

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD INDUCIDA A TRAVÉS DE PUENTES SALINOS INTERDOMINIO: UN ESTUDIO DE LA ENZIMA LACASA DE *Trametes versicolor*”

Tesis que presenta
ESP. EN BT. LEONARDO DAVID HERRERA ZUÑIGA

Para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS (QUÍMICA)

Director
DR. ARTURO ROJO DOMÍNGUEZ

Sinodales

Presidente:

Dr. Andrés Hernández Arana

Secretario:

Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna

Primer vocal:

Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza

Segundo Vocal:

Dra. Nina Pastor Colón

Tercer vocal:

Dr. Arturo Rojo Domínguez



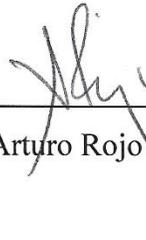
Iztapalapa, CDMX, 17 de diciembre de 2018

Sustentante:



Esp en Bt. Leonardo David Herrera Zuñiga

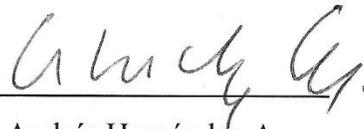
Directro de Tesis:



Dr. Arturo Rojo Domínguez

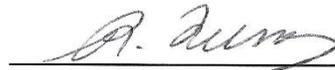
Jurado Asignado

Presidente:



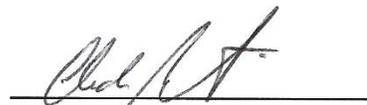
Dr. Andrés Hernández Arana

Secretario:



Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna

Primer vocal:



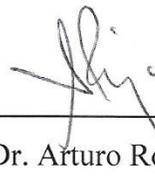
Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza

Segundo Vocal:



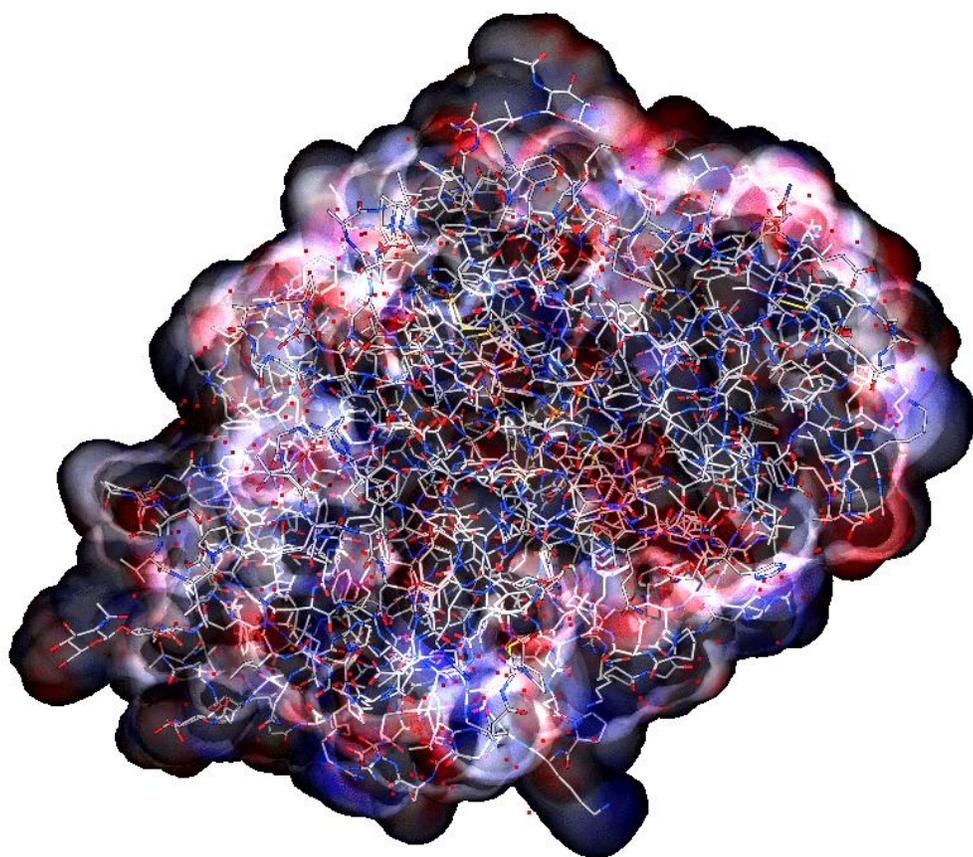
Dra. Nina Pastor Colón

Tercer vocal:



Dr. Arturo Rojo Domínguez

El presente trabajo de tesis doctoral se realizó en los laboratorios del Área de Biofísicoquímica del Departamento de Química de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana y en el Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo bajo la dirección del Dr. Arturo Rojo Domínguez

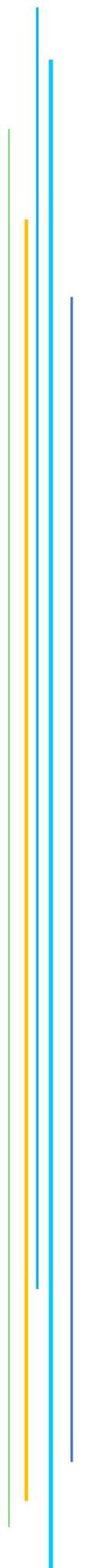


“Model-makers are storytellers”

Ken Dill

a book: Molecular Driving Forces

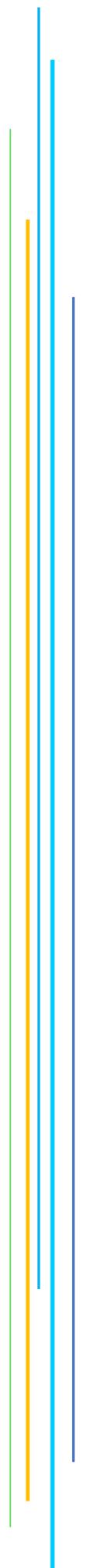
RESUMEN



Las enzimas han demostrado su capacidad adaptativa a la temperatura a través del tiempo mediante mutaciones precisas, muchas de ellas con un solo cambio de residuo. En el presente trabajo, desarrollamos una metodología para proponer y evaluar la estabilización de las **interacciones iónicas de tipo puentes salinos** en la estructura de la enzima lacasa. Esta enzima, es una, oxidorreductasa que se pliega en tres dominios de arquitectura similar a las inmunoglobulinas, y en ella se identificaron posiciones estructurales de alta probabilidad de fortalecer los contactos entre dominios mediante la inserción de un solo puente salino. Se modelaron diez mutaciones, junto a tres controles (dos positivos y uno negativo).

