de *Bacillus subtilis* (Claus, 2004). También se han descrito algunas polifenol oxidasas que muestran “actividad lacasa”, en cutículas de insectos como *Drosophila melanogaster*, *Lucilia cupreina*, *Manduca sexta* y *Sarcophaga bullata* (Gianfreda y cols., 1999). Recientemente, y haciendo uso de técnicas metagenómicas, se ha aislado una polifenol oxidasa con actividad lacasa a partir de muestras de rumen bovino (Beloqui y cols., 2006).

Las funciones biológicas atribuidas a las lacasas son muy variadas: respuesta a heridas y desarrollo de cuerpos frutales en plantas; formación del humus del suelo, patogénesis (factores de virulencia fúngica), esporulación, formación de pigmentos y morfogénesis de hongos en general; esclerotización de las cutículas de insectos; o síntesis de melanina y resistencia a factores físicos en las esporas bacterianas (Thurston, 1994; Gianfreda y cols., 1999). Una de las funciones biológicas de las lacasas más discutidas y estudiadas está relacionada con la lignina.

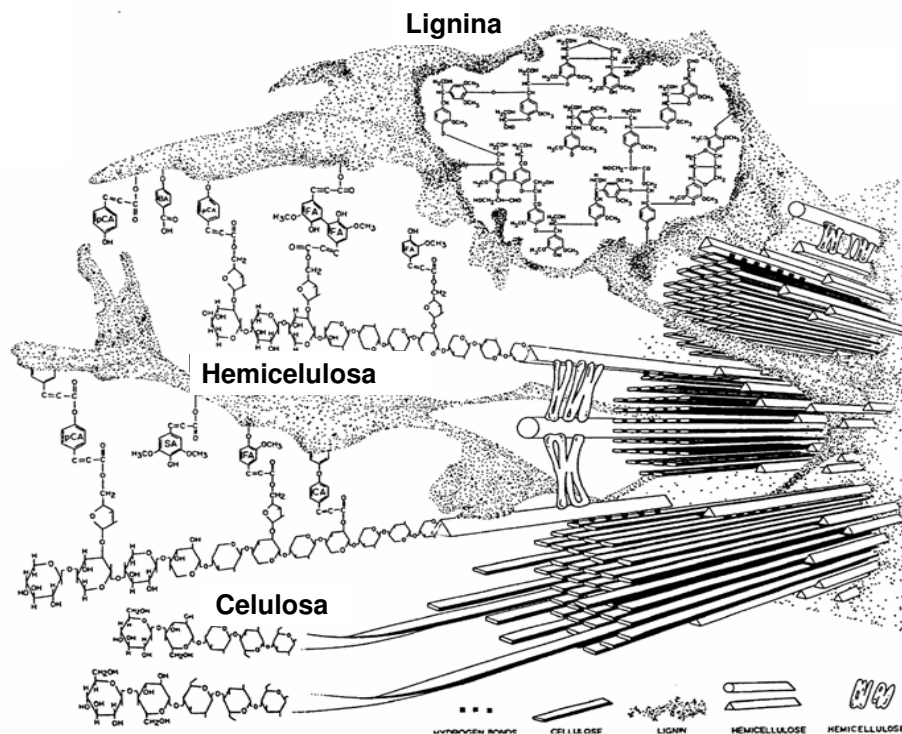


**Tabla 1.1.** Características generales de algunas lacasas fúngicas representativas.

Especie	Clase	Masa Molecular (kDa)	T óptima (°C) (con ABTS)	pH óptimo (con ABTS)	$K_m$ ( $\mu$ M)		E° (mV)	Referencia
					ABTS	siringaldazina		
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Ascomicete	110	60	4.5	290	1.5	465	(Bulter y cols., 2003; Berka y cols., 1997)
<i>Melanocarpus albomyces</i>	Ascomicete	80	65	3.5	280	1.3	460	(Kiiskinen y cols., 2002)
<i>Trametes versicolor</i>	Basidiomicete	68	55	2.5	37	n.d.	780	(Rogalski y cols., 1990)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Basidiomicete	67	35	3.6	70	36	740	(Hublik y Schinner, 2000; Palmieri y cols., 2003)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Basidiomicete	70	65	4.0	18	4	750	(Li y cols., 1999; Record y cols., 2002; Sigoillot y cols., 2004)
<i>Trametes hirsuta</i>	Basidiomicete	65	52	3.5	n.d.	n.d.	780	(Shleev y cols., 2004; Rebrikov y cols., 2006)
<i>Coriolopsis gallica</i>	Basidiomicete	84	70	3.0	52	9	n.d.	(Calvo y cols., 1998; Tinoco y cols. 2001)
<i>Marasmius quercophilus</i>	Basidiomicete	65	80	4.5	113	4.2	730	(Farnet y cols., 2004; Klonowska y cols., 2002)
<i>Rigidoporus lignosus</i>	Basidiomicete	60	40	3.0	200	40	750	(Cambria y cols., 2000; Garzillo y cols., 2001)
<i>Rhizoctonia solani</i>	Basidiomicete	66	n.d.	2.7	52	28	710	(Wahleithner y cols., 1996)

n.d.: no determinado

La lignina es el polímero aromático más abundante en la Tierra y el segundo compuesto, detrás de la celulosa, en contribuir a la biomasa terrestre. Se trata de un componente estructural de la pared celular de las plantas vasculares, un biopolímero polifenólico heterogéneo muy complejo constituido a partir de la polimerización de tres precursores (los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos: *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico) (**Figura 1.5**). Mientras que en los tejidos leñosos de las plantas las lacasas forman parte del sistema sintetizador de la lignina, la función de las lacasas de los hongos de podredumbre blanca es despolimerizar y mineralizar la lignina. La naturaleza recalcitrante y heterogénea de la lignina hace que el mecanismo de biodegradación de los hongos de podredumbre blanca sea el resultado de un complejo sistema extracelular de naturaleza oxidativa que implica efectos sinérgicos de varias enzimas y compuestos no enzimáticos (mediadores). Las enzimas ligninolíticas más importantes son la lignina peroxidasa, la manganeso peroxidasa y la lacasa, aunque enzimas como la celobiosa:quinona oxidoreductasa, la celobiosa deshidrogenasa, la glioxalato oxidasa, la glucosa oxidasa, la veratril alcohol oxidasa y algunas esterases también actúan durante el proceso de despolimerización (Thurston, 1994; Call y Mucke, 1997; Gianfreda y cols., 1999). De todas formas, la información actualmente disponible no es suficiente para definir el papel preciso de las lacasas en los procesos de lignificación/deslignificación.

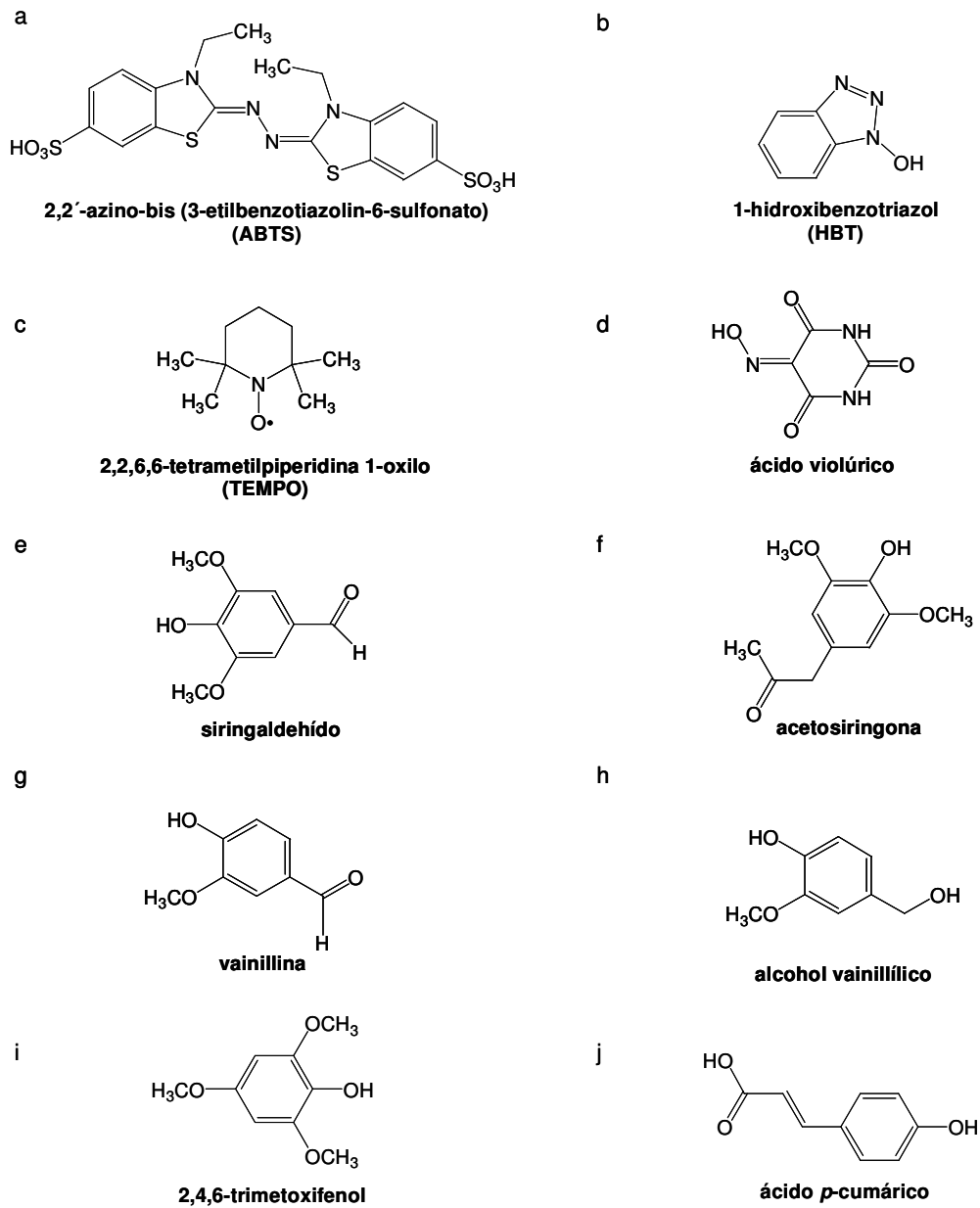


**Figura 1.5.** Disposición relativa y estructura molecular de la lignina, hemicelulosa y celulosa en la pared celular de plantas vasculares. Figura adaptada por el Prof. A. Martínez (CIB, CSIC) (Bidlack y cols., 1992).

### 1.3.2. SISTEMA LACASA-MEDIADOR

El número y tipo de sustratos oxidados por la lacasa puede ampliarse mediante un mecanismo que implica la participación de mediadores redox. Los mediadores son compuestos de bajo peso molecular fácilmente oxidados por la lacasa produciendo radicales catiónicos muy inestables y reactivos; estos últimos pueden oxidar a su vez compuestos complejos (incluyendo sustratos no fenólicos) antes de retornar a su estado original (Torres y cols., 2003). En este mecanismo los mediadores actúan como transportadores difusibles de electrones permitiendo la oxidación indirecta de sustratos poliméricos como la lignina, penetrando incluso a las zonas de su estructura menos accesibles. Además, mediante el uso de mediadores la lacasa es capaz de oxidar compuestos con un mayor potencial redox que la propia enzima -como sucede en la oxidación mediada de los hidrocarburos aromáticos policíclicos o PAHs- (Riva, 2006).

Desde que en 1990 Bourbonnais demostrara que la inclusión de mediadores expandía la actividad catalítica de las lacasa hacia sustratos no fenólicos (Bourbonnais y Paice, 1990) se han descrito más de 100 mediadores distintos, aunque los más comúnmente usados son el ABTS (2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato)) y el HBT (1-hidroxibenzotriazol) (Solis-Oba y cols., 2005). El sistema lacasa-mediador puede aplicarse en la industria del blanqueo de la pasta de papel (Bourbonnais y cols., 1997; Call y Mucke, 1997) así como en la biorremediación de xenobióticos como los PAHs (Johannes y cols., 1996; Collins y cols., 1996; Bourbonnais y cols., 1997; Call y Mucke, 1997; Majcherczyk y cols., 1998; Majcherczyk y Johannes, 2000; Alcalde y cols., 2002). Además se ha demostrado que la combinación de dos o más mediadores (por ejemplo, ABTS y HBT) puede producir un efecto sinérgico en la actividad oxidativa (Pickard y cols., 1999). Sin embargo, el coste económico de los mediadores de origen químico, su elevada toxicidad y la carencia de estudios suficientes sobre los efectos de sus derivados, además de la inactivación que sus radicales catiónicos ejercen sobre la lacasa, hace que la aplicación del sistema lacasa-mediador sea todavía limitada (Baldrian, 2006). El uso de mediadores naturales podría presentar ventajas medioambientales y económicas. Muchos compuestos implicados en la degradación natural de la lignina que derivan de unidades de lignina oxidadas o que son secretados por los hongos de podredumbre blanca pueden actuar como mediadores de manera eficaz. Así, los mediadores naturales ácido 4-hidroxibenzoico, alcohol 4-hidroxibencílico, alcohol veratrílico, siringaldehído, acetosiringona, vainillina, y ácido *p*-cumárico, entre otros, se han probado con diferentes lacasas obteniendo resultados similares a los conseguidos con mediadores artificiales (**Figura 1.6**) (Johannes y Majcherczyk, 2000; Camarero y cols., 2005). Un claro ejemplo es el descrito recientemente para la degradación de los PAHs benzo[*a*]pireno, pireno y antraceno por el sistema lacasa-mediador constituido por la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* y el ácido *p*-cumárico (Cañas y cols., 2007).



**Figura 1.6.** Estructuras químicas de algunos de los mediadores redox de lacasa. (a-d) Mediadores sintéticos. (e-j) Mediadores naturales, derivados de la oxidación de la lignina.

### 1.3.3. ESTRUCTURA

La lacasa es una enzima monomérica organizada en tres dominios tipo cupredoxina, un plegamiento característico de oxidasas multicobre azul y otras pequeñas proteínas de cobre como la plastocianina de plantas o la azurina bacteriana (Nakamura y Go, 2005). Normalmente son glicoproteínas extracelulares con una masa molecular de entre 50 y 140 kDa y con una gran diversidad tanto en el tamaño (10-45% del peso total) como en la composición de los carbohidratos covalentemente unidos (Claus, 2004). La mayoría de las lacasas fúngicas contienen un total de 520-550 aminoácidos, sin incluir el péptido señal de unos 20 residuos en el extremo amino terminal para su secreción extracelular (Thurston, 1994).

En las reacciones de oxidorreducción de las lacasas participan cuatro átomos de cobre ubicados en zonas muy conservadas de su estructura y que se clasifican en tres clases diferentes debido a sus características espectroscópicas (Solomon y cols., 1996; Claus, 2004):

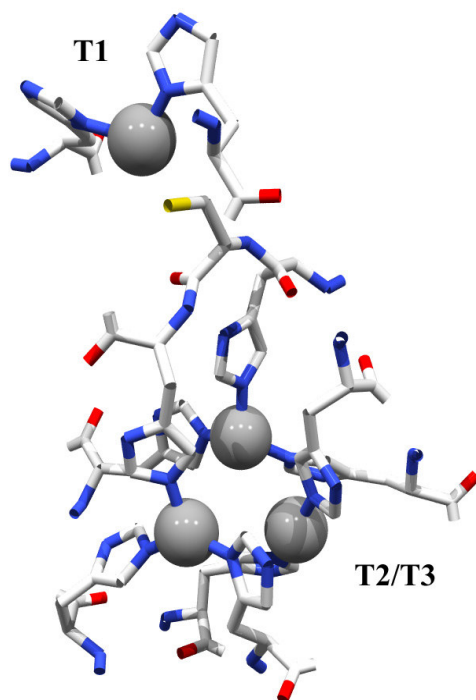
- El sitio de Cu tipo T1 o cobre azul paramagnético muestra una banda de absorción intensa a 610 nm ( $\epsilon_{610}$  entre 4900 y 5700  $M^{-1} cm^{-1}$ ) que es la que confiere el típico color azul-verdoso de las lacasas en su estado basal oxidado ( $Cu^{2+}$ ). La intensa absorción se debe al enlace covalente entre el Cu T1 y el azufre de uno de los residuos Cys que lo coordina. Además también exhibe un característico desplazamiento hiperfino paralelo en el espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR) debido a la transición de carga del azufre al  $Cu^{2+}$ .
- El sitio de Cu tipo T2 o cobre normal paramagnético no absorbe en el espectro visible pero tiene propiedades paramagnéticas características en el espectro de EPR.
- El sitio de Cu T3 o centro binuclear está formado por dos átomos de Cu. No muestran señal EPR debido al fuerte acoplamiento antiferromagnético de los dos iones metálicos a través de un grupo hidroxilo. En la forma oxidada muestran un “*hombro*” característico a 330 nm en el espectro UV.

El Cu T2 junto con los dos Cu del sitio T3 forman el *cluster* o agrupamiento trinuclear, lugar donde se reduce el oxígeno molecular liberándose dos moléculas de agua. La oxidación de los sustratos reductores ocurre en el sitio T1 y posteriormente los electrones son transferidos al *cluster* trinuclear a través de un tripéptido His-Cys-His, altamente conservado en las oxidasas multicobre azules.

La resolución estructural por rayos X de la lacasa bacteriana de *Bacillus subtilis* (Enguita y cols., 2003) y cinco lacasas fúngicas de *Coprinus cinereus* (Ducros y cols., 2001), *Trametes versicolor* (Piontek y cols., 2002), *Pycnoporus cinnabarinus* (Antorini y cols., 2002), *Melanocarpus albomyces* (Hakulinen y cols., 2002) y *Rigidoporus lignosus* (Garavaglia y cols., 2004) han ayudado a esclarecer la importancia estructural de los sitios de Cu al tiempo que han aportado información relevante sobre la relación estructura-función de este grupo de enzimas.

El Cu del sitio T1 en las lacasas fúngicas está coordinado trigonalmente por dos átomos N de dos residuos His y un átomo S de una Cys como ligandos ecuatoriales conservados y una

posición axial normalmente variable. Este ligando axial es un residuo de Met en las lacasas bacterianas, en las lacasas de plantas y en el resto de oxidasas multicobre azul (por ejemplo ascorbato oxidasa). Sin embargo, es una Leu o Phe en las lacasas fúngicas. En este último caso, el ligando axial está a distancias superiores a los 3.6 Å, por lo que no participa en la coordinación. De ahí que la coordinación del Cu T1 en lacasas fúngicas presente una geometría planar trigonal (Claus, 2004). Por el contrario, el resto de los componentes de la familia multicobre azul muestra una coordinación tetragonal, con dos histidinas, una cisteína y una metionina axial (cuyo átomo de azufre se sitúa a unos 2.9 Å, participando en la coordinación). El centro mononuclear T1 se encuentra en el dominio 3, en un bolsillo hidrofóbico a unos 6 Å de la superficie de la enzima. El sustrato reductor se une a una pequeña cavidad, junto al sitio T1, cargada negativamente. Estas cargas negativas podrían estabilizar el radical catiónico que se produce durante el ciclo catalítico (Piontek y cols., 2002). Una vez que el sustrato ha sido oxidado, los electrones se transfieren intramolecularmente desde el Cu T1 hasta el centro trinuclear que se encuentra aproximadamente a 12 Å de distancia, a través del tripéptido conservado His-Cys-His (**Figura 1.7**) (Kumar y cols., 2003).



**Figura 1.7.** Disposición estructural de los cuatro átomos de Cu (representados como esferas grises) y los residuos que los coordinan en la lacasa de *M. albomyces* (figura generada con el programa PDB-Viewer por el Prof. J. Polaina, IATA, CSIC, Valencia).

El centro trinuclear se sitúa entre los dominios 1 y 3, a unos 12 Å de la superficie. Los tres átomos de Cu forman un triángulo regular perfecto (a una distancia de 3.85 Å entre ellos en la lacasa de *T. versicolor*) (Piontek y cols., 2002) y se encuentran coordinados por 8 His. Los dos átomos de cobre del sitio T3 se mantienen unidos por un puente hidroxilo y están coordinados por 6 His mientras que las otras dos His coordinan el Cu T2 (Claus, 2004). El sitio de reducción del O<sub>2</sub> en el agrupamiento T2/T3 tiene acceso al solvente por dos canales, uno ancho y otro estrecho, en las lacasas de *M. albomyces*, *C. cinnereus* y *T. versicolor*, así como en la ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina. El canal más ancho accede al sitio T3, facilitando así la entrada del oxígeno molecular y la salida del agua (Ducros y cols., 2001; Piontek y cols., 2002; Hakulinen y cols., 2002).

Una característica estructural importante presente en las lacasas de los Ascomicetes *Neurospora crassa*, *Myceliophthora thermophila*, y *Melanocarpus albomyces* es la presencia, en la proteína madura, de una tapa en el extremo C-terminal formada por cuatro residuos (Asp-Ser-Gly-Leu). Esta tapa es consecuencia del procesamiento C-terminal de una extensión de unos 14 aminoácidos que es escindida proteolíticamente durante la secreción de la proteína (Berka y cols., 1997; Germann y cols., 1988; Hakulinen y cols., 2002).

Diferentes estudios de alineamiento múltiple de más de 100 secuencias de lacasas revelan una evidente conservación a nivel de la estructura terciaria de los sitios redox y de la coordinación de los sitios de Cu (Kumar y cols., 2003; Valderrama y cols., 2003). Los 8 ligandos de His del *cluster* trinuclear T2/T3 aparecen en un patrón altamente conservado de 4 motivos His-X-His. En uno de estos motivos, X es la Cys que se une al Cu T1 mientras que las His adyacentes se unen a cada uno de los dos Cu del sitio T3. A una distancia de 35-75 residuos hay otro motivo His-X-His y cerca del amino terminal hay otros dos motivos separados por 35-60 residuos (Solomon y cols., 1996). Los doce aminoácidos que sirven de ligandos para los cuatro átomos de Cu se encuentran localizados dentro de cuatro segmentos de secuencia separadas y con una longitud de entre 8 y 24 residuos (L1-L4) características de las lacasas y que las diferencia del resto de oxidasas multicobre azul. Además existe una homología intraproteica entre L1 y L3 así como entre L2 y L4 que sugiere la existencia de un evento de duplicación en la evolución de las lacasas. La elevada conservación del sitio activo de las diferentes oxidasas de Cu sugiere que la actividad unida a tres sitios diferentes de Cu debió ser un evento evolutivo muy temprano.

#### 1.3.4. MECANISMO CATALÍTICO

A pesar de la intensa investigación llevada a cabo, el mecanismo catalítico de las lacasas todavía no está completamente definido (Duran y cols., 2002). Sin embargo, hay varios hechos bien establecidos (Torres y cols., 2003; Alcalde, 2007):

- La oxidación del sustrato reductor genera un radical libre tras la transferencia de un electrón al Cu T1, el cual se encuentra en su estado basal en forma totalmente oxidada ( $\text{Cu}^{2+}$ ). El producto de oxidación inicial es típicamente inestable y es susceptible de una segunda oxidación (por ejemplo convirtiendo un fenol en quinona) o sufrir reacciones no enzimáticas como la hidratación y/o reacciones de polimerización (Gianfreda y cols., 1999).
- Como la oxidación del sustrato mediante la sustracción de un electrón está acoplada con la reducción del oxígeno molecular por cuatro electrones, la lacasa debe operar como una batería, almacenando los electrones de las oxidaciones individuales para reducir el  $\text{O}_2$  (Thurston, 1994). Por ello, para la completa reducción de una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua, se requiere la oxidación consecutiva de 4 moléculas de sustratos reductores.
- Cada electrón extraído de cuatro oxidaciones mono-electrónicas en el sitio T1 es transferido intramolecularmente, a través del motivo conservado His-Cys-His, al agrupamiento trinuclear T2/T3 donde se une el  $\text{O}_2$ .

### 1.3.5. POTENCIAL REDOX

El potencial redox ( $E^\circ$ ) de las lacasas tiene una relación directa con la energía requerida para arrancar un electrón al sustrato reductor, constituyendo una de las características clave de estas enzimas. De hecho, el comportamiento catalítico de las lacasas sobre la mayoría de los sustratos reductores depende del  $E^\circ$  en el Cu T1 (aceptor de electrones). De este modo, las lacasas con un mayor  $E^\circ_{\text{T1}}$  son de especial interés en biotecnología debido a que, *a priori*, serán capaces de oxidar sustratos de elevado  $E^\circ$  como los componentes no fenólicos de la lignina, los PAHs, diversos colorantes poliméricos recalcitrantes, etc. (Shleev y cols., 2005b). El  $E^\circ$  de diferentes lacasas ha sido ampliamente estudiado mediante técnicas electroquímicas (principalmente voltamperometría cíclica y valoraciones redox) haciendo uso de diferentes tipos de electrodos y mediadores redox ( Xu y cols., 1997; Shleev y cols., 2004, 2005a y 2005b).

El  $E^\circ$  del Cu T1 de las lacasas fúngicas es mayor ( $E^\circ_{\text{T1}}$  cercano a +800 mV) que el de las lacasas de plantas o bacterianas (por ejemplo la lacasa de *Rhus vernicifera* tiene un  $E^\circ_{\text{T1}} = +400$  mV) y otras oxidasas multicobre azul (ascorbato oxidasa  $E^\circ_{\text{T1}} = +340$  mV). Sin embargo, es importante señalar que también existen marcadas diferencias en los  $E^\circ_{\text{T1}}$  de las diferentes lacasas fúngicas, desde +465 mV de la lacasa de *M. thermophila* hasta +780 mV de la lacasa de *T. versicolor*. En este sentido, se ha realizado un enorme esfuerzo con la intención de dilucidar qué factores determinan estas diferencias en los  $E^\circ_{\text{T1}}$ , sobre todo si se tienen en cuenta las geometrías de coordinación de los sitios de Cu, prácticamente conservadas.

La coordinación axial del Cu T1 parece ser uno de los factores que afectan al  $E^\circ$  de las enzimas multicobre azul. Como se comentó en el apartado 1.3.3, mientras que en la ascorbato



oxidasa, o en las lacasas de plantas y bacterianas (todas ellas con  $E^{\circ}_{T1}$  en torno a +400 mV) la posición axial la ocupa un residuo de Met, en las lacasas fúngicas son residuos hidrofóbicos (Leu o Phe). Según las teorías de F. Xu, una disminución en la densidad electrónica del átomo de Cu T1 debido a la falta del ligando donante Met puede resultar en un incremento en la energía de ionización y por lo tanto en un mayor  $E^{\circ}_{T1}$  (Xu y cols., 1997). En este sentido, se han descrito diversas lacasas fúngicas de bajo  $E^{\circ}_{T1}$  en las que el ligando axial es una Leu y otras con alto  $E^{\circ}_{T1}$  y una Phe en dicha posición (**Tabla 1.2**). Sin embargo, las lacasas de *Rhizoctonia solani* y *Neurospora crassa* tienen un  $E^{\circ}_{T1}$  elevado (+710 mV y +780 mV respectivamente) aunque presentan una Leu como ligando axial. Los diferentes estudios de mutagénesis dirigida sobre el ligando axial no han producido cambios significativos en el  $E^{\circ}_{T1}$  de las lacasas de *M. thermophila*, *R. solani* y *T. villosa* (Xu y cols., 1998 y 1999; Palmer y cols., 2003), pero en el caso de la lacasa bacteriana CotA la sustitución de la Met axial por Leu o Phe supuso un aumento en el  $E^{\circ}_{T1}$  de aproximadamente +100 mV, aunque la  $k_{cat}$  sobre diferentes sustratos disminuyó notablemente, así como la estabilidad de la enzima (Durao y cols., 2006).

Es importante destacar que el ligando axial forma parte de un pentapéptido altamente conservado (**Tabla 1.2**), en el que los tres primeros residuos se localizan en la proximidad del sitio de unión del sustrato al Cu T1, y se cree que puedan estar implicados en el valor del  $E^{\circ}_{T1}$ . Este tripéptido en las lacasas de alto  $E^{\circ}$  está formado por LEA (con la excepción de la lacasa de *N. crassa*), mientras que en las de bajo  $E^{\circ}$  es VSG. Xu y colaboradores construyeron un triple mutante de la lacasa de *M. thermophila* para sustituir VSG por LEA y aunque no observaron un aumento en el  $E^{\circ}_{T1}$ , los parámetros cinéticos sí que sufrieron pequeñas variaciones (Xu y cols., 1998).

**Tabla 1.2.** Alineamiento de secuencias de diferentes lacasas fúngicas y de la ascorbato oxidasa. En rojo, los ligandos del átomo de Cu T3. En verde, los ligandos del Cu T1. Recuadrado en azul el pentapeptido 509-513 altamente conservado, supuestamente involucrado en la modulación del potencial redox.

Lacasa		Alineamiento de secuencia										$E^{\circ}$ (mV)			
<i>Scytalidium thermophilum</i>	506	H	C	H	I	A	W	H	V	S	G	G	L	517	+510
<i>Myceliophthora thermophila</i>	502	H	C	H	I	A	W	H	V	S	G	G	L	513	+470
<i>Neurospora crassa</i>	500	H	C	H	I	A	W	H	V	S	G	G	L	511	+780
<i>Rhizoctonia solani</i>	459	H	C	H	I	D	W	H	L	E	A	G	L	470	+710
<i>Trametes villosa</i>	452	H	C	H	I	D	F	H	L	E	A	G	F	463	+780
<i>Trametes versicolor</i>	551	H	C	H	I	D	F	H	L	E	A	G	F	462	+790
Ascorbato oxidasa de <i>Cucurbita pepo</i>	506	H	C	H	I	E	P	H	L	H	M	G	M	517	+340








Finalmente, el grupo de K. Piontek, mediante el análisis y comparación de la estructura cristalográfica de las lacasas de *T. versicolor* y *C. cinnereus*, propuso otro mecanismo por el cual las lacasas y posiblemente otras metaloenzimas redox pueden incrementar su  $E^{\circ}_{T1}$  (Piontek y cols., 2002). Según este estudio, la distancia entre el Cu T1 y los átomos de nitrógeno que lo coordinan también podría ser un factor importante para la modulación del potencial redox.

Sin duda alguna, los factores que afectan al potencial redox de las metaloproteínas son muy variados y de una gran complejidad. Los efectos de solvatación, las interacciones metal-ligando, las interacciones electrostáticas intramoleculares y/o las restricciones del plegamiento de la proteína que dictan la posición y orientación de los ligandos pueden modular los valores de  $E^{\circ}$  de estas enzimas (Li y cols., 2004).

### 1.3.6. APLICACIONES INDUSTRIALES Y BIOTECNOLÓGICAS

Debido a la baja especificidad de sustrato, las lacasas son capaces de catalizar un gran número de reacciones oxidativas. Esta versatilidad catalítica hace que estas enzimas tengan cada vez un mayor interés en aplicaciones biotecnológicas muy variadas.

- Una de las aplicaciones técnicas más conocidas de las lacasas es la deslignificación (blanqueo de la pasta de papel) y el tratamiento de las aguas residuales en la industria papelera. Desde que en 1990 Bourbonnais demostrara que la lacasa de *Trametes versicolor* en presencia de mediadores era capaz de deslignificar la pasta de papel, sin necesidad de las tradicionales técnicas basadas en el uso de reactivos tóxicos clorados, son muchos los estudios desarrollados para optimizar todo el proceso (Bourbonnais y cols., 1995; Call y Mucke, 1997; Riva, 2006).
- La biorremediación enzimática mediante lacasas es otra de las áreas de gran interés. El sistema lacasa-mediador es capaz de oxidar compuestos tóxicos presentes en zonas contaminadas y efluentes industriales como los PAHs, clorofenoles, dimetoxifenoles, nitrofenoles, y pesticidas organofosforados entre otros (Rodríguez y cols., 1999; Alcalde y cols., 2002; d'Acunzo y cols., 2002; Torres y cols., 2003). De especial interés es la degradación de PAHs. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos constituyen un grupo de xenobióticos muy peligroso (mutagénicos, carcinogénicos y/o teratogénicos) que se encuentran distribuidos ampliamente en ambientes terrestres y acuáticos (**Figura 1.8**).

	PAH	Masa molecular	Solubilidad en agua (mg/L)	Genotoxicidad
<b>PERSISTENCIA</b>	Naftaleno 	128.2	31.7	No genotóxico
	Antraceno 	178.2	0.07	No genotóxico
	Fenantreno 	178.2	1.3	No genotóxico
	Fluoranteno 	202.3	0.260	Carcinogénico moderado
	Pireno 	202.3	0.140	Alteraciones en la síntesis cromosómica
	Benzo [a]antraceno 	228.3	0.002	Carcinogénico, produce aberraciones cromosómicas
	Benzo [a]pireno 	252.3	0.003	Carcinogénico, produce aberraciones cromosómicas, formación de aductos de DNA

**Figura 1.8.** PAHs y su toxicidad. El grado de persistencia en el medio ambiente (dependiente de su solubilidad) y su toxicidad mantiene una estrecha relación con el incremento en número de núcleos bencénicos y la angularidad en la estructura de la molécula.

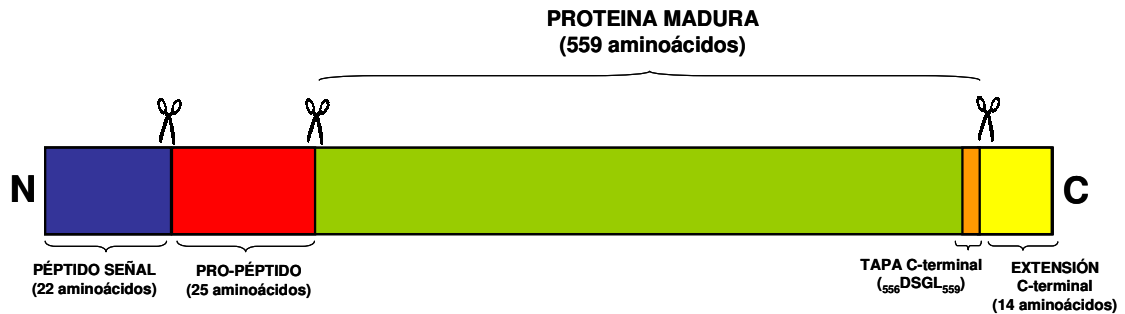
Las principales fuentes de emisión proceden de vertidos marinos (por ejemplo, el 52.7% del contenido total del fuel vertido por el buque *Prestige* estaba constituido por PAHs), los motores de los vehículos, procesos industriales o incendios forestales. Las últimas tendencias en eliminación de PAHs apuntan a la combinación de métodos químicos y biológicos como tratamiento de choque para la oxidación de estos nocivos compuestos. En este sentido, se está realizando un importante esfuerzo para el diseño de lacasas eficaces en la oxidación de PAHs bajo las exigentes condiciones del proceso (presencia de disolventes orgánicos, condiciones ambientales extremas, etc.).

- Las aplicaciones en la industria textil van desde el blanqueo de la fibra de algodón y colorantes textiles hasta la producción de precursores de colorantes de mayor calidad. De hecho, la lacasa de *M. thermophila* se usa desde hace poco para la oxidación del colorante índigo en prendas vaqueras (Riva, 2006).
- En la industria alimentaria las lacasas se utilizan para mejorar la estabilidad y propiedades organolépticas de zumos de frutas, vino y cerveza. La oxidación enzimática de compuestos fenólicos en las bebidas elimina la turbidez de éstas y produce mejoras en el color, aroma y sabor. Además, el uso de lacasas en panadería influye en la calidad de la masa de pan (Minussi y cols., 2002).

- Las lacasas se incorporan a productos cosméticos y de higiene personal. La tinción y ondulamiento del pelo tradicional implica el uso de productos químicos agresivos que pueden ser reemplazados por tratamientos con lacasas. También se utilizan en desinfección, cuidado de la piel y en desodorantes de cuidado personal. La lacasa es capaz de oxidar tioles y compuestos amónicos que producen mal olor en casos de halitosis, bromhidrosis e hiperhidrosis (Xu, 2005).
- La actividad lacasa acoplada a transductores físicos puede ser útil en el diseño de biosensores para detectar O<sub>2</sub> y una gran variedad de sustratos reductores como fenoles, anilinas y glucosa. Además, puede determinar indirectamente la actividad de otras enzimas (por ejemplo, amilasas, aminopeptidasas, fosfatasa alcalina, celobiosa oxidasa, quimotripsina o glucosidasa). La enzima de interés cataliza la producción de un compuesto cuya subsiguiente transformación por la lacasa genera cambios físicos (Mayer y Staples, 2002; Minussi y cols., 2002; Xu, 2005).
- Una prometedora y futura aplicación de las lacasas reside en el diseño de biopilas de combustible. Las lacasas pertenecen al exclusivo grupo de enzimas que son capaces de aceptar electrones directamente desde un electrodo (Call y Mucke, 1997; Christenson y cols., 2004); además, catalizan la reducción de oxígeno a agua consumiendo 4 electrones, es decir, la reacción que tiene lugar en el cátodo de las pilas de combustible. La investigación se centra en el diseño y obtención de la transferencia directa de electrones en el compartimento catódico con lacasas que sean eficaces cinéticamente.

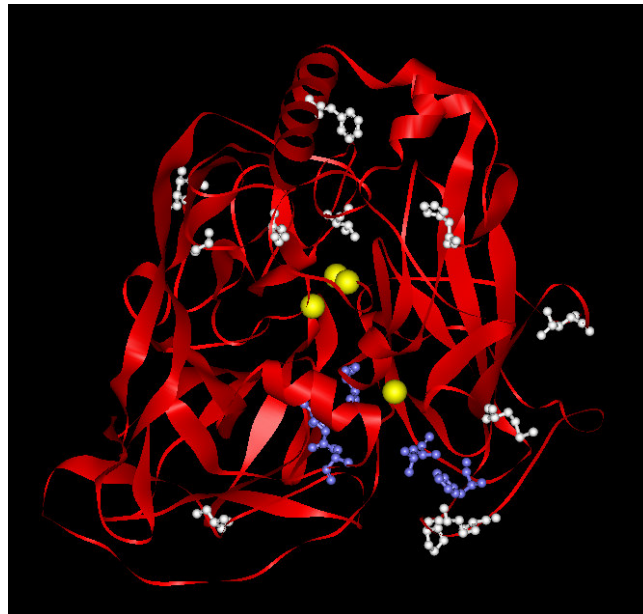
### 1.3.7. LA LACASA DE *Myceliophthora thermophila* (MtL)

La lacasa termoestable del Ascomicete *Myceliophthora thermophila* (un hongo de podredumbre blanca) es una glicoproteína monomérica extracelular con una masa molecular de ~110 kDa, con un contenido en carbohidratos en torno al 40-60%. Los 1860 nucleótidos que forman el gen de esta lacasa codifican una pre-pro-enzima de 620 aminoácidos. Durante su maduración y secreción la proteína sufre tres procesamientos: (1) escisión del péptido señal de 22 aminoácidos y (2) de un pro-péptido de 25 residuos en el extremo N-terminal; y (3) la separación de una extensión de 14 aminoácidos en el extremo C-terminal dando lugar a una proteína madura de 559 aminoácidos (**Figura 1.9**). Como consecuencia del procesamiento de la extensión C-terminal, queda una tapa polipeptídica de 4 residuos característica en las lacasas de Ascomicetes de funcionalidad controvertida. La secuencia de aminoácidos de MtL comparte una identidad elevada con otras lacasas de Ascomicetes (75%, 65% y 60% con las lacasas de *M. albomyces*, *P. anserina* y *N. crassa*, respectivamente) y menos del 30% con las de Basidiomicetes (por ejemplo, 22% con la lacasa de *T. versicolor*).



**Figura 1.9.** Esquema general de la lacasa de *M. thermophila*. Las tijeras indican los sitios de procesamiento de la proteína durante su maduración.

En 1997 se clonó y expresó heterológamente MtL en *Aspergillus oryzae*, obteniéndose hasta 19 mg de enzima por litro de cultivo (Berka y cols., 1997). Sin embargo, *A. oryzae* no es un hospedador adecuado para protocolos de evolución dirigida, ya que integra el DNA foráneo en su propio genoma. Por ello, el grupo de Frances Arnold clonó MtL en *S. cerevisiae* y mejoró su expresión funcional mediante evolución molecular dirigida (Bulter y cols., 2003). Llevaron a cabo 10 ciclos de evolución *in vitro* del gen completo de MtL, haciendo uso de diferentes estrategias de generación de diversidad (epPCR con Mutazima y *Taq* polimerasa, *in vitro* StEP y recombinación *in vivo*, entre otras técnicas), explorando más de 20000 clones. Finalmente, la mejor variante obtenida, MtLT2, presentó una expresión 8 veces superior (18 mg/L) y la actividad total mejoró 170 veces con respecto a la MtL parental. MtLT2 se encuentra hiperglicosilada y contiene 14 mutaciones (12 en la proteína madura y dos en sitios de procesamiento), la mayoría de ellas en residuos alejados de los átomos de Cu y el sitio de unión del sustrato reductor, en la superficie de la proteína y en lazos periféricos (**Figura 1.10**). MtLT2 es la enzima con la que se ha realizado el presente trabajo de Tesis Doctoral.



**Figura 1.10.** Modelo estructural del mutante MtLT2. Los residuos que se supone participan en la unión del sustrato aparecen en azul y las mutaciones en blanco. Los átomos de Cu se representan como esferas amarillas. El modelo se ha creado mediante Deep View y Swiss-Model Server a partir de la lacasa de *M. albomyces* (75% de identidad de secuencia con MtLT2).

#### 1.4. ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

Las soluciones acuosas son el entorno natural para la acción y las propiedades estructurales y dinámicas de las enzimas. Sin embargo, a menudo es beneficioso cambiar a un medio no acuoso cuando se emplean las enzimas como catalizadores prácticos en química orgánica o en biotecnología (Adamczak y Krishna, 2004). Por ello, uno de los mayores enfoques actuales de la ingeniería de proteínas es el desarrollo de enzimas catalíticamente activas en medios no convencionales (disolventes orgánicos, fluidos supercríticos, líquidos iónicos, etc.) (Roccatano y cols., 2005).

Gracias a los estudios realizados a lo largo de estas dos últimas décadas, hoy se conoce que el uso de enzimas en disolventes orgánicos no sólo es posible, sino que, en estos ambientes aparentemente hostiles, las enzimas son capaces de catalizar reacciones que no son favorecidas en un medio acuoso. En un medio orgánico es posible modular la actividad, especificidad (incluyendo estereo-, regio- y/o quimioespecificidad) y estabilidad de muchas enzimas (Dordick, 1992; Klibanov, 2001; Lee y Dordick, 2002; Adamczak y Krishna, 2004). El uso de disolventes orgánicos presenta otras ventajas como el aumento de la solubilidad de sustratos no polares, el desplazamiento del equilibrio termodinámico hacia la síntesis en detrimento de la hidrólisis o el aumento de la termoestabilidad. Además, la recuperación tanto de productos como del biocatalizador es mucho más fácil en sistemas que contienen una fase

orgánica. Por último, es importante reseñar que se evitan reacciones secundarias/laterales dependientes de agua y las posibles contaminaciones microbianas en la mezcla de reacción (Laane y cols., 1987; Ogino y Ishikawa, 2001; Schmid y cols., 2001; Roccatano y cols., 2005).

En cualquier caso, la actividad catalítica suele ser menor en medios orgánicos que en acuosos (Klibanov, 2001). Existen varios factores que afectan a esta disminución: la pérdida de moléculas de agua críticas en la superficie de la enzima, una bajada drástica de la polaridad del microambiente de la enzima, y la disminución de la movilidad y flexibilidad conformacional debida a la pérdida de interacciones no-covalentes (Zaks y Klibanov, 1988; Khmelnitsky y cols., 1991; Lee y Dordick, 2002).

Para evitar la desnaturalización y aminorar la pérdida de actividad en disolventes se han desarrollado diferentes técnicas (Klibanov, 2001): la inmovilización en diferentes soportes, la modificación química con compuestos anfipáticos como el polietilenglicol, la liofilización en condiciones óptimas de pH y en presencia de diferentes compuestos (lípidos, sales, ciclodextrinas, ácidos y bases, excipientes y surfactantes, entre otros), el atrapamiento de enzimas en micelas inversas o microemulsiones, y el uso de células enteras provenientes de cepas resistentes a disolventes orgánicos (Ogino y Ishikawa, 2001; Lee y Dordick, 2002; Bommarium y Riebel, 2004).

Asimismo, la ingeniería genética de proteínas se ha utilizado para esclarecer los aspectos mecanísticos del efecto de los disolventes orgánicos sobre los biocatalizadores y para el descubrimiento/desarrollo de nuevas enzimas activas y estables en medios no acuosos. Gracias a estos estudios, se conoce que la eliminación selectiva de residuos cargados de la superficie de la enzima, puede favorecer en algunos casos la estabilidad, ya que la enzima necesitará menos cantidad de agua para solvatar dichos residuos y la superficie se hace más hidrófoba. Además, la introducción de interacciones internas estabilizantes como los puentes disulfuro, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals e interacciones electrostáticas entre otras, pueden conferir estabilidad frente a disolventes orgánicos (Arnold, 1990; Klibanov, 2001; Ogino y Ishikawa, 2001; Krishna, 2002; Lee y Dordick, 2002; Adamczak y Krishna, 2004).

La catálisis enzimática en disolventes orgánicos está madurando rápidamente y tanto el número de procesos sintéticos que se están desarrollando a escala industrial como el número de publicaciones científicas al respecto (por lo menos una publicación por día) aumenta con rapidez (Ogino y Ishikawa, 2001; Lee y Dordick, 2002; Krishna, 2002). Sin embargo, la mayoría de los trabajos hasta el momento se han llevado a cabo con enzimas hidrolíticas. El uso de enzimas más complejas en disolventes orgánicos, incluyendo aquellas que requieren cofactores y especialmente las oxidorreductasas y liasas, no se ha estudiado en profundidad (Klibanov, 2001).

#### 1.4.1. LACASAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

El estudio de la lacasas en medios no acuosos comenzó en 1988 con la investigación de la lacasa de *Trametes versicolor* en micelas inversas (Rodakiewicz-Nowak, 2000). Desde entonces se ha analizado el comportamiento de varias lacasas en presencia de diferentes disolventes orgánicos, todos ellos miscibles en agua. Los estudios se han llevado a cabo con lacasas solubles (Luterek y cols., 1998; Rodakiewicz-Nowak y cols., 1999 y 2000; Robles y cols., 2002), liofilizadas (Milstein y cols., 1989), inmovilizadas en diferentes soportes (Milstein y cols., 1989; Luterek y cols. 1998), en micelas inversas (Rodakiewicz-Nowak, 2000; Rodakiewicz-Nowak y cols., 2000) y estabilizadas con polietilenglicol (Vandertol-Vanier y cols., 2002). En todos los casos la actividad catalítica disminuye a medida que la concentración de cosolvente aumenta en el medio de reacción. Aparte del efecto desnaturalizante de los disolventes orgánicos, una característica importante de las lacasas es el hecho de que el sitio de unión del sustrato reductor está muy cerca de la superficie (a menos de 6 Å) y es por tanto fácilmente accesible por el solvente, lo cual puede ser un factor crítico en la catálisis efectiva en presencia de solventes miscibles con agua (Rodakiewicz-Nowak y cols., 2000; Bogdanovskaya y cols., 2002).

A pesar de la baja actividad y estabilidad de la lacasa en cosolventes, muchas de sus aplicaciones se llevan a cabo en disolventes orgánicos que ayudan a solubilizar los sustratos hidrofóbicos sobre los que actúan. En efecto, la mayoría de estos sustratos requieren de la presencia de disolventes orgánicos, ya que sus valores de  $K_m$  -en el orden de mM- superan el límite de su solubilidad en agua (Cantarella y cols., 2003; Wong y cols., 2004). Así, las lacasas en disolventes pueden ser necesarias en las transformaciones de materiales ligno-celulósicos y compuestos derivados (Rodakiewicz-Nowak, 2000; Robles y cols., 2002), en la oxidación de xenobióticos (Alcalde y cols., 2002), en la oxidación de hormonas esteroideas o en las polimerizaciones enzimáticas para la síntesis de resinas fenólicas (poli- $\alpha$ -naftol, poli-pirogalol y poli-catecol) (Aktas y cols., 2000; Kurisawa y cols., 2003; Intra y cols., 2005).

#### 1.4.2. DISEÑO DE ENZIMAS RESISTENTES A DISOLVENTES MEDIANTE EVOLUCIÓN DE LABORATORIO

La evolución molecular dirigida ha demostrado ser en los últimos años una herramienta muy útil para el diseño de enzimas resistentes a disolventes orgánicos. Los ejemplos más destacados se resumen a continuación.

- Mediante sucesivos ciclos de mutagénesis aleatoria se obtuvo un mutante de la subtilisina E con actividades mejoradas en ausencia y presencia de dimetilformamida. La actividad de dicha variante en dimetilformamida 60% (v/v) fue 256 veces mayor que la de la enzima nativa (Chen y Arnold, 1993).



