



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**Análisis estructural de los mecanismos de regulación de la actividad  
enzimática de la lacasa de *Thermus thermophilus* HB27**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

***DOCTOR EN CIENCIAS***

PRESENTA

**M. en C. RICARDO MIRANDA BLANCAS**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA**

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2021

El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Estructural perteneciente al Instituto de Biotecnología (UNAM) y en el Centro de Investigación en Dinámica Celular de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Contó con el financiamiento del proyecto PAPIIT IN-209920 de la Universidad Nacional Autónoma de México y la beca doctoral No. 592043.

**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART  
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS  
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “**Análisis estructural de los mecanismos de regulación de la actividad enzimática de la lacasa de *Thermus thermophilus* HB27**” que presenta el alumno **Ricardo Miranda Blancas (5620141101)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Carlos Daniel Amero Tello CIQ-UAEM	APROBADO	
Dr. Rodrigo Said Razo Hernández CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Alejandra Hernández Santoyo FQ-UNAM	APROBADO	
Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares FQ-UNAM	APROBADO	
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Enrique Rudiño Piñera IBT-UNAM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MOREL DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril de 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA** | Fecha: 2021-04-20 19:48:26 | Firmante

mGKTu2cmWsrOK3goiuzDBtaF58xn8JrgRTdtRzQpVi50RRtJa9sCXIQDaah8jcs04D2BEycMI1vjiZqCAtumfaiY7Rt9fkb4x7213314V0x/Q4b3II+PHW2L4e6pJXUZny+xGeKB3tpf+b1GLLZ7e+Q7ZB2nBEZZJx1pb8lk5ntwQmOpp25wH/MZvfbzBq+VmsPxcmmOzo/cnDgaZd2aQhcnbe+KvynsCbcodwp3p5uSkNFGuMLZiBjV61ybnXQ/sFLokgzYc25ike13/9bCB8p/XP97U0XS+oyugP817Ywb9DwIA6OJFFwoXfyMGQIPjPqhczu1QZPYMuhDQ==

**ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO** | Fecha: 2021-04-21 09:47:58 | Firmante

j1kZsnAU7kDX7FEEOPgWbBphQzo1OEEHNPwL1Gk8Ta3QWZuI2NwpUB0nd9FXcVLd+FFEjleA4+9yJxtD4fAtBFZXJDPS4vmH2GKNgpYtCbr3yDLQ8+0bvVHBB1Wj9I1BBespTTKaQ4WmL46c8jOnyKUYpPxeUm7519xsRaUalKbFkbj2TfWBYfKLSLsq/GN6tyA6TKXV9G9VIdyioURRoKqJqIUYIM9g63kGzDokb13H5jorW65EXUY3VDDCBe5p9zNpnWz2ZJIYCG1py3W5m5aLnZ63S0syUkoAhU1vxDzjxUaXilnkT1T4rNM+5voY1ucLj5TEZ2zE94vdPZQ==

**ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA** | Fecha: 2021-04-21 20:35:32 | Firmante

f3v2aviQ7GkS7nEUqeREV7HUH0IKzvd1G5F1s/MMQE5Z5Yqp+q36haj0+QTzxbLw0ahcaUeBkEdalmMSFcezEwetIIHeWOBzwxekjNxnsvFX2sBTX68gr+0xHvw722JtmXGEWeBOjWdg1841xCIFQzCnkz63F4DehAWqVfmXTIJGGIYDShrf8KM8C823PKTe+EinCKI3TRe7NrrOzUo2DXukoTWSFnwa0ZFL3dKsoDK2Dny7xduC8Vly2xd28IAXdhq+C0rmoDbcVMVz8yaa/9GFLjy+aEYImG7KeOm/jq0T8DnJn2YjuUhuVY5ZXuEavuyTWdMwmPVjKj9YJGQ==

**CARLOS DANIEL AMERO TELLO** | Fecha: 2021-04-22 12:48:54 | Firmante

IQFE5Kf9h7bPgaLLNXhxdgb3bH+oD26Uxa2vpQTl+IFnkYMPauMQI1IaaCcWct/zssINNCGSopO1XtWVVe644VHamiaY2rRwF83JBEYNxmdVq7AkryQ3Ga4HqIPBR1jBwLjhV2SbL4H48zIVrs54sBR3RplPcpDUEE4hMZXiildxw4/qNZoWHK3J85LmUsbd4M0RtuRkhh24Ng6XNAXEn2mCWlkT1hBkK3ALcvplfsm3l4t9vuXrVrYqZ0y6GaM8DphGmwAEVIRXVGyimOVts5otJ0rJtdfYtGEgijw7HaRuK/p0xUq07d7BpDIJMKwVzjk76xIQJuPjZL8pxw==

**RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ** | Fecha: 2021-04-22 15:12:27 | Firmante

HXDwqsDof2PpYQ0oX1Qbo3jrip6DHQqVlxlX0+7qM3AFyGF09e3CLhGn5QsxVHJqGTfIKSpJmq6bu2+2kyCQon1j3Xdj3ERilHh98ffBcQIWBa+VkdRytdEw+hBR/Y5CqAVlx8ZsbVWCifIM6Y0ouH7y9cfWOku5aO2Utxf9zQ7mtVCDPBT4E2J3Sb35FmdswmNd8twHB2ZwqENgmqerXrPyqRQKy3JhdcpaLQRjIRY/IPnPGetqZAXK0o/aHxbKtEGLJPYQL1noN6ad72Isn7Zl5OpqZUg0HYQry/SmWU6m21ft0T3kpO1wwogks9mhosahssGTG9kmygscw==

**CARMEN NINA PASTOR COLON** | Fecha: 2021-04-25 18:10:31 | Firmante

SQs/3lnzlUr09F086h8Mkpk0ZA+AkQTVc828pQBkYuk+TuxhPXnW4guxG3uWtLwgmYadq/Ug2VtHlv8ryGW6Uru2qJssLu9d9Een22wPVcil5Ens9YlpG8ZAs00sF+sKy5zLB8cwrP4hTPP/yvWUWT1YKfzvtqsk05Q524R3LLJ/FMlnsvsl2hhRI9bavEkY4I2RtXaSkk6w8GJYpXFQX23Jgz1ppq/2gBaZjo/2m8GNQ0jsjWVS3YVvdb7GHtoz5AvuwEM5seO6x0SNlx6/BU7GRavIN3lr/SzfOexwdKLCtXcdu4MiurVY+YH9x4kBJ6loEoC98A3rHQ4p1OaiDg==

**ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES** | Fecha: 2021-06-01 18:32:57 | Firmante

SBk61P4rFuOJb3TyoeFTfV4C9Woy8aunY9WqqRTIOknDlqEJZh5GpniHh7zAd/tmaBwoYReJDBsgUppUfrb7nO1kxRCxJBYMYC8UbdF3Mxym9sxxXdrGQJbeLJrL0urXEB4uL6bFzmEnOVJfz4FCjbV3fSV4bipipeiKB8zIbl1nl2zMHf6dX2IDe5OEpf3ldf7d+ErMWD1DoNbl42zJx+H/S9BI6W1WJ/SWWHvY5QDX/+sAvaotvog9h9JrsrebXIKKaVG5Nq+QehULg16YT8v1mz4e80tpSuro+OL2DDb9sy269z9BNNeoC4pThkoTsq2Ogi98hAhDxCKMbrmQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



nLzoEG

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/sAhXrfV7GOWv64CjhjYpUMH8w2pQuWAQ>





## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Rudiño Piñera por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación, por darme las condiciones para poder desarrollar con libertad un proyecto que me dio habilidades y herramientas para seguir mi camino en la ciencia. Y sobre todo por demostrarme que además de un colaborador tengo un amigo en el laboratorio 8 del IBT.

A mi familia de la que siempre he recibido todo el apoyo para poder lograrlo. Efren, Ana, Rodolfo, Teodoro y Efrecito.

A la Dra. Nina Pastor y el Dr. Carlos Amero por todo el apoyo y aportaciones que hicieron a este proyecto como parte del comité tutorial.

A todo los integrantes del Laboratorio de Bioquímica Estructural.

A la Dr. Adela Rodríguez y la M. en C. Georgina E. Espinosa por su apoyo para difractar cristales que dieron lugar a una de las estructuras cristalográficas presentadas en este trabajo.

Al equipo de la línea 19-ID del Advanced Photon Source, Chicago que nos dio la posibilidad de difractar cristales que dieron lugar a diversas estructuras cristalográficas que se presentan en este trabajo.

# INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>V</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRONIMOS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. ABSTRACT</b> .....	<b>XI</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1 <i>Thermus thermophilus</i></b> .....	<b>3</b>
<b>3.2 Proteínas extremófilas</b> .....	<b>5</b>
<b>3.3 Metaloproteínas</b> .....	<b>6</b>
<b>3.4 Enzimas multicobre oxidasas</b> .....	<b>7</b>
<b>3.5 Enzima Lacasa</b> .....	<b>9</b>
<b>3.6 Lacasa de <i>Thermus thermophilus</i></b> .....	<b>12</b>
<b>3.7 Cristalografía de proteínas</b> .....	<b>14</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>6.1. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>20</b>
<b>6.2. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>20</b>
<b>7. METODOLOGÍA</b> .....	<b>21</b>
<b>7.1 Sobreexpresión de la <i>Tth</i>-MCO</b> .....	<b>21</b>
<b>7.2 Purificación de la enzima <i>Tth</i>-MCO</b> .....	<b>22</b>
<b>7.3 Cinética enzimática</b> .....	<b>22</b>
<b>7.4 Cristalización de la <i>Tth</i>-MCO</b> .....	<b>23</b>

<b>7.5 Colecta de datos por difracción de rayos X .....</b>	<b>24</b>
7.5.1. Estructuras 6Q29, 6WX9, 6WCH, 6WCG, 6WCL, 6WCM,6WCN, 6WCP y 6W2K. ....	24
7.5.2. Estructura 6TYR .....	24
<b>7.6 Determinación de estructura cristalográfica .....</b>	<b>25</b>
7.6.1. Estructuras 6Q29, 6WX9, 6WCH, 6WCG, 6WCL, 6WCM, 6WCN, 6WCP y 6W2K. ....	25
7.6.2. Estructura 6TYR .....	25
<b>7.7. Filogenia molecular .....</b>	<b>26</b>
<b>7.8. Cálculos de dinámica molecular.....</b>	<b>26</b>
7.8.1 Preparación de modelos de proteínas para cálculos de dinámica molecular. ....	26
7.8.2 Simulaciones de dinámica molecular. ....	27
7.8.3 Análisis de las trayectorias .....	28
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>8.1 Purificación y cristalización de la <i>Tth</i>-MCO. ....</b>	<b>29</b>
<b>8.2 Análisis estructural de la horquilla-<math>\beta</math> de la <i>Tth</i>-MCO. ....</b>	<b>36</b>
<b>8.3 Cálculos de dinámica molecular.....</b>	<b>43</b>
<b>8.4 Composición y función de la horquilla-<math>\beta</math> de la <i>Tth</i>-MCO.....</b>	<b>47</b>
<b>8.5 Mecanismo de transferencia de protones en la enzima <i>Tth</i>-MCO .....</b>	<b>53</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>61</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>62</b>

## ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
SGZ	Siringaldazina
<i>Tth</i> -MCO	Lacasa de <i>Thermus thermophilus</i>
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulphate- polyacrylamide gel electrophoresis
MGy	Mega grays

## 1. RESUMEN

La enzima multicobre oxidasa de la bacteria hipertermófila *Thermus thermophilus* (*Tth*-MCO), ha sido caracterizada y descrita previamente como un ejemplo de una lacasa con baja actividad catalítica, especialmente cuando se compara contra las lacasas fúngicas.

Estructuralmente, la *Tth*-MCO tiene una característica única entre las lacasas reportadas en la base de datos Protein Data Bank (PDB): una horquilla- $\beta$  adyacente a la cavidad de entrada al sitio de coordinación de cobre T1, la cual no está presente en ninguna otra lacasa depositada en el PDB. Esta horquilla- $\beta$  presenta un comportamiento típico de las áreas expuestas a solvente en estructuras cristalográficas: ausencia de densidad electrónica, altos valores de factores B y diversos contactos cristalinos con los vecinos cristalográficos. Sin embargo, el comportamiento dinámico de esta horquilla- $\beta$  en solución y sus implicaciones biológicas no han sido descritas.

En este trabajo, se describen 12 nuevas estructuras cristalográficas de la *Tth*-MCO en dos grupos espaciales y tres celdas unitarias diferentes, además del comportamiento dinámico de la horquilla- $\beta$  por medio de cálculos de dinámica molecular estudiando el efecto del pH y de la temperatura. Estas nuevas conformaciones cristalográficas de la horquilla- $\beta$  de la *Tth*-MCO descritas aquí junto con su dinámica se usaron para entender el comportamiento cinético de la enzima cuando cambia el del pH en el medio, utilizando el sustrato siringaldazina.

El análisis de la información estructural permitió describir dos nuevas conformaciones de la horquilla- $\beta$  y un probable mecanismo de transferencia de protones, los cuales se utilizaron para explicar el comportamiento enzimático de *Tth*-MCO. Además, descubrimos que el inusual contenido de metioninas de la horquilla- $\beta$  de *Tth*-MCO es responsable de coordinar a través de sus átomos S $\delta$ , iones de Ag<sup>+1</sup> y Hg<sup>+1</sup> cuando se encuentra en condiciones oxidativas. Sin embargo, independientemente de las condiciones redox probadas, no fue posible coordinar iones Cu<sup>+1</sup> y Cu<sup>+2</sup>.

En el presente trabajo, proponemos que la baja actividad de lacasa que muestra la *Tth*-MCO es el resultado de un mecanismo de transferencia de protones de múltiples pasos, junto con una conformación de la horquilla- $\beta$  dependiente del pH que al modificar el tamaño de la cavidad de entrada a el sitio T1Cu modula la actividad catalítica de la enzima. Por otra parte, incluso con la falta de información estructural, el mecanismo de transferencia de protones de múltiples pasos parece estar presente en diversas lacasas bacterianas, mientras que la existencia de la horquilla- $\beta$  es típica en las lacasas de los géneros *Thermus* y *Meiothermus*.

## 1. ABSTRACT

The multi-copper oxidase enzyme from the hyper-thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* (*Tth*-MCO) has been previously characterized and described as an example of a laccase with low catalytic activity, especially when compared against the catalytic activity of fungal laccases.

Structurally, *Tth*-MCO has a unique characteristic among the laccases reported in the data base Protein Data Bank (PDB): a  $\beta$ -hairpin adjacent to the T1Cu site, which is not present in any other laccase deposited in the PDB. This  $\beta$ -hairpin shows a common behavior of areas exposed to solvent in crystallographic structures, absence of electron density, high values of B-factor and diverse crystalline contacts with crystallographic neighbors. However, the dynamic behavior of this  $\beta$ -hairpin in solution and its biological implications have not been described.

In this work, 12 new crystallographic structures of *Tth*-MCO in two space groups and three different unit cells and the dynamic behavior of the  $\beta$ -hairpin are described by means of molecular dynamics calculations studying the effect of pH and temperature. These new crystallographic conformations of the  $\beta$ -hairpin of *Tth*-MCO described here along with their molecular dynamics were used to understand the kinetic restrictions of the enzyme caused by the pH values in the medium when studying the enzymatic kinetics of *Tth*-MCO. against syringaldazine substrate.

The analysis of the structural information will send out two different new conformations of the  $\beta$ -hairpin and a probable proton transfer mechanism, which were used to explain the enzymatic behavior of *Tth*-MCO. Furthermore, we discovered that the unusual methionine content of the  $\beta$ -hairpin of *Tth*-MCO is responsible for coordinating through its S $\delta$  atoms, Ag<sup>+1</sup> and Hg<sup>+1</sup> ions when under oxidative conditions, however, regardless of the redox conditions tested, it was not possible to coordinate Cu<sup>+1</sup> and Cu<sup>+2</sup>.



In the present work, we propose that the low laccase activity shown by *Tth*-MCO is the consequence of a multi-step proton transmission mechanism, together with a pH-dependent  $\beta$ -hairpin conformation that modifies the size from the entrance cavity to the T1Cu site modulates the catalytic activity of the enzyme. On the other hand, even with the lack of structural information, the multi-step proton transmission mechanism appears to be extensible to most bacterial laccases, while the existence of the  $\beta$ -hairpin is typical in laccases of the genera *Thermus* and *Meiothermus*.

## 2. INTRODUCCIÓN

La enzima multicobre oxidasa de la bacteria termófila *Thermus thermophilus* (*Tth*-MCO) es una proteína de 462 residuos de aminoácidos, de los cuales 23 son parte de un péptido señal que es escindido para llegar a su forma madura, ya que esta es una enzima de secreción. La *Tth*-MCO tiene un punto isoeléctrico (pI) experimental aproximado de 9.3, una masa molecular de 51.12 kDa y una temperatura óptima de 92 °C con una vida media de 14 horas a 80 °C [1].

La *Tth*-MCO lleva a cabo una reacción redox que consiste en la reducción de una molécula de O<sub>2</sub> hasta dos moléculas de H<sub>2</sub>O. La característica de termo-tolerancia de la *Tth*-MCO la posiciona como una enzima de gran interés para diversas actividades industriales entre las que encontramos la producción de papel, procesamiento de residuos de colorantes textiles, procesos de clarificación, desarrollo de cosméticos, así como su uso en el desarrollo de procesos de síntesis química y tratamientos para biorremediación de suelos contaminados con agro-insumos [2]. Sin embargo, su baja eficiencia catalítica con los principales sustratos utilizados por sus contrapartes fúngicas, que es una característica de la mayoría de las lacasas de bacterias en comparación con las lacasas fúngicas, es una limitante para su uso.

Con el fin de entender la baja eficiencia catalítica de la *Tth*-MCO, en este trabajo se propone la existencia de dos mecanismos que participan en el proceso catalítico de la lacasa de la *Tth*-MCO. Estos se identificaron a partir de 12 estructuras cristalográficas de la *Tth*-MCO que se obtuvieron en diversas condiciones cristalográficas, involucrando la presencia de un motivo horquilla- $\beta$  localizado en una región adyacente a la cavidad de entrada del sitio activo del T1Cu y un mecanismo de transferencia de protones, los cuales, podrían estar regulando la entrada de electrones y protones al sitio activo de la enzima.

Por todas las características ya mencionadas, la obtención de información estructural que permita comprender el funcionamiento de estos procesos en *Tth*-MCO podría dar como resultado el diseño racional de mutaciones que mejoren los parámetros cinéticos de la enzima.

Los resultados de este trabajo se muestran en 5 secciones:

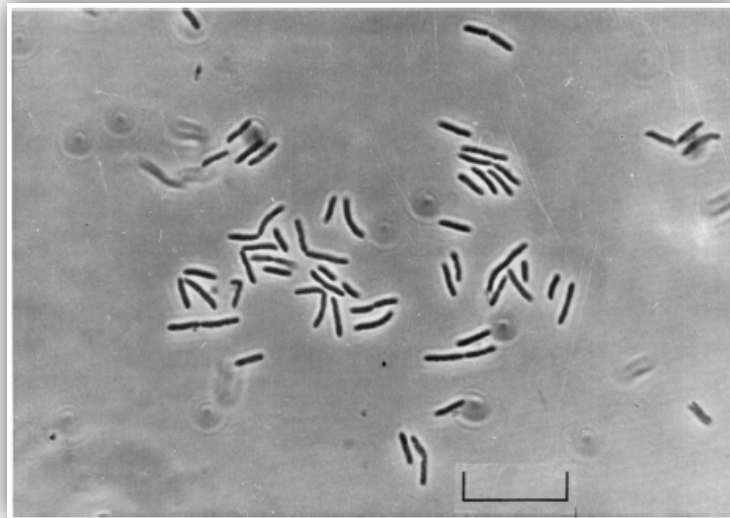
- La movilidad de la horquilla- $\beta$ , presentando diferentes conformaciones de esta región.
- Comportamiento dinámico de la horquilla- $\beta$  de la enzima *Tth*-MCO por análisis de dinámica molecular.
- Exploración de una probable función adicional de la horquilla- $\beta$ , intentando dar una explicación al inusual número de metioninas presentes a lo largo de esta horquilla.
- Análisis filogenético de la *Tth*-MCO, utilizando secuencias de lacasas bacterianas y fúngicas, para identificar los principales cambios presentes a nivel de estructura primaria.
- Descripción de un mecanismo de transferencia de protones que involucra la participación de por lo menos 3 residuos de aminoácidos, una molécula de H<sub>2</sub>O y cambios conformacionales, que podría explicar parcialmente la baja eficiencia catalítica de esta enzima comparada con las lacasas fúngicas.

### 3. MARCO TEÓRICO

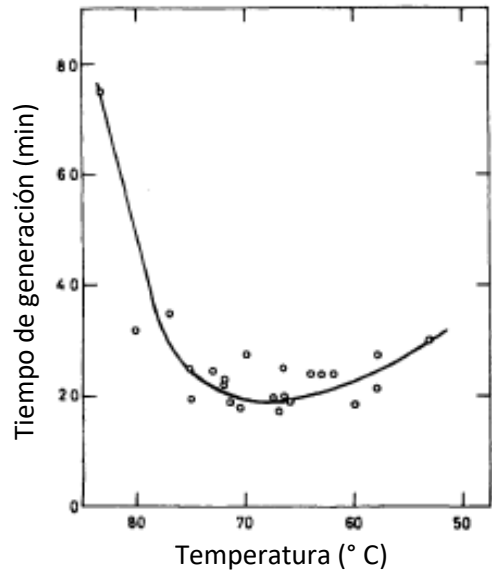
#### 3.1 *Thermus thermophilus*

La bacteria termófila *Thermus thermophilus* fue aislada por primera vez en 1968 en aguas termales de Japón. Es una bacteria Gram negativa que no forma esporas, es sésil y contiene pigmentos amarillos. Esta bacteria presenta su crecimiento óptimo en medios con un valor de pH de 7.5. Respecto a su resistencia a antibióticos, es una bacteria sensible a actinomicina D, tetraciclina y D-cicloserina [3].

**Figura 3.1.1.** Células de *T. thermophilus* de la cepa HB8 crecidas a 75 °C. La barra indica 10 µm [3].



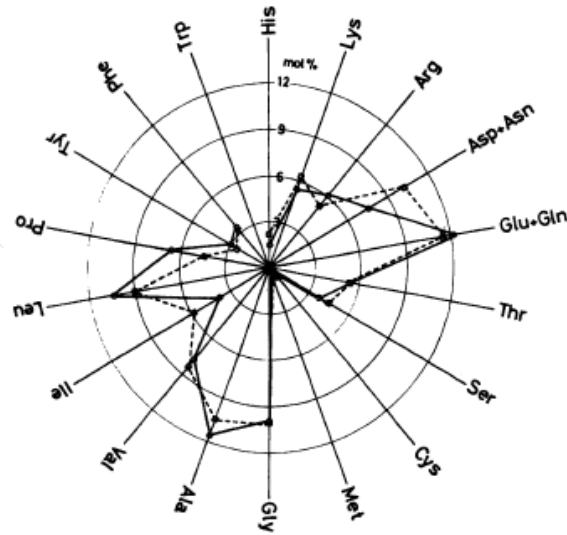
En cuanto a su condición de bacteria extremófila, *T. thermophilus* es una termófila obligada, ya que no presenta crecimiento por debajo de 45 °C y su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en un intervalo de 65 a 72 °C. Su genoma tiene una composición de 69.4% de GC con temperatura de fusión calculada de 97.5 °C, lo cual le confiere la estabilidad térmica necesaria para subsistir en las condiciones ambientales naturales de esta bacteria [3,4].



**Figura 3.1.2.** Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento. Seguimiento al crecimiento bacteriano midiendo la absorbancia a 600 nm [3].

Las proteínas de *T. thermophilus* presentan resistencia térmica y solo el 10% de sus proteínas se desnaturalizan con un choque térmico de 110 °C durante 5 minutos. Este dato se puede comparar con las proteínas de *E. coli* que presentan 75% de desnaturalización en la misma condición experimental. Sin embargo, al comparar la composición de aminoácidos de ambas especies no se observa una tendencia clara a algún tipo de aminoácido en especial (Figura 3.1.3)[3].

En general, las proteínas de *T. thermophilus* son muy estables y esta característica ha llamado la atención para ser utilizadas como modelos en el campo de la biología estructural, particularmente en la cristalografía de proteínas, por lo cual un gran número de sus proteínas han sido cristalizadas para explicar procesos esenciales en la célula como la traducción de proteínas en el ribosoma [5-7].



**Figura 3.1.3.** Comparación de la composición de aminoácidos de *T. thermophilus* y *E. coli* expresado en proporción molar. La línea continua representa la proporción de residuos de aminoácidos de *T. thermophilus* y la línea discontinua la proporción de aminoácidos de *E. coli* [3].

### 3.2 Proteínas extremófilas

En la actualidad, la industria genera una creciente demanda de biocatalizadores industriales con características que les permitan contender contra condiciones desfavorables de ciertos procesos industriales, por lo que se han realizado búsquedas de enzimas con características únicas que puedan reemplazar a los procesos de síntesis orgánica [8]. Además, gran parte de los procesos industriales son llevados a cabo en condiciones que involucran el uso de amplios intervalos de temperatura, pH y salinidad. Por lo que los organismos extremófilos son considerados una fuente valiosa de enzimas que pueden llevar a cabo diversos procesos industriales.

Los organismos termófilos se encuentran principalmente en los dominios Archaea y Bacteria. Debido a sus características estos organismos se encuentran distribuidos en una gran cantidad de ecosistemas, en los que generalmente se presentan condiciones extremas para la mayoría de los seres vivos, de esta forma, las características físico-químicas que predominan en estos

ecosistemas en conjunto con las presiones de selección, han logrado el surgimiento de enzimas con características únicas [9].

En el caso particular de las enzimas termófilas se puede entender su estabilidad térmica en términos de la estructura terciaria, ya que la determinación de estructuras cristalográficas de alta resolución de enzimas de organismos mesófilos y termófilos permite reconocer las principales diferencias entre ellas y comprender los mecanismos que utilizan para poder contener contra la desnaturalización térmica. La principal característica de las enzimas termófilas es la presencia de una mayor cantidad de interacciones iónicas intramoleculares que le permiten tener un empaquetamiento más robusto, lo que les confiere mayor estabilidad estructural [10-12]. Entre las enzimas extremófilas de mayor interés para aplicaciones industriales se encuentran las amilasas, xilanasas, proteasas, ADN polimerasas, deshidrogenasas, oxigenasas, hidrolasas, celulasas, glicosidasas, esterasas, entre otras [13].

### 3.3 Metaloproteínas

Las enzimas con actividad oxido-reductasa y metaloproteínas representan más del 40% de las proteínas clasificadas (IUBMB) y participan en una gran cantidad de procesos vitales para la vida como son la fotosíntesis y la respiración celular, además de ser parte de procesos de señalización, regulación de la expresión de genes y metabolismo de xenobióticos [14].

Muchas metaloproteínas presentan un color distintivo que está asociado con la presencia de un ion metálico en particular o con la interacción de este con la proteína, aunque algunas proteínas pueden presentar color por la presencia de cromóforos formados por la cadena peptídica [15].

Los centros metálicos más simples consisten en un ion metálico interaccionando con los aminoácidos de su primera esfera de coordinación y estos pueden tener diversas funciones que van desde centros catalíticos, transferencia de electrones, transporte de metales, censo de metales y como elementos estructurales [16].

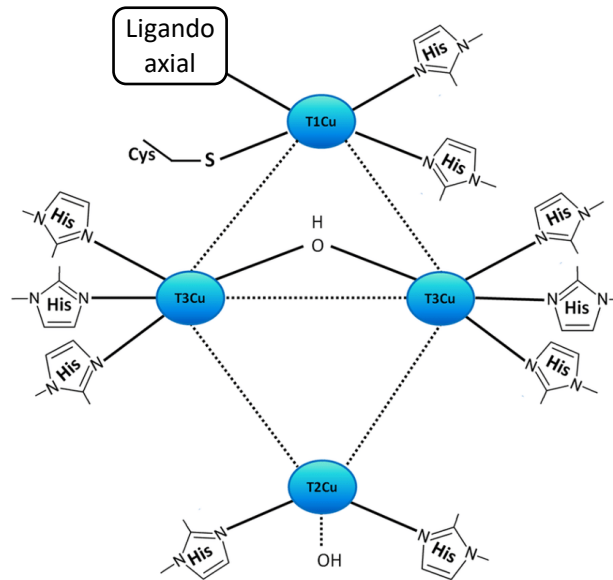


La presencia de metales de transición como cofactores en este tipo de enzimas son de vital importancia para la catálisis de reacciones químicas. Entre los metales más comunes en proteínas encontramos el hierro, el zinc y el cobre. De estos metales, los iones de hierro y cobre son capaces de catalizar reacciones redox, y una de las propiedades más importantes del hierro y del cobre es su capacidad para coordinar gases como el oxígeno, que es uno de los intermediarios más importantes de las reacciones redox en enzimas multicobre oxidasas [17].

### 3.4 Enzimas multicobre oxidasas.

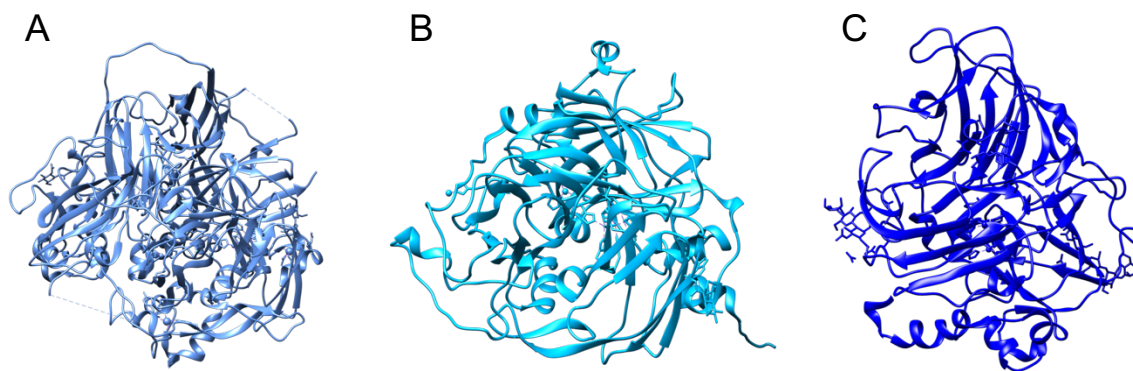
Dentro del grupo de las metaloproteínas se encuentran las enzimas multicobre oxidasas (MCO), que tienen como característica principal la presencia de al menos 1 ion de cobre coordinado directamente por residuos de aminoácidos que estabilizan la esfera de coordinación del ion metálico [18]. Existen 3 tipos de sitios de unión a cobre en las MCO y presentan las siguientes características:

- **Sitio de unión a cobre tipo 1 (T1Cu).** Este sitio de unión está caracterizado por tener 1 átomo de cobre coordinado por dos residuos de histidina y una cisteína con una estructura trigonal plana. Dependiendo de la enzima a la que pertenece, puede tener la presencia de un ligando axial. El T1Cu presenta una intensa banda de absorción ( $\epsilon \sim 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) a 600 nm, la cual es responsable del intenso color azul [17-19].
- **Sitio de unión a cobre tipo 2 (T2Cu).** Estos sitios tienen un átomo de cobre coordinado únicamente por dos residuos de histidina. Presenta una geometría tetragonal plana [17].
- **Sitio de unión a cobre tipo 3 (T3Cu).** Este sitio de unión a cobre consiste en un centro binuclear de dos átomos de cobre, cada uno coordinado por 3 residuos de histidina. Este centro no presenta señal en resonancia paramagnética electrónica (EPR por sus siglas en inglés) debido a un fuerte acoplamiento paramagnético [17].