El presente trabajo se evaluaron **17 sistemas**, evaluados cada uno de ellos a tres temperaturas (**298.15 K** (25°C), **323.15 K** (50°C), y **348.15 K** (75°C)), por triplicado generándose **153 simulaciones** por dinámica molecular (25 a 30 ns) para tiempo total de simulación aproximado de **3 μs**. Los resultados demostraron que la metodología computacional usada mediante la combinación de triplicados en dinámica molecular, cálculos de energía electrostática utilizando la ecuación de **Poisson-Boltzmann** y agrupación de estructuras (**clustering**) basada en el análisis de componentes principales, es robusta y confiable. Adicionalmente, la aplicación de esta metodología mostró que las mutantes de arginina son mejores que las mutantes de lisina para conferir termoestabilidad, en la enzima **lacasa de *Trametes versicolor***.

AGRADECIMIENTOS



Al **CONACyT, COMECyT y PRODEP** por los apoyos recibidos

Dr. Arturo Rojo Domínguez, quien me acogió en el laboratorio de Biofisiología del Departamento Química en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa cuando era un alumno que ignoraba completamente el arte del estudio de las proteínas y la Bioinformática.

Dr. Gustavo Viniegra, porque, aunque este lejos, lo sé presente. Y entonces recuerdo que hay cosas entre los Hombres que no dependen del tiempo y la distancia. Por esa Lealtad tan profunda como inmediata, de la cual tantas enseñanzas pueden extraerse.

Dr. Andrés Hernández Arana, por las innumerables tardes de compañía y comprensión en la Soledad de la Ciencia, por su agudeza científica y, sobre todo, por el cariño y apoyo emocional en los momentos difíciles.

Dr. Cesar Millán Pacheco, cuando más haces falta, sin tu “olfato” científico, la realización de este trabajo hubiese resultado aún más sinuoso.

A mis compañeros de Laboratorio para los cuales no me alcanza el sentimiento por decir gracias a su incomparable apoyo y compañerismo, amigos míos.

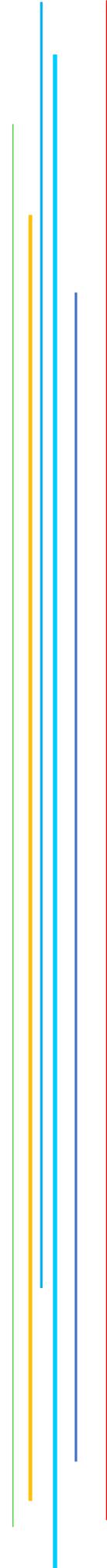
Centro de Supercómputo y Visualización en Paralelo (LSVP), del cual me siento un miembro más. Computólogos, que en tantas ocasiones han ayudado a paliar mis “torpezas” informáticas. A todos y cada uno de ustedes por la asistencia y el apoyo brindado. Especialmente a **Carlitos** por aguantar mis inhóspitos horarios y premuras.

Y antes de que todo esto fuera posible, al amor incondicional de mi familia, **mis hermanos Roy y Fer** por su cariño, a mi hermana **Diana**, y a **mi Padre** por sostenerme en mis caídas. Para aquella de quien aprendí la disciplina por trabajar y estudiar, aquella que me propulsó en los momentos que mi voluntad claudicaba, gracias a **María del Carmen, mi Madre**. Porque a Ustedes debo todo lo que soy. Porque me mostraron lo mejor que un hermano e hijo puede esperar: la inquebrantable seguridad de su Amor, y una profunda convicción en sus creencias acompañada por la fuerza necesaria para vivir su vida en consecuencia.

A **Mayte Mikal**, Porque del amanecer de cada día sobre tu rostro nace la energía que me impulsa, gracias por demostrarme la fortaleza de la vida... Je t'aime ma petite fille.

Y siempre y por encima de todo, el mayor agradecimiento a el Amor de mi Vida **Miriam Magaly**, por compartir conmigo el inmenso camino del esfuerzo por la sabiduría, y por tener la cognición para ayudarme a que lo urgente no perturbe lo importante. Bendeciré el tiempo de haberte conocido, porqué eres mi faro en medio de la noche...

TABLA DE CONTENIDOS

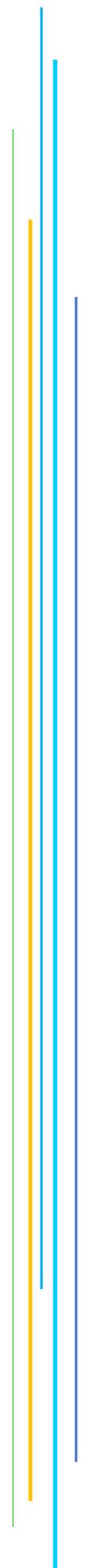


RESUMEN	5
AGRADECIMIENTOS	7
TABLA DE CONTENIDOS	9
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS	13
LISTA DE FIGURAS	16
LISTA DE TABLAS	20
INTRODUCCIÓN	22
ANTECEDENTES	24
1.1 Oxidasas Multicobre	25
1.2 Enzima Lacasa (EC 1.10.3.2)	25
1.2.1 Propiedades Fisicoquímicas y Estructura de la Lacasa	27
1.2.2 Mecanismo de Reacción de la Lacasa	29
1.2.2.1 Sustratos	30
1.2.3 Evolución de la Lacasa	31
1.2.4 <i>Trametes versicolor</i>	32
1.3 Aplicaciones Industriales y Biotecnológicas de la Lacasa	33
1.4 Estabilidad a Altas Temperaturas	36
1.4.1 Factores de Influencia en la Estabilidad Térmica de Proteínas	38
1.4.1.1 Enlaces Disulfuro	38
1.4.1.2 Puentes Salinos	39
1.4.1.3 Enlaces de Hidrógeno	40
1.4.1.4 Efecto Hidrofóbico	41
1.4.1.5 Interacción entre Anillos Aromáticos	41
1.4.1.6 Reducción de la Flexibilidad	42
1.4.2 Estudios de Estabilidad Térmica en Lacasa	43
1.5 Ingeniería de Proteínas y Diseño Racional	44
1.5.1 Aproximación Computacional	45
1.6 Dinámica Molecular	46
1.7 Energía Libre	51