- Empleando mutagénesis aleatoria e *in vivo* DNA *shuffling* se diseñaron varias *p*-nitrofenil esterasas con una actividad en dimetilformamida 30% (v/v) similar a la de la enzima nativa en solución acuosa. Estas mutaciones y recombinaciones también consiguieron aumentar el nivel de expresión haciendo que la actividad total fuera mejorada 50-60 veces (Moore y Arnold, 1996).
- En un primer ciclo de mutagénesis aleatoria se aislaron tres mutantes de una cloroperoxidasa con una actividad y estabilidad mejorada en microemulsiones de solventes ternarios compuestas por tolueno, isopropanol y agua (Rai y cols., 2001).
- Tras varios ciclos de PCR propensa a error y DNA *shuffling* se creó una fosfolipasa A<sub>1</sub> más activa y estable en 50% (v/v) de dimetilsulfóxido. A pesar de que el *screening* se realizó en dimetilsulfóxido, las propiedades de la variante ensayadas en otros disolventes orgánicos también dieron muy buenos resultados (Song y Rhee, 2001).
- La citocromo P450 monooxigenasa BM-3 fue evolucionada para mejorar su actividad en tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido. Tras dos generaciones de mutagénesis aleatoria y saturada se obtuvieron actividades 10 veces superiores en tetrahidrofurano 2% (v/v) y 6 veces superiores en dimetilsulfóxido 25% (v/v). Además, cuando estos mutantes se probaron en presencia de otros disolventes, los resultados también fueron prometedores. Así pues, la evolución para la resistencia a tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido permitió mejoras simultáneas en múltiples cosolventes (Wong y cols., 2004a).
- La evolución de la fructosa-bisfosfato aldolasa hacia su termoestabilidad mediante diferentes ciclos de DNA *shuffling*, generó paralelamente un mutante con estabilidad en disolventes orgánicos tanto polares como apolares. Anteriormente ya se había demostrado que la mejora en la termoestabilidad podía estar acompañada de una mayor tolerancia a los disolventes orgánicos (Hao y Berry, 2004).



## **2. OBJETIVOS**



Una lacasa “adaptada” a medios orgánicos puede resultar de gran utilidad en la oxidación de diversos compuestos hidrofóbicos. Por este motivo, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue la evolución molecular dirigida de la lacasa fúngica de *Myceliophthora thermophila* variante T2 (MtLT2) expresada en *Saccharomyces cerevisiae* hacia una mayor actividad y estabilidad en presencia de disolventes orgánicos. Para ello se hizo necesario llevar a cabo las siguientes tareas:

- Diseño y validación de un método de *high-throughput screening* que permitiese la exploración de librerías con un elevado número de variantes de forma rápida y precisa.
- Desarrollo de protocolos de generación de diversidad variados para experimentos de evolución molecular. Se prestó especial atención a la utilización de la maquinaria celular de *S. cerevisiae* para la creación de nuevas herramientas de recombinación de DNA.
- Caracterización bioquímica y espectro-electroquímica de las diferentes variantes obtenidas en el proceso evolutivo.

Como objetivo secundario de la Tesis Doctoral, se planteó el estudio *semi-racional* de residuos involucrados *a priori* en el valor de potencial redox de las lacasas fúngicas. Con este fin, la Ser510 y el ligando axial Leu513 fueron analizados en primer lugar mediante mutagénesis saturada combinatorial. La mejor variante de este proceso fue caracterizada y empleada como parental para la construcción y exploración de nuevas bibliotecas genéticas en los residuos del tripéptido altamente conservado <sub>509</sub>VSG<sub>511</sub> y la tapadera C-terminal <sub>556</sub>DSGL<sub>559</sub>.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>3.1. REACTIVOS, KITS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y ENZIMAS COMERCIALES .....</b>	<b>43</b>
<b>3.2. MICROORGANISMOS .....</b>	<b>44</b>
<b>3.3. VECTOR PLASMÍDICO.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4. GEN PARENTAL DE LACASA (M<sub>1</sub>LT<sub>2</sub>).....</b>	<b>45</b>
<b>3.5. LACASAS .....</b>	<b>45</b>
<b>3.6. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.....</b>	<b>46</b>
3.6.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i> .....	46
3.6.2. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i> .....	47
<b>3.7. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS.....</b>	<b>49</b>
<b>3.8. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....</b>	<b>50</b>
3.8.1. Linearización del vector pJRoC30.....	50
3.8.2. Determinación de la concentración de DNA.....	50
3.8.3. Electroforesis analítica y semipreparativa en geles de agarosa .....	50
3.8.4. Oligonucleótidos .....	51
3.8.5. Secuenciación de DNA.....	52
<b>3.9. PRODUCCIÓN DE LAS LACASAS.....</b>	<b>52</b>
3.9.1. Expresión de las lacasas en <i>S. cerevisiae</i> .....	52
3.9.2. Purificación de lacasas .....	52
<b>3.10. DESARROLLO DEL ENSAYO DE <i>HIGH-THROUGHPUT</i> (HTP) SCREENING EN PRESENCIA DE DISOLVENTES ORGÁNICOS .....</b>	<b>53</b>
3.10.1. Inmovilización de la lacasa y generación del radical catiónico ABTS <sup>•+</sup> .....	53
3.10.2. Estabilidad del ABTS <sup>•+</sup> en disolventes orgánicos .....	54
3.10.3. Protocolo de HTP- <i>screening</i> en disolventes orgánicos.....	54
3.10.3.1 Transformación de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	54
3.10.3.2 Preparación de las librerías para el HTP- <i>screening</i> en disolventes orgánicos mediante ensayo de punto final .....	54
<b>3.11. EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE LACASAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS .....</b>	<b>58</b>
3.11.1. Ajuste de las condiciones de PCR propensa a error.....	58
3.11.2. Primera generación: PCR mutagénica con Mutazima .....	59



3.11.3. Segunda generación: creación de dos genotecas mutagénicas independientes con las polimerasas Mutazima y <i>Taq</i> .....	59
3.11.4. Tercera generación: <i>in vivo</i> DNA <i>shuffling</i> de los mejores mutantes de la segunda generación previamente mutagenizados .....	60
3.11.5. Cuarta generación: recombinación por ensamblaje <i>in vivo</i> de genotecas mutagénicas con diferente espectro mutacional.....	60
3.11.6. Quinta generación: Mutagénesis Dirigida y Saturada.....	61
<b>3.12. DISEÑO “SEMI-RACIONAL” DE LACASAS: MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL .....</b>	<b>61</b>
3.12.1. Mutagénesis saturada combinatorial sobre las posiciones 510 y 513.....	62
3.12.2. Mutagénesis saturada combinatorial sobre el tripéptido conservado <sup>509</sup> VSG <sub>511</sub> .....	62
3.12.3. Mutagénesis saturada combinatorial de los residuos Gly558 y Leu559.....	62
3.12.4. Mutagénesis saturada combinatorial de cuatro posiciones de la tapa C-terminal ( <sup>556</sup> DSGL <sub>559</sub> ).....	63
<b>3.13. ENSAYOS BIOQUÍMICOS Y CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS LACASAS PURIFICADAS .....</b>	<b>63</b>
3.13.1. Determinación de los parámetros cinéticos .....	63
3.13.2. Medida de la actividad en disolventes orgánicos.....	63
3.13.3. Medida de la estabilidad de las lacasas en diferentes disolventes orgánicos.....	64
3.13.4. Medida de la estabilidad térmica.....	64
3.13.5. Ensayos de actividad a diferentes pHs .....	64
3.13.6. Oxidación de antraceno.....	65
3.13.7. Espectros UV/Vis de los Cu T1 y T3 de las lacasas .....	65
3.13.8. Desglicosilación.....	65
3.13.9. Medidas de la actividad de reducción del O <sub>2</sub> .....	666
<b>3.14. CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA.....</b>	<b>66</b>
3.14.1. Análisis por EPR de los sitios de Cu T1 y T2.....	66
3.14.2. Potencial redox.....	66
3.14.2.1 Estudios espectro-electroquímicos .....	677
3.14.2.2 Voltamperometrías cíclicas .....	67
<b>3.15. MODELADO ESTRUCTURAL DE LACASAS.....</b>	<b>68</b>



### 3.1. REACTIVOS, KITS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y ENZIMAS COMERCIALES

**Tabla 3.1.** Reactivos químicos y Kits de biología molecular.

<b>Nombre</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>Referencia</b>
Agarosa, biología molecular	Bio-Rad (España)	161-3101
Agarosa, bajo punto de fusión	Bio-Rad	161-3112
30% Acrilamida/Bis	Bio-Rad	161-0158
Bacto Triptona	Difco (EEUU)	211705
Bacto Peptona	Difco	211677
Extracto de levadura	Difco	212750
Bacto agar	Difco	214010
Marcador masa molecular DNA, GeneRuler 1kb DNA ladder	Fermentas (Canada)	SM 0311
DMP (2,6-dimetoxifenol)	Fluka (España)	38772
<i>Coomasie Brilliant Blue R250</i>	Fluka	27816
Antraceno	Fluka	10590
9,10-Antraquinona	Fluka	84696
Marcadores de masa molecular de proteínas	Novagen (EEUU)	69079
<i>QIAprep spin miniprep</i>	QIAGEN (Reino Unido)	27104
Sepabeads FP-EP	Resindion SRL (Italia)	SS IP 11/86
ABTS (2,2'azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato))	Sigma (España)	A-1888
Mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs)	Sigma	D-7295
Bromuro de etidio, biología molecular	Sigma	E7637-1G
<i>Yeast Transformation Kit</i>	Sigma	YEAST-1
<i>Yeast Nitrogen Base (YNB)</i>	Sigma	291940
Complemento de aminoácidos sin uracilo	Sigma	Y-1501
Cloranfenicol	Sigma	C-0378
Ampicilina	Sigma	A-9518
D-(+)-Glucosa	Sigma	G-5767
D-(+)-Galactosa	Sigma	G-0750
D-(+)-Rafinosa pentahidrato	Sigma	R-0250
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma	A-4378
<i>Zymoprep, Yeast Plasmid Miniprep</i>	Zymo Research (EEUU)	D2001
<i>Zymoclean Gel DNA Recovery Kit</i>	Zymo Research	D4001
<i>DNA clean and concentrator TM-5</i>	Zymo Research	D4003

**Tabla 3.2.** Enzimas comerciales.

Nombre	Casa Comercial	Referencia
Enzima de restricción <i>Bam</i> H I	New England Biolab (Reino Unido)	R01365
Enzima de restricción Xho I	New England Biolab	R01465
<i>Taq</i> polimerasa	Sigma	D-4545
<i>Genemorph random mutagenesis kit</i> (Mutazyme™)	Stratagene (EEUU)	600550
<i>PfuUltra High-Fidelity</i> DNA polimerasa	Stratagene	600380
PNGase F	Sigma	P-7367

### 3.2. MICROORGANISMOS

- ***Saccharomyces cerevisiae* cepa BJ5465** (ATCC 208289, LGC Promochem, España). Genotipo: MAT $\alpha$  *ura3-52 trp1 leu2-delta1 his3-delta200 pep4::HIS3 prb1-delta1.6R can1*. Cepa deficiente en proteasas, adecuada generalmente para la expresión y secreción de proteínas heterólogas (Parekh y cols., 1995). Se utilizó como huésped para la expresión de genes evolucionados artificialmente de la lacasa de *Myceliophthora thermophila*, variante T2 (MtLT2), clonados en el plásmido pJRoC30 (Bulter y cols., 2003).
- ***Escherichia coli* cepa XL2-blue** (Stratagene, EEUU). Genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZAM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]*. Células ultracompetentes con una eficiencia de transformación superior a  $5 \times 10^9$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA. Esta cepa se empleó para purificar y producir con mayor rendimiento los genes de lacasas mutadas/recombinadas durante el proceso de evolución molecular.

### 3.3. VECTOR PLASMÍDICO

- **pJRoC30** (Novogen, EEUU). Vector episómico bifuncional de 10477 pb (12337 pb incluyendo el gen de la lacasa MtLT2). pJRoC30 contiene el promotor GAL1 (inducible por galactosa), el gen de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli* y el gen URA3 que confiere auxotrofia para uracilo (las células de *S. cerevisiae* crecidas con este vector pueden cultivarse en medio selectivo -sin uracilo-) (**Figura 3.1**).

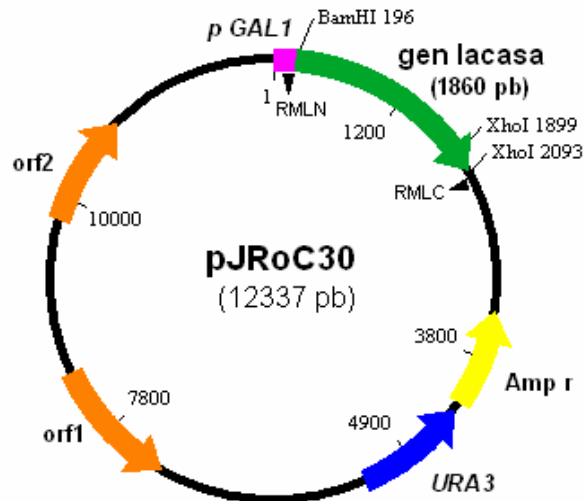


Figura 3.1. Plásmido pJRoC30.

### 3.4. GEN PARENTAL DE LACASA (MtLT2)

El gen parental empleado para el desarrollo de esta Tesis Doctoral corresponde a la lacasa de *Myceliophthora thermophila* mutante T2 (MtLT2), que fue diseñado por evolución dirigida en estudios previos llevados a cabo en el *California Institute of Technology* (CALTECH), para una expresión funcional en *S. cerevisiae* (Bulter y cols., 2003; Bulter y Alcalde, 2003). MtLT2 contiene 14 mutaciones introducidas durante 10 ciclos de evolución dirigida, lo que le confiere niveles de expresión apropiados para la ingeniería de la lacasa frente a diversas aplicaciones. MtLT2 posee varias secuencias que flanquean el gen que codifica para la lacasa madura (1677 pb) y que son procesadas en diferentes estadios en el huésped eucariota: una secuencia líder o señal (66 pb), una secuencia pro-líder (75 pb), y una cola C-terminal (42 pb) (ver Figura 1.9 de Introducción) (Berka y cols., 1997; Zumárraga y cols., 2007a).

### 3.5. LACASAS

Las lacasas de *Trametes versicolor* y de *Myceliophthora thermophila* fueron donadas por Novozymes (EEUU); la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*, por la Dra. Susana Camarero (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid); la lacasa de *Trametes hirsuta*, por el Prof. Lo Gorton (Universidad de Lund, Suecia); y las lacasas de *Coriolopsis gallica* y de *Pleurotus ostreatus*, por el Prof. Vázquez-Duhalt (Universidad Nacional Autónoma de México).

### 3.6. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

#### 3.6.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA *E. coli*

- **Medio LB/amp** (Sambrook y cols., 1989). Medio para crecimiento selectivo de transformantes de *E. coli* que contienen el vector pJRoC30.

Bacto Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Ampicilina estéril (100 mg/mL) <sup>1</sup>	1 mL
Completar con agua destilada hasta	1 L

<sup>1</sup> Esterilizar por filtración.

Ajustar a pH 7.0 con NaOH. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C. Añadir la ampicilina cuando el medio se encuentre a ~ 50 °C.

Para medio sólido, añadir agar 20 g/L antes de la esterilización.

- **Solución SOB** (Sambrook y cols., 1989). Solución *stock* para transformación en *E. coli*.

Bacto Triptona	2 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	0.05 g
KCl (250 mM)	1 mL
Completar con agua destilada hasta	100 mL

Ajustar a pH 7.0 con NaOH. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C.

Puede prepararse y almacenarse a 4 °C durante largos períodos de tiempo.

- **Medio SOC** <sup>1</sup> (Sambrook y cols., 1989). Solución de trabajo para transformación en *E. coli*.

Medio SOB	5 mL
MgCl <sub>2</sub> estéril (2 M) <sup>2</sup>	25 µL
Glucosa (20% p/v) <sup>2</sup>	100 µL

<sup>1</sup> Preparar nuevo para cada transformación.

<sup>2</sup> Esterilizar por filtración.

### 3.6.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA *S. cerevisiae*

- **Medio YP (1.55x)**

Peptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
Completar con agua destilada hasta	650 mL

Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C.

Una vez preparado, mantener el medio en oscuridad (sensible a la luz) a 4 °C.

- **Medio YPD.** Crecimiento general de levaduras.

Peptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
Glucosa (20%) <sup>1</sup>	100 mL
Cloranfenicol (25 mg/mL) en etanol <sup>1</sup>	1 mL
Completar con agua destilada hasta	1 L

<sup>1</sup> Esterilizar por filtración.

Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C la peptona y el extracto de levadura disueltos en agua. Añadir la glucosa y el antibiótico cuando el medio se encuentre a ~ 50 °C.

Para medio sólido, añadir agar 20 g/L antes de la esterilización.

Una vez preparado, mantener el medio en oscuridad (sensible a la luz) a 4 °C.

- **Medio Mínimo (líquido).** Medio selectivo sin uracilo para el crecimiento de transformantes que contienen el vector pJRoC30.

Medio YNB (67 g/L) <sup>1</sup>	100 mL
Complemento de aminoácidos (10x) <sup>1</sup>	100 mL
Rafinosa (20% p/v) <sup>2</sup>	100 mL
Cloranfenicol (25 mg/mL) en etanol <sup>3</sup>	1 mL
Completar con agua destilada estéril hasta	1 L

<sup>1</sup> YNB: *Yeast Nitrogen Base* y Complemento de aminoácidos sin uracilo. Esterilizar por filtración.

<sup>2</sup> Esterilizar por filtración. Mantener a temperatura ambiente (precipita en frío).

<sup>3</sup> Esterilizar por filtración.

Una vez preparado, mantener el medio en oscuridad (sensible a la luz) a 4 °C.

- **Medio Mínimo sólido (para placas SC drop-out)**

Bacto agar	20 g
Medio YNB (67 g/L) <sup>1</sup>	100 mL
Complemento de aminoácidos (10x) <sup>1</sup>	100 mL
Glucosa (20% p/v) <sup>1</sup>	100 mL
Cloranfenicol (25 mg/mL) en etanol <sup>1</sup>	1 mL
Completar con agua destilada hasta	1 L

<sup>1</sup> Esterilizar por filtración.

Preparar el agar disuelto en agua para la esterilización en autoclave durante 15 min a 121 °C. Añadir el resto de los ingredientes cuando el medio se encuentre a ~ 50 °C.

- **Medio de expresión.** Medio para la expresión de lacasa en *S. cerevisiae* en microplacas de 96 pocillos.

Medio YP (1.55x) <sup>1</sup>	720 mL
Tampón KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M, pH 6.0) <sup>1</sup>	67 mL
CuSO <sub>4</sub> (1 M) <sup>1,2</sup>	11.1 µL
Galactosa (20% p/v) <sup>1</sup>	110 mL
Cloranfenicol (25 mg/mL) en etanol <sup>1</sup>	1 mL
Completar con agua destilada estéril hasta	1 L

<sup>1</sup> Esterilizar por filtración.

<sup>2</sup> Para la producción de lacasa a mayor escala (litros), se utilizó una concentración final de CuSO<sub>4</sub> de 5.6 mM (5.6 mL de CuSO<sub>4</sub> 1 M por litro de medio de cultivo).

- **Medio mínimo en fase sólida para la expresión y detección de lacasa.** Medio mínimo con galactosa para la expresión de lacasa en *S. cerevisiae* (placas SC drop-out conteniendo ABTS para detectar los halos de actividad).



Bacto agar	2 g
Medio YNB (67 g/L) <sup>1</sup>	10 mL
Complemento aminoácidos (10x) <sup>1</sup>	10 µL
Galactosa (20% p/v) <sup>1</sup>	10 mL
Cloranfenicol (25 mg/mL) en etanol <sup>1</sup>	0.1 mL
CuSO <sub>4</sub> (1 M) <sup>1</sup>	1µL
ABTS (20 mM) <sup>1</sup>	1 mL
Tampón KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M, pH 6.0) <sup>1</sup>	6 mL
Completar con agua destilada estéril hasta	100 mL

<sup>1</sup> Esterilizar por filtración.

Preparar el agar disuelto en agua para la esterilización en autoclave durante 15 min a 121 °C. Añadir el resto de los ingredientes cuando el medio se encuentre a ~ 50 °C.

### 3.7. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

- La cepa silvestre de *S. cerevisiae* se sembró en placas YPD. Tras 48 h a 30 °C, se transfirieron colonias individuales a tubos de 20 mL conteniendo 3 mL de YPD. Los tubos se incubaron a 30 °C y 210 rpm (Incubador Micromagmix, Ovan). Cuando los cultivos alcanzaron densidades ópticas (DO<sub>600</sub>) entre 1 y 2, se prepararon suspensiones en glicerol estéril al 20% (v/v) y se almacenaron a -76 °C.
- Las cepas de levadura transformadas con mutantes en el plásmido pJRoc30 se crecieron en placas SC durante 2-3 días a 30 °C. Se transfirieron colonias individuales a tubos de 20 mL conteniendo 3 mL de medio mínimo. Los tubos se incubaron a 30 °C y 210 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron absorbancias entre 1 y 2, se prepararon suspensiones en glicerol estéril al 20 % (v/v) y se almacenaron a -76 °C.
- Las células *E. coli* transformadas con mutantes en el vector pJRoc30 se sembraron en placas LB/amp durante 12 h a 37 °C. Se transfirieron colonias individuales a tubos Falcon de 15 mL conteniendo 5 mL de LB/amp. Los tubos se incubaron a 37 °C y 210 rpm durante 12 h, y se prepararon las correspondientes suspensiones en glicerol estéril al 20 % (v/v) para su congelación a -76 °C.

### 3.8. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

#### 3.8.1. LINEARIZACIÓN DEL VECTOR pJRoC30

El vector pJRoC30 fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I con el fin de eliminar el gen de la lacasa y poder sustituirlo posteriormente en la transformación con los correspondientes genes mutados (**Tabla 3.3**). Con el objetivo de evitar un excesivo número de falsos positivos en la búsqueda (*screening*), para la linearización se empleó el vector pJRoC30, el cual contenía el gen nativo de la lacasa de *Myceliophthora thermophila* (MtL) y que prácticamente carece de expresión funcional en *S. cerevisiae* (Bulter y cols., 2003).

**Tabla 3.3.** Condiciones de la digestión del plásmido pJRoC30 con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I.

Componente	Cantidad
Tampón de digestión NE <i>Bam</i> HI (10x)	2 $\mu$ L
BSA (10 mg/mL)	2 $\mu$ L
Plásmido pJRoC30 conteniendo el gen MtL	4 $\mu$ g
<i>Bam</i> HI	7.5 U
<i>Xho</i> I	7.5 U
Completar con agua destilada hasta	20 $\mu$ L

La reacción se incubó a 37 °C durante 5 h y posteriormente las enzimas fueron inactivadas mediante incubación a 80 °C durante 20 min.

#### 3.8.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA

La cuantificación de la concentración de DNA se estimó espectrofotométricamente (Sambrook y cols., 1989) y mediante marcadores de masa molecular de DNA.

#### 3.8.3. ELECTROFORESIS ANALÍTICA Y SEMIPREPARATIVA EN GELES DE AGAROSA

Los geles de agarosa al 0.75% (p/v) (Sambrook y cols., 1989) fueron introducidos en celdas Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) con una fuente de alimentación Power Pac Basic (Bio-Rad). Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (2  $\mu$ g/mL) durante 15-20 min y se analizaron con el software *Quantiti one 1-D analysis* (Bio-Rad) acoplado a un transiluminador Gel Doc TM XR (Bio-Rad).

En la purificación del plásmido lineal y de los distintos productos de PCR, se prepararon electroforesis semipreparativas en geles de agarosa 0.75% (p/v) de bajo punto de fusión. Los desarrollos o carreras se llevaron a cabo a 4 °C bajo un potencial de 60 V (menos de 5 V/cm,

teniendo en cuenta la distancia entre los electrodos) durante 120 min. Las porciones de gel que contenían los fragmentos a purificar no se trataron con bromuro de etidio ni se expusieron a la luz ultravioleta. Las bandas de interés fueron detectadas a partir de la comparación con bandas analíticas -en el mismo gel- cargadas con el DNA de interés, y posteriormente extraídas y analizadas en el transiluminador para determinar la posición exacta de la banda semipreparativa correspondiente. La extracción del DNA del gel se realizó con el kit *Zymoclean, Gel DNA Recovery*.

### 3.8.4. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos fueron diseñados con el software Fast-PCR 3.5.30 (*University of Helsinki*, Finlandia) y sintetizados por Sigma-Genosys (Reino Unido).

**Tabla 3.4.** Oligonucleótidos cebadores.

Nombre	Secuencia	Sitio de unión en pJRoC30
<b>RMLN directo</b>	5' CCTCTATACTTTAACGTCAAGG 3'	pb 5'-160-181-3'
<b>RMLC inverso</b>	5' GGGAGGGCGTGAATGTAAGC 3'	pb 5'-2139-2158-3'
<b>mtlsq2 directo</b>	5' GAAGGGCACCAACCTGC 3'	pb 5'-643-659-3'
<b>mtlsq3 inverso</b>	5' GCACGTAAAAGTCGTGG 3'	pb 5'-1657-1673-3'
<b>bobf5 directo</b>	5' GTCATCGAAGCC <b><u>NNS</u></b> CGAACGCCCGGGAACACTACTGG 3'	pb 5'- 1172-1207-3'
<b>bobr5 inverso</b>	5' CCAGTAGTTCCCGGGCGTT <b><u>CGSNN</u></b> GGCTTCGATGACG 3'	pb 5'- 1172-1207-3'
<b>JAR directo</b>	5' GTCATCGAAGCC <b><u>AAC</u></b> CGAACGCCCGGGAACACTACTGG 3'	pb 5'- 1172-1207-3'
<b>JAR inverso</b>	5' CCAGTAGTTCCCGGGCGTT <b><u>CGGTT</u></b> GGCTTCGATGACG 3'	pb 5'- 1172-1207-3'
<b>3CPO directo</b>	5' ATCGCCTGGCACGTC <b><u>NNS</u></b> GGCGGC <b><u>NNS</u></b> GGCGTCGTCTACC 3'	pb 5'- 1859-1898-3'
<b>3CPO inverso</b>	5' GGTAGACGACGCC <b><u>SNN</u></b> GCCGCC <b><u>SNN</u></b> GACGTGCCAGGCGAT 3'	pb 5'- 1859-1898-3'
<b>TRIF directo</b>	5' CCACTGCCACATCGCCTGGCAC <b><u>NNSNNSNNS</u></b> GGCTTGGGCGTCGTCTACC 3'	pb 5'- 1849-1898-3'
<b>TRIR inverso</b>	5' GGTAGACGACGCCAAGCC <b><u>SNSNNSNN</u></b> GTGCCAGGCGATGTGGCAGTGG 3'	pb 5'- 1849-1898-3'
<b>BOBDIR directo</b>	5' CCAACCCCAACCCCAAGTCCGACTCG <b><u>NNSNNS</u></b> AAGCGCCGCTGGGTCGAGGAGG 3'	pb 5'- 1992-2045-3'
<b>BOBREV inverso</b>	5' CCTCCTCGACCCAGCGGCGCTT <b><u>SNSNNSN</u></b> CGAGTCGGACTTGGGGTTGGGGTTGG 3'	pb 5'- 1992-2045-3'
<b>PLUGDIR directo</b>	5' CCAACCCCAACCCCAAGTCC <b><u>NNSNNSNNSNNS</u></b> AAGCGCCGCTGGGTCGAGGAGG 3'	pb 5'- 1992-2045-3'
<b>PLUGREV inverso</b>	5' CCTCCTCGACCCAGCGGCGCTT <b><u>SNSNNSNNSNNSN</u></b> GGACTTGGGGTTGGGGTTGG 3'	pb 5'- 1992-2045-3'

Subrayados y en negrita aparecen los codones que fueron sometidos a mutagénesis saturada y/o dirigida, donde N es (A/T/G/C) y S es (G/C).

### 3.8.5. SECUENCIACIÓN DE DNA

Las secuencias de las diferentes variantes evolucionadas de MtLT2 se obtuvieron en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas del CSIC (Madrid) con un secuenciador fluorescente automático Applied Biosystems 377. Los oligonucleótidos empleados fueron: RMLN y mtlsq2 directos; mtlsq3 y RMLC inversos.

El análisis de secuencias se llevó a cabo con el programa BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999).

## 3.9. PRODUCCIÓN DE LAS LACASAS

### 3.9.1. EXPRESIÓN DE LAS LACASAS EN *S. cerevisiae*

Los clones de *S. cerevisiae* que contenían los genes de lacasas tanto del tipo nativo como de mutantes fueron cultivados en 3 mL de medio mínimo durante 48 h, a 30 °C y 250 rpm (Micromagmix shaker, Ovan). Una alícuota de este precultivo se inoculó para alcanzar una densidad óptica ( $DO_{600}$ ) de 0.25 en un volumen total de 50 mL de medio mínimo en un matraz de 500 mL con tapón poroso. Cuando se completaron dos ciclos de crecimiento ( $DO_{600} = 1$ , 6-8 h de incubación), se añadieron 450 mL de medio de expresión conteniendo  $CuSO_4$  5.6 mM y se incubó a 30 °C y 250 rpm en un matraz de 2 L de base ancha (20 cm  $\varnothing$  en la base). El cultivo se paró tras 38-42 h cuando tanto el crecimiento celular como la actividad lacasa se estacionaron ( $DO_{600}$  28-32; actividad lacasa 0.2-0.9 U/mL).

Las células se separaron por centrifugación a 4 °C durante 10 min a 3000 *g* en una centrifuga Sorvall RC-5B (Sorval Instruments, EEUU). El sobrenadante se filtró dos veces con membranas de fibra de vidrio y nitrocelulosa con un poro de 0.45  $\mu$ m, y se concentró hasta un volumen final de 20 mL en una celda de ultrafiltración con una membrana YM de 10 kDa de corte molecular (Amicon/Millipore, España).

### 3.9.2. PURIFICACIÓN DE LACASAS

Las lacasas nativa y mutantes fueron purificadas con un equipo de cromatografía líquida de proteínas FPLC (LC-500 CI, Amersham Bioscience).

El extracto crudo concentrado se sometió a una precipitación fraccionada con sulfato de amonio al 50% de saturación (p/v) a 0 °C. Tras equilibrar la muestra durante 30 min se centrifugó a 17000 *g* durante 20 min en una centrifuga Sorvall RC-5B (Sorval Instruments, EEUU).

El sobrenadante filtrado se cargó en una columna de interacción hidrofóbica HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose High Performance (Amersham Bioscience, Suecia) previamente equilibrada con una solución 1.8 M  $(NH_4)_2SO_4$  en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 6.0

(tampón P). La proteína se eluyó con un gradiente lineal de 1.8 a 0 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en 90 min a un flujo de 2 mL/min.

Las fracciones con actividad lacasa concentradas y dializadas en tampón P se cargaron en una columna (150 x 50 mm) de intercambio aniónico DEAE Sepharose CL-6B de 10 mL, preequilibrada con el mismo tampón. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0.4 M de NaCl en 90 minutos (flujo 2 mL/min).

Las fracciones con actividad lacasa se concentraron, se dializaron en tampón P y se cargaron en una columna de intercambio aniónico MonoQ 5/5 HR (Amersham Bioscience, Suecia) preequilibrada con el mismo tampón. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0.3 M de NaCl en 90 minutos (flujo 0.5 mL/min).

Las fracciones con actividad lacasa se recogieron, se concentraron, y se dializaron en tampón P hasta 1 mL en concentradores Vivaspín con un corte molecular de 10 kDa (VivaScience, Alemania, ref. VS2001). Las proteínas puras se almacenaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) con el kit de Bio-Rad en un espectrofotómetro Uvikon 930 (Kontron Instruments, Italia). La actividad enzimática se midió siguiendo la producción del radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> a 418 nm ( $\epsilon_{418} = 36000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La mezcla de reacción contenía 3 mM de ABTS en tampón acetato sódico 100 mM, pH 4.5, y lacasa. Una unidad de actividad lacasa se definió como la correspondiente a la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto. La pureza de la enzima se estimó mediante electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 8% (p/v), según el método discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970) y su posterior revelado con plata o azul Coomassie.

### **3.10. DESARROLLO DEL ENSAYO DE *HIGH-THROUGHPUT* (HTP) *SCREENING* EN PRESENCIA DE DISOLVENTES ORGÁNICOS**

#### **3.10.1. INMOVILIZACIÓN DE LA LACASA Y GENERACIÓN DEL RADICAL CATIÓNICO ABTS<sup>•+</sup>**

La lacasa MtLT2 se inmovilizó en partículas esféricas de polimetacrilato, Sepabeads FP-EP (diámetro de poro 15-30 nm, área superficial 60  $\text{m}^2/\text{g}$  seco, 110  $\mu\text{mol}$  de grupos oxirano/g húmedo) (Resindion SRL, Italia). El soporte y la enzima MtLT2 (proporción mg de proteína/g de soporte 1:1) se incubaron durante 48 h en 10 mL de tampón fosfato potásico 1.25 M, pH 10.0, en un agitador rotatorio Movil-Rod (J.P. Selecta, España). El inmovilizado fue lavado tres veces con 10 mL de tampón Britton y Robinson 10 mM, pH 6.0 (ácido bórico 0.1 M, ácido acético 0.1 M y ácido fosfórico 0.1 M, ajustando el pH con NaOH). Los grupos epóxido que no habían reaccionado se bloquearon por incubación en tampón glicina 2 M, pH 8.0, durante 24 h. El biocatalizador inmovilizado se lavó con tampón Britton y Robinson (tampón ByR), se secó bajo vacío y se almacenó a 4  $^\circ\text{C}$ .

Para la generación del radical  $ABTS^{\bullet+}$ , 5 mg de lacasa inmovilizada se incubaron en 4 mL de tampón ByR 50 mM a pH 6.0 con ABTS 3 mM. El transcurso de la reacción se siguió espectrofotométricamente. Una vez se desarrolló el color verde, indicando que el radical catiónico  $ABTS^{\bullet+}$  se había formado, se filtró la mezcla (filtro de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m) para detener la reacción y separar el radical catiónico para los siguientes estudios de estabilidad.

### 3.10.2. ESTABILIDAD DEL $ABTS^{\bullet+}$ EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

La estabilidad del radical catiónico  $ABTS^{\bullet+}$  generado por la lacasa MtLT2 inmovilizada se estudió en presencia de diferentes disolventes orgánicos. Sobre un volumen de  $ABTS^{\bullet+}$  se añadió otro volumen de acetonitrilo, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) o dioxano, y se obtuvieron sus espectros en UV/Vis en un espectrofotómetro UVIKON 930 (Kontron Instruments, Italia). Después de una hora de incubación en presencia de disolvente, se volvieron a medir los espectros de absorción de cada una de las mezclas.

### 3.10.3. PROTOCOLO DE HTP-SCREENING EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

#### 3.10.3.1 Transformación de células de *S. cerevisiae*

Las genotecas de cada ciclo evolutivo generadas mediante diferentes estrategias (ver apartado 3.11) se transformaron en células de *S. cerevisiae* (*Yeast transformation Kit*) para una expresión funcional de los correspondientes clones (Bulter y Alcalde, 2003). Se incubaron colonias aisladas de células silvestres de *S. cerevisiae* en 20 mL de medio YPD líquido a 30 °C y 210 rpm en un agitador (Edmund Bühler GmbH SM-30, Alemania) durante toda la noche ( $DO_{600} > 2$ ). Una cantidad adecuada del cultivo se inoculó en un volumen total de 120 mL de YPD atemperado para alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.3. Se incubó de nuevo durante 4-6 h, hasta completar dos ciclos de crecimiento y alcanzar una  $DO_{600}$  de 1.2. Las células se transformaron con las correspondientes genotecas en presencia del plásmido linearizado, en las proporciones descritas en el apartado 3.11, con el kit de transformación de levadura. Inmediatamente antes del choque térmico (42 °C durante 15 min), se añadió DMSO a la mezcla de transformación con una concentración final de 10% (v/v) para aumentar la eficiencia de transformación (aproximadamente 20000 clones por reacción de transformación).

#### 3.10.3.2 Preparación de las librerías para el HTP-screening en disolventes orgánicos mediante ensayo de punto final

Las células de *S. cerevisiae* transformadas con la correspondiente genoteca y el vector pJR0C30 linearizado se sembraron en placas SC y se incubaron a 30 °C. Transcurridos 3-4 días se picaron colonias individuales y se inocularon en microplacas de 96 pocillos (Sero-well, Reino Unido) que contenían 50  $\mu$ L de medio mínimo por pocillo (**Figura 3.2**). La columna completa número 6 de cada placa se inoculó con el tipo parental (columna de referencia) y uno de los

pocillos (H1) no se inoculó (control). Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 30 °C, 210 rpm y 80% de humedad relativa en un incubador con sistema de humidificación Minitron-INFORS (Biogen, España). Tras 48 h, se añadieron 160 µL de medio de expresión a cada pocillo y se volvieron a incubar a 30 °C y 210 rpm. Después de 24 h, se midió la  $DO_{600}$  para determinar la densidad celular de cada pocillo con un lector de microplacas Versa Max (Molecular Devices, EEUU). Se centrifugaron las placas (placas maestras) durante 5 min a 3200  $g$  y 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5810R (Alemania). 40 µL del sobrenadante de cada pocillo fueron transferidos desde la placa maestra a dos placas réplica (20 µL del sobrenadante en cada una) de propileno resistentes a disolventes orgánicos (Cultek, España), mediante un robot manipulador de líquidos Quadra 96-320 (Tomtec, EEUU). Ver detalles del programa en el **Anexo II**. Con estas dos placas réplica se llevaron a cabo los *screenings* de actividad y estabilidad.

El **screening de actividad inicial** se realizó añadiendo a la primera placa 180 µL de tampón ByR 100 mM, pH 6.0 con diferentes concentraciones (entre 20 y 60 % (v/v)) de cosolventes (acetonitrilo o etanol). A continuación, con la ayuda del robot (ver programa en **Anexo II**), se añadieron 20 µL de ABTS (concentración final en el pocillo, 3 mM), se agitaron las placas brevemente y se midió la absorbancia en el lector de placas a 418 nm. Las placas se incubaron a temperatura ambiente hasta que se desarrolló el color verde del radical catiónico  $ABTS^{\bullet+}$  y se midió nuevamente la absorbancia ( $\epsilon_{418} = 36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Las actividades se calcularon a partir de la diferencia de la absorbancia final e inicial dividida por las correspondientes  $DO_{600}$ . Las actividades relativas se normalizaron con la actividad del tipo parental de la correspondiente placa.

El **screening de estabilidad** se realizó con la segunda placa réplica. A los 20 µL del sobrenadante se le añadieron 180 µL de tampón ByR 100 mM, pH 6.0 con diferentes concentraciones (entre 20 y 60 % (v/v)) de cosolventes (acetonitrilo o etanol). Las placas se sellaron (sealplate tape Whatman uniseal 7704-0001, EEUU) y se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadieron 20 µL de ABTS (concentración final en el pocillo, 3 mM) y se sometieron al mismo protocolo descrito anteriormente. La actividad residual se calculó en base a las actividades iniciales correspondientes del *screening* de actividad.

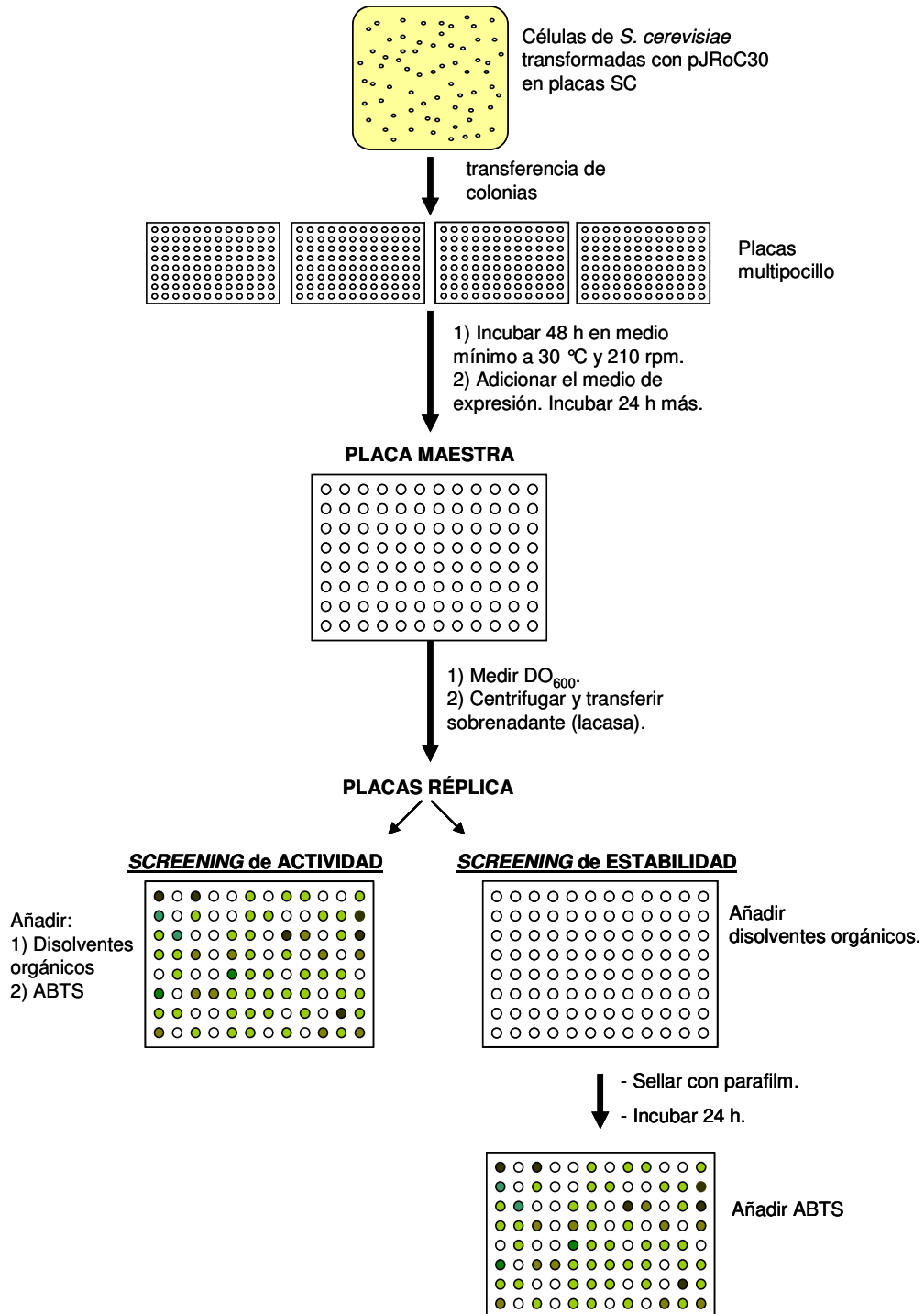
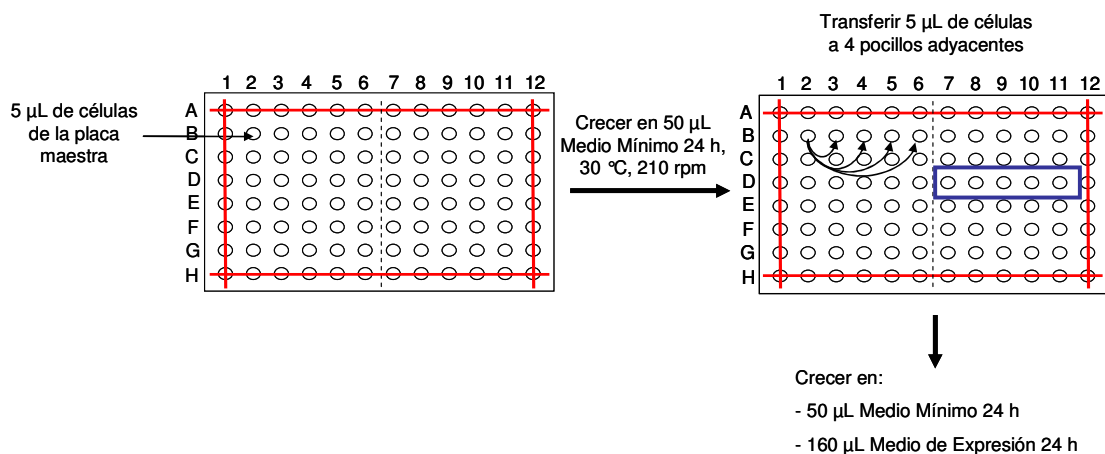


Figura 3.2. Esquema del ensayo de HPT-screening en disolventes orgánicos.



Con los mutantes seleccionados se realizaron dos *re-screenings* consecutivos:

**Primer *rescreening*:** alícuotas de 5  $\mu$ L de los clones seleccionados se inocularon en placas multipocillo con 50  $\mu$ L de medio mínimo. Las columnas y filas de los extremos de la placa (columnas 1 y 12, filas A y H) no se utilizaron. Tras 24 h de incubación a 30 °C y 210 rpm, se transfirieron 5  $\mu$ L a los pocillos adyacentes como se muestra en la **Figura 3.3**, incubándose durante 24 h más. Finalmente se adicionaron 160  $\mu$ L de medio de expresión y se incubaron durante 24 h. De esta manera cada clon fue crecido en 4 pocillos y el parental (estándar interno) se trató del mismo modo (fila D, pocillos 7-11). Las placas se sometieron al mismo protocolo de *screening*, con la salvedad de que cada valor de actividad procedió de la media de 4 microcultivos por clon.



**Figura 3.3.** Esquema del protocolo del primer *re-screening*. El recuadro azul corresponde a los pocillos con la lacasa parental.

**Segundo *rescreening*:** alícuotas de 100  $\mu$ L de los clones más activos del primer *re-screening* se crecieron en 3 mL de medio YPD a 30 °C y 210 rpm durante 24 h. Se extrajeron los plásmidos de estos cultivos (*Zymoprep yeast plasmid miniprep* kit, Zymo Research). Como el producto de las *zymoprep* no era puro y la concentración del DNA extraído fue muy baja, se transformaron los plásmidos en células de *E. coli* supercompetentes XL-Blue2 según el protocolo correspondiente (Stratagene) y se seleccionaron en placas LB/amp. Colonias aisladas se inocularon en 5 mL de medio LB/amp y se crecieron durante toda la noche a 37 °C. Se extrajeron los plásmidos (*QIAprep spin miniprep* kit, QIAGEN). Las células de *S. cerevisiae* se transformaron con los plásmidos de los mejores mutantes así como con el correspondiente tipo parental, y el *screening* se llevó a cabo de la misma manera, con la salvedad de que cada valor de actividad procedió de la media de 5 microcultivos por clon.

### 3.11. EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE LACASAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

#### **Aspectos generales:**

La generación de diversidad mediante PCR-mutagénica se llevó a cabo en un termociclador de gradiente (Thermocycler Mycycler, Biorad, EEUU) bajo los siguientes parámetros de reacción: 95 °C durante 2 min (1 ciclo); 94 °C durante 0.45 min, 53 °C durante 0.45 min, 74 °C durante 3 min (28 ciclos); y 74 °C durante 10 min (1 ciclo). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación mutagénica fueron RMLC directo y RMLN inverso. Para promover la ligación *in vivo*, los productos de PCR se diseñaron conteniendo extensiones con una homología de 40 pb y 66 pb para los extremos digeridos con *Bam*HI y *Xho*I del vector linearizado, respectivamente.

En cada una de las generaciones, los correspondientes productos de PCR fueron concentrados (*DNA clean concentrador TM-5 kit*, Zymo Research, EEUU), cargados en un gel semipreparativo de agarosa de bajo punto de fusión y purificados con el kit *Zymoclean gel DNA recovery*. Los productos de PCR fueron posteriormente clonados *in vivo* al transformar las células de *S. cerevisiae*, tras el promotor GAL1 del vector pJRoC30 previamente linearizado con *Bam*HI y *Xho*I tal como se indica en el apartado 3.8.1.

#### **3.11.1. AJUSTE DE LAS CONDICIONES DE PCR PROPENSA A ERROR**

Para estimar el índice de mutación y evaluar los diferentes paisajes de evolución, se construyeron pequeñas genotecas de 176 clones (2 placas de 96 pocillos) empleando polimerasas con diferente espectro mutacional.

##### **a) Genotecas Mutazima:**

El índice de mutación se moduló variando la cantidad de DNA molde en la reacción de PCR. La concentración de cada uno de los reactivos, en un volumen final de 50  $\mu$ L, fue la siguiente: 370 nM oligonucleótido RMLN, 370 nM oligonucleótido RMLC, 0.8 mM dNTPs, 3 % (v/v) DMSO, 0.05 U/ $\mu$ L Mutazima DNA polimerasa (Genemorph Random Mutagenesis kit, Stratagene), 4 ng/ $\mu$ L y 13 ng/ $\mu$ L de gen de lacasa molde para las genotecas de bajo índice de mutación y 4 pg/ $\mu$ L de gen de lacasa molde para las de alto índice de mutación. Los parámetros de la PCR fueron, en todos los casos, los descritos en los aspectos generales del apartado 3.11.