**Figura 3.4.1.** Representación esquemática de los 3 tipos de sitios de unión a cobre en enzimas multicobre oxidasas [20].

El grupo de las MCO (que pueden ser definidas por sus características espectroscópicas, secuencia, homología y reactividad) está compuesto por ascorbato oxidasas, ceruloplasminas y lacasas. Funcionalmente, estas enzimas se caracterizan por utilizar cuatro electrones, que se obtienen de la oxidación de un sustrato, para reducir una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua [19].



**Figura 3.4.2.** Estructuras cristalográficas de enzimas MCO. **A)** Ceruloplasmina de *Homo sapiens* (Código PDB 4ENZ), **B)** Ascorbato oxidasa de *Cucurbita pepo* (Código PDB 1AOZ) y en **C)** Lacasa de *Corioliopsis gallica* (Código PDB 5A7E).

### 3.5 Enzima Lacasa

Las lacasas (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxígeno oxidorreductasa) son enzimas pertenecientes al grupo de las MCOs que se aislaron por primera vez del árbol de la laca *Rhus vernicifera* [21]. Son generalmente enzimas extracelulares y glicosiladas (esto último cuando su origen es vegetal o fúngico), aunque algunas especies pueden producir enzimas intra y extracelulares. Las lacasas son enzimas expresadas por hongos, plantas, bacterias e insectos y presentan masas moleculares de aproximadamente 60 kDa con una actividad óptima en temperaturas entre 50 y 70 °C [22].

En plantas, las enzimas lacasa son intracelulares y están involucradas en procesos de polimerización de lignina vía radicalización oxidativa de fenoles. El proceso comienza con la oxidación de un monolignol, resultando un radical fenol que es relativamente estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado en un sistema conjugado. A continuación, dos radicales monómeros pueden acoplarse en forma de dihidrodímeros, estableciendo un enlace covalente y el dímero necesita ser deshidrogenado generando un radical fenol antes de poder acoplar otro monómero radical. Estos pasos se repiten para hacer crecer el polímero de lignina incorporando un monómero en cada reacción [23].

En los hongos, las lacasas son importantes en procesos involucrados en la degradación de lignina, patogenicidad, formación de pigmentos y la destoxificación de compuestos fenólicos producidos durante la degradación de lignina. En el caso de la degradación de lignina, en la que participan hongos y bacterias, las enzimas implicadas en este proceso pueden ser intra o extracelulares y están clasificadas en dos tipos: enzimas modificadoras de lignina y auxiliares en degradación de lignina. Las lacasas y peroxidasas forman parte del grupo de enzimas modificadoras de lignina [24].

En bacterias se han encontrado genes de lacasas en proteobacterias, actinobacterias y firmicutes; en cianobacterias y bacteroidetes el número de cepas con genes de lacasas es particularmente bajo. Las funciones de lacasas en bacterias han sido poco estudiadas, pero actualmente se sabe que participan en procesos de formación de pigmentos como la melanina en la especie

*Sinorhizobium meliloti* [25]. En *Bacillus weihenstephanensis* la lacasa está involucrada en la formación de un pigmento café tipo melanina, presente en la espora, que le concede protección contra la radiación ultravioleta y el peróxido de hidrógeno [26].

Respecto al tipo de sustratos que pueden ser reconocidos por lacasas se encuentran los fenoles y arilaminas, aunque estas enzimas presentan baja especificidad y pueden oxidar una gran cantidad de sustratos de origen natural o industrial. Las lacasas, principalmente de origen fúngico, son utilizadas en procesos de la industria textil, la fabricación de papel, en la transformación enzimática de intermediarios y en la oxidación de contaminantes [27]. La biorremediación enzimática con lacasas y mediadores redox es un campo de estudio en constante crecimiento. Lo anterior se debe a la versatilidad de las lacasas para transformar y detoxificar una gran variedad de contaminantes orgánicos liberados por procesos industriales como hidrocarburos policíclicos aromáticos, clorofenoles, bifenilos policlorados, pesticidas organofosforados, colorantes, etc [28-30].

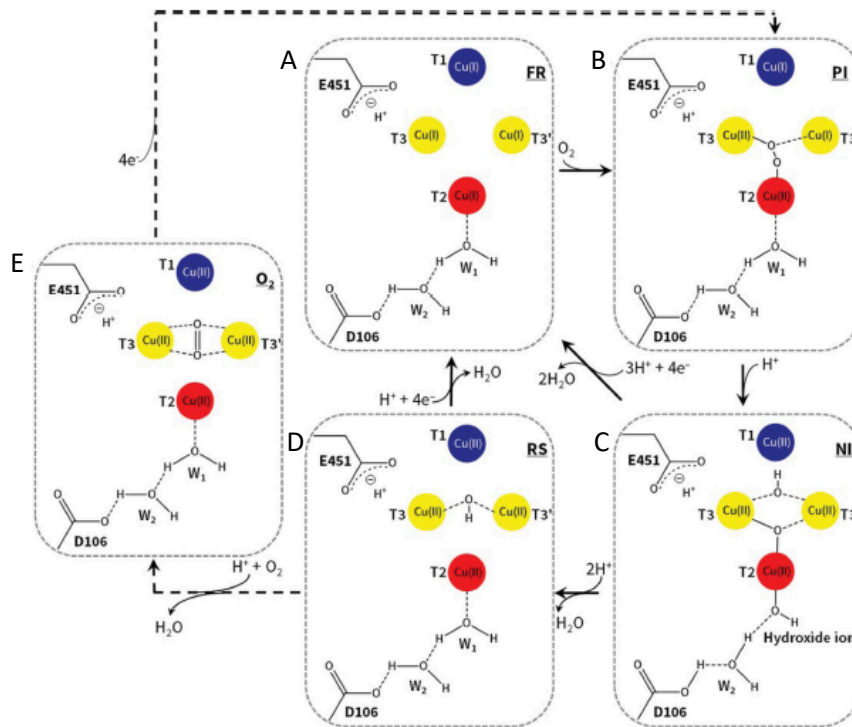
En la industria, las enzimas multicobre oxidasas pueden ser utilizadas en campos de la química verde, en los que podemos encontrar la producción de biodiesel, biorremediación, síntesis orgánica, blanqueamiento, alimentos, textiles y diseño de nuevos dispositivos electrónicos [22].

La actividad catalítica de las lacasas se da por la transferencia de electrones del sustrato al T1Cu y de ahí hacia el centro trinuclear T2/T3Cu. Esta transferencia de electrones se puede llevar a cabo a través de enlaces o directamente por el espacio entre los átomos, o por una combinación de ambos. En la transferencia por enlaces, están involucradas las histidinas contiguas a la cisteína que coordinan al T1Cu. En la estrategia alterna se ha calculado que puede existir una tunelización entre centros redox en proteínas en distancias de hasta 14 Å, lo que hace probable que la transferencia de electrones en las lacasas sea a través de este fenómeno [27].

Hasta el momento se conocen cerca de 50 estructuras cristalográficas de lacasas de 7 diferentes organismos, en las cuales se han podido observar diferentes pasos del mecanismo de acción. Lo anterior debido a experimentos basados en la liberación de protones y electrones como

consecuencia de la radiólisis de moléculas de H<sub>2</sub>O por acción de la radiación depositada en los cristales de la enzima en el momento de la difracción con rayos X [31]. Esta liberación de protones y electrones provoca que la enzima catalice la reducción de moléculas de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, lo que permite que se obtengan diversas estructuras con diferentes intermediarios en el mecanismo de acción. Sin embargo, a pesar de la información que se ha obtenido, existen pasos del mecanismo de acción que aún se desconocen [32]. Esto puede ser consecuencia del daño que sufren los cristales al ser expuestos a los rayos X y en el caso particular de las MCOs, los átomos de cobre y los puentes disulfuro son las regiones de la enzima que se ven afectadas inicialmente, ocasionando daños en toda la estructura [33].

El mecanismo de acción de las lacasas consiste en llevar a cabo la reducción de una molécula de O<sub>2</sub> a dos moléculas de H<sub>2</sub>O en dos pasos. El ciclo comienza cuando 4 iones de Cu<sup>+2</sup> permiten la entrada de O<sub>2</sub> en el sitio trinuclear (TNC por sus siglas en inglés) coordinando el O<sub>2</sub> entre dos T3Cu y un T2Cu [34]. Una vez que la molécula de O<sub>2</sub> se encuentra posicionada entre los dos T3Cu, se genera una interacción dipolo-dipolo [35]. Esto resulta en la oxidación de ambos iones de cobre, permitiendo la formación del intermediario peróxido, localizado entre los dos T3Cu y el T2Cu, uniéndose de manera asimétrica al T3Cu en el TNC [36]. El segundo paso de reducción involucra la entrada de 2 electrones obtenidos de la oxidación del sustrato, generando el rompimiento del intermediario peróxido en el TNC, formando el intermediario nativo [37]. En este punto uno de los átomos de oxígeno es coordinado en el TNC por T3Cu y el T3Cu' y el otro átomo de O es coordinado por el T3Cu y el T2Cu. En el siguiente paso, el T2Cu es coordinado por 2 H<sub>2</sub>O formando una tetracoordinación mientras que los T3Cu y el T3Cu' tiene una coordinación bipiramidal pentacoordinada, esto es llamado el estado intermedio nativo [36]. El siguiente paso es la protonación de la molécula de oxígeno, recibiendo tres protones que llegan a partir del canal de entrada hasta el TNC, formando H<sub>2</sub>O y OH<sup>-</sup>. El último protón y 3 electrones llegan al TNC, reduciendo los Cu<sup>+2</sup> a Cu<sup>+1</sup>, esto provoca la liberación de los ligandos del TNC (Figura 3.5.1) [38].



**Figura 3.5.1.** Representación esquemática del mecanismo de reducción de  $O_2$  a  $2H_2O$  de las lacasas. **A)** FR, completamente reducido, **B)** PI, intermediario peróxido, **C)** intermediario nativo, **D)** estado relajado y **E)**  $O_2$  coordinado [36].

### 3.6 Lacasa de *Thermus thermophilus*

La enzima lacasa de *T. thermophilus* fue reportada por primera vez por Kentaro Miyazaki, en este estudio se expresó y purificó de la fuente nativa una proteína con una masa molecular de 51.12 kDa inducida por la presencia de 1 mM de  $CuSO_4$  en el medio y posteriormente se identificó su actividad de lacasa así como modificaciones post-traduccionales en la región amino terminal donde se elimina un péptido-sígnal que va de la Met1 a la Ala22 [1].

Respecto a la termotolerancia de la *Tth*-MCO, es la lacasa más resistente reportada en la actualidad, al tener una vida media de 14 horas a  $80^\circ C$  en comparación con la lacasa CotA de *Bacillus subtilis* que tiene una vida media de 2 h a  $80^\circ C$  y la oxidasa McoA de *Aquifex aeolicus* que soporta 1 h a  $80^\circ C$  [39,40]. Entre sus principales características se encuentra que esta enzima requiere la presencia de iones de cobre (0.1 mM) para llevar a cabo su reacción. Esta reacción es

inhibida con ácido etilendiaminotetracético (EDTA), por lo que Miyazaki propone la presencia de un sitio adicional de unión a cobre en la enzima [1]. Sin embargo, se ha reportado actividad residual al probar la enzima con 4 átomos de cobre en ausencia de cobre en el medio. En este mismo estudio también se muestra la baja estabilidad de la enzima en ausencia de iones de cobre en los 4 sitios de unión [41].

La *Tth*-MCO está formada por 3 dominios cupredoxina (Dominio 1, Gly24-Ala169; Dominio 2, Glu170-Val343; Dominio 3, Val344-Gly462). Esta enzima tiene un T1Cu que se encuentra localizado en el dominio 3, y un sitio trinuclear compuesto por un T2Cu y dos T3Cu localizado entre los dominios 1 y 3. El dominio dos funciona como un conector y contiene una región con una función de bisagra. Estructuralmente, la *Tth*-MCO es idéntica, si se compara su forma apo (sin átomos de cobre coordinados) y holo (con los 4 sitios de unión a cobre ocupados), ya que entre ellas muestran un RMSD de 0.16 Å, encontrando las diferencias más marcadas en la segunda esfera de coordinación de los átomos de cobre.

El sitio de coordinación T1Cu está compuesto por los residuos His393, His450 y Cys445. El sitio T2Cu está formado por los residuos His95 e His396. En el caso del sitio binuclear T3Cu-T3Cu', está formado por los residuos His237, His398 e His444 en el T3Cu y por los residuos de His97, His135 e His446 en el T3Cu' [36]. Adicionalmente, esta enzima contiene un motivo de horquilla-β con una composición inusual de metioninas, ya que de las 13 metioninas que se encuentran en la secuencia primaria de la *Tth*-MCO, 6 están localizadas en la horquilla-β y 5 más en la zona adyacente.

La composición de esta horquilla-β tiene características que permiten suponer al menos la presencia de un sitio de unión a cobre adicional en la *Tth*-MCO, debido a evidencia experimental que permitió identificar sitios de unión a mercurio y plata coordinados por metioninas e histidinas presentes en la horquilla-β. Estos sitios de unión podrían ser parte de un sistema que le permita a esta enzima oxidar sustratos inorgánicos; sin embargo, esto es algo que aún no ha sido demostrado experimentalmente.



Por otro lado, la localización de esta horquilla- $\beta$  llama mucho la atención, ya que su base se localiza en a un costado de la cavidad de entrada al sitio T1Cu, de tal manera que esta estructura podría estar involucrada de alguna manera en la actividad enzimática de la *Tth*-MCO.

Respecto al mecanismo de transporte de protones para diversas enzimas multicobre oxidasas, se han propuesto diversos aminoácidos que llevan a cabo la función de entregar protones al TNC. Algunos de los ejemplos de aminoácidos involucrados en el transporte de protones son el Glu506 en la CueO [42], el Glu487 en Fet3p [43] y el Glu498 en CotA [44]. Adicionalmente, se ha propuesto la participación del Glu451 en la protonación del TNC en la *Tth*-MCO. Este sistema de transporte de protones propuesto para la *Tth*-MCO involucra una doble conformación del Glu451, acercándose al TNC para entregar el protón al T3Cu a través de una molécula de agua o directamente al residuo His137 [36].

### 3.7 Cristalografía de proteínas

Desde los primeros intentos por determinar la estructura tridimensional de proteínas por difracción de rayos X, se reportó que la radiación ionizante es capaz de inducir cambios en las proteínas generando fragmentación, agregación, modificación de residuos de aminoácidos y pérdida de función. El daño producido por radiación es uno de los principales problemas para la obtención de estructuras cristalográficas de macromoléculas, y esto se ha descrito desde reportes de Blake y Phillips en 1962. En estos reportes, ellos postulan que el daño en cristales de mioglobina es proporcional a la dosis de radiación recibida [45].

De la radiación que es depositada en un cristal de proteína, en la que típicamente se utilizan energías entre 5 y 17 keV, el 98% de los fotones del haz de rayos X pasa a través del cristal sin interactuar y solo el 2% interactúa con él. Del 100% de la energía que interactúa con el cristal, el 84% experimenta el efecto fotoeléctrico mientras que el 8% se pierde por efecto de la dispersión inelástica y solo el 8% experimenta la dispersión elástica. Por lo tanto, menos del 0.2% de la radiación de rayos X es difractada por el cristal [45]. Sin embargo, la cantidad de radiación

que es absorbida por un cristal de proteína depende de su composición elemental y del porcentaje y solutos presentes en el disolvente, ya que los rayos X son absorbidos por los electrones de un átomo, por lo que aquellos átomos con una masa molecular alta, absorberán una mayor cantidad de energía depositada. Es por esta razón que la composición de un cristal es uno de los parámetros que determina su tiempo de vida media [46].

En general, los daños por radiación comprometen la adquisición de información durante la difracción y también comprometen información estructural específica, que puede llevar a interpretaciones erróneas sobre el funcionamiento y estructura de una proteína. El daño por radiación se puede clasificar en daño global y específico. En el daño global se puede observar la pérdida de intensidad en el patrón de difracción, desvanecimiento de las reflexiones de alta resolución, incremento del volumen de la celda unitaria, mayor mosaicidad y un aumento en los valores B (los cuales se ha observado que son directamente proporcionales a la dosis absorbida). Estos cambios en el valor B provocan que algunos residuos con múltiples conformaciones no puedan ser modelados en estructuras obtenidas de cristales con altas dosis de radiación depositada. Los anterior es consecuencia del aumento en la energía cinética, transiciones electrónicas, radiólisis, expansión de celda unitaria, entre otros fenómenos causados por la dosis depositada en los cristales, lo cual causa modificaciones en algunos residuos de aminoácidos [47,48].

Entre los daños específicos encontramos que los centros metálicos se reducen y los residuos susceptibles pierden definición en el mapa de densidad electrónica, rompimiento de puentes disulfuro, seguido de la descarboxilación de residuos aminoácidos ácidos, pérdida del grupo hidroxilo en residuos de tirosinas, rompimiento de enlaces C-S en metioninas [49].

Otra de las consecuencias de irradiar cristales de proteínas con altas dosis de rayos X en cristales que difractan a alta resolución, es la pérdida de densidades electrónicas correspondientes a los átomos de hidrogeno y la densidad electrónica de las moléculas de agua desaparece gradualmente en el curso de la recolección de datos [48].

En este contexto, existen moléculas conocidas como "scavengers" que han sido propuestas y utilizadas para neutralizar radicales libres, reduciendo el daño por radiación [50]. Sin embargo, estas moléculas han sido probadas en cristales de diversas proteínas sin tener siempre los mismos resultados. Uno de ellos es el ascorbato de sodio, que se ha demostrado su efectividad protegiendo a la lisozima. Sin embargo, el daño por radiación no puede ser prevenido en su totalidad, solo reducido, incluso tomando la colección de datos a temperaturas criogénicas [51].

Con el uso de temperaturas criogénicas durante el proceso de difracción de cristales de proteína con rayos X, se logró la obtención de datos con una particularidad muy importante para la biología estructural, datos para resolver estructuras cristalográficas con diferentes intermediarios de reacciones [52]. Estos experimentos se basan principalmente en la recolección de datos para obtener series de estructuras cristalográficas a partir de un mismo cristal utilizando subproductos resultantes de la radiólisis de moléculas de H<sub>2</sub>O, como protones y electrones [53]. De esta manera, las enzimas que tienen actividad redox son capaces de utilizar estos productos para iniciar el ciclo de reacción. Una vez que inicia la colecta de datos, se liberan protones y electrones que son utilizados para llevar a cabo la reacción, mientras tanto las bajas temperaturas utilizadas durante el experimento permiten que se obtenga un intermediario particular al reducir la velocidad de formación de los productos de la radiólisis en una primera etapa de colecta de datos correspondiente [53]. Durante una segunda colecta de datos en el mismo cristal, se aumenta la dosis de radiación depositada, lo que promueve la formación de un segundo intermediario. Con el uso de esta técnica en conjunto con la colecta de diversos juegos de datos, se pueden generar estructuras con diferentes intermediarios de reacción a partir de un mismo cristal de proteína [36,52-55].

Otro de los objetivos de la biología estructural es la determinación de la distribución espacial de diversos motivos, incluyendo motivos flexibles en proteínas, los cuales están representados principalmente por asas [56]. Por lo tanto, es necesario obtener información estructural de regiones flexibles, por ejemplo, asas expuestas al solvente, ya que dependiendo de su localización espacial respecto a los sitios activos de las proteínas, se pueden conocer y proponer posibles

funciones [57]. Sin embargo, determinar la forma en que se mueven los motivos flexibles de una proteína no explica completamente su función, ya que la escala de tiempo en la que se mueven estas zonas es sumamente importante [58,59].

Por otro lado, la biología estructural hace uso de secuencias de estructura primaria, usualmente realizando análisis filogenéticos, que permiten expandir el alcance de las comparaciones que se realizan con otras secuencias de proteínas, para sugerir nuevas funciones a nivel de proteína o dominio [60.61]. Además, estos análisis permiten corroborar la existencia de motivos compartidos en proteínas homólogas que resultan en el desarrollo de hipótesis acerca de funciones desconocidas de la proteína de interés [62].

## 4. JUSTIFICACIÓN

Las lacasas son enzimas utilizadas ampliamente en procesos industriales muy diversos que incluyen la industria textil, la fabricación de papel, el desarrollo de cosméticos, procesos de química verde y con un gran potencial en procesos de biorremediación. Por lo anterior, la *Tth*-MCO ha generado un gran interés debido a ser la lacasa con mayor termotolerancia reportada, lo que la coloca como una enzima útil para procesos que se llevan a cabo en condiciones no favorables para muchas proteínas. Sin embargo, su eficiencia catalítica es menor a la reportada de lacasas fúngicas.

Estas características generan interrogantes respecto a la forma en que se lleva a cabo el mecanismo de reacción de la *Tth*-MCO, que podrían ser resueltas por la biología estructural. Esta podría generar información que lleve a la posible modificación de forma racional que pudiera mejorar los parámetros cinéticos de esta enzima ( $K_M = 0.30 \pm 0.02$  mM,  $k_{cat}/K_M = 4.18 \times 10^3 \pm 5.1$  (s<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>), medida a 60 °C utilizando siringaldazina) [41], en contraste con la lacasa de *Coriolopsis gallica* que presenta parámetros cinéticos superiores ( $K_M = 0.40$  mM,  $k_{cat}/K_M = 6.8 \times 10^6$  (s<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>)). Por esta razón, la determinación de estructuras cristalográficas de la *Tth*-MCO en diferentes condiciones de cristalización aumenta las probabilidades de obtener cristales con arreglos cristalinos diferentes a los ya reportados. De tal manera que se espera que las estructuras cristalográficas obtenidas en otros grupos espaciales, puedan aportar información que permita entender alguno de los procesos que se llevan a cabo en esta enzima.

## 5.HIPÓTESIS

La baja eficiencia catalítica de la lacasa termo-resistente de *T. thermophilus*, en comparación con sus homólogas de hongos, se debe a la existencia de dos características estructurales:

- I) El movimiento de un motivo horquilla- $\beta$  localizado a un costado de la cavidad de entrada del sustrato al sitio T1Cu.
  
- II) La presencia de un mecanismo de transporte de protones desde la superficie de la proteína hasta el sitio trinuclear de cobre.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. OBJETIVO GENERAL

Buscar nuevos arreglos cristalinos y grupos espaciales para la enzima *Tth*-MCO con el fin de: 1) Encontrar nuevas conformaciones de la horquilla- $\beta$ , generando información para realizar cálculos de dinámica molecular sobre la movilidad y dinámica de este elemento estructural. 2) Obtener estructuras cristalográficas con nuevos intermediarios de reacción de la enzima con el uso de diferentes dosis de radiación depositada en un mismo cristal.

### 6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Encontrar nuevas condiciones de cristalización para explorar nuevos arreglos cristalinos de la *Tth*-MCO.
- Colectar datos de los cristales obtenidos en diferentes grupos espaciales o celdas unitarias.
- Colectar datos de difracción de rayos X de los cristales de la *Tth*-MCO con diferentes ocupaciones de iones de cobre en los sitios T2Cu y T3Cu.
- Colectar datos de difracción de rayos X de los cristales de la *Tth*-MCO con diferentes dosis de radiación depositada.
- Analizar y comparar las estructuras cristalográficas de la *Tth*-MCO generadas en este proyecto para identificar los determinantes estructurales que puedan explicar su baja eficiencia catalítica como lacasa.
- Realizar cálculos de dinámica molecular con nuevas conformaciones de la horquilla- $\beta$  para entender la dinámica de este motivo.
- Encontrar por medio de análisis filogenéticos enzimas con motivos equivalentes a la horquilla- $\beta$  de la *Tth*-MCO conservados en otras lacasas, para poder proponer conclusiones acerca de su función biológica.



## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Sobreexpresión de la *Tth*-MCO

Se transformaron células quimio-competentes de *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 DE3 con el vector pET22b-*Tth*MCO (pET22b + gen de la lacasa de *T thermophilus* (ID: TthAA229\_17990)). Las células transformadas se seleccionaron utilizando medio de cultivo solido Luria Bertani (LB) [1% (P/V) triptona; 0.5% (P/V) extracto de levadura; 1% (P/V) cloruro de sodio] suplementado con una concentración final de 2  $\mu$ M de ampicilina. Las colonias positivas se transfirieron a 20 mL de medio de cultivo líquido LB, suplementado con una concentración final de 2  $\mu$ M de ampicilina, para ser criopreservadas en glicerol a -70 °C. Posteriormente, estas alicuotas se utilizaron para producir pre-inóculos.

Para el proceso de sobreexpresión de la proteína se inocularon 5 mL del pre inóculo en 1 L de medio de cultivo LB suplementado con 2  $\mu$ M de ampicilina concentración final y se incubó a 37 °C y 150 rpm hasta llegar a una densidad óptica de 0.5 medida a 600 nm para inducir la sobreexpresión de la proteína adicionando Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.1 mM y sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) a una concentración final de 1 mM incubando durante 4 horas. Al terminar este periodo el cultivo se mantuvo en condiciones de micro-aireación durante 4 horas (para la proteína utilizada en el cristal del que se colectaron datos para la estructura con el código PDB 6Q29) y 16 horas (para la proteína utilizada en el cristal del que se colectaron datos para la estructura con el código PDB 6TYR) ambas a 30 °C.

Las células se separaron del medio de cultivo por centrifugación a 7,500g por 40 min a 4 °C y se resuspendieron en 40 mL de amortiguador MES 20 mM pH 5.5. Las células resuspendidas se sonicaron en intervalos de 30 seg de sonicación por 60 seg de reposo, repitiendo este ciclo 4 veces en hielo durante un tiempo total de 5 min.

## 7.2 Purificación de la enzima *Tth*-MCO

El proceso de purificación consta de un primer paso en el que se incuba el extracto crudo a 65 °C durante 25 min para desnaturalizar las proteínas de *E. coli* que no son termo-resistentes, las cuales son separadas por un paso de centrifugación a 12,000g durante 50 min a 4 °C. Del extracto centrifugado se descarta el precipitado y el sobrenadante se carga en una columna empacada con 20 mL de resina SP sefarosa (GE Healthcare) previamente equilibrada con 3 volúmenes de amortiguador MES 20 mM pH 5.5. Las proteínas que interactuaron con la resina se eluyeron con un gradiente lineal de cloruro de sodio (NaCl) de 0-1 M en amortiguador MES 20 mM a pH 5.5 y finalmente colectadas en 50 fracciones de 2 mL cada una. Una muestra de todas las fracciones colectadas se cargaron en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12% de acrilamida para identificar las fracciones en la que eluyó la *Tth*-MCO. Las fracciones con la *Tth*-MCO son concentradas hasta un volumen total de 2 ml utilizando un centricon con corte de 30 kDa. Los 2 mL de enzima *Tth*-MCO se cargaron en una columna de exclusión molecular (Superdex 75 GE Healthcare) previamente equilibrada con 3 volúmenes de amortiguador MES 20 mM pH 5.5 y 50 mM de NaCl. La muestra se eluyó utilizando 1 volumen del amortiguador utilizado para equilibrar la columna previamente y se colectó en fracciones de 2 ml. Una muestra de todas las fracciones se cargaron en un gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida para identificar las fracciones con la enzima *Tth*-MCO y a las fracciones identificadas con la enzima se les midió de manera cualitativa su actividad oxidasa utilizando el sustrato siringaldazina, y finalmente la muestra con enzima *Tth*-MCO se concentró hasta 20 mg ml<sup>-1</sup>.

## 7.3 Cinética enzimática

Se realizaron mediciones de actividad enzimática utilizando un espectrofotómetro (Cary 60 Agilent Technologies) acoplado a un sistema de control de temperatura para mantener constante este parámetro y cada una de las mediciones se realizó por triplicado. El valor de actividad específica y la actividad dependiente de pH se midieron utilizando como sustrato siringaldazina, 0.1 mM de CuSO<sub>4</sub> y amortiguador MES y HEPES. La actividad dependiente de pH se midió utilizando amortiguador MES 50 mM pH 5.5 y 6.5, y amortiguador HEPES 50 mM pH 7.5. Cada

prueba de actividad se realizó incubando 10 min la muestra a 60 °C antes de la medición y a esta misma temperatura se realizó una prueba de actividad una vez que se adicionó el sustrato siringaldazina. Este método está basado en la oxidación de siringaldazina el cual da como resultado un producto que se mide a 525 nm [63].

#### 7.4 Cristalización de la *Tth*-MCO

Para encontrar nuevas condiciones de cristalización para la enzima *Tth*-MCO se realizó un proceso de selección utilizando los kits de cristalización Wizard I, II, III y IV de la marca Rigaku y Crystal Screen I y II, Crystal Screen Cryo I y II, Crystal Screen Lite, Index, PEG/Ion, PEG/pH, Memb Fac y Quick Screen de la marca Hampton Research.

Se realizaron más de 3,500 pruebas de cristalización. 612 pruebas por triplicado a 4 °C y 612 pruebas por triplicado a 18 °C, para hacer un barrido por las condiciones de diversos kits de cristalización en busca de nuevas condiciones de cristalización. Para lo anterior, se utilizó la técnica de microbatch bajo aceite, la cual consiste en colocar 1 µl de la solución de proteína con 1 µl de la solución precipitante (1 µL por cada condición de cristalización de cada uno de los kits) y finalmente la prueba se cubre con 13 µL de parafina dentro de cada pozo de la placa. Estas placas permanecen en una cámara de temperatura constante, monitoreando la posible formación de cristales.

Entre todas las pruebas de cristalización se encontraron dos condiciones de cristalización a 4 °C que permitieron la formación cristales. Estas condiciones se obtuvieron de los kits Crystal Screen I y Crystal Screen Cryo 72 horas después de montar las pruebas de cristalización. Ambas condiciones son muy parecidas, sin embargo, en la condición No. 40 del kit Crystal Screen (20% V/V isopropanol, 20% P/V Polietilen Glicol 4000 y 100 mM de amortiguador de citrato de sodio tribásico dihidratado pH 5.6) crecen cristales con una morfología más definida. Esta condición de cristalización se replicó y se obtuvieron cristales que se difractaron en la línea 19-ID del Advanced Photon Source, Chicago, con un detector tipo CCD modelo ADSC Quantum 315, con una longitud de onda de 1.02 Å y rotación del ángulo  $\phi$  de 1° hasta llegar a 180° grados de colecta, datos que

dieron como resultado las estructuras con los códigos PDB 6Q29, 6WX9, 6WCH, 6WCG, 6WCL, 6WCM, 6WCN Y 6WCP.