OBJETIVOS	52
MATERIALES Y MÉTODOS	54
2.1 Modelado de la Enzima Lacasa	56
2.2 Generación de Variantes Quiméricas	56
2.3 Mutantes Control	57
2.4 Mutantes con Potencial Estabilizante	57
2.5 Dinámica Molecular	60
2.6 Análisis de la Estructura Secundaria	61
2.7 Puentes de Hidrógeno	61
2.8 Estabilidad de la Simulación y Empaquetamiento	61
2.9 Fluctuaciones de Cadenas Laterales	62
2.10 Distancia de Interacción Dominio:Dominio y Aminoácido:Aminoácido	62
2.11 Aproximación de la Energía Libre (MM/PBSA)	63
2.12 Componentes Principales y Agrupamiento	66
RESULTADOS Y DISCUSIONES	67
3.1 Construcción del Modelo wtTv	68
3.2 Generación de Mutantes	73
3.3 Discriminación de Mutantes con Potencial Termoestable	78
3.4 La Dinámica	79
3.4.1 Estabilidad	80
3.4.1.1 Raíz de la Desviación Cuadrática Media	80
3.4.1.2 Compactación Estructural	89
3.4.1.3 Estructura Secundaria	93
3.4.1.4 Análisis de Movilidad	98
3.4.2 Evaluación de la Energía	100
3.4.2.1 MM/PBSA	101
3.4.2.2 Puentes de Hidrógeno	109
3.4.2.3 Distancias de Interacción	111
3.4.2.4 Agrupamiento	115
3.4.2.5 Estructuras de Mayor Estabilidad	124

CONCLUSIONES	127
ARTICULOS GENERADOS A PARTIR DEL PRESENTE TRABAJO	130
4.1 Molecular dynamics on laccase from <i>Trametes versicolor</i> to examine thermal stability induced by salt bridges	131
4.2 In silico Design of Laccase Thermostable Mutants From Lacc 6 of <i>Pleurotus ostreatus</i>	143
APÉNDICES	155
Apéndice Mecanismo de Actividad	156
Apéndice COLVARS	158
Apéndice Min	160
Apéndice Run	162
Apéndice Distancia	164
Apéndice PB-DF	165
Apéndice MM/PBSA	166
Apéndice PCA	168
Apéndice Secuencia	169
Apéndice Topo-2D	170
Acta y Constancia de Examen	171

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS



\AA^2	área superficial
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolina-6-acidosulfónico), agente oxidante de diversos compuestos químicos y su mecanismo de reciclado entre la lacasa y el sustrato
ADN	ácido desoxirribonucleico
<i>βglu</i>	enzima β -glucosidasa silvestre de <i>Paenibacillus polymyxa</i>
BLAST	algoritmo heurístico para la búsqueda y alineamiento de secuencias (Basic Local Alignment Search Tool)
Cα	carbono alfa
Carma	código para el análisis y evaluación de la dinámica molecular de proteínas
CATH	clasificación estructural de proteínas (Protein Structure Classification Database)
CHARMm	campo de fuerzas aplicable a biomoléculas (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics)
Clustering	técnica de agrupación en base a la similitud estructural (RMSD) para el análisis de sistemas multivariados en biomoléculas
CnE	contactos no enlazantes
COLVARS	módulo de variables colectivas de uso en NAMD
Cu T₁, T₂ y T₃	cobre de tipo I, II y III
D_A, D_B y D_C	primer, segundo y tercer dominio cupredoxina
DM	dinámica molecular
DSSP	diccionario de estructura secundaria en proteínas (Dictionary of Protein Secondary Structure)
EPR	resonancia paramagnética electrónica (Electron Paramagnetic Resonance)
GenBank	base de secuencias de genes (Genetic Sequence Database)
HAPs	hidrocarburos aromáticos policíclicos
Hb	puentes de hidrógeno
<i>in-silico</i>	expresión que significa hecho por computadora o vía simulación computacional
IBs	enzima lacasa silvestre de <i>Bacillus subtilis</i>
LPB	ecuación de Poisson-Boltzmann linealizada
LSVP	laboratorio de supercómputo y visualización en paralelo de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.
ITv	enzima lacasa silvestre de <i>Trametes versicolor</i>
MCO	oxidasa multicobre
MM/PBSA	Protocolo para la determinación de la energía libre en biomoléculas (Molecular Mechanics / Poisson Boltzmann Surface Area)
MOE	Software de simulación para biomoleculares (Molecular Operating Environment)

NAMD	código paralelizado para uso en dinámica molecular de alto rendimiento en sistemas biológicos (NAnoscale Molecular Dynamics)
NCBI	centro nacional de información para la biotecnología (National Center for Biotechnology Information)
PCA	análisis de componentes principales
PDB	banco de datos de proteínas (Protein Data Bank)
PME	método para calcular interacciones de larga distancia (Particle Mesh Ewald)
redox	oxido-reducción
Rg	radio de giro
RI	residuos interdominio
RMSD	desviación de la media cuadrática (Root Mean Square Deviation)
RMSF	fluctuaciones cuadráticas medias (Root Mean Square Fluctuation)
Robetta	servidor para analizar interacciones proteína-proteína mediante el “escaneo de alaninas
SA	sitio activo
SASA	área superficial accesible al solvente (Solvent Accessible Surface Area)
SCOP2	clasificación estructural de proteínas (Structural Classification of Proteins)
SIMULOID	código para el análisis y evaluación de la dinámica molecular de proteínas
T_{1/2}	temperatura de despegamiento de la proteína
T	temperatura
TNC	agrupamiento tetranuclear, ensamble molecular que conforma el sitio activo de la lacasa constituido por 4 átomos de cobre
VMD	visualizador de biomoléculas (Visual Molecular Dynamics)
wtβglu	modelo por homología de la Enzima β -glucosidasa silvestre de <i>Paenibacillus polymyxa</i>
wtBs	modelo por homología de la enzima lacasa silvestre de <i>Bacillus subtilis</i>
wtTv	modelo por homología de la enzima lacasa silvestre de <i>Trametes versicolor</i>
ΔE_{MM}	energía del sistema calculada por mecánica molecular
$\Delta E_{MM-interna}$	contribución de los términos enlazantes a la energía del sistema
$\Delta E_{MM-externa}$	contribución de los términos no enlazantes a la energía del sistema
ΔG	cambio en la energía libre
ΔG_{PB}	contribución electrostática a la energía
ΔG_{SA}	contribución a la energía debido al costo de crear una cavidad proporcional al área molecular
ΔG_{solv}	cambio en la energía debido al costo de solvatación