##### **b) Genotecas *Taq* polimerasa/MnCl<sub>2</sub>:**

En este caso, la tasa de mutación se controló variando la concentración de MnCl<sub>2</sub>. Adicionalmente también se analizó el efecto de concentraciones equilibradas/desequilibradas de dNTPs y de la concentración del DNA molde en la reacción de PCR mutagénica (**Tabla 3.5**).

**Tabla 3.5.** Ajuste de las condiciones de las genotecas *Taq/MnCl<sub>2</sub>* con las diferentes variables.

Componente	TIPOS DE GENOTECAS <i>Taq/MnCl<sub>2</sub></i>		
	dNTPs desequilibrados		dNTPs equilibrados
	Concentración de DNA alta	Concentración de DNA baja	
<b>Oligonucleótidos (RMLN y RMLC)</b>	90 nM	90 nM	90 nM
<b>DNA molde</b>	1.5 ng/μL	0.1 ng/μL	0.1 ng/μL
<b>dNTPs</b>	0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 0.6 mM dCTP, 0.6 mM dTTP	0.04 mM dATP, 0.04 dGTP, 0.1 mM dCTP, 0.1 mM dTTP	0.3 mM (0.075 mM de cada uno )
<b>DMSO</b>	3% (v/v)	3% (v/v)	3% (v/v)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0.75 mg/mL	1.5 mg/mL	1.5 mg/mL
<b>Taq polimerasa</b>	0.05 U/μL	0.05 U/μL	0.05 U/μL
<b>MnCl<sub>2</sub><sup>1</sup></b>	0 mM / 0.05 mM / 0.1 mM / 0.2 mM	0 mM/ 0.05 mM/ 0.1 mM / 0.2 mM	0 / 0.002 mM / 0.005mM / 0.02 mM / 0.05 mM / 0.1 mM / 0.2 mM

<sup>1</sup> Para cada una de las genotecas se analizaron las diferentes concentraciones de MnCl<sub>2</sub> indicadas.

### 3.11.2. PRIMERA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA CON MUTAZIMA

Se construyó una genoteca de 1500 mutantes con el kit Genemorph (Stratagene) ajustando la tasa de mutación de la polimerasa Mutazima entre 1.1 y 3.5 mutaciones por kb (4 ng/μL de DNA M<sub>t</sub>LT2 molde).

Se mezclaron 400 ng de productos de PCR mutagénica con 100 ng de vector pJRoC30 linealizado y se transformaron en células de *S. cerevisiae* competentes con el kit de transformación de levadura.

El *screening* de punto final se desarrolló como se describe en el apartado 3.10.3.2, preparando placas independientes para valorar la actividad y la estabilidad en presencia de acetonitrilo 20% (v/v) y en presencia de etanol 30% (v/v).

### 3.11.3. SEGUNDA GENERACIÓN: CREACIÓN DE DOS GENOTECAS MUTAGÉNICAS INDEPENDIENTES CON LAS POLIMERASAS MUTAZIMA Y *Taq*

En la segunda generación se diseñaron y exploraron dos genotecas independientes, cada una de ~1500 clones, usando como parental el mejor mutante de la primera generación (variante 6C9).

Las condiciones elegidas para la construcción de la genoteca Mutazima fueron las de bajo índice de mutación (4 ng/μL de DNA parental); y en el caso de la genoteca *Taq* se

utilizaron las condiciones de genoteca con dNTPs equilibrados y en ausencia de  $MnCl_2$  tal y como se describe en la Tabla 3.5.

Las mezclas de transformación de cada una de las genotecas contenían una relación vector linealizado:productos de PCR 1:4 (100 ng de vector y 400 ng de productos de PCR).

Los *screening* de actividad y estabilidad se realizaron a una concentración final del 40% (v/v) de acetonitrilo y 50% (v/v) de etanol siguiendo el protocolo del apartado 3.10.3.2.

#### **3.11.4. TERCERA GENERACIÓN: *IN VIVO* DNA SHUFFLING DE LOS MEJORES MUTANTES DE LA SEGUNDA GENERACIÓN PREVIAMENTE MUTAGENIZADOS**

Las mejores variantes de la segunda generación (mutantes 2B10, 9F1, 17C10, 7H9 y 5B9) se tomaron como parentales y fueron sometidos a un nuevo ciclo de evolución mediante PCR mutagénica con *Taq/MnCl<sub>2</sub>*, para posteriormente recombinar estos productos mediante *in vivo* DNA shuffling, se exploraron ~1000 clones. Cada uno de los parentales fue amplificado mediante PCR propensa a error con dNTPs equilibrados y una concentración de  $MnCl_2$  de 0.005 mM tal y como se detalla en la Tabla 3.5.

Los productos mutagenizados por PCR se mezclaron en la misma proporción (400 ng totales, 80 ng de cada producto) y se transformaron conjuntamente con el vector linealizado (relación vector:producto PCR 1:4).

Los *screenings* se realizaron a una concentración final de 50% (v/v) de acetonitrilo y 50% (v/v) de etanol siguiendo el protocolo del apartado 3.10.3.2 y utilizando los parentales 2B10 (respecto a la actividad en etanol) y 5B9 (respecto a la actividad en acetonitrilo).

#### **3.11.5. CUARTA GENERACIÓN: RECOMBINACIÓN POR ENSAMBLAJE *IN VIVO* DE GENOTECAS MUTAGÉNICAS CON DIFERENTE ESPECTRO MUTACIONAL**

Se construyó una genoteca de ~1000 clones a partir del ensamblaje *in vivo* de dos experimentos de PCR propensa a error con diferente predisposición mutacional, usando como DNA molde el mejor mutante de la tercera generación (variante 3D1).

La genoteca de Mutazima se preparó según 3.11.1.a con una concentración de DNA parental de 13 ng/  $\mu$ L. La genoteca de *Taq/MnCl<sub>2</sub>* se preparó como se describe en 3.11.4.

Ambas genotecas se mezclaron en la misma proporción y se recombinaron *in vivo* tras la transformación en *S. cerevisiae* y reparación *in vivo* del vector pJRoc30 linealizado con los fragmentos mutagenizados. Se estudiaron diferentes relaciones de vector linealizado:genoteca mixta a partir de 100 ng del vector (relación vector linealizado:genoteca mixta 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 y 1:10).

Los *screenings* se desarrollaron a una concentración final del 60% (v/v) de acetonitrilo y 60% (v/v) de etanol siguiendo el protocolo del apartado 3.10.3.2.

### 3.11.6. QUINTA GENERACIÓN: MUTAGÉNESIS DIRIGIDA Y SATURADA

El mutante 2E9, mejor variante de la 4ª generación, fue sometido a mutagénesis dirigida en la posición 280 para reemplazar Ser por Asn. La introducción de dicha mutación se llevó a cabo mediante la estrategia de *In Vivo Overlap Extension* (IVOE) detallada en el apartado 3.12. Los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron: RMLN directo y JAR inverso para la primera reacción de PCR, y JAR directo y RMLC inverso para la segunda.

Posteriormente, esta posición se exploró por mutagénesis saturada, mediante IVOE, en una genoteca de ~400 clones. La mutagénesis saturada permite mutar un determinado codón explorando las 20 sustituciones aminoacídicas posibles. Los oligonucleótidos utilizados para la 1ª reacción de PCR fueron RMLN directo y bobaf5 inverso; para la 2ª reacción de PCR, los oligonucleótidos fueron bobaf5 directo y RMLC inverso.

Las mezclas de reacción de PCR para ambos casos de mutagénesis fueron las siguientes: 0.25  $\mu\text{M}$  de cada uno de los oligonucleótidos cebadores, 2 ng/ $\mu\text{L}$  del gen 2E9 molde, 0.25 mM de cada dNTP, 3% (v/v) DMSO y 0.05 U/ $\mu\text{L}$  de *PfuUltra* DNA polimerasa en un volumen total de 50  $\mu\text{L}$ .

Los parámetros de la reacción de PCR tanto para la mutagénesis dirigida como la saturada fueron los siguientes: 95 °C durante 2 min (1 ciclo); 94 °C durante 0.45 min, 55 °C durante 0.45 min, 74 °C durante 2 min (28 ciclos); y 74 °C durante 10 min (1 ciclo).

La transformación en levadura, tanto de la mutagénesis dirigida como de la saturada, se realizó mezclando 400 ng de cada uno de los productos de PCR con 100 ng de vector pJRoC30 linearizado (relación vector: productos de PCR 1:8), según el protocolo del apartado 3.10.3.1.

Los *screenings* se desarrollaron a una concentración final del 50% (v/v) de acetonitrilo o 50% (v/v) de etanol, siguiendo el protocolo del apartado 3.10.3.2.

### 3.12. DISEÑO “SEMI-RACIONAL” DE LACASAS: MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL

La mutagénesis saturada combinatorial permite explorar simultáneamente varios codones (tanto contiguos como en posiciones separadas) y analizar todas las posibles combinaciones y permutaciones de los residuos aminoacídicos de interés.

Para la aplicación de la mutagenésis saturada combinatorial en *S. cerevisiae* se diseñó una nueva técnica que denominamos *In Vivo Overlap Extension* (IVOE) (Alcalde y cols., 2006). IVOE consiste en crear dos o más productos de PCR a partir de nucleótidos degenerados en las posiciones sometidas a estudio, para posteriormente facilitar su recombinación *in vivo* durante la transformación en *S. cerevisiae*, junto con el plásmido linearizado.

### **3.12.1. MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL SOBRE LAS POSICIONES 510 Y 513**

El gen de MtLT2 fue sometido a estudios *semi-rationales* mediante la exploración de las posiciones 510 y 513 debido a la implicación en la actividad del biocatalizador (Xu y cols., 1998). Se creó una genoteca de ~1700 clones mediante mutagénesis saturada combinatorial por IVOE. La 1ª reacción de PCR se hizo con los oligonucleótidos RMLN directo y 3CPO inverso. Los oligonucleótidos para la 2ª reacción fueron 3CPO sentido y RMLC inverso. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µL conteniendo 0.25 µM de cada oligonucleótido cebador, 2 ng/µL del DNA molde parental (MtLT2), 0.25 mM de cada dNTP, 3% (v/v) de DMSO y 0.05 U/µL de *PfuUltra* DNA polimerasa (Stratagene). Los parámetros de las reacciones de PCR fueron las mismas que las descritas en el apartado 3.11.6.

Se mezclaron 200 ng de cada uno de los dos productos de PCR con 100 ng de vector pJRoC30 linearizado (relación vector:producto PCR 1:4) y se transformaron en células de levadura según el protocolo descrito anteriormente.

El *screening* se realizó tal y como se describe en el apartado 3.10.3.2 pero en ausencia de disolventes orgánicos. En su lugar se añadieron a cada pocillo 180 µL de tampón acetato 100 mM pH 4.5 conteniendo ABTS 3 mM.

### **3.12.2. MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL SOBRE EL TRIPÉPTIDO CONSERVADO<sub>509</sub>VSG<sub>511</sub>**

El mejor mutante del anterior apartado (variante 7E1) se empleó como parental para la exploración mediante mutagénesis saturada combinatorial del tripéptido altamente conservado<sub>509</sub>VSG<sub>511</sub> (Xu y cols., 1998) Los oligonucleótidos empleados para las reacciones de PCR fueron: RMLN directo y TRIR inverso para la primera PCR, y TRIF directo y RMLC inverso para la segunda. Las condiciones de reacción fueron las mismas que en el apartado 3.12.1, pero con el gen de la lacasa 7E1 como DNA molde parental.

Se realizó un *pre-screening* en fase sólida en placas SC con ABTS (alrededor de 20000 clones) (ver apartado 3.6.2). Las colonias transformantes que desarrollaron un halo verde debido al radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>, se seleccionaron y sometieron posteriormente al *screening* en fase líquida habitual descrito en el apartado 3.10.3.2 pero en ausencia de disolventes orgánicos.

### **3.12.3. MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL DE LOS RESIDUOS Gly558 Y Leu559**

Los residuos Gly558 y Leu559 pertenecientes a la tapa C-terminal (Hakulinen y cols., 2002; Zumárraga y cols. 2007b) fueron estudiadas adicionalmente en la variante 7E1. Las dos reacciones de PCR se llevaron a cabo en las mismas condiciones que en el apartado 3.11.6

pero con los siguientes oligonucleótidos degenerados: RMLN directo y BOBREV inverso para la primera PCR, y BOBDIR directo y RMLC inverso para la segunda.

El *screening* de la librería (3000 clones) se efectuó tal y como se detalla en el apartado 3.10.3.2 pero en ausencia de disolventes orgánicos.

#### **3.12.4. MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL DE CUATRO POSICIONES DE LA TAPA C-TERMINAL (<sup>556</sup>DSGL<sup>559</sup>)**

Los cuatro residuos que forman la tapa C-terminal (Asp556, Ser557, Gly558 y Leu559) fueron sometidos a mutagénesis saturada combinatorial por IVOE. Las condiciones de reacción de las PCR fueron las descritas en el apartado 3.11.6, usando como DNA molde parental 7E1 y los siguientes oligonucleótidos: RMLN directo y PLUGREV inverso para la primera PCR, y PLUGDIR directo y RMLC inverso para la segunda.

Se exploraron ~150000 clones mediante *pre-screening* con ABTS y el posterior *screening* de los clones seleccionados, tal como se describe en el apartado 3.12.2.

### **3.13. ENSAYOS BIOQUÍMICOS Y CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS LACASAS PURIFICADAS**

#### **3.13.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS**

Los parámetros cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_m$ ) de las enzimas nativa y mutantes se determinaron en un espectrofotómetro UVIKON 930. Se valoraron tanto sustratos no fenólicos (ABTS,  $\epsilon_{418} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Nikupaavola y cols., 1988) como fenólicos (2,6 dimetoxifenol,  $\epsilon_{469} = 26500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Wariishi y cols., 1992) en tampón acetato sódico 100 mM, pH 4.5 a 25 °C. Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante un ajuste no lineal por mínimos cuadrados del modelo de Michaelis-Menten utilizando el programa informático Sigma Plot 7.101. Cada dato experimental se obtuvo a partir de la media de tres experimentos independientes.

#### **3.13.2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD EN DISOLVENTES ORGÁNICOS**

Las actividades iniciales de las diferentes lacasas en presencia de disolventes orgánicos (acetonitrilo, etanol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida, acetona, metanol) se determinaron siguiendo en continuo (en el intervalo 0-60 s) la oxidación del ABTS en un lector de placas Versamax. Se prepararon diluciones adecuadas de las enzimas en tampón fosfato 10 mM pH 6.0, de manera que dieran una respuesta apropiada en modo cinético en el lector de microplacas. Se añadieron 192  $\mu\text{L}$  de ABTS 3 mM en tampón acetato 20 mM pH 4.5,

conteniendo diferentes porcentajes de co-disolventes (de 0 a 60% v/v) en placas de polipropileno resistentes a los disolventes usados. La reacción comenzó tras la adición de 8  $\mu$ l de la respectiva lacasa. Para cada enzima, concentración y disolvente, se hicieron al menos tres medidas independientes.

### **3.13.3. MEDIDA DE LA ESTABILIDAD DE LAS LACASAS EN DIFERENTES DISOLVENTES ORGÁNICOS**

Se prepararon diluciones de las lacasas en tampón fosfato 10 mM pH 6.0 de tal manera que alícuotas de 20  $\mu$ L permitieran valorar la actividad en el lector de microplacas en modo cinético. Se mezclaron 100  $\mu$ L de lacasa con 150  $\mu$ L de tampón fosfato 10 mM pH 6.0, con concentraciones finales de disolventes del 30, 40, 50 y 60% (v/v). A tiempos de incubación de 2 h, 24 h, 48 h y 72 h se extrajeron 20  $\mu$ L de cada uno de los ensayos con ayuda del robot Quadra96 (Tomtec, EEUU). Se mezclaron con 180  $\mu$ L de ABTS 3 mM en tampón acetato 20 mM pH 4.5, registrándose el cambio de absorbancia a 418 nm. Cada punto fue realizado, al menos, por triplicado.

La actividad residual de las lacasas se expresó como porcentaje referido a la actividad inicial de éstas en ausencia de disolventes orgánicos.

### **3.13.4. MEDIDA DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA**

El estudio de termoestabilidad se realizó con ayuda del termociclador Mycycler equipado con un formador de gradientes (Bio-Rad, EEUU), el cual permite crear gradientes de temperatura a diferentes intervalos. Se prepararon diluciones de las diferentes lacasas en tampón fosfato 10 mM pH 6.0 de tal manera que alícuotas de 10  $\mu$ L dieran una respuesta adecuada para medir la actividad en el lector de microplacas en modo cinético. Se incubaron 60  $\mu$ L de lacasa por cada punto del gradiente. El gradiente de temperatura estudiado comprendió el intervalo 30-80 °C con temperaturas intermedias de 30.0 °C, 31.7 °C, 34.8 °C, 39.3 °C, 45.3 °C, 49.9 °C, 53 °C, 55 °C, 56.8 °C, 59.9 °C, 64.3 °C, 70.3 °C, 75.0 °C, 78.1 °C y 80.0 °C. A diferentes tiempos de incubación (1 h, 2 h, 6 h y 24 h) se extrajeron alícuotas de 10  $\mu$ L de lacasa y se mezclaron con 190  $\mu$ L de de ABTS 3 mM en tampón acetato 20 mM pH 4.5. La actividad se valoró en continuo (oxidación del ABTS a 418 nm). El tiempo 0 se determinó a partir de las correspondientes muestras incubadas a temperatura ambiente. Cada valor procedió de al menos tres medidas independientes.

### **3.13.5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD A DIFERENTES pHs**

Los perfiles de pH de la actividad de las diferentes lacasas purificadas se realizaron en tampón ByR 100 mM a diferentes pHs (pH 2.0-9.0, ajustados con ácido acético o NaOH). Se prepararon diluciones de las enzimas en tampón fosfato 10 mM pH 6.0 para que alícuotas de



10  $\mu$ L dieran una respuesta adecuada en la medida de actividad en el lector de microplacas en modo cinético. Las lacasas (10  $\mu$ L) se añadieron por filas y el tampón a diferentes pHs (180  $\mu$ L) por columnas. Finalmente, se añadieron 10  $\mu$ L de ABTS 60 mM y se midieron las actividades de cada una de las condiciones por triplicado.

### 3.13.6. OXIDACIÓN DE ANTRACENO

Los experimentos de oxidación de antraceno por la lacasa 2B10 (2ª generación) se realizaron en viales de vidrio en un volumen total de 500  $\mu$ L. La mezcla de reacción contenía: 20  $\mu$ M de antraceno, 1 mM de mediador ABTS y 10 U/mL de lacasa 2B10 en tampón acetato sódico 10 mM, pH 4.5 con una concentración final de 20% de acetonitrilo (v/v). Los viales se sellaron e incubaron en oscuridad a temperatura ambiente en un agitador rotatorio Movil-Rod. Paralelamente, se realizaron controles de antraceno con y sin mediador en ausencia de lacasa para analizar la posible autooxidación del PAH.

A diferentes tiempos de incubación se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ L de reacción y se analizó la degradación del antraceno mediante HPLC (bomba Varian 9012, EEUU), acoplada a un inyector automático (L-2200 Hitachi, Japón). La columna cromatográfica empleada fue una Nucleosil C-18 (150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) de fase reversa (Análisis Vínicos, España). La temperatura de la columna se mantuvo constante en un horno (MFE-01 Análisis Vínicos, España) a 40 °C. La fase móvil estaba compuesta por acetonitrilo:agua 60:40, a un flujo de 1 mL/min. Los compuestos se identificaron mediante un detector de fotodiodos (Varian Prostar, EEUU) en un rango de 200-400 nm, y la integración de los picos se realizó con el software Varian Star 6.41.

### 3.13.7. ESPECTROS UV/Vis DE LOS Cu T1 Y T3 DE LAS LACASAS

Los espectros de absorción de las diferentes lacasas se realizaron un espectrofotómetro UVIKON 930. Se midió la absorbancia de las lacasas puras en el intervalo 200-800 nm.

### 3.13.8. DESGLICOSILACIÓN

Las proteínas purificadas se desglucosilaron con la péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F) (Sigma), que hidroliza los oligosacáridos unidos a los residuos asparragina. Concretamente, 8  $\mu$ g de lacasa pura se desnaturalizaron con SDS 0.2% (p/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM a 100 °C durante 10 min. Posteriormente se añadieron 2.5 Unidades de PNGasa F y la mezcla de reacción se incubó toda la noche a 37 °C. La reacción se paró a 100 °C durante 10 min. Los productos se analizaron en un gel de electroforesis (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie.

### 3.13.9. MEDIDAS DE LA ACTIVIDAD DE REDUCCIÓN DEL O<sub>2</sub>

La actividad de reducción de O<sub>2</sub> de las diferentes lacasas se realizó en colaboración con el Dr. Antonio López-Lacey y la Lda. Cristina Vaz del ICP, CSIC. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas (cuadrupolo Masstorr 200 DX, VG Quadrupoles Ltd.) con ABTS 3 mM como donador de electrones en tampón acetato 10 mM pH 4.5, a 27 °C. La celda de medida tenía un volumen de 10 mL y estaba separada del espectrómetro de masas por una membrana de teflón a través de la cual los gases difunden desde la solución. La respuesta del espectrómetro a determinados valores de masa es proporcional a la presión parcial del gas en la solución de la celda. El consumo de O<sub>2</sub> se midió a una masa 16. La calibración se realizó con la solución saturada con O<sub>2</sub> puro y la señal base se estimó con la solución purgada con Argón puro. El consumo de O<sub>2</sub> por parte del espectrómetro de masas (medido en ausencia de lacasa para cada concentración de O<sub>2</sub>) se sustrajo de las medidas de actividad, en las cuales se añadieron 5-25 µg de lacasa.

## 3.14. CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA

### 3.14.1. ANÁLISIS POR EPR DE LOS SITIOS DE Cu T1 Y T2

Los estudios de EPR (*Electronic Paramagnetic Resonance*) de las diferentes variantes se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. Arturo Martínez-Arias del Instituto de Catálisis (CSIC). Se utilizó un equipo Bruker ER200D (Alemania) que opera en la banda X ( $\nu \approx 9.6$  GHz) y usando un patrón de DPPH (difeníl-pyrcil-hidrazilo) (en una cavidad rectangular doble) para la calibración de la frecuencia. Las lacasas purificadas se introdujeron en una celda espectroscópica de cuarzo. Los espectros se realizaron a 77 K y a una potencia de la radiación microondas de 19.5 miliwatt (en experimentos independientes no se observó saturación de las señales en esas condiciones), a 100 kHz de frecuencia de modulación, 2 G de amplitud de modulación, una constante de tiempo de 40 ms, y  $1 \times 10^5$  de ganancia. La determinación de los parámetros EPR más relevantes de las especies Cu(II) detectadas se realizó mediante simulación por ordenador.

### 3.14.2. POTENCIAL REDOX

Todos los análisis espectro-electroquímicos se realizaron en colaboración con el Dr. Sergey Shleev, de la Universidad de Lund (Suecia).

El K<sub>4</sub>[Mo(CN)<sub>8</sub>] fue sintetizado y purificado de acuerdo al método publicado previamente (Gercog y cols., 1985). Los mediadores K<sub>4</sub>[W(CN)<sub>8</sub>] y K<sub>4</sub>[Os(CN)<sub>6</sub>] fueron amablemente donados por el Prof. Kenji Kano (Universidad de Kioto, Japón).

### 3.14.2.1 Estudios espectro-electroquímicos

La espectroelectroquímica de los diferentes mutantes de MtLT2 se llevó a cabo usando una celda micro-espectroelectroquímica cuyo electrodo de trabajo es un capilar de oro. La celda se diseñó siguiendo el procedimiento descrito por Larsson (Larsson y cols., 2001). El potencial del capilar de Au se controló con un potenciostato BAS LC-3E (Bioanalytical Systems, EEUU) de 3 electrodos: un electrodo de referencia Ag | AgCl | KCl, un contra-electrodo platino, y el electrodo de trabajo. Los espectros de absorbancia se monitorizaron con un espectrofotómetro de fibra óptica PC2000-UV-VIS (Ocean Optics, EEUU) con un rango efectivo de medida entre 200 y 1100 nm. Se hizo un tratamiento previo del electrodo de trabajo (capilar de oro) que consistió en lavar la celda capilar con una mezcla peróxido de hidrógeno:ácido sulfúrico (1:3) seguido de un enjuague con agua bidestilada.

El potencial redox de los sitios Cu T1 de la enzima se determinó por valoración redox espectroelectroquímica mediada (*Mediated Redox Titration*, MRT) usando el dispositivo espectroelectroquímico ya mencionado (Larsson y cols., 2001). Las MRTs se desarrollaron de acuerdo a la metodología publicada previamente (Christenson y cols., 2006) utilizando un sistema medidor complejo que contiene cuatro mediadores diferentes ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ,  $K_4[W(CN)_6]$ ,  $K_4[Os(CN)_6]$ , y  $K_4[Mo(CN)_6]$  con unos potenciales redox de 430 mV, 520 mV, 640 mV y 780 mV vs. ENH respectivamente).

### 3.14.2.2 Voltamperometrías cíclicas

Los voltamogramas cíclicos de las distintas lacasas se realizaron en un potenciostato CV-50W (BAS) de tres electrodos: el electrodo de trabajo consistió en electrodos modificados con lacasa; el electrodo de referencia fue  $Hg_2 | Hg_2Cl_2 | KCl_{sat}$  (*Saturated Calomel Electrode* SCE, 242 mV vs. ENH) y el contra-electrodo un hilo de Pt. Los electrolitos soporte fueron tampones citrato-fosfato 0.1 M con pHs 4.0 y 7.0.

Los electrodos de trabajo fueron electrodos de grafito espectrográficos (*Spectroscopic Graphite Electrodes*, SPGE) modificados con lacasas. La superficie de los SPGE tipo RW001, diámetro 3.05 mm, 13% porosidad (Ringsdorff Werke GmbH, Alemania) se preparó mediante pulido en un papel “*wet fine emery*” (Tufback Durite, P1200). Posteriormente se enjuagó con agua MilliQ y se dejó secar. Una vez pulido el electrodo, se depositó un volumen de 10  $\mu$ L de la lacasa correspondiente sobre la superficie del electrodo y se dejó adsorber. Transcurridos 15 min el electrodo se enjuagó de nuevo con agua.

### 3.15. MODELADO ESTRUCTURAL DE LACASAS

Los modelos estructurales de los diferentes mutantes se realizaron en colaboración con el Dr. Julio Polaina del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). Los modelos se obtuvieron a partir de un estudio de homologías con estructuras conocidas (Protein Data Bank). La proteína más similar a MtLT2 es la lacasa de *Melanocarpus albomyces* (PDB id: 1GW0) (Hakulinen y cols., 2002), con la que comparte un 75% de identidad de secuencia. El alineamiento de secuencias basado en la estructura de ambas proteínas se llevó a cabo con GenTHREADER (McGuffin y cols., 2004). Este alineamiento se utilizó para obtener un modelo del servidor de modelado de proteínas Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>), el cual fue analizado con el programa DeepView/Swiss-Pdb Viewer (Guex y Peitsch, 1997).

## **4. RESULTADOS**

<b>4.1. EVOLUCIÓN DIRIGIDA EN DISOLVENTES ORGÁNICOS.....</b>	<b>71</b>
4.1.1. Preparación de un método de <i>screening</i> en disolventes orgánicos.....	71
4.1.1.1 Elección del sustrato .....	71
4.1.1.2 Ajuste de las condiciones iniciales del <i>screening</i> .....	72
4.1.2. Ajuste de las condiciones de las PCR mutagénicas .....	76
4.1.3. Ciclos evolutivos en cosolventes .....	78
4.1.3.1 Primera generación: PCR mutagénica con Mutazima .....	78
4.1.3.2 Segunda generación: creación de dos genotecas mutagénicas independientes con las polimerasas Mutazima y <i>Taq</i> .....	79
4.1.3.3 Tercera generación: <i>in vivo</i> DNA <i>shuffling</i> de los genes parentales previamente mutagenizados .....	81
4.1.3.4 Cuarta generación: recombinación por ensamblaje <i>in vivo</i> de genotecas con diferente espectro mutacional .....	83
4.1.3.5 Quinta generación: mutagénesis dirigida y saturada.....	84
<b>4.2. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS MUTANTES .....</b>	<b>85</b>
4.2.1. Expresión de las lacasas en <i>S. cerevisiae</i> .....	85
4.2.2. Purificación de las lacasas .....	86
<b>4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS LACASAS PURIFICADAS.....</b>	<b>89</b>
4.3.1. Estudio de los mutantes en cosolventes .....	89
4.3.1.1 Estudio comparativo de los mutantes .....	89
4.3.1.2 Tolerancia del mutante final R2 a diferentes cosolventes y comparación de su comportamiento con otras lacasas fúngicas. ....	92
4.3.2. Caracterización bioquímica .....	93
4.3.2.1 Evaluación de la glicosilación.....	93
4.3.2.2 Perfiles de termoestabilidad y pH óptimo.....	95
4.3.3. Caracterización espectro-electroquímica .....	96
4.3.3.1 Determinación de los potenciales redox en los sitios T1 y T2/T3.....	96
4.3.3.2 Estudio de la geometría y entorno químico de los cobres T1 y T2.....	99
<b>4.4. TEST DE OXIDACIÓN DEL ANTRACENO .....</b>	<b>100</b>
<b>4.5. ESTUDIOS “SEMI-RACIONALES” .....</b>	<b>101</b>
4.5.1. Construcción de genotecas mediante IVOE.....	102
4.5.2. Tamaño de la librería y diseño del área de recombinación.....	103
4.5.3. Mutagénesis saturada combinatorial sobre los residuos 510 y 513.....	104
4.5.4. Mutagénesis saturada combinatorial sobre el tripéptido conservado <sup>509</sup> VSG <sub>511</sub> y su relación con la tapa C-terminal <sup>556</sup> DSGL <sub>559</sub> .....	106
4.5.5. Mutagénesis saturada combinatorial de los residuos G558 y L559.....	110
4.5.6. Mutagénesis saturada combinatorial de las cuatro posiciones de la tapa C-terminal ( <sup>556</sup> DSGL <sub>559</sub> ) .....	111
<b>4.6. ESTUDIO DE LA VARIANTE 7E1 .....</b>	<b>112</b>
4.6.1. Caracterización bioquímica de la variante 7E1 .....	112
4.6.2. Caracterización espectro-electroquímica de 7E1.....	114

## 4.1. EVOLUCIÓN DIRIGIDA EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

### 4.1.1. PREPARACIÓN DE UN MÉTODO DE *SCREENING* EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

#### 4.1.1.1 ELECCIÓN DEL SUSTRATO

El desarrollo de un ensayo de HTP-*screening* fiable y reproducible es un requisito indispensable para hacer evolución molecular dirigida de enzimas o para explorar genotecas (meta)genómicas. Un buen método colorimétrico o fluorimétrico debe ser sensible para la función o característica deseada y debe permitir la detección de los clones con actividad más baja durante los ciclos iniciales de la evolución *in vitro*. El ABTS (2,2'azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato) fue considerado un excelente candidato para poner a punto el método de *screening* en disolventes orgánicos debido a su bajo límite de detección y su estabilidad en soluciones acuosas. La lacasa oxida con alta afinidad el ABTS mediante la sustracción de un electrón produciendo un radical catiónico de color verde (ABTS<sup>•+</sup>;  $\epsilon_{418} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Figura 4.1).

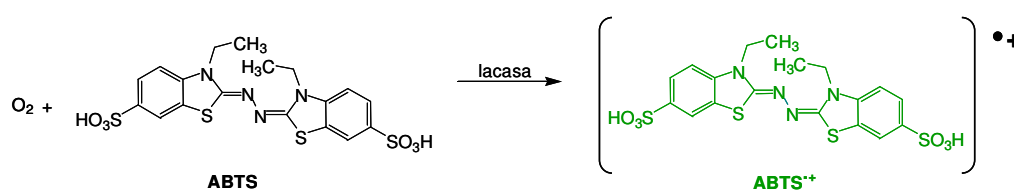
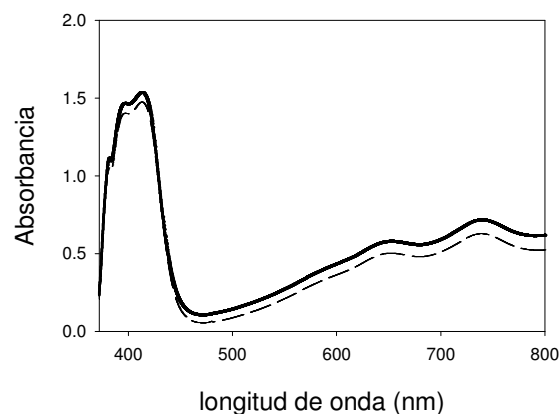


Figura 4.1. Oxidación del ABTS por la lacasa.

El límite de sensibilidad de este ensayo se sitúa alrededor de 5 nU/ml, y el producto verde de la reacción es estable durante varias horas en solución acuosa (Bulter y cols., 2003). Sin embargo, se conoce muy poco acerca del comportamiento del radical catiónico del ABTS en disolventes orgánicos. Por ello, se llevó a cabo un estudio preliminar de su estabilidad en disolventes (Alcalde y cols., 2005). En primer lugar, se generó ABTS<sup>•+</sup> empleando la lacasa MtLT2 inmovilizada en Sepabeads FP-EP para facilitar la posterior separación del biocatalizador, deteniendo así la reacción. Sobre la solución de ABTS<sup>•+</sup> se añadieron volúmenes iguales de diferentes disolventes orgánicos y se determinaron sus espectros UV/Vis (Figura 4.2). Después de una hora de incubación, no se detectaron cambios significativos en presencia de acetonitrilo, etanol o dimetilsulfóxido. Tal y como se había observado con anterioridad (Cantarella y cols., 2003), el dioxano disminuye la estabilidad del ABTS<sup>•+</sup> y por lo tanto el ensayo no es adecuado para este disolvente. También se probaron otros compuestos como sustratos para esta reacción (ácido 3-hidroxiantranílico, siringaldazina, ácido homovainilínico, 1-naftol, *o*-fenilendiamina y diaminoantraquinona). En todos los casos la absorbancia no fue lo suficientemente estable, decreciendo con el tiempo. Además se detectaron interferencias con el medio de expresión que se emplea en los microcultivos de *S. cerevisiae*. Por el contrario, el ABTS no muestra interacciones significativas ni con el medio de

expresión ni con ninguna de las proteínas secretadas por la levadura durante su crecimiento (Bulter y cols., 2003). Por todos estos motivos, se escogió dicho sustrato para llevar a cabo la evolución en disolventes.



**Figura 4.2.** Espectro del radical catiónico ABTS\*\* en presencia de acetonitrilo 50% (v/v). Línea continua: espectro obtenido inmediatamente después de añadir el acetonitrilo; línea discontinua: espectro después de una hora de incubación. El ABTS\*\* se generó por la lacasa MtLT2 inmovilizada en Sepabeads FP-EP.

#### 4.1.1.2 AJUSTE DE LAS CONDICIONES INICIALES DEL SCREENING

##### a) Concentración de disolvente en el ensayo

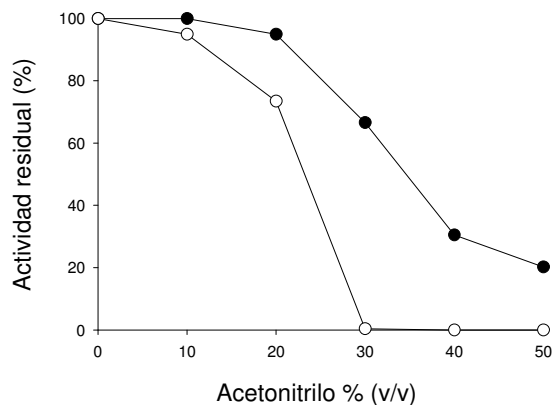
Se escogieron dos lacasas fúngicas con diferente potencial redox (la lacasa parental de este trabajo MtLT2 y la lacasa de *Trametes versicolor* como control), con el fin de establecer la concentración inicial de disolvente orgánico con la que llevar a cabo el *screening*.

Se midió la estabilidad de las lacasas bajo diferentes concentraciones de acetonitrilo (**Figura 4.3**). Ambas lacasas se comportaron de manera similar, siendo bastante estables bajo concentraciones inferiores al 20% (v/v) tras 4 horas de incubación. Sin embargo, a concentraciones superiores la estabilidad disminuyó considerablemente. La lacasa de *T. versicolor* no toleró concentraciones por encima del 30% (v/v), mientras que MtLT2 fue más estable, manteniendo cerca del 70% de la actividad inicial tras 4 horas de incubación en acetonitrilo 30% (v/v).

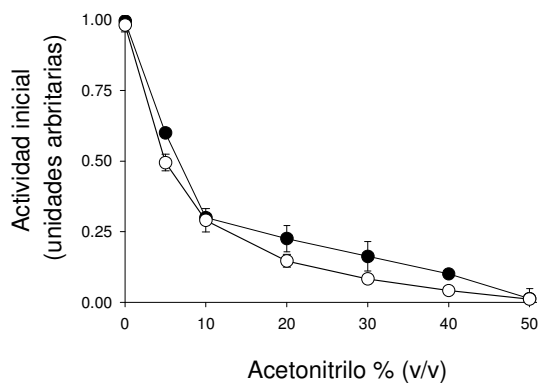
Idóneamente, las condiciones de *screening* deben asegurar que puedan medirse los pequeños aumentos esperados debido a sustituciones puntuales en la secuencia de la proteína. Esto se logra mediante el ajuste de las condiciones del ensayo hacia el punto donde la actividad de la enzima parental esté cerca del límite de detección. Por ello, se evaluaron las velocidades iniciales en acetonitrilo y en etanol, las cuales disminuyeron apreciablemente a medida que se aumentaba la proporción del cosolvente (**Figura 4.4**, resultados en acetonitrilo). En acetonitrilo 20% (v/v) o en etanol 30% (v/v), MtLT2 mantuvo aproximadamente el 20% de su



actividad en solución acuosa, dando una respuesta reproducible en la microplaca. Estas concentraciones de cosolventes fueron escogidas para comenzar el proceso evolutivo.



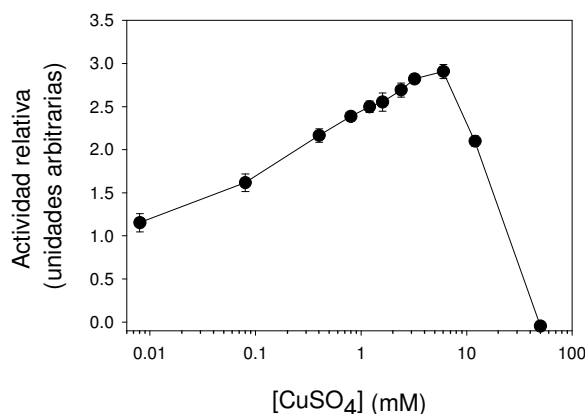
**Figura 4.3.** Estabilidad de las lacasas MtLT2 (círculos negros) y *T. versicolor* (círculos blancos) en presencia de diferentes concentraciones de acetonitrilo (v/v). El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos conteniendo las lacasas MtLT2 o de *T. versicolor* con diferentes concentraciones de acetonitrilo en tampón acetato sódico 100 mM, pH 4.5. Cada placa se preparó por duplicado, para medir las actividades a tiempo 0 y tras 4 horas de incubación. A la primera placa se le añadió ABTS (para dar una concentración final en el pocillo de 3 mM) y se cuantificó la actividad inicial. La placa réplica fue sellada e incubada a temperatura ambiente. Tras 4 horas, se le añadió ABTS 3 mM y se midió la actividad. La actividad residual fue estimada en base a la relación de la actividad a tiempo 0 y la registrada tras las 4 horas de incubación. Cada punto representa el promedio de 8 experimentos.



**Figura 4.4.** Actividad inicial de las lacasas MtLT2 (círculos negros) y de *T. versicolor* (círculos blancos) a diferentes concentraciones de acetonitrilo (v/v). Cada punto representa el promedio de 8 experimentos (8 pocillos).

### b) Optimización de las condiciones de expresión. Evaluación de la respuesta del ensayo para microcultivos

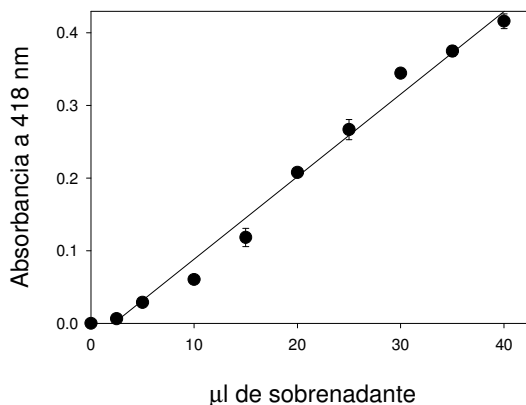
La expresión del gen M<sub>t</sub>LT2 se llevó a cabo en la cepa BJ5465 de *S. cerevisiae* (deficiente en proteasas y especialmente indicada para la secreción de proteínas heterólogas). El sistema de expresión de la lacasa es altamente dependiente de la concentración de CuSO<sub>4</sub>. Así, la concentración de Cu<sup>2+</sup> para la mayor producción de M<sub>t</sub>LT2 en microplaca se estimó alrededor de 6 mM (**Figura 4.5**). La diferencia entre la actividad secretada con CuSO<sub>4</sub> 8 μM y CuSO<sub>4</sub> 6 mM fue aproximadamente de 3 veces. A concentraciones superiores a 8 mM, el Cu<sup>2+</sup> puede ser tóxico para la célula y además a esa concentración puede inhibir la lacasa (Robles y cols., 2002). Por todo ello, se seleccionó para la expresión de M<sub>t</sub>LT2 en microplaca una concentración final de Cu<sup>2+</sup> de 10 μM. Bajo estas condiciones no hay interferencias con la respuesta generada por la oxidación del ABTS y los niveles de expresión son adecuados para un ensayo tanto en punto final como en modo continuo.



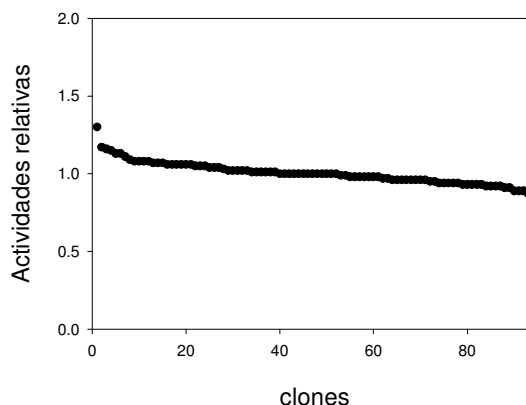
**Figura 4.5.** Actividad relativa de M<sub>t</sub>LT2 en cultivos crecidos con diferentes concentraciones de Cu<sup>2+</sup> en el medio de expresión. Las actividades se normalizaron con respecto a la actividad en ausencia de CuSO<sub>4</sub>. Las células se crecieron en placas multipocillo según el protocolo descrito en el apartado 3.10.3.2 de Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio de 5 experimentos (5 pocillos).

Se evaluó la linealidad del ensayo en función de la cantidad de lacasa requerida (**Figura 4.6**). Para ello, se emplearon diferentes volúmenes de sobrenadante (a partir de microcultivos de M<sub>t</sub>LT2) en el ensayo de oxidación de ABTS en presencia de cosolvente. El límite de detección se estimó alrededor de los 15 pg de lacasa/μL, y el ensayo fue lineal y reproducible. La validación del ensayo concluyó mediante la evaluación del coeficiente de varianza (cociente -expresado en %- entre la desviación estándar y el valor medio de los puntos sometidos a estudio) para la oxidación del ABTS en cosolventes. Para ello se preparó una microplaca que contuvo en todos sus pocillos microcultivos de M<sub>t</sub>LT2 sincronizados (todos ellos a partir de transformantes nuevos sometidos a las mismas condiciones de crecimiento y expresión). El

coeficiente de varianza del ensayo de punto final fue de 9.9% en acetonitrilo 20% (v/v) y 9.0% en etanol 30% (v/v) (**Figura 4.7**).



**Figura 4.6.** Linealidad del ensayo de *screening* con ABTS en presencia de etanol 30% (v/v). Cada punto representa el promedio de 8 experimentos (8 pocillos).



**Figura 4.7.** Validación del ensayo de *screening* con ABTS en presencia de acetonitrilo 20% (v/v). Las actividades están representadas en orden descendente. Para la expresión de la enzima se usó un medio de expresión con  $\text{CuSO}_4$  10  $\mu\text{M}$ .

Una vez ajustadas las condiciones óptimas del ensayo colorimétrico del ABTS en presencia de disolventes orgánicos a partir de M<sub>t</sub>LT2 expresada en microcultivos, se diseñaron los diferentes protocolos de *screening* de actividad y de estabilidad (apartado 3.10.3.2 de Materiales y Métodos) (Alcalde y cols., 2005). Los mejores clones seleccionados en cada generación se sometieron posteriormente a dos re-*screenings* consecutivos para descartar los posibles falsos positivos. En particular, en el segundo re-*screening* se hizo uso de transformantes nuevos con la finalidad de obtener una correcta comparación entre los distintos clones. Este segundo re-*screening* es altamente fiable ya que confiere sincronización al crecimiento celular de los mutantes.

#### 4.1.2. AJUSTE DE LAS CONDICIONES DE LAS PCR MUTAGÉNICAS

Antes de comenzar con los experimentos de evolución molecular dirigida, se ajustaron los índices de mutación de las DNA polimerasas Mutazima y *Taq* en las reacciones de mutagénesis aleatoria. Para ello se construyeron pequeñas librerías de lacasas con diferentes variables que afectaron a la frecuencia de mutación en el gen diana. Generalmente, en los experimentos de evolución *in vitro* la tasa de error es adecuada cuando el 30-40% de los mutantes de la librería contiene menos del 10% de la actividad de la enzima parental (Cirino y cols., 2003).

*A priori*, la polimerasa Mutazima introduce mutaciones con una frecuencia de error más elevada que la *Taq* ( $\sim 3.3 \times 10^{-4}$  errores por nucleótido sintetizado), obteniendo unos rendimientos de PCR mayores, bajo condiciones de reacción óptimas para la enzima (presencia de  $MgCl_2$  y nucleótidos equilibrados). Esto es debido a que la Mutazima posee una frecuencia de error intrínseca durante la amplificación del DNA que se puede ajustar fácilmente (Cline y Hogrefe, 2000). Así, para una misma reacción de PCR los moldes amplificados a partir de concentraciones bajas de DNA diana sufrirán más duplicaciones que los amplificados a partir de una mayor concentración. Por tanto, cuantas más veces la Mutazima replique el molde, más errores acumulará el gen. En resumen, los mayores índices de mutación se consiguen simplemente disminuyendo la concentración de DNA molde o mediante más ciclos de anillamiento y extensión. En nuestro caso en particular, cuando la concentración de DNA molde MtLT2 estuvo entre 4 y 13 ng/ $\mu$ L los paisajes de las librerías fueron apropiados (entre 36.8% y 47.1% de clones inactivos) (**Tabla 4.1, Figura 4.8**).

La *Taq* polimerasa, aunque carece de actividad correctora de errores *exo* 3'-5', tiene un rango de error intrínseco muy limitado (entre  $8 \times 10^{-6}$  y  $2 \times 10^{-4}$  errores por nucleótido sintetizado) dependiendo de las condiciones de reacción (Vanhercke y cols., 2005). Sin embargo, su tasa mutacional puede incrementarse deliberadamente a través de:

- La adición de  $MnCl_2$  en el tampón de reacción.
- La variación de la relación de los diferentes dNTPs.
- La alteración de la concentración inicial de DNA molde.
- El incremento de la concentración de  $MgCl_2$ .
- La introducción de más unidades de *Taq* polimerasa en la reacción.
- La ampliación del tiempo de extensión en la PCR.

Se exploraron pequeñas librerías generadas con *Taq* y Mutazima bajo diferentes condiciones de reacción. Cuando se introdujeron concentraciones desequilibradas de dNTPs en presencia de  $MnCl_2$ , el índice de mutación fue menor de lo esperado (sólo 4.6% de mutantes con menos del 10% de la actividad del tipo parental en la reacción con  $MnCl_2$  0.2 mM). Cuando se variaron las concentraciones de dNTPs,  $MgCl_2$  y se redujo la concentración de DNA molde se consiguió aumentar el índice de error. Bajo estas condiciones (ver apartado 3.11.1 de Materiales y Métodos) la frecuencia mutacional aumentó considerablemente (un 14% de los mutantes mostraron menos del 10% de la actividad de MtLT2 en ausencia de  $MnCl_2$ ).