La condición de cristalización obtenida fue probada utilizando la técnica de sembrado de microcristales usando el “Seed Bead kit” de Hampton para obtener una disolución con microcristales que se sembraron con la técnica de microbatch bajo aceite. Se montaron pruebas de cristalización utilizando diferentes diluciones (1:10, 1:100 y 1:1000) a partir de la muestra obtenida con micronúcleos teniendo como resultado 432 pruebas de cristalización. Los cristales obtenidos de la dilución 1:1000 se difractaron en el ánodo rotatorio del Laboratorio Nacional de Estructuras de Macromoléculas (LANEM) del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. Esta colecta generó los datos para determinar la estructura con el código PDB 6TYR.

Los cristales obtenidos por el método de microbatch bajo aceite a 4 °C se montaron en asas de rayón para ser sobreenfriados en nitrógeno líquido usando como crioprotector 30% (V/V) de polietilenglicol 400.

## 7.5 Colecta de datos por difracción de rayos X

### 7.5.1. Estructuras 6Q29, 6WX9, 6WCH, 6WCG, 6WCL, 6WCM, 6WCN, 6WCP y 6W2K.

La difracción por rayos X del cristal para obtener las estructuras 6Q29, 6WX9, 6WCH, 6WCG, 6WCL, 6WCM, 6WCN Y 6WCP, se colectó a -173 °C en la línea 19-ID del Advanced Photon Source, Chicago con un detector tipo CCD modelo ADSC Quantum 315, con una longitud de onda de 1.02 Å y rotación del ángulo  $\phi$  de 1° hasta llegar a 180° de colecta.

### 7.5.2. Estructura 6TYR

Los datos del cristal se colectaron en un ánodo rotatorio de cobre (Osmic Varimax, Cu-HF) a una temperatura de -173 °C . Para la colecta se utilizó un goniostato Rigaku AFC-11 de 4 círculos modificando el ángulo omega ( $\omega$ ) para aumentar la cantidad de reflexiones obtenidas. Se

colectaron 180° con una oscilación del ángulo  $\phi$  de 0.5 entre cada *frame*. El detector utilizado durante la difracción fue un DECTRIS PILATUS 200 K image plate detector.

## 7.6 Determinación de estructura cristalográfica

### 7.6.1. Estructuras 6Q29, 6WX9, 6WCH, 6WCG, 6WCL, 6WCM, 6WCN, 6WCP y 6W2K.

El proceso de indexado e integración de los datos se realizó utilizando el programa MOSFLM [64] para encontrar el grupo espacial y el tamaño de celda, con estos datos se indexaron, integraron y escalaron los datos utilizando las rutinas XDS, XDSCONV y XSCALE, dentro de paquete XDS [65]. El remplazo molecular se realizó en el programa PHASER MR [66] utilizando como modelo para calcular fases la estructura con el código PDB 2XU9. El primer paso de afinamiento se realizó utilizando el programa REFMAC 5 [67] para realizar un afinamiento de cuerpo rígido. Los ajustes, construcción de moléculas presentes en el cristal y afinamiento manual se realizó con el programa COOT [68] alternando con afinamientos restringidos en el programa PHENIX [69], en el cual se agregaron moléculas de agua, se calcularon ocupaciones y se concluyó el afinamiento cuando los valores de  $R_{work}$  y  $R_{free}$  [70] llegaron por debajo de 0.20 y 0.25, respectivamente.

### 7.6.2. Estructura 6TYR

El proceso de indexado e integración de los datos se realizó utilizando el programa HKL3000 [71], los datos de difracción se procesaron para reducirlos y escalarlos usando el programa SCALA [72]. El remplazo molecular se realizó en el programa PHASER MR [66] utilizando como modelo para calcular fases la estructura con el código PDB 2XU9. El primer paso de afinamiento se realizó utilizando el programa REFMAC 5 [67] para realizar un afinamiento de cuerpo rígido. Los ajustes, construcción de moléculas presentes en el cristal y afinamiento manual se realizó con el programa COOT [68] alternando con afinamientos restringidos en el programa PHENIX [69] en el cual se agregaron moléculas de agua, se calcularon ocupaciones y se concluyó cuando los valores de  $R_{work}$  y  $R_{free}$  [70] llegaron por debajo de 0.20 y 0.25, respectivamente.

## 7.7. Filogenia molecular

En la National Center of Biotechnology Information (NCBI) dentro de la plataforma del *Standart Protein BLAST* ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)), se sometió la secuencia de la lacasa de *T. thermophilus* (ID: tr|Q72HW2|Q72HW\_THET2 laccase) excluyendo modelos (XM/XP) y utilizando el algoritmo PSI-BLAST [73,73]. Se usaron bases de datos de traslaciones CDS no redundantes del GenBank, PDB, Swiss Prot, PIR, PRF excluyendo muestras ambientales del WGS.

Se seleccionaron cinco iteraciones de PSI-BLAST para obtener un total de 502 secuencias con un intervalo de identidad de 38.28 a 100%, y manteniendo el valor  $e$  igual a 0 respecto a la secuencia inicial. A partir de las secuencias encontradas con PSI-BLAST, ClustalW “CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments” construyó un alineamiento de secuencia [75].

La construcción del cladograma final se basó en el alineamiento de ClustalW con 502 secuencias de aminoácidos de proteínas, usando las coincidencias locales. Utilizando el programa IQtree se construyó un cladograma con 1000 iteraciones, usando una selección automática de 1 modelo de matriz de la mejor distancia [76].

## 7.8. Cálculos de dinámica molecular.

### 7.8.1 Preparación de modelos de proteínas para cálculos de dinámica molecular.

Las coordenadas con los códigos de entrada PDB 6Q29, 6TYR y 2XU9 se eligieron para las simulaciones de dinámica molecular por sus diferencias en la posición de los residuos 290-310, correspondientes a la horquilla- $\beta$  descrita en la estructura cristalográfica con el código de entrada PDB 2XU9. Todas las coordenadas se preparó usando la herramienta “Protein Preparation Wizard” del programa Maestro (Versión 2019-4). Los estados de protonación se coloraron acorde a los dos valores de pH con los que se trabajó en las cinéticas enzimáticas, 5.5 y 7.5, usando PROPKA 3.1 [77]. Los átomos de hidrógeno se agregaron y la protonación de los residuos de histidina en los sitios de coordinación T1Cu, T2Cu y T3Cu se realizó en los átomos de nitrógeno

que no coordinan iones de cobre; igualmente los iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) se agregaron aleatoriamente para neutralizar el sistema. Todos los átomos de cobre se trataron en el estado de oxidación  $\text{Cu}^{2+}$ .

#### 7.8.2 Simulaciones de dinámica molecular.

Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo con el módulo Desmond dentro de la suite Schrödinger 2019-2. Se realizaron simulaciones de 10 ns + 5 ns (NPT-NVT) a 27 °C y 65 °C, para incluir los efectos de la temperatura usando condiciones de un perímetro cubico periódico con una simulación de caja de 15 Å alrededor de la superficie de la proteína, las moléculas de solvente explícito se simularon usando el modelo de agua SPC. Los detalles del sistema completo se muestran en la Tabla 7.8.1.

Todas las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con el campo de fuerza OPLS\_2005 [78] con los parámetros de coordinación de átomos de cobre reportados por Hu en 2005 [79] que se usaron para otras lacasas [80]. Estos parámetros se agregaron previo al inicio de las simulaciones en el archivo “Desmond structure/parameter (.cms)”.

Todas las entradas se sometieron a un protocolo de minimización-relajación formado por 5 pasos: i) 100 ps de simulación NVT de dinámica Browniana, a -263 °C, con restricciones en métodos de solutos pesados con 50 X de fuerza constante ii) 12 ps de simulación NVT a -263 °C con restricciones en métodos de solutos pesados con 50 X de fuerza constante usando un termostato Berendsen, iii) 12 ps de simulación NPT a 10 K, con restricciones en métodos de solutos pesados con 50 X de fuerza constante usando un termostato/baróstato Berendsen, iv) 12 ps de simulación NPT a 27 °C, con restricciones en métodos de solutos pesados con 50 X de fuerza

constante usando un termostato/barostato Berendsen, v) 24 ps de simulación NPT con restricciones a 27 °C usando un termostato/baróstato Berendsen. Primera producción (10 ns) se corrió a 27 °C usando un ensamble NPT y el integrador RESPA con paso de tiempo de 2 segundos. Un termostato Berendsen se aplicó con 1 ps de tiempo de relajación. La presión se mantuvo en 1.01325 bar con un baróstato Berendsen con paso de tiempo de 2 segundos e interacciones de corto alcance modeladas con un radio de corte de 9 Å. Después, la estructura final de cada simulación NPT se utilizó como conformación inicial por 5 ns de simulación NVT a 65 °C con los mismos parámetros utilizados en la corrida NPT. Los enlaces de coordinación de los sitios T2Cu y T3Cu se restringieron con un campo de fuerza constante de 50 X para mantener el sitio de coordinación, debido a que los parámetros reportados no representan el estado de oxidación de cobre para estos sitios [87] . Las trayectorias se guardaron cada 10 ps por la simulación NPT y cada 5 ps para la simulación NVT.

### 7.8.3 Análisis de las trayectorias

Los plugins VMD se usaron para calcular la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD por sus siglas en inglés) de las trayectorias. Se utilizó la herramienta de análisis de eventos simulados de MAESTRO (Versión 2019-4), para calcular la raíz cuadrática media de fluctuaciones (RMSF por sus siglas en inglés) y para el análisis de la distribución y visualización de trayectorias.



## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 8.1 Purificación y cristalización de la *Tth*-MCO.

El extracto crudo de un cultivo de la bacteria *E. coli* BL21-*Tth*-MCO<sup>+</sup>, previamente inducido para la sobreexpresión de la enzima *Tth*-MCO, se incubó a 65 °C durante 25 minutos para desnaturalizar todas las proteínas de *E. coli* que carecen de termo-tolerancia. Las proteínas desnaturalizadas que se precipitaron se separaron por medio de centrifugación para clarificar el extracto. El extracto crudo se aplicó en una columna de intercambio catiónico (SP sefarosa) y las proteínas que interactuaron con la resina se eluyeron con un gradiente de NaCl, en el cual, las cargas de los iones compiten con las cargas de las proteínas. De esta manera las diferentes poblaciones de proteínas que interactúan en la columna se separaron en diversas fracciones para su posterior análisis (Figura 8.1.1).

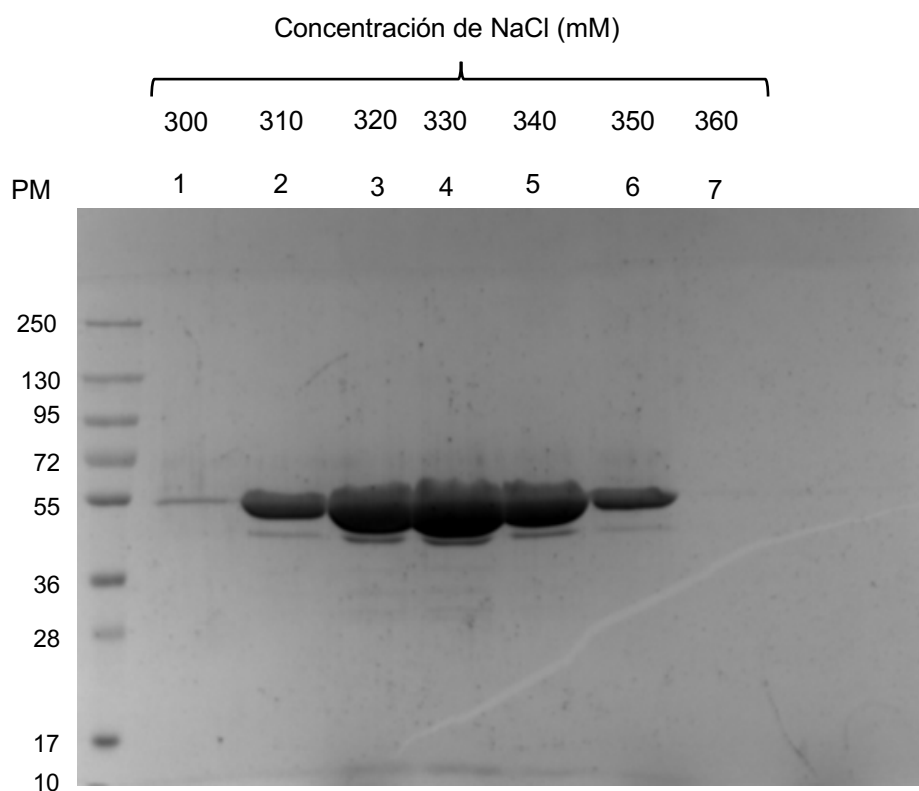


Figura 8.1.1 SDS-PAGE de fracciones obtenidas de una cromatografía de intercambio catiónico. La enzima *Tth*-MCO se observa en las fracciones correspondientes a 300-350 mM en el gradiente de NaCl.

Las fracciones de la cromatografía de intercambio catiónico, que en el SDS-PAGE mostraron la presencia de una proteína de aproximadamente 52 kDa, se juntaron y dializaron en una sola membrana con un volumen total de 10 ml. Esta muestra se dializó contra 100 volúmenes de amortiguador MES 20 mM pH 5.5, para eliminar el NaCl residual del gradiente utilizado en el intercambio catiónico. Finalmente, la muestra dializada se concentró hasta llegar a un volumen final de 2 ml y se cargó en una columna de exclusión molecular (Superdex 75). Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE (Figura 8.1.2) y las que contenían una proteína de masa molecular aproximada de 52 kDa se utilizaron para hacer pruebas de actividad oxidasa.

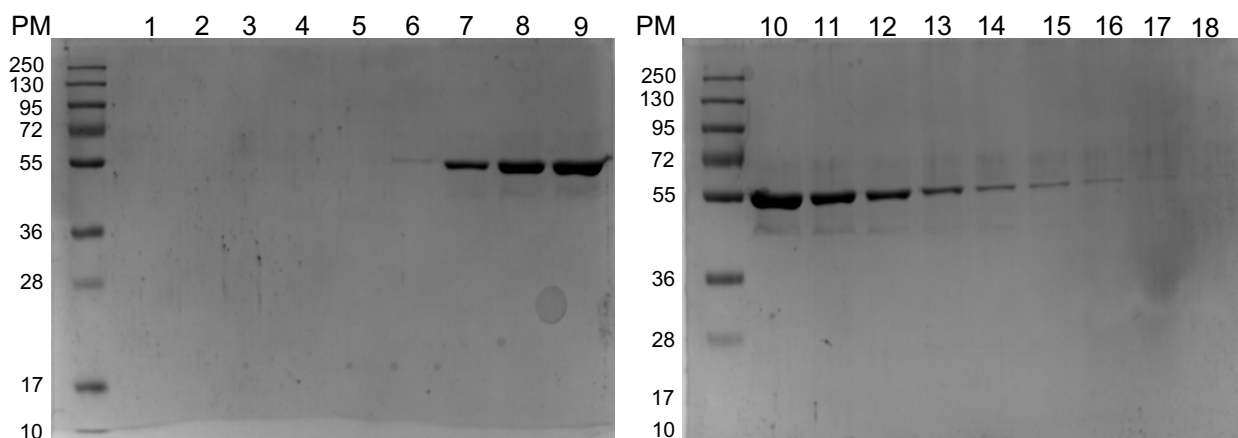


Figura 8.1.2 SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de una cromatografía de exclusión molecular. En la figura los carriles 7-14 muestran una proteína con una masa molecular de 52 kDa y corresponden con el volumen de elución de 78 a 92 ml.

A todas las fracciones con proteínas de masa molecular aproximada de 52 kDa se les realizó una prueba de actividad utilizando siringaldazina como sustrato. Las fracciones con actividad oxidasa se dializaron contra 100 volúmenes de amortiguador MES 20 mM pH 5.5 para eliminar el NaCl que contiene la muestra después de la exclusión molecular. Estas fracciones se concentraron hasta alcanzar  $20 \text{ mg ml}^{-1}$ . Después de un proceso de 4 pasos de purificación se obtuvo una muestra con una pureza mayor al 95% (Figura 8.1.3).

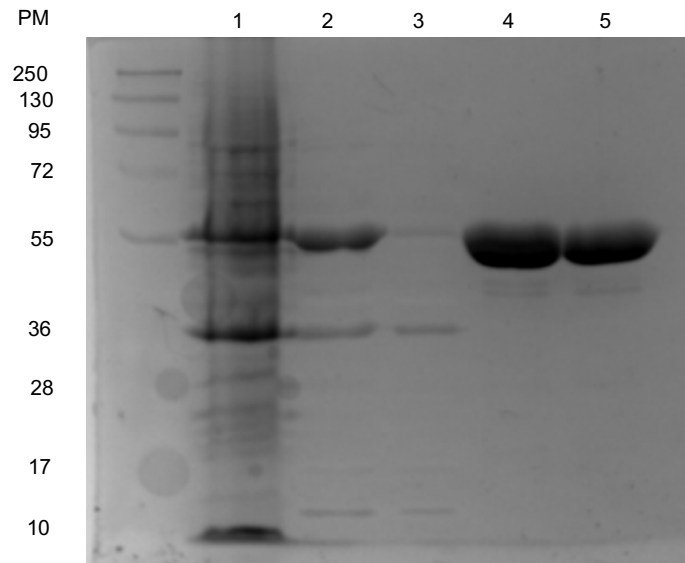


Figura 8.1.3 SDS-PAGE del proceso de purificación. 1) Extracto crudo sonicado de la bacteria después de la sobreexpresión de la *Tth*-MCO, 2) Proteína concentrada a  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  después de la cromatografía de intercambio catiónico, 3) Fracción correspondiente a el eluyente de un centricon con corte de 30kDa, 4) *Tth*-MCO concentrada a  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  después de una cromatografía de exclusión molecular, 5) *Tth*-MCO dializada y concentrada a  $20 \text{ mg ml}^{-1}$  utilizada para poner pruebas de cristalización.

La *Tth*-MCO purificada se cargó en un gel de isoelectroenfoque para corroborar su punto isoeléctrico. Se aplicaron 3 muestras en carriles distintos que dieron como resultado un pI superior a 9 (Figura 8.1.4). Por lo tanto, el punto isoeléctrico experimental resultó tener un valor de al menos 1 unidad por encima del pI calculado en el servidor *Protein isoelectric point calculator*, que dio como resultado un valor de 8.01 (<http://isoelectric.org/calculate.php>).

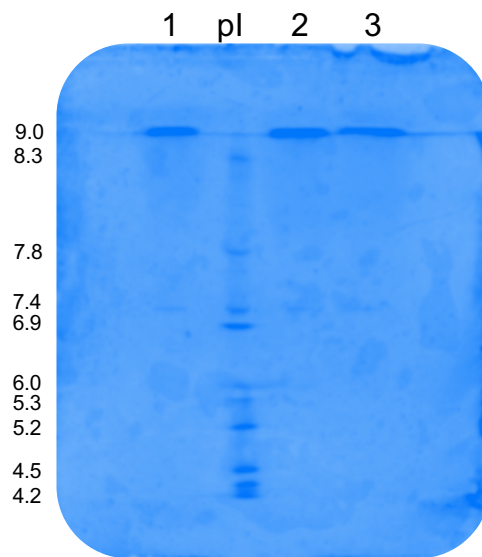
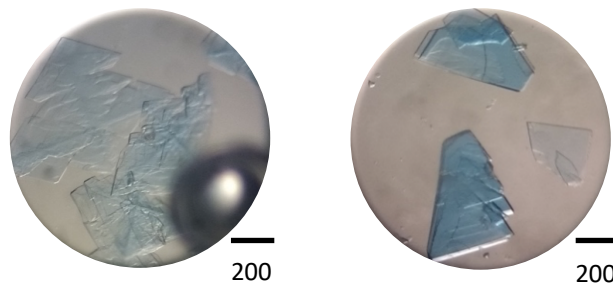


Figura 8.1.4 Isoelectroenfoco por triplicado de la *Tth*-MCO purificada. En la parte superior se enumera el número de repetición técnica y en el carril con la etiqueta Mpl se muestra el marcador de punto isoeléctrico.

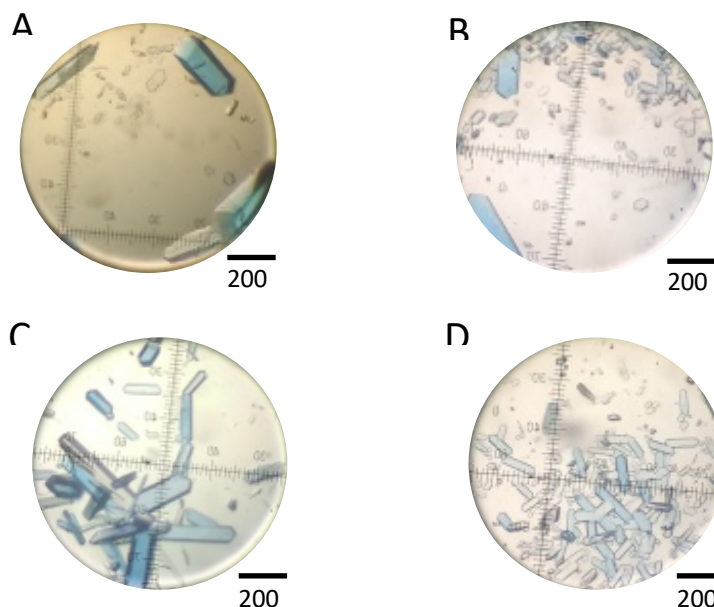
Para poder cumplir el objetivo de encontrar nuevas condiciones de cristalización, y de esta manera aumentar la probabilidad de tener cristales de la *Tth*-MCO en una matriz de cristalización diferente a la ya reportada [81], se montaron pruebas de cristalización utilizando los *Kits Crystal Screen* (I y II), *Crystal Screen Cryo* (I y II), *Wizard* (I, II, III y IV), *PEG-ION*, *Natrix* y *Quick Screen*.

De las pruebas de cristalización realizadas, se encontró una condición de cristalización que permite obtener cristales 3 días después de poner la prueba, a diferencia de las condiciones de cristalización reportadas previamente que tardan 10 meses para la formación de cristales *de novo* y 3 meses utilizando microsiembra de cristales. La nueva condición de cristalización se compone de 20% de polietilenglicol 4000 y 20% de 2-propanol en 100 mM de amortiguador de citrato de sodio a pH 5.5.



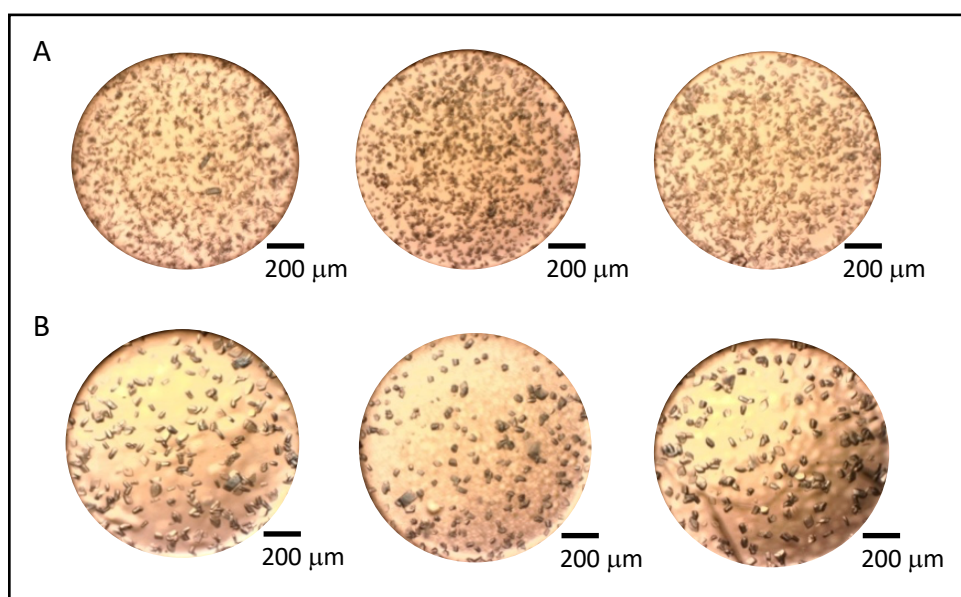
**Figura 8.1.5.** Cristales de *Tth*-MCO obtenidos con la condición No. 40 del “*Kit Crystal Screen*” por la técnica de *microbatch* a 4 °C en incubación por 72 horas.

Los cristales que se obtuvieron de las pruebas de cristalización con el “*Kit Crystal Screen*”, crecieron en forma de placas sobrepuestas, por lo que no fue posible separarlas para su posterior procesamiento. Debido a lo anterior, se montaron matrices de cristalización modificando las concentraciones de proteína y amortiguador de citrato de sodio pH 5.5 con el método de *microbatch*. Esta matriz generó cristales en la condición con 100 mM de citrato de sodio y 12 mg ml<sup>-1</sup>. Los cristales obtenidos se montaron en *loops* de rayón y se sobreenfriaron en nitrógeno líquido para ser difractados.



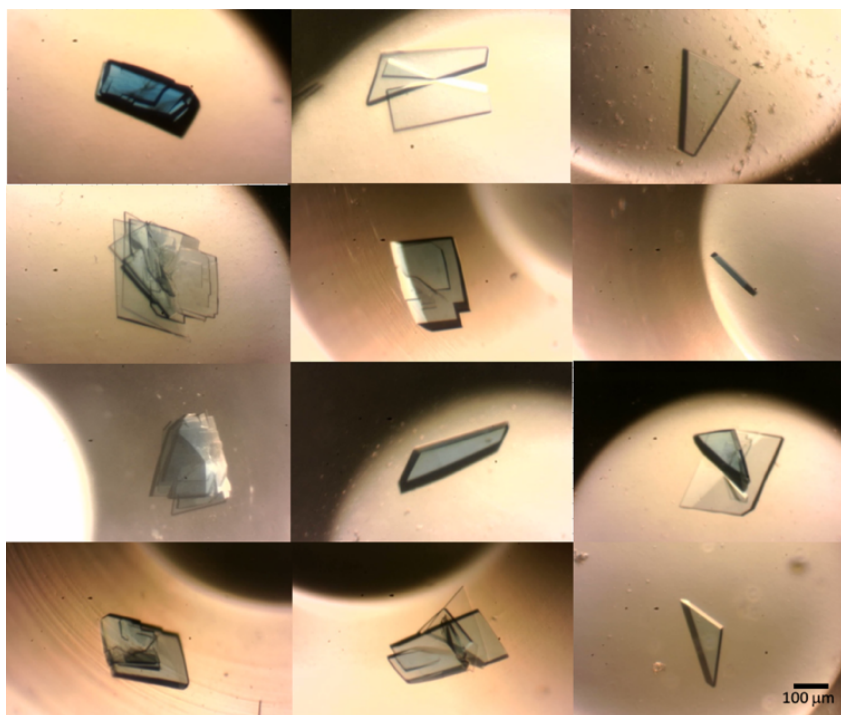
**Figura 8.1.6.** Cristales de *Tth*-MCO de la matriz de cristalización en la condición con 12 mg ml<sup>-1</sup>. Cristales en 100, 90, 80 y 70 mM citrato de sodio pH 5.5 en A, B, C y D respectivamente.

Con el objetivo de obtener una mayor cantidad de cristales, y siguiendo con la estrategia de buscar nuevas condiciones de cristalización, se utilizó el “*Kit Seed Bead*” de la compañía *Hampton Research*, para generar disoluciones de microcristales y montar pruebas de cristalización por microsiembra. Para las pruebas de cristalización con microsiembra se utilizaron diversas disoluciones a partir de la solución de microcristales, debido al exceso de micronúcleos en disoluciones de 1:100 y 1:1000. Este exceso produce que se generen un alto número de cristales, pero de dimensiones muy pequeñas (Figura 8.1.7).



**Figura 8.1.7.** Cristales obtenidos por la técnica de microsiembra de núcleos. A) Dilución 1:100 de una disolución con micronúcleos. B) Dilución 1:1000 de la disolución con micronúcleos.

Para poder obtener cristales de mayor tamaño se utilizó la disolución de 1:10,000 que permitió montar pruebas de cristalización en las que se pudo llegar a colocar 1 micronúcleo por cada pozo de la placa de *microbatch*. En estas pruebas de cristalización se observó el crecimiento de cristales individuales con tamaños superiores a 100 μm por lado (Figura 8.1.8).

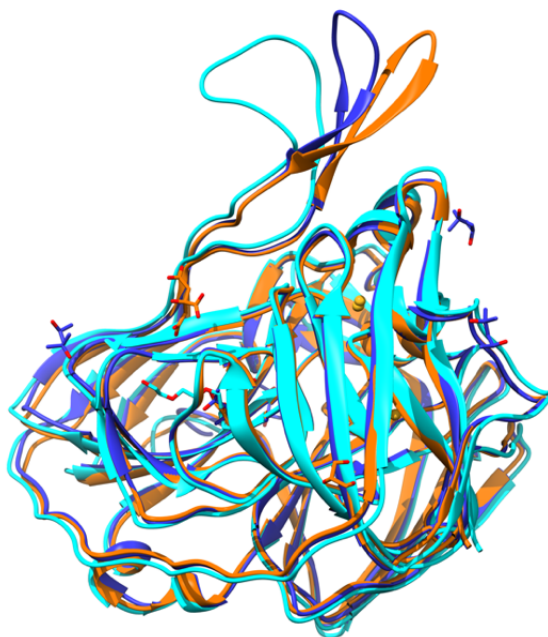


**Figura 8.1.8.** Cristales obtenidos por la técnica de microsiembra de núcleos con disolución de 1:10,000. La proteína se agregó en una concentración de  $12 \text{ mg ml}^{-1}$ . La barra de tamaño que se muestra en el panel inferior derecho, que representa  $100 \mu\text{m}$ , es una escala para las 12 micrografías mostradas en esta figura.

La búsqueda de nuevas condiciones de cristalización para la *Tth*-MCO permitió encontrar inicialmente una condición en la que además de reducir el tiempo de cristalización notablemente, forma cristales en el grupo espacial  $P12_11$  que es diferente al reportado anteriormente. Por otro lado, los cristales que crecieron a partir de microsiembra formaron cristales en el grupo espacial  $C222_1$ , que es igual al reportado por Serrano-Posada [81], sin embargo, la celda unitaria es diferente. Estos cambios resultaron ser significativos en el orden de las moléculas en el interior del cristal, particularmente con respecto a los residuos 290-310, por lo que permitieron observar 2 nuevas conformaciones de la zona descrita como horquilla- $\beta$  en el PDB con el código de entrada PDB 2XU9.

## 8.2 Análisis estructural de la horquilla- $\beta$ de la *Tth*-MCO.

Las nuevas estructuras cristalográficas obtenidas corresponden a los códigos de entrada PDB 6Q29 y 6TYR, las cuales resultaron a partir de cristales obtenidos por diferentes técnicas que dieron lugar a una estructura con el código PDB 6Q29 con grupo espacial  $P12_11$  con tamaño de celda de 54.53 Å, 60.75 Å y 76.34 Å y ángulos  $\alpha=\gamma=90^\circ$  y  $\beta=109.57^\circ$ . La estructura con el código PDB 6TYR se resolvió en el grupo espacial  $C222_1$  con celda de tamaño 61.44 Å, 85.38 Å y 169.16 Å y ángulos  $\alpha=\beta=\gamma$  de  $90^\circ$ . Estas estructuras presentan una característica muy particular, y es la presencia de dos conformaciones del motivo horquilla- $\beta$  en la conformación “abierta” y “cerrada” (Figura 8.2.1).