LISTA DE FIGURAS

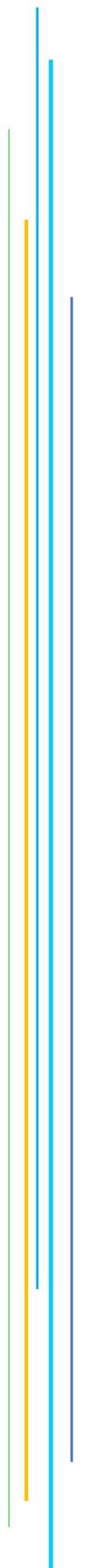


Figura 0	Numero de publicaciones anuales sobre lacasa registrados en el National Center for Biotechnology Information	26
Figura 1	Estructura de la lacasa de <i>Thermus thermophilus</i> (PDB: 5JRR)	27
Figura 2	Esquema de los tres tipos de cobre encontrados en la lacasa	28
Figura 3	Esquematzación del organismo vegetal y ubicación de la molécula de lignina	30
Figura 4	Modelo evolutivo de la lacasa	32
Figura 5	Desglose de las aplicaciones biotecnológicas de la lacasa Modelo evolutivo de la lacasa	33
Figura 6	Representación esquemática de los componentes de campo del campo de fuerzas (<i>force fields</i>)	50
Figura 7	Paisaje energético para el plegamiento de una proteína.	51
Figura 8	Coordenada de reacción	51
Figura 9	Protocolo de trabajo	55
Figura 10	Parámetros utilizados para la simulación de los átomos de cobre	58
Figura 11	Representación esquemática del sistema para <i>Trametes versicolor</i> embebido en una caja con aguas	59
Figura 12	Estructura de la enzima lacasa con ID: 1GYC-PDB	68
Figura 13	Alineamiento entre <i>ITv</i> y 1GYC	69
Figura 14	Modelo de la enzima lacasa <i>wtITv</i>	70
Figura 15	Conservación del sitio activo	71
Figura 16	Esquema de la superposición del sitio activo en 32 estructuras cristalográficas homólogas a <i>ITv</i>	72
Figura 17	Representación artística de la enzima <i>ITv</i>	73
Figura 18	Esquematzación de la búsqueda de rotámeros para la construcción de mutantes	76
Figura 19	Estructura de la lacasa de <i>T. versicolor</i>	78
Figura 20	Raíz de la Desviación Cuadrática Media para las estructuras silvestres	83
Figura 21	Raíz de la desviación cuadrática media para el control negativo y positivo	85

Figura 22	Raíz de la desviación cuadrática media para las mutantes negativas	86
Figura 23	Raíz de la desviación cuadrática media para las mutantes positivas	88
Figura 24	Radio de giro a lo largo de las trayectorias para wtTv.	90
Figura 25	Radio de giro a lo largo de las trayectorias para la estructura control negativo	90
Figura 26	Radio de giro a lo largo de las trayectorias para las mutaciones positivas	91
Figura 27	Radio de giro a lo largo de las trayectorias para las mutaciones negativas	92
Figura 28	Conservación de la estructura secundaria como una función del tiempo a 298.15 K (25°)	94
Figura 29	Conservación de la estructura secundaria como una función del tiempo a 323.15 K (50°)	95
Figura 30	Conservación de la estructura secundaria como una función del tiempo a 348.15 K (75°)	96
Figura 31	Comparación de las fluctuaciones de cadenas laterales entre el factor-B de la estructura cristalográfica 1GYC y el RMSF calculado para wtTv	99
Figura 32	Evolución de la energía obtenida con el protocolo MM/PBSA para las proteínas silvestres	102
Figura 33	Evolución de la energía obtenida con el protocolo MM/PBSA para las mutantes control y negativas	103
Figura 34	Evolución de la energía obtenida con el protocolo MM/PBSA para las mutantes positivas	104
Figura 35	Cuantificación del cambio de energía calculado por MM/PBSA para cada sistema respecto a su correspondiente estructura silvestre	105
Figura 36	Cuantificación de los componentes enlazantes y no enlazantes al protocolo MM/PBSA	107
Figura 37	Cuantificación de las contribuciones a la energía calculadas por MM/PBSA	108
Figura 38	Frecuencia en el número de puentes de hidrógeno como función del número de residuos	110
Figura 39	Distribución de la distancia entre centros de masa para los dominios	112

Figura 40	Distribución de la distancia entre aminoácidos formadores del Puente Salino a 298.15 K (25°C) y 323.15 K (50°C)	113
Figura 41	Distribución de la distancia entre aminoácidos formadores del Puente Salino a 348.15 K (75°C)	114
Figura 42	Agrupamiento para la simulación de la mutante A71R	115
Figura 43	Grafica de análisis del Agrupamiento a 298.15 K (25°C)	118
Figura 44	Grafica de análisis del Agrupamiento a 323.15 K (50°C)	119
Figura 45	Grafica de análisis del Agrupamiento a 348.15 K (75°C)	120
Figura 46	Comparación estructural y energética de los tres agrupamientos mejor posicionados en función a su estructura silvestre	122
Figura 47	Estadístico de la comparación estructural y energética de los tres agrupamientos mejor posicionados en función a su estructura silvestre	123
Figura 48	Comparación entre residuos arginina y lisina para el mismo puente salino	125
Figura 1a	Mecanismo catalítico de la enzima lacasa	156
Figura 2a	Mecanismo de reducción del O ₂ catalizado por la lacasa	157
Figura 3a	Esquematación del ordenamiento topológico para la enzima la lacasa wtTv	170

LISTA DE TABLAS



Tabla 1	Preparados Comerciales a Base de Lacasa para Procesos Industriales	34
Tabla 2	Clasificación de los Organismos con Base a la Temperatura	36
Tabla 3	Estadísticas de Interacción para wtTv, Proteínas Diméricas y Termoestables	75
Tabla 4	Descripción y Localización de las Mutantes de wtTv, wtBs, y wtβglu	77
Tabla 5	Descripción y Localización de las Mutantes de wtTv	79
Tabla 6	Valores Promedios del RMSD para wtTv, wtBs, wtβglu y sus Mutantes	81
Tabla 7	Valores Promedios del Radio de Giro para wtTv, wtBs, wtβglu y sus Mutantes	89
Tabla 8	Estadísticas para Puentes de Hidrógeno	109

INTRODUCCIÓN

Desde la industria del vestido, la farmacéutica, de alimentos o turística hoy en día se buscan certificaciones de “Industria Limpia” o “Calidad ambiental”, es por ello por lo que una producción limpia y generación de desechos cada vez más compatibles con el medio ambiente han generado en todo tipo de industria una expectativa por insertar procesos enzimáticos en sus procesos industriales. En el caso de las enzimas, éstas son una herramienta muy importante en diversos procesos biotecnológicos, desde aquellos poco refinados como la biorremediación hasta procesos más finos, como la catálisis quirál selectiva. Enzimas extracelulares, incluyendo la lacasa que genera peróxido de hidrógeno, son las responsables de la degradación de lignina y compuestos similares. La baja especificidad que presenta y la fuerte habilidad oxidativa de los sistemas de degradación, la hace capaz de atacar un amplio rango de compuestos, muchos de ellos altamente tóxico.