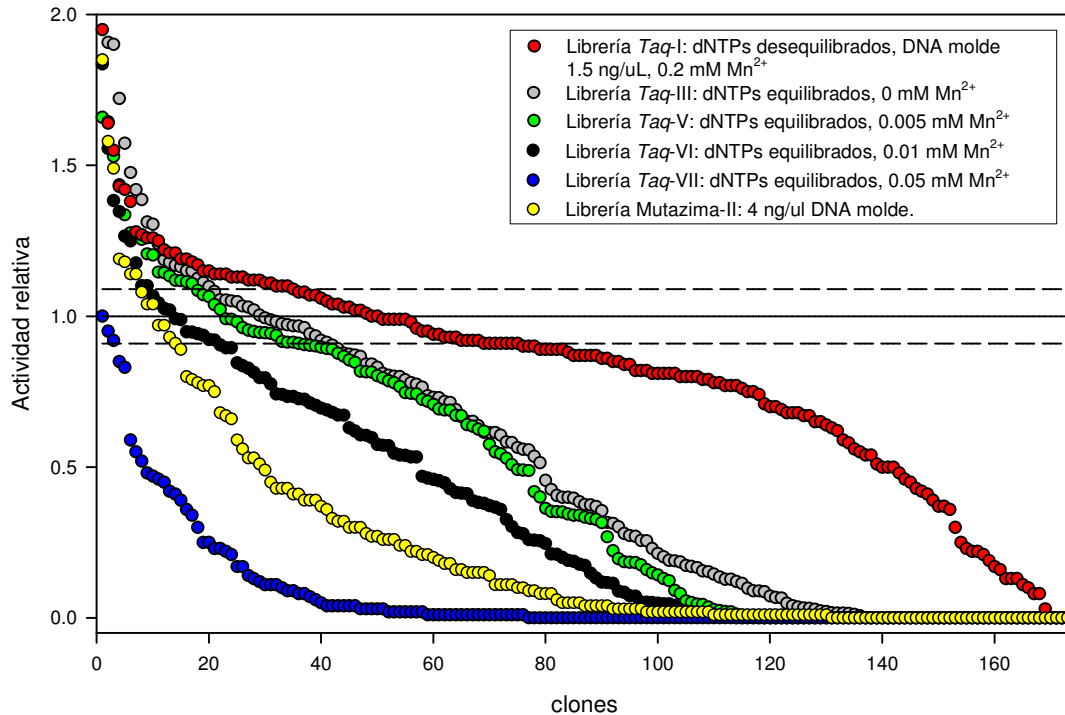
Adicionalmente, se analizaron librerías con concentraciones equilibradas de dNTPs. En este caso, la frecuencia de mutación se ajustó finamente variando la concentración de  $MnCl_2$ . Así se generaron librerías comprendiendo desde un 34% a un 81% de clones con menos del 10% de la actividad del parental a partir de concentraciones de  $MnCl_2$  en el intervalo 0-0.05 mM (**Tabla 4.1, Figura 4.8**).

Finalmente, se seleccionaron las condiciones de reacción de las librerías Mutazima-I, Mutazima-II, *Taq*-III y *Taq*-V para las posteriores PCR mutagénicas. Estas librerías muestran una frecuencia de mutación adecuada que permite identificar las mutaciones beneficiosas al tiempo que pueden resultar útiles para evaluar los procesos de recombinación *in vivo*.

**Tabla 4.1.** Condiciones de las diferentes librerías Mutazima y *Taq*.

Librería	dNTPs	[ $MnCl_2$ ] (mM)	[ $MgCl_2$ ] (mg/mL)	Concentración DNA molde (ng/ $\mu$ L)	% de mutantes con menos del 10% de actividad de la enzima parental <sup>1</sup>	% clones inactivos <sup>1</sup>
<i>Taq</i> -I	desequil.	0.2	0.75	1.5	4.6	2.3
<i>Taq</i> -II	desequil.	0	1.5	0.1	14.2	8.1
<i>Taq</i> -III	equilibr.	0	1.5	0.1	33.9	21.8
<i>Taq</i> -IV	equilibr.	0.002	1.5	0.1	35.2	29.9
<i>Taq</i> -V	equilibr.	0.005	1.5	0.1	41.3	32.2
<i>Taq</i> -VI	equilibr.	0.01	1.5	0.1	47.1	34.5
<i>Taq</i> -VII	equilibr.	0.05	1.5	0.1	81.1	56.3
<i>Taq</i> -VIII	equilibr.	0.1	1.5	0.1	92.5	81.0
Mutaz-I	equilibr.	—	—	13	46.2	36.8
Mutaz-II	equilibr.	—	—	4	56.3	47.1
Mutaz-III	equilibr.	—	—	0.004	96.9	92.4

<sup>1</sup> Cálculos basados en el perfil de los paisajes (**Figura 4.8**).

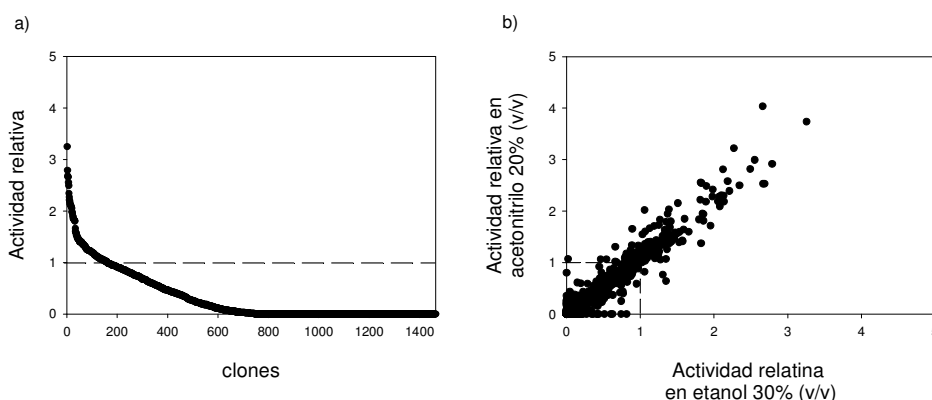


**Figura 4.8.** Paisajes de las librerías *Taq* y Mutazima bajo diferentes condiciones de PCR. Las actividades de los clones se representan en orden descendente. La línea horizontal continua indica la actividad del parental. Las líneas discontinuas indican el coeficiente de varianza del ensayo (por debajo del 10%).

#### 4.1.3. CICLOS EVOLUTIVOS EN COSOLVENTES

##### 4.1.3.1 Primera generación: PCR mutagénica con Mutazima

Se construyó una librería de 1500 clones mediante PCR mutagénica (empleando las condiciones estipuladas para la librería Mutazima-II; ver Tabla 4.1). Los *screenings* se realizaron en presencia de acetonitrilo 20% (v/v) o etanol 30% (v/v). La mejor variante de este primer ciclo fue el mutante 6C9; durante el *screening* mostró una actividad alrededor de 3.6 veces mejor que el parental MtLT2 en ambos disolventes orgánicos sin afectar a su estabilidad. En el *screening*, también se obtuvieron otras variantes con aproximadamente el doble de actividad que el parental MtLT2, aunque finalmente sólo se escogió 6C9 como tipo parental para la segunda generación (**Figura 4.9**). La variante 6C9 mostró una mutación en el péptido señal (P(n20)H), una mutación silenciosa (S415S) y por último la mutación L429V responsable del aumento en la actividad (**Tabla 4.2**).



**Figura 4.9. a)** Paisaje del ensayo de *screening* en presencia de etanol 30% (v/v). La actividad de los clones de la librería de mutantes de MtLT2 preparada por mutagénesis aleatoria se representa en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental. **b)** El *screening* se llevó a cabo en acetoniitrilo 20% (v/v) y en etanol 30% (v/v). Los mutantes con actividades elevadas en ambos disolventes se eligieron para los siguientes *re-screenings*. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental.

**Tabla 4.2.** Mutantes de la primera generación.

Lacasas	Creación de diversidad genética	Cambios de nucleótidos			Mejora <sup>1</sup>	
		Cambios de aminoácidos			EtOH	AcN
MtLT2 parental	—	—			1	1
6C9	Mutazima	C59A(CCT/CAT) P(n20)H <sup>2</sup>	G1386A(TCG/TCA) S415S <sup>3</sup>	C1426G(CTA/GTA) L429V	3.6	2.6
4B2	Mutazima	C960T(TAC/TAT) Y273Y <sup>3</sup>	C1424G(ACC/AGC) T428S		2.4	2.4
3G10	Mutazima	G1843A(GAG/AAG) E(c615)K <sup>2</sup>			2.2	1.6

<sup>1</sup> Mejoras con respecto a la actividad del tipo parental (MtLT2) tras el *screening* en etanol (EtOH) 30% (v/v) y acetoniitrilo (AcN) 20% (v/v).

<sup>2</sup> Mutaciones en el péptido señal (n) y en la extensión C-terminal (c) que son procesados durante la maduración de la proteína.

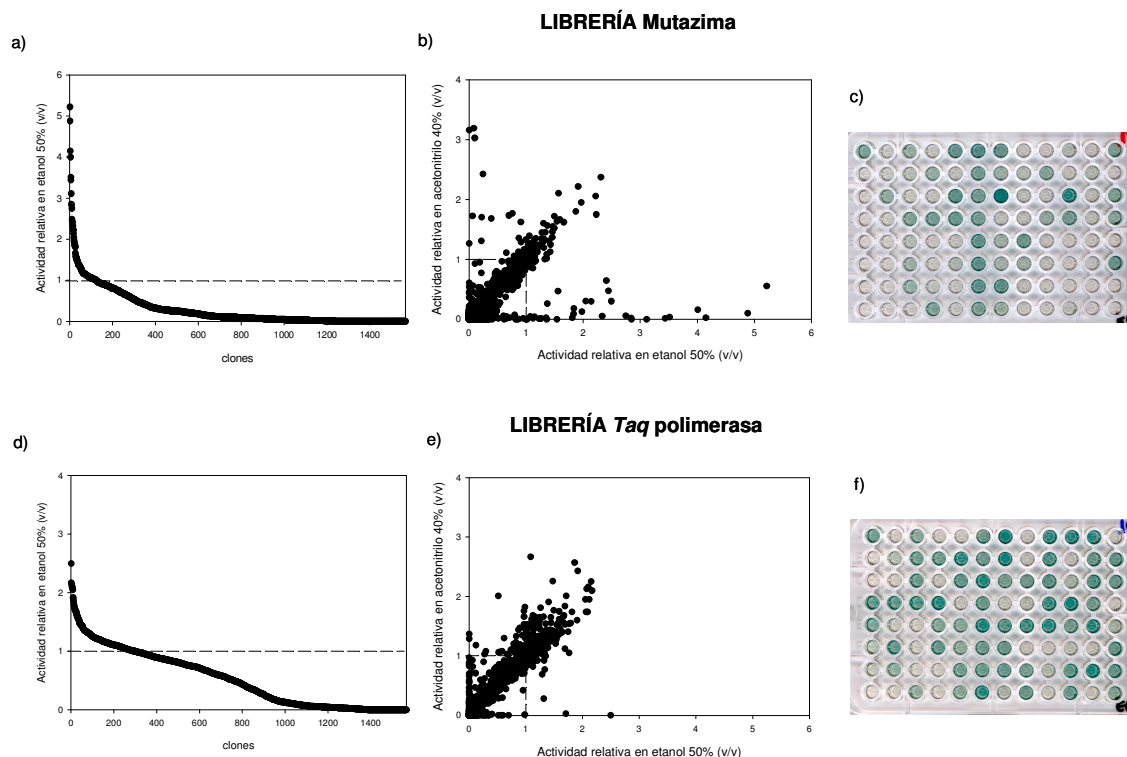
<sup>3</sup> Mutación silenciosa.

#### 4.1.3.2 Segunda generación: creación de dos genotecas mutagénicas independientes con las polimerasas Mutazima y *Taq*

En la segunda generación, al emplear 6C9 como parental, la presión selectiva pudo ser incrementada (los *screenings* se llevaron a cabo en acetoniitrilo 40% (v/v) y etanol 50% (v/v)).

Ya que el espectro mutacional de las polimerasas Mutazima y *Taq* es diferente (ver **Anexo III**), con la finalidad de ampliar la diversidad genética del experimento, se construyeron y

exploraron de manera independiente dos librerías mutagénicas creadas con Mutazima y *Taq* polimerasa (librería Mutazima-II y Taq-III; ver Tabla 4.1). Se realizó el *screening* sobre un total de 3000 clones encontrando varios mutantes “*adaptados*” bajo las estrictas condiciones del ensayo (**Figura 4.10**).



**Figura 4.10.** Paisajes de la segunda generación. **a y d)** Perfiles evolutivos de los ensayos de *screening* en etanol 50% (v/v). La actividad de los clones de ambas librerías están representados en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental. **b y e)** *Screenings* de las librerías en presencia de acetoniitrilo 40% (v/v) y en etanol 50% (v/v). Los mutantes con actividades elevadas en ambos disolventes se eligieron para los siguientes re-*screening*. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental. **c y f)** Aspecto de las placas multipocillo durante el *screening* con ABTS para las librerías Mutazima y *Taq*.

Tras los dos re-*screenings* se seleccionaron cinco mutantes con elevada actividad y estabilidad en ambos disolventes orgánicos como parentales para el siguiente ciclo evolutivo. Se encontraron mutantes con mayor preferencia (tolerancia) frente a uno de los dos cosolventes empleados en el *screening*. Así, 2B10 fue 2.2 veces más activo que 6C9 en etanol 50% (v/v) y 1.7 veces en acetoniitrilo 40% (v/v). Por el contrario, el mutante 5B9 se “*adaptó*” mejor a la presencia de acetoniitrilo. La actividad relativa y las mutaciones de cada uno de ellos se resumen en la **Tabla 4.3**.



Tabla 4.3. Mutantes de la segunda generación.

Lacasas	Creación de diversidad genética	Cambios de nucleótidos			Mejora <sup>1</sup>	
		Cambios de aminoácidos			EtOH	AcN
6C9 parental	Mutazima	—			1	1
5B9	Taq	T676C(TCG/CCG) S179P			1.1	2.7
7H9	Taq	G685A(GAG/AAG) E182K			1.9	2.4
2B10	Mutazima	A1795C(AAC/CAC) N552H	G980A(AGC/AAC) S280N	G1047A(AGG/AGA) R302R <sup>2</sup>	2.2	1.7
9F1	Mutazima	C850A(CAC/AAC) H237N	G895A(GCC/ACC) A252T	C1038G(GGC/GGG) G300G <sup>2</sup>	1.6	2.1
17C10	Mutazima	C1621T(GAC/GAT) D494D <sup>2</sup>	G1781T(TGG/TTG) W547L		1.5	1.5

<sup>1</sup> Mejoras con respecto a la actividad del parental (6C9) tras el *screening* en etanol 50% (v/v) y acetonitrilo al 40% (v/v).

<sup>2</sup> Mutación silenciosa.

#### 4.1.3.3 Tercera generación: *in vivo* DNA shuffling de los genes parentales previamente mutagenizados

Cada uno de los cinco mutantes seleccionados en la segunda generación se sometieron, por separado, a una nueva reacción de PCR mutagénica con *Taq*/MnCl<sub>2</sub> (condiciones de la genoteca *Taq*-V; ver Tabla 4.1) con el fin de introducir nuevas mutaciones puntuales. A continuación, los diferentes productos de PCR se recombinaron mediante *in vivo* DNA shuffling. De este modo se emplearon dos estrategias de generación de diversidad genética diferentes en un solo paso de evolución (Figura 4.11).

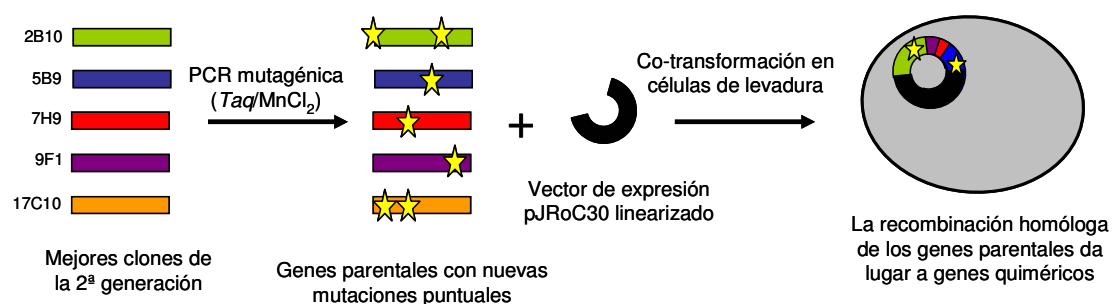
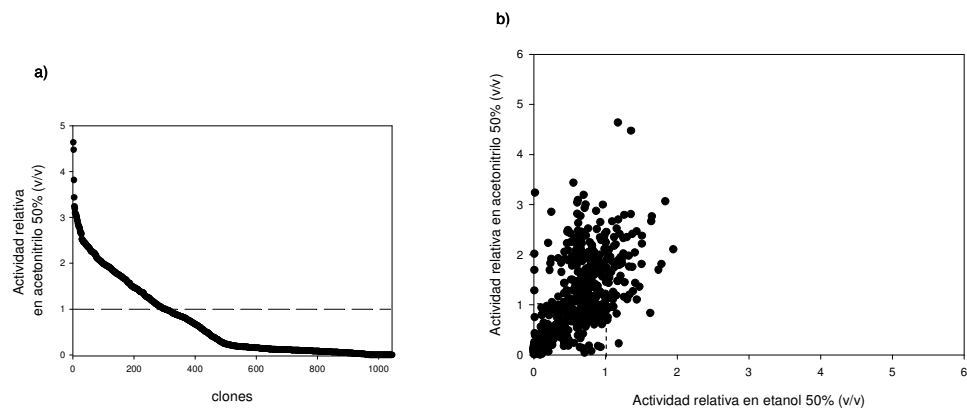


Figura 4.11. Esquema de la estrategia seguida en la tercera generación de evolución dirigida. Se hizo una PCR propensa a error de los cinco mutantes seleccionados en la anterior generación y posteriormente se llevó a cabo el *in vivo* DNA shuffling de todos ellos.

Se exploró una librería de aproximadamente 1000 clones y en el *screening* se incrementó la presión selectiva hasta concentraciones del 50% (v/v), tanto para acetonitrilo como para etanol. La mejor variante tras los dos re-*screenings* resultó ser 3D1, un mutante que procede de la recombinación de 7H9 y 2B10. En concreto, incorpora la única mutación de 7H9 (E182K) y una de las tres mutaciones de 2B10 (N552H).

Esta variante se seleccionó como tipo parental para la cuarta generación, ya que a pesar de que la actividad (tras los dos re-*screenings*) en etanol fue muy similar a la del parental 2B10 (1.2 veces), la actividad en acetonitrilo aumentó considerablemente con respecto al parental 5B9 (4.7 veces). Curiosamente, ninguna de las tres variantes secuenciadas presentaron mutaciones adicionales procedentes del proceso de amplificación con *Taq*/MnCl<sub>2</sub> (**Figura 4.12, Tabla 4.4**).



**Figura 4.12.** a) Paisaje del ensayo de *screening* en acetonitrilo 50% (v/v). La actividad de los clones de la librería de mutantes de la tercera generación se representa en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental. b) El *screening* se llevó a cabo en acetonitrilo 50% (v/v) y en etanol 50% (v/v). Los mutantes con actividades elevadas en ambos disolventes se eligieron para los siguientes re-*screenings*. Las líneas discontinuas indican la actividad del tipo parental.

**Tabla 4.4.** Mutantes de la tercera generación.

Lacasas	Creación de diversidad genética	Combinación de <b>mutaciones</b> en el <i>in vivo shuffling</i>	Mejora <sup>1</sup>	
			EtOH	AcN
parentales 5B9, 7H9, 2B10, 9F1, 17C10	Mutazima y <i>Taq</i> independ.	—	1	1
<b>3D1</b>	<i>Taq</i> + <i>in vivo</i> DNA <i>shuffling</i>	incorpora: mutación <b>E182K</b> del parental 7H9 + mutación <b>N552H</b> del parental 2B10	1.2	4.7
6B12 <sup>2</sup>	<i>Taq</i> + <i>in vivo</i> DNA <i>shuffling</i>	incorpora: mutación <b>S179P</b> del parental 5B9 + mutaciones <b>H237N</b> , <b>A252T</b> y <b>G300G</b> del parental 9F1	1.8	3.1
4B1 <sup>2</sup>	<i>Taq</i> + <i>in vivo</i> DNA <i>shuffling</i>	incorpora: mutación <b>H237N</b> del parental 9F1 + mutación <b>D494D</b> del parental 17C10	1.3	2.8

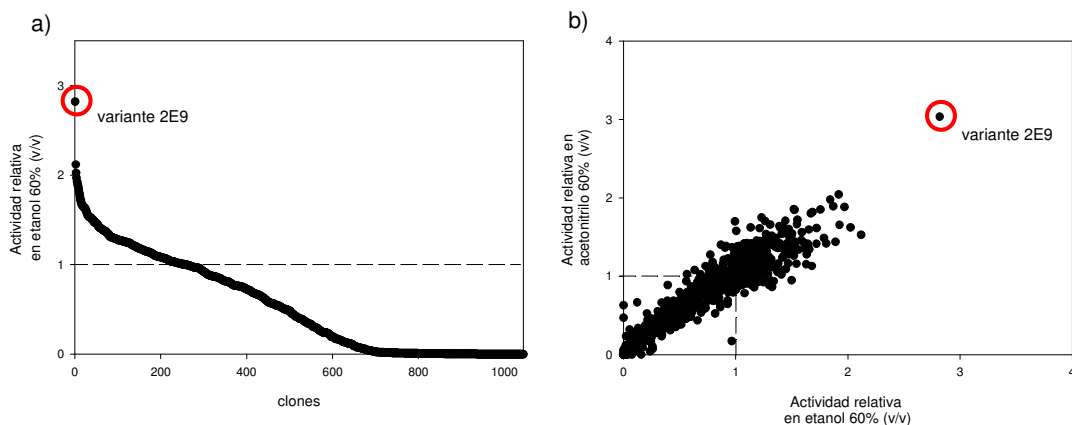
<sup>1</sup> Mejoras el *screening* en etanol 50% (v/v) respecto al parental 2B10 y en acetonitrilo 50% (v/v) respecto al parental 5B9.

<sup>2</sup> Las variantes 6B12 y 4B1 se descartaron finalmente como parentales para el siguiente ciclo puesto que su actividad tras los dos re-*screenings* disminuyó considerablemente.

#### 4.1.3.4 Cuarta generación: recombinación por ensamblaje *in vivo* de genotecas con diferente espectro mutacional

El mejor mutante de la tercer generación, 3D1, se sometió a dos reacciones de PCR mutagénicas diferentes con Mutazima y *Taq* (genotecas Mutazima-I y *Taq*-V; ver Tabla 4.1) para posteriormente mezclar ambas genotecas en la misma proporción y recombinarlas *in vivo* tras la transformación en *S. cerevisiae*. Se probaron diferentes relaciones de vector linealizado:genoteca mixta (1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 y 1:10) para analizar la eficiencia de recombinación/transformación. Con más de 15000 clones por reacción de transformación, el mejor resultado se obtuvo con la relación 1:8 (100 ng vector linealizado:800 ng genoteca mixta), muy similar a la eficiencia obtenida con el plásmido circular.

Tras el *screening* de ~1000 clones en presencia de 60% (v/v) etanol y de 60% (v/v) acetonitrilo el único mutante seleccionado fue 2E9, el cual mostró una actividad y estabilidad en ambos disolventes mucho mayor que la del resto de los clones de su generación (**Figura 4.13**).



**Figura 4.13.** a) Paisaje del ensayo de *screening* en presencia de etanol 60% (v/v). La actividad de los clones de la librería de mutantes de la cuarta generación se representa en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental. b) *Screening* de la librería de la cuarta generación en acetonitrilo 60% (v/v) y etanol 60% (v/v). El mejor mutante, 2E9 (circulo rojo), con actividad elevada en ambos disolventes, se seleccionó para los siguientes re-*screenings*. Las líneas discontinuas indican la actividad del tipo parental.

2E9 contenía dos mutaciones, ambas en codones consecutivos de la extensión C-terminal (**Tabla 4.5**).

**Tabla 4.5.** Mutante de la cuarta generación.

Lacasas	Creación de diversidad genética	Cambios de nucleótidos Cambios de aminoácidos		Mejora <sup>1</sup>	
				EtOH	AcN
3D1 parental	—	—	—	1	1
<b>2E9</b>	ensamblaje <i>in vivo</i> de genotecas mutagénicas	G1841A(GGC/GAC) G(c614)D <sup>2</sup>	G1843A(GAG/AAG) E(c615)K <sup>2</sup>	2.8	3

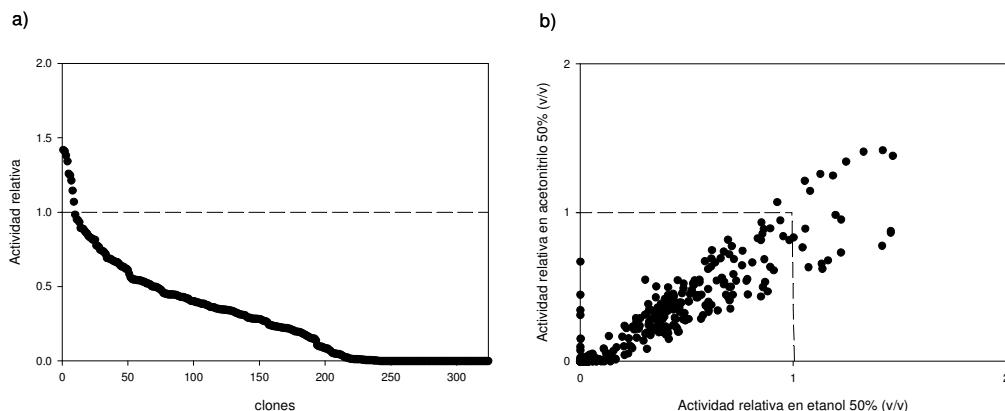
<sup>1</sup> Mejoras con respecto a la actividad del parental (3D1) tras el *screening* en etanol 60% (v/v) y en acetonitrilo 60% (v/v).

<sup>2</sup> Mutaciones en el extremo C-terminal que es procesado durante la maduración de la proteína.

#### 4.1.3.5 Quinta generación: mutagénesis dirigida y saturada

En la tercera generación, tras el *in vivo shuffling* de los parentales, el mejor mutante 3D1 perdió la mutación S280N correspondiente al parental 2B10, por lo que su actividad en etanol apenas aumentó (ver Tabla 4.4). Por ello se decidió reincorporar esta mutación en 2E9 mediante mutagénesis dirigida. El experimento resultó exitoso, obteniéndose el mutante R2 con mejor actividad tanto en etanol como en acetonitrilo 50% (v/v) (**Tabla 4.6**). En vista de la importancia de dicha posición en la actividad/estabilidad en cosolventes, se exploró en mayor profundidad mediante mutagénesis saturada sobre la variante 2E9.

Se creó una librería de aproximadamente 400 clones y se seleccionó el mutante 1D11 con prácticamente la misma actividad que R2. El secuenciado de 1D11 reveló que dicho mutante incorporaba nuevamente la mutación S280N. Adicionalmente se secuenció una de las variantes con actividad 0, para verificar que el protocolo de mutagénesis saturada se había llevado a cabo de manera correcta, y que 1D11 no suponía ningún artefacto o contaminación. En efecto, el mutante 1C2 incorporaba un residuo voluminoso -prolina- en la posición 280, lo cual supuso la pérdida de la actividad catalítica (**Figura 4.14, Tabla 4.6**).



**Figura 4.14.** a) Paisaje del ensayo de *screening* en presencia de etanol 50% (v/v). La actividad de los clones de la biblioteca de mutantes de la quinta generación se representa en orden descendente. Las líneas discontinuas indican la actividad del tipo parental. b) *Screening* de la librería de la quinta generación en acetonitrilo 50% (v/v) y en etanol 50% (v/v).

**Tabla 4.6.** Mutantes de la quinta generación.

Lacasas	Creación de diversidad genética	Cambios de nucleótidos Cambios de aminoácidos	Mejora <sup>1</sup>	
			EtOH	AcN
2E9 parental	Mutazima	—	1	1
R2	mutagénesis dirigida	G980A (AGC/AAC) S280N	1.3	1.8
1D11	mutagénesis saturada	G980A (AGC/AAC) S280N	1.4	1.7
1C2	mutagénesis saturada	A979C y G980C (AGC/CCC) S280P	0	0

<sup>1</sup> Mejoras con respecto a la actividad del parental (2E9) tras el *screening* en etanol 50% (v/v) y en acetonitrilo 50% (v/v).

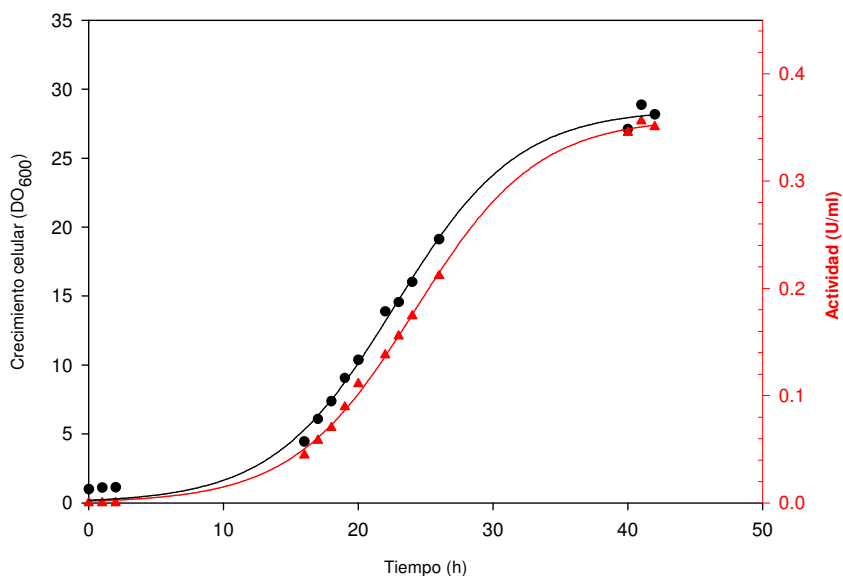
## 4.2. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS MUTANTES

### 4.2.1. EXPRESIÓN DE LAS LACASAS EN *S. cerevisiae*

Las diferentes librerías de lacasas obtenidas a lo largo de todo el proceso de evolución artificial se crearon usando el gen completo de la lacasa. El gen incluye el péptido señal, el propéptido y la extensión del extremo C-terminal, los cuales son procesados por la maquinaria celular de *S. cerevisiae* durante la secreción de la proteína. Para evitar la selección de mutantes de expresión (es decir, mutaciones que aumentan el nivel de expresión sin influir

directamente en la propiedad a evolucionar), las mejores variantes de cada generación se purificaron y se caracterizaron cinéticamente en presencia y ausencia de cosolventes antes de usarlas como parentales de la siguiente generación.

La expresión en *S. cerevisiae* de las lacasas nativa y mutantes clonadas en el vector pJRoC30 se desarrolló en condiciones adecuadas de temperatura, aireación y agitación (ver Apartado 3.9.1 de Materiales y Métodos) (**Figura 4.15**).



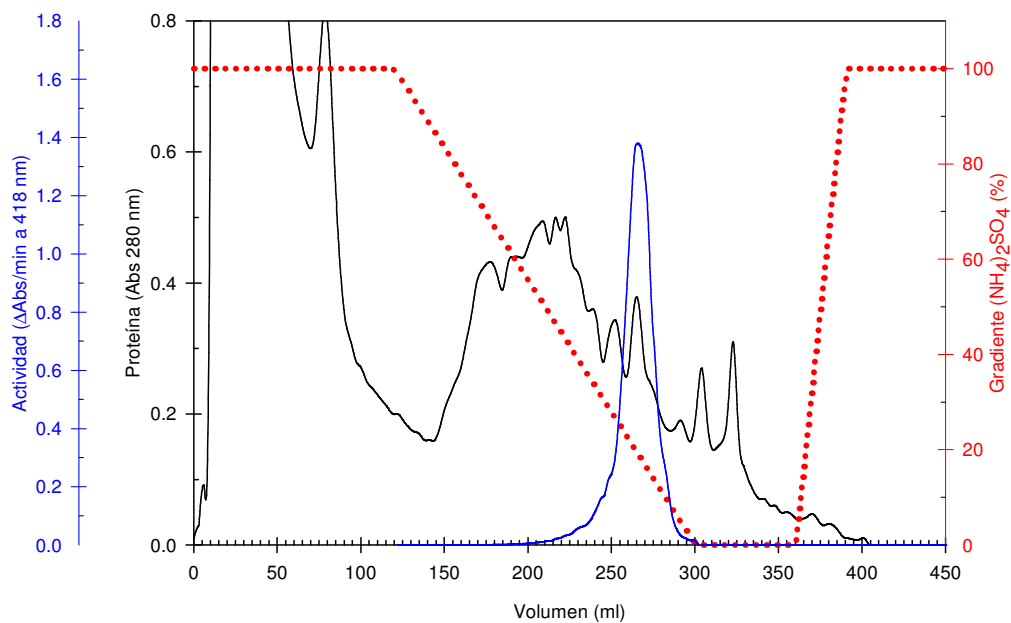
**Figura 4.15.** Crecimiento celular (●) y actividad lacasa (▲) durante la expresión en *S. cerevisiae* de MtLT2 clonada en pJRoC30.

#### 4.2.2. PURIFICACIÓN DE LAS LACASAS

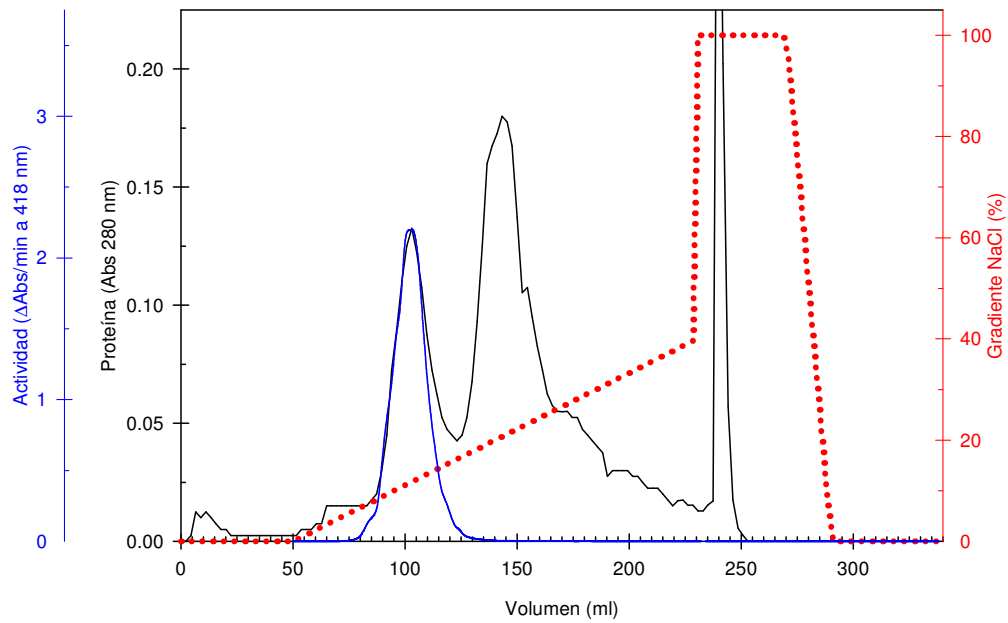
Las diferentes variantes fueron purificadas a homogeneidad con 4 pasos consecutivos (ver apartado 3.9.2 de Materiales y Métodos). El extracto crudo (500 mL) se centrifugó, filtró y concentró hasta un volumen final de 30 mL. El concentrado se sometió a una precipitación fraccionada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% (p/v). Tras el tratamiento, el sobrenadante -con actividad lacasa (usando ABTS 3 mM como sustrato)- se centrifugó y se cargó en una columna de interacción hidrofóbica (**Figura 4.16**). Las fracciones con actividad lacasa se sometieron a dos pasos consecutivos de purificación en columnas de intercambio aniónico: primero en una columna DEAE-Sepharose de intercambio aniónico débil y posteriormente en una columna MonoQ de intercambio fuerte (**Figura 4.17 y Figura 4.18**). El rendimiento final fue del ~30% y se obtuvieron aproximadamente 0.6-1.0 mg totales de lacasa pura. Todos los pasos de purificación se llevaron a cabo a temperatura ambiente, dada la alta estabilidad de MtLT2 y sus variantes. La **Tabla 4.7** resume el protocolo de purificación empleado en esta Tesis.

Tabla 4.7. Purificación de MTLT2

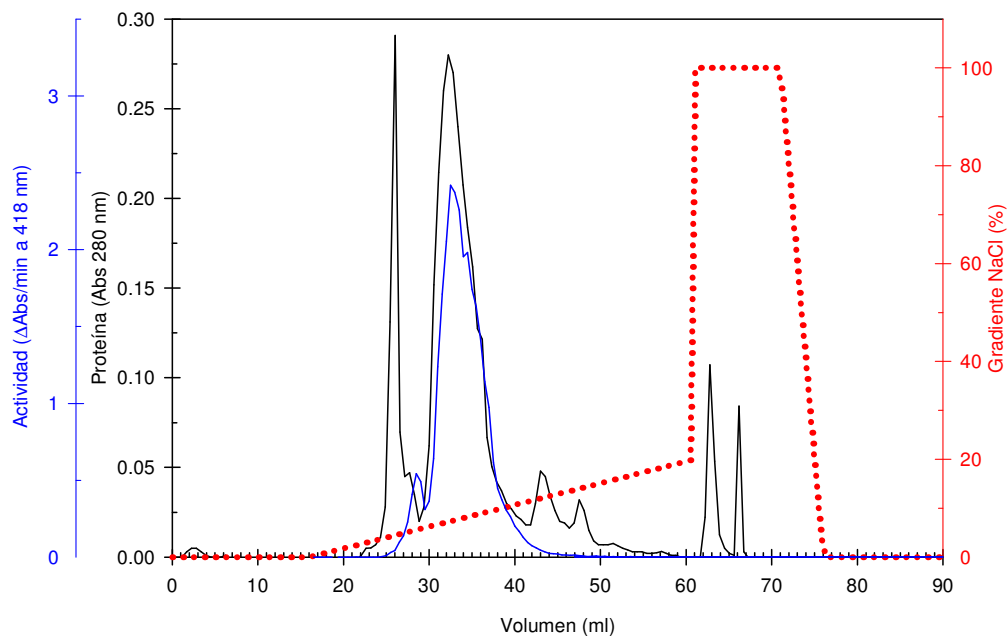
Paso de purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de Purificación
Extracto crudo	455	39.53	134.6	3.40	100	1
Concentración	28	34.64	133.4	3.85	99.1	1.1
50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	31	9.06	118.9	13.1	88.4	3.9
HIC Phenyl Sepharose	9.2	1.85	52.2	28.2	38.8	8.3
DEAE Sepharose CL-6B	1.9	0.95	47.5	50.0	35.3	14.7
MonoQ 5/5 HR	1.4	0.62	40.0	64.7	29.7	19.0



**Figura 4.16.** Cromatografía de interacción hidrofóbica (Phenyl Sepharose). Se muestran los perfiles correspondientes a la actividad lacasa con ABTS ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  a 418 nm) (—); proteína (Abs a 280 nm) (—) y gradiente de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (%) (•••••).



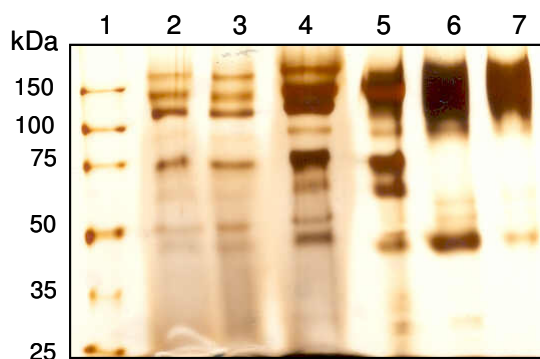
**Figura 4.17.** Cromatografía de intercambio aniónico débil (DEAE-Sepharose). Se muestran los perfiles correspondientes a la actividad lacasa con ABTS ( $\Delta$ Abs/min a 418 nm) (—); proteína (Abs a 280 nm) (—) y gradiente de NaCl (%) (.....).



**Figura 4.18.** Cromatografía de intercambio aniónico fuerte (MonoQ). Se muestran los perfiles correspondientes a la actividad lacasa con ABTS ( $\Delta$ Abs/min a 418 nm) (—); proteína (Abs a 280 nm) (—); gradiente de NaCl (%) (.....).



La electroforesis en condiciones desnaturalizantes (en presencia de SDS) mostró una banda mayoritaria de la lacasa pura en torno a ~130 kDa (**Figura 4.19**). La lacasa migra como una banda difusa debido a la elevada glicosilación.



**Figura 4.19.** Electroforesis SDS-PAGE de los distintos pasos de purificación. Gel de poliacrilamida al 8% (p/v), teñido con plata. Línea 1: marcador de masa molecular de proteínas. Línea 2: extracto crudo. Línea 3: extracto crudo filtrado y concentrado. Línea 4: precipitación fraccionada con 50% (p/v) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Línea 5: interacción hidrofóbica (Phenyl Sepharose). Línea 6: intercambio aniónico débil (DEAE-Sepharose). Línea 7: Intercambio aniónico fuerte (MonoQ).

### 4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS LACASAS PURIFICADAS

Una vez purificadas la lacasa parental MtLT2 y los mejores mutantes del proceso de evolución molecular dirigida, se procedió a evaluar su comportamiento en presencia de cosolventes orgánicos. Asimismo, se llevó a cabo la caracterización bioquímica y espectro-electroquímica de las diferentes variantes.

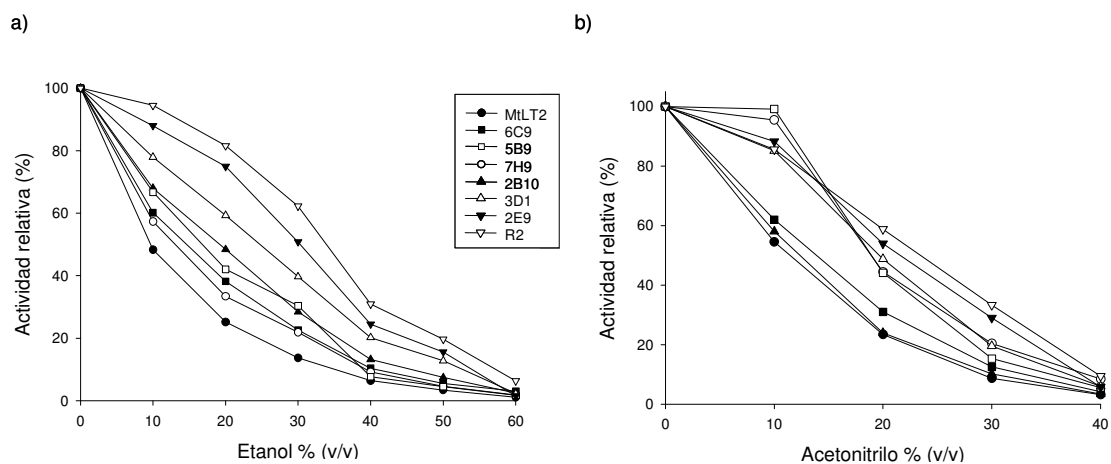
#### 4.3.1. ESTUDIO DE LOS MUTANTES EN COSOLVENTES

##### 4.3.1.1 Estudio comparativo de los mutantes

La tolerancia a cosolventes orgánicos de todos los mutantes purificados coincidió (excepto para 5B9) con un aumento de su actividad en medio acuoso (**Tabla 4.8**). Durante el proceso evolutivo también se tuvo en cuenta la estabilidad como factor discriminante, seleccionando sólo aquellos mutantes con más del 80% de la actividad residual tras 24 h de incubación en acetonitrilo y en etanol (bajo las concentraciones estipuladas en el *screening* de cada ciclo). Entre las lacasas más estables, cabe destacar 7H9, que mantuvo el 100% de su actividad en acetonitrilo 10% (v/v) (**Figura 4.20, Tabla 4.8**).

El mutante final de la evolución dirigida, R2, mostró una tolerancia significativa a cosolventes con una mejora en la actividad de 19.2 veces en presencia de etanol 50% (v/v) y 33.4 veces en acetonitrilo 30% (v/v) con respecto al parental MtLT2. De hecho, R2 mantuvo el

33% de su actividad inicial en solución acuosa cuando se expuso a acetonitrilo 30% (v/v) y el 20% de su actividad inicial en etanol 50% (v/v). De este manera, R2 exhibió casi la misma actividad en etanol 40% (v/v) y en acetonitrilo 30% (v/v) (1737 U/ $\mu$ mol lacasa y 1876 U/ $\mu$ mol lacasa, respectivamente) que el tipo parental MtLT2 en medio acuoso (1703 U/ $\mu$ mol lacasa). Bajo las mismas condiciones, MtLT2 retuvo menos del 10% de su actividad (109 U/ $\mu$ mol lacasa en etanol 40% (v/v) y 149 U/ $\mu$ mol lacasa en acetonitrilo 30% (v/v)).



**Figura 4.20.** Perfiles de actividad relativa de la lacasa tipo parental y los mutantes evolucionados en diferentes concentraciones de etanol (a) y en acetonitrilo (b). Las actividades se midieron con ABTS 3 mM en tampón acetato 100 mM pH 4.5 conteniendo las correspondientes concentraciones de cosolventes. Los perfiles de tolerancia a cosolventes orgánicos de los extractos crudos y de las lacasas purificadas fueron equivalentes, lo que indica que no se seleccionó ningún mutante de expresión.

**Tabla 4.8.** Actividad y estabilidad de la lacasa tipo parental MtLT2 y los diferentes mutantes en medio acuoso y en presencia de disolventes orgánicos (etanol o acetonitrilo).

Lacasa (generación)	Actividad en medio acuoso <sup>1</sup>	Mejora <sup>2</sup>	Actividad en etanol 50% (v/v) <sup>1</sup>	Mejora <sup>2</sup>	% Actividad relativa etanol 50% (v/v) <sup>3</sup>	Estabilidad en etanol 50% (v/v) <sup>4</sup>	Actividad en acetonitrilo 30% (v/v) <sup>1</sup>	Mejora <sup>2</sup>	% Actividad relativa acetonitrilo 30% (v/v) <sup>3</sup>	Estabilidad en acetonitrilo 30% (v/v) <sup>4</sup>
<b>MtLT2</b> (parental)	1703 ± 11	1.0	58 ± 1	1.0	3.4	80	149 ± 3	1.0	8.8	86
<b>6C9</b> (1 <sup>a</sup> )	3579 ± 14	2.1	198 ± 5	3.4	5.5	84	449 ± 11	3.0	12.6	86
<b>5B9</b> (2 <sup>a</sup> )	2048 ± 5	1.2	93 ± 1	1.6	4.5	125	314 ± 9	2.1	15.3	155
<b>7H9</b> (2 <sup>a</sup> )	4767 ± 32	2.8	222 ± 6	3.8	4.7	110	974 ± 13	6.5	20.4	138
<b>2B10</b> (2 <sup>a</sup> )	5841 ± 9	3.4	435 ± 8	7.5	7.4	93	600 ± 12	4.0	10.3	96
<b>3D1</b> (3 <sup>a</sup> )	4085 ± 15	2.4	524 ± 3	9.1	12.8	95	780 ± 23	5.4	19.6	92
<b>2E9</b> (4 <sup>a</sup> )	5111 ± 7	3.0	798 ± 30	13.8	15.6	97	1486 ± 11	10.0	29.1	98
<b>R2</b> (5 <sup>a</sup> )	5619 ± 18	3.3	1106 ± 5	19.2	19.7	99	1876 ± 6	12.6	33.4	100

<sup>1</sup> Actividad (Unidades / μmol lacasa) medida con ABTS 3 mM.

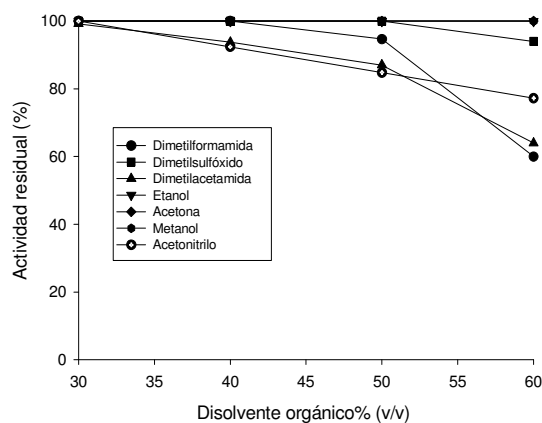
<sup>2</sup> Mejora con respecto al parental MtLT2.

<sup>3</sup> El porcentaje de actividad relativa se calculó en base a la relación entre la actividad inicial en presencia y en ausencia de disolventes orgánicos.