**Figura 8.2.1.** Sobreposición de 3 estructuras cristalográficas de la *Tth*-MCO con diferente conformación de la horquilla- $\beta$ . En color cian la estructura con el código de entrada PDB 6Q29 con la “conformación abierta”, en azul la estructura con el código de entrada PDB 2XU9 con la “conformación intermedia” y en anaranjado la estructura con el código de entrada PDB 6TYR con la “conformación cerrada”.



Los datos estadísticos de la colecta de todas las estructuras cristalográficas reportadas en este trabajo se muestran en las Tablas 8.1.1 y 8.1.2.

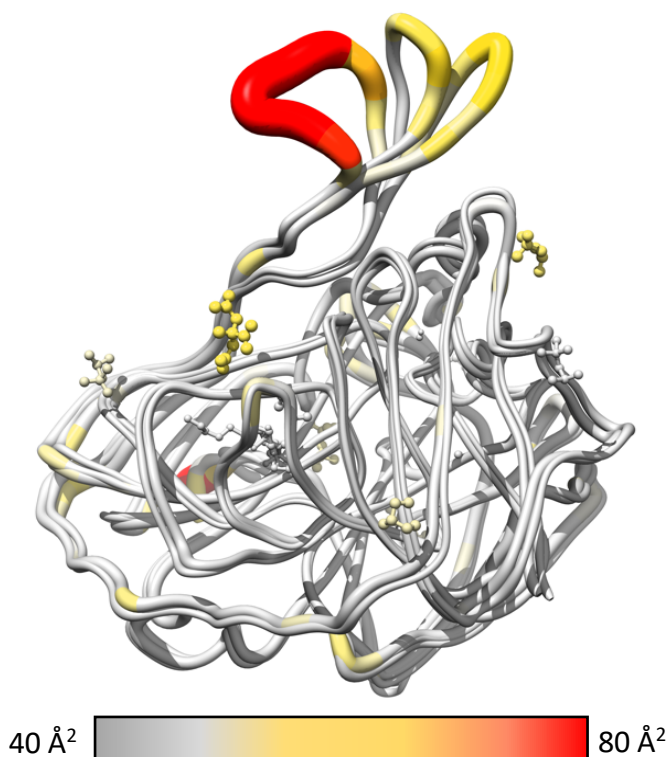
**Tabla 8.1.1.** Estadísticos de la colecta de datos. Estructuras con diferente condición de óxido-reducción y estructura con conformación cerrada.

Datos estadísticos de la colecta	Condición oxidante	Conformación cerrada	Condición reductora
<b>Grupo espacial</b>	P 1 2 <sub>1</sub> 1	C 2 2 2 <sub>1</sub>	C 2 2 2 <sub>1</sub>
<b>Parámetros de celda unitaria</b>			
a (Å)	72.25	61.44	93.71
b (Å)	96.23	85.38	110.58
c (Å)	72.29	169.16	96.55
$\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ (°)	$\alpha$ = $\gamma$ =90 $\beta$ = 109.57	$\alpha$ = $\beta$ = $\gamma$ 90	$\alpha$ = $\beta$ = $\gamma$ 90
<b>Intervalo de resolución (Å)</b>	19.94-2.0 (2.07- 2.0)	42.29-1.81 (1.87-1.81)	29.35-2.19 (2.31-2.19)
<b>Residuos por monómero</b>	439/2	439/1	439/1
<b>Número de reflexiones</b>	202927 (20371)	75928 (6444)	105025 (8509)
<b>Número de reflexiones únicas</b>	64577 (6545)	39303 (3426)	25616 (2182)
<b>Complejidad (%)</b>	97.98 (99.91)	96.38 (85.27)	98.35 (85.10)
<b>Multiplicidad</b>	3.1 (3.1)	1.9 (1.9)	4.1 (3.9)
<b>I / <math>\sigma</math>(I)</b>	16.54 (5.59)	25.62 (2.88)	5.1 (3.6)
<b>CC<sub>1/2</sub> (%)</b>	0.993 (0.89)	99.9 (0.68)	-
<b>R<sub>merge</sub></b>	0.06 (0.22)	0.03 (0.34)	0.17(0.29)
<b>Wilson Plot B-value</b>	13.53	23.39	16.68
<b>R<sub>work</sub> / R<sub>free</sub> (%)</b>	14.49/19.71	18.1/23.4	14.6/19.4
<b>Átomos de proteína</b>	8099	3548	3694
<b>Átomos de Iones / ligandos</b>	83	36	35
<b>Moléculas de H<sub>2</sub>O</b>	882	268	378
<b>Longitudes de enlace (Å)</b>	0.007	0.007	0.009
<b>ángulos de enlace (°)</b>	0.91	1.0	1.33
<b>Promedio de Factor B (Å<sup>2</sup>)</b>	16.62	27.90	17.77
<b>Regiones más favorecidas</b>	96.32	97.71	96.57
<b>Regiones permitidas adicionales</b>	2.99	2.06	2.97
<b>Regiones no permitidas</b>	0.69	0.23	0.46
<b>Código PDB</b>	<b>6W2K</b>	<b>6TYR</b>	<b>5AFA</b>

**Tabla 8.1.2.** Estadísticos de la colecta de datos. Estructuras con diferente dosis de radiación depositada en conformación de la horquilla- $\beta$  cerrada.

<b>Datos estadísticos de la colecta</b>	<b>Lac_v1 2.50 MGy</b>	<b>Lac_v2 5.10 MGy</b>	<b>Lac_v3 7.75 MGy</b>	<b>Lac_v4 10.33 MGy</b>	<b>Lac_v5 12.91 MGy</b>	<b>Lac_v6 15.50 MGy</b>	<b>Lac_v7 18.08 MGy</b>	<b>Lac_v8 20.67 MGy</b>
<b>Grupo espacial</b>	P 1 2 <sub>1</sub> 1	P 1 2 <sub>1</sub> 1	P 1 2 <sub>1</sub> 1	P 1 2 <sub>1</sub> 1	P 1 2 <sub>1</sub> 1	P 1 2 <sub>1</sub> 1	P 1 2 <sub>1</sub> 1	P 1 2 <sub>1</sub> 1
<b>Parámetros de celda unitaria</b>	54.53	54.52	54.57	54.66	54.49	54.43	54.48	54.44
<b>a (Å)</b>	60.75	60.75	60.84	60.93	60.79	60.81	60.81	60.83
<b>b (Å)</b>	76.34	76.33	76.1	76.54	76.330	76.23	76.20	76.23
<b>c (Å)</b>	$\alpha=\gamma=90$	$\alpha=\gamma=90$	$\alpha=\gamma=90$	$\alpha=\gamma=90$	$\alpha=\gamma=90$	$\alpha=\gamma=90$	$\alpha=\gamma=90$	$\alpha=\gamma=90$
<b><math>\alpha</math>-<math>\beta</math>-<math>\gamma</math> (°)</b>	$\beta= 109.57$	$\beta= 109.51$	$\beta= 109.42$	$\beta= 109.57$	$\beta= 109.48$	$\beta= 109.34$	$\beta= 109.29$	$\beta= 109.27$
<b>Intervalo de resolución (Å)</b>	39.2-1.7 (1.76-1.7)	39.2-1.7 (1.76-1.7)	26.18-1.7 (1.76-1.7)	39.36-1.7 (1.76-1.7)	35.97-1.7 (1.76-1.7)	38.83-1.7 (1.76-1.7)	39.27-1.7 (1.76-1.7)	39.26-1.7 (1.76-1.7)
<b>Residuos por monómero</b>	440/1	440/1	440/1	440/1	440/1	440/1	440/1	440/1
<b>Número de reflexiones</b>	168432 (16158)	96325 (9270)	96221 (9286)	97098 (9393)	96312 (9298)	96273 (9287)	96423 (9315)	96302 (9296)
<b>Número de reflexiones únicas</b>	51846 (5143)	51835 (5136)	51741 (5145)	52310 (5195)	51847 (5157)	51799 (5144)	51848 (5154)	51852 (5152)
<b>Complejidad (%)</b>	99.21 (98.44)	99.98 (100.00)	99.95 (100.00)	99.97 (99.98)	99.97 (100.00)	99.98 (99.98)	99.98 (100.00)	99.98 (99.98)
<b>Multiplicidad</b>	3.7 (3.6)	1.9 (1.8)	1.9 (1.8)	1.9 (1.8)	1.9 (1.8)	1.9 (1.8)	1.9 (1.8)	1.9 (1.8)
<b>I / <math>\sigma</math>(I)</b>	8.8 (2.4)	8.7 (2.3)	8.08 (2.07)	7.27 (1.38)	7.92 (1.57)	7.1 (1.26)	6.55 (1.02)	6.42 (0.81)
<b>CC<sub>1/2</sub> (%)</b>	0.99 (0.97)	0.99 (0.76)	0.997 (0.69)	0.995 (0.46)	0.997 (0.56)	0.996 (0.45)	0.996 (0.313)	0.997 (0.184)
<b>R<sub>merge</sub></b>	0.03 (0.14)	0.045 (0.34)	0.046 (0.35)	0.058 (0.62)	0.048 (0.51)	0.050 (0.65)	0.052 (0.79)	0.054 (1.0)
<b>Wilson Plot B-value</b>	11.90	16.20	15.15	16.78	19.11	20.59	21.89	23.21
<b>R<sub>work</sub> / R<sub>free</sub> (%)</b>	19.7/22.8	19.8/24.7	19.5/23.5	20.4/24.9	19.6/24.4	19.7/23.9	19.5/24.2	19.8
<b>Átomos de proteína</b>	3915	4007	3961	3897	3939	3897	3905	3856
<b>Átomos de iones / ligandos</b>	17	17	15	17	17	17	17	23
<b>Moléculas de H<sub>2</sub>O</b>	409	445	380	350	371	329	328	273
<b>Longitudes de enlaces (Å)</b>	0.007	0.007	0.007	0.007	0.006	0.008	0.007	0.007
<b>Ángulos de enlace (°)</b>	0.93	1.01	0.96	1.08	0.93	1.07	0.96	0.90
<b>Promedio de factor B (Å<sup>2</sup>)</b>	23.0	21.29	20.53	22.45	24.26	26.42	27.09	29.38
<b>Regiones más favorecidas</b>	97.90	96.80	96.35	96.12	96.80	96.35	96.80	95.89
<b>Regiones permitidas adicionales</b>	1.87	1.01	2.51	2.74	1.83	3.20	2.74	2.74
<b>Regiones no permitidas</b>	0.23	0.68	1.14	1.14	1.37	0.46	0.46	1.37
<b>Código PDB</b>	<b>6Q29</b>	<b>6WX9</b>	<b>6WCH</b>	<b>6WCG</b>	<b>6WCL</b>	<b>6WCM</b>	<b>6WCN</b>	<b>6WCP</b>

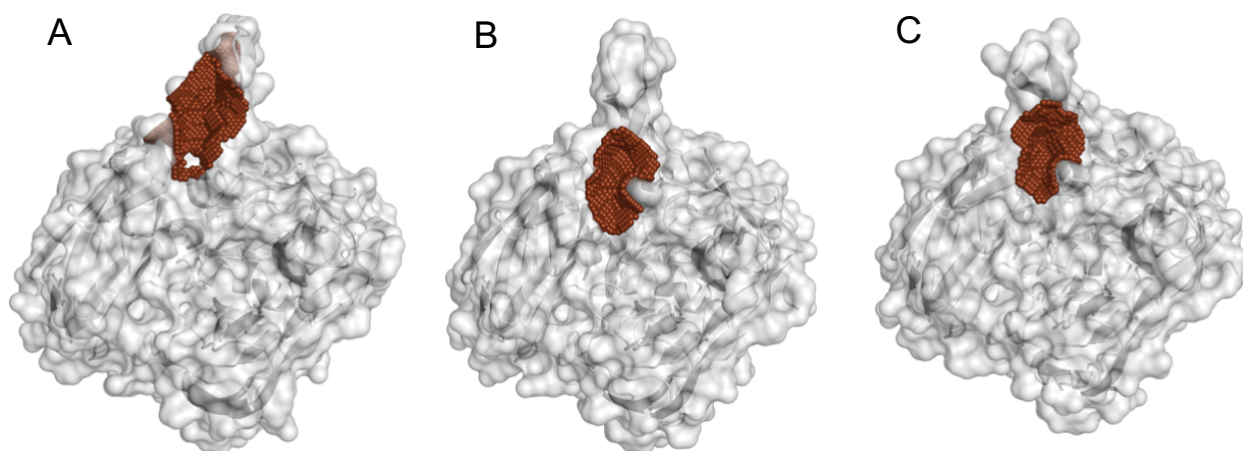
Al ser una enzima de un organismo termófilo, la *Tth*-MCO es una enzima altamente resistente a la desnaturalización térmica, debido a que el núcleo de esta proteína, al igual que en otras proteínas de organismos termófilos, tiene muy poco movimiento [82]. Esta característica se presenta prácticamente en toda la proteína con excepción de la horquilla- $\beta$  que está localizada a un costado de la cavidad de acceso a el T1Cu. Este motivo tiene como característica altos valores de desplazamiento atómico (valores B), superiores a  $60 \text{ \AA}^2$  en contraste con el resto de la proteína que tiene un promedio de valores B cercanos a  $30 \text{ \AA}^2$  (Figura 8.2.2). Los valores B altos en este motivo horquilla- $\beta$  de la *Tth*-MCO sugieren que esta zona podría tener un comportamiento dinámico, o bien que es una zona con pocos contactos dentro de la red cristalina. Si consideramos los valores B como un indicador de movimiento [83], este comportamiento dinámico, podría ser relevante en la interacción sustrato-enzima [84]. Ya que esta horquilla- $\beta$  es un elemento adyacente a la cavidad de entrada al sitio T1Cu, y si presenta un comportamiento dinámico, este podría ser importante en el proceso de apertura y cierre de esta cavidad.



**Figura 8.2.2.** Sobreposición de 3 estructuras cristalográficas de la *Tth*-MCO en las que se muestra el valor B representado con el color y grosor de las representaciones. La figura muestra la conformación abierta (PDB 6Q29), intermedia (2XU9) y cerrada (6TYR) de izquierda a derecha respetivamente.

Para identificar el efecto del movimiento de la horquilla- $\beta$  de la *Tth*-MCO, se utilizó el servidor CavityPlus [85] (<http://www.pkumdl.cn:8000/cavityplus/computation.php>) para medir el área expuesta al solvente en la cavidad de acceso al T1Cu en la *Tth*-MCO cuando la horquilla- $\beta$  cambia de conformación. El análisis de la estructura con conformación abierta dio como resultado una superficie expuesta al solvente de 295.7 Å<sup>2</sup>, esta es la mayor superficie encontrada en las estructuras analizadas en esta tesis. Por otra parte, las estructuras con la conformación intermedia y cerrada presentan un área expuesta al solvente de 182.7 y 179.7 Å<sup>2</sup> respectivamente (Figura 8.2.3).

Las diferencias en el área expuesta al solvente se estarían relacionando con un cambio en la actividad enzimática, ya que la estructura con la conformación abierta que presenta la mayor área expuesta se cristalizó en una condición en la que el pH aproximado es de 5.5, pH que se ha reportado que es el de mayor actividad para esta enzima utilizando siringaldazina como sustrato [1]. En el caso de la estructura intermedia, obtenida en una condición de cristalización que tiene un valor de pH entre 7.5 y 8.0, la *Tth*-MCO es prácticamente inactiva en este valor de pH frente a siringaldazina. Para la estructura con la conformación cerrada, con el código de entrada PDB 6TYR, esta presenta la menor superficie expuesta al solvente en la cavidad de entrada al sitio T1Cu, lo que podría mostrarnos un estado de inactividad para la *Tth*-MCO. Sin embargo, esta estructura se obtuvo de un cristal que creció en la condición de cristalización con pH 5.5 a partir de un núcleo de cristalización, obtenido en otra condición de cristalización por lo que podríamos estar viendo el efecto de la matriz y las condiciones de cristalización en el acomodo de la proteína para su empaquetamiento en el cristal.



**Figura 8.2.3** Análisis de superficie expuesta al solvente utilizando el servidor *CavityPlus*. En **A)** se muestra la superficie de la estructura con el código PDB 6Q29, esta estructura tiene una conformación abierta, en **B)** la estructura con el código PDB 2XU9 con una conformación intermedia y en **C)** la estructura con el código de entrada PDB 6TYR que tiene una conformación cerrada. Todas las conformaciones se nombran respecto a la cavidad de entrada al sitio T1Cu.

Con la intención de identificar los cambios que sufre la *Tth*-MCO en su superficie cuando se modifica el valor de pH del medio. Se calculó la carga de todos los residuos aminoácidos de la superficie, tomando en cuenta las diferencias en los valores de pH en que se formó el cristal para obtener cada una de las estructuras cristalográficas analizadas. Los cálculos se realizaron utilizando el servidor PDB2PQR [86,87], en el que se indicó que el pH para las estructuras 6Q29 y 6TYR es 5.5 y para la estructura 2XU9 un valor de pH de 7.5 (Figura 8.2.4).

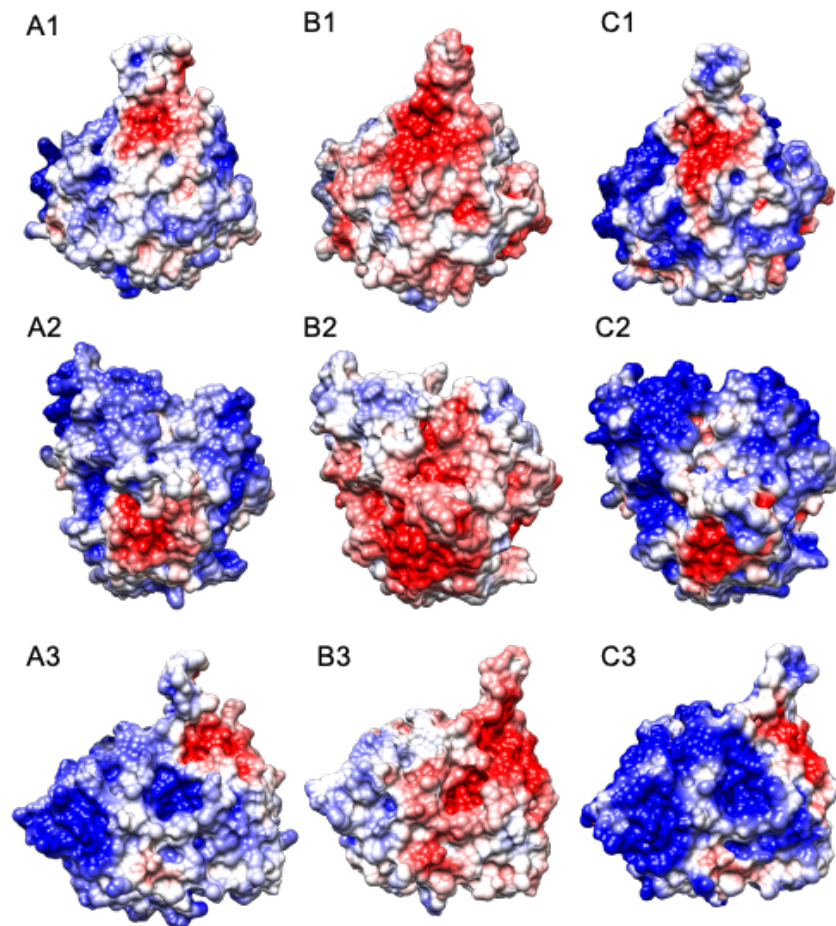
Debido a que la superficie electrostática de *Tth*-MCO en las tres estructuras cristalográficas cambia, y no solo estructuralmente en la cavidad vecina al sitio T1Cu, sino también en la base de la horquilla  $\beta$  y en la horquilla  $\beta$  (residuos de aminoácidos His189, His303 respectivamente), estos cambios también podrían ser relevantes para la conformación de este motivo, sin embargo, el papel de esos residuos en la movilidad de la horquilla  $\beta$  debe analizarse en profundidad. Respecto al potencial electrostático en la superficie de la *Tth*-MCO, en un pH de 7.5 se tiene un valor medio de 1.0 eV para toda la proteína, pero cuando el valor de pH cambia a 5.5, el potencial

electrostático calculado a partir de las coordenadas de las entradas del PDB 6Q29 y 6TYR, cambia a valores con un promedio de 8.0 eV para la proteína completa (Figuras 8.2.4 paneles A3, A4, B3, B4, C3 y C4). Estos comportamientos se deben a cambios en el estado de protonación, no solo de los residuos H189 y H303, sino también en Glu267, Glu352, Asp392 y Asp442 debido al cambio de pH. Sin embargo, estos cambios parecen afectar no solo la organización de los cristales, sino que también parecen modificar la conformación de horquilla  $\beta$ .

Las diferentes conformaciones encontradas en las estructuras cristalográficas con los códigos de entrada PDB 6Q29, 2XU9 y 6TYR tienen vecinos cristalográficos que podrían influir en la matriz cristalina en que cada molécula de proteína se acomoda en el cristal. Sin embargo, los análisis de cambios conformacionales y electrostáticos en sus superficies relacionados con los valores de pH en los que se obtuvo cada uno de los cristales, abre la posibilidad de que las conformaciones de la horquilla- $\beta$  sean la causa y no la consecuencia de la matriz cristalina.

Por otro lado, el que exista una región que de acuerdo con los valores B presente alta movilidad y flexibilidad, es relevante en el funcionamiento de la enzima, debido al cambio en el área de superficie expuesta a la cavidad de entrada al sitio T1Cu que es modificada dependiendo de la conformación que adopta la horquilla- $\beta$ . Esto provoca que la cavidad de entrada al sitio T1Cu modifique su tamaño, lo que puede generar que se restrinja o se facilite la interacción del sustrato con el sitio T1Cu, lo cual tendría un efecto directo en el comportamiento catalítico de la *Tth*-MCO.

Además, cambios en la carga electrostática en la superficie de la *Tth*-MCO, principalmente residuos de aminoácidos adyacentes al motivo horquilla- $\beta$  podrían estar modulando la apertura y cierre de la cavidad de entrada al sitio T1Cu en un proceso dependiente del pH del medio. De esta manera, en esta tesis se propone que la actividad enzimática de la *Tth*-MCO tiene un elemento regulatorio en su horquilla- $\beta$ , que por impedimento estérico, podría ser responsable de la inhibición del funcionamiento de la enzima en un medio alcalino y un efecto contrario al potenciar la actividad enzimática en medios ácidos.



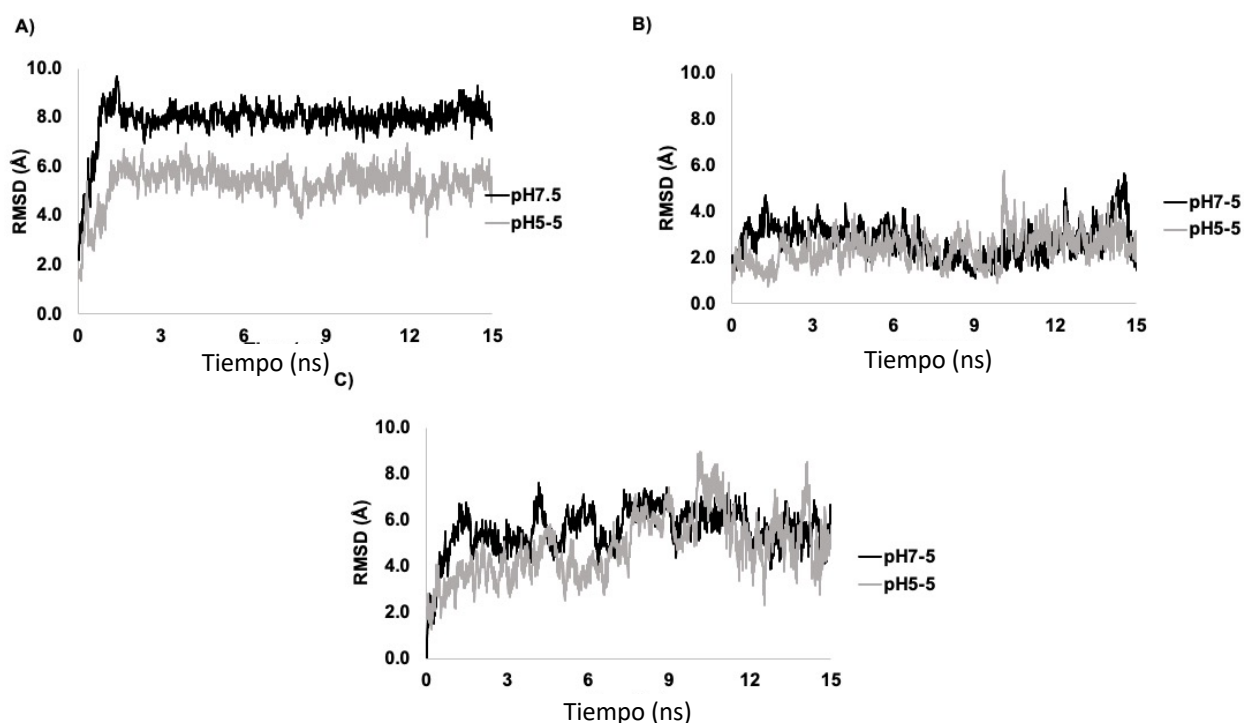
**Figura 8.2.4.** Análisis de las cargas electrostáticas de la superficie expuesta al solvente utilizando el servidor PDB2PQR. En los paneles **A** (1,2 y 3) se muestra la superficie de la estructura con el código PDB 6Q29 obtenida en pH 5.5, con diferentes rotaciones. En **B** (1,2 y 3) se muestran la estructura con el código PDB 2XU9 con una conformación intermedia a pH 7.5 y en **C** (1,2,3) la estructura con el código de entrada PDB 6TYR que tiene una conformación cerrada a pH 5.5. Todas las conformaciones se nombran respecto a la cavidad de entrada al sitio T1Cu.

### 8.3 Cálculos de dinámica molecular

Con la evidencia obtenida a partir del análisis de las estructuras cristalográficas con los códigos de entrada PDB 6Q29, 6TYR y 2XU9, se generó la hipótesis de un componente dinámico en la horquilla- $\beta$ , la cual podría ser dependiente de los valores de pH del medio. Por lo tanto, con la intención de dilucidar la importancia del pH en el comportamiento dinámico de la *Tth*-MCO, se

realizaron cálculos de dinámica molecular en colaboración con el Research on Renewable Energy and Sustainability Laboratory (R<sup>2</sup>ES Lab), de la universidad de Siena, Italia.

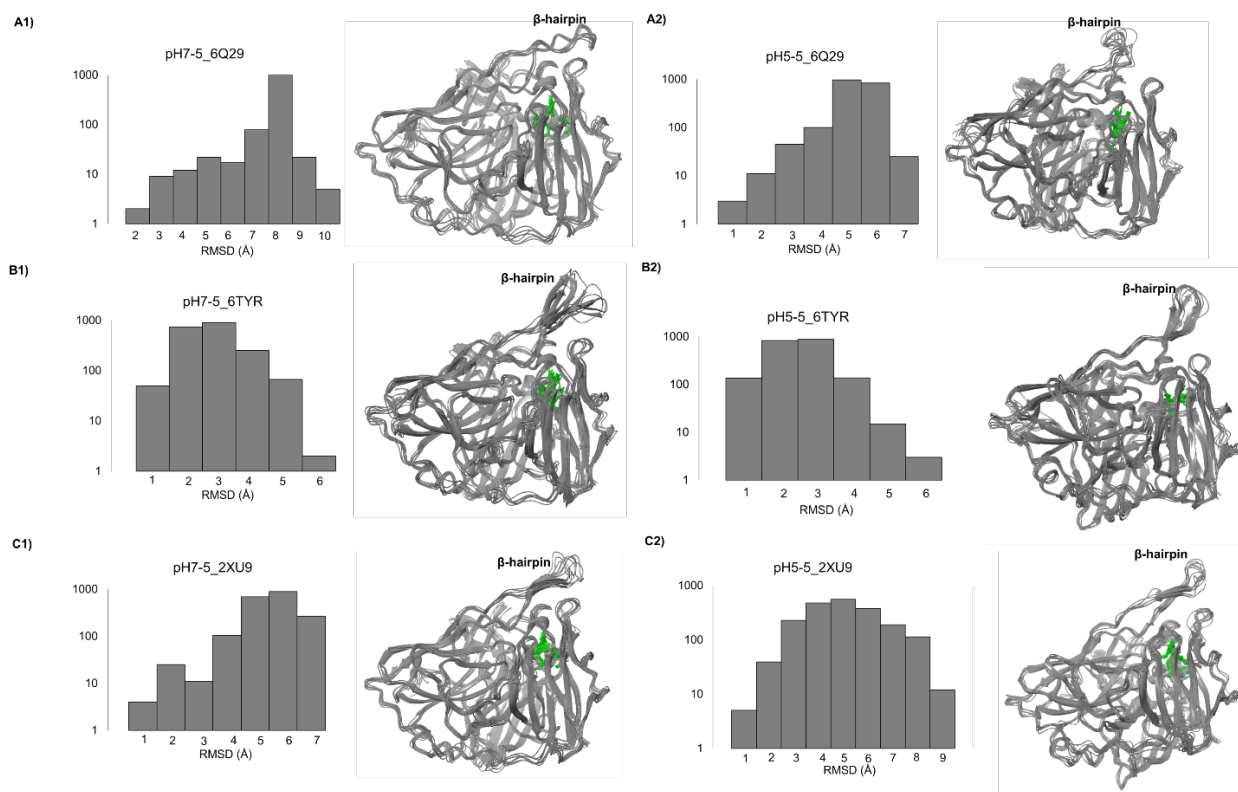
Los cálculos de dinámica molecular realizados permitieron identificar la dinámica de la horquilla- $\beta$  a través del tiempo, inicialmente comparando los valores de RMSD durante 15 ns a 27 y 65 °C. De esta manera, el análisis de las trayectorias de cada una de las simulaciones muestra que la horquilla- $\beta$  presenta movimiento durante el tiempo que dura la simulación en cada una de las condiciones estudiadas (Figura 8.3.1). Y muestra los valores de RMSD más altos en el experimento con la estructura con el código PDB 6Q29, que corresponde a la conformación abierta en un medio con pH de 7.5. Esta condición favorece que la horquilla- $\beta$  presente una tendencia a cerrar la cavidad de entrada al sitio T1Cu (Figura 8.3.1, panel A).



**Figura 8.3.1.** Se muestra el RMSD de la cadena principal correspondiente a la región de la horquilla- $\beta$  (residuos 289-309) para las diferentes conformaciones estudiadas en diferentes valores de pH de las estructuras con el código de entrada PDB: A) 6Q29, B) 6TYR y C) 2XU9. Los resultados muestran un tiempo de simulación de 0-10 ns a 27 °C y para 10-15 ns a 65°C. El RMSD fue calculado con referencia a la estructura inicial que corresponde con la estructura cristalográfica.