Aunque la enzima lacasa es utilizada en la actualidad por numerosos procesos biotecnológicos/industriales surge el inconveniente que en la mayoría de dichos procesos son llevados a cabo a temperaturas elevadas, lo cual genera que las enzimas pierdan actividad de manera rápida y se utilizan grandes cantidades de ella. A pesar de ello, se continúa la búsqueda enzimas lacasa que sean capaces de utilizarse en diversos procesos biotecnológicos.

En la actualidad los proceso para producir enzimas altamente eficientes son costosos en tiempo, recursos materiales y humanos, tardando muchos de ellos años y algunos de ellos no logrando los fines para los cuales fueron diseñados, es aquí donde nuevas herramientas (*in-silico*) toman mano para el estudio de enzimas de interés biotecnológico/industrial, optimizando tiempos y minimizando recursos. La dinámica molecular como una técnica de estudio para la ciencia en computación biológica se ha posicionado como la técnica predilecta por investigadores en estos campos para el estudio, diseño y creación de nuevas y mejoradas enzimas con capacidad de realizar sus funciones básicas en ambientes extremos.

En la presente Tesis, se ha estudiado computacionalmente las bases moleculares para el diseño de una variante termoestable estructuralmente de la enzima lacasa de *Trametes versicolor* a través de la inserción de puentes salinos en la superficie proteica.

ANTECEDENTES

1.1 Oxidasas Multicobre

1.2 Enzima Lacasa (EC 1.10.3.2)

1.2.1 Propiedades Fisicoquímicas y Estructura de la Lacasa

1.2.2 Mecanismo de Reacción de la Lacasa

1.2.2.1 Sustratos

1.2.3 Evolución de la Lacasa

1.2.4 *Trametes versicolor*

1.3 Aplicaciones Industriales y Biotecnológicas de la Lacasa

1.4 Estabilidad a Altas Temperaturas

1.4.1 Mecanismos de Estabilidad Térmica en Proteínas

1.4.1.1 Enlaces Disulfuro

1.4.1.2 Puentes Salinos

1.4.1.3 Enlaces de Hidrógeno

1.4.1.4 Efecto Hidrofóbico

1.4.1.5 Interacción entre Anillos Aromáticos

1.4.1.6 Reducción de la Flexibilidad

1.4.2 Estudios de Estabilidad Térmica en Lacasa

1.5 Ingeniería de Proteínas y Diseño Racional

1.5.1 Aproximación Computacional

1.6 Dinámica Molecular

1.7 Energía Libre

1.1 Oxidasas Multicobre

Las oxidasas multicobre (MCO) son una superfamilia de proteínas oxidorreductasas que básicamente realizan el proceso de oxidación de cualquier sustrato con características similares al p-difenol, reduciendo directamente el oxígeno molecular a agua a través de un mecanismo de transferencia de cuatro electrones. Contienen al menos cuatro iones de cobre característicos que dan lugar a la formación del centro catalítico de la enzima. Dependiendo de las características espectroscópicas del estado oxidado, cada cobre del centro catalítico es clasificado como tipo 1 (T₁), tipo 2 (T₂) o tipo 3 (T₃) [1].

El cobre T₁ de manera general se encuentra coordinado por dos residuos de histidina y un residuo de cisteína. El resultado del enlace entre el azufre de la cisteína y el cobre forman un complejo de transferencia de carga con una fuerte absorción alrededor de los 600 a 610 nm lo cual causa un intenso color azul. Por esta razón las MCOs son llamadas oxidasas “azules” [2]. La superfamilia MCO se encuentra conformada por un conjunto de familia de enzimas tales como las ceruloplatinas, o ferroxidasas (EC 1.16.3.1), ascorbato oxidasa (EC 1.16.3.3), nitrito reductasa (EC 1.17.2.1) y la lacasa [benzenodiol: oxígeno reductasa (EC 1.10.3.2)], mismas que se encuentran envueltas en procesos fisiológicos diversos.

1.2 Enzima Lacasa (EC 1.10.3.2)

La lacasa es una proteína con actividad del tipo fenoloxidasa (EC 1.10.3.2). Cataliza la oxidación de una gran variedad de moléculas orgánicas, utilizando oxígeno como cosustrato y generando agua como subproducto. La lacasa es activa principalmente sobre compuestos aromáticos, especialmente fenoles sustituidos y aminas aromáticas [3]. La lacasa fue descrita por primera vez del árbol de la laca japonés denominado *Rhus vernicifera*, del cual deriva su nombre, y fue descrita por primera vez por Bertrand como una enzima fúngica a finales del siglo XIX [4,5].

-
1. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper oxidases and oxygenases, *Chemical Reviews*. 1996, 96(1): 2563–2606. doi:10.1021/cr950046o
 2. Messerschmidt A, Huber R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships, *European Journal of Biochemistry*. 1990, 187(2): 341–352. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15311.x
 3. Chapple A, Nguyen LN, Hai FI, et al. Impact of inorganic salts on degradation of bisphenol A and diclofenac by crude extracellular enzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2017, 0(0): 1-8. doi.org/10.1080/10242422.2017.1415332
 4. Yoshida H. LXIII. Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokyo. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 1883, 43: 472-486. doi:10.1039/CT8834300472

La lacasa se encuentra distribuida a lo largo de toda la naturaleza. En organismos vegetales, participa en la formación de la pared celular y en la lignificación; en bacterias, en la producción de melanina y formación de pigmentos; y en insectos, en el endurecimiento y oscurecimiento de la quitina en el exoesqueleto de artrópodos, algunos hongos y bacterias.

No obstante, los organismos más importantes para la producción de la lacasa son los hongos, especialmente en: la formación del cuerpo fructífero, síntesis de pigmentos, procesos de patogénesis y para la degradación y el reciclado de la lignocelulosa. Dentro de los hongos con mayor producción de la enzima lacasa, resaltan los basidiomicetos degradadores de la madera, únicos organismos capaces de degradar eficientemente el polímero de lignina [6, 7].