<sup>4</sup> Porcentaje de actividad residual (medida con ABTS 3 mM) después de 24 h de incubación en disolventes orgánicos.

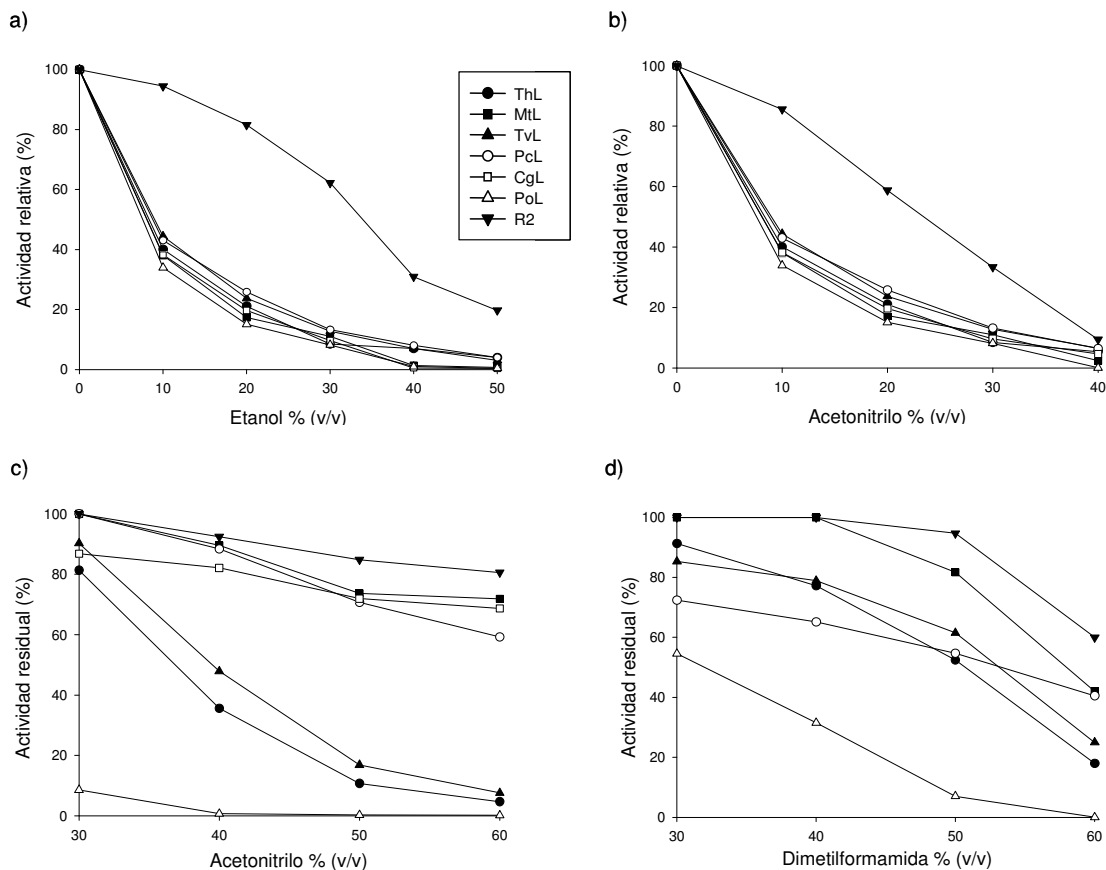
#### 4.3.1.2 Tolerancia del mutante final R2 a diferentes cosolventes y comparación de su comportamiento con otras lacasas fúngicas.

El mutante R2 se estudió en presencia de varios cosolventes de relevancia tecnológica y diferente polaridad ( $\log P$  entre -0.23 y -1.3, donde  $P$  es el coeficiente de partición de un solvente en el sistema bifásico agua/n-octanol) (**Figura 4.21**), con el objeto de evaluar si la tolerancia mostrada hacia acetonitrilo y etanol podía extenderse a otros disolventes. En efecto, el mutante R2 mostró una elevada “*promiscuidad*” frente a otros cosolventes, siendo altamente estable a elevadas concentraciones de dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dimetilacetamida, acetona y metanol. De esta forma, R2 mantuvo entre el 85 y 100% de su actividad después de 24 h de incubación en estos disolventes orgánicos con concentraciones del 50% (v/v). Esta elevada resistencia a diferentes cosolventes se puede atribuir a la presión selectiva establecida durante el protocolo de evolución, en el que se combinaron e incrementaron las concentraciones de acetonitrilo y de etanol, generación tras generación.



**Figura 4.21.** Estabilidad de la variante R2 en presencia de concentraciones crecientes de diferentes disolventes orgánicos. Los experimentos se desarrollaron en viales de vidrio sellados que contenían la lacasa R2 en mezclas cosolvente/tampón fosfato 100 mM pH 6.0. Después de 24 h de incubación a temperatura ambiente, se tomaron alícuotas y se evaluó la actividad con ABTS 3 mM en tampón acetato 20 mM pH 4.5. Las actividades residuales se expresaron como porcentajes de la actividad inicial en la correspondiente concentración de disolvente orgánico.

El mutante R2 también se comparó con varias lacasas purificadas de hongos de podredumbre blanca -con potenciales redox oscilando entre +475 y +790 mV-, que comúnmente se emplean en presencia de disolventes orgánicos (**Figura 4.22**). R2 mostró mayor actividad residual y estabilidad en cosolventes que cualquiera de las lacasas evaluadas. Por ejemplo, en etanol 30% (v/v) mientras la colección de lacasas mantuvo en torno al 10% de su actividad en solución acuosa, R2 conservó más del 60%.



**Figura 4.22.** **a y b)** Actividad inicial de la variante R2 y de las diferentes lacasas fúngicas en presencia de concentraciones crecientes de etanol y de acetonitrilo. ThL, lacasa de *Trametes hirsuta*; MtL, lacasa de *Myceliophthora thermophila* expresada en *Aspergillus oryzae*; TvL, lacasa de *Trametes versicolor*; PcL, lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*; CgL, lacasa de *Corioloopsis gallica*; PoL, lacasa de *Pleurotus ostreatus*. **c y d)** Actividades residuales después de la incubación durante 24 h de R2 y de las diferentes lacasas fúngicas en presencia de concentraciones crecientes de acetonitrilo y dimetilformamida. Cada punto representa el promedio de tres medidas independientes.

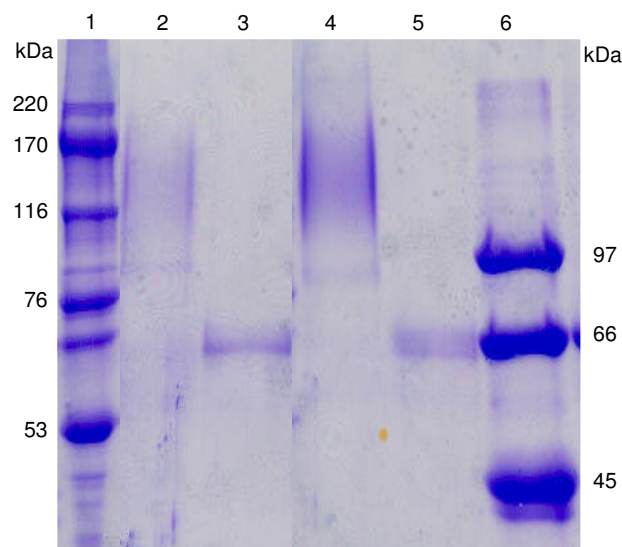
## 4.3.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

### 4.3.2.1 Evaluación de la glicosilación

Como se indicó en el apartado 4.2.2, la masa molecular de los mutantes expresados en *S. cerevisiae* fue aproximadamente de 130 kDa. La N-desglicosilación de las variantes purificadas redujo la masa molecular hasta ~65 kDa (**Figura 4.23**), la misma masa molecular descrita para la enzima silvestre de *Myceliophthora thermophila* expresada en *Aspergillus oryzae* desglicosilada (Berka y cols., 1997). De estos datos se deduce que MtLT2 se encuentra hiperglicosilada: aproximadamente el 50% de la masa molecular total son carbohidratos covalentemente unidos a residuos Asn de la cadena polipeptídica debido a las modificaciones

postraduccionales en el organismo hospedador. La incorporación y eliminación de residuos de Asn durante la evolución (S280N, en la 2ª y 5ª generación; y N552H en la 2ª y 3ª generación) no alteró el tamaño total de la proteína indicando que estos sitios no estaban involucrados en la unión de glicanos. De hecho, adicionalmente se estimó (con la herramienta de predicción de sitios de N-glicosilación del servidor ExPASy, [www.expasy.org](http://www.expasy.org)), que las secuencias aminoacídicas alrededor de las posiciones 280 y 552 no corresponden a sitios de N-glicosilación. También, empleando el mismo servidor, se estimó en 61183 Da la masa molecular teórica de la proteína madura de MtLT2, un 6% menos de lo observado experimentalmente en la lacasa N-desglicosilada. Esta diferencia en la masa molecular puede ser debida a las O-glicosilaciones durante el procesamiento de la enzima en el aparato de Golgi.

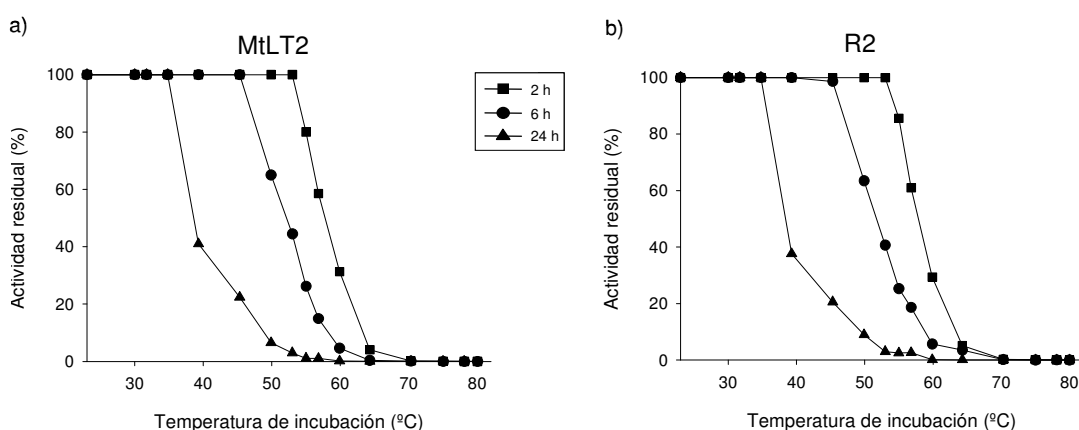
Se ha sugerido que la hiperglicosilación puede aumentar la estabilidad de la enzima y protegerla de la degradación proteolítica (Bulter y cols., 2003). En nuestro caso, el elevado porcentaje de carbohidratos indica que el período de residencia de la lacasa en el aparato de Golgi debe ser largo. Por ello, suponemos que el tránsito desde el Golgi hacia la membrana citoplasmática y la posterior exocitosis de MtLT2 o sus variantes son procesos complejos que limitan la expresión de estas lacasas en *S. cerevisiae*.



**Figura 4.23.** Electroforesis SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida al 8% (p/v), teñido con azul Coomassie. Las lacasas MtLT2 y R2 purificadas se desglicosilaron con la N-glicosidasa PNGasaF. Línea 1: marcadores de masa molecular. Línea 2: lacasa MtLT2 glicosilada. Línea 3: lacasa MtLT2 desglicosilada. Línea 4: lacasa R2 glicosilada. Línea 5: lacasa R2 desglicosilada. Línea 6: marcadores de masa molecular.

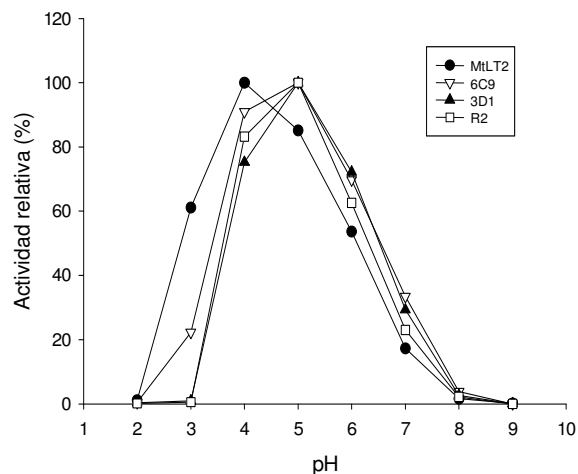
#### 4.3.2.2 Perfiles de termoestabilidad y pH óptimo.

La termoestabilidad en medio acuoso de las diferentes variantes a lo largo de la evolución dirigida no varió significativamente, por lo que el mutante final R2 mostró unos perfiles de termoestabilidad equivalentes a los del tipo parental MtLT2 (**Figura 4.24**). Generalmente, las mutaciones que confieren estabilidad frente a la temperatura pueden también ejercer un efecto beneficioso frente a otros factores desnaturalizantes (como la presencia de disolventes orgánicos) y viceversa. En nuestro caso, sin embargo, las mutaciones introducidas durante la evolución artificial no mejoraron la termoestabilidad.



**Figura 4.24.** Termoestabilidad del tipo parental MtLT2 (a) y de R2 (b). Las actividades se midieron a diferentes tiempos con ABTS 3 mM en tampón Britton y Robinson 100 mM pH 4.5. Las actividades se normalizaron con la actividad inicial a temperatura ambiente antes de la incubación. Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes.

Un efecto lateral del proceso de evolución *in vitro* fue que el perfil de pH para la oxidación de ABTS se vio alterado (**Figura 4.25**). El pH óptimo del tipo parental MtLT2 cambió de 4.0 a 5.0 en la primera generación y se mantuvo en 5.0 durante las siguientes generaciones. Es importante destacar que se detectó un pequeño aumento en la actividad a pH neutro (3D1 retiene cerca del 70% y 30% de su actividad máxima a pH 6.0 y 7.0 respectivamente). El pH óptimo descrito para las lacasas se encuentra generalmente en el intervalo 3.0-5.0 (Shleev y cols., 2004). Este desplazamiento en el pH óptimo de nuestros mutantes, constituye un interesante punto de partida para diseñar por evolución dirigida lacasas activas a pHs alcalinos ya que muchas de sus aplicaciones se llevan a cabo bajo dichas condiciones (por ejemplo, en determinadas etapas del tratamiento de materiales lignocelulósicos, en biosensores, en biopilas de combustible, en la preparación de tintes de peluquería, etc.).



**Figura 4.25.** Perfiles de la actividad a diferentes pHs del tipo parental MtLT2 y las variantes 6C9, 3D1 y R2. La actividad se midió con ABTS 3 mM en tampón Britton y Robinson 100 mM. La actividad lacasa se representa normalizada con respecto a su valor óptimo de actividad. Cada punto representa la media de tres experimentos independientes.

### 4.3.3. CARACTERIZACIÓN ESPECTRO-ELECTROQUÍMICA

Los diferentes mutantes obtenidos por evolución dirigida se caracterizaron espectro-electroquímicamente para evaluar si las mutaciones introducidas ejercieron algún efecto sobre los átomos de Cu catalíticos. En primer lugar se determinaron los potenciales medios ( $E^\circ$ ) del sitio T1 y del agrupamiento trinuclear T2/T3, tal y como se describe en el apartado 3.14 de Materiales y Métodos. Los parámetros cinéticos se determinaron a 25 °C variando la concentración de ABTS en medio acuoso. Todas las variantes presentaron cinéticas de Michaelis-Menten (**Tabla 4.9**).

#### 4.3.3.1 Determinación de los potenciales redox en los sitios T1 y T2/T3

Sorprendentemente, el  $E^\circ$  del sitio T1 para MtLT2 (+690 mV), fue muy superior a los valores descritos en la literatura para la lacasa de *Myceliophthora thermophila* expresada en *A. oryzae* (+465 mV) (Xu y cols., 1997) (**Figura 4.26**). Por ello, de manera paralela se decidió medir con nuestras condiciones experimentales la determinación del  $E^\circ$  del sitio T1 con la lacasa de *M. thermophila* expresada en *A. oryzae*, obteniéndose +690 mV que coincide con el valor obtenido para MtLT2. En este sentido, es importante reseñar que la estimación del potencial redox en esta Tesis Doctoral fue llevada a cabo mediante el empleo de una celda micro-espectroelectroquímica con un electrodo capilar de oro. La lacasa se deposita en la celda y mediante un potencióstato se transmiten los diferentes potenciales de manera precisa y de forma mediada estudiando los diferentes estados de oxido-reducción en el sitio T1. Los trabajos anteriores en los que se describe los potenciales redox de la lacasa de *M. thermophila*



hacen uso de estrategias de valoraciones redox con mezclas de mediadores parcialmente reducidos a diferentes concentraciones (Xu y cols., 1997), siendo por tanto métodos indirectos y menos precisos -son estimaciones bioquímicas y en nuestro caso son medidas electroquímicas (Shleev y cols., 2005a)-.

**Tabla 4.9.** Caracterización electroquímica y constantes catalíticas (con ABTS en medio acuoso) del tipo parental MtLT2 y los mutantes del proceso evolutivo. Cada uno de los valores procede de cinco experimentos independientes y en ninguno de los casos la desviación estándar superó el 10%.

Lacasa	E° cluster T2/T3 (mV, pH 7.0); $\Delta$ mV/pH <sup>1</sup>	E° sitio T1 (mV, pH 7.0) <sup>2</sup>	Constantes catalíticas con ABTS		
			$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
MtLT2 tipo parental	400; 50	690	28.3	120	0.23 x 10 <sup>6</sup>
<b>6C9</b> (1ª G)	n.d. <sup>3</sup>	n.d. <sup>3</sup>	60.0	109	0.55 x 10 <sup>6</sup>
<b>2B10</b> (2ª G)	n.d. <sup>3</sup>	700	97.5	105	0.92 x 10 <sup>6</sup>
<b>7H9</b> (2ª G)	390; 57	700	80.0	35	2.28 x 10 <sup>6</sup>
<b>3D1</b> (3ª G)	n.d. <sup>3</sup>	680	68.0	55	1.23 x 10 <sup>6</sup>
<b>2E9</b> (4ª G)	380; 60	630	85.0	24	3.55 x 10 <sup>6</sup>
<b>R2</b> (5ª G)	390; 57	700	93.5	16	5.85 x 10 <sup>6</sup>

<sup>1</sup> Valores extraídos de los experimentos de Voltamperometría cíclica.

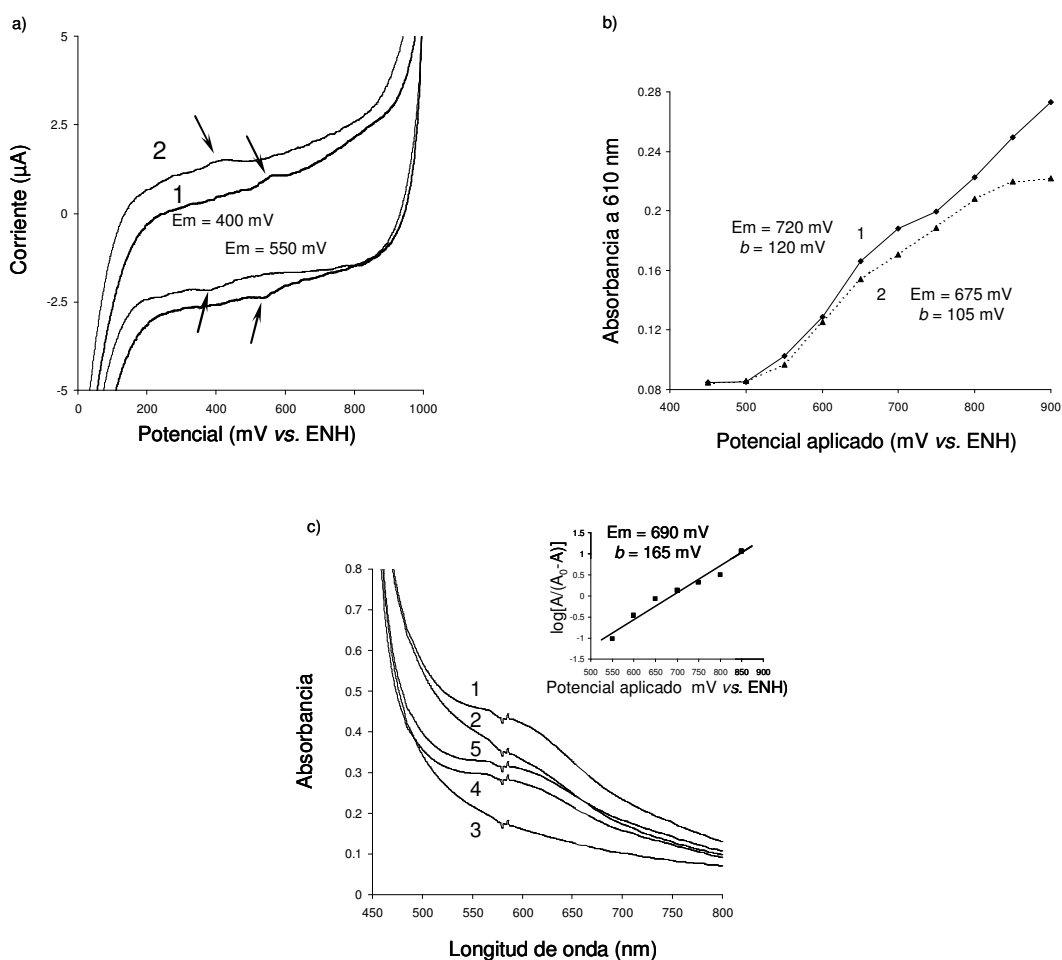
<sup>2</sup> Valores extraídos de los experimentos de valoración redox.

<sup>3</sup> n.d.: no determinado.

Respecto a los diferentes mutantes, aunque los E° de ambos sitios se vieron alterados en el transcurso de la evolución molecular, finalmente el último mutante R2 mostró unos E° similares a los del tipo parental MtLT2, -aproximadamente +700 mV en el sitio T1 y +400 mV en el agrupamiento trinuclear T2/T3. Como se puede apreciar en la **Tabla 4.9**, no existe una relación directa entre el aumento en la eficiencia catalítica y las variaciones en los E°.

Se realizaron las voltamperometrías cíclicas tanto de electrodos desnudos como impregnados con lacasas en soluciones saturadas de aire a pH 4.0 y 7.0. Tal y como puede observarse en el voltamograma cíclico (VC) (**Figura 4.26**) la corriente electrocatalítica en los electrodos modificados con lacasas comenzó en un potencial aproximado de +700 mV vs. electrodo normal de hidrogeno (ENH), muy cercano al del potencial redox del sitio T1, confirmando así el mecanismo recientemente propuesto de la función lacasa adsorbida en

electrodos de carbón (Shleev y cols., 2005b y 2005c). Más aún, el pronunciado proceso Faradaico detectado en los VCs podría atribuirse a la transformación redox de la porción de lacasa conectada a la superficie del electrodo a través del agrupamiento trinuclear T2/T3 (Shleev y cols., 2005a). Las transformaciones redox del cluster T2/T3 fueron casi reversibles (la diferencia entre los picos anódicos y catódicos no excedió de 20 mV) y altamente dependientes de pH (50-60 mV/pH).



**Figura 4.26.** Caracterización electroquímica.  $E_m$  se refiere al potencial redox medio. **a)** Voltamograma cíclico de la lacasa tipo parental MtLT2 adsorbida en SPGE (velocidad de barrido: 10 mV/s; potencial de inicio: 1000 mV; segundo barrido). Tampón citrato-fosfato 100 mM pH 4.0 (1) y pH 7.0 (2). **b)** Valoración redox mediada del mutante R2 en tampón fosfato 25 mM, pH 7.0 (38  $\mu\text{M}$  de lacasa; aproximadamente 300  $\mu\text{M}$  de cada uno de los mediadores; potencial de inicio +900 mV). Valoración reductiva (curva 1) y valoración oxidativa (curva 2). Inserto: parámetros promedio calculados a partir de ambas valoraciones, reductiva y oxidativa.  $b$ : pendiente de la curva. **c)** Espectro de las valoraciones del mutante R2, correspondientes a (1) la lacasa oxidada (+900 mV); (2) lacasa parcialmente reducida (+700 mV); (3) lacasa totalmente reducida (+450 mV); (4) lacasa parcialmente reoxidada y (5) lacasa reoxidada mediante aplicación del potencial inicial (+900 mV). Inserto: típica curva de Nernst de la dependencia del potencial aplicado ( $E$ ) vs. absorbancia a 610 nm y los parámetros promedio calculados a partir de las valoraciones. Para las caracterizaciones a, b y c también se realizaron valoraciones redox de la lacasa *T. hirsuta* como control.

#### 4.3.3.2 Estudio de la geometría y entorno químico de los cobres T1 y T2

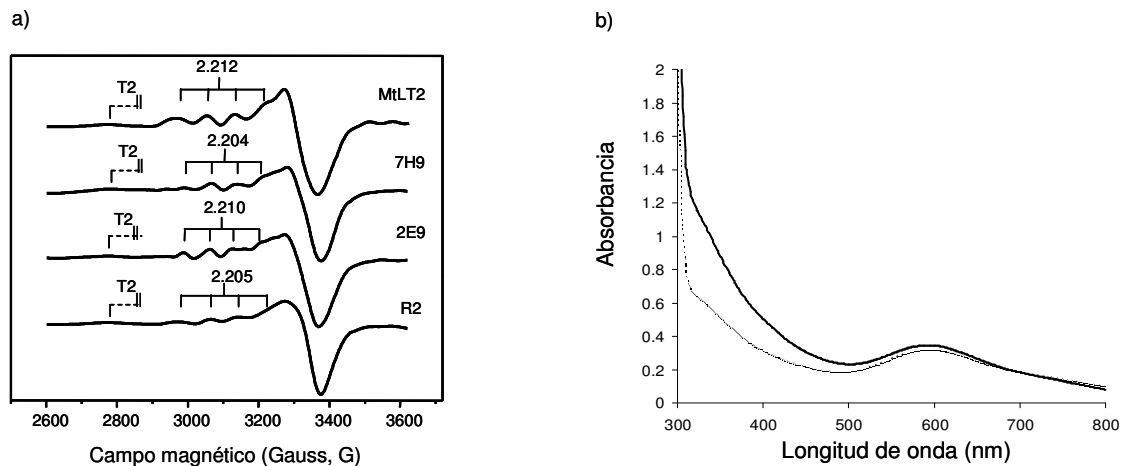
Para evaluar el efecto de las mutaciones en la estructura geométrica y electrónica de los sitios de cobre, se llevó a cabo la caracterización mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR) de las variantes purificadas (**Figura 4.27**). La comparación de los parámetros  $g_{||}$  y  $A_{||}$  del componente paralelo (extraído mediante simulación por ordenador de los correspondientes picos hiperfinos) de la señal del Cu T1 reveló que únicamente las mutaciones introducidas en la 2ª, 4ª y 5ª generación (variantes 7H9, 2E9 y R2, respectivamente) promovieron cambios pequeños pero apreciables en el entorno químico de este sitio (**Tabla 4.10**).

Desafortunadamente, respecto al sitio T2, los espectros sólo permitieron resolver los rasgos más externos de la componente paralela hiperfina de la señal correspondiente, lo que impidió sacar conclusiones definitivas de las modificaciones eventuales que pudieran haberse producido por las mutaciones en este sitio.

**Tabla 4.10.** Caracterización de EPR de la lacasa parental MtLT2 y las diferentes variantes del proceso de evolución molecular dirigida.

Lacasa	$g_{  }$	$A_{  }(\text{cm}^{-1})$
MtLT2 (tipo parental)	2.212	$8.0 \times 10^{-3}$
7H9 (2ª generación)	2.204	$7.9 \times 10^{-3}$
2E9 (4ª generación)	2.210	$7.4 \times 10^{-3}$
R2 (5ª generación)	2.205	$8.5 \times 10^{-3}$

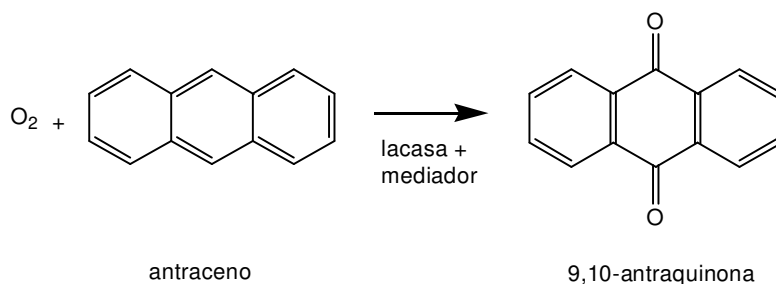
Con la finalidad de aportar información sobre posibles cambios eventuales en el agrupamiento trinuclear T2/T3, adicionalmente se registraron los espectros de absorbancia de las lacasas tipo parental MtLT2 y mutante R2. Como se muestra en la **Figura 4.27**, se obtuvieron espectros típicos de lacasa con señales para el sitio T1 (un pico alrededor de 600-610 nm) y T3 (un hombro alrededor de 330 nm). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la forma de los espectros y la intensidad de absorbancia en la región de 300-500 nm, indicando posibles cambios en la estructura del sitio T1 y en el agrupamiento T2/T3. La relación  $A_{330}/A_{610}$  del tipo MtLT2 fue mucho menor que en R2: 1.9 y 3.2, respectivamente, a pesar de que ambos poseen una banda de absorbancia azul de similar intensidad.



**Figura 4.27.** a) Espectro EPR a 77 K de las lacasas indicadas. b) Espectro de absorbancia de las lacasas tipo parental MlLT2 (línea discontinua) y del mutante R2 (línea continua).

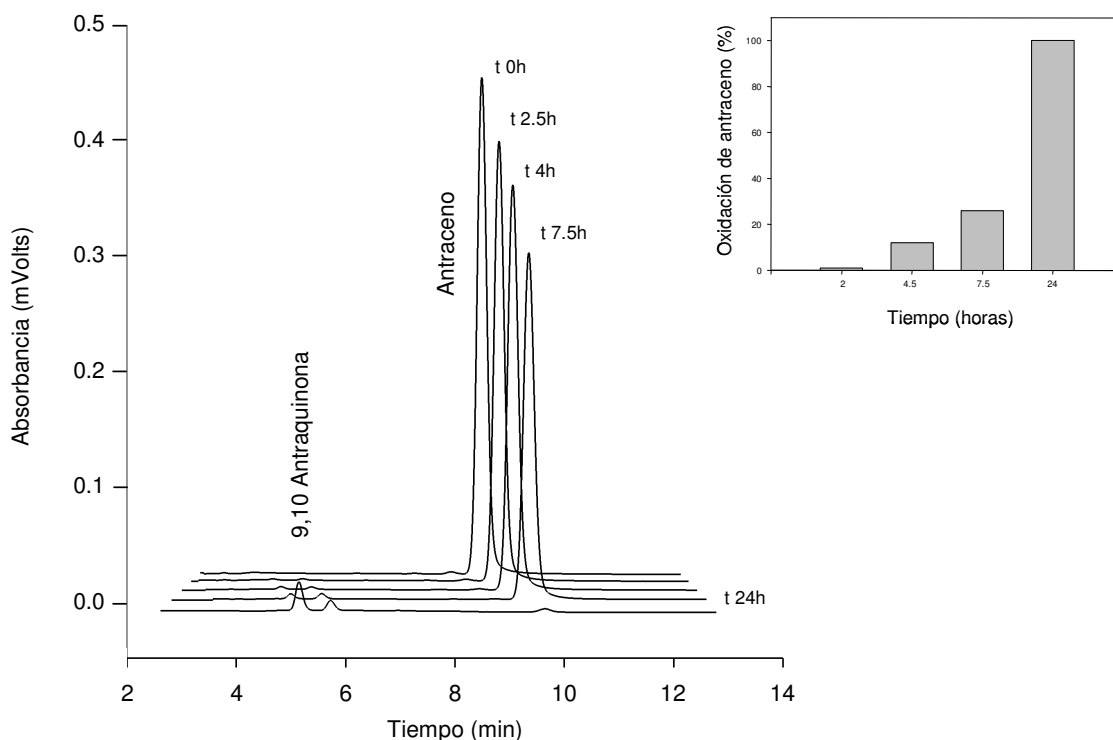
#### 4.4. TEST DE OXIDACIÓN DEL ANTRACENO

Las lacasas resistentes a elevadas concentraciones de disolventes orgánicos pueden constituir una interesante alternativa para la biorremediación de PAHs. Por este motivo, se consideró oportuno hacer un experimento para comprobar si los mutantes obtenidos por evolución dirigida eran capaces de oxidar eficientemente PAHs en presencia de cosolventes orgánicos. Se escogió como sustrato el antraceno por tratarse de un compuesto modelo que muestra una orientación de anillos aromáticos fusionados similar a la de los PAHs carcinogénicos más complejos. Se utilizó el sistema lacasa-mediador (**Figura 4.28**) constituido por el mutante 2B10 (2ª generación) y el mediador artificial ABTS, en presencia de 20% (v/v) de acetonitrilo para favorecer la solubilidad del PAH (Zumárraga y cols., 2007d).



**Figura 4.28.** Reacción de oxidación del antraceno en presencia de lacasa y mediador.

La biotransformación del antraceno se analizó mediante HPLC observando una completa oxidación tras 24 h de reacción (**Figura 4.29**).



**Figura 4.29.** Cromatogramas a diferentes tiempos de incubación de la reacción de oxidación del antraceno por la lacasa 2B10 en presencia de ABTS y 20% de acetonitrilo (v/v). Inserto: porcentaje de oxidación del antraceno por el sistema lacasa-mediador.

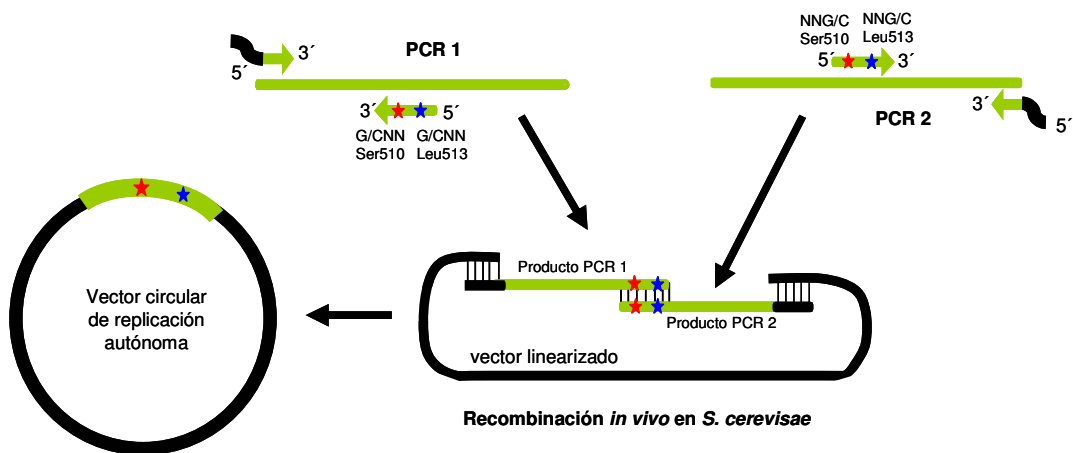
## 4.5. ESTUDIOS “SEMI-RACIONALES”

### Consideraciones generales

La puesta a punto del método de crecimiento de *S. cerevisiae* en microplacas junto con la expresión funcional de MtLT2 fue aprovechada no sólo para evolucionar MtLT2 en cosolventes sino para llevar a cabo estudios *semi-racionales*. De esta manera, se consideró apropiado evaluar en MtLT2 diferentes residuos implicados *a priori* en el potencial redox de la enzima y en su actividad catalítica. Dichos experimentos se llevaron a cabo mediante mutagénesis saturada combinatorial, donde cada posición pudo ser sustituida por los 20 aminoácidos naturales para a continuación acoplar las genotecas a un método de HTP-*screening* y seleccionar aquellos clones con mayor actividad de oxidación del ABTS.

#### 4.5.1. CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS MEDIANTE IVOE

Para llevar a cabo la mutagénesis saturada combinatorial, se diseñó una nueva estrategia que hemos denominado IVOE (*In Vivo Overlap Extension*) (Alcalde y cols., 2006). IVOE se basa en el empleo de la elevada frecuencia de recombinación homóloga de la maquinaria celular eucariótica. De una manera precisa y no mutagénica, la levadura reensambla fragmentos de DNA (producidos *in vitro* y mutagenizados en los correspondientes codones) fusionando el gen reparado con el plásmido linearizado, y evitando así un paso intermedio de ligación *in vitro* (Figura 4.30).



**Figura 4.30.** Estrategia de IVOE para la mutagénesis saturada combinatorial en dos codones. Para la primera reacción de PCR (PCR 1), se diseñó una extensión en el extremo N-terminal con 40 pb de homología con el extremo *Bam*HI del vector linearizado. Para la segunda reacción de PCR (PCR 2), se diseñó una extensión en el extremo C-terminal con 66 pb de homología con el extremo *Xho*I del vector linearizado. La mutagénesis saturada combinatorial sobre las posiciones Ser510 y Leu513 se llevó a cabo usando oligonucleótidos cebadores degenerados (NNG/C para cada triplete diana) con 15 pb y 13 pb a ambos lados de los sitios de mutación.

En términos generales, en primer lugar se realizan dos reacciones de mutagénesis saturada mediante PCR, usando oligonucleótidos cebadores (degenerados en los codones a mutagenizar) y que comparten secuencias homólogas en los extremos 3' y 5' respectivamente. Los productos de estas reacciones de PCR se emplean directamente para transformar células de *S. cerevisiae*. De esta manera, la maquinaria celular de la levadura recombina estos fragmentos a través de sus áreas de homología dando lugar al gen completo. Además, la recombinación no sólo reensambla los dos fragmentos en un gen reparado, sino que también "baraja" los codones mutagenizados. Asimismo, los genes completos contienen grandes extensiones (en torno a 50 pb) que recombinan con los extremos del vector linearizado - introducido durante la transformación- formando un plásmido de replicación autónoma. En cualquier caso, es difícil averiguar qué suceso ocurre en primer lugar: el reensamblaje de los fragmentos de PCR entre sí o su unión al plásmido linearizado, de hecho, parece factible que

ambos eventos transcurran simultáneamente. Con este protocolo, se consiguen unas eficientes transformaciones (similares a las que se pueden producir con un vector circular), por lo que se puede acoplar fácilmente a un protocolo de HTP-*screening*.

#### 4.5.2. TAMAÑO DE LA LIBRERÍA Y DISEÑO DEL ÁREA DE RECOMBINACIÓN

El tamaño de la librería de mutagénesis saturada combinatorial depende estrictamente del código genético, del tipo de codón mutagénico y del número de residuos elegidos para la mutagénesis (Arnold y Georgiou, 2003). La mutagénesis saturada de los aminoácidos de interés se consigue mediante el uso de oligonucleótidos cebadores degenerados en los correspondientes codones en estudio (representados por NNN, donde N es cualquiera de las cuatro bases nucleotídicas, A, C, T y G). De este modo, si se somete un único codón a este protocolo, se generarían 64 variantes a nivel de DNA, mientras que si se hace sobre dos o tres codones simultáneamente, se producirían 4096 y 262144 variantes, respectivamente. Evidentemente, el número de variantes incrementa rápidamente cuantos más codones sean randomizados, excediendo la capacidad efectiva del *screening* (en nuestro caso por debajo de 10000 clones por generación).

Por ello, se decidió aplicar restricciones controladas para reducir el número de variantes a explorar, manteniendo la calidad de la genoteca. Para ello se preparó una estrategia basada en una randomización NNG/C en lugar de la NNN. De esta forma, el número posible de codones se reduce a 32, la complejidad de la secuencia disminuye y los aminoácidos más comunes (Leu, Arg, Ser) son codificados por sólo tres codones en lugar de seis (**Tabla 4.11**). Además, el tamaño de la librería se reduce a la mitad y el número de codones de terminación a uno. En resumen, la utilización de oligonucleótidos degenerados NNG/C, disminuye considerablemente el número de variantes a explorar, mientras que todos los aminoácidos posibles siguen siendo accesibles (Sun, 2003; Georgescu y cols., 2003).

**Tabla 4.11.** Análisis estadístico de las librerías generadas mediante la randomización NNG/C.

Número de codones <i>randomizados</i>	Número de variantes generados a nivel de DNA	Número de variantes generados a nivel de proteína
1	32	20
2	1024	400
3	32768	8000
4	1048576	160000
5	33554432	3200000
6	1073741824	64000000

#### 4.5.3. MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL SOBRE LOS RESIDUOS 510 Y 513

La validación del método IVOE se llevó a cabo empleando el gen de MtLT2 como tipo parental y sometiendo a mutagénesis saturada combinatorial dos posiciones implicadas en el potencial redox del sitio T1 ( $E^{\circ}_{T1}$ ) de la lacasa: la Ser510 y la Leu513. El residuo Ser510 es parte del tripéptido  ${}_{509}\text{VSG}_{511}$  -altamente conservado en las lacasas de bajo potencial redox-, localizado en las proximidades del sitio de unión del sustrato reductor. La Leu 513 es el ligando axial no-coordinante del Cu T1 aparentemente esencial para el  $E^{\circ}_{T1}$  (ver apartado 1.3.5 de la Introducción) (Xu y cols., 1998 y 1999; Palmer y cols., 2003). Ambos residuos se sometieron a mutagénesis saturada combinatorial empleando oligonucleótidos degenerados con codones NNG/C. Las posiciones 510 y 513 se encuentran separadas en el gen de MtLT2 por sólo 6 pb, lo cual permitió incluir los dos codones a mutagenizar en el mismo oligonucleótido degenerado. Los oligonucleótidos degenerados (3CPO directo e inverso) se diseñaron de manera que los codones NNG/C se localizaran en el centro del oligonucleótido, para que durante el anillamiento de la PCR estuvieran flanqueados por 15 y 13 pb (**Figura 4.30**). Los dos fragmentos de PCR sintetizados tenían una homología de 40 pb, proveniente del tamaño de los propios oligonucleótidos degenerados utilizados en su amplificación, lo cual facilitó su recombinación *in vivo*. Empleando secuencias homólogas mayores de 50 pb la eficiencia de clonación no varió significativamente. Las extensiones para la recombinación con el vector linearizado fueron de 40 y 66 pb. Con extensiones homólogas inferiores a 20 pb la eficiencia de transformación disminuyó significativamente. Es importante señalar que durante la preparación del experimento, las extensiones y las regiones con homología de secuencia fueron diseñadas con el fin de que recombinasen específicamente sin alterar el marco de lectura, lo cual garantizó la calidad de la genoteca. Las características de los oligonucleótidos degenerados utilizados en los diferentes experimentos de mutagénesis saturada combinatorial se detallan en la **Tabla 4.12** (sus secuencias se encuentran en el apartado 3.8.4 de Materiales y Métodos).

**Tabla 4.12.** Características de los oligonucleótidos degenerados utilizados en los diferentes experimentos de mutagénesis saturada combinatorial.

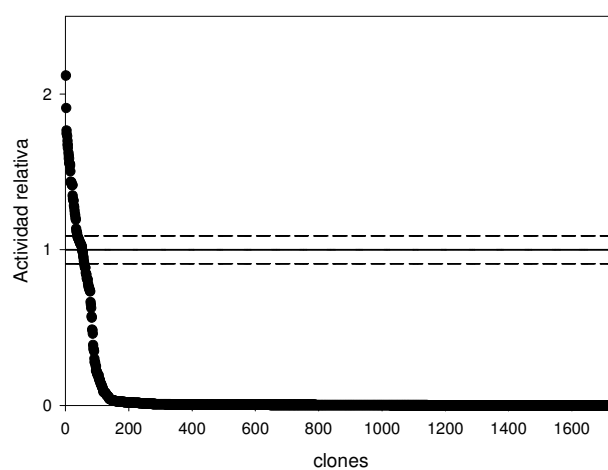
Oligonucleótidos degenerados	Homología entre ambos oligonucleótidos (pb)	Distancia entre los codones randomizados (pb)	Distancia desde el codón degenerado hasta los extremos del oligonucleótido (pb)	Tamaño de las extensiones homólogas con el plásmido linearizado (pb)
3CPO directo y 3CPO inverso	40	6	15 y 13	40 y 66
TRIF directo y TRIR inverso	50	0 <sup>1</sup>	22 y 20	40 y 66
BOBDIR directo y BOBREV inverso	54	0 <sup>1</sup>	26 y 22	40 y 66
PLUGDIR directo y PLUGREV inverso	54	0 <sup>1</sup>	20 y 22	40 y 66

<sup>1</sup> Codones consecutivos



Bajo estas premisas, se construyó una librería de 1740 clones que fueron explorados para su actividad sobre ABTS. Únicamente el 3% de los clones mostraron mejoras respecto al tipo parental MtLT2 y el 93.1% tuvo menos del 10% de la actividad de MtLT2 (**Figura 4.31**).

Tras dos *re-screenings* consecutivos sólo un mutante (7E1) presentó mejoras significativas (1.7 veces mayor actividad que MtLT2). La secuencia de 7E1 reveló mutaciones en los dos codones sometidos a estudio: la posición 513 sufrió una mutación silenciosa, y en la 510 se produjo una mutación beneficiosa -por ello única responsable del aumento de la actividad catalítica- (**Tabla 4.13**).



**Figura 4.31.** Paisaje del experimento de mutagénesis saturada combinatorial sobre las posiciones Ser510 y Leu513. La actividad de los clones de la librería de mutantes se representa en orden descendente. La línea continua horizontal indica la actividad del tipo parental. Las líneas discontinuas representan el coeficiente de varianza del ensayo (inferior al 10%).

**Tabla 4.13.** Mutante seleccionado en la librería de mutagénesis saturada combinatorial/IVOE sobre las posiciones 510 y 513.

Lacasas	Cambios de nucleótidos Cambios de aminoácidos		Mejora <sup>1</sup>
MtLT2 parental	—		1
<b>7E1</b>	(TCG/GGG) <b>S510G</b>	(CTG/TTG) <b>L513L</b> <sup>2</sup>	1.7

<sup>1</sup> Mejoras con respecto a la actividad del parental (MtLT2) tras el *screening* con ABTS 3 mM en tampón acetato 100 mM pH 4.5.

<sup>2</sup> Mutación silenciosa.

Curiosamente, la mutación  ${}_{(TCG)}S510G_{(GGG)}$  no se puede conseguir mediante la sustitución de un único nucleótido. El hecho de que ocurran dos cambios de nucleótidos consecutivos mediante las técnicas convencionales de PCR mutagénica es altamente improbable, lo cual indica que dicho cambio no podría haber sido descubierto mediante evolución dirigida convencional (**Tabla 4.14**).

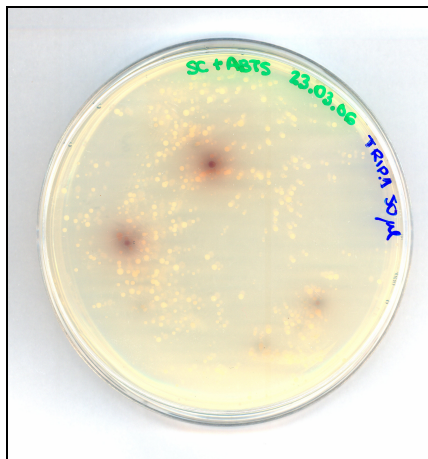
**Tabla 4.14.** Comparación entre la mutación conseguida mediante IVOE en la posición 510 y los posibles cambios dependientes de una única base nucleotídica.

Mutación beneficiosa de la variante 7E1 <sup>1</sup>	Aminoácidos accesibles mediante la sustitución de una única base <sup>1</sup>
S510G (TCG <sub>8,6</sub> /GGG <sub>6,0</sub> )	L(TTG <sub>27,2</sub> ); P(CCG <sub>5,3</sub> ); T(ACG <sub>8,0</sub> ); A(GCG <sub>6,2</sub> ); W(TGG <sub>10,4</sub> )

<sup>1</sup> Los números del subíndice indican el uso de los correspondientes codones en *S. cerevisiae* (frecuencia de uso/1000).

#### 4.5.4. MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL SOBRE EL TRIPÉPTIDO CONSERVADO ${}_{509}VSG_{511}$ Y SU RELACIÓN CON LA TAPA C-TERMINAL ${}_{556}DSGL_{559}$

El incremento de actividad observado en 7E1 debido a la mutación  ${}_{(TCG)}S510G_{(GGG)}$  indicó la importancia de dicho residuo en el comportamiento catalítico de la lacasa. Como se señaló anteriormente, el residuo 510 forma parte del segmento  ${}_{509}VSG_{511}$  de MtLT2. La composición de aminoácidos de dicho tripéptido en las lacasas fúngicas parece tener relación con diferentes valores de  $E^{\circ}_{T1}$  (Xu y cols., 1998), por lo que se consideró apropiado someter a mutagénesis saturada combinatorial el tripéptido completo  ${}_{509}VGG_{511}$  de la variante 7E1. Como se ha explicado previamente, realizar mutagénesis saturada combinatorial en tres o más posiciones eleva considerablemente el número de variantes a explorar (ver Tabla 4.11), lo cual complica sobremanera su estudio mediante métodos de *screening* en fase líquida. Por ello, decidimos incorporar un *pre-screening* en fase sólida con ABTS como sustrato. Teniendo en cuenta que la mayor parte de la librería sería inactiva (tal y como sucedió en el caso de la librería sobre Ser510 y Leu513), la incorporación de este *pre-screening* discriminaría la mayor parte de los mutantes inactivos. Por este motivo, el posterior *screening* en fase líquida se limitó únicamente a aquellos clones con actividad equivalente o superior a la del parental 7E1 en placa Petri (detectada mediante la aparición de un halo alrededor de la correspondiente colonia (apartado 3.6.2 de Materiales y Métodos) (**Figura 4.32**).