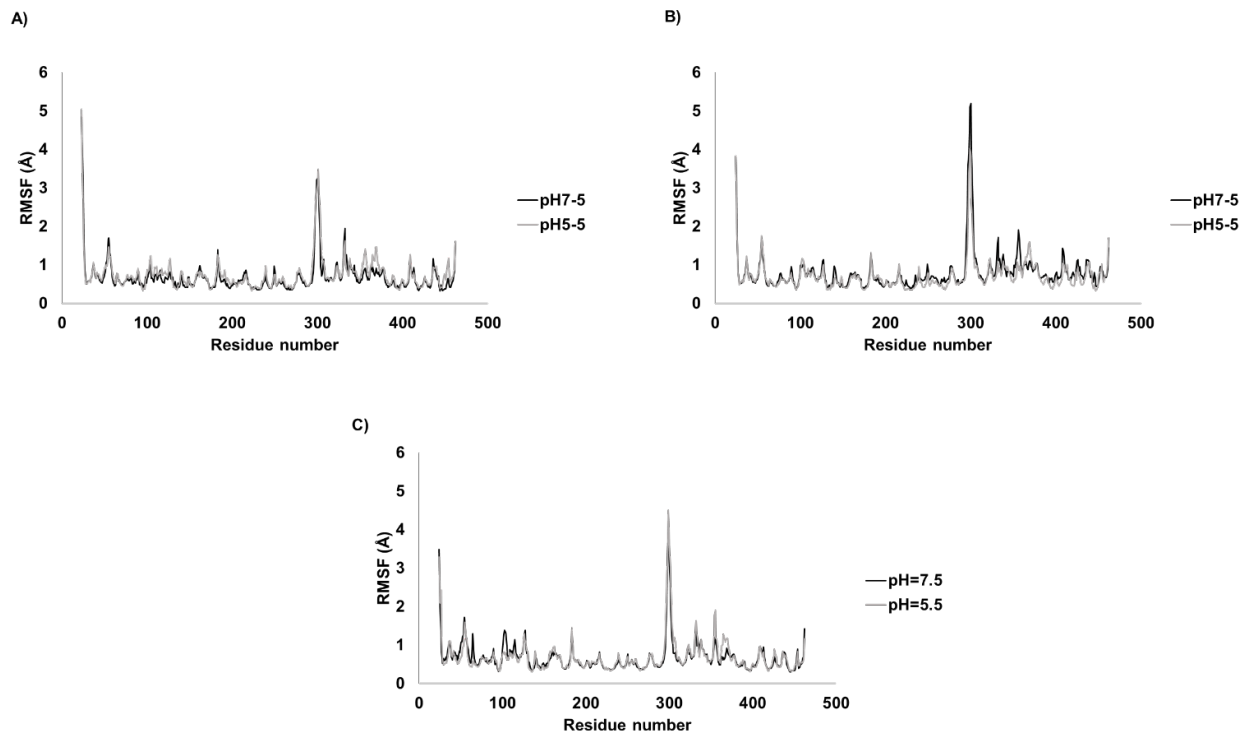
Además de identificar un comportamiento dinámico en la zona de la horquilla- $\beta$  medida en los residuos de aminoácido 289-309, se generó una serie de figuras que muestran la distribución conformacional con 8 estructuras tomadas de manera aleatoria de cada una de las simulaciones de dinámica molecular. Esta figura muestra dos tendencias claras, dependiendo la condición de pH en la que se realiza la simulación. En los cálculos que se realizaron utilizando un pH de 5.5, se identificó una tendencia en el comportamiento de la horquilla- $\beta$  para mantenerse abierta, lo cual permite a su vez que la entrada a la cavidad del sitio activo se mantenga abierta, esto podría influir en la forma en que el sustrato se acerca al sitio T1Cu (Figura 8.3.2, paneles A2, B2 y C2).



**Figura 8.3.2.** Distribución conformacional de acuerdo con valores de RMSD en Å. En el panel derecho de cada distribución conformacional se muestra una superposición de ocho conformaciones seleccionadas aleatoriamente de las distribuciones más pobladas.

Para las simulaciones de dinámica molecular realizadas con un pH de 7.5, se encontraron coordenadas que tienen una marcada tendencia a adoptar una conformación cerrada en la horquilla- $\beta$  (Figura 8.3.2, paneles A1, B1 y C1). A partir de los resultados obtenidos, se puede argumentar que este motivo de la enzima *Tth*-MCO no solo tiene un comportamiento dinámico, como fue reportado en la publicación de Bello [88], donde se evaluó el efecto de la presencia y ausencia de iones cobre en la movilidad de la horquilla- $\beta$ . Estos resultados permiten formular una serie de observaciones entre las que resaltan: un comportamiento dinámico de la horquilla- $\beta$ , lo cual no es raro, según lo reportado en la literatura. Adicionalmente, la movilidad de este motivo está influenciada por cambios en el pH del medio. Lo anterior, permitiría entender el comportamiento catalítico de esta enzima con relación al pH del medio.

De acuerdo con los resultados anteriores que muestran que la horquilla- $\beta$  de la *Tth*-MCO tiene un importante comportamiento dinámico, se calculó el valor de RMSF de todos los aminoácidos de la enzima para identificar las zonas con mayor movilidad. El análisis de los valores de RMSF para todas las simulaciones de dinámica molecular que comprenden 2 valores de pH para las estructuras 6Q29, 2XU9 y 6TYR, muestran valores de RMSF muy similares entre cada simulación, con sus respectivos cambios de pH. La figura 8.3.3 muestra una sobreposición de los valores de RMSF en todas las simulaciones realizadas.



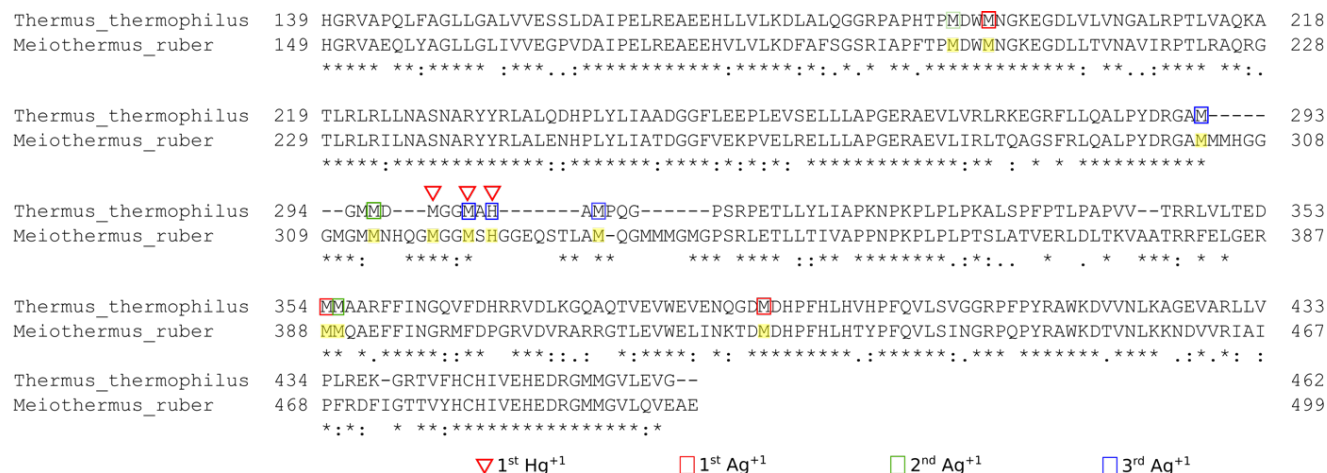
**Figura 8.3.3.** RMSF calculado en Å para la cadena principal de la *Tth*-MCO, para diferentes conformaciones estudiadas a 27 °C pH 7.5 y 5.5 con las estructuras cristalográficas con el código de entrada PDB: A) 6Q29, B) 6TYR y C) 2XU9. EL RMSF fue calculado con referencia al estado 0 de la dinámica molecular.

Los resultados obtenidos de las simulaciones de dinámica molecular permiten demostrar que el pH del medio es un factor importante en la movilidad de la horquilla- $\beta$  de la *Tth*-MCO. Esta dependencia con relación a los valores del pH del medio podría explicar parcialmente el comportamiento de esta enzima cuando este factor es modificado en el medio.

#### 8.4 Composición y función de la horquilla- $\beta$ de la *Tth*-MCO

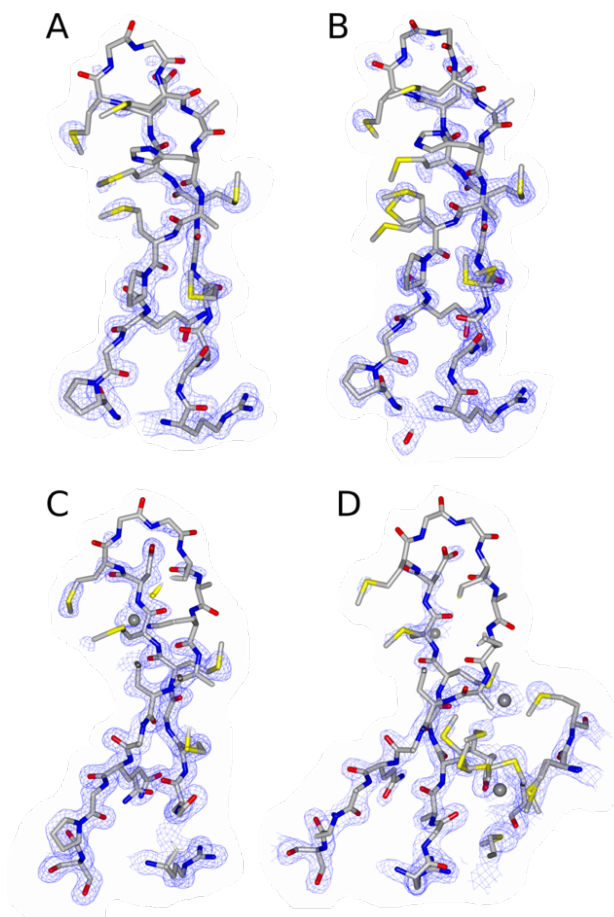
En un trabajo publicado por Serrano-Posada [38] se reportó una inusual proporción de metioninas en la horquilla- $\beta$  de la *Tth*-MCO y la zona adyacente, lo que sugiere que este motivo podría tener sitios de unión a metales. Por lo que se remojaron cristales de la *Tth*-MCO en una solución crioprotectora en presencia de iones de mercurio ( $Hg^{+2}$ ) con la intención de encontrar algún sitio de unión a metales adicional a los ya reportados para las multicobre oxidasas azules. Para la estructura cristalográfica con el código PDB 2XVB se localizó la densidad electrónica que

corresponde a un ion de mercurio que es coordinado por la Met298, Met301, His303 y M305 (Figura 8.3.1 y Figura 8.4.2, Panel C). Otra de las estructuras de la base de datos con el código de entrada PDB 5K15 fue obtenida a partir de un cristal remojado en solución crio-protectora con iones metálicos ( $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ ) durante 8 min, pero no fue posible detectar densidad electrónica correspondiente a un ion de cobre, adicional a los 4 cobres catalíticos, en este experimento realizado en condiciones oxidantes (Figura 8.4.2, Panel A). Como parte de este trabajo se remojaron varios cristales en diferentes concentraciones de iones metálicos con el objetivo de localizar más sitios de coordinación de metales en la horquilla- $\beta$  y la zona adyacente, por lo que se remojaron cristales en soluciones crio-protectoras con iones de cobre ( $(\text{Cu}_2\text{PO}_4)_2$ ) en condiciones reductoras y iones de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). La estructura cristalográfica obtenida del cristal remojado con  $\text{Cu}_2(\text{PO}_4)_2$  en condiciones reductoras con el código de entrada PDB 6W2K no tiene densidad electrónica asociada que justifique la presencia de algún ion de cobre coordinado en la horquilla- $\beta$  (Figura 8.4.2, Panel B). Por el contrario, el cristal remojado con  $\text{AgNO}_3$  generó datos para resolver una estructura cristalográfica con el código de entrada PDB 5AFA que presenta 3 sitios de unión a iones de plata (uno en la horquilla- $\beta$  y dos entre la horquilla- $\beta$  y la zona adyacente a este motivo). El primer ion  $\text{Ag}^{+1}$  está coordinado por los residuos aminoácidos Met195, Met354 y **Met391**, el segundo sitio de unión del ion  $\text{Ag}^{+1}$  está formado por los residuos aminoácidos Met192, **Met296** y Met355 y por último el tercer sitio de unión  $\text{Ag}^{+1}$  se compone de los residuos aminoácidos **Met292, Met301, His303 y Met305** (Los aminoácidos pertenecientes a la horquilla- $\beta$  y que coordinan a los 3 iones de plata están resaltados en negritas en el texto anterior) (Figura 8.4.1 y Figura 8.4.2, Panel D).



**Figura 8.4.1.** Alineamientos de secuencia de dos ejemplos de lacasas de los géneros *Thermus* y *Meiothermus*: *Tth*-MCO y la lacasa de *M. ruber*. Los símbolos muestran los aminoácidos presentes en cada uno de los sitios de coordinación de los tres diferentes sitios de unión a iones de Ag<sup>+1</sup> y el sitio de coordinación a Hg<sup>+1</sup> encontrados en la horquilla-β y zona adyacente de la *Tth*-MCO. Todos estos residuos se encuentran conservados en *M. ruber*.

Hasta el momento, se han realizado diversos intentos por obtener estructuras cristalográficas de la *Tth*-MCO con iones de cobre coordinados en la horquilla-β, modificando el estado de oxidación de los iones al incubar cristales en condiciones oxidantes y reductoras. Sin embargo, no ha sido posible observar densidad electrónica correspondiente a iones de cobre adicionales a los 4 de los sitios activos, a pesar de encontrar residuos de metionina en conformaciones presentes en sitios de unión a iones metálicos.



**Figura 8.4.2.** Mapas de densidad electrónica 2Fo-Fc de la horquilla- $\beta$  con nivel de 1 en RMSD. Los mapas de densidad electrónica y sus correspondientes coordenadas de las estructuras cristalográficas con los códigos de entrada PDB 5K15, 6W2K, 2XVB Y 5AFA se muestran respectivamente en los paneles A, B, C y D.

A diferencia del caso de CueO de *E. coli*, donde la presencia de iones de  $\text{Cu}^{+1}$  y  $\text{Ag}^{+1}$ , permitieron generar la hipótesis de su capacidad como cuprosa oxidasa [89], en *Tth*-MCO ha sido imposible encontrar densidad electrónica correspondiente a nuevos iones de cobre coordinados por horquilla- $\beta$ . Por esta razón, no ha sido posible esclarecer por medios cristalográficos, si la *Tth*-MCO tiene o no actividad de cuproso oxidasa, lo cual podría conferirle alguna función en procesos de detoxificación y homeostasis de cobre, como se ha propuesto para la CueO de *E. coli* [89].

Por lo tanto, se realizó una búsqueda de secuencia primaria de proteínas en las bases de datos disponibles, con la intención de encontrar proteínas que pudieran compartir esta región. De tal manera que de acuerdo con la función reportada en otras enzimas pudiéramos encontrar alguna asociada a la horquilla- $\beta$ . La búsqueda de secuencias en la base de datos permitió obtener 502 secuencias de lacasas de bacterias. Estas secuencias se alinearon y se utilizaron para para construir un árbol filogenético que agrupa las secuencias de acuerdo con su parentesco, organizándolas en clados.

En el cladograma de la Figura 8.5.1 se muestra que la *Tth*-MCO se encuentra en un clado que comparte con 21 lacasas del género *Thermus*. En el grupo más cercano que corresponde al género *Thermus* encontramos secuencias de 15 lacasas del género *Meiothermus*. Un análisis detallado entre las secuencias de ambos géneros permitió localizar la presencia de un lazo en la zona adyacente a la cavidad de entrada del sustrato al T1Cu que corresponde a la misma zona ocupada por la horquilla- $\beta$  en la *Tth*-MCO. Este lazo característico que comparten las secuencias de ambos géneros, no se encuentra en ninguna otra secuencia de las 502 secuencias analizadas y fuera de los géneros *Thermus* y *Meiothermus*. Si bien, las lacasas de *E. coli* y *B. subtilis* tienen algunos motivos estructurales adyacentes a la cavidad de entrada del T1Cu, estos se encuentran situados en regiones diferentes a la ocupada por la horquilla- $\beta$  de la *Tth*-MCO (Figura 8.5.1, Panel B).

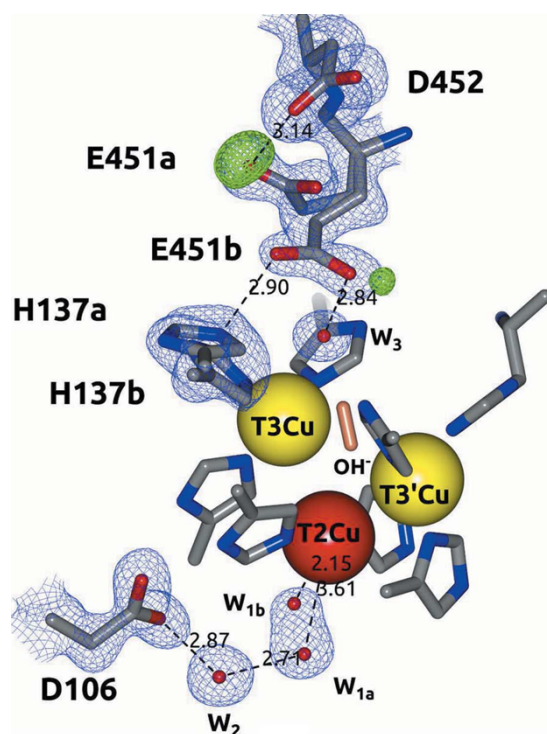
El alineamiento de secuencias de la región correspondiente a la horquilla- $\beta$  entre los géneros *Thermus* y *Meiothermus* resalta los residuos de metionina presentes tanto en la horquilla- $\beta$  de la *Tth*-MCO, como en la zona homóloga de las secuencias de las lacasas del género *Meiothermus* (Figura 8.4.1). Este descubrimiento refuerza la hipótesis de que este motivo podría tener una función adicional a la ya propuesta en este mismo trabajo, función común a otras lacasas del mismo género. Sin embargo, hasta el momento no existe evidencia experimental adicional a nuestro análisis filogenético.





## 8.5 Mecanismo de transferencia de protones en la enzima *Tth*-MCO

Otro aspecto que es importante señalar en la regulación de la actividad enzimática de la *Tth*-MCO es la presencia de un mecanismo de transferencia de protones, propuesto por Serrano-Posada [36] que permite la entrada de los protones. Al respecto, Serrano-Posada propuso que el residuo aminoácido glutamato 451, que se encuentra ubicado a un costado del TNC, es uno de los componentes que regula o participa en este mecanismo como se muestra en la Figura 8.5.1 [36].



**Figura 8.5.1.** Mecanismos de transferencia de electrones propuesto por Serrano-Posada [38]. En la figura se indica la presencia de una doble conformación del Glu451, que es el responsable de recibir el protón en la conformación “a” (densidad electrónica positiva en color verde) proveniente de la superficie y lo entrega en el TNC en la conformación “b”.

En el Glu451 conformación “a” se reportó que conforme se aumentaba la cantidad de radiación depositada en el cristal, se acumula una densidad electrónica positiva que solo se puede justificar en el afinamiento de la estructura con un átomo de hidrogeno, y lo mismo sucede en la conformación “b”, cuando el Glu451 experimenta un cambio conformacional que lo acerca al T3Cu para realizar la entrega del protón en el TNC. Sin embargo, este modelo del mecanismo no

es capaz de explicar cómo es que el protón puede transferirse desde la superficie de la enzima hasta el Glu451, por lo que se diseñó una serie de experimentos con la intención de encontrar más información para entender cómo es que el protón puede trasladarse a través de la enzima para llegar al TNC.

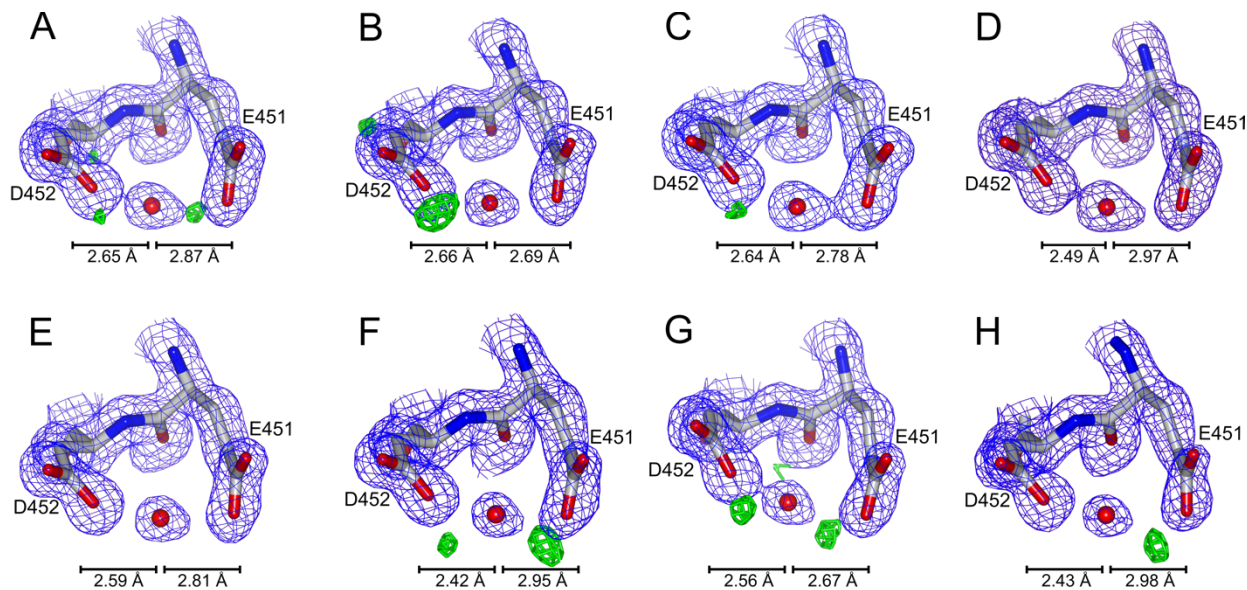
Con el objetivo de entender con mayor detalle el funcionamiento del mecanismo de transferencia de protones se determinaron una serie de estructuras cristalográficas con los códigos de entrada PDB 6Q29, 6WX9, 6WCH, 6WCG, 6WCL, 6WCM, 6WCN y 6WCP. Estas 8 estructuras se obtuvieron a partir de un solo cristal para obtener estructuras con diferente dosis de radiación acumulada. Esta serie de estructuras tiene dosis de radiación depositada que van desde 2.5 hasta 20.67 MGy (Tabla 8.4.1). Todas las estructuras de la serie se resolvieron a 1.7 Å de resolución y en general, solo presentan pequeños cambios en el tamaño de la celda unitaria, así como disminución en la calidad de algunos parámetros estadísticos (Tabla 8.5.1). Lo que si las hace muy diferentes a las estructuras reportadas por Serrano-Posada es el hecho de que, en la serie presentada en esta tesis, el ion de cobre del sitio T3Cu se encuentra escindido, lo que evitaría la translocación del protón al TNC, evidenciando detalles que no habían sido descritos en estructuras previas.

**Tabla 8.5.1.** Radiación depositada por estructura cristalográfica.

Código PDB	Radiación depositada (MGy)
6Q29	2.5
6WX9	5.1
6WCH	7.75
6WCG	10.33
6WCL	12.91
6WCM	15.50
6WCN	18.08
6WCP	20.67

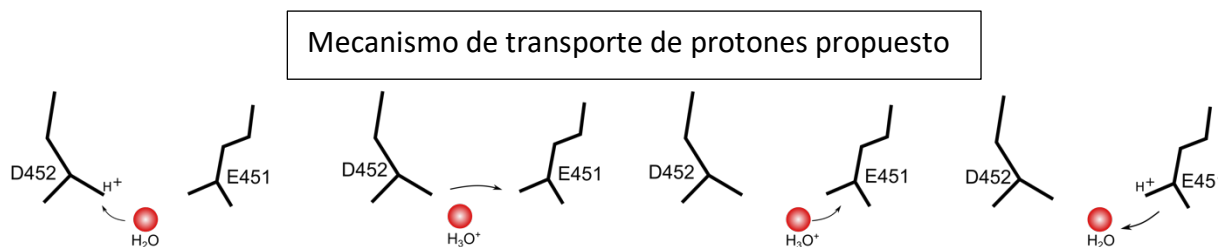
El análisis de las estructuras cristalográficas de esta serie permitió observar una característica única en estructuras cristalográficas de lacasas tanto bacterianas como fúngicas depositadas en el PDB, ya que solamente se observa densidad electrónica para los sitios de unión a cobre T1Cu y T3'Cu, esta característica da como resultado la estructura cristalográfica de una enzima semi-ocupada por sus respectivos iones de cobre. Lo anterior permitió evidenciar detalles que pudieran representar etapas en el mecanismo de transferencia de protones hacia el TNC, ya que, hasta el momento, si bien se ha demostrado la importancia de aminoácidos relacionados con este mecanismo de transporte de protones, solo existen evidencia experimental de la función de residuos de aminoácidos conservados en la posición del Glu451 de la *Tth*-MCO y no sobre como este protón llegó a este residuo.

Como consecuencia de la falta del ion de cobre en el sitio T3Cu, se pudo identificar la presencia de una densidad electrónica positiva en un mapa Fo-Fc en el átomo O $\delta$ 1 del residuo de Glu451, como lo propone el modelo previamente reportado. Sin embargo, también se evidenció la presencia de una densidad electrónica positiva en la cadena lateral del residuo Asp452. Lo anterior se puede observar en la Figura 8.5.2, panel A que corresponde a la estructura con el código 6Q29 con una radiación acumulada calculada de 2.5 MGy. En esta misma figura se puede ver una molécula de H<sub>2</sub>O que se encuentra equidistante del O $\delta$ 1 del Glu451 y del O $\epsilon$ 1 del Asp452, formando un puente de hidrógeno entre ellos. Cuando la dosis de radiación depositada aumenta a 5.1 MGy, aparece un pico de densidad electrónica positiva, en un mapa Fo-Fc, a 1.28Å del O $\epsilon$ 1 del residuo Asp452; este pico desaparece cuando la dosis de radiación depositada es 7.75 MGy y la densidad electrónica del mapa Fo-Fc claramente se comparte entre la molécula de H<sub>2</sub>O y el O $\delta$ 1 del residuo Glu451. Cuando la dosis de radiación depositada llega a 10.3 MGy, las coordenadas de los residuos Glu451, Asp452 y la molécula de H<sub>2</sub>O, se encuentran nuevamente en la posición en la que estaban en la estructura con 2.5 MGy, correspondiente a la primera medición de esta serie. Al incrementar la dosis de radiación depositada a 18.08 MGy, la molécula de H<sub>2</sub>O se acerca al residuo Asp452, mientras que cuando la dosis de radiación depositada llega a 20.67 MGy, la molécula de H<sub>2</sub>O regresa a una posición equidistante entre el O $\delta$ 1 del Glu451 y el O $\epsilon$ 1 del residuo Asp452 (Figura 8.5.2).



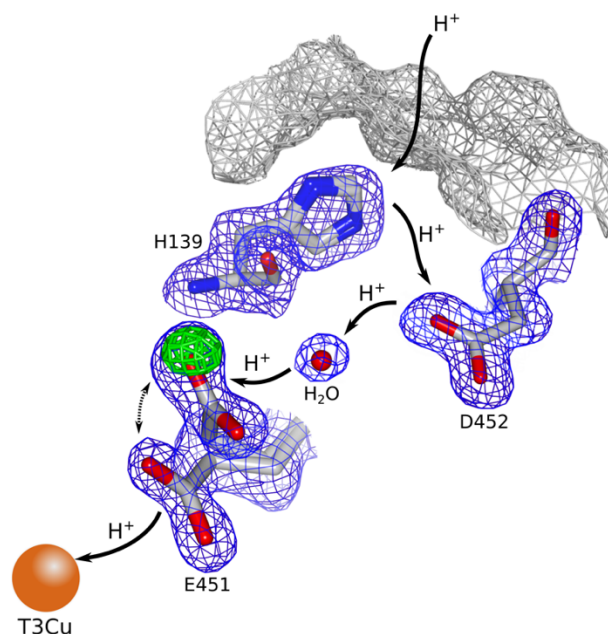
**Figura 8.5.2.** Efecto de la dosis de radiación depositada en la densidad electrónica y las coordenadas de los residuos aminoácidos Glu451 y Asp452 de *Tth*-MCO. Paneles A-H representan la dosis de radiación acumulada 2.58, 5.16, 7.75, 10.33, 12.91, 15.50, 18.00 y 20.67 MGy respectivamente. Los mapas 2Fo-Fc están representados a 1 rmsd (azul), el mapa Fo-Fc está representado a +3.5 rmsd (verde) y -3.5 rmsd (rojo) sin embargo no existen densidades negativas en esta región.

Estos cambios causados por la reducción química, producto de la dosis de radiación depositada, parecen describir un mecanismo de transporte de protones en el cual el protón es transferido entre los residuos aminoácidos Glu451 y Asp452 a través de una molécula de H<sub>2</sub>O. Este mecanismo, de ser cierto, sería esencial para que se presente la actividad de lacasa en la *Tth*-MCO (Figura 8.5.3).