Debido a su alto potencial industrial la lacasa ha atraído cada vez más la atención de científicos e investigadores en los últimos años. Por lo tanto, el número de publicaciones sobre esta proteína ha aumentado de manera constante en la década de los 80s y 90s a más de 300 publicaciones en el 2017 (**Figura 0**). La mayoría de las investigaciones han sido centradas en lacasas fúngicas, aunque también han sido estudiadas en plantas, insectos, bacterias e incluso arqueas [3 - 7].

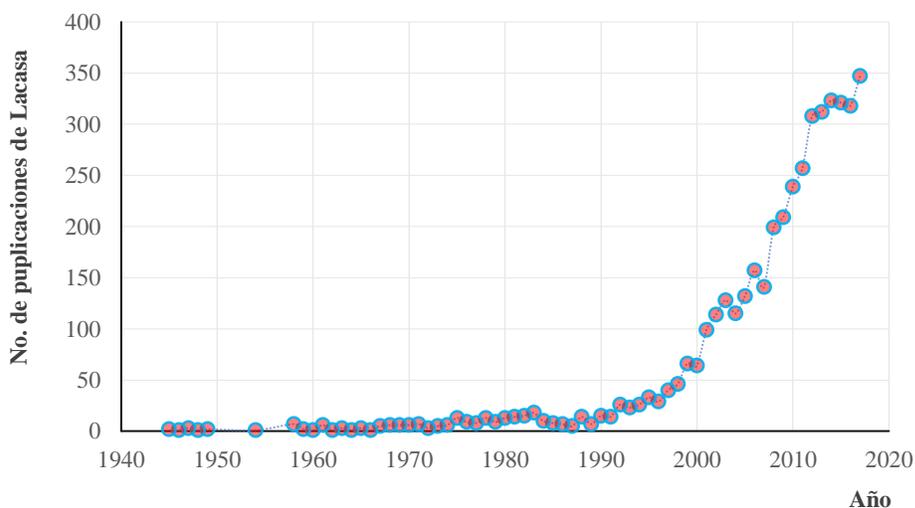


Figura 0. Número de publicaciones anuales sobre lacasa. Datos registrados por el National Center for Biotechnology Information (NCBI) a enero del 2018, palabra clave “laccase” [8].

5. Bertrand G. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*. 1896, 123:463-465.
6. Claus H, Faber G, König H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002.;59:672-678. doi: 10.1007/s00253-002-1047-
7. Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 1994, 140: 19-26. doi: 10.1099/13500872-140-1-19
8. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] <https://http://ncbi.nlm.nih.gov/>

1.2.1 Propiedades Fisicoquímicas y Estructurales de la Lacasa

La enzima lacasa en general es una proteína monomérica con un peso molecular sin carbohidratos de entre 60 a 70 kDa, con carbohidratos puede incrementar su peso hasta en un 20% [9]. Cuentan con un andamiaje altamente conservado formado por tres dominios tipo cupredoxina (**DA**, **DB**, **DC**) y cuatro átomos de cobre catalíticos, no obstante, en los últimos años se han elucidado lacasas de dos dominios de origen bacteriano, que se asocian para formar un trímero activo [10]. En particular, la lacasa fúngica contiene dos puentes disulfuro altamente conservados interdominio, favoreciendo la estabilidad estructural [11] (**Figura 1**).

El plegamiento tipo cupredoxina cumple con una arquitectura de barril tipo β (Greek-key motif) entrelazando hojas y láminas tipo β formando una conformación tipo sándwich, encontrándose conservado a lo largo de las proteínas de cobre azul, teniendo un ancestro común entre ellas [12]. Para el caso de las MCOs formadas por tres dominios, el alto grado de homología las hace virtualmente indistinguibles en su plegamiento y estructura. Sin embargo, el cobre tipo 1 y su entorno las hace significativamente distintas, siendo este átomo de cobre el que proporciona la especificidad al sustrato [13].

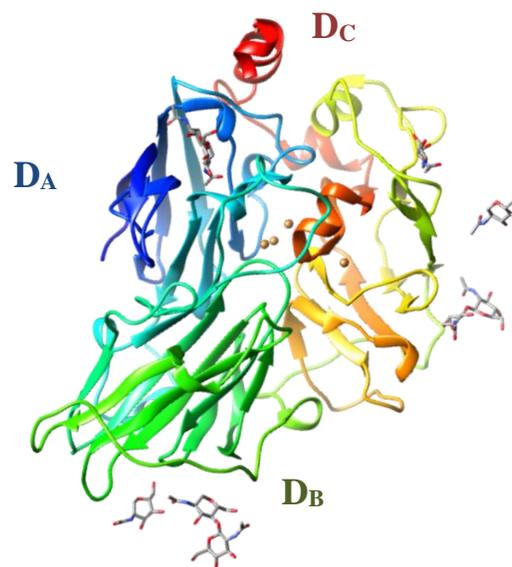


Figura 1. Estructura de la lacasa de *Thermus thermophilus* (PDB: 5JRR) [14]. Los átomos de cobre están representados como esferas, y los residuos de azúcares como barras blancas sobre la superficie de la proteína. En tonalidad azul se aprecia el dominio número 1 comprendido por los residuos 1 a 158, en verde el dominio 2 del residuo 159 al 303y por último en naranja-rojo, el dominio 3 del residuo 304 al 462.

- Claus H. Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron*. 2004, 35:93-96. doi: 10.1016/j.micron.2003.10.029
- Muthukumarasamy NP, Murugan S. Production, purification and application of bacterial laccase: a review. *Biotechnology*. 2014, 13: 196-205. doi: 10.3923/biotech.2014.196.205
- Hakulinen N, and Rouvinen J. Three-dimensional structures of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015, 72: 857-868. doi: 10.1007/s00018-014-1827-5
- Dwivedi UN, Singh P, Pandey VP, et al. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011, 68: 117–128. doi: 10.1016/j.molcatb.2010.11.002
- Nakamura K, Go N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005, 62: 2050-2066. doi: 10.1007/s00018-004-5076-5
- Diaz A, Ruiz RR, Rosas E. et al. Crystal structure of native laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *To be published*. 2017 doi: 10.2210/pdb5JRR/pdb

La lacasa contiene cuatro átomos de cobre, los cuales han sido clasificados en tres tipos, cada uno de ellos acorde a sus espectros de absorción y de resonancia paramagnética electrónica [15]. En conjunto forman un agrupamiento tetranuclear [(TNC) (**Figura 2**)], y un ciclo de óxido reducción complejo (**Apéndice Mecanismo de Actividad, Figura a1**).