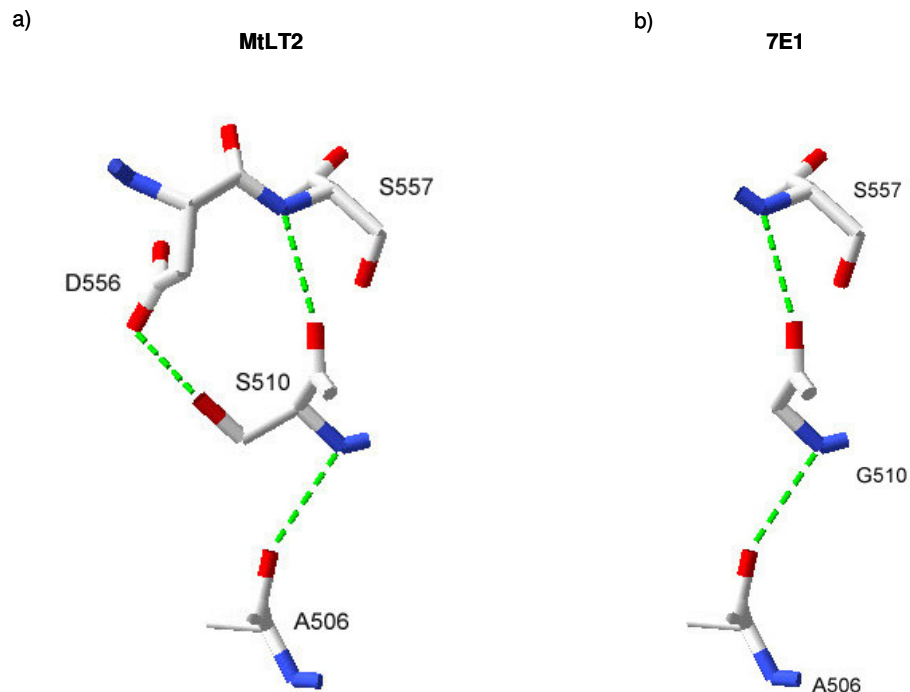


**Figura 4.32.** Pre-*screening* en fase sólida en placas SC *drop-out* con ABTS empleado en la exploración de la librería  $_{509}$ VSG $_{511}$ . Las colonias que presentaron un halo verde → púrpura se seleccionaron para el posterior *screening* en fase líquida (microcultivo en placas de 96 pocillos).

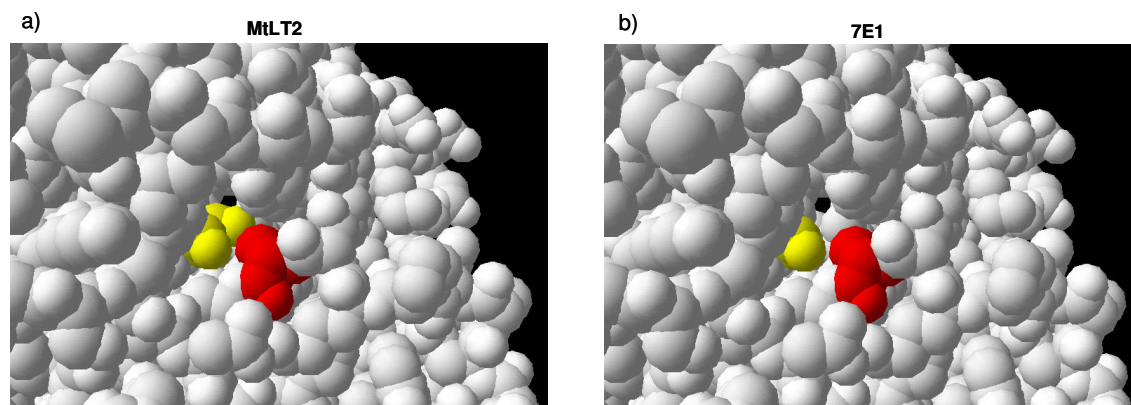
Durante el pre-*screening* en fase sólida de más de 20000 colonias, aproximadamente 400 clones (2% de la librería) mostraron una actividad cercana a la del parental 7E1. Dichos clones fueron seleccionados y explorados en fase líquida. Las mejores variantes fueron secuenciadas, *redescubriendo* en todos los casos únicamente la mutación S510G de la variante 7E1.

Por este motivo, se decidió construir un modelo tridimensional con el fin de localizar las interacciones de la posición 510. Para ello, se empleó la estructura de la lacasa de *Melanocarpus albomyces* (Hakulinen y cols., 2002) -con una homología de secuencia del 75% con M<sub>t</sub>LT2-.

En M<sub>t</sub>LT2, la Ser510 enlaza con el Asp556 a través de un puente de hidrógeno (**Figura 4.33**). El residuo Asp556 forma parte de la tapa C-terminal  $_{556}$ DSGL $_{559}$ , una estructura altamente conservada en las lacasas de Ascomicetes (ver apartado 1.3.3 de Introducción). Recientemente, se ha sugerido que esta tapa C-terminal podría afectar la función del agrupamiento trinuclear T2/T3 mediante cambios conformacionales desconocidos hasta el momento, pero que parecen regular la entrada de oxígeno y la salida de agua del sitio T2/T3 a través de un canal que conecta con el exterior (Hakulinen y cols., 2002). En la variante 7E1, la interacción entre la Ser510 y el Asp556 se rompe y como consecuencia se ensancha el túnel que conduce al sitio trinuclear T2/T3, debido a la eliminación de la cadena lateral de la Ser510 (**Figura 4.34**).



**Figura 4.33.** Interacciones locales en la posición 510 en (a) la lacasa tipo parental MlLT2 y (b) tras la mutación S510G (variante 7E1).



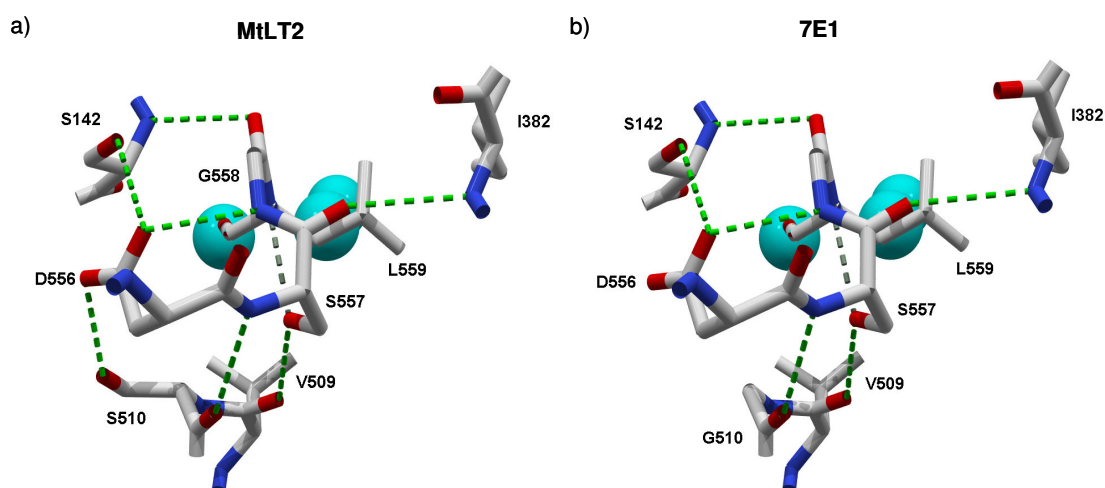
**Figura 4.34.** a) Posición relativa de la Ser510 (en amarillo) y el Asp556 (en rojo) en lacasa parental MlLT2. b) Tras la mutación en la variante 7E1, la Gly510 (amarillo) aumenta el tamaño del túnel de acceso al agrupamiento trinuclear.

En vista de esta información, se consideró apropiado inspeccionar todas las posibles interacciones de la tapa C-terminal con los residuos circundantes. El examen del modelo molecular reveló una compleja red de interacciones mediante puentes de hidrógeno de la tapa

C-terminal, no solamente con la Ser510 sino también con otros residuos próximos (Ser142, Ile382 y Val509) (**Tabla 4.15, Figura 4.35**).

**Tabla 4.15.** Interacciones (puentes de hidrógeno) de la tapa C-terminal de MtLT2. En negrita los residuos de la tapa C-terminal.

Tapa C-terminal	Interacciones			
<b>D556</b>	S142	S510	<b>G558</b>	
<b>S557</b>	I382	V509	S510	<b>L559</b>
<b>G558</b>	S142	<b>D556</b>		
<b>L559</b>	<b>S557</b>			



**Figura 4.35.** Interacciones de la tapa C-terminal ( $_{556}\text{DSGL}_{559}$ ) en (a) MtLT2 y (b) en la variante 7E1. Las esferas azules representan los átomos de cobre del agrupamiento trinuclear y las líneas de puntos verdes los enlaces de hidrógeno.

Es importante destacar que en MtLT2 la tapa C-terminal va seguida de una extensión C-terminal de 14 aminoácidos que es escindida durante la maduración de la proteína en los procesos post-traduccionales, y cuya función tampoco se conoce (Kiiskinen y Saloheimo, 2004). El alineamiento parcial de la secuencia de aminoácidos de la lacasa MtLT2 con otras lacasas de Ascomycetes indica que el extremo C-terminal puede o no contener esta extensión que precede a la tapa C-terminal (**Figura 4.36**). Este tipo de homología en el extremo C-terminal no están descritas para las lacasas de Basidiomycetes.

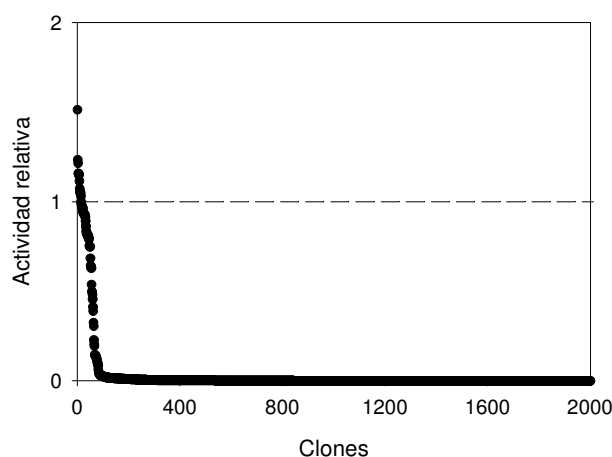
<b>Sc. minor</b>	525	HCHIAWHASEGLAMQFVSESSIA--IGMKDTQIFDNTCKNNNA <sup>Y</sup> VPTE-VFPQDDSGI-----	580
<b>Sc. sclero</b>	525	HCHIAWHASEGLAMQFVSESSIA--IGMKDTEIFDNTCKNNNA <sup>Y</sup> VPTE-VFPQDDSGI-----	580
<b>Mo. fruct</b>	529	HCHIAWHASEGLAMQFVSESSIA--VRMKDTAIFEDTCSNNNA <sup>Y</sup> VPGE-LFAEDDSGI-----	584
<b>Bo. fuc</b>	504	HCHIAWHASEGLALQFVSESSILPTIGTADVSTFQNTCAAWKAW <sup>T</sup> PTE-PFPQDDSGI-----	561
<b>MtLT2</b>	548	HCHIAWHVSGGLGVVYLERADDLRGAVSDADDDFDRLCADWRR <sup>Y</sup> WPTN-PNPKSDSGLKRR-WVEEG-EWLVKA	620
<b>7E1</b>	548	HCHIAWHVGGGLGVVYLERADDLRGAVSDADDDFDRLCADWRR <sup>Y</sup> WPTN-PNPKSDSGLKRR-WVEEG-EWLVKA	620
<b>Me. albomy</b>	551	HCHIAWHVSGGLSVDFLERPADLRQRISQBEDDFNRVCDEWRA <sup>Y</sup> WPTN-PYPKIDSGLKRRRWVEES-EWLVK-	623
<b>Po. anser</b>	547	HCHIAWHVSGGLSVQYLERPNDLRNGFSQADKNQHNNCNANRA <sup>Y</sup> WPTN-PFPKIDSGLKVKK <sup>W</sup> VGEHPDWYIKN	621
<b>Ne. crass</b>	547	HCHIAWHVSGGLSNQFLERAQDLRNSISPADKKAFNDNCDANRA <sup>Y</sup> FPDNAPFPKDDSGLSG--VKAR-EVKMKW	619
<b>Cr. parasi</b>	532	HCHIAWHVSAGLGNTFLRQPSAFVAGLNTNDVNQLNSOCKSNNA <sup>Y</sup> YPSKDI <sup>F</sup> KQDDSGV-----	591
<b>Ga. gramin</b>	526	HCHIAWHVAQGLSVQFLERVQDIPSAFP---LSAIEPTCSONTA <sup>Y</sup> YATS-PHKQHD <sup>S</sup> GL-----	581
<b>Co. lagena</b>	534	HCHIAWHVSMGLSVQFLERKDEITSALK---LETLDQTCTW <sup>KD</sup> YAHAA-FYPKYDSGL-----	589
<b>Ho. acido</b>	547	HCHIAWHVSAGLYVSIENP-----TAIKSMHIPKPA <sup>W</sup> WTGKDV <sup>PD</sup> IDSGL-----	594

**Figura 4.36.** Alineamiento parcial de la secuencia de aminoácidos de la lacasa MtLT2 y la variante 7E1 con otras lacasas de Ascomycetes con el mismo tipo de extremo C-terminal (con o sin extensión). Las secuencias se alinearon con el programa Clustal W multi-sequence alignment (Thompson y cols., 1994). Recuadrado en rojo, los cuatro residuos que forman la tapa C-terminal. Sc. minor, lacasa de *Sclerotinia minor* Lacc2 (ABM21603); Sc. clero, lacasa de *Sclerotinia sclerotiorum* Lacc2 (ABM21604); Mo. fruct., lacasa de *Monilinia fructigena* Lacc2 (ABM21605); Bo. fuc, lacasa de *Botryotinia fuckeliana* Lacc1 (Q12570); Me. albomy, lacasa de *Melanocarpus albomyces* (Q70KY3); Po. anser, lacasa de *Podospora anserina* (P78722); Ne. crass, *Neurospora crassa* (AAA33591); Cr. parasi, lacasa de *Cryphonectria parasitica* (Q03966); Ga. gramin, lacasa de *Gaeumannomyces graminis* var. (CAD10749); Co. lagena, lacasa de *Colletotrichum lagenarium* (BAB32575); Ho. acido, lacasa de *Hortaea acidophila* Lacc1 (AA33970).

El procesamiento del extremo C-terminal en MtLT2 junto con el incremento de actividad tras la mutación en la posición 510, sugieren que la tapa C-terminal debe tener una función importante en la funcionalidad de las lacasas de Ascomycetes. Por esta razón se consideró interesante investigar adicionalmente la tapa C-terminal mediante mutagénesis saturada combinatorial.

#### 4.5.5. MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL DE LOS RESIDUOS G558 Y L559

En primer lugar, y ya que el aminoácido en la posición 559 es el menos conservado de los cuatro que forman la tapa C-terminal (pudiendo ser Ile/Leu/Val, ver Figura 4.36), la Leu559 se sometió a mutagénesis saturada combinatorial junto con el residuo vecino Gly558. Partiendo de 7E1, se creó una librería de 3000 variantes en la que el 96% de los clones retuvieron menos del 10% de la actividad del tipo parental (**Figura 4.37**). Esta elevada inactivación indica que los aminoácidos mutagenizados son esenciales para la funcionalidad de la enzima. Aproximadamente el 0.7% de los clones mostraron una actividad similar a la del tipo parental 7E1, pero en ningún caso superior. La **Tabla 4.16** recoge las variantes secuenciadas.



**Figura 4.37.** Paisaje de la librería construida mediante mutagénesis saturada combinatorial sobre las posiciones 558 y 559. La actividad de los clones de la librería de mutantes se representa en orden descendente. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental.

**Tabla 4.16.** Mutantes de la librería  $_{558}GL_{559}$ .

Lacasa	Cambios de nucleótidos Cambios de aminoácidos		Mejora <sup>1</sup>
7E1 parental	—————		1
<b>2D8</b>	(GGC/AAC) <b>G558N</b>	(ACC/AGC) <b>L559N</b>	1.1
<b>8C1</b>	(GGC/AGG) <b>G558R</b>	(CTC/AAG) <b>L559K</b>	0.5
<b>18D9</b>	(GGC/CCC) <b>G558P</b>	(CTC/CCC) <b>L559P</b>	0
<b>7D7</b>	(GGC/GGG) <b>G558G</b>	(CTC/GGG) <b>L559G</b>	0

<sup>1</sup> Mejora en la actividad con respecto a la lacasa parental 7E1.

#### 4.5.6. MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL DE LAS CUATRO POSICIONES DE LA TAPA C-TERMINAL ( $_{556}DSGL_{559}$ )

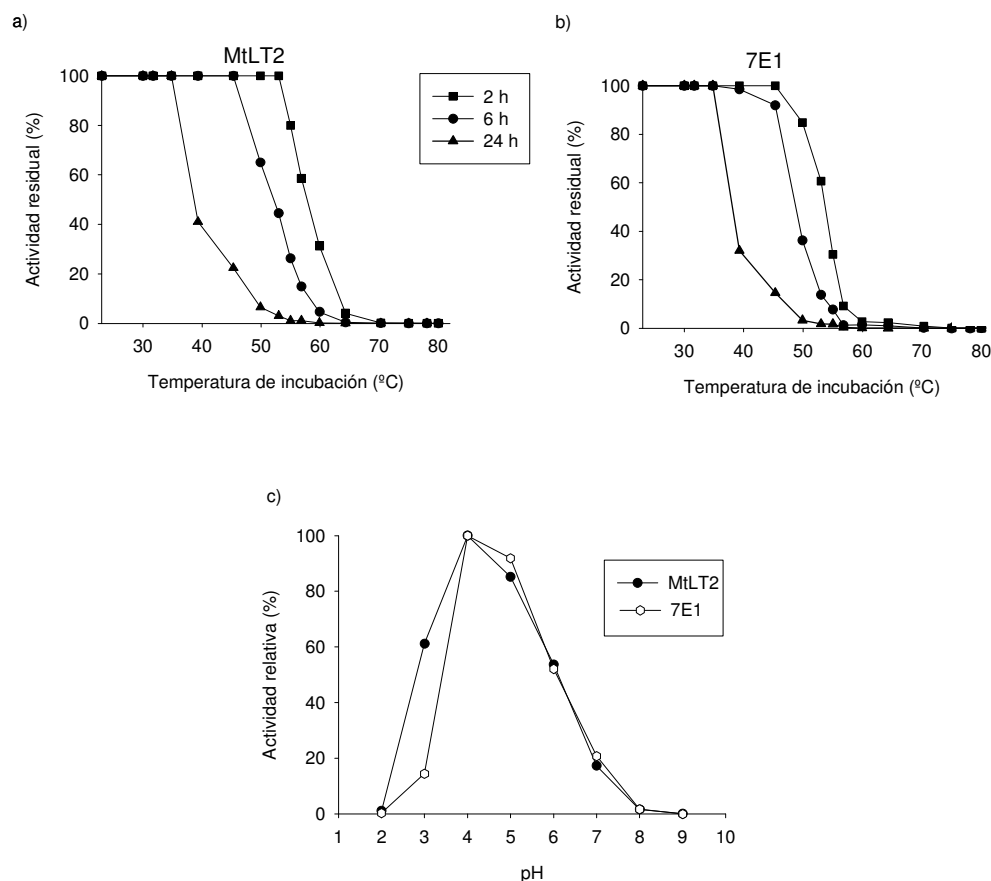
Finalmente, los cuatro residuos que componen la tapa C-terminal fueron sometidos a mutagénesis saturada combinatorial. Se realizó el *pre-screening* de 150000 clones de los cuales sólo el 1.9% fueron activos y ninguno de ellos mostró, tras el *screening* en fase líquida, mayor actividad que el parental 7E1.

## 4.6. ESTUDIO DE LA VARIANTE 7E1

Después de explorar más de 170000 clones a lo largo de cuatro experimentos consecutivos de mutagénesis saturada combinatorial, en todos los casos las mejores variantes incorporaron exclusivamente la mutación S510G, que fue determinada preliminarmente en la variante 7E1 durante el primer experimento de mutagénesis saturada. Así pues, se procedió a purificar y a caracterizar bioquímica- y espectro-electroquímicamente el mutante 7E1.

### 4.6.1. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA VARIANTE 7E1

La termoestabilidad de 7E1 se redujo tras la mutación y su perfil de pH se vio alterado en la región ácida, en particular a pH 3.0 (**Figura 4.38**).



**Figura 4.38.** Termoestabilidad de MtlT2 (**a**) y de 7E1 (**b**). Las actividades se midieron con ABTS 3 mM en tampón Britton y Robinson 100 mM. Las actividades se normalizaron con la actividad inicial a temperatura ambiente antes de la incubación. Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes. **c**) Perfiles de actividad a diferentes pHs de MtlT2 y la variante 7E1. Las actividades se midieron con ABTS 3 mM en tampón Britton y Robinson 100 mM pH 4.5. La actividad lacasa se representa normalizada con respecto a su valor óptimo de actividad. Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes.

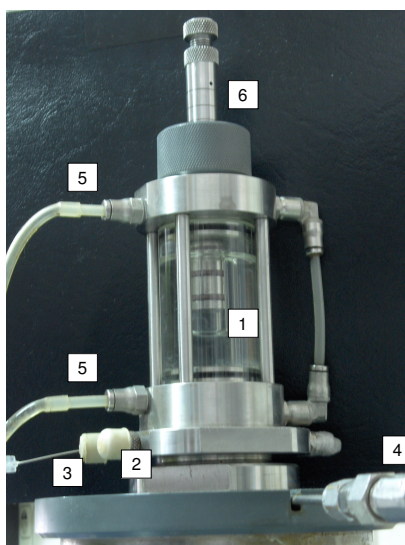


Los diferentes parámetros cinéticos del mutante 7E1 frente a un sustrato fenólico (2,6-DMP) y otro no fenólico (ABTS) se resumen en la **Tabla 4.17**. 7E1 muestra eficiencias catalíticas ( $k_{cat}/K_m$ ) 3.3 y 8.4 veces mayores que las del parental MtLT2, con ABTS y 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) respectivamente. La drástica reducción de la  $K_m$  para el 2,6-DMP podría indicar que la mutación S510G permite un mejor ajuste para las estructuras fenólicas en el sitio de unión T1.

**Tabla 4.17.** Constantes catalíticas de sustratos reductores no fenólicos (ABTS) y fenólicos (2,6-DMP).

Lacasa	Constantes catalíticas con ABTS				Constantes catalíticas con 2,6-DMP			
	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} M^{-1}$ )	Mejora	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} M^{-1}$ )	Mejora
MtLT2	28.3	120	$2.3 \times 10^5$	1	25.8	175	$1.4 \times 10^5$	1
7E1	96.7	125	$7.7 \times 10^5$	3.3	65.9	56	$11.7 \times 10^5$	8.4

Se puso a punto un nuevo método para estimar con precisión los valores cinéticos en función del consumo de  $O_2$  en reacciones catalizadas por la lacasa. Para ello, se conectó una celda de reacción a un espectrómetro de masas con el fin de estimar el consumo directo de  $O_2$  en presencia del sustrato reductor ABTS. La velocidad de consumo del  $O_2$  en la celda se pudo medir a diferentes concentraciones de gas, determinando así la  $K_m^{O_2}$  (**Figura 4.39**). Como se puede apreciar en la **Tabla 4.18**, los valores de  $K_m^{O_2}$  aumentaron significativamente en 7E1.



**Figura 4.39.** Dispositivo para la medida de la  $K_m^{O_2}$ . **1)** Celda de reacción. **2)** Entrada de las muestras. **3)** Entrada de los gases. **4)** Salida al espectrómetro de masas. **5)** Entradas para la termostatación de la celda. **6)** Tapa de la celda de reacción.

**Tabla 4.18.** Constantes cinéticas basadas en el consumo de oxígeno molecular para la oxidación del ABTS.

Lacasa	Cinéticas basadas en el consumo de O <sub>2</sub>		
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m^{O_2}$ (μM)	$k_{cat}/K_m^{O_2}$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
<b>MtLT2</b>	39.2	160	0.25 x 10 <sup>6</sup>
<b>7E1</b>	49.8	240	0.20 x 10 <sup>6</sup>

#### 4.6.2. CARACTERIZACIÓN ESPECTRO-ELECTROQUÍMICA DE 7E1

Para evaluar el efecto de la mutación S510G en el tránsito de electrones se realizaron diferentes estudios espectroelectroquímicos (**Tabla 4.19, Figura 4.40**). En primer lugar se obtuvieron los correspondientes espectros de EPR, apreciándose ligeros cambios en la señal del Cu T1. Como sucedió con los mutantes evolucionados en disolventes, no se pudo conseguir una señal adecuada para el Cu T2, lo que impidió extraer conclusiones acerca de posibles alteraciones de este átomo.

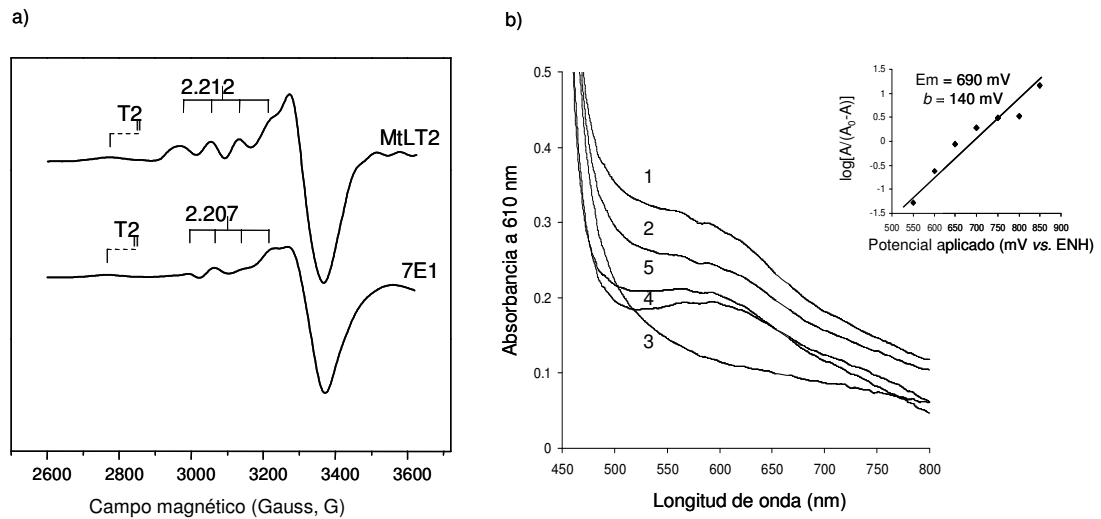
Paralelamente, se llevaron a cabo experimentos de estimación de potenciales redox (E°) en los sitios T1 y T2/T3. El E° del sitio T1 no varió significativamente en 7E1. Estos resultados concuerdan con trabajos de caracterización electroquímica previos de la lacasa de *Myceliophthora thermophila*, en los que el triple mutante <sup>509</sup>VGG<sub>511/509</sub>LEA<sub>511</sub> no mostró una alteración significativa del potencial redox en T1 aunque sí que varió su comportamiento cinético (Xu y cols., 1998).

**Tabla 4.19.** Caracterización espectro-electroquímica.

Lacasa	E° cluster T2/T3 (mV, pH7.0); ΔmV/pH <sup>1</sup>	E° sitio T1 (mV, pH 7.0) <sup>2</sup>	EPR del sitio T1	
			$g_{  }$	$A_{  }$ (cm <sup>-1</sup> )
<b>MtLT2</b>	400; 50	690	2.212	8.0 x 10 <sup>-3</sup>
<b>7E1</b>	390; 55	700	2.207	7.7 x 10 <sup>-3</sup>

<sup>1</sup> Valores extraídos de los experimentos de Voltamperometría cíclica.

<sup>2</sup> Valores extraídos de los experimentos de valoración redox.



**Figura 4.40.** Caracterización espectroscópica y electroquímica.  $E_m$  se refiere al potencial redox medio. Como control también se realizaron valoraciones redox de la lacasa de *T. hirsuta*. **a)** Espectro EPR a 77 K de la lacasa parental MtLT2 y la variante 7E1. **b)** Espectro de las valoraciones redox del mutante 7E1, correspondientes a (1) la lacasa oxidada (+900 mV); (2) lacasa parcialmente reducida (+700 mV); (3) lacasa totalmente reducida (+450 mV); (4) lacasa parcialmente reoxidada y (5) lacasa reoxidada mediante aplicación del potencial inicial (+900 mV). Inserto: típica curva de Nernst de la dependencia del potencial aplicado ( $E$ ) vs. absorbancia a 610 nm, y parámetros promedio calculados a partir de las valoraciones.



## **5. DISCUSIÓN**

<b>5.1. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LACASAS EN DISOLVENTES .....</b>	<b>119</b>
5.1.1. Diseño de la estrategia evolutiva.....	119
5.1.2. Optimización del experimento de evolución molecular y resumen de la ruta evolutiva.....	120
5.1.3. Mutaciones del proceso evolutivo en disolventes orgánicos.....	122
<b>5.2. ESTUDIOS “SEMI-RACIONALES”: PAPEL DE LA TAPA C-TERMINAL Y SU INTERACCIÓN CON EL TRIPÉPTIDO ALTAMENTE CONSERVADO <sub>509</sub>VSG<sub>511</sub> .....</b>	<b>130</b>
5.2.1. Creación de genotecas mediante mutagénesis saturada combinatorial/IVOE .....	130
5.2.2. Mutagénesis saturada combinatorial sobre MtLT2.....	132
5.2.3. Mutagénesis saturada combinatorial sobre 7E1.....	133

## 5.1. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LACASAS EN DISOLVENTES

### 5.1.1. DISEÑO DE LA ESTRATEGIA EVOLUTIVA

Una lacasa resistente a disolventes orgánicos debe ser activa y al mismo tiempo estable en presencia de elevadas concentraciones de medio orgánico. Estas características conferirían un valor añadido al catalizador ya que en una transformación dada, donde fueran necesarios cosolventes, se podrían alcanzar velocidades de reacción apropiadas.

Por ello, la estrategia de evolución dirigida de este trabajo se planteó cuidadosamente siguiendo las siguientes premisas (Zumárraga y cols., 2007c):

- El ensayo de HTP-*screening* se llevó a cabo en presencia de dos cosolventes de diferente naturaleza -acetonitrilo y etanol- con el fin de encontrar mutantes activos en ambos disolventes, lo cual podría eventualmente conferir “*promiscuidad*” hacia otras mezclas agua/disolvente.
- Para mejorar la actividad y estabilidad en disolventes, sólo aquellos mutantes que aumentaran su actividad y retuvieran la estabilidad se seleccionarían para los siguientes ciclos de evolución.
- La exigente presión selectiva -incrementando las concentraciones de cosolventes en el *screening* generación tras generación (desde un 20% hasta un 60% (v/v))- aceleraría el proceso evolutivo siempre y cuando los parentales de cada ciclo tolerasen las condiciones del ensayo de *screening*.
- Se purificarían a homogeneidad y se haría un exhaustivo estudio espectro-electroquímico de cada una de las variantes de la evolución artificial, para posteriormente valorar la influencia de las adaptaciones conferidas por las mutaciones sobre el tránsito de electrones en la estructura de la lacasa.

La lacasa termoestable Mtl mutante T2 (MtlT2) fue el tipo parental adecuado para el experimento de evolución molecular por varias razones. MtlT2 tiene un elevado nivel de expresión en *S. cerevisiae*, un requisito indispensable a la hora de hacer evolución *in vitro* de lacasas (Bulter y cols., 2003). Además, ya poseía una buena estabilidad en disolventes orgánicos, tal y como se comprobó durante la validación del método de HTP-*screening* (Alcalde y cols., 2005). Por último, Mtl constituía un excelente punto de partida para el diseño evolutivo: esta enzima altamente termoestable fue previamente sometida a diez ciclos de evolución dirigida culminando en la variante T2, que contiene mutaciones beneficiosas en la proteína madura con un aumento de hasta 170 veces de la actividad total con respecto a la de la enzima nativa (Bulter y cols., 2003). Este hecho está relacionado con la novedosa teoría que postula una relación directa entre la termoestabilidad, la robustez mutacional y la capacidad evolutiva de las proteínas: en principio, las enzimas termoestables pueden ser más “*evolucionables*” porque son capaces de tolerar en mayor grado las mutaciones beneficiosas pero al mismo tiempo desestabilizantes (Bloom y cols., 2006).

### 5.1.2. OPTIMIZACIÓN DEL EXPERIMENTO DE EVOLUCIÓN MOLECULAR Y RESUMEN DE LA RUTA EVOLUTIVA.

La **Figura 5.1** resume el proceso de evolución dirigida llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, una combinación de diferentes estrategias de mutagénesis aleatoria, dirigida y saturada junto con metodologías de recombinación *in vivo* del DNA.

En primer lugar se ajustó la expresión heteróloga de la lacasa en *S. cerevisiae* de modo que la producción de la enzima -dependiente del consumo de cobre- no fuera tóxica para el hospedador eucariótico, lo cual podría haber limitado el proceso evolutivo (Alcalde y cols., 2005). Por otro lado, los microcultivos de *S. cerevisiae* en microplaca -asociados a la expresión funcional de la lacasa- se ajustaron para conseguir una respuesta reproducible y adecuada durante los ciclos de evolución dirigida. De esta manera, los coeficientes de varianza del ensayo con ABTS no superaron el 10% en ningún caso, garantizando la fidelidad del *screening*.

La diversidad genética a lo largo de las diferentes generaciones se promovió mediante diversas estrategias, y en su mayor parte haciendo uso de la elevada recombinación homóloga ofrecida por las células de *S. cerevisiae* (Cherry y cols., 1999; Bulter y Alcalde, 2003). De esta manera, a lo largo del experimento de evolución *in vitro*, tanto la clonación como los diferentes procesos de recombinación *in vivo* del DNA fueron optimizados para conseguir una elevada eficiencia de transformación (en torno a 15000-20000 clones por reacción de transformación). Para ello se diseñaron secuencias homólogas con áreas de solapamiento de aproximadamente 30-50 pb sin alterar el marco de lectura abierto.

Con el fin de facilitar una exploración amplia del gen de MtLT2, durante la ruta evolutiva artificial se alternaron metodologías de PCR mutagénica con procesos de recombinación *in vivo* del DNA. Respecto a las técnicas de mutagénesis aleatoria, en todos los casos se ajustó el índice de mutación para introducir de 1 a 3 cambios de aminoácidos por proteína. Las metodologías basadas en la recombinación *in vivo* del DNA fueron variadas, y en concreto para la presente Tesis Doctoral se prepararon específicamente dos nuevas herramientas de creación de diversidad: el ensamblaje *in vivo* de librerías mutagénicas con diferente espectro mutacional (4ª generación) y el IVOE (*in vivo overlap extension*) para los experimentos de mutagénesis saturada (combinatorial) (5ª generación y experimentos *semi-rationales*, apartado 5.2).



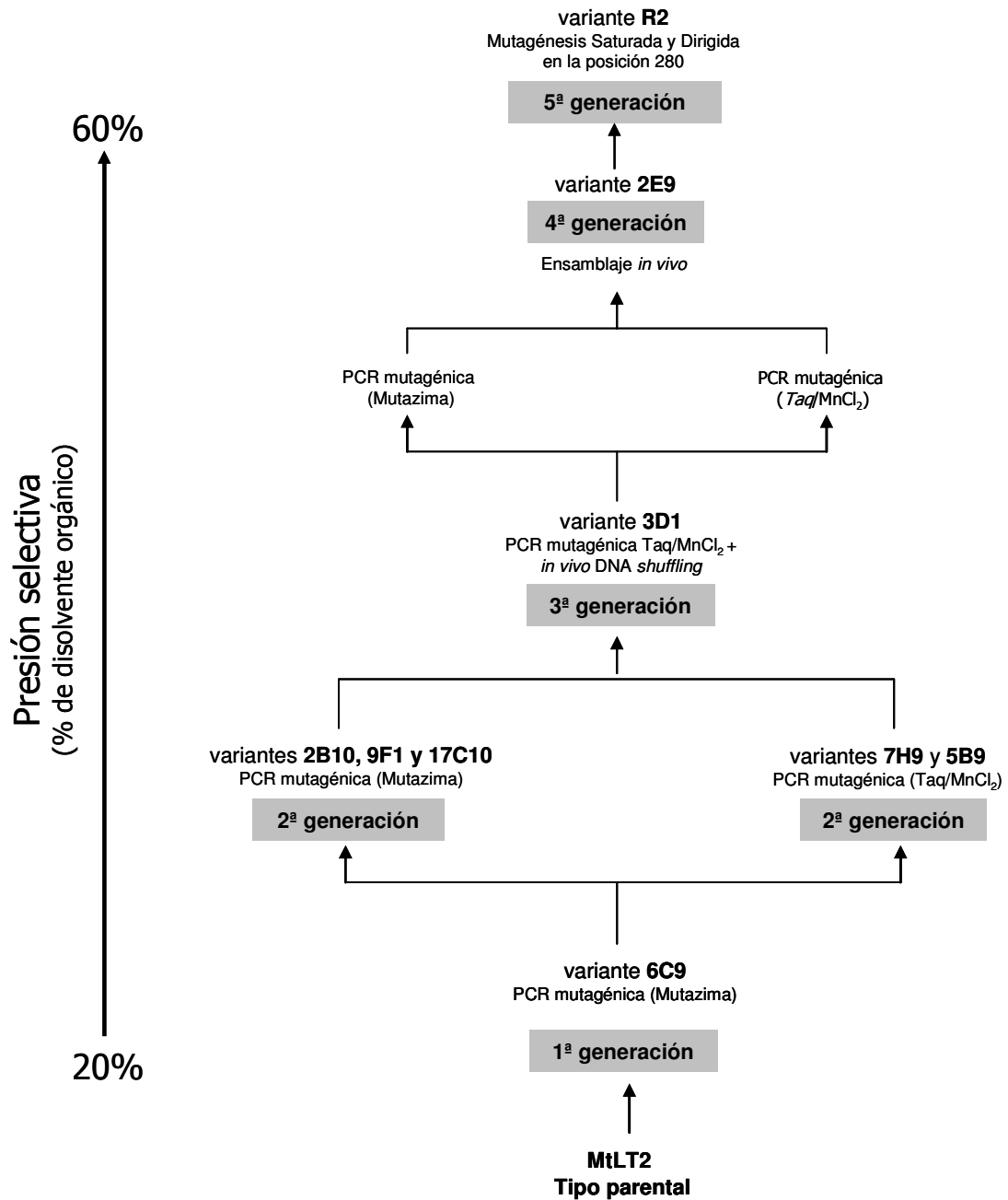


Figura 5.1. Esquema general del proceso de evolución artificial desarrollado en este trabajo.

En orden cronológico, la primera generación fue creada mediante el empleo de una única polimerasa (Mutazima). Sin embargo, en función de la polimerasa utilizada, la predisposición mutacional puede variar considerablemente (ver **Anexo III**). Por este motivo, en la segunda generación se construyeron y exploraron de manera paralela dos librerías procedentes de dos polimerasas con diferente espectro mutacional.

Para la 3ª generación se decidió realizar *in vivo* DNA *shuffling* de los mejores parentales del ciclo anterior. En este caso, cada gen parental fue amplificado y mutagenizado mediante el uso de *Taq/MnCl<sub>2</sub>*, y posteriormente recombinado *in vivo* en *S. cerevisiae*. Por lo tanto, no fue una recombinación de parentales *per se* sino previamente mutagenizados, ya que se ha comprobado en trabajos previos que dicho enfoque puede ser beneficioso para obtener mejores adaptaciones (Bulter y cols., 2003). Los tres mutantes seleccionados y secuenciados en este ciclo presentaron genes quimera con mutaciones procedentes de los diferentes parentales, sin detectarse la incorporación de nuevas mutaciones generadas por PCR mutagénica. Teniendo en cuenta que las condiciones de la mutagénesis aleatoria fueron ajustadas para generar una tasa de error baja, la ausencia de nuevas mutaciones indica que en este caso en particular, solamente se pudieron seleccionar clones conteniendo mutaciones barajadas de los parentales. Es probable que en la exploración de una librería de mayor tamaño se hubieran podido descubrir nuevas mutaciones beneficiosas.

Para la 4ª generación se crearon dos genotecas con dos polimerasas diferentes y se recombinaron *in vivo* generando un espectro mutacional inesperado. En efecto, el mejor mutante de esta generación tuvo dos mutaciones beneficiosas en codones consecutivos. La probabilidad de introducir dos cambios aminoacídicos consecutivos mediante PCR mutagénica convencional es muy pequeña. De hecho, no se ha publicado este fenómeno en ninguna otra investigación de evolución dirigida hasta el momento. Más que por azar, estos resultados sugieren que la recombinación *in vivo* en *S. cerevisiae* de librerías de mutantes con diferentes tendencias mutacionales puede proporcionar otras alternativas a los protocolos estándar *in vitro*.

Por último, la 5ª generación supuso, primero, la mutagénesis dirigida y, después, saturada -mediante IVOE- sobre una posición que se perdió tras el DNA *shuffling* de la 3ª generación.

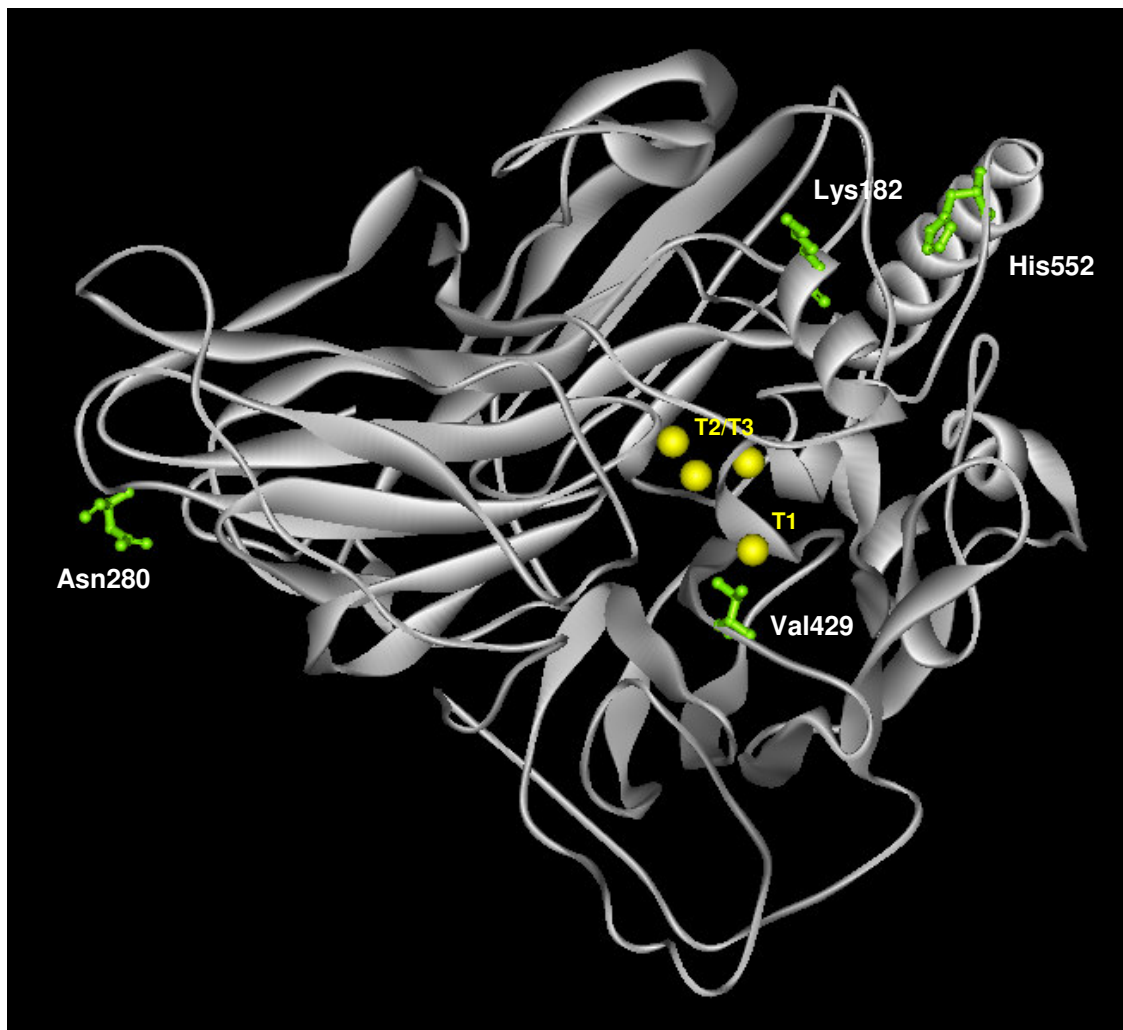
### 5.1.3. MUTACIONES DEL PROCESO EVOLUTIVO EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

Las mutaciones de cada una de las variantes de la evolución dirigida en disolventes orgánicos de la lacasa de M<sub>t</sub>LT2 se resumen en la **Tabla 5.1**. Tras 5 generaciones y alrededor de 13000 clones explorados, la mejor variante (R2) acumula un total de 8 mutaciones: una en el péptido señal, cuatro mutaciones beneficiosas y una silenciosa en la proteína madura, y dos mutaciones consecutivas en la extensión C-terminal (un pequeño polipéptido de 14 residuos que se escinde en los estadios post-traduccionales).

**Tabla 5.1.** Mutaciones del proceso de evolución molecular dirigida en disolventes orgánicos. ● Mutación nueva; ◇ Mutación acumulada; subrayadas se muestran las mutaciones silenciosas.

Mutantes (generación)	Mutaciones														
	P(n20)H	E182K	S179P	H237N	A252T	S280N	<u>G300G</u>	<u>R302R</u>	<u>S415S</u>	L429V	<u>D494D</u>	W547L	N552H	G(c614)D	E(c615)K
6C9 (1ª)	●								●	●					
2B10 (2ª)	◇					●		●	◇	◇			●		
7H9 (2ª)	◇	●							◇	◇					
5B9 (2ª)	◇		●						◇	◇					
9F1 (2ª)	◇			●	●		●		◇	◇					
17C10 (2ª)	◇								◇	◇	●	●			
3D1 (3ª)	◇	◇							◇	◇			◇		
2E9 (4ª)	◇	◇							◇	◇			◇	●	●
R2 (5ª)	◇	◇				●			◇	◇			◇	◇	◇

Con el objeto de localizar las mutaciones en la estructura de la lacasa, se construyeron modelos moleculares haciendo uso nuevamente de la lacasa de *Melanocarpus albomyces* cuya estructura cristalográfica está resuelta (Hakulinen y cols., 2002) y comparte una identidad de secuencia con MtLT2 en torno al 75%. para una mayor claridad se explicarán, en orden cronológico, el papel de las mutaciones que posee la variante final R2 (**Figura 5.2**).

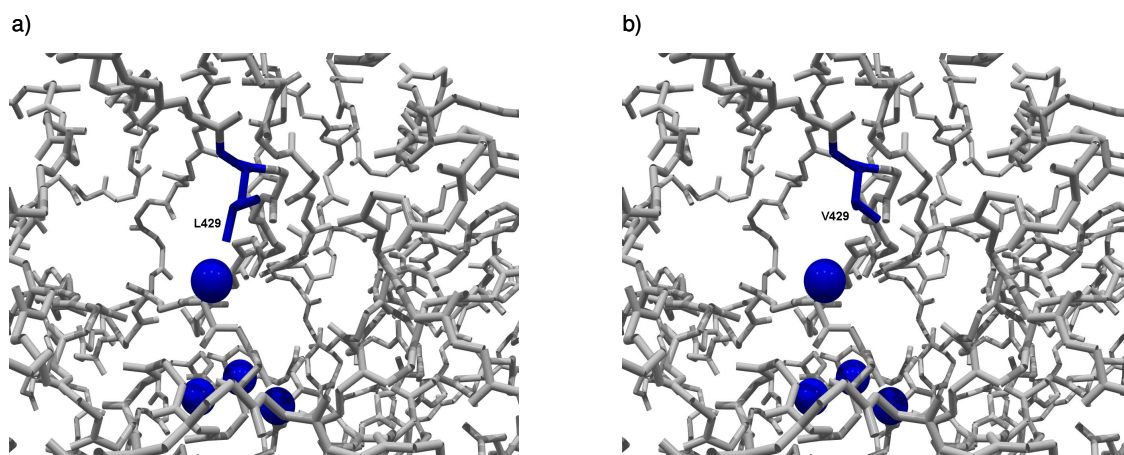


**Figura 5.2.** Modelo estructural de la lacasa R2 madura. En verde las mutaciones introducidas durante el proceso de evolución dirigida. En amarillo los átomos de Cu.