**Figura 8.5.3.** Diagrama general del mecanismo de transporte de protones propuesto para la *Tth*-MCO.

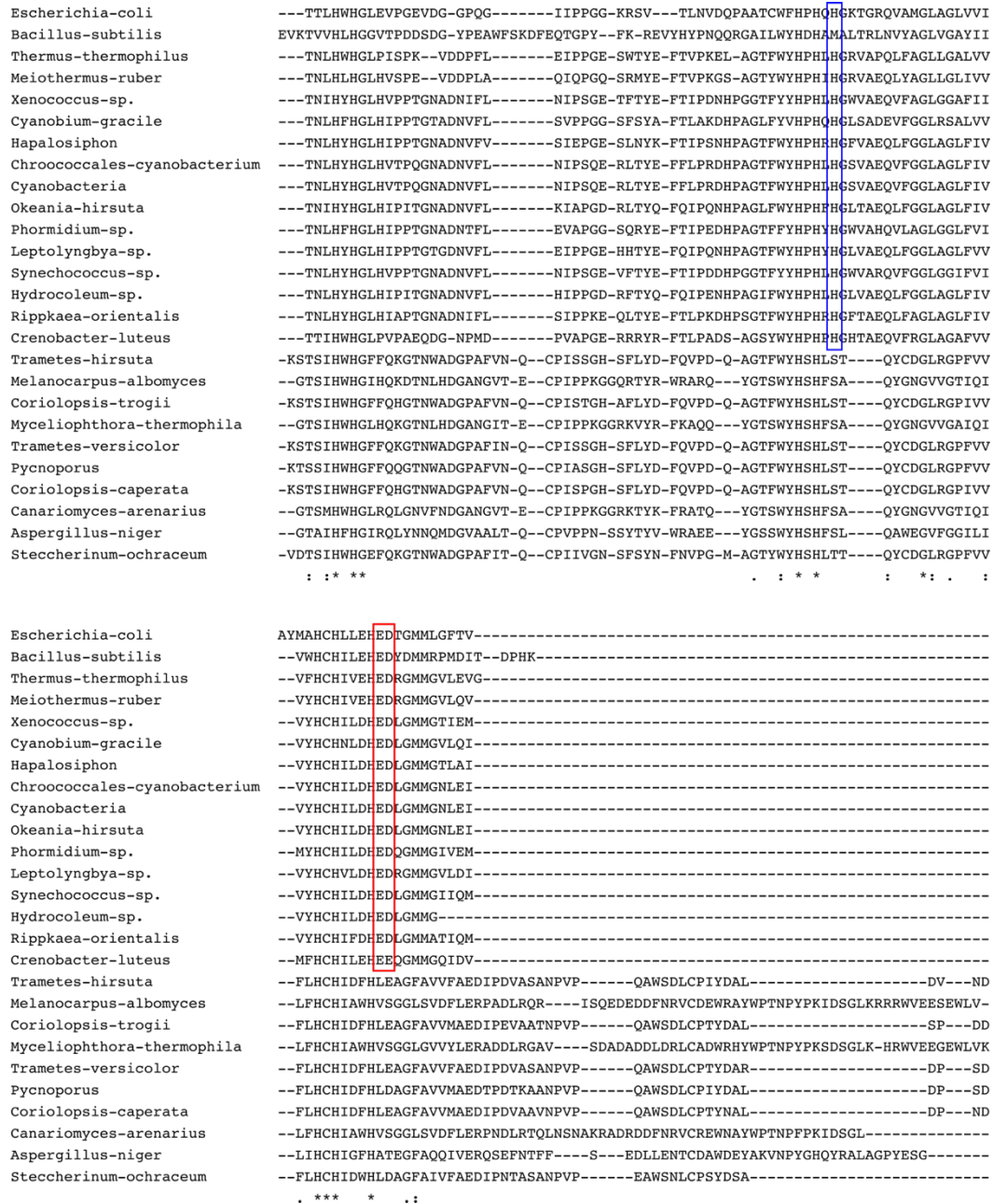
Sin embargo, ninguno de los residuos de Glu451 o Asp452 están expuestos al solvente, por lo tanto, son incapaces de tomar los protones desde el disolvente, por lo que se propone el residuo His139, por su posición en la estructura de la *Tth*-MCO, como el responsable de capturar protones desde el disolvente para entregar este protón al residuo Asp452 que lo transfiere al residuo Glu451 mediante una molécula de H<sub>2</sub>O utilizando el mecanismo propuesto por Grotthuss (Figura 8.5.4) [90].



**Figura 8.5.4.** Mecanismo de transferencia de electrones propuesto para la *Tth*-MCO.

De manera adicional, se analizaron 26 secuencias primarias de lacasas de bacterias y de hongos, para determinar cuáles de los aminoácidos propuestos en este mecanismo de transporte de protones se encuentran conservados. Los resultados del alineamiento de secuencias de 16 secuencias de lacasas de bacterias y 10 secuencias de lacasas de hongos, muestran que los residuos aminoácidos His139, Glu451 y Asp452 se encuentran conservados en todas las secuencias de bacterias analizadas, mientras que en las secuencias de hongos solo se conserva en el 50% de las secuencias la presencia de un aminoácido de carga negativa en la posición equivalente al Asp452 de *Tth*-MCO (Figura 8.5.5). Por lo anterior, es probable pensar que este mecanismo de transporte de electrones se encuentra conservado en la secuencia de al menos 16 lacasas bacterianas tomadas al azar de la base de datos de Uniprot. De comprobarse esta

hipótesis, este mecanismo de transporte de protones podría explicar al menos parcialmente, las particularidades de las lacasas bacterianas, cuando son comparadas con las de origen fúngico.



**Figura 8.4.5.** Alineamiento de secuencias de 26 lacasas de bacterias y hongos. En el recuadro azul se indica las secuencias en las que se encuentra conservados los residuos de aminoácido histidina 139 y en rojo aquellas secuencias en las que se conservan los residuos de aminoácidos glutamato y aspartato de la posición 451 y 452 respectivamente en la enzima *Tth*-MCO.

## 9. CONCLUSIONES

En este trabajo se propone el motivo horquilla- $\beta$  de la *Tth*-MCO como un elemento regulador para la actividad lacasa de esta enzima, al presentar diferentes conformaciones que dan como resultado la modificación de la superficie expuesta en la cavidad de entrada al T1Cu. Adicionalmente, se propone que los cambios conformacionales de la horquilla- $\beta$  de la *Tth*-MCO son un proceso dependiente de pH, ya que se tiene evidencia de que los cambios en el pH pueden modificar las cargas de la superficie electrostática de la proteína en la región adyacente a este motivo, y tanto las estructuras cristalográficas como las dinámicas moleculares realizadas y descritas en esta tesis apoyan esta propuesta.

Por otro lado, la horquilla- $\beta$  de la *Tth*-MCO podría tener una función adicional relacionada con la unión a metales, ya que se sabe que puede coordinar iones de  $Hg^{+1}$  y  $Ag^{+1}$ . Al menos en el último caso, esta coordinación no parece tener efecto sobre la actividad de lacasa. Sin embargo, la razón por la que *la Tth*-MCO es capaz de coordinar a otros metales en su horquilla- $\beta$  y zonas vecinas, es aún desconocida. Un análisis de la cantidad, posición y orientación de las metioninas presentes en esta área, hacen dudar que esto sea un fenómeno azaroso, pero es necesario más investigación para aclarar su papel dentro de la función biológica de *Tth*-MCO.

Experimentos de acumulación de dosis de radiación depositada en cristales de *Tth*-MCO, realizados en este trabajo, permitieron describir características adicionales que podrían representar un mecanismo de transporte de protones. Este mecanismo implicaría un proceso de transferencia de protones muy diferente al que podría presentarse en lacasa fúngicas. Este mecanismo fue inicialmente propuesto por Serrano-Posada [38], el cual incluye la participación del residuo Glu451 como el elemento que permite la entrada de protones al TNC. Sin embargo, esta propuesta no explicaba como este protón llega desde el exterior de la enzima, en este trabajo se proponen nuevos componentes en el mecanismo de transferencia de protones, entre los que destacan los residuos Asp452, His139 y una molécula de  $H_2O$ . En esta ampliación de la propuesta inicial, el residuo His139 es el responsable de la captura de protones desde el

disolvente, y posteriormente entrega el protón al residuo Asp452. El siguiente paso consistiría en el transporte del protón desde el residuo Asp452 hasta el Glu451, usando el mecanismo de transporte de protones propuesto por Grotthuss [90], el cual ha sido ya descrito por cálculos de dinámica molecular en sistemas biológicos [91]. Esta propuesta está basada en las observaciones de 8 estructuras cristalográficas obtenidas de un mismo cristal expuesto a diferentes dosis de radiación depositada, en el cual no se encontraban los cobres T2 y T3. Además, este mecanismo de transferencia de protones al TNC parece que no es exclusivo de la *Tth*-MCO, ya que un análisis de secuencias de 16 lacasas de bacterias y 10 lacasas de hongos mostró que los residuos de aminoácidos listados arriba son comunes en todas las secuencias de lacasas bacterianas analizadas, no así en las de hongos. La presencia de estos residuos de aminoácidos conservados podría explicar, al menos parcialmente, la baja actividad de lacasa presente en las MCO de bacterias descritas a la fecha.



## 10. PERSPECTIVAS

Realizar experimentos de RMN para analizar a mayor detalle la componente de la horquilla- $\beta$  con cambios en el pH del medio.

Realizar las mutantes de la His139, Glu451 y una doble mutante para confirmar su participación en el proceso de transferencia de protones propuesto en esta tesis, buscando mejorar la eficiencia catalítica de la enzima retirando el sistema regulador de entrada de protones al TNC en la *Tth*-MCO.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Miyazaki, K. (2005) A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles*. 9, 415–425. DOI: 10.1007/s00792-005-0458-z
- 2 Chauhan, P.S., Goradia, B. y Saxena, A. (2017) Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *Biotech*. 7(5): 323. DOI: 10.1007/s13205-017-0955-7.
- 3 Oshima T. y Imahori K. (1974) Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1(24): 102-112. DOI.org/10.1099/00207713-24-1-102
- 4 Henne A., Brüggemann H., Raasch C., Wiezer A., Hartsch T., Liesegang H., Johann A., Lienard T., Gohl O., Martinez-Arias R., Starkuviene V., Schlenczeck S., Dencker S., Huber R., Klenk H-P., Kramer W., Merkl R., Gottschalk G. & Fritz H-J. (2004) The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat. Biotechnol*. 22, 547–553. DOI: 10.1038/nbt956
- 5 Bulkley D., Johnson F. y Steitz T.A., (2012) The antibiotic thermorubin inhibits protein synthesis by binding to inter-subunit bridge B2a of the ribosome. *J. Mol. Biol*. 416(4): 571-578. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.12.055
- 6 Neubauer C., Gillet R., Kelley A.C. y Ramakrishnan V. (2012) Decoding in the absence of a codon by tmRNA and SmpB in the ribosome. *Science*. 335(6074): 1366-1369. DOI: 10.1126/science.1217039
- 7 Schmeing T.M., Voorhees R.M., Kelley A.C., y Ramakrishnan V. (2011) How mutations in tRNA distant from the anticodon affect the fidelity of decoding. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 18(4): 432-436. DOI: 10.1038/nsmb.2003
- 8 Van den Burg B. (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Opin. Microbiol*. 6(3): 213-218. DOI: 10.1016/s1369-5274(03)00060-2
- 9 Atomi H., Sato T., y Kanai T. (2011) Application of hyperthermophiles and their enzymes. *Curr. Opin. Biotechnol*. 22, 618–626. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.06.010
- 10 Vieille C. y Zeikus G.J. (2001) Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 65, 1–43. DOI: 10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001
- 11 Russell, R.J.M., Ferguson J.M.C., Hough D.W., Danson M.J. y Taylor G.L. (1997) The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*.36(33): 9983-9994. DOI: 10.1021/bi9705321
- 12 Hough D.W. y Danson M.J. (1999) Extremozymes. *Curr. Opin. Chem. Biol*. 3(1): 39-46. DOI:

10.1016/S1367-5931(99)80008-8

13 Demirjian D.C., Morís-Varas, F. y Cassidy C.S. (2001) Enzymes from extremophiles. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5(2): 144–151. DOI: 10.1016/s1367-5931(00)00183-6

14 Kennedy M.L., y Gibney B.R. (2001) Metalloprotein and redox protein design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11(4): 485-90. DOI: 10.1016/s0959-440x(00)00237-2

15 Reid B.G. y Flynn G.C. (1997) Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry.* 36(22): 6786-91. DOI: 10.1021/bi970281w

16 Degtyarenko K. (2005) Metalloproteins. In *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics.* DOI: 10.1002/047001153X.g306204

17 Enguita F.J. (2011) Structural biology of fungal multicopper oxidases. In *Mycofactories.* EBSCO. P.P.:57–72. DOI: 10.2174/978160805223311101010057

18 Bond A.M. (1994) Chemical and electrochemical approaches to the investigation of redox reactions of simple electron transfer metalloproteins. *Inorganica Chim Acta.* 226(1): 293-340. DOI: 10.1016/0020-1693(94)04082-6

19 Solomon E.I., Sundaram U.M. y Machonkin T.E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96(7): 2563-2606. DOI: 10.1021/cr950046o

20 Zerva A., Simić S., Topakas E. y Nikodinovic-Runic J., (2019) Applications of microbial laccases: Patent review of the past decade (2009–2019). *Catalysts* 9(12):1023. DOI: 10.3390/catal9121023

21 Rivera-Hoyos C.M., Morales-Álvarez E.D., Poutou-Piñales R.A., Pedroza-Rodríguez A.M., Rodríguez-Vázquez R. y Delgado-Boada J.M. (2013) Fungal laccases. *Fungal Biol. Rev.* 27, 67–82. DOI: 10.1016/j.fbr.2013.07.001

22 Baldrian P. (2006) Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 215–242. DOI: 10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x

23 Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J y Boerjan W. (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* 153(3): 895-905. DOI: 10.1104/pp.110.155119

24 Janusz G., Pawlik A., Sulej J., Świdorska-Burek U., Jarosz-Wilkolazka A. y Paszczyński A. (2017) Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 41(6): 941-962. DOI: 10.1093/femsre/fux049

25 Castro-Sowinski S., Martinez-Drets G. y Okon Y. (2002) Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209(1):119-25. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11119.x

26 Drewnowska J.M., Zambrzycka M., Kalska-Szostko B., Fiedoruk K. y Swiecicka I. (2015)

Melanin-like pigment synthesis by soil *Bacillus weihenstephanensis* isolates from Northeastern Poland. PLoS One. 10(4). 10.1371/journal.pone.0125428. DOI: 10.1371/journal.pone.0125428

27 Bertrand T., Jolival C., Briozzo P., Caminade E., Joly N., Madzak C. y Mougin C. (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. Biochemistry. 41, 7325–7333. DOI: 10.1021/bi0201318

28 Viswanath B., Rajesh B., Janardhan A., Kumar A.P. y Narasimha G. (2014) Fungal laccases and their applications in bioremediation. Enzyme Res. 2014(8): 1-21. DOI: 10.1155/2014/163242

29 Strong P.J. y Claus H. (2011) Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. Crit Rev. Environ. Sci. Technol. 41(4): 373-434. DOI: 10.1080/10643380902945706

30 Chandra R. y Chowdhary P. (2015) Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. Environ. Sci. Process. Impacts. 17(2): 326-342. DOI: 10.1039/c4em00627e

32 Ferraroni M., Myasoedova N.M., Schmatchenko V., Leontievsky A.A., Golovleva L.A., Scozzafava A. y Briganti F. (2007) Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. BMC Struct. Biol. 7, 60. DOI: 10.1186/1472-6807-7-60

31 Dzaugis M.E., Spivack A.J. y D'Hondt S. (2015) A quantitative model of water radiolysis and chemical production rates near radionuclide-containing solids. Radiat Phys Chem 115, 127–134. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2015.06.011

32 Polyakov K.M., Gavryushov S., Fedorova T.V., Glazunova O.A. y Popov A.N. (2019) The subatomic resolution study of laccase inhibition by chloride and fluoride anions using single-crystal serial crystallography: insights into the enzymatic reaction mechanism. Acta Crystallogr. D. Struct. Biol. 75(9): 804-816. DOI: 10.1107/S2059798319010684

33 De La Mora E., Lovett J.E., Blanford C.F., Garman E.F., Valderrama B. y Rudino-Pinera E. (2012) Structural changes caused by radiation-induced reduction and radiolysis: The effect of X-ray absorbed dose in a fungal multicopper oxidase. Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr 68(5): 564–577. DOI: 10.1107/S0907444912005343

34 Pérez-Henarejos S.A., Alcaraz L.A. y Donaire A. (2015) Blue Copper Proteins: A rigid machine for efficient electron transfer, a flexible device for metal uptake. Arch. Biochem. Biophys. 584: 134-148. DOI: 10.1016/j.abb.2015.08.020

35 Claus H. (2004) Laccases: Structure, reactions, distribution. Micron. 35: 93–96. DOI: 10.1016/j.micron.2003.10.029

36 Serrano-Posada H., Centeno-Leija S., Rojas-Trejo S.P., Rodríguez-Almazán C., Stojanoff V. y Rudiño-Piñera E. (2015) X-ray-induced catalytic active-site reduction of a multicopper oxidase: Structural insights into the proton-relay mechanism and O<sub>2</sub>-reduction states. Acta Crystallogr.

Sect. D. Biol. Crystallogr. 71, 2396–2411. DOI: 10.1107/s1399004715018714

37 Ferraroni M., Matera I., Chernykh A., Kolomytseva M., Golovleva L.A., Scozzafava A. y Briganti F. (2012) Reaction intermediates and redox state changes in a blue laccase from *Steccherinum ochraceum* observed by crystallographic high/low X-ray dose experiments. *J. Inorg. Biochem.* 11:203-209. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2012.01.011

38 Polyakov K.M., Gavryushov S., Ivanova S., Fedorova T. V., Glazunova O.A., Popov A.N. y Koroleva O. V. (2017) Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: Insights into the reaction mechanism. *Acta Crystallogr. Sect. D. Struct. Biol.* 73(5): 388-401. DOI: 10.1107/S2059798317003667

39 Fernandes A.T., Soares C.M., Pereira MM, Huber R., Grass G. y Martins L.O. (2007) A robust metallo-oxidase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *FEBS J.* 274(11): 2683–2694. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05803.x

40 Martins L.O., Soares C.M., Pereira M.M., Teixeira M., Costa T., Jones G.H. y Henriques A.O. (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* 277(21), 18849–18859. DOI: 10.1074/jbc.M200827200

41 Liu X., Gillespie M., Ozel A.D., Dikici E., Daunert S. y Bachas L.G. (2011) Electrochemical properties and temperature dependence of a recombinant laccase from *Thermus thermophilus*. *Anal. Bioanal. Chem.* 399(1): 361–366. DOI: 10.1007/s00216-010-4345-9

42 Kataoka K., Sugiyama R., Hirota S., Inoue M., Urata K., Minagawa Y, Seo D. y Sakurai T. (2009) Four-electron reduction of dioxygen by a multicopper oxidase, CueO, and roles of Asp112 and Glu506 located adjacent to the trinuclear copper center. *J. Biol. Chem.* 284(21): 14405-14413. DOI: 10.1074/jbc.M808468200

43 Augustine A.J., Quintanar L., Stoj C.S., Kosman D.J. y Solomon E.I. (2007) Spectroscopic and kinetic studies of perturbed trinuclear copper clusters: The role of protons in reductive cleavage of the O-O bond in the multicopper oxidase Fet3p. *J. Am. Chem. Soc.* 129(43): 13118-13126. DOI: 10.1021/ja073905m

44 Durão P., Bento I., Fernandes A.T., Melo EP., 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. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11(4): 514-526. DOI: 10.1007/s00775-006-0102-0

45 Blake, C.C.F. y Phillips, D.C. Effects of X-irradiation on single crystals of myoglobin. In *Biological Effects of Ionizing Radiation at the Molecular Level*; International Atomic Energy Agency: Vienna, Austria, 1962; pp. 183–191

46 Garman E.F. (2013) Radiation damage in macromolecular crystallography: What is it and why do we care? *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66(4): 339–351. DOI: 10.1107/S0907444910008656

- 47 Takeda K., Kusumoto K., Hirano Y. y Miki K. (2010) Detailed assessment of X-ray induced structural perturbation in a crystalline state protein. *J. Struct. Biol.* 169(2): 135–144. DOI: 10.1016/j.jsb.2009.09.012
- 48 Garman E.F. y Weik M. (2015) Radiation damage to macromolecules: Kill or cure? In *Journal of Synchrotron Radiation*. 22(2):195–200. DOI: 10.1107/S160057751500380X
- 49 Weik M., Ravelli R.B.G., Kryger G., McSweeney S., Raves M.L., Harel M., Gros P., Silman I., Kroon J. y Sussman J.L. (2000) Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(2):623-628. DOI: 10.1073/pnas.97.2.623
- 50 Murphy F. (2019) Estrategias para preservar los puentes disulfuro en cristales de lisozima de clara de huevo de *Gallus gallus*. Tesis Doctoral. [https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB\\_UNAM/TES01000790696](https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000790696)
- 51 Allan E.G., Kander M.C., Carmichael I. y Garman E.F. (2013) To scavenge or not to scavenge, that is STILL the question. *J. Synchrotron Radiat.* 20(1): 23-36. DOI: 10.1107/S0909049512046237
- 52 Kobayashi K. (2019) Pulse radiolysis studies for mechanism in biochemical redox reactions. *Chem Rev.* 119(6): 4413-4462. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00405
- 53 Denisov I.G., Victoria D.C. y Sligar S.G. (2007) Cryoradiolytic reduction of heme proteins: Maximizing dose-dependent yield. *Radiat. Phys. Chem.* 76(4): 714-721. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2006.03.002
- 54 Sato D., Shiba T., Karaki T., Yamagata W., Nozaki T., Nakazawa T. y Harada S. (2017) X-Ray snapshots of a pyridoxal enzyme: A catalytic mechanism involving concerted [1,5]-hydrogen sigmatropy in methionine  $\gamma$ -lyase. *Sci. Rep.* 7(4874): 1-10. DOI: 10.1038/s41598-017-05032-6
- 55 Horrell S., Antonyuk S.V., Eady R.R., Hasnain S.S., Hough M.A. y Strange R.W. (2016) Serial crystallography captures enzyme catalysis in copper nitrite reductase at atomic resolution from one crystal. *IUCrJ.* 15(3):271.281. DOI: 10.1107/S205225251600823X
- 56 Vranken W.F. (2014) NMR structure validation in relation to dynamics and structure determination. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 82: 27-38. DOI: 10.1016/j.pnmrs.2014.08.001
- 57 Bala S., Shinya S., Srivastava A., Ishikawa M., Shimada A., Kobayashi N., Kojima C., Tama F., Miyashita O. y Kohda D. (2020) Crystal contact-free conformation of an intrinsically flexible loop in protein crystal: Tim21 as the case study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1864(2): 129418. DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.129418
- 58 Klepeis J.L., Lindorff-Larsen K., Dror R.O. y Shaw D.E. (2009) Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19(2): 120-127. DOI: 10.1016/j.sbi.2009.03.004

- 59 Gu Y., Li D.W. y Brünschweiler R. (2015) Decoding the mobility and time scales of protein loops. *J. Chem. Theory Comput.* 11(3): 1208-1314. DOI: 0.1021/ct501085y
- 60 John K.S. (2017) Review paper: The shape of phylogenetic treespace. In *Systematic Biology*. 66(1): 83-94. DOI: 10.1093/sysbio/syw025
- 61 Yang Z. y Rannala B. (2012) Molecular phylogenetics: Principles and practice. *Nat. Rev. Genet.* 13(5): 303-314. DOI: 10.1038/nrg3186
- 62 C. H.J. y Scott F. (2009) *Evolutionary analysis*, Fifth Edition. Boston. Pearson
- 63 Lin Y. y Lloyd P.M. (2006) An enzyme kinetics experiment using laccase for general chemistry. *J Chem Educ.* 83(4): 638-640. DOI: 10.1021/ed083p638
- 64 Battye, T. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R., y Leslie, A. G. (2011). iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta crystallogr. Section D, Biol crystallogr*, 67(4):271–281. DOI: 10.1107/S0907444910048675
- 65 Kabsch W. (2010) Xds. *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 66(2):125–132. DOI: 0.1107/S0907444909047337
- 66 McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C. y Read R.J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40(2): 658-674. DOI: 10.1107/S0021889807021206
- 67 Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A., Pannu N.S., Steiner R.A., Nicholls R.A., Winn M.D., Long F. y Vagin A.A. (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr Sect. D. Biol. Crystallogr.* 67: 355-367. DOI: 10.1107/S0907444911001314
- 68 Emsley P. y Cowtan K. (2004) Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 60(12): 2126-2132. DOI: 10.1107/S0907444904019158
- [69] Adams P.D., Afonine P.V., Bunkóczi G., Chen V.B., Davis I.W., Echols N., Headd J.J., Hung L.W., Kapral G.J., Grosse-Kunstleve R.W., McCoy A.J., Moriarty N.W., Oeffner R., Read R.J., Richardson D.C., Richardson J.S., Terwilliger T.C. y Zwart P.H. (2010) PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 66(2): 213-221. DOI: 10.1107/S0907444909052925
- 70 Brünger A.T. (1997) Free R value: Cross-validation in crystallography. *Methods Enzymol.* 277: 366-396. DOI: 10.1016/S0076-6879(97)77021-6
- 71 Minor W., Cymborowski M., Otwinowski Z. y Chruszcz M. (2006) HKL-3000: The integration of data reduction and structure solution - From diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 62(8): 859-866. DOI: 10.1107/S0907444906019949
- 72 Evans P.R. (2011) An introduction to data reduction: Space-group determination, scaling and

intensity statistics. *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 67(4): 282-292. DOI: 10.1107/S090744491003982X

73 Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. y Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17), 3389–3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389

74 Altschul S.F., Wootton J.C., Gertz E.M., Agarwala R., Morgulis A., Schäffer A.A. y Yu Y.K. (2005) Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* 272(20): 5101-5109. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x

75 Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., Mcgettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. y Higgins D.G (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23(21): 2947-2948. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm404

76 Chernomor O., Von Haeseler A. y Minh B.Q. (2016) Terrace Aware Data Structure for Phylogenomic Inference from Supermatrices. *Syst. Biol.* 65(6): 997-1008. DOI: 10.1093/sysbio/syw037. Epub 2016 Apr 26

77 Olsson MHM., SØndergaard C.R., Rostkowski M. y Jensen J.H. (2011) PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical p K a predictions. *J. Chem. Theory Comput.* 7(2): 525-537. DOI: 10.1021/ct100578z

78 Banks J.L., Beard H.S., Cao Y., Cho A.E., Damm W., Farid R., Felts A.K., Halgren T.A., Mainz D.T., Maple J.R., Murphy R., Philipp D.M., Repasky M.P., Zhang L.Y., Berne B.J., Friesner R.A., Gallicchio E. y Levy R.M. (2005) Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). *J Comput Chem.* 26(16): 1752-80. DOI: 10.1002/jcc.20292

79 Hu L., Farrokhnia M., Heimdal J., Shleev S., Rulíšek L. y Ryde U. (2011) Reorganization energy for internal electron transfer in multicopper oxidases. *J. Phys. Chem. B.* 115: 13111-13126. DOI: 10.1021/jp205897z

80. Avelar M., Pastor N., Ramírez-Ramírez J. y Ayala M. (2018). Replacement of oxidizable residues predicted by QM-MM simulation of a fungal laccase generates variants with higher operational stability. *J. Inorg. BioChem.* 178: 125-133. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.10.007

81 Serrano-Posada H., Valderrama B., Stojanoff V. y Rudiño-Piñera E. (2011) Thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of apo and holo forms. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst. Commun.* 67(12): 1595–1598. DOI: 10.1107/S174430911103805X

82 Unsworth L.D., Van Der Oost J. y Koutsopoulos S. (2007) Hyperthermophilic enzymes - Stability, activity and implementation strategies for high temperature applications. *FEBS J.* 174(16): 4044-4056. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05954.x



- 83 Schneider B., Gelly J.C., De Brevern A.G. y Černý J. (2014) Local dynamics of proteins and DNA evaluated from crystallographic B factors. *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 70(9): 2413-2419. DOI: 10.1107/S1399004714014631
- 84 Papaleo E., Saladino G., Lambrughì M., Lindorff-Larsen K., Gervasio F.L. y Nussinov R. (2016) The Role of Protein Loops and Linkers in Conformational Dynamics and Allostery. *Chem. Rev.* 116(11): 6391-6423. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b0062
- 85 Xu Y., Wang S., Hu Q., Gao S., Ma X., Zhang W., Shen Y., Chen F., Lai L. y Pei J. (2018) CavityPlus: A web server for protein cavity detection with pharmacophore modelling, allosteric site identification and covalent ligand binding ability prediction. *Nucleic Acids Res.* 46: 374-379. DOI: 10.1093/nar/gky380
- 86 Li H., Robertson A.D. y Jensen J.H. (2005) Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK<sub>a</sub> values. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 61(4): 704-721. DOI: 10.1002/prot.20660
- 87 Søndergaard C.R., Olsson M.H.M., Rostkowski M. y Jensen J.H. (2011) Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pK<sub>a</sub> values. *J Chem Theory Comput.* 12(7): 2284-2295. DOI: 10.1021/ct200133y
- 88 Bello M., Valderrama B., Serrano-Posada H. y Rudiño-Piñera E. (2012) Molecular Dynamics of a Thermostable Multicopper Oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: Structural Differences between the Apo and Holo Forms. *Plos One.* 7(7): e40700. DOI: 10.1371/journal.pone.0040700
- 89 Singh S.K., Roberts S.A., McDevitt S.F., Weichsel A., Wildner G.F., Grass G.B., Rensing C. y Montfort W.R. (2011) Crystal structures of multicopper oxidase CueO bound to copper(I) and silver(I): Functional role of a methionine-rich sequence. *J. Biol. Chem.* 286(43): 37849-37857. DOI: 10.1074/jbc.M111.293589
- 90 de Grotthuss, C.J.T. (1806). "Sur la décomposition de l'eau et des corps qu'elle tient en dissolution à l'aide de l'électricité galvanique". *Ann. Chim.* 58: 54-73
- 91 Swanson J.M.J., Maupin C.M., Chen H., Petersen M.K., Xu J., Wu Y. y Voth G.A. (2007) Proton solvation and transport in aqueous and biomolecular systems: Insights from computer simulations. *J. Phys. Chem. B.* 111(17): 4300-4014. DOI: 10.1021/jp070104x



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Structural Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jysbi](http://www.elsevier.com/locate/jysbi)

## The $\beta$ -hairpin from the *Thermus thermophilus* HB27 laccase works as a pH-dependent switch to regulate laccase activity

R. Miranda-Blancas<sup>a,b</sup>, M. Avelar<sup>c</sup>, A. Rodriguez-Arteaga<sup>d</sup>, A. Sinicropi<sup>c,e,f</sup>, E. Rudiño-Piñera<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 2001 Universidad Av., Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

<sup>b</sup> Instituto de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 1001 Universidad Av., Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

<sup>c</sup> Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy, University of Siena, 53100 Siena, Italy

<sup>d</sup> Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 2001 Universidad Av., Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

<sup>e</sup> Institute of Chemistry of Organometallic Compounds (CNR-ICCOM), Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino, Italy

<sup>f</sup> CSGI, Consorzio per lo Sviluppo dei Sistemi a Grande Interfase, 50019 Sesto Fiorentino, Italy

### ARTICLE INFO

Edited by Bauke Dijkstra

#### Keywords:

Laccase  
*Thermus thermophilus*  
 $\beta$ -Hairpin  
Molecular dynamics  
Multi-copper oxidase

### ABSTRACT

The multi-copper oxidase from the hyper-thermophilic bacteria *Thermus thermophilus* (*Tth*-MCO), has been previously characterized and described as an example of a laccase with low catalytic properties, especially when it is compared with the activity of fungal laccases, but it is active at high temperatures. Structurally, *Tth*-MCO has a unique feature: a  $\beta$ -hairpin near the T1Cu site, which is not present in any other laccases deposited at the PDB. This  $\beta$ -hairpin has an expected crystallographic behavior in solvent-exposed areas of a crystallized protein: lack of electron density, high B-values and several crystalline contacts with neighboring crystallographic copies; however, its dynamical behavior in solution and its biological implications have not been described. Here, we describe four new *Tth*-MCO crystallographic structures, and the  $\beta$ -hairpin behavior has been analyzed by molecular dynamics simulations, considering the effect of pH and temperature. The  $\beta$ -hairpin new crystallographic conformations described here, together with their dynamics, were used to understand the pH-restrained laccase activity of *Tth*-MCO against substrates as syringaldazine. Remarkably, there are insertions in laccases from *Thermus* and *Meiothermus* genus, sharing the same position and a methionine-rich composition of the *Tth*-MCO  $\beta$ -hairpin. This unique high methionine content of the *Tth*-MCO  $\beta$ -hairpin is responsible to coordinate,  $\text{Ag}^{+1}$  and  $\text{Hg}^{+1}$  in oxidative conditions, but  $\text{Cu}^{+1}$  and  $\text{Cu}^{+2}$  are not coordinated in crystallographic experiments, regardless of the redox conditions; however,  $\text{Ag}^{+1}$  addition does not affect *Tth*-MCO laccase activity against syringaldazine. Here, we propose that the pH-dependent  $\beta$ -hairpin dynamical behavior could explain, at least in part, the inefficient laccase activity displayed by *Tth*-MCO in acidic pH values.