Dichos átomos de cobre se encuentran agrupados en tres sitios redox [16]:

- Tipo 1 (**T₁**): cobre azul da el característico color azul a la enzima, de allí uno de sus nombres “oxidasa de cobre azul”, el único unido con un residuo de cisteína.
- Tipo 2 (**T₂**): no confiere color, aunque si es detectable por técnicas de EPR, generalmente se encuentra asociado a una molécula de agua.
- Tipo 3 (**T₃**): dos átomos de cobre con carácter diamagnético debido al acoplamiento antiferromagnético, mediados por un hidroxilo.

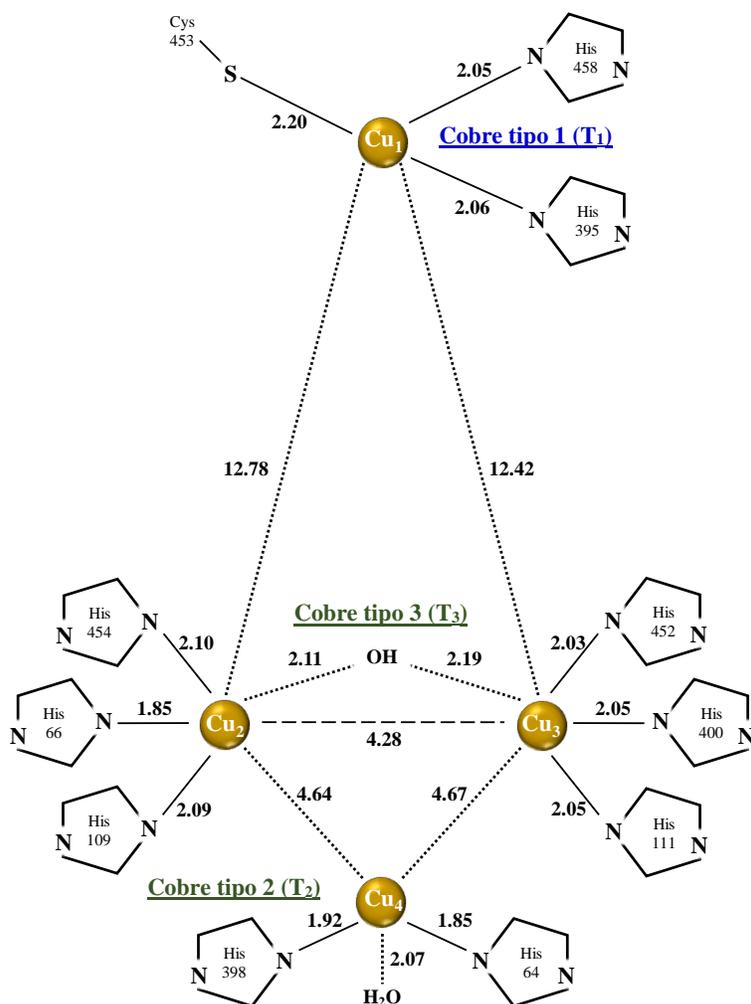


Figura 2. Esquema de los tres tipos de cobre encontrados en la lacasa [16].

Los cobres T₂ y T₃ se encuentran coordinados por ocho residuos de histidina provenientes de los dominios D_A y D_C a partes iguales, al tiempo que el cobre T₁ se encuentra coordinado por dos residuos de histidina y un residuo de cisteína, los tres del dominio D_C. A su vez, la lacasa de plantas y bacterias pueden presentar una metionina como cuarto ligando coaxial en el sitio del cobre T₁ y coordinado a éste, para la lacasa fúngica el residuo de metionina puede ser intercambiado por una leucina o fenilalanina que por su parte no coordina al cobre T₁ [16]. Basándose en una comparación de más de 100 secuencias de lacasas de diversos organismos, Dwiniveri y colaboradores encontraron en el 2011 una huella o firma en la secuencia [12].

Esta firma secuencial distingue a la lacasa de otras MCO, dado que los átomos de cobre se encuentran distribuidos en cuatro segmentos altamente conservados de entre 8 y 24 aminoácidos, denominados L1-L4, donde los 11 o 12 residuos que enlazan a los átomos de cobre se encuentran altamente conservados (**Figura 2**) a lo largo de toda la familia de las lacasas.

1.2.2 Mecanismo de Reacción de la Lacasa

La reacción que cataliza la lacasa es la siguiente:



Los cobres T₂ y T₃ forman un agrupamiento trinuclear que es el lugar donde se reduce el oxígeno [15]. El cobre del centro T₁ es el primer aceptor de electrones del sustrato. El sustrato natural puede ser un grupo fenólico lignocelulósico. Dentro de los sustratos sintéticos se encuentran los fenoles y aminas sustituidas.

Los electrones removidos del sustrato durante su oxidación se transfieren secuencialmente al centro T₂-T₃. Una vez colectados cuatro electrones este conjunto reduce una molécula de oxígeno que junto a dos hidrógenos forman dos moléculas de agua. Así la oxidación monoelectrónica del sustrato va acoplada a la reducción por cuatro electrones del oxígeno molecular.

-
15. Quintanar L, Stoj CS, Taylor AB, et al. Shall we dance? How a multicopper oxidase chooses its electron transfer partner. *Accounts of Chemical Research*. 2007, 40 :445-452. doi: [10.1021/ar600051a](https://doi.org/10.1021/ar600051a)
 16. Jones SM, Solomon EI. Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015, 72: 869-883. doi: [10.1007/s00018-014-1826-6](https://doi.org/10.1007/s00018-014-1826-6)
 17. Santhanam N, Vivanco JM, Decker SR, et al. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends in Biotechnology*. 2011, 29: 480-489. doi: [10.1016/j.tibtech.2011.04.005](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.005)

1.2.2.1 Sustratos

En la naturaleza existen varios organismos capaces de degradar parcialmente la lignina para acceder y aprovechar las cadenas de celulosa. No obstante, los únicos organismos capaces de degradar la lignina en su totalidad son los hongos basidiomicetos.

Dentro de este tipo de hongos destacan los hongos de la podredumbre blanca de la madera, denominados así por el residuo de color blanquisco rico en celulosa que genera el hongo después de ejercer su actividad lignocelulósica sobre la madera. Múltiples estudios realizados sobre la degradación de la lignina describen un proceso oxidativo inespecífico, catalizado por enzimas y agentes oxidantes de bajo peso molecular (**Figura 3**).

La acción catalítica de la lacasa suele ser “promiscua” ya que puede realizar la oxidación de orto y para difenoles, amino fenoles, dímeros de lignina fenólicos e incluso no fenólicos en presencia de algunos intermediarios [17, 18].