La mutación  ${}_{(CCT)}P(n20)H_{(CAT)}$  que aparece en el mutante 6C9 de la primera generación, se encuentra en el péptido señal que es escindido junto con el pro-péptido y la extensión C-terminal durante el procesamiento de la proteína madura. Una de las mutaciones beneficiosas encontradas en el trabajo que dio lugar a la lacasa MtLT2 (Bulter y cols., 2003) estaba en el

mismo codón (mutación A(n20)P) y aumentó la actividad total de la lacasa 1.5 veces. Parece plausible que el residuo en la posición 20 desempeñe alguna función durante la secreción, descartándose cualquier efecto sobre la tolerancia de la lacasa en cosolventes, puesto que no forma parte de la proteína madura y la secuencia líder en la que se localiza únicamente posee una función secretora.

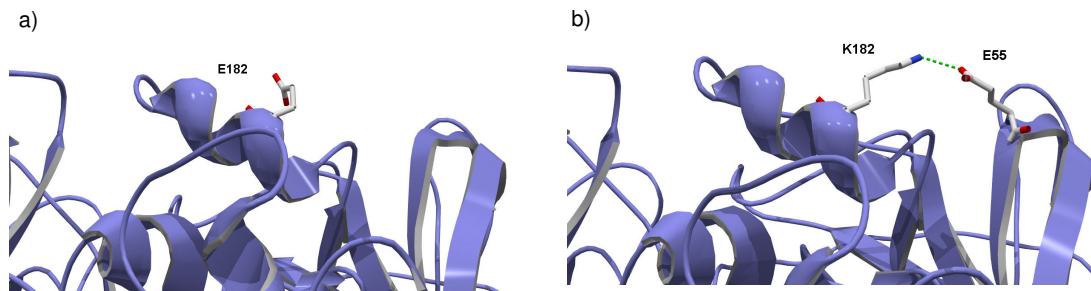
La mutación  ${}_{(CTA)}L429V_{(GTA)}$ , también procedente del variante 6C9, se localiza cerca del sitio T1 (**Figura 5.3**). De acuerdo con Hakulinen y cols. (2002), la Leu429 está implicada en la unión del sustrato reductor en la lacasa de *M. albomyces*, la cual tiene un bolsillo de unión al sustrato más estrecho que el de otras lacasas. El cambio de Leu a Val en esta posición representa una sustitución de un residuo hidrofóbico por otro que también lo es pero que tiene menor tamaño. A pesar de que nuestros resultados experimentales corroboran esta sustitución como principal responsable de la mejora en este ciclo (1ª generación), es difícil encontrar argumentos que permitan explicar dicho comportamiento puesto que aparentemente no se establecen nuevas interacciones que puedan favorecer o reforzar la estructura de la proteína frente a agentes desnaturizantes.



**Figura 5.3.** a) Entorno del residuo L429 (azul) en MtLT2. b) mutación L429V en R2. Las esferas azules representan los átomos de Cu.

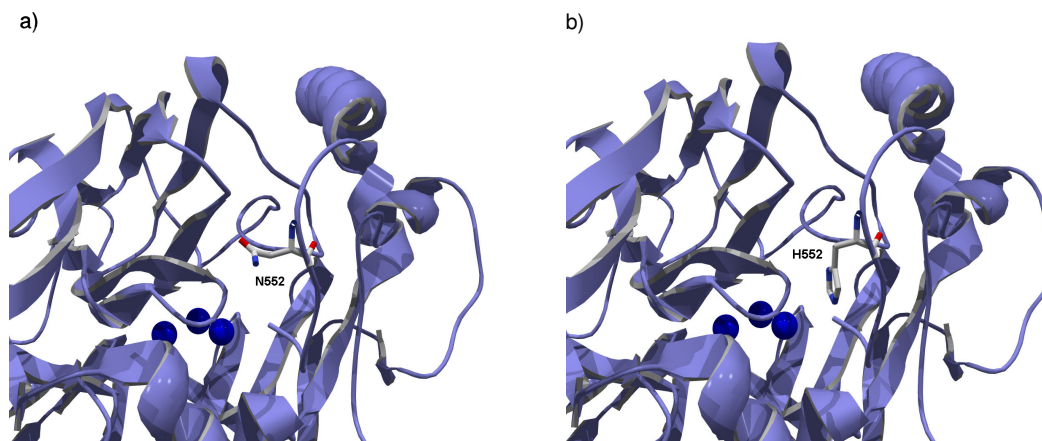
La variante 3D1 de la tercera generación, se obtuvo mediante *in vivo shuffling* de la mutación  ${}_{(GAG)}E182K_{(AAG)}$  del parental 7H9 y una de las mutaciones beneficiosas  ${}_{(AAC)}N552H_{(CAC)}$  de la variante 2B10, procedentes de la segunda generación. La modificación en la posición 182 supuso una mayor estabilidad en medios orgánicos (Tabla 4.8 de Resultados) junto con un pequeño cambio en la señal de EPR del sitio T1 (Figura 4.27.a de Resultados). El residuo 182 se localiza en la superficie de la proteína, en una lámina beta bastante alejada de los cobres catalíticos. Es probable que esta región forme parte de un entorno lábil en la estructura global de la lacasa, siendo un punto susceptible al desplegamiento/desnaturización. La sustitución del Glu182 por una Lys permitiría la formación de un puente salino entre los residuos Lys182 y Glu55, reforzando dicha región

(**Figura 5.4**) y por lo tanto aumentando la tolerancia de la proteína frente a los disolventes. De hecho, se ha descrito en varios trabajos previos que los pares iónicos superficiales pueden aumentar la resistencia de las proteínas al calor y otros agentes desnaturizantes incluyendo los disolventes orgánicos (Arnold, 1990; Lopez-Camacho y cols., 1996).



**Figura 5.4.** a) Residuo E182 en MtlT2. b) Mutante E182K. El residuo K182 forma un puente salino con E55.

Respecto a la mutación N552H, aparte de conferir una elevada actividad en ambos disolventes, suprime la actividad a pH 3.0 (la variante 7H9 sólo retiene el 3% de su actividad a este valor de pH). Esta mutación se encuentra localizada en la superficie de la proteína, muy cerca de la tapa C-terminal que cierra el canal que da acceso al agrupamiento trinuclear T2/T3 (**Figura 5.5**). Nuestro modelo molecular indica que la sustitución de Asn por His puede variar la entrada al cluster trinuclear, lo que quizás afecte al tránsito de O<sub>2</sub> hacia el sitio T2/T3.



**Figura 5.5.** a) Residuo de Asn552 en la lacasa parental MtlT2. b) Mutación N552H en R2. Las esferas azules representan los átomos de cobre del agrupamiento trinuclear T2/T3.

El mejor mutante de la cuarta generación 2E9, presenta dos nuevas mutaciones beneficiosas en codones adyacentes:  ${}_{(GGC)}G614D_{(GAC)}$  y  ${}_{(GAG)}E615K_{(AAG)}$ . Como se ha comentado anteriormente (apartado 5.1.2), la aparición de dos cambios aminoacídicos

consecutivos es producto de la estrategia de creación de diversidad usada en esta generación (el ensamblaje *in vivo* de librerías con diferentes espectros mutacionales).

Estas dos mutaciones se localizan en la extensión C-terminal, un polipéptido de 14 aminoácidos que es procesado por la proteasas *KEX2* y *KEX1* en el aparato de Golgi (**Figura 5.6**) y que por lo tanto no forma parte de la proteína madura (Shuster, 1991; Bulter y cols., 2003). A día de hoy, la funcionalidad de la extensión C-terminal en las lacasas de Ascomicetes es objeto de controversia. Hakulinen y cols. (2002) estudiaron la expresión de la lacasa del Ascomicete *M. albomyces* en *S. cerevisiae*, concluyendo que el aparato celular de la levadura no era capaz de procesar el C-terminal correctamente. Por el contrario, Bulter y cols. (2003) describieron un correcto procesado en *S. cerevisiae* de la lacasa MtL mediante la introducción por evolución dirigida de una diana de restricción para la proteasa *KEX2*, lo que hace suponer que el proceso de evolución ajustó la secuencia de MtL a las diferentes especificidades de las proteasas de *S. cerevisiae* (Bulter y cols., 2003). Recientemente el Dr. Bulter confirmó (comunicación personal) dicha especificidad mediante análisis del C-terminal del último mutante de dicho trabajo, MtLT2 (que es el parental de la presente Tesis Doctoral).



**Figura 5.6.** Procesamiento de la cola C-terminal de la lacasa MtLT2 por las proteasas *KEX1* y *KEX2* en *S. cerevisiae*. En rojo la tapa C-terminal y en verde los 14 aminoácidos de la extensión C-terminal. La lacasa nativa MtLwt carece de secuencia de reconocimiento de la *KEX2*. En la variante MtLT2 Bulter y cols. introdujeron la mutación H561R. La endopeptidasa *KEX2* reconoce la secuencia Lys-Arg y corta entre la Arg561 y Arg562. Posteriormente la carboxipeptidasa *KEX1* elimina los residuos Lys560 y la Arg561 para dejar la Leu559 como último residuo de la proteína madura.

La proteasa *KEX2* se localiza en el aparato de Golgi, donde procesa polipéptidos cuando reconoce secuencias Lys-Arg (un fenómeno extensamente descrito, por ejemplo, para el procesado de la secuencia prepro-líder del factor  $\alpha$ ) (Shuster, 1991). Las dos mutaciones consecutivas del mutante 2E9 se encuentran en la zona media de la extensión C-terminal (en el octavo y noveno aminoácido de este polipéptido). Ya que la extensión C-terminal es procesada y por lo tanto no es parte de la proteína madura, no se puede saber directamente cómo estos cambios han podido influir en el comportamiento de la lacasa 2E9 madura en presencia de disolventes orgánicos (Zumárraga et. al., 2007a).

Para evaluar si las mutaciones en la extensión C-terminal influyeron de algún modo en la estructura geométrica y electrónica de los sitios T1 y T2 de la proteína madura, se estudió el mutante mediante EPR. Se pudieron apreciar diferencias en el entorno químico del sitio T1, lo cual indica que el procesado de la extensión C-terminal afecta de alguna forma al plegamiento de la proteína madura. En vista de estos resultados, es probable que la red de interacciones que conforman la geometría del cobre T1 paramagnético se haya visto perturbada durante el plegamiento debido a los procesos de modificación post-traduccionales. Este hecho podría relacionarse con la disminución del  $E^\circ$  del sitio T1 (de +680 mV a +630 mV, ver Tabla 4.9 de Resultados).

Anteriormente ya se había descrito que el carácter extremadamente básico de la cola C-terminal jugaba un papel importante durante la maduración de la proteína (Germann y cols., 1988). Esta hipótesis se sustenta en el elevado carácter básico inherente a la extensión C-terminal para las lacasas de Ascomycetes (en MtLT2, 4 de los 14 residuos del polipéptido son básicos -dos Lys y dos Arg-, confiriendo un punto isoeléctrico (pI) de 8.59 a la extensión). Este valor es considerablemente más alto que el pI de la proteína madura (5.29). Según esta teoría, la extensión C-terminal se pliega a modo de lazo sobre el armazón del bolsillo activo, modulando la incorporación de los átomos de cobre catalíticos.

Por este motivo se consideró oportuno calcular teóricamente los pI de la extensión C-terminal y de la proteína madura en las diferentes variantes del proceso de evolución artificial (para ello se empleó el programa disponible en el Servidor [www.expasy.org](http://www.expasy.org) para determinación de pI). Estos cálculos indican que el pI de la extensión C-terminal se desplaza de 8.59 a 9.70 tras la introducción de las dos mutaciones consecutivas (**Tabla 5.2**). Suponemos que estas mutaciones contribuyen a una unión más fuerte entre la cola C-terminal y el núcleo enzimático (pI 5.46) estableciendo interacciones electroestáticas más intensas durante el procesado de la proteína, lo que eventualmente podría afectar al plegamiento. De todas maneras, únicamente el análisis comparativo cristalográfico del tipo parental y 2E9 podría corroborar esta hipótesis.

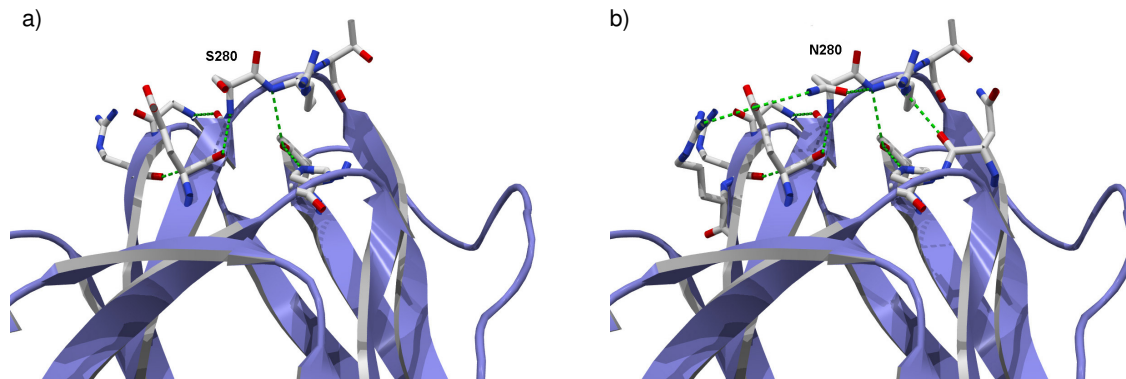


**Tabla 5.2.** Secuencias de la extensión C-terminal del tipo parental M<sub>t</sub>L<sub>T</sub>2 y los diferentes mutantes. En rojo los cambios de aminoácidos introducidos durante la evolución dirigida. Se subraya el sitio de procesamiento de *KEX2* introducido por Bulter y cols. (2003). Los valores de pI se calcularon usando el servidor ExPASy Proteomics ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)), con el programa para análisis de estructuras primarias.

Lacasas	Secuencia cola C-terminal	pI de la cola C-terminal	pI de la lacasa madura
M <sub>t</sub> L <sub>w</sub> t <sup>1</sup>	KHRWVEEGEVLVKA	6.76	5.13
M <sub>t</sub> L <sub>L</sub> 1 <sup>1</sup>	<u>K</u> RWVEEGEVLVKA	8.59	5.13
M <sub>t</sub> L <sub>T</sub> 2 <sup>1</sup>	<u>KRR</u> WVEEGEVLVKA	8.59	5.29
6C9 (1 <sup>a</sup> generación)	<u>KRR</u> WVEEGEVLVKA	8.59	5.29
2B10 (2 <sup>a</sup> generación)	<u>KRR</u> WVEEGEVLVKA	8.59	5.34
7H9 (2 <sup>a</sup> generación)	<u>KRR</u> WVEEGEVLVKA	8.59	5.41
3D1 (3 <sup>a</sup> generación)	<u>KRR</u> WVEEGEVLVKA	8.59	5.46
2E9 (4 <sup>a</sup> generación)	<u>KRR</u> WVEEDK WLVKA	9.70	5.46
R2 (5 <sup>a</sup> generación)	<u>KRR</u> WVEEDKWL VKA	9.70	5.46

<sup>1</sup> Mutantes procedentes de un experimento previo de evolución molecular para expresión funcional de M<sub>t</sub>L en *S. cerevisiae* (Bulter y cols., 2003).

En la última generación se recuperó la mutación  ${}_{(AGC)}S280N_{(AAC)}$  del mutante 2B10 de la segunda generación (mutación perdida durante el *in vivo shuffling* de la tercera generación) mediante mutagénesis dirigida. La mejora fue significativa, por lo que adicionalmente se investigó esta posición por mutagénesis saturada mediante IVOE para analizar todos los posibles aminoácidos. Sorprendentemente, el nivel de adaptación obtenido en la segunda generación era el óptimo, ya que se obtuvo el mismo tipo de mutación después de los experimentos de saturación sobre la posición 280 de R2. A pesar de que este aminoácido se encuentra en la superficie de la proteína, bastante alejado de los sitios de cobre, su introducción en la última generación aumentó el potencial redox del Cu T1 +75 mV y también dio lugar a diferentes parámetros espectrales (Figura 4.26 de Resultados). El modelo proteico sugiere que la mutación S280N permite la formación de tres puentes de hidrógeno adicionales, que dan lugar a una mayor estabilidad de la estructura de la proteína en esa región (**Figura 5.7**). La energía libre de tres puentes de hidrogeno es similar a la de un puente salino, y tal como ocurre con la mutación E182K, supone un robustecimiento estructural en una zona que *a priori* puede ser más lábil. Esta fortificación estructural puede traducirse en una mayor resistencia a la desnaturalización bajo la presión de factores externos agresivos como los disolventes orgánicos.



**Figura 5.7.** a) Residuo de Ser280 en MtlT2. b) Mutación S280N en R2. El nuevo residuo Asn280 permite la formación de puentes de hidrógeno adicionales con residuos periféricos.

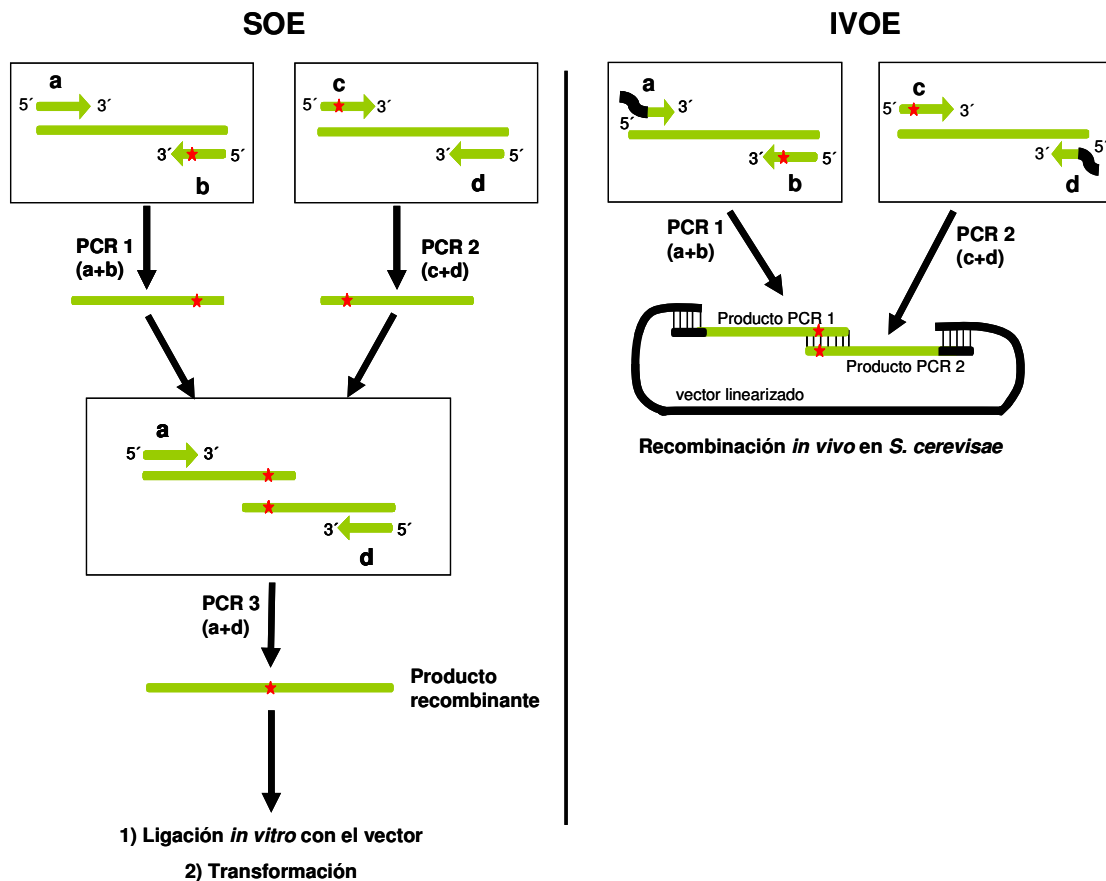
## 5.2. ESTUDIOS “SEMI-RACIONALES”: PAPEL DE LA TAPA C-TERMINAL Y SU INTERACCIÓN CON EL TRIPÉPTIDO ALTAMENTE CONSERVADO

<sup>509</sup>VSG<sub>511</sub>

### 5.2.1. CREACIÓN DE GENOTECAS MEDIANTE MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL CON IVOE

Para la realización de los estudios “*semi-racionales*” de esta Tesis Doctoral, se empleó la técnica de mutagénesis saturada combinatorial sobre varias posiciones importantes en MtlT2. Ya que se disponía de *S. cerevisiae* como organismo hospedador, se consideró interesante el desarrollar un nuevo protocolo de mutagénesis saturada combinatorial, como alternativa a los métodos estándar, en el que se hiciera uso de la recombinación *in vivo* como característica más atractiva.

La construcción de librerías de mutagénesis saturada combinatorial se lleva a cabo normalmente mediante la metodología SOE (*Sequence Overlap Extension*) (Ho y cols., 1989; Arnold y Georgiou, 2003). SOE es un método de PCR para facilitar la recombinación de secuencias sin la necesidad de sitios de restricción, produciendo finalmente fragmentos de DNA mutados *in vitro* (**Figura 5.8**). En primer lugar se preparan dos reacciones de PCR independientes en las que se amplifican dos fragmentos de la secuencia del gen diana. Cada reacción utiliza un oligonucleótido flanqueante que hibrida en un extremo de la secuencia molde y otro oligonucleótido interno degenerado que hibrida en el sitio/s de la mutación/es y contiene las bases de interés mutadas (NNN o NNG/C). Por ello, se deben diseñar oligonucleótidos degenerados de manera que los extremos de los productos de PCR resultantes contengan secuencias complementarias.



**Figura 5.8.** El solapamiento de secuencias mediante SOE (*Sequence Overlap Extension*) es un método de mutagénesis que recombina secuencias de DNA que contienen las mutaciones mediante varias reacciones de PCR consecutivas, y además también requiere un paso adicional de ligación *in vitro* para clonar el fragmento completo en el vector. Como alternativa, el IVOE (*In Vivo Overlap Extension*) suprime un paso de PCR y el proceso de ligación *in vitro* con el plásmido linearizado. Para ello es indispensable hacer uso del aparato celular eucariota de *S. cerevisiae* y el diseño de oligonucleótidos degenerados con extensiones apropiadas.

Así pues, primero hay que amplificar los fragmentos de DNA en dos reacciones de PCR independientes dando lugar a dos productos de PCR que solapan en una región específica, la región sometida a mutagénesis. Posteriormente, se debe realizar una tercera reacción de PCR, donde los dos productos de PCR son mezclados, anillando uno con otro a través de la región de los oligonucleótidos internos degenerados. Esto se debe a que las secuencias de sus extremos 3' son complementarias y actúan como oligonucleótidos cebadores, dando al final de la PCR una nueva versión de la secuencia original completa.

Aparte de la ligación *in vitro* indispensable, el mayor factor limitante de la mutagénesis saturada combinatorial mediante SOE deriva de las reacciones de PCR consecutivas, las

cuales pueden dar lugar a rendimientos de reacción relativamente bajos y a la formación de subproductos no deseables (Arnold y Georgiou, 2003). Para superar estos inconvenientes, en la presente Tesis Doctoral se preparó una metodología *in vivo* alternativa, más rápida y eficiente y que además no es mutagénica (el aparato corrector de errores de la célula de *S. cerevisiae* previene la aparición de mutaciones adicionales que son comunes en los métodos *in vitro*). En un simple experimento, IVOE recombina fragmentos de PCR, “baraja” codones mutagenizados y repara el vector linealizado y los productos de PCR para dar un vector circular de replicación autónoma mediante unos extremos solapantes específicamente diseñados. En SOE, la última reacción de PCR y la ligación *in vitro* son requisitos fundamentales. Sin embargo, IVOE evita estos pasos, simplemente haciendo uso de la propia maquinaria celular y la elevada frecuencia de recombinación homóloga de *S. cerevisiae* (Alcalde y cols., 2006b).

### 5.2.2. MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL SOBRE M1LT2

En primer lugar se decidió explorar dos posiciones de M1LT2 involucradas en el potencial redox del sitio T1 y que habían sido anteriormente estudiadas por mutagénesis dirigida, pero nunca antes se habían sometido a estudios saturantes. En concreto, la Ser510 forma parte del tripéptido <sub>509</sub>VSG<sub>511</sub>, que es común a las lacasas de bajo potencial redox. Por el contrario, el tripéptido LEA aparece en las lacasas de alto potencial redox. El tripéptido VSG/LEA se localiza en las proximidades del cobre T1 y del sitio de unión para el sustrato reductor. Respecto a la Leu513, como se explicó en el apartado 1.3.5 de la Introducción, constituye el ligando axial no coordinante que parece estar implicado en los distintos valores de  $E^{\circ}_{T1}$  descritos para diferentes lacasas fúngicas, de plantas o bacterianas. Este ligando axial suele ser una Leu o una Phe en las lacasas fúngicas, y una Met en las lacasas de plantas y bacterianas (**Tabla 5.3**).

**Tabla 5.3.** Potencial redox del sitio T1 de diferentes enzimas multicobre azul y el residuo en posición axial (Alcalde, 2007).

Especie	Organismo	Enzima	$E^{\circ} \text{ CuT1}$ (mV)	Ligando axial
<i>Trametes versicolor</i>	Basidiomicete	lacasa	+790	Phe
<i>Trametes villosa</i>	Basidiomicete	lacasa	+790	Phe
<i>Neurospora crassa</i>	Ascomicete	lacasa	+780	Leu
<i>Rhizoctonia solani</i>	Deuteromicete	lacasa	+710	Leu
<i>Coprinus cinereus</i>	Basidiomicete	lacasa	+550	Leu
<i>Scytalidium thermophilum</i>	Basidiomicete	lacasa	+510	Leu
<i>Homo sapiens</i>	Mamífero	ceruloplasmina	+490	Met
<i>Myrothecium verrucaria</i>	Hongo mitospórico	bilirubina oxidasa	+480	Met
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Ascomicete	lacasa	+470	Leu
<i>Rhus vernicifera</i>	Planta	lacasa	+430	Met
<i>Cuburbita pepo</i>	Planta	ascorbato oxidasa	+340	Met

Debido a la relevancia de estas posiciones (510 y 513) y a su proximidad en el espacio de secuencia (sólo hay 6 pb entre ellas), ambos codones se sometieron a IVOE. La variante 7E1 fue el único mutante positivo con diferencias significativas respecto al parental, mostrando únicamente un cambio aminoácido en la posición 510 ( ${}_{(TCG)}S510G_{(GGG)}$ ) y una mutación sinónima para el ligando axial ( ${}_{(CTG)}L513L_{(TTG)}$ ). En este sentido, es importante destacar que es la primera vez que el ligando axial es sometido a mutagénesis saturada. Anteriormente, el grupo del Prof. Xu (Xu et al., 1997 y 1998) reemplazó el ligando axial de MtL mediante mutagénesis dirigida sin mejorar las propiedades de la lacasa. En un trabajo más reciente, se mutó el ligando axial de la lacasa bacteriana CotA de *Bacillus subtilis*, y aunque el potencial redox se incrementó, la modificación afectó negativamente a la estabilidad del biocatalizador (Duro y cols., 2006). Según nuestros datos experimentales, el ligando axial del sitio T1 en MtLT2 es un residuo altamente conservado (o en otros términos, probablemente haya alcanzado su nivel más alto de evolución o adaptación) y cualquier cambio por otro residuo diferente no daría lugar a una mejora significativa en la actividad del biocatalizador.

Respecto a la sustitución ( ${}_{(TCG)}S510G_{(GGG)}$ ), tal y como se señaló en el apartado 4.5.4 de Resultados, se trata de una mutación que no es posible alcanzar a través de sustituciones de una única base -es decir, mediante experimentos de mutagénesis aleatoria- (ver Tabla 4.14 de Resultados). Teniendo en cuenta que las tasas de mutación deben ser bajas en los experimentos de evolución molecular de genes completos, y que las metodologías de PCR propensa a error están limitadas a mutaciones puntuales y predisposiciones específicas, siempre quedará una amplia fracción del espacio de secuencia sin explorar. En este caso, la utilización de IVOE permitió descubrir una mutación que parece ser fundamental para la funcionalidad de MtLT2. De hecho, y como se mostró en el apartado 4.5.4 de Resultados, la mutación S510G interrumpe la conexión con la tapa C-terminal  ${}_{556}DSGL_{559}$ , el tetrapéptido altamente conservado de las lacasas de Ascomicetes que está involucrado en el procesado de la extensión C-terminal mencionada anteriormente.

### 5.2.3. MUTAGÉNESIS SATURADA COMBINATORIAL SOBRE 7E1

La variante 7E1 fue sometida a nuevos ciclos de mutagénesis saturada combinatorial, en primer lugar sobre el tripéptido altamente conservado  ${}_{509}VSG_{511}$  y posteriormente sobre la tapa C-terminal  ${}_{556}DSGL_{559}$ . Tras explorar más de 170000 clones en experimentos independientes, en todos los casos se redescubrió la variante 7E1 con la única mutación S510G. La caracterización bioquímica y espectro-electroquímica de la variante 7E1 aportó información relevante (Zumárraga y cols., 2007b):

1. 7E1 mostró eficiencias catalíticas 3.3 y 8 veces superiores para sustratos fenólicos y no fenólicos respectivamente, sin presentar alteraciones significativas en los valores de potencial redox en el sitio T1, a pesar de las perturbaciones detectadas en el ambiente químico de dicho sitio (ver Figura 4.39 de Resultados).

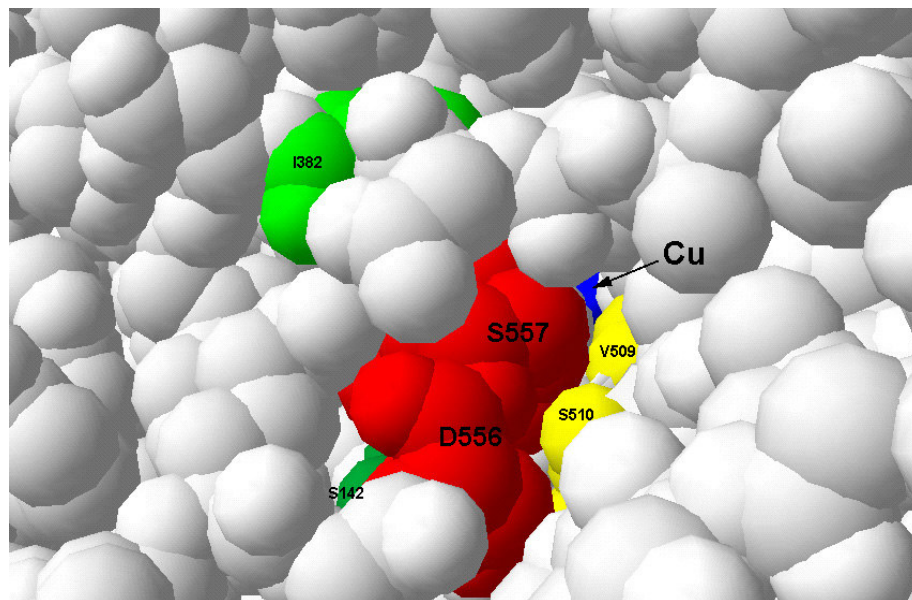
El importante aumento en la  $k_{\text{cat}}$  (ver Tabla 4.17 de Resultados), indica que la mutación S510G afectó a la etapa de transferencia de electrones y no al cambio de energía libre. Debido a que los  $E^\circ$  del sitio T1 no se modificaron significativamente ( $690 \text{ mV} \pm 10 \text{ mV}$ ), lo más probable es que el principal parámetro afectado por la mutación fuera el coeficiente de transmisión de electrones ( $k_{e1}$ ), es decir, la probabilidad de que un electrón sea transferido, la cual depende del elemento matriz de acoplamiento electrónico ( $H_{DA}$ ) (Xu y cols., 1998). Por lo tanto, el aumento en la  $k_{\text{cat}}$  se debe, al parecer, al efecto de esta mutación en la ruta de transferencia de electrones entre el donador de electrones (el sustrato reductor) y el átomo de Cu T1.

Por el contrario, la reducción del oxígeno en el agrupamiento trinuclear T2/T3 así como la transferencia electrónica intra-proteica no son etapas limitantes ( $> 1000 \text{ s}^{-1}$ ) (Solomon y cols., 1996; Lee y cols., 2002). En este caso, sólo se podrían visualizar catalíticamente cambios dramáticos del cluster T2/T3 o de la ruta His-Cys-His. De acuerdo con nuestros datos espectroelectroquímicos, estos cambios no ocurrieron, por lo que el potencial redox del cluster fue muy similar en ambas lacasas, MtLT2 y 7E1 ( $400 \pm 10 \text{ mV}$ ).

2. Se alteraron notoriamente los valores para la  $K_m^{\text{O}_2}$ . Este fenómeno es de especial interés, ya que enlaza con hipótesis previas acerca de la función de la tapa C-terminal. Hakulinen y cols. (2002) destacaron el posible papel de la tapa en la regulación de entrada y salida de  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  desde el agrupamiento trinuclear T2/T3 a través de un canal en la lacasa de *Melanocarpus albomyces*. Sin embargo, hasta la fecha nunca antes se había establecido una función determinada para el tripéptido  $_{509}\text{VSG}_{511}$ . En 7E1, como se ha explicado con anterioridad, la interacción entre la Ser510 y Asp556 se rompe, ampliando el canal que conduce al cluster trinuclear T2/T3 (**Figura 5.9**). Una estructura más relajada tras la mutación parece afectar al ajustado tráfico de oxígeno y de agua en el canal, con el consecuente aumento en la  $K_m^{\text{O}_2}$ .

En vista de esta información, se podría suponer que la tapa C-terminal funciona como una “bisagra” molecular que comunica con la región donde el sustrato reductor interacciona, estableciendo una conexión directa entre la unión de sustratos al sitio T1 y la entrada de oxígeno al agrupamiento trinuclear T2/T3.

Las lacasas son enzimas que catalizan la oxidación (mediante la sustracción de un electrón) del sustrato correspondiente, oxidación que va acoplada a la reducción del oxígeno molecular (que requiere de cuatro electrones para completarse). De alguna manera, la lacasa opera como una batería, almacenando electrones de reacciones de oxidación individuales, con el objetivo último de reducir el oxígeno molecular a dos moléculas de agua. Por consiguiente, parece probable que la sincronización entre la unión del sustrato reductor en el sitio T1 y el oxígeno molecular en el cluster T2/T3 sea altamente dependiente de la interacción existente entre la tapa y el tripéptido  $_{509}\text{VSG}_{511}$ .



**Figura 5.9.** Canal de acceso al agrupamiento trinuclear T2/T3 en MtLT2. En azul, el cluster de cobres; en rojo la tapa C-terminal; en verde otros residuos circundantes que interaccionan con la tapa; en amarillo los residuos del tripéptido  ${}^{509}\text{VSG}_{511}$  (ver también Figuras 4.33 y 4.34 de Resultados). La mutación en la posición 510 amplía el túnel tras la ruptura de la interacción entre el tripéptido conservado  ${}^{509}\text{VSG}_{511}$  y la tapa C-terminal.





## **6. CONCLUSIONES**



- Se ha desarrollado un método de HTP-*screening* en fase líquida que permite la exploración rápida y precisa de librerías complejas de lacasas expresadas en *S. cerevisiae*. Dicho protocolo está basado en la oxidación específica del sustrato reductor ABTS por la lacasa presente en los sobrenadantes celulares. Este método puede ser aplicado tanto en un ensayo de punto final como en modo continuo, en presencia o ausencia de cosolventes (etanol o acetonitrilo), mostrando coeficientes de varianza inferiores al 10%. La incorporación de dos re-*screenings* consecutivos garantiza la fidelidad de los mutantes seleccionados.
- La combinación de genotecas mutagénicas creadas con diferentes polimerasas (en generaciones sucesivas o independientemente dentro de un mismo ciclo evolutivo) y las técnicas de recombinación *in vivo* en levadura empleadas en esta Tesis Doctoral permiten la creación de genotecas con una diversidad funcional adecuada para experimentos de evolución molecular. En particular, el ensamblaje *in vivo* de genotecas mutagénicas con diferente espectro mutacional supone una alternativa válida a la utilización convencional de la mutagénesis aleatoria.
- Se han completado 5 ciclos de evolución dirigida hacia una mayor actividad y estabilidad de la lacasa MtLT2 en presencia de disolventes orgánicos. El mutante R2 es la última variante de dicho proceso. R2 muestra una mejora en la actividad de 19 veces en presencia de etanol 50% (v/v) y de 33 veces en acetonitrilo 30% (v/v), sin merma en su estabilidad. Así, el mutante R2 es altamente estable en dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dimetilacetamida, acetona, acetonitrilo, etanol o metanol.
- La elevada tolerancia a altas concentraciones de diferentes disolventes orgánicos mostrada por R2 se debe al diseño del protocolo evolutivo, en el que se combinaron dos disolventes en cribados independientes para conferir adaptación a medios orgánicos, al tiempo que se aumentó la presión selectiva, es decir la concentración de cosolventes, generación tras generación.
- El mutante R2 acumula 6 mutaciones beneficiosas (4 en la proteína madura y 2 en la extensión C-terminal). Tres de las mutaciones presentes en la lacasa madura se encuentran en zonas periféricas, alejadas de los cobres catalíticos. En particular, el establecimiento de nuevos puentes de hidrógeno y puentes salinos parecen contribuir al robustecimiento estructural del catalizador frente a agentes desnaturizantes. Las mutaciones localizadas en la extensión C-terminal sugieren un plegamiento diferente de la lacasa a través de nuevas interacciones electrostáticas, lo cual parece repercutir en la función de la enzima en presencia de disolventes.
- Se han realizado estudios “*semi-racionales*” mediante la utilización de la mutagénesis saturada combinatorial a través de IVOE. El método IVOE permite, mediante un único paso, la creación de genotecas saturadas y combinatoriales en *S. cerevisiae*.

- La mejor variante de los diferentes estudios “*semi-racionales*”, 7E1, muestra una única mutación beneficiosa. La mutación S510G interrumpe la conexión establecida mediante un puente de hidrogeno entre la Ser510 y el Asp556 de la tapa C-terminal, aumentando el túnel que da acceso al agrupamiento trinuclear T2/T3.
- De las cinéticas de consumo de oxígeno y los estudios espectro-electroquímicos se deduce que la sincronización entre la unión del sustrato al sitio T1 y la entrada de oxígeno al agrupamiento trinuclear T2/T3 ha sido alterada, perturbando por consiguiente las constantes catalíticas tanto para el sustrato reductor como para el O<sub>2</sub>.
- Proponemos un nuevo papel para la tapa C-terminal en la funcionalidad global de las lacasas de Ascomicetes. Sugerimos su funcionamiento como una “*bisagra*” molecular que sincroniza la unión del oxígeno molecular al sitio T2/T3 con la entrada de sustratos en el sitio T1. El mecanismo sugerido se apoya adicionalmente en el hecho de que, aparte del cambio en la afinidad por el O<sub>2</sub>, el principal parámetro afectado por la mutación es el coeficiente de transmisión electrónica entre el sustrato reductor y el sitio T1.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



- Abecassis, V., Pompon, C., y Truan G. **(2000)** High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo DNA recombination in yeast: statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Nucleic Acids Research* 28:E88.
- Adamczak, M. y Krishna, S.H. **(2004)** Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis. *Food Technology and Biotechnology* 42:251-264.
- Affholter, J., y Arnold F.H. **(1999)** Engineering a revolution. *Chemtech* 29:34-39.
- Aktas, N., Kibarar, G., y Tanyolac, A. **(2000)** Effects of reaction conditions on laccase-catalyzed alpha-naphthol polymerization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 75:840-846.
- Alcalde, M., Bulter, T., y Arnold, F.H. **(2002)** Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. *Journal of Biomolecular Screening* 7:547-553.
- Alcalde, M. **(2003)** Evolución Molecular Dirigida: hacia el diseño de nuevos biocatalizadores. *Investigación y Ciencia* 326:69-77.
- Alcalde, M., Zumárraga, M., García-Arellano, H., Mencía, M., Plou, F.J., y Ballesteros, A. **(2005)** Screening mutant libraries of fungal laccases in the presence of organic solvents. *Journal of Biomolecular Screening*. 6:624-631.
- Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F.J., y Ballesteros, A. **(2006a)** Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends in Biotechnology* 24:281-287.

- Alcalde, M., Zumárraga, M., Polaina, J., Ballesteros, A., y F.J. Plou. **(2006b)** Combinatorial saturation mutagenesis by *in vivo* overlap extension for the engineering of fungal laccases. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 9:719-727.
- Alcalde, M. **(2007)** Laccase: biological functions, molecular structure and industrial applications. *En: Industrial enzymes. Structure, function and applications*. Ed. Polaina, J. y MacCabe, A.P. Springer, Heidelberg (Alemania), pp. 459-474.
- Antorini, M., Herpoel-Gimbert, I., Choinowski, T., Sigoillot, J.C., Asther, M., Winterhalter, K., y Piontek, K. **(2002)** Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1594:109-114.
- Arnold, F.H. **(1990)** Engineering enzymes for nonaqueous solvents. *Trends in Biotechnology* 8:244-249.
- Arnold, F.H. **(1998)** Design by directed evolution. *Accounts of Chemical Research* 31:125-131.
- Arnold, F.H. **(1999)** Unnatural selection: molecular sex for fun and profit. *Engineering & Science* 1/2:41-50.
- Arnold, F.H. y Volkov, A.A. **(1999)** Directed evolution of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 3:54-59.
- Arnold, F.H. **(2001)** Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* 409:253-257.
- Arnold, F. y Georgiou, G. eds. **(2003a)** Directed enzyme evolution: screening and selection methods. Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU).



- Arnold, F. y Georgiou, G. eds. **(2003b)** Directed evolution: library creation. Methods and protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU).
- Baldrian, P. **(2006)** Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30:215-242.
- Beloqui, A., Pita, M., Polaina, J., Martinez-Arias, A., Golyshina, O.V., Zumárraga, M., Yakimov, M.M., Garcia-Arellano, H., Alcalde, M., Fernandez, V.M., Elborough, K., Andreu, J.M., Ballesteros, A., Plou, F.J., Timmis, K.N., Ferrer, M., y Golyshin, P.N. **(2006)** Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen - Biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *Journal of Biological Chemistry* 281:22933-22942.
- Berka, R.M., Schneider, P., Golightly, E.J., Brown, S.H., Madden, M., Brown, K.M., Halkier, T., Mondorf, K., y Xu, F. **(1997)** Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3151-3157.
- Bidlack, Malonge, J.M., y Benson, R. **(1992)** Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Sciences* 51-56.
- Bloom, J.D., Labthavikul, S.T., Otey, C.R., y Arnold, F.H. **(2006)** Protein stability promotes evolvability. *Proceedings of the USA National Academy of Sciences* 103:5869-5874.
- Bogdanovskaya, V.A., Tarasevich, M.R., Kuznetsova, L.N., Reznik, M.F., y Kasatkin, E.V. **(2002)** Peculiarities of direct bioelectrocatalysis by laccase in aqueous-nonaqueous mixtures. *Biosensors & Bioelectronics* 17:945-951.

- Bommarius, A.S. y Riebel, B.R. **(2004a)** Applications of recombinant DNA technology: directed evolution. *En: Biocatalysis. Fundamentals and applications*. Wiley-VCH (EEUU), pp. 309-333.
- Bommarius, A.S. y Riebel, B.R. **(2004b)** Biocatalysis in non-conventional media. *En: Biocatalysis. Fundamentals and applications*. Wiley-VCH (EEUU), pp. 339-367.
- Bornscheuer, U.T. y Pohl, M. **(2001)** Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology* 5:137-143.
- Bourbonnais, R. y Paice, M.G. **(1990)** Oxidation of nonphenolic substrates - an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267:99-102.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P., y Yaguchi, M. **(1995)** Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1876-1880.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E., y Borneman, S. **(1997)** Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4627-4632.
- Bradford, M.M. **(1976)** Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Bulter, T. y Alcalde, M. **(2003)** Preparing libraries in *Saccharomyces cerevisiae*. *En: Directed evolution: library creation. Methods and protocols*. Ed. Arnold, F.H. y Georgiou, G. Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU), pp. 17-22.

- Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C., y Arnold, F.H. **(2003)** Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Applied and Environmental Microbiology* 69:987-995.
- Call, H.P. y Mucke, I. **(1997)** History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym<sup>®</sup> process). *Journal of Biotechnology* 53:163-202.
- Calvo, A.M., Copa-Patino, J.L., Alonso, O., y Gonzalez, A.E. **(1998)** Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Corioloropsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Archives of Microbiology* 171:31-36.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, M.J., y Martinez, A.T. **(2005)** Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1775-1784.
- Cambria, M.T., Cambria, A., Ragusa, S., y Rizzarelli, E. **(2000)** Production, purification, and properties of an extracellular laccase from *Rigidoporus lignosus*. *Protein Expression and Purification* 18:141-147.
- Cammack, R., Fernandez, V.M., y Hatchikian, E.C. **(1994)** Nickel-iron hydrogenase. *Methods in Enzymology* 243:43-68.
- Cantarella, G., d'Acunzo, F. y Galli, C. **(2003)** Determination of laccase activity in mixed solvents: Comparison between two chromogens in a spectrophotometric assay. *Biotechnology and Bioengineering* 82:395-398.

- Cañas, A.I., Alcalde, M., Plou, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T., y Camarero, S. **(2007)** Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environmental Science and Technology* 41:2964-2971.
- Chen, K.Q. y Arnold, F.H. **(1993)** Tuning the activity of an enzyme for unusual environments - sequential random mutagenesis of Subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proceedings of the USA National Academy of Sciences* 90:5618-5622.
- Cherry, J.R., Lamsa, M.H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., y Pedersen, A.H. **(1999)** Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnology* 17:379-384.
- Cherry, J.R. y Fidantsef, A.L. **(2003)** Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology* 14:438-443.
- Chica, R.A., Doucet, N., y Pelletier, J.N. **(2005)** Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Current Opinion in Biotechnology* 16:378-384.
- Christenson, A., Dimcheva, N., Ferapontova, E.E., Gorton, L., Ruzgas, T., Stoica, L., Shleev, S., Yaropolov, A.L., Haltrich, D., Thorneley, R.N.F., y Aust, S.D. **(2004)** Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes. *Electroanalysis* 16:1074-1092.
- Christenson, A., Shleev, S., Mano, N., Heller, A., y Gorton, L. **(2006)** Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1757:1634-1641.

- Cirino, P., Mayer, K.M., y Umeno, D. **(2003)** Generating mutant libraries using error-prone PCR. *En: Directed evolution: library creation. Methods and protocols.* Ed. Arnold, F.H. y Georgiou G. Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU), pp. 3-9.
- Claus, H. **(2004)** Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35:93-96.
- Cline, J. y Hogrefe, H. **(2000)** Randomize gene sequences with new PCR mutagenesis kit. *Stratagene Strategies* 13:157-161.
- Coco, W.M., Levinson, W.E., Crist, M.J., Hektor, H.J., Darzins, A., Pienkos, P.T., Squires, C.H., y Monticello, D.J. **(2001)** DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nature Biotechnology* 19:354-359.
- Collins, P.J., Kotterman, M.J.J., Field, J.A., y Dobson, A.D.W. **(1996)** Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:4563-4567.
- Crameri, A., Raillard, S.A., Bermudez, E., y Stemmer, W.P.C. **(1998)** DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* 391:288-291.
- d'Acunzo, F., Galli, C., y Masci, B. **(2002)** Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems - Solubility and steric issues. *European Journal of Biochemistry* 269:5330-5335.
- Darwin, C. **(1859)** The Origin of Species. By mean of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. London (Reino Unido).
- Dordick, J.S. **(1992)** Designing enzymes for use in organic-solvents. *Biotechnology Progress* 8:259-267.

- Drummond, D.A., Iverson, B.L., Georgiou, G., y Arnold, F.H. **(2005)** Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins. *Journal of Molecular Biology* 350:806-816.
- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Ostergaard, P., Schneider, P., Svendsen, A., y Davies, G.J. **(2001)** Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 angstrom resolution: evidence for different 'type 2 Cu-depleted' isoforms. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 57:333-336.
- Duran, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A., y Gianfreda, L. **(2002)** Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 31:907-931.
- Durao, P., Bento, I., Fernandes, A.T., Melo, E.P., Lindley, P.F., y Martins, L.O. **(2006)** Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11:514-526.
- Dwyer, M.A., Looger, L.L., y Hellinga, H.W. **(2004)** Computational design of a biologically active enzyme. *Science* 304:1967-1971.
- Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriques, A.O., y Carrondo, M.A. **(2003)** Crystal structure of a bacterial endospore coat component - A laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry* 278:19416-19425.
- Farinas, E.T., Bulter, T., y Arnold, F.H. **(2001)** Directed enzyme evolution. *Current Opinion in Biotechnology* 12:545-551.