### 1. Introduction

Laccases are enzymes that belong to the family of multi-copper oxidases (MCO), which are widely distributed in nature as they are found in fungi, plants, bacteria and insects (Berthet et al., 2012; Brijwani et al., 2010; Chauhan et al., 2017). Laccases carry out the catalysis of a reaction that involves the oxidation of aromatic phenols and methoxyphenols, diamines, aminophenols and hydroxyindoles (Morozova

et al., 2007), with the concomitant reduction of molecular oxygen. Unlike many other oxidoreductases, its reaction does not require cofactors such as NADPH, and unlike peroxidases, laccases do not produce peroxide intermediates which are toxic for their activity (Santhanam et al., 2011).

The enzyme mechanism consists of the reduction of  $\text{O}_2$  in a two-step reaction. The first step began with the oxidation of the substrate, when it gets closer to the T1 access cavity. This T1 site is coordinated almost by

**Abbreviations:** APS, advanced photon source; MD, molecular dynamics; MGy, mega gray; *MrLac*, laccase from *M. ruber*; PDB, protein data bank; RCSB-PDB, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics-Protein Data Bank; SGZ, syringaldazine; TNC, Trinuclear Copper Center; *Tth*-MCO, laccase from *T. thermophilus*; T1Cu, copper-binding site type 1; T2Cu, copper-binding site type 2; T3Cu, copper-binding site type 3.

\* Corresponding author.

E-mail address: [enrique.rudino@ibt.unam.mx](mailto:enrique.rudino@ibt.unam.mx) (E. Rudiño-Piñera).

<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107740>

Received 1 December 2020; Received in revised form 30 April 2021; Accepted 30 April 2021

Available online 5 May 2021

1047-8477/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Table 1**  
X-ray data-collection and refinement statistics. Values in parentheses are for the highest resolution shells.

Parameters	6Q29	6W2K	6TYR	5AFA
<b>Data Collection Statistics</b>				
Space group	P 1 2 <sub>1</sub> 1	P 1 2 <sub>1</sub> 1	C 2 2 2 <sub>1</sub>	C 2 2 2 <sub>1</sub>
Unit-cell parameters	54.53	72.25	61.44	93.71
a (Å)	60.75	96.23	85.38	110.58
b (Å)	76.34	72.29	169.16	96.55
c (Å)	$\alpha = \gamma = 90$	$\alpha = \gamma = 90$	$\alpha = \beta = \gamma$	$\alpha = \beta = \gamma$
$\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ (°)	$\beta = 109.57$	$\beta = 109.57$	90	90
Resolution range (Å)	39.2–1.7 (1.76–1.7)	19.94–2.0 (2.07–2.0)	42.29–1.81 (1.87–1.81)	29.35–2.19 (2.31–2.19)
Number of reflections	168,432 (16158)	202,927 (20371)	75,928 (6444)	105,025 (8509)
Number of unique reflections	51,846 (5143)	64,577 (6545)	39,303 (3426)	25,616 (2182)
Completeness (%)	99.21 (98.44)	97.98 (99.91)	96.38 (85.27)	98.35 (85.10)
Average multiplicity	3.7 (3.6)	3.1 (3.1)	1.9 (1.9)	4.1 (3.9)
I / $\sigma$ (I)	8.8 (2.4)	16.54 (5.59)	25.62 (2.88)	5.1 (3.6)
CC <sub>1/2</sub> (%)	0.99 (0.97)	0.993 (0.89)	0.999 (0.68)	–
R <sub>merge</sub>	0.03 (0.14)	0.06 (0.22)	0.03 (0.34)	0.17(0.29)
Residues per monomer/monomers per asymmetric unit	440/1	439/2	439/1	439/1
<b>Refinement statistics</b>				
Resolution range (Å)	39.2–1.7 (1.76–1.7)	19.94–2.0 (2.07–2.0)	42.29–1.81 (1.87–1.81)	29.35–2.19 (2.31–2.19)
Wilson Plot B-value	11.90	13.53	23.39	16.68
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> (%)	19.7/22.8	14.49/ 19.71	18.1/23.4	14.6/19.4
Protein	3915	8099	3548	3694
Ion/ligand	17	83	36	35
Water	409	882	268	378
Bond lengths (Å)	0.007	0.007	0.007	0.009
Bond angles (°)	0.93	0.91	1.0	1.33
Average B-value (Å <sup>2</sup> )	23.0	16.62	27.90	17.77
Most favored regions	97.90	96.32	97.71	96.57
Additional allowed regions	1.87	2.99	2.06	2.97
Disallowed regions	0.23	0.69	0.23	0.46

two histidines and one cysteine. Many bacterial MCOs have a methionine as a fourth ligand, resulting in a fourth coordinate trigonal tetrahedral geometry. In fungal MCO is common to find phenylalanine or leucine like an axial ligand. The T1 access cavity is next to the  $\beta$ -hairpin in *Tth*-MCO (PDB entry code 2XU9) with 638.3 Å<sup>3</sup>, and there are other examples of loops or secondary structures around the cavity in CueO (PDB entry code 2FQD) at 1941,27 Å<sup>3</sup> and CotA (PDB entry code 4YVN) at 2381.06 Å<sup>3</sup>. It is important to remember that the type of catalysis carried out by the laccase, belongs to the type of external sphere, in which there is no substrate enzyme system and the electronic transfer is carried out at very large distances (Blumberger, 2015), in fact, there are 3 laccase complexes in the PDB of different origins with ABTS, it is striking that even though in some deposits the quality of the electron density map of ABTS is not consistent with a binder with an occupation of 1, the distances between these molecules of ABTS and copper T1 range from 5 to 26 Å.

The cycle starts when four reduced copper ions allow the entry of O<sub>2</sub> to the trinuclear center (TNC), when the O<sub>2</sub> is coordinated between two binding copper type 3 (T3Cu) and one binding copper type 2 (T2Cu) (Pérez-Henarejos et al., 2015). The oxygen molecule is positioned between T3Cu copper ions due to its charge, inducing a dipole-dipole interaction (Claus, 2004). This results in the oxidation of both copper ions, allowing the formation of the peroxide intermediate, located between the two T3Cu and T2Cu, coordinating asymmetrically the T3Cu in

the TNC (Serrano-Posada et al., 2015). The second reduction involves the entry of two electrons, generating the break of the peroxide intermediate, and resulting in an entirely oxidized state known as a native intermediate (Ferraroni et al., 2012). Given the speed of the reaction, the peroxide intermediate has not been observed in X-ray diffraction data from fungal laccases, but has been observed in bacterial laccases (Serrano-Posada et al., 2015). At this point, one O atom is coordinated by the TNC, and another O atom is located between the binuclear T3Cu. The two water molecules stabilize the T2Cu forming a flat square tetra-coordination while each of the T3Cu has a bipyramidal penta-coordination, this is the native intermediate state of the TNC (Serrano-Posada et al., 2015). The next step is the protonation of the oxygen molecule, receiving three protons from the input channel, in fungal laccases, to TNC to form H<sub>2</sub>O and OH<sup>-</sup>. The last proton and three electrons coming into the TNC, reduce Cu<sup>+2</sup> to Cu<sup>+1</sup>, resulting in the release of TNC ligands (Polyakov et al., 2017).

The laccase from *T. thermophilus* (*Tth*-MCO), represents a compelling case among the multi-copper oxidases because its maximum enzymatic activity is at 92 °C and has a half-life of 14 h at 65 °C; however, it presents a restrained pH-range of activity (Miyazaki, 2005). The crystallographic structure of this enzyme was determined, and a cumulative radiation dose technique was applied to described different catalytic intermediates and to observe the effect of the electron flux produced by X-ray radiation damage over the copper centers of T1, T2 and T3 in a crystallized *Tth*-MCO (Serrano-Posada et al., 2015). *Tth*-MCO copper occupancy to T2Cu proved to be very sensitive to radiation damage, and even in crystallographic structures with low deposited radiation dose, it was possible to detect the copper bound to the T2Cu site with fractional occupancies. When the deposited dose increased above 0.2 MGy, this copper is radiolized from the crystal, disappearing its electron density (Serrano-Posada et al., 2015). *Tth*-MCO shows a unique structural characteristic: the presence of a  $\beta$ -hairpin localized at the base of the T1Cu. This motif has the same conformation in all the crystallographic structures deposited before this work at the PDB. Because of its size, conformation, and solvent-exposed surface, this motif has been described to perform a dynamic behavior linked to the presence or absence of copper in T1, T2 and T3 Cu sites: the called holo and apo forms of *Tth*-MCO respectively (Bello et al., 2012).

Aside from the molecular dynamic simulations performed by Bello, the conformation adopted by the  $\beta$ -hairpin in the crystallographic structures, published by Serrano, was described as a crystallographic artifact due to the crystalline matrix organization (Serrano-Posada et al., 2015). Another particular feature of this motif is the unusually high percentage of methionines, arranged in a three-dimensional manner, suitable to coordinate metals. These features have not been found in other homologous laccases deposited at the PDB. Nevertheless, the presence of methionines in a metal-binding arrangement was described in an  $\alpha$ -helix of a laccase from *E. coli* (Singh et al., 2011). However, the identities of the metals susceptible to bind these arrangements of methionines in *Tth*-MCO, or the biological implications of these metal-binding sites, have not been unveiled. In this work, we described four new crystallographic structures, including new conformations of the *Tth*-MCO  $\beta$ -hairpin motif along with their dynamical behavior, using molecular dynamics calculations to analyze the effect of the pH and temperature. Our results show that the *Tth*-MCO  $\beta$ -hairpin behaves in a pH-dependent manner affecting the access to T1Cu in a dynamical mode, and explaining, at least in part, the limited laccase activity of *Tth*-MCO at neutral and basic conditions for substrates as syringaldazine. Remarkably, phylogenetic analysis shows that methionine-rich insertions, similar to the *Tth*-MCO  $\beta$ -hairpin, are present in laccases from *Thermus* and *Meiothermus* genus, opening the possibility to find new examples of bacterial laccase activity-dependent to pH and based on movements of these methionine-rich insertions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Expression and protein purification

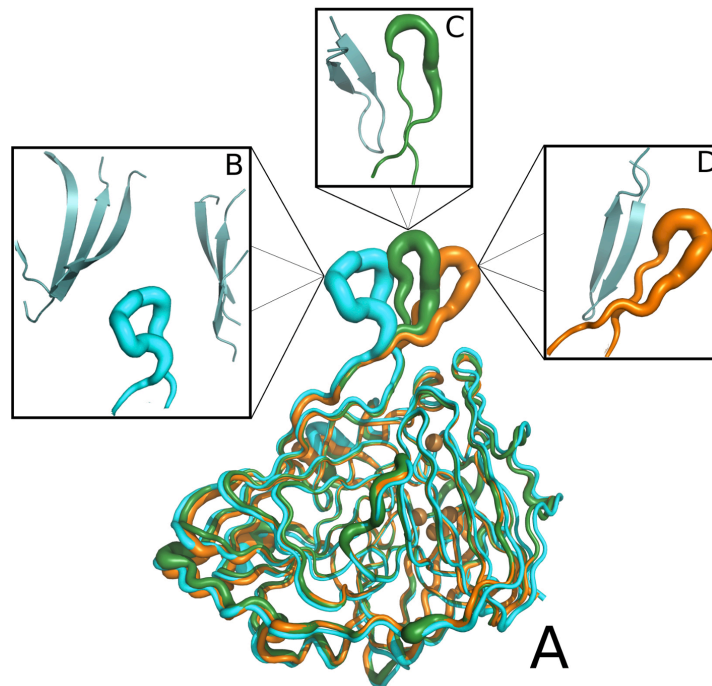
*Escherichia coli* BL21 (DE3) chemo-competent cells were transformed with *Tth*-MCO (pET22b + *Thermus thermophilus* gen laccase). Positive clones were selected in Luria Bertani (LB) medium [1% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) NaCl] plates supplemented with ampicillin at a final concentration of 2  $\mu$ M. A positive clone was inoculated in 50 ml of LB medium supplemented with ampicillin at a final concentration of 2  $\mu$ M and was used as a pre-inoculum. 1 L of LB medium supplemented with ampicillin was inoculated with a pre-inoculum of 20 ml. The LB medium was incubated at 310.15 K and 150 rpm until the optical density at 600 nm reached 0.5. The expression of *Tth*-MCO was induced by adding IPTG to a final concentration of 0.1 mM and CuSO<sub>4</sub> to a final concentration of 1 mM, and the culture was incubated for 4 h at 310.15 K and 150 rpm. After the induction time, the culture was incubated in micro-aeration conditions for 16 h to obtain the holo-form of the laccase for the crystallographic structure with the PDB entries 6TYR and 6W2K. Another culture was incubated in micro-aeration conditions for 4 h at 303.15 K to obtain a partial copper occupation in the crystal for the crystallographic structure with the PDB entry 6Q29. The cells were harvested by centrifugation at 7,500g, 40 min at 277.15 K, and resuspended in 40 ml MES 20 mM and pH 5.5. The bacterium was lysed by sonication on ice for 5 five minutes with pulses of 30 s and 60 s without sonication between pulses, and then the sample was heated at 338.15 K for 20 min. Cell debris was removed by centrifugation for 50 min at 12,000g, and 277.15 K. The supernatant was loaded in a column with 20 ml SP sepharose (GE Healthcare) washed with several volumes of water

and pre-equilibrated with three volumes of MES (20 mM and pH 5.5). Proteins were eluted with a linear gradient of NaCl (0–1 M) in MES 20 mM pH 5.5 buffer at 1.0 ml min<sup>-1</sup>. All fractions were loaded in SDS-PAGE, and the fractions with *Tth*-MCO protein were put together and concentrated in a centricon of 30 kDa molecular weight cutoff, until 2 ml total volume. The protein was loaded in a Superdex 75 column (GE Healthcare), previously equilibrated with 20 mM MES pH 5.5 and 50 mM NaCl. *Tth*-MCO was eluted at 1 ml min<sup>-1</sup> using the same buffer. Fractions with laccase activity were pooled and concentrated with a centricon with a 30 kDa molecular cutoff, until a final concentration of 20 mg ml<sup>-1</sup> was reached.

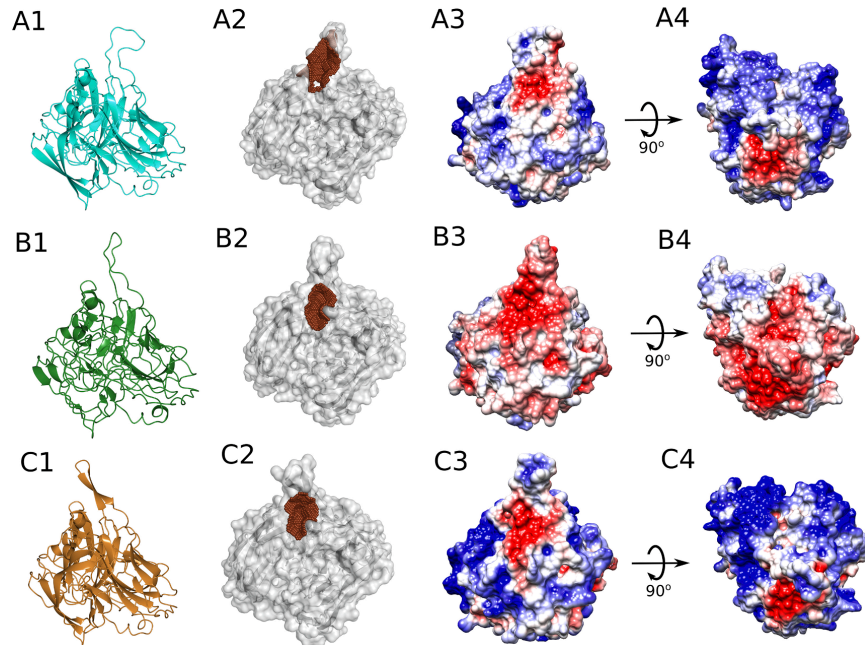
### 2.2. X-ray crystallography

The crystallization condition was obtained with a starting screening using Crystal Screen and Crystal Screen Cryo (Hampton Research) with the micro-batch method. The crystallization test consisted of 1  $\mu$ l of protein in MES 20 mM pH 5.6 and 1  $\mu$ l of crystallization condition No. 40 of Crystal Screen (0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 20% v/v *iso*-Propanol, 20% w/v Polyethylene glycol 4,000) at 4 °C for the open conformation (PDB entry 6Q29). The closed crystals conformation was grown after four days using the Seed Bead kit (Hampton Research) with previously formed crystals and the same crystallization condition for the closed conformation (PDB entry 6TYR). The crystallization conditions for the 6W2K and 5AFA crystals were 1  $\mu$ l of protein in TRIS 20 mM pH 7.5 and 1  $\mu$ l of crystallization condition No. 35 of Crystal Screen 2 (0.1 M HEPES pH 7.5 and 70% MPD) at 4 °C.

The 5AFA crystal was obtained by using the micro-batch crystallization method under oil at 4 °C. In previous data collection, the crystal



**Fig. 1.** Superposition of the three crystallographic structures of *Tth*-MCO (PDB entries 6Q29 cyan, 2XU9 green, and 6TYR orange, panel A). The  $\beta$ -hairpin of each structure and their crystallographic neighbors are displayed in panels B (PDB entry 6Q29), C (PDB entry 2XU9), and D (PDB entry 6TYR). B-values are represented in each panel by different thicknesses, as the value increases so the thickness does. This Figure was prepared with Pymol and Inkscape.



**Fig. 2.** The different conformations of the  $\beta$ -hairpin of *Tth*-MCO in **A)** PDB entry 6Q29, **B)** PDB entry 2XU9 and **C)** PDB entry 6TYR. Different solvent exposed areas in the substrate-binding cavity near the T1Cu site, in each structure shown in A2, B2 and C2. Electrostatic surface potential for crystallographic structures from the PDB entries 6Q29 and 6TYR were calculated at pH 5.5, while the same calculation for the PDB entry 2XU9 was performed at pH 7.5 (panels A3 and A4, B3 and 4, and C3 and C4, respectively). This Figure was prepared with PDB2PQR, CavityPlus server, Inkscape, Pymol and Chimera.

was flash cooled in liquid nitrogen and freezing was prevented by using 30% (v/v) polyethylene glycol 400 as a cryoprotectant. Subsequently, the crystal was soaked for 30 min in 5 mM  $\text{AgNO}_3$  at 278 K.

X-ray diffraction for the PDB entries 6W2K and 6Q29 was collected at 100.15 K at the beamline X6A of the National Synchrotron Light Source and at the beamline 19-ID of the Advanced Photon Source (APS), respectively; and X-ray diffraction for the PDB entry code 6TYR was collected in the in-house X-ray generator from the Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas Biológicas (LANEM), UNAM. Diffraction data were processed and scaled with XDS (Kabsch, 2010) (for PDB entries 6Q29 and 6W2K) and HKL3000 (Minor et al., 2006) and SCALA (for PDB entry code 6TYR). All structure solutions were determined by molecular replacement in Phaser MR (McCoy et al., 2007), using PDB ID: 2XU9 as a template, followed by a structural rigid body refinement with Refmac MR (Murshudov et al., 2011) and proceeded by alternating refinement between an automatic restrained-refinement, following the standard defaults suggested by developers (<https://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/public/xtal/doc/phenix/reference/refinement.html#refinement-with-all-default-parameters>) in the Phenix documentations (Adams et al., 2010) and the building manual in Coot (Emsley and Cowtan, 2004).

The coordinates and the structure factors of 6Q29 and 6TYR have been deposited in the Protein Data Bank (RCSB-PDB). For cavity exposed surface calculations, the CavityPlus Server was used ([repharma.pku.edu.cn/cavityplus](http://repharma.pku.edu.cn/cavityplus)), electrostatic charge calculations were calculated using PDB2PQR (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/docs/ContributedSoftware/apbs/pdb2pqr.html>), and Chimera software was used to visualize the cavity and electrostatic results. Table 1

### 2.3. Laccase activity assay

All measurements were carried out spectrophotometrically, pH dependence was determined at 60 °C against syringaldazine (SGZ) as a substrate, using MES and HEPES buffer, 0.1 mM  $\text{CuSO}_4$  and 50  $\mu\text{M}$  syringaldazine. The pH dependence of the activity was measured in 50 mM MES buffer (pH 5.5 and 6.5) and 50 mM HEPES buffer (pH 7.5) using SGZ. Each test was incubated for 10 min at 60 °C before measuring. The method was based on the oxidation of SGZ, which resulted in a colored product recorded at 530 nm (Torres-Duarte et al., 2009). The effect of the silver ion on the enzymatic activity in *Tth*-MCO, was measured using 4 and 8 equivalents in the kinetic assay.

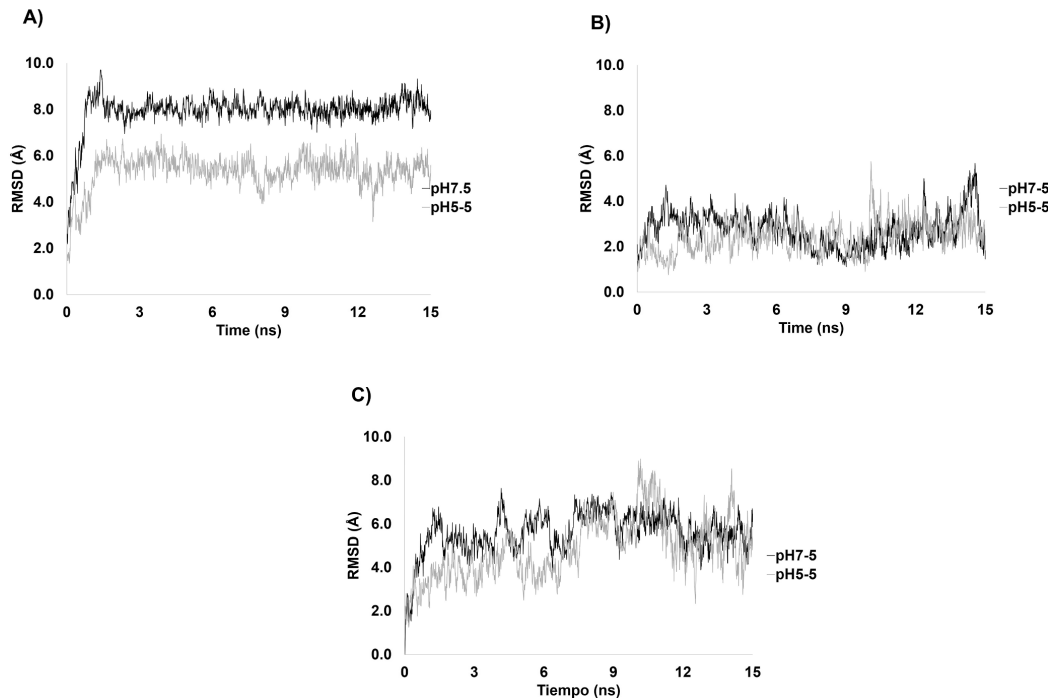
### 2.4. MD simulation details

#### 2.4.1. Protein model preparation for MD

The PDB entries 6Q29, 6TYR and 2XU9 were chosen for MD simulations because of their different conformations of the  $\beta$ -hairpin. All coordinates were prepared using the Protein Preparation Wizard tool in Maestro (Maestro 2019; Schrödinger Release 2019-4). Protonation states were set, according to the two-working pH's, 5.5 and 7.5, using PROPKA 3.1 (Olsson et al., 2011; Sondergaard et al., 2011). Hydrogen atoms were added and the His residues protonation, at the coordination sites T1Cu, T2Cu and T3Cu, took place at the uncoordinated N atom with the Cu ions, H189 and H303 are both protonated at pH 5.5 and not protonated at pH 7.5 in all structures. Likewise, sodium ions ( $\text{Na}^+$ ) were added randomly as counterions to neutralize the system. All copper atoms were modeled in the oxidized state ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

#### 2.4.2. MD simulations

The MD simulations were carried out with Desmond module in



**Fig. 3.** The protein backbone RMSD of the  $\beta$ -hairpin ( $\text{\AA}$ ), for the different conformations studied at different pH: a) 6Q29 entry, b) 6TYR entry and c) 2XU9 entry. Simulation time from 0 to 10 ns corresponds at  $T = 300$  K and from 10 to 15 ns to 340 K. RMSD was computed using as reference the initial structure of each dynamic and the region considered for the  $\beta$ -hairpin was within the residues 289–309.

Schrödinger (Bowers et al., 2006; Desmond Molecular Dynamics System, Schrödinger Released 2019–2). Since the *Th*-MCO laccase activity has been measured at 330 K, we have performed 10 ns + 5 ns simulations at 300 K (NPT) and 340 K (NVT), in order to include the effect of the temperature, employing a cubic water box of 15  $\text{\AA}$  from the protein surface in all directions, using periodic boundary condition, explicit solvent molecules were simulated using the SPC water model. All MD simulations were performed using the OPLS\_2005 (Banks et al., 2005) force-field with the Cu-coordination parameters reported by Hu et al. (Hu et al., 2011) that have been previously applied to other laccases (Avelar et al., 2018). These parameters were added in the Desmond structure/parameter file (.cms).

All entries were subjected to a minimization-relaxation protocol composed of five steps: i) 100 ps Brownian dynamics NVT simulation, at 10 K, with restraints on solute heavy atoms, ii) 12 ps NVT simulation, at 10 K, with restraints on solute heavy atoms using a Berendsen (Berendsen et al., 1984) thermostat, iii) 12 ps NPT simulation, at 10 K, with restraints on solute heavy atoms using a Berendsen thermostat/barostat, iv) 12 ps NPT simulation, at 300 K, with restraints on solute heavy atoms, v) 24 ps unrestrained NPT simulation at 300 K using a Berendsen thermostat/barostat. The first production run (10 ns) was carried out at 300 K using a NPT ensemble and the RESPA integrator with a 2 ps time step. A Berendsen thermostat was applied with a 1 ps relaxation time, the pressure was maintained at 1 bar with a Berendsen barostat with a 2 ps time step and short-range interactions were modeled using a cutoff radius of 9  $\text{\AA}$ . Afterward, the final structure of each NPT simulation was used as an initial conformation for a 5 ns NVT simulation at 340 K with the same parameters as before. T2Cu and T3Cu coordination bonds were restrained with a constant force of  $50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{\AA}^{-2}$  to

maintain the copper coordination. Trajectories were saved every 10 ps for the NPT simulations and every 5 ps for the NVT simulations.

#### 2.4.3. Trajectory analysis

VMD (Humphrey et al., 1996) plugins were used to compute the Root Mean Square Deviation (RMSD) of the trajectories. Simulated Event Analysis tool in Maestro (Release 2019–4) was used to compute the Root Mean Square Fluctuation (RMSF) and for the conformational distribution analysis and the trajectory visualization (Maestro 2019, Schrödinger Release 2019–4)

#### 2.5. Phylogenetic analysis

In the BLAST non-redundant protein database the sequence of laccase from *T. thermophilus* ID: tr|Q72HW2|Q72HW2.THET2, was submitted, excluding models (XM/XP) and sent to Blast with the PSI-BLAST algorithm (Altschul et al., 2005, 1997), the databases were all non-redundant: GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR, PRF and excluding environmental samples from WGS.

Five iterations of PSI-BLAST were selected to obtain a total of 502 sequences with an identity range from 38.28 to 100%. E-value was equal to zero, regarding the query sequence and the best alignment was constructed with Clustalw CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments (Larkin et al., 2007).

The cladogram construction was based on the Clustalw alignment with 502 sequences, using the local matching method. The cladogram was constructed in IQtree with 1000 iterations and using an automatic selection for the best distance matrix model (Chernomor et al., 2016).



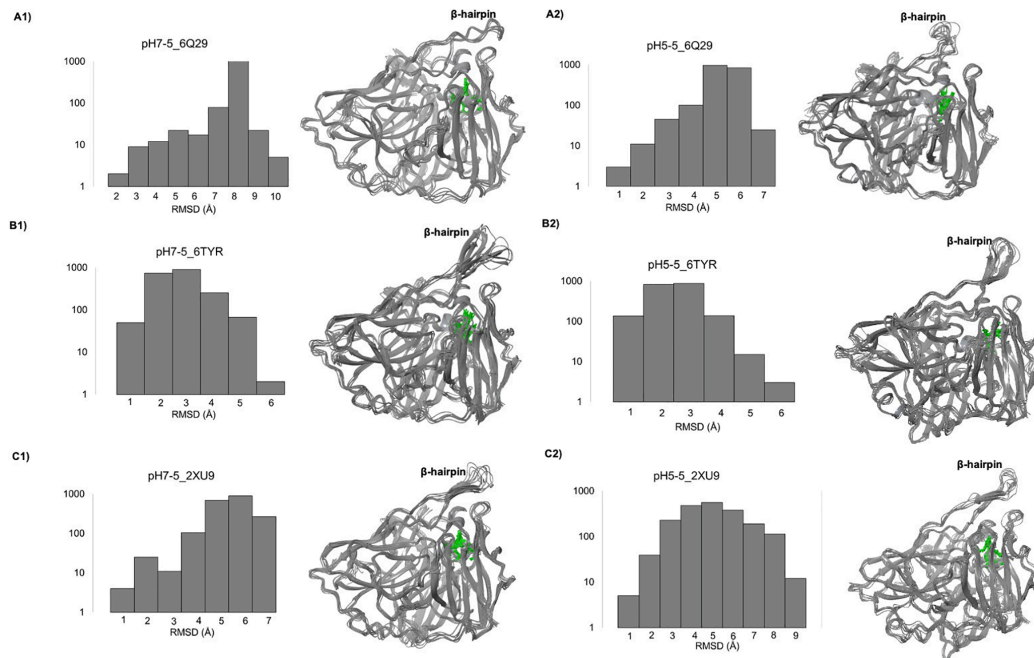


Fig. 4. Conformational distribution according to the RMSD value (Å). The superposition of eight conformations randomly selected of the most populated distribution is shown.