- Ferrer, M., Martínez-Abarca, F., y Golyshin, P.N. (2005) Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Current Opinion in Biotechnology* 16:588-593.
- Fox, R.J., Davis, S.C., Mundorff, E.C., Newman, L.M., Gavrilovic, V., Ma, S.K., Chung, L.M., Ching, C., Tam, S., Muley, S., Grate, J., Gruber, J., Whitman, J.C., Sheldon, R.A., y Huisman, G.W. (2007) Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution. *Nature Biotechnology* 25:338-344.
- Garavaglia, S., Cambria, M.T., Miglio, M., Ragusa, S., Lacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., y Rizzi, M. (2004) The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *Journal of Molecular Biology* 342:1519-1531.
- Garzillo, A.M., Colao, M.C., Buonocore, V., Oliva, R., Falcigno, L., Saviano, M., Santoro, A.M., Zappala, R., Bonomo, R.P., Bianco, C., Giardina, P., Palmieri, G., y Sannia, G. (2001) Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*. *Journal of Protein Chemistry* 20:191-201.
- Georgescu, R., Bandara, G., y Sun, L.H. (2003) Saturation mutagenesis. *En: Directed evolution. Library creation. Methods and protocols.* Ed. Arnold, F.H. y Georgiou, G. Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU), pp.75-83.
- Gercog, C., Gustav, K. y Shtrele, I. (1985). Manual on inorganic synthesis (en ruso). Mir, Mosc (Rusia).
- Germann, U.A., Muller, G., Hunziker, P.E., y Lerch, K. (1988) Characterization of 2 allelic forms of *Neurospora crassa* laccase amino-terminal and carboxyl-terminal processing of a precursor. *Journal of Biological Chemistry* 263:885-896.

- Gianfreda, L., Xu, F., y Bollag, J.M. **(1999)** Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3:1-25.
- Gibbs, M.D., Nevalainen, K.M.H., y Bergquist, P.L. **(2001)** Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. *Gene* 271:13-20.
- Glieder, A., Farinas, E.T., y Arnold, F.H. **(2002)** Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nature Biotechnology* 20:1135-1139.
- Goddard, J.P. y Reymond, J.L. **(2004)** Enzyme assays for high-throughput screening. *Current Opinion in Biotechnology* 15:314-322.
- Guex, N. y Peitsch M.C. **(1997)** SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714-2723.
- Hakulinen, N., Kiiskinen, L.L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., y Rouvinen, J. **(2002)** Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural Biology* 9:601-605.
- Hall, T.A. **(1999)** Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hao, J.J. y Berry, A. **(2004)** A thermostable variant of fructose bisphosphate aldolase constructed by directed evolution also shows increased stability in organic solvents. *Protein Engineering Design & Selection* 17:689-697.
- Hayes, R.J., Bentzien, J., Ary, M.L., Hwang, M.Y., y Jacinto, J.M. **(2002)** Combining computational and experimental screening for rapid optimization of protein properties. *Proceedings of the USA National Academy of Sciences* 99:15926-15931.



- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., y Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain-reaction. *Gene* 77:51-59.
- Hublik, G. y Schinner, F. (2000) Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology* 27:330-336.
- Intra, A., Nicotra, S., Riva, S., y Danieli, B. (2005) Significant and unexpected solvent influence on the selectivity of laccase-catalyzed coupling of tetrahydro-2-naphthol derivatives. *Advanced Synthesis & Catalysis* 347:973-977.
- Jaeger, K.E. y Eggert, T. (2004) Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Current Opinion in Biotechnology* 15:305-313.
- Johannes, C., Majcherczyk, A., y Huttermann A. (1996) Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46:313-317.
- Johannes, C. y Majcherczyk, A. (2000) Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology* 66:524-528.
- Joo, H., Lin, Z.L., y Arnold, F.H. (1999) Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature* 399:670-673.
- Kagami, O., Baik, S.H., y Harayama, S. (2004) Effective DNA shuffling methods for enzyme evolution. *En: Enzyme functionality. Design, engineering, and screening*. Ed. Svendsen, A. Marcel Dekker, Inc, New York (EEUU), pp. 425-441.

- Khmelnitsky, Y.L., Mozhaev, V.V., Belova, A.B., Sergeeva, M.V., y Martinek, K. **(1991)** Denaturation capacity - a new quantitative criterion for selection of organic-solvents as reaction media in biocatalysis. *European Journal of Biochemistry* 198:31-41.
- Kiiskinen, L.L., Viikari, L., y Kruus, K. **(2002)** Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:198-204.
- Kikuchi, M., Ohnishi, K., y Harayama, S. **(1999)** Novel family shuffling methods for the *in vitro* evolution of enzymes. *Gene* 236:159-167.
- Kikuchi, M., Ohnishi, K., y Harayama, S. **(2000)** An effective family shuffling method using single-stranded DNA. *Gene* 243:133-137.
- Kirk, O., Borchert, T.V., y Fuglsang, C.C. **(2002)** Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13:345-351.
- Klibanov, A.M. **(2001)** Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409:241-246.
- Klonowska, A., Gaudin, C., Fournel, A., Asso, M., Le Petit, J., Giorgi, M., y Tron, T. **(2002)** Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. *European Journal of Biochemistry* 269:6119-6125.
- Kolkman, J.A. y Stemmer, W.P.C. **(2001)** Directed evolution of proteins by exon shuffling. *Nature Biotechnology* 19:423-428.
- Krishna, S.H. **(2002)** Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotechnology Advances* 20:239-267.

- Kuchner, O. y Arnold, F.H. (1999) Directed evolution of enzyme catalysis. *BioFutur* B1-B11.
- Kumar, S.V.S., Phale, P.S., Durani, S., y Wangikar, P.P. (2003) Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering* 83:386-394.
- Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H., y Kobayashi, S. (2003) Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin). *Macromolecular Bioscience* 3:758-764.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., y Veeger, C. (1987) Rules for optimization of biocatalysis in organic-solvents. *Biotechnology and Bioengineering* 30:81-87.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227:680-685.
- Larsson, T., Lindgren, A., y Ruzgas, T. (2001) Spectroelectrochemical study of cellobiose dehydrogenase and diaphorase in a thiol-modified gold capillary in the absence of mediators. *Bioelectrochemistry* 53:243-249
- Lee, M.Y. y Dordick, J.S. (2002) Enzyme activation for nonaqueous media. *Current Opinion in Biotechnology* 13:376-384.
- Li, H., Webb, S.P., Ivanic, J., y Jensen, J.H. (2004) Determinants of the relative reduction potentials of Type-1 copper sites in proteins. *Journal of the American Chemistry Society* 126:8010-8019.
- Li, K.C., Xu, F., y Eriksson, K.E.L. (1999) Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2654-2660.

- Lichtarge, O., Bourne, H.R., y Cohen, F.E. **(1996)** An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *Journal of Molecular Biology* 257:342-358.
- LinGoerke, J.L., Robbins, D.J., y Burczak, J.D. **(1997)** PCR-based random mutagenesis using manganese and reduced dNTP concentration. *Biotechniques* 23:409-412
- Lopez-Camacho, C., Salgado, J., Lequerica, J.L., Madarro, A., Ballestar, E., Franco, L., y Polaina, J. **(1996)** Amino acid substitutions enhancing thermostability of *Bacillus polymyxa* beta-glucosidase A. *Biochemical Journal* 314:833-838.
- Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S., Rogalski, J., Jaszek, H., Malarczyk, E., Staszczak, M., y Fink-Boots, M. **(1998)** Activity of free and immobilized extracellular *Cerrena unicolor* laccase in water miscible organic solvents. *Holzforschung* 52:589-595.
- Lutz, S., Ostermeier, M., y Benkovic, S.J. **(2001a)** Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using alpha-phosphothioate nucleotides. *Nucleic Acids Research* 29:E16.
- Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G.L., Maranas, C.D., y Benkovic, S.J. **(2001b)** Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proceedings of the USA National Academy of Sciences* 98:11248-11253.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., y Huttermann, A. **(1998)** Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 22:335-341.

- Majcherczyk, A. y Johannes, C. **(2000)** Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1474:157-162.
- Manivasakam, P., Weber, S.C., Mcelver, J., y Schiestl, R.H. **(1995)** Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 23:2799-2800.
- May, O., Nguyen, P.T., y Arnold, F.H. **(2000)** Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nature Biotechnology* 18:317-320.
- Mayer, A.M. y Staples, R.C. **(2002)** Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60:551-565.
- Maynard Smith, J. **(1984)** La teoría de la evolución. Hermann Blume (Reino Unido).
- McGuffin, L.J., Street, S., Sorensen, S.A., y Jones, D.T. **(2004)** The Genomic Threading Database. *Bioinformatics* 20:131-132.
- Milstein, O., Nicklas, B., y Huttermann, A. **(1989)** Oxidation of aromatic-compounds in organic-solvents with laccase from *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31:70-74.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., y Duran, N. **(2002)** Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 13:205-216.
- Miyazaki, K. y Arnold, F.H. **(1999)** Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: Rapid improvement of protein function. *Journal of Molecular Evolution* 49:716-720.

Moore, J.C. y Arnold, F.H. (1996) Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nature Biotechnology* 14:458-467.

Muhlrad, D., Hunter, R., y Parker, R. (1992) A rapid method for localized mutagenesis of yeast genes. *Yeast* 8:79-82.

Murakami, H., Hohsaka, T., y Sisido, M. (2002) Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs. *Nature Biotechnology* 20:76-81.

Nakamura, K. y Go, N. (2005) Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:2050-2066

Nikupaavola, M.L., Karhunen, E., Salola, P., y Raunio, V. (1988) Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochemical Journal* 254:877-883.

Ogino, H. y Ishikawa, H. (2001) Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91:109-116.

Okkels, J.S. (2004) *In vivo* gene shuffling in yeast: a fast and easy method for directed evolution of enzymes. *En: Enzyme functionality. Design, engineering, and screening*. Ed. Svendsen, A. Marcel Dekker, Inc, New York (EEUU), pp. 413-424.

Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W., y Rothstein, R.J. (1981) Yeast transformation - a model system for the study of recombination. *Proceedings of the USA National Academy of Sciences* 78:6354-6358.

Ostermeier, M., Shim, J.H., y Benkovic, S.J. (1999) A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nature Biotechnology* 17:1205-1209.

- Palmer, A.E., Szilagyi, R.K., Cherry, J.R., Jones, A., Xu, F., y Solomon, E.I. **(2003)** Spectroscopic characterization of the Leu513His variant of fungal laccase: Effect of increased axial ligand interaction on the geometric and electronic structure of the type 1 Cu site. *Inorganic Chemistry* 42:4006-4017.
- Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G., y Giardina, P. **(2003)** Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 33:220-230.
- Parales, R.E. y Ditty, J.L. **(2005)** Laboratory evolution of catabolic enzymes and pathways. *Current Opinion in Biotechnology* 16:315-325.
- Parekh, R., Forrester, K., y Wittrup, D. **(1995)** Multicopy overexpression of bovine pancreatic trypsin-inhibitor saturates the protein-folding and secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification* 6:537-545.
- Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R., y Vazquez-Duhalt, R. **(1999)** Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioloropsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 65:3805-3809.
- Piontek, K., Antorini, M., y Choinowski, T. **(2002)** Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry* 277:37663-37669.
- Plou, F.J., Alcalde, M., y Ballesteros, A. **(1999)** Estabilidad de los biocatalizadores. *Investigación y Ciencia* 273:46-55.
- Qian, Z. y Lutz, S. **(2005)** Improving the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B by circular permutation. *Journal of the American Chemical Society* 127:13466-13467.

- Rai, G.P., Sakai, S., Florez, A.M., Mogollon, L., y Hager, L.P. (2001) Directed evolution of chloroperoxidase for improved epoxidation and chlorination catalysis. *Advanced Synthesis & Catalysis* 343:638-645.
- Record, E., Punt, P.J., Chamkha, M., Labat, M., van den Hondel, C.A.M.J., y Asther, M. (2002) Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *European Journal of Biochemistry* 269:602-609.
- Riva, S. (2006) Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* 24:219-226.
- Robles, A., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Ben Omar, N., Perez, R., y Galvez, A. (2002) Characterisation of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielavopsis) paradoxa* CH32. *Enzyme and Microbial Technology* 31:516-522.
- Roccatano, D., Wong, T.S., Schwaneberg, U., y Zacharias, M. (2005) Structural and dynamic properties of cytochrome P450BM-3 in pure water and in a dimethylsulfoxide/water mixture. *Biopolymers* 78:259-267.
- Rodakiewicz-Nowak, J., Haber, J., Pozdnyakova, N., Leontievsky, A., y Golovleva, L.A. (1999) Effect of ethanol on enzymatic activity of fungal laccases. *Bioscience Reports* 19:589-600.
- Rodakiewicz-Nowak, J. (2000) Phenols oxidizing enzymes in water-restricted media. *Topics in Catalysis* 11:419-434.
- Rodakiewicz-Nowak, J., Kasture, S.M., Dudek, B., y Haber, J. (2000) Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 11:1-11.



- Rodriguez, E., Pickard, M.A., y Vazquez-Duhalt, R. (1999) Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 38:27-32.
- Rogalski, J., Dawidowicz, A.L., y Leonowicz, A. (1990). Purification and immobilization of the inducible form of extracellular laccase of the fungus *Trametes versicolor*. *Acta Biotechnologica* 10:261-269.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A., y Clare, J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8:423-488.
- Salazar, O., Cirino, P.C., y Arnold, F.H. (2003) Thermostabilization of a cytochrome P450 peroxygenase. *ChemBioChem* 4:891-893.
- Salazar, O. y Sun, L. (2003) Evaluating a screen and analysis of mutant libraries. *En: Directed enzyme evolution. Screening and selection methods*. Ed. Arnold, F.H. y Georgiou, G. Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU), pp. 85-97.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (EEUU).
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., y Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409:258-268.
- Schmidt-Dannert, C., Umeno, D., y Arnold, F.H. (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nature Biotechnology* 18:750-753.
- Shafikhani, S., Siege, R.A., Ferrari, E., y Schellenberger, V. (1997) Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization. *Biotechniques* 23:304-310.

- Shleev, S.V., Morozova, O., Nikitina, O., Gorshina, E.S., Rusinova, T., Serezhenkov, V.A., Burbaev, D.S., Gazaryan, I.G., y Yaropolov, A.I. (2004) Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie* 86:693-703.
- Shleev, S., Christenson, A., Serezhenkov, V., Burbaev, D., Yaropolov, A., Gorton, L., y Ruzgas, T. (2005a) Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode. *Biochemical Journal* 385:745-754.
- Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T., y Gorton, L. (2005b) Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. *Bioelectrochemistry* 67:115-124.
- Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A.I., Whittaker, J.W., y Gorton, L. (2005c) Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosensors & Bioelectronics* 20:2517-2554.
- Shuster, J.R. (1991) Gene expression in yeast: protein secretion. *Current Opinion in Biotechnology* 2:685-690.
- Sieber, V., Martinez, C.A., y Arnold, F.H. (2001) Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nature Biotechnology* 19:456-460.
- Sigoillot, C., Record, E., Belle, V., Robert, J.L., Levasseur, A., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J., Fournel, A., Sigoillot, J.C., y Asther, M. (2004) Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64:346-352.

- Solis-Oba, M., Ugalde-Saldivar, V.M., Gonzalez, I., y Viniegra-Gonzalez, G. **(2005)** An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 579:59-66.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., y Machonkin, T.E. **(1996)** Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* 96:2563-2605.
- Song, J.K. y Rhee, J.S. **(2001)** Enhancement of stability and activity of phospholipase A(1) in organic solvents by directed evolution. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1547:370-378.
- Stemmer, W.P.C. **(1994)** Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370:389-391.
- Sun, L.H., Bulter T., Alcalde, M., Petrounia, I.P., y Arnold, F.H. **(2002)** Modification of galactose oxidase to introduce glucose 6-oxidase activity. *ChemBioChem* 3:781-783.
- Sun, L.H. **(2003)** Engineering galactose oxidase to increase expression level in *E. coli*, enhance thermostability and introduce novel activities. Ph. D. Thesis. California Institute of Technology.
- Tao, H.Y. y Cornish, V.W. **(2002)** Milestones in directed enzyme evolution. *Current Opinion in Chemical Biology* 6:858-864.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., y Gibson, T.J. **(1994)** Clustal-W - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, Position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

- Thurston, C.F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-UK* 140:19-26.
- Tinoco, R., Pickard, M.A., y Vazquez-Duhalt, R. (2001) Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology* 32:331-335.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I., y Le Borgne, S. (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental* 46:1-15.
- Turner, N.J. (2003) Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends in Biotechnology* 21:474-478.
- Valderrama, B., Oliver, P., Medrano-Soto, A., y Vazquez-Duhalt, R. (2003) Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 84:289-299.
- Vandertol-Vanier, H.A., Vázquez-Duhalt, R., Tinoco, R., y Pickard, M.A. (2002) Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Corioloropsis gallica* laccase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29:214-220.
- Vanhercke, T., Ampe, C., Tirry, L., y Denolf, P. (2005) Reducing mutational bias in random protein libraries. *Analytical Biochemistry* 339:9-14.
- Vedvick, T.S. (1991) Gene expression in yeast: *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology* 2:742-745.
- Voigt, C.A., Martinez, C., Wang, Z.G., Mayo, S.L., y Arnold, F.H. (2002) Protein building blocks preserved by recombination. *Nature Structural Biology* 9:553-558.

- Volkov, A.A., Shao, Z., y Arnold, F.H. **(1999)** Recombination and chimeragenesis by *in vitro* heteroduplex formation and *in vivo* repair. *Nucleic Acids Research* 27:E18.
- Wahleithner, J.A., Xu, F., Brown, K.M., Brown, S.H., Golightly, E.J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A., y Schneider, P. **(1996)** The identification and characterisation of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* 29:395-403.
- Wahler, D. y Reymond, J.L. **(2001)** High-throughput screening for biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology* 12:535-544.
- Wariishi, H., Valli, K., y Gold, M.H. **(1992)** Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* - kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry* 267:23688-23695.
- Williams, G.J., Nelson, A.S., y Berry, A. **(2004)** Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61:3034-3046.
- Wong, T.S., Arnold, F.H., y Schwaneberg, U. **(2004a)** Laboratory evolution of cytochrome P450BM-3 monooxygenase for organic cosolvents. *Biotechnology and Bioengineering* 85:351-358.
- Wong, T.S., Tee, K.L., Hauer, B., y Schwaneberg, U. **(2004b)** Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. *Nucleic Acids Research* 32:E23.
- Wong, T.S., Tee, K.L., Hauer, B., y Schwaneberg, U. **(2005)** Sequence saturation mutagenesis with tunable mutation frequencies. *Analytical Biochemistry* 341:187-189.
- Wong, T.S., Zhurina, D., y Schwaneberg, U. **(2006)** The diversity challenge in directed protein evolution. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 9:271-288.

- Xu, F., Shin W., Brown, S.H., Wahleithner, J.A., Sundaram, U.M., y Solomon, E.I. **(1997)** A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1292:303-311.
- Xu, F., Berka, R.M., Wahleithner, J.A., Nelson, B.A., Shuster, J.R., Brown, S.H., Palmer, A.E., y Solomon, E.I. **(1998)** Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochemical Journal* 334:63-70.
- Xu, F., Palmer, A.E., Yaver, D.S., Berka, R.M., Gambetta, G.A., Brown, S.H., y Solomon, E.I. **(1999)** Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase - Axial perturbations of the T1 copper. *Journal of Biological Chemistry* 274:12372-12375.
- Xu, F. **(2005)** Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnology* 1:38-50.
- You, L. y Arnold, F.H. **(1996)** Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Engineering* 9:719-719.
- Zaks, A. y Klibanov, A.M. **(1988)** The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry* 263:8017-8021.
- Zaccolo, M., Williams, D.M., Brown, D.M., y Gherardi, E. **(1996)** An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues. *Journal of Molecular Biology* 255:589-603.
- Zhao, H., Giver, Z., Shao, Z., Affholter, J., y Arnold, F.H. **(1998)** Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nature Biotechnology* 16:258-261.

- Zhao, H., Moore, J.C., Volkov, A.A., y Arnold, F.H. **(1999)** Method for optimizing industrial enzymes by directed evolution. *En: Manual of industrial microbiology & biotechnology*. Ed. Demain, A. L., y Davies, J.E. ASM Press, Washington (EEUU), pp. 597-604.
- Zhao, H. y Zha, W. **(2004)** Evolutionary methods for protein engineering. *En: Enzyme functionality. Design, engineering, and screening*. Ed. Svendsen, A. Marcel Dekker, Inc, New York (EEUU), pp. 353-373.
- Zhao, H.M. y Arnold, F.H. **(1997)** Combinatorial protein design: strategies for screening protein libraries. *Current Opinion in Structural Biology* 7:480-485.
- Zhao, H.M., Chockalingam, K., y Chen, Z.L. **(2002)** Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology* 13:104-110.
- Zumárraga, M., Camarero, S., Martínez-Arias, A., Ballesteros, A., Plou, F. J., y Alcalde, M. **(2007a)** Exploring laccase functionality by in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra. Aceptado en *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* (Ref. PROT-00243-200).
- Zumárraga, M., Shleev, S., Polaina, J., Martínez-Arias, A., Vaz, C., López-De Lacey, A., Fernández, V.M., Ferrer, M., Plou, F.J., Ballesteros, A. y Alcalde, M. **(2007b)** Structural study of the *Myceliophthora thermophila* laccase: role of the C-terminal plug and its interaction with the highly conserved tripeptide <sub>509</sub>VSG<sub>511</sub>. Enviado a *Journal of Biological Chemistry* (Ref. M7:02985).
- Zumárraga, M., Bulter, T., Shleev, S., Polaina, J., Martínez-Arias, A., García-Arellano, H., Plou, F.J., Ballesteros, A. y Alcalde, M. **(2007c)** *In vitro* evolution of a highly active and stable fungal laccase in organic cosolvents. Segunda revisión en *Chemistry and Biology* (Ref. CHEMBIOL-D-07-0072).

Zumárraga, M., Plou, F.J., Garcia-Arellano, H., Ballesteros, A., y Alcalde, M. **(2007d)**  
Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases engineered by directed evolution. *Biocatalysis and Biotransformation* (en prensa, Ref. GBAB244321).



## **8. ANEXOS**

<b>ANEXO I</b> Secuencia del gen MtLT2.....	<b>171</b>
<b>ANEXO II</b> Programas del robot manipulador de líquidos.....	<b>175</b>
<b>ANEXO III</b> PCR mutagénica: <i>Taq</i> polimerasa vs. Mutazima .....	<b>177</b>
<b>ANEXO IV</b> Publicaciones científicas y congresos .....	<b>179</b>

## ANEXO I

Secuencia completa del gen MtLT2:

péptido-síñal (22 aminoácidos); propéptido (25 aminoácidos); proteína madura (559 aminoácidos); extensión C-terminal (14 aminoácidos).

1	ATG AGG TCC TTC ATC AGC GCC GCG ACG CTT TTG GTG GGC ATT CTC	45
1	M R S F I S A A T L L V G I L	15
46	ACC CCT AGC GTT CCT GCT GCC CCT CCA TCC ACC CCT GAG CAG CGC	90
16	T P S V P A A P P S T P E Q R	30
91	GAC CTG CTC GTC CCG ATC ACG GAG AGG GAG GAG GCA GCC GTG AAG	135
31	D L L V P I T E R E E A A V K	45
136	GCT CGC CAG CAG ATC TGC AAC ACC CCC AGC AAC CGG GCG TGC TGG	180
46	A R Q Q I C N T P S N R A C W	60
181	ACT GAC GGA TAC GAC ATC AAC ACC GAC TAC GAA GTG GAC AGC CCG	225
61	T D G Y D I N T D Y E V D S P	75
226	GAC ACG GGT GTT GTT CGG CCT TAT ACT CTG ACT CTC ACC GAA GTC	270
76	D T G V V R P Y T L T L T E V	90
271	GAC AAC TGG ACC GGA CCT GAT GGC GTC GTC AAG GAG AAG GTC ATG	315
91	D N W T G P D G V V K E K V M	105
316	CTG GTT AAC AAT AGT ATA ATC GGA CCA ACA ATC TTT GCG GAC TGG	360
106	L V N N S I I G P T I F A D W	120
361	GGC GAC ACG ATC CAG GTA ACG GTC ATC AAC AAC CTC GGG ACC AAC	405
121	G D T I Q V T V I N N L G T N	135
406	GGC ACG TCG ATC CAC TGG CAC GGA CTG CAC CAG AAG GGC ACC AAC	450
136	G T S I H W H G L H Q K G T N	150
451	CTG CAC GAC GGC GTC AAC GGT ATC ACC GAG TGC CCG ATC CCG CCC	495
151	L H D G V N G I T E C P I P P	165
496	AAG GGA GGG AGG AAG GTG TAC CGG TTC AAG GCT CAG CAG TAC GGG	540
166	K G G R K V Y R F K A Q Q Y G	180
541	ACG AGC TGG TAC CAC TCG CAC TTC TCG GCC CAG TAC GGC AAC GGC	585
181	T S W Y H S H F S A Q Y G N G	195
586	GTG GTC GGG GCC ATT CAG ATC AAC GGG CCG GCC TCG CTG CCG TAC	630
196	V V G A I Q I N G P A S L P Y	210
631	GAC ACC GAC CTG GGC GTG TTC CCC ATC AGC GAC TAC TAC TAC AGC	675
211	D T D L G V F P I S D Y Y Y S	225
676	TCG GCC GAC GAG CTG GTG GAA CTC ACC AAG AAC TCG GGC GCG CCC	720
226	S A D E L V E L T K N S G A P	240
721	TTC AGC GAC AAC GTC CTG TTC AAC GGC ACG GCC AAG CAC CCG GAG	765
241	F S D N V L F N G T A K H P E	255

766	ACG	GGC	GAG	GGC	GAG	TAC	GCC	AAC	GTG	ACG	CTC	ACC	CCG	GGC	CGG	810
256	T	G	E	G	E	Y	A	N	V	T	L	T	P	G	R	270
811	CGG	CAC	CGC	CTG	CGC	CTG	ATC	AAC	ACG	TCG	GTC	GAG	AAC	CAC	TTC	855
271	R	H	R	L	R	L	I	N	T	S	V	E	N	H	F	285
856	CAG	GTC	TCG	CTC	GTC	AAC	CAC	ACC	ATG	ACC	ATC	ATC	GCC	GCC	GAC	900
286	Q	V	S	L	V	N	H	T	M	T	I	I	A	A	D	300
901	ATG	GTG	CCC	GTC	AAC	GCC	ATG	ACG	GTC	GAC	AGC	CTC	TTC	CTC	GGC	945
301	M	V	P	V	N	A	M	T	V	D	S	L	F	L	G	315
946	GTC	GGC	CAG	CGC	TAC	GAT	GTC	GTC	ATC	GAA	GCC	AGC	CGA	ACG	CCC	990
316	V	G	Q	R	Y	D	V	V	I	E	A	S	R	T	P	330
991	GGG	AAC	TAC	TGG	TTT	AAC	GTC	ACA	TTT	GGC	GGC	GGC	CTG	CTC	TGC	1035
331	G	N	Y	W	F	N	V	T	F	G	G	G	L	L	C	345
1036	GGC	GGC	TCC	AGG	AGT	CCC	TAC	CCG	GCC	GCC	ATC	TTC	CAC	TAC	GCC	1080
346	G	G	S	R	S	P	Y	P	A	A	I	F	H	Y	A	360
1081	GGC	GCC	CCC	GGC	GGC	CCG	CCC	ACG	GAC	GAG	GGC	AAG	GCC	CCG	GTC	1125
361	G	A	P	G	G	P	P	T	D	E	G	K	A	P	V	375
1126	GAC	CAC	AAC	TGC	CTG	GAC	CTC	CCC	AAC	CTC	AAG	CCC	GTC	GTG	GCC	1170
376	D	H	N	C	L	D	L	P	N	L	K	P	V	V	A	390
1171	CGC	GAC	GTG	CCC	CTG	AGC	GGC	CTC	GCC	AAG	CGG	CCC	GAC	AAC	ACG	1215
391	R	D	V	P	L	S	G	L	A	K	R	P	D	N	T	405
1216	CTC	GAC	GTC	ACC	CTC	GAC	ACC	ATG	GGC	ACG	CCC	CTG	TTC	GTC	TGG	1260
406	L	D	V	T	L	D	T	M	G	T	P	L	F	V	W	420
1261	AAG	GTC	AAC	GGC	AGC	GCC	ATC	AAC	ATC	GAC	TGG	GGC	AGG	CCC	GTC	1305
421	K	V	N	G	S	A	I	N	I	D	W	G	R	P	V	435
1306	GTC	GAC	TAC	GTC	CTC	ACG	CAG	AAC	ACC	AGC	TTC	CCA	CCC	GGG	CAC	1350
436	V	D	Y	V	L	T	Q	N	T	S	F	P	P	G	H	450
1351	AAC	ATT	GTC	GAG	GTG	AAC	GGA	GCT	GAT	CAG	TGG	TCG	TAC	TGG	TTG	1395
451	N	I	V	E	V	N	G	A	D	Q	W	S	Y	W	L	465
1396	ATC	GAG	AAC	GAT	CCC	GGC	GCA	CCT	TTC	ACC	CTA	CCG	CAT	CCG	ATG	1440
466	I	E	N	D	P	G	A	P	F	T	L	P	H	P	M	480
1441	CAC	CTG	CAC	GGC	CAC	GAC	TTT	TAC	GTG	CTG	GGC	CGC	TCG	CCC	GAC	1485
481	H	L	H	G	H	D	F	Y	V	L	G	R	S	P	D	495
1486	GAG	CCG	CCG	GCA	TCC	AAA	GAG	CGG	CAC	GTG	TTC	GAT	CCG	GCG	CGG	1530
496	E	P	P	A	S	K	E	R	H	V	F	D	P	A	R	510
1531	GAC	GCG	GGC	CTG	CTG	AGC	GGG	GCC	AAC	CCT	GTG	CGG	CGG	GAC	GTG	1575
511	D	A	G	L	L	S	G	A	N	P	V	R	R	D	V	525
1576	ACG	ATG	CTG	CCG	GCG	TTC	GGG	TGG	GTG	GTG	TTG	GCC	TTC	CGG	GCC	1620
526	T	M	L	P	A	F	G	W	V	V	L	A	F	R	A	540
1621	GAC	AAC	CCG	GGC	GCC	TGG	CTG	TTC	CAC	TGC	CAC	ATC	GCC	TGG	CAC	1665
541	D	N	P	G	A	W	L	F	H	C	H	I	A	W	H	555
1666	GTC	TCG	GGC	GGC	CTG	GGC	GTC	GTC	TAC	CTC	GAG	CGC	GCC	GAC	GAC	1710
556	V	S	G	G	L	G	V	V	Y	L	E	R	A	D	D	570
1711	CTG	CGC	GGG	GCC	GTC	TCG	GAC	GCC	GAC	GCC	GAC	GAC	TTC	GAC	CGC	1755
571	L	R	G	A	V	S	D	A	D	A	D	D	F	D	R	585

---

1756	CTC	TGC	GCC	GAC	TGG	CGC	CGC	TAC	TGG	CCT	ACC	AAC	CCC	AAC	CCC	1800
586	L	C	A	D	W	R	R	Y	W	P	T	N	P	N	P	600
1801	AAG	TCC	GAC	TCG	GGC	CTC	AAG	CGC	CGC	TGG	GTC	GAG	GAG	GGC	GAG	1845
601	K	S	D	S	G	L	K	R	R	W	V	E	E	G	E	615
1846	TGG	CTG	GTC	AAG	GCG	TGA										1863
616	W	L	V	K	A	*										



## ANEXO II

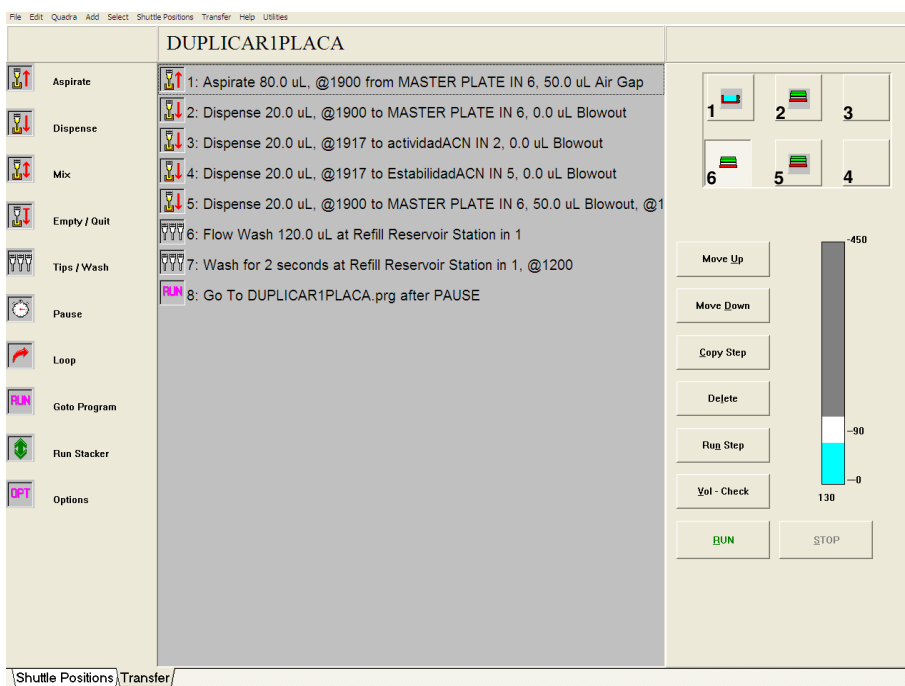
Los *screenings* de las diferentes generaciones se llevaron a cabo con la ayuda de un robot manipulador de líquidos Quadra96 (Tomtec, EEUU) (**Figura A.1**).



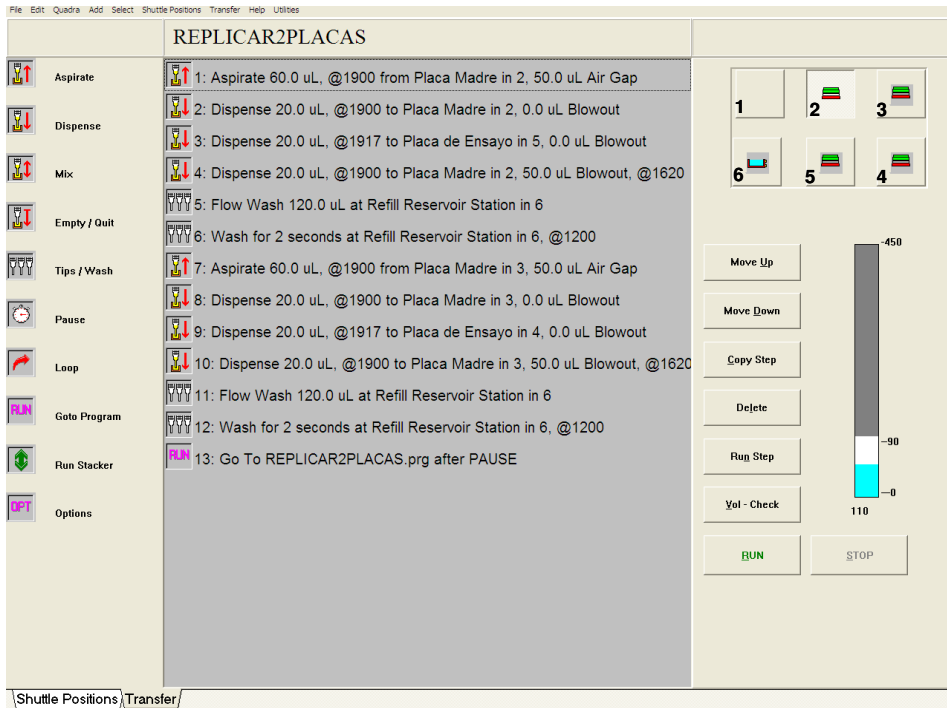
**Figura A.1.** Fotografía del robot manipulador de líquidos, con placas multipocillo en sus diferentes estaciones.

Los programas diseñados para la transferencia de sobrenadantes de microcultivos y adición de reactivos en esta Tesis Doctoral se detallan a continuación.

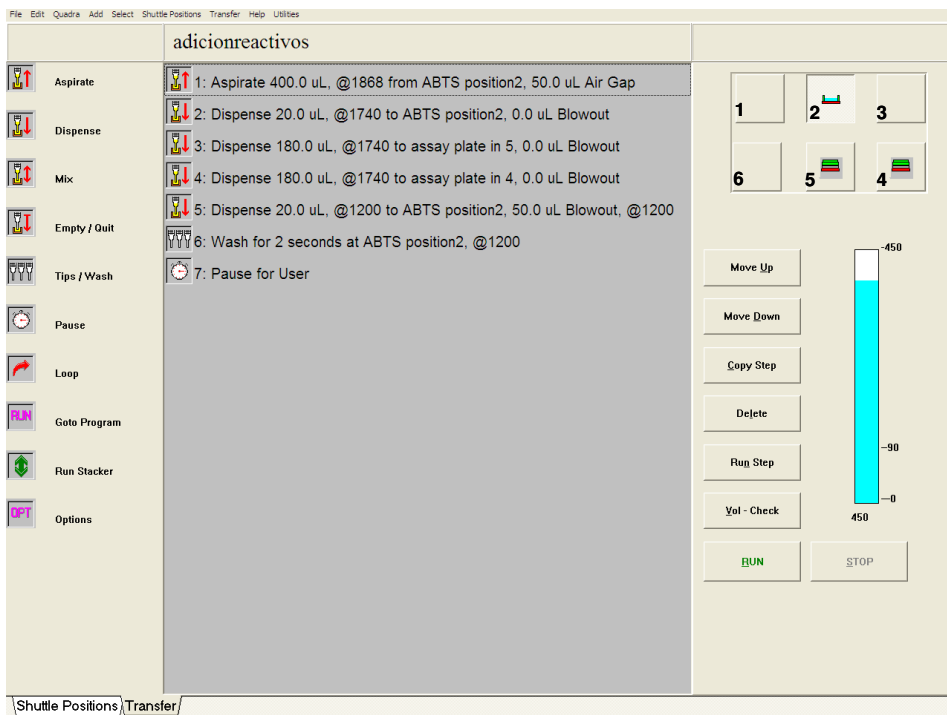
a)

A screenshot of the Tomtec Quadra 96 software interface. The window title is 'DUPLICAR1PLACA'. The interface is divided into several sections. On the left, there is a vertical toolbar with icons for Aspirate, Dispense, Mix, Empty / Out, Tips / Wash, Pause, Loop, Goto Program, Run Stacker, and Options. The main area contains a list of steps for the program: 1: Aspirate 80.0 uL, @1900 from MASTER PLATE IN 6, 50.0 uL Air Gap; 2: Dispense 20.0 uL, @1900 to MASTER PLATE IN 6, 0.0 uL Blowout; 3: Dispense 20.0 uL, @1917 to actividadACN IN 2, 0.0 uL Blowout; 4: Dispense 20.0 uL, @1917 to EstabilidadACN IN 5, 0.0 uL Blowout; 5: Dispense 20.0 uL, @1900 to MASTER PLATE IN 6, 50.0 uL Blowout, @1; 6: Flow Wash 120.0 uL at Refill Reservoir Station in 1; 7: Wash for 2 seconds at Refill Reservoir Station in 1, @1200; 8: Go To DUPLICAR1PLACA.prg after PAUSE. On the right side, there is a control panel with buttons for Move Up, Move Down, Copy Step, Delete, Run Step, Vol - Check, RUN, and STOP. A vertical scale is also present, ranging from 0 to 450, with a current value of 130. At the bottom, there are tabs for Shuttle Positions and Transfer.

b)



c)



**Figura A.2. a)** Duplicar una placa: a partir de la placa maestra (estación nº 6 del robot) crear 2 placas réplica (estaciones 2 y 5) con 20 µL cada una. **b)** Réplica dos placas a la vez: a partir de dos placas maestras diferentes (estaciones 2 y 3) crear una placa réplica de cada una de ellas (estaciones 4 y 5, respectivamente). **c)** Adición de 180 µL de reactivo (reservorio en estación 2) a dos placas réplica independientes (estaciones 4 y 5).



## ANEXO III

### PCR mutagénica: *Taq* polimerasa vs. Mutazima

Una manera ampliamente aceptada de evaluar la tendencia en los espectros mutacionales es analizar la relación de transiciones (Ts, sustituciones de purinas por purinas o pirimidinas por pirimidinas) y transversiones (Tv, sustituciones de purinas por pirimidinas y viceversa). Como hay 4 posibles transiciones y 8 posibles transversiones, la relación Ts/Tv de un espectro mutacional no predeterminado será 0.5 y la relación AT→GC/GC→AT igual a 1.

Sin embargo, tanto Mutazima como la *Taq* polimerasa muestran una tendencia elevada hacia las transiciones, con una relación Ts/Tv que puede variar de 2.9 a 0.8 (**Tabla A.1**). Además, Mutazima tiende generalmente a mutar Gs y Cs con una relación AT→GC/GC→AT ~0.2, lo que facilita la mutagénesis de moldes DNA ricos en GCs, como es el caso del gen de la lacasa de MtL (65 % del total de nucleótidos). Por el contrario, *Taq* es 2-3 veces más propensa a introducir mutaciones A→N o T→N (con relaciones AT→GC/GC→AT superiores a 1).

El espectro mutacional complementario de ambas polimerasas hace que compensen mutuamente la tendencia inherente de cada una de ellas, obteniendo genotecas con un perfil de mutación más equilibrado. Es decir, la combinación de diferentes polimerasas alternándolas en generaciones sucesivas de evolución o creando librerías de mutantes independientes en una única generación, incrementa la exploración del espacio proteico y por tanto, las librerías tendrán una representación de mutantes más variada que las librerías creadas mediante una única polimerasa. Estos enfoques se han visto plasmados en la 1ª y 2ª generación.

Además, en la 4ª generación se buscó una variación del perfil mutacional mediante el ensamblaje *in vivo* de librerías con diferente tendencia mutacional, obteniendo una variante (2E9) con dos mutaciones en codones consecutivos (<sub>GGC</sub>G614D<sub>GAC</sub> y <sub>GAG</sub>E615K<sub>AAG</sub>) como se ha señalado anteriormente. En ambas mutaciones, se producen dos transiciones A→G. Aunque este tipo de cambios son más frecuentes con la Mutazima que con la *Taq* (43.7% frente a 13.6%), tampoco se puede descartar la participación de la *Taq*/MnCl<sub>2</sub> en estas mutaciones.

**Tabla A.1.** Espectro mutacional de las polimerasas *Taq* y Mutazima.

Tipo de mutación	<i>Taq</i> polimerasa (MnCl <sub>2</sub> / dNTPs desequilib.)	<i>Taq</i> polimerasa (MnCl <sub>2</sub> /dNTPs equilibrados)	Mutazima polimerasa
Ts/Tv	0.8	2.9	1.2
AT→GC/GC→AT	1.9	6.6	0.2
A→N, T→N	75.9 %	83.3 %	25.6 %
G→N, C→N	19.6 %	14.2 %	72.5 %
<b>Transiciones</b>			
A→G, T→C	27.6 %	63.2 %	10.3 %
G→A, C→T	13.6 %	9.5 %	43.7 %
<b>Transversiones</b>			
A→T, T→A	40.9 %	16.1 %	11.1 %
A→C, T→G	7.3 %	4.0 %	4.2 %
G→C, C→G	1.4 %	1.4 %	8.8 %
G→T, C→A	4.5 %	3.3 %	20.0 %
<b>Inserciones</b>	0.3 %	n.d.	0.8 %
<b>Deleciones</b>	4.2 %	1.5 %	1.1 %
<b>Referencias</b>	(Shafikhani y cols., 1997)	(LinGoerke y cols., 1997)	(Cline y Hogrefe, 2000)

## ANEXO IV

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones y trabajos presentados en congresos:

### **Publicaciones científicas:**

1. Alcalde, M., Zumárraga, M., García-Arellano, H., Mencía, M., Plou, F.J., y Ballesteros, A. (2005) Screening mutant libraries of fungal laccases in the presence of organic solvents. *Journal of Biomolecular Screening*. 6:624-631.
2. Alcalde, M., Zumárraga, M., Polaina, J., Ballesteros, A., y Plou, F.J. (2006) Combinatorial saturation mutagenesis by *in vivo* overlap extension for the engineering of fungal laccases. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 9:719-727.
3. Zumárraga, M., Plou, F.J., García-Arellano, H., Ballesteros, A., y Alcalde, M. (2007) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases engineered by directed evolution. *Biocatalysis and Biotransformation* (en prensa, Ref. GBAB244321).
4. Zumárraga, M., Bulter, T., Shleev, S., Polaina, J., Martínez-Arias, A., García-Arellano, H., Plou, F.J., Ballesteros, A. y Alcalde, M. (2007) *In vitro* evolution of a highly active and stable fungal laccase in organic cosolvents. Segunda revisión en *Chemistry and Biology* (Ref. CHEMBIOL-D-07-00072).
5. Zumárraga, M., Camarero, S., Martínez-Arias, A., Ballesteros, A., Plou, F. J., y Alcalde, M. (2007) Exploring laccase functionality by *in vivo* assembly of mutant libraries with different mutational spectra. Aceptado en *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* (Ref. PROT-00243-200).
6. Zumárraga, M., Shleev, S., Polaina, J., Martínez-Arias, A., Vaz, C., López-De Lacey, A., Fernández, V.M., Ferrer, M., Plou, F.J., Ballesteros, A. y Alcalde, M. (2007) Structural study of the *Myceliophthora thermophila* laccase: role of the C-terminal plug and its interaction with the highly conserved tripeptide <sub>509</sub>VSG<sub>511</sub>. Enviado a *Journal of Biological Chemistry* (Ref. M7:02985).

### **Trabajos presentados en Congresos:**

1. Alcalde, M., García-Arellano, H., Zumárraga, M., Plou, F. J. y Ballesteros, A. "Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by native and evolved fungal laccases. The usage of polymeric dyes for enzyme-biodegradation screening assays". Congreso de la Sociedad Española de Catálisis, SECAT 03 (Málaga, 22-25 de Junio 2003). Póster.

2. Alcalde, M., García-Arellano, H., Zumárraga, M., Plou, F. J. y Ballesteros, A. "*High-Throughput assay for the directed evolution of a fungal laccase in organic media*". Current Challenges in Biomolecular Screening (Madrid, 13-14 de Noviembre 2003). Póster.
3. Alcalde, M., Zumárraga, M., García-Arellano, H., Plou, F. J. y Ballesteros, A. "*Evolución Dirigida de Enzimas*". Congreso Nacional de Biotecnología BIOTEC 04 (Oviedo, julio 2004). Conferencia invitada y Póster.
4. Zumárraga, M., García-Arellano, H., Pastor, E., Plou, F.J., Molina, M.J., Ballesteros, A. y Alcalde, M. "*Degradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos con enzimas: diseño combinatorial de catalizadores activos en presencia de disolventes*". Congreso de la Sociedad Española de Catálisis, SECAT 05 (Madrid, 27-29 de Junio de 2005). Póster.
5. Zumárraga, M., García-Arellano, H., Molina, M. J., Plou, F. J. y Alcalde, M. "*Evolución de laboratorio de lacasas termoestables para su actividad y estabilidad en presencia de altas concentraciones de co-solventes*". Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular SEBBM 05 (Zaragoza, 12-15 de Septiembre de 2005). Asistencia y Póster.
6. Zumárraga, M., Alcalde, M., Polaina, J., Molina, M. J., Ballesteros, A. y Plou, F. J. "*Combinatorial saturation mutagenesis by in vivo overlap extension for the engineering of fungal laccases*". Internacional symposium on ENVIRONMENTAL BIOCATALYSIS: from remediation with enzymes to novel green processes (Cordoba, 23-26 de Abril de 2006). Asistencia y Póster.
7. López-Cortés, M., Zumárraga, M., Beloqui, A., Fernández-Arrojo, L., Torres, P., Ghazi, I., Kunamneni, A., Pastor, E., Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J. y Ballesteros, A. "*Obtención y mejora por evolución dirigida de enzimas nativas y metagenomas extremos. Su aplicación a procesos de interés industrial*". Reunión de la Red Nacional de "Plegamiento, Estabilidad e Ingeniería de Proteínas" (Bilbao, Junio 2006). Comunicación oral.
8. Zumárraga, M., Bulter, T., Shleev, S., Polaina, J., García-Arellano, H., Martínez-Arias, A., Plou, F. J., Ballesteros, A. y Alcalde, M. "*Evolución de laboratorio de una lacasa fúngica altamente activa y estable en presencia de disolventes orgánicos*". Biospain-Biotec 2006 (Madrid 18-20 de Septiembre de 2006). Póster.