### 3. Results

In this study, we obtained two new crystallographic conformations of the *Tth*-MCO  $\beta$ -hairpin. The coordinates of the PDB entry 6Q29 show a conformation of the  $\beta$ -hairpin, which increases the surface of the neighboring cavity of the CuT1 site, named in this work “crystallographic open conformation”. Conversely, the PDB entry 6TYR shows a  $\beta$ -hairpin in a named “crystallographic closed conformation”, shrinking the access to the T1Cu site. Interestingly, the PDB entry 2XU9 shows a conformation of the  $\beta$ -hairpin between the two new conformations, found in this work and named “crystallographic intermediary conformation” (Fig. 1). These three crystallographic structures represent three different crystal lattices, i.e., even the PDB entries 6TYR and 2XU9 share the same space group (C222<sub>1</sub>), but their unit cell parameters are different, the PDB entry 6Q29 belongs to another space group: P12<sub>1</sub>1. Another particularity regarding the PDB entries 6Q29 and 6TYR is that the crystals responsible for both structures growth, under the same conditions and methods, but while the PDB entry 6Q29 crystals grew after three days; the PDB entry 6TYR crystal grew, also after three days, but using seeds coming from 6Q29 crystals, remarkably, these single details end up in a new crystal arrangement (Fig. 1B, 1C and 1D). It is important to point out that the hypothesis presented in this work, regarding the pH-dependent mobility of the  $\beta$ -hairpin, is challenged by the closed  $\beta$ -hairpin conformation found in the PDB entry 6TYR. However, the number of contacts, calculated by coot, with the neighboring crystallographic copies of the  $\beta$ -hairpin in the PDB entries 6Q29, 2XU9 and 6TYR were 0, 4 and 6, respectively. Then it is possible to consider that the  $\beta$ -hairpin conformation found in 6TYR is more influenced by the crystal matrix than the remaining crystallographic structures reported in this work.

The coordinates from the PDB entries 6Q29, 6TYR and 2XU9 were submitted to the CavityPlus Server, in order to analyze the effect of the three conformations of the  $\beta$ -hairpin (Fig. 2 panels A1, B1 and C1) over

the existence of a neighboring cavity to the T1Cu site. The calculated area of the cavity from the PDB entry 6Q29, was  $\sim 295.7 \text{ \AA}^2$ , the higher value calculated among the three structures (Fig. 2 panel A2) and related to the crystallographic open conformation of the  $\beta$ -hairpin. In the other two crystallographic structures, the area calculated is almost identical among them and 40% lower than in the  $\beta$ -hairpin in the crystallographic open conformation  $182.7 \text{ \AA}^2$  for the PDB entry 2XU9 and  $179.7 \text{ \AA}^2$  for the PDB entry 6TYR (Fig. 2 panels B2 and C2). These crystallographic results suggest a probable relationship between the  $\beta$ -hairpin conformation and the access of the substrate to the T1Cu site. The T1Cu access cavity is essential because this access is responsible for subtracting electrons from the substrate, and this process in laccases follows an outer-sphere mechanism in which the reorganization energy, the electronic driving force and especially the distance between the substrate and the T1Cu site, play central roles (Jones and Solomon, 2015). Several laccase structures deposited at the PDB, show substrate-binding pockets near the T1Cu site. These cavities usually have hydrophobic characteristics and are formed by loops or secondary structures around the T1Cu site. Nevertheless, there are very few examples of substrate molecules attached to these cavities. An extreme example proposed a putative substrate cavity, in CotA, at  $26 \text{ \AA}$  from the copper T1 position (Liu et al., 2016). In the ABTS case, a common substrate used to corroborate laccase activities, a volume of around  $2,400 \text{ \AA}^3$  is needed to fit the molecule into the pocket. Another example in the PDB of ABTS is bound at  $4 \text{ \AA}$  of the T1Cu site in CotA, but this ABTS molecule does not fit clearly in the electronic density (Enguita et al., 2003). Thus, if the  $\beta$ -hairpin conformations affect the access to the T1Cu site by the effect of the pH, the  $\beta$ -hairpin movement could affect the distance between the substrate and the T1Cu, acting as a modulator of the laccase activity in *Tth*-MCO.

However, the crystals used for the PDB entries 6Q29 and 6TYR grew in crystallization conditions with a pH value of 5.5, which are at least 2 units of pH below the crystallization condition for the PDB entry 2XU9

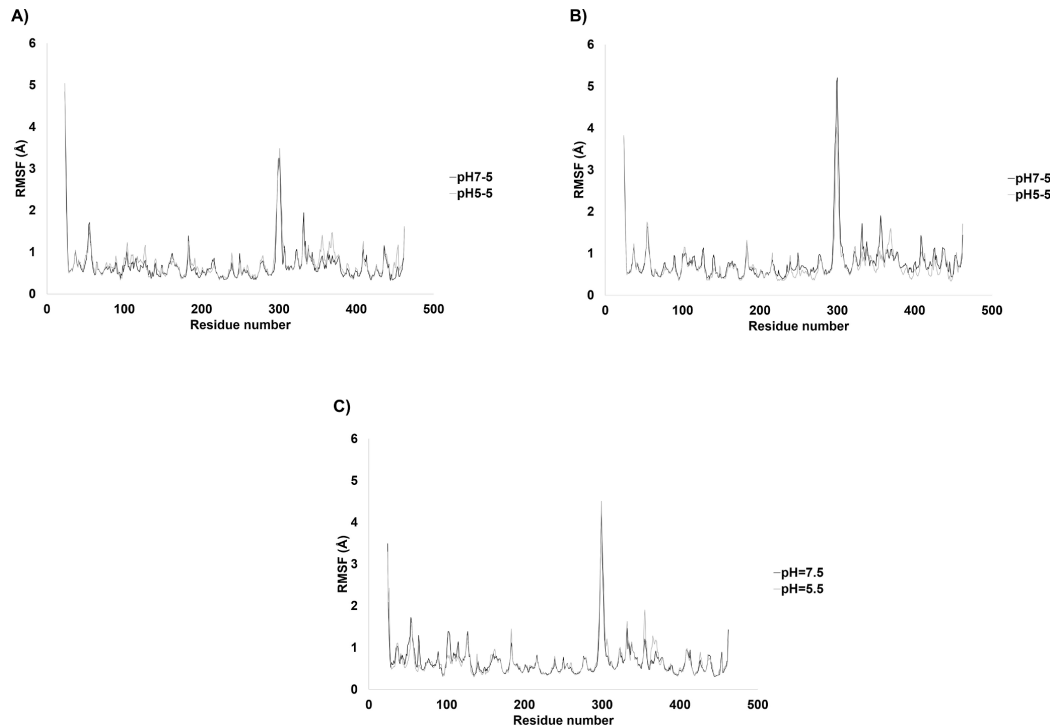


Fig. 5. Protein backbone RMSF (Å), for the different conformations studied at 300 K at pH 7.5 and pH 5.5. a) 6Q29 entry, b) 6TYR entry and c) 2XU9 entry. RMSF was computed using as reference the frame 0 of the MD.

(approximately with a pH of 7.5). These changes are relevant not only in the crystal organization, but also in the electrostatic surface charge, which affects the first. Because the electrostatic surface of *Tth*-MCO in the three crystallographic structures changes, and not only structurally in the neighboring cavity to the T1Cu site, but also in the base of the  $\beta$ -hairpin and in the  $\beta$ -hairpin (amino acid residues His189, His303 respectively), these changes could also be relevant for the conformation of this motif, however, the role of those residues in the mobility of the  $\beta$ -hairpin need to be deeply analyzed. Interestingly, *Tth*-MCO presents a positive electrostatic potential at a pH value of 7.5 with a mean value of 1.0 eV for the whole protein, but when the pH value changes to 5.5, the electrostatic potential calculated from the coordinates of the PDB entries 6Q29 and 6TYR, changes to values with an average of 8.0 eV, for the whole protein (Fig. 2 panels A3, A4, B3, B4, C3 and C4). These behaviors are due to changes in the protonated state, not only of the residues H189 and H303, but also Glu267, Glu352, Asp392 and Asp442 due to the pH change. However, these changes seem to affect not only the crystal organization, but also seems to modify the  $\beta$ -hairpin conformation according to the pH values, and open the possibility to link the laccase activity, against specific substrates, restricted by pH in *Tth*-MCO (Zheng et al., 2012), with the  $\beta$ -hairpin conformation. However, to remove the bias of the crystalline matrices, we modeled this dynamical behavior, since even the conditions for the crystals 6Q29 and 6TYR, are identical in every aspect, out of the use of seeds in 6TYR; these crystals captured two conformations of the  $\beta$ -hairpin, energetically possible, in the same condition, by performing MD simulations considering the pH as the driving force.

The RMSD of the protein backbone was analyzed during the 15 ns simulation time (NPT + NVT simulations), to validate the robustness of the *Tth*-MCO conformations at different values of pH and temperature.

For all the conformations RMSD lies under 3 Å, small deviations were observed when the temperature increased, and small fluctuations were seen in the backbone of the protein changing the pH and showing an average difference of the RMSD values of about 0.3 Å (Fig. S1). Considering the  $\beta$ -hairpin residues only, the RMSD of the protein backbone presents high values of fluctuation that differ between structures as shown in Fig. 3. The MD simulation using the PDB entry 6Q29, coordinates at pH 7.5 shows the maximum deviation, with oscillations of about 8 Å, while the MD using the PDB entry 6TYR model at both pHs, resulted in a smaller fluctuation of about 3 Å (Fig. 3). The observed RMSD differences of about 2 Å, between the simulations of the PDB entry 6Q29 molecule at the two different pH values, are due to the closing tendency of the  $\beta$ -hairpin that induces, for the simulation at pH 7.5, a movement of 8 Å from what was observed in the initial structure. Once the  $\beta$ -hairpin reaches the closed conformation, it is retained, showing small deviations on the RMSD values (Fig. 3A). On the other hand, the PDB entries 6TYR and 2XU9 MD models showed a similar dynamical behavior independently of pH values (Fig. 3B and 3C). However, for these two structures, even if the RMSD shows a similar profile, when the pH changes, the position of the  $\beta$ -hairpin also changes. To compare the structural changes among all simulations, a conformational distribution analysis based on the RMSD values was performed (Fig. 4). Eight randomly chosen conformations of the most populated cluster for the 6Q29, 6TYR and 2XU9 models were superimposed (Fig. 4). A pH-dependent change was observed in the orientation of the  $\beta$ -hairpin next to the T1Cu site, which supports the hypothesis of pH-dependent regulation. Remarkably, the dynamical behavior of the  $\beta$ -hairpin highlights that the pH promotes the transition between the open and close  $\beta$ -hairpin conformations (Fig. 4).



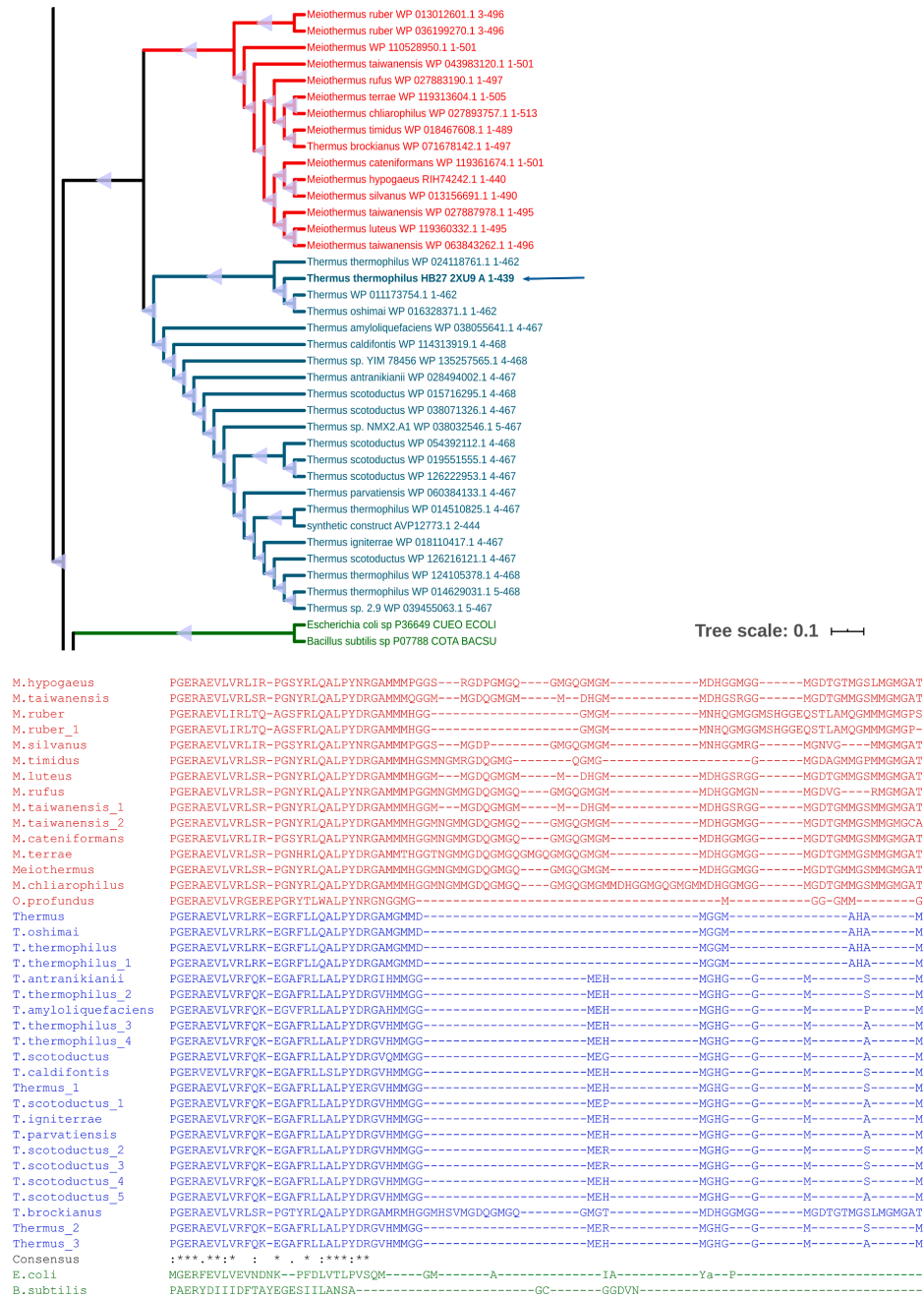


Fig. 6. Unrooted cladogram prepared using IQtree. This representation was constructed with 502 lacC sequences. In blue and red, members of the Thermus and Meiothermus genera are displayed, while *E. coli* and *B. subtilis* are highlighted in green. Aside from the clades belonging to the Thermus and Meiothermus genera, the rest of the taxa contains lacCes without the  $\beta$ -hairpin motif, but with a structural region rich in methionines. The blue arrow indicates the position of the Tth-MCO sequence. The complete cladogram is shown in Fig. S4 from the supplementary materials.



first Ag<sup>+1</sup> ion is coordinated by M195, M354, and M391, the second Ag<sup>+1</sup> site is formed by M192, M296, and M355, and the third Ag<sup>+1</sup> site is composed by M292, M301, and M305. Again, all these residues are also conserved in MrLac (Fig. 7D and Fig. 8). However, when the *Tth*-MCO laccase activity was tested against SGZ, in the presence of silver nitrate, the relative activity did not change. Therefore, the presence of metal ions does not affect the activity, but we do not know if this is related to changes in the mobility of the  $\beta$ -hairpin.

If the  $\beta$ -hairpin is responsible for a pH-dependent regulation, this seems to occur only in laccases from *Thermus* and *Meiothermus* genus, as our phylogenetic analysis indicates, therefore, the absence of a  $\beta$ -hairpin or similar motives in fungal laccases could be one of the reasons why bacterial laccase activity is lower in one order of magnitude from fungal counterparts, because the pH-dependent movement of the  $\beta$ -hairpin opens a cavity near the T1Cu site with enough volume to accommodate a substrate as syringaldazine or ABTS (Autore et al., 2009; Liu et al., 2011; Ramírez-Cavazos et al., 2014; Yan et al., 2014).

#### 4. Discussion

Even the different  $\beta$ -hairpin conformations of the *Tth*-MCO, found in crystallographic structures with the PDB entries 6Q29 and 2XU9, are near other copies in the crystalline matrix, the analysis of their structural changes, electrostatic potential and MD simulations regarding the pH, showing that the  $\beta$ -hairpin conformations are caused by the crystal matrix and are not a consequence of it, while in the PDB entry 6TYR the crystal contacts seem to affect the  $\beta$ -hairpin conformation (Fig. 2). The analysis of the  $\beta$ -hairpin conformations shows important changes in their B-value behaviors, comparable with the RMSF found by MD simulations (Fig. S2). If the B-values are considered as a parameter of movement (Schneider et al., 2014), then the  $\beta$ -hairpin is the region with the greatest flexibility and mobility in *Tth*-MCO structure, as was also found in the MD calculations performed, in which the higher RMSF values found also correspond to the  $\beta$ -hairpin region (Fig. 5). The MD conformational distribution analysis predicted two main conformations, the first one has a closed T1Cu access cavity which corresponds to the simulations at pH 7.5, and a second one in which the cavity is open when the pH changes to 5.5 as shown in Fig. 4. While the  $\beta$ -hairpin in the PDB entry 6Q29 with an open conformation shows B-values higher than 80 Å<sup>2</sup>, the intermediate and the closed crystallographic conformations of the  $\beta$ -hairpin have B-values with an average of 50 Å<sup>2</sup> (Fig. 1A). Except for this motif, the protein has low RMSF and B-values regardless of the different crystal matrices and according to the different MD simulations performed in this work. Therefore, the movement of the protein, except for the  $\beta$ -hairpin, is not affected by the pH, but it is affected by the temperature. At pH 5.5 and 340 K, we found a narrow increase in the movement of the  $\beta$ -hairpin region, whilst at pH 7.5 we saw a small decrease in the  $\beta$ -hairpin movement, that is not correlated with the temperature, but it is to the fact that once the conformation reaches the closed position, it stays in this position, and even with the increase of the temperature does not have the tendency to open at pH 7.5. It is important to highlight, that the conformation of the  $\beta$ -hairpin directly affects the access to the cavity near the CuT1 site, which is structurally the only possible substrate-binding site necessary for the laccase activity in *Tth*-MCO. These changes are evident when the solvent-exposed surface of this cavity is analyzed and compared among the different crystallographic structures and the MD models described in this work. Those changes in the  $\beta$ -hairpin conformation seem to be affected by the pH in which the crystal grows, and these changes can explain the fact that the laccase activity of the *Tth*-MCO has its highest activity in acidic conditions for substrates as SGZ. Interestingly, the  $\beta$ -hairpin conformation from the PDB entry 6Q29 was obtained from the growth of a crystal at pH 5.5 and had the highest solvent-exposed area of the cavity near the CuT1 site. In contrast, the activity against SGZ is reduced or disappears when the pH changes to neutral or alkaline (Miyazaki, 2005). The arguments above suggest that the dynamic behavior of the  $\beta$ -hairpin, even in solution, could be directly affected by pH changes, and these changes regulate

the laccase activity via the conformation of the  $\beta$ -hairpin.

In the cladogram presented in this work (Figs. 6 and S4), the *Tth*-MCO is grouped with all the other laccases from the genus *Thermus*, and the phylogenetically closest group to *Thermus* laccases, contains proteins from the genus *Meiothermus*. Analyzing in detail the sequences of the *Thermus* and *Meiothermus* genus, we found that they shared a segment, equivalent to the  $\beta$ -hairpin of the *Tth*-MCO, also enriched in methionines (Fig. 8). These suggest that the  $\beta$ -hairpin is relevant for the differentiation of these sequences and probably also involved in specific biological functions that are still unveiled. For example, MrLac has an insertion equivalent to the *Tth*-MCO  $\beta$ -hairpin, with a sequence also unusually enriched by methionines, with the difference that MrLac has a more extended insertion than *T. thermophilus*. This particularity in the composition of methionines could suggest that the insertion equivalent to the  $\beta$ -hairpin of *Tth*-MCO could be responsible for a similar function in both enzymes (Fig. 5).

#### 5. Conclusions

In this work, we propose that the  $\beta$ -hairpin, from *Tth*-MCO, is a regulatory element for its laccase activity, a proposal based on multiple shreds of evidence coming from crystallographic structures, MD calculations and phylogenetic analysis. Besides, this  $\beta$ -hairpin could have an additional function related to the binding of metallic ions that stills unknown, but that is independent of its laccase activity. The methionines located at the *Tth*-MCO  $\beta$ -hairpin, have the capability to coordinate metal ions such as Hg<sup>+1</sup> and Ag<sup>+1</sup>. Interestingly, CueO from *E. coli*, which has an  $\alpha$ -helix of 45 amino acids long, different to the  $\beta$ -hairpin of *Tth*-MCO, but also with a high methionine content, also has been proved to coordinate Ag<sup>+1</sup> and Cu<sup>+1</sup> ions, carrying out detoxification functions in *E. coli* (Singh et al., 2011). This opens the possibility of giving a detoxifying function to laccases containing this type of structure.

Remarkably, our findings, regarding the  $\beta$ -hairpin of *Tth*-MCO, could be extendable to laccases from *Thermus* and *Meiothermus* genus. Therefore, its existence could explain, at least partially, the shallow laccase activity present in some bacterial MCOs. The *Tth*-MCO  $\beta$ -hairpin seems to be an example of the regulatory activity that a multi-conformational motif could have within an enzyme, in which the subtle control of external factors, such as pH is essential for the motif conformation.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

RMB acknowledge Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), MÉXICO, for the scholarship granted as a PhD student enrolled in the Posgrado en Ciencias from UAEM. ERP acknowledges IBT Institutional budget and its economic incentive from Sistema Nacional de Investigadores (SNI) for financing this research. This work was funded partially by grant PAPIIT IN209920. Authors acknowledge Adelaida Díaz-Vilchis and Lilian González-Segura for X-ray diffraction data collection. Part of the crystallographic results shown in this report is derived from work performed at Argonne National Laboratory, Structural Biology Center at the Advanced Photon Source. Argonne is operated by the University of Chicago Argonne, LLC, for the U.S. Department of Energy, Office of Biological and Environmental Research under contract DE-AC02-06CH11357. Authors also acknowledge Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas Biológicas (LANEM), and Georgina Espinosa-Pérez from the Instituto de Química, UNAM, for X-ray diffraction data collection. MA and AS acknowledge Italian MIUR Grant - Department of Excellence 2018-2022 and computational resources provided by hpc@dbcf (<http://molsys.dbcf.unisi.it/hpc>).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107740>.

## References

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H., 2010. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2, 213–221. <https://doi.org/10.1107/S0907444909052925>.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Altschul, S.F., Wootton, J.C., Gertz, E.M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schäffer, A.A., Yu, Y.K., 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *272 (20)* 5101–5109. *FEBS J.* 5101–5109. [10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x).
- Autore, F., Del Vecchio, C., Fraternali, F., Giardina, P., Sanna, G., Faraco, V., 2009. Molecular determinants of peculiar properties of a *Pleurotus ostreatus* laccase: Analysis by site-directed mutagenesis. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 507–513. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.004>.
- Avelar, M., Pastor, N., Ramirez-Ramirez, J., Ayala, M., 2018. Replacement of oxidizable residues predicted by QM-MM simulation of a fungal laccase generates variants with higher operational stability. *J. Inorg. Biochem.* 178, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.10.007>.
- Banks, J.L., Beard, H.S., Cao, Y., Cho, A.E., Damm, W., Farid, R., Felts, A.K., Halgren, T.A., Mainz, D.T., Maple, J.R., Murphy, R., Philipp, D.M., Repasky, M.P., Zhang, L.Y., Berne, B.J., Friesner, R.A., Gallicchio, E., Levy, R.M., 2005. Integrated modeling program, applied chemical theory (IMPACT). *J. Comput. Chem.* 26 (16), 1752–1780. <https://doi.org/10.1002/jcc.20292>.
- Bello, M., Valderrama, B., Serrano-Posada, H., Rudino-Piñera, E., 2012. Molecular dynamics of a thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: structural differences between the apo and holo forms. *PLoS One* 7, e40700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040700>.
- Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., Van Gunsteren, W.F., Dinola, A., Haak, J.R., 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81, 3684. <https://doi.org/10.1063/1.448118>.
- Berthet, S., Thevenin, J., Baratin, D., Demont-Caulet, N., Debeaumont, I., Bidzinski, P., Leple, J.C., Huis, R., Hawkins, S., Gomez, L.D., Lapiere, C., Jouanin, L., 2012. Role of Plant Laccases in lignin polymerization. *Adv. Bot. Res.* 61, 145–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416023-1.00005-7>.
- Blumberg, J., 2015. Recent advances in the theory and molecular simulation of biological electron transfer reactions. *Chem. Rev.* 115 (20), 11191–11238. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00298>.
- Bowers, K.J., Chow, E., Xu, H., Dror, R.O., Eastwood, M.P., Gregersen, B.A., Klepeis, J.L., Kolosvary, L., Moraes, M.A., Sacerdoti, F.D., Salmon, J.K., Shan, Y., Shaw, D.E., 2006. Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing*, 10.1145/1188455.1188544.
- Brijwani, K., Rigdon, A., Vadlani, P.V., 2010. Fungal laccases: Production, function, and applications in food processing. *Enzyme Res.* ID 149748, 10 pages. <https://doi.org/10.4061/2010/149748>.
- Chauhan, P.S., Goradia, B., Saxena, A., 2017. Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech.* 7 (5), 323. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0955-7>.
- Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2016. Terrace aware data structure for phylogenomic inference from supermatrices. *Syst. Biol.* 65, 997–1008. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syw037>.
- Christensen, N.J., Kepp, K.P., 2013. Stability mechanisms of a thermophilic laccase probed by molecular dynamics. *PLoS One.* 8 (4), e61985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061985>.
- Claus, H., 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35, 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.029>.
- Emsley, P., Cowtan, K., 2004. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>.
- Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriques, A.O., Carrondo, M.A., 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: A laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.* 278 (21), 19416–19425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301251200>.
- Ferraroni, M., Matera, I., Chernykh, A., Kolomytseva, M., Golovleva, L.A., Scozzafava, A., Briganti, F., 2012. Reaction intermediates and redox state changes in a blue laccase from *Steccherinum ochraceum* observed by crystallographic high/low X-ray dose experiments. *J. Inorg. Biochem.* 111, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.01.011>.
- Hu, L., Farrokhi, M., Heimdal, J., Shleev, S., Rulišek, L., Ryde, U., 2011. Reorganization energy for internal electron transfer in multicopper oxidases. *J. Phys. Chem. B.* 115 (45), 13111–13126. <https://doi.org/10.1021/jp205897z>.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics* 14 (1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- Jones, S.M., Solomon, E.I., 2015. Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 869–883. <https://doi.org/10.1007/s00181-014-1826-6>.
- Kabsch, W., 2010. Xds. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132. [10.1107/S0907444909047337](https://doi.org/10.1107/S0907444909047337).
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Willm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
- Liu, X., Gillespie, M., Ozel, A.D., Dikici, E., Daunert, S., Bachas, L.G., 2011. Electrochemical properties and temperature dependence of a recombinant laccase from *Thermus thermophilus*. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 361–366. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4345-9>.
- Liu, Z., Xie, T., Zhong, Q., Wang, G., 2016. Crystal structure of CotA laccase complexed with 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) as a novel binding site. *Struct. Biol. Commun.* F72, 328–335. <https://doi.org/10.1107/S2053230X1600426X>.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J., 2007. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40 (4), 658–674. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>.
- Minor, W., Cymborowski, M., Otwinowski, Z., Chruszcz, M., 2006. HKL-3000: The integration of data reduction and structure solution - From diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 62 (8), 859–866. <https://doi.org/10.1107/S0907444906019949>.
- Missimer, J.H., Steinmetz, M.O., Baron, R., Winkler, F.K., Kammerer, R.A., Daura, X., van Gunsteren, W.F., 2007. Configurational entropy elucidates the role of salt-bridge networks in protein thermostability. *Protein Sci.* 16 (7), 1349–1359. <https://doi.org/10.1110/ps.062542907>.
- Miyazaki, K., 2005. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* 9, 415–425. <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0458-z>.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I., 2007. “Blue” laccases. *Biochem.* 72, 1136–1150. <https://doi.org/10.1134/S0006297907100112>.
- Murshudov, G.N., Skubák, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., Winn, M.D., Long, F., Vagin, A.A., 2011. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 67, 355–367. <https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>.
- Olsson, M.H.M., Söndergaard, C.R., Rostkowski, M., Jensen, J.H., 2011. PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *J. Chem. Theory Comput.* 7 (2), 525–537. <https://doi.org/10.1021/ct100578z>.
- Pérez-Henarejos, S.A., Alcaraz, L.A., Donaire, A., 2015. Blue Copper proteins: A rigid machine for efficient electron transfer, a flexible device for metal uptake. *Arch. Biochem. Biophys.* 15 (584), 134–148. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.08.020>.
- Polyakov, K.M., Gavryushov, S., Ivanova, S., Fedorova, T.V., Glazunova, O.A., Popov, A.N., Koroleva, O.V., 2017. Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: Insights into the reaction mechanism. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* 73 (5), 388–401. <https://doi.org/10.1107/S2059798317003667>.
- Ramírez-Cavazos, L.I., Junghans, C., Ornelas-Soto, N., Cárdenas-Chávez, D.L., Hernández-Luna, C., Demarche, P., Enaud, E., García-Morales, R., Agathos, S.N., Parra, R., 2014. Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 108, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.06.006>.
- Santhanam, N., Vivanco, J.M., Decker, S.R., Reardon, K.F., 2011. Expression of industrially relevant laccases: Prokaryotic style. *Trends Biotechnol.* 29 (10), 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.tbttech.2011.04.005>.
- Serrano-Posada, H., Centeno-Leija, S., Rojas-Trejo, S.P., Rodríguez-Almazán, C., Stojanoff, V., Rudino-Piñera, E., 2015. X-ray-induced catalytic active-site reduction of a multicopper oxidase: structural insights into the proton-relay mechanism and O<sub>2</sub>-reduction states. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* D71, 2396–2411. <https://doi.org/10.1107/S1399004715018714>.
- Schneider, B., Gelly, J., de Alexandre, G., Brevern, A., Cerny, J., 2014. Local dynamics of proteins and DNA evaluated from crystallographic B factors. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol.* D70, 2413–2419. <https://doi.org/10.1107/S1399004714014631>.
- Schrödinger Release 2019.4: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
- Singh, S.K., Roberts, S.A., McDevitt, S.F., Weichsel, A., Wildner, G.F., Grass, G.B., Rensing, C., Montfort, W.R., 2011. Crystal structures of multicopper oxidase CueO bound to copper(I) and silver(I): Functional role of a methionine-rich sequence. *J. Biol. Chem.* 286 (43), 37849–37857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.293589>.
- Søndergaard, C.R., Olsson, M.H.M., Rostkowski, M., Jensen, J.H., 2011. Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of p K<sub>a</sub> values. *J. Chem. Theory Comput.* 7 (7), 2284–2295. <https://doi.org/10.1021/ct200133y>.
- Torres-Duarte, C., Roman, R., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., 2009. Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system. *Chemosphere.* 77 (5), 687–692. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.039>.
- Yan, J., Chen, D., Yang, E., Niu, J., Chen, Y., Chagan, I., 2014. Purification and characterization of a thermotolerant laccase isoform in *Trametes trogii* strain and its potential in dye decolorization. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 93, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.06.001>.
- Zheng, Z., Li, H., Li, L., Shao, W., 2012. Biobleaching of wheat straw pulp with recombinant laccase from the hyperthermophilic *Thermus thermophilus*. *Biotechnol. Lett.* 66 (2), 213–221. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0796-0>.