La oxidación monoelectrónica de un sustrato por la lacasa implica la formación de un radical libre. Estos radicales posteriormente pueden ser oxidados a quinonas por la lacasa o bien sufrir reacciones no enzimáticas variadas.

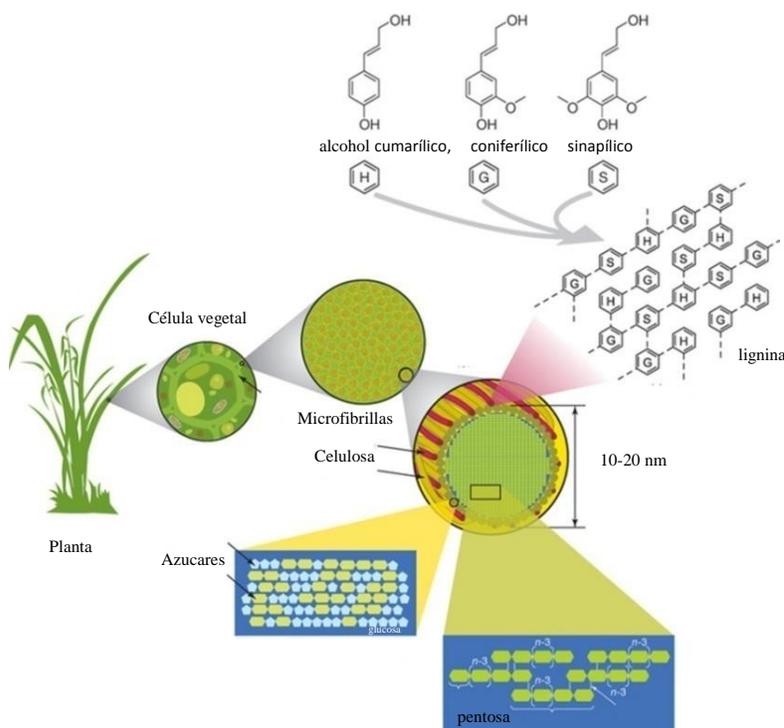


Figura 3. Esquemización del organismo vegetal y ubicación de la molécula de lignina. Modelo de la estructura del polímero de lignina, y sus precursores alcohólicos fenilpropanoicos cumarílico (H), coniferílico (G) y sinapílico (S).

18. Legerská B, Chmelová D, Ondrejovič M. Degradation of synthetic dyes by laccases: a mini-review. *Nova Biotechnologica et Chimica*. 2016, 15(1): 90-106. doi: 10.1515/nbec-2016-0010

La oxidación de fenoles frecuentemente produce reacciones de acoplamiento carbono-carbono y carbono-oxígeno entre los radicales, lo que origina productos de mayor peso molecular que los sustratos, es decir, reacciones de polimerización.

La tendencia de la lacasa de provocar polimerización no es una desventaja cuando es aprovechada en procesos de biorremediación, ya que la polimerización oxidativa de los contaminantes puede ser un método aceptable para su eliminación [19]. Para medir la actividad de las lacasas, se han utilizado mediadores sintéticos como el [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonato)] (ABTS) o 1-hidroxibenzotriazol y naturales como 4-hidroxibenzóico, 4-hidroxibenzol y 3- hidroxiantranilato [20].

1.2.3 Evolución de la Lacasa

Para 1998 Ducros y colaboradores elucidaron la primera estructura tridimensional de lacasa proveniente del hongo *Coprinus cinereus* [21]. No obstante, hasta el año 2004 se consideró que la arquitectura de toda lacasa debería estar constituida de tres dominios tipo cupredoxina, fue entonces que Canters y colaboradores elucidaron otra clase de lacasa, a la cual llamaron “lacasa pequeña” por estar constituida de dos dominios $D_A:D_C$, eliminando el D_A de su estructura [22].

En la lacasa de tres dominios, el D_A es responsable de la conexión y formación del agrupamiento trinuclear entre caras para los dominios D_A y D_C [23]. Como resultado de la ausencia de este dominio en la lacasa pequeña, la formación del agrupamiento trinuclear es imposible, generando estructuras semi-inestables sin embargo, la evolución generó nuevas estrategias para la generación del agrupamiento trinuclear mediante el ensamblaje de monómeros de dos dominios en MCOs de mayor tamaño (**Figura 4**), dando mayor estabilidad y funcionalidad a este tipo de proteínas [22 - 24].

-
19. Viswanath B, Rajesh B, Janardhan A, et al. Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Research*. 2014, 2014: 163242 doi: [10.1155/2014/163242](https://doi.org/10.1155/2014/163242).
 20. Morozova OV, Shumakovich GP, Shleev SV, et al. Laccase-mediator systems and their applications: a review. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*. 2007, 43(5): 583-97. doi: [10.1134/S0003683807050055](https://doi.org/10.1134/S0003683807050055)
 21. Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, et al. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Structural Biology*. 1998, 5(4): 310–316, 1998. doi: [10.1038/nsb0498-310](https://doi.org/10.1038/nsb0498-310)
 22. Machczynski MC, Vijgenboom E, Samyn E, et al. Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Science*. 2014, 13(9): 2388–2397. doi: [10.1110/ps.04759104](https://doi.org/10.1110/ps.04759104)
 23. Nakamura K, Kawabata T, Yura K, et al. Novel types of two-domain multi-copper oxidases: possible missing links in the evolution. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 2003, 553(3): 239–244. doi: [10.1016/j.jmb.2008.11.024](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.11.024)
 24. Viswanath B, Rajesh B, Lawton TJ, et al. Crystal structure of a two-domain multicopper oxidase: implications for the evolution of multicopper blue proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, 284(15): 10174-80. doi: [10.1074/jbc.M900179200](https://doi.org/10.1074/jbc.M900179200).

El descubrimiento de la lacasa de dos dominios es un prometedor modelo para el estudio de la evolución de las MCOs. Acorde a este modelo evolutivo, el origen de las MCO de tres dominios como lo es la lacasa, indica que ésta se estructuró a partir de una duplicación del dominio tipo cupredoxina de que alberga el centro de cobre T₁ (**Figura 4**).

Como lo define Nakamura y colaboradores [23], la creación del sitio activo así como la evolución de la lacasa pueden ser explicadas por múltiples eventos en la evolución, tales como la inserción y/o deleción de átomos de cobre, la triplicación del dominio con arquitectura tipo cupredoxina, hasta del rearrreglo espacial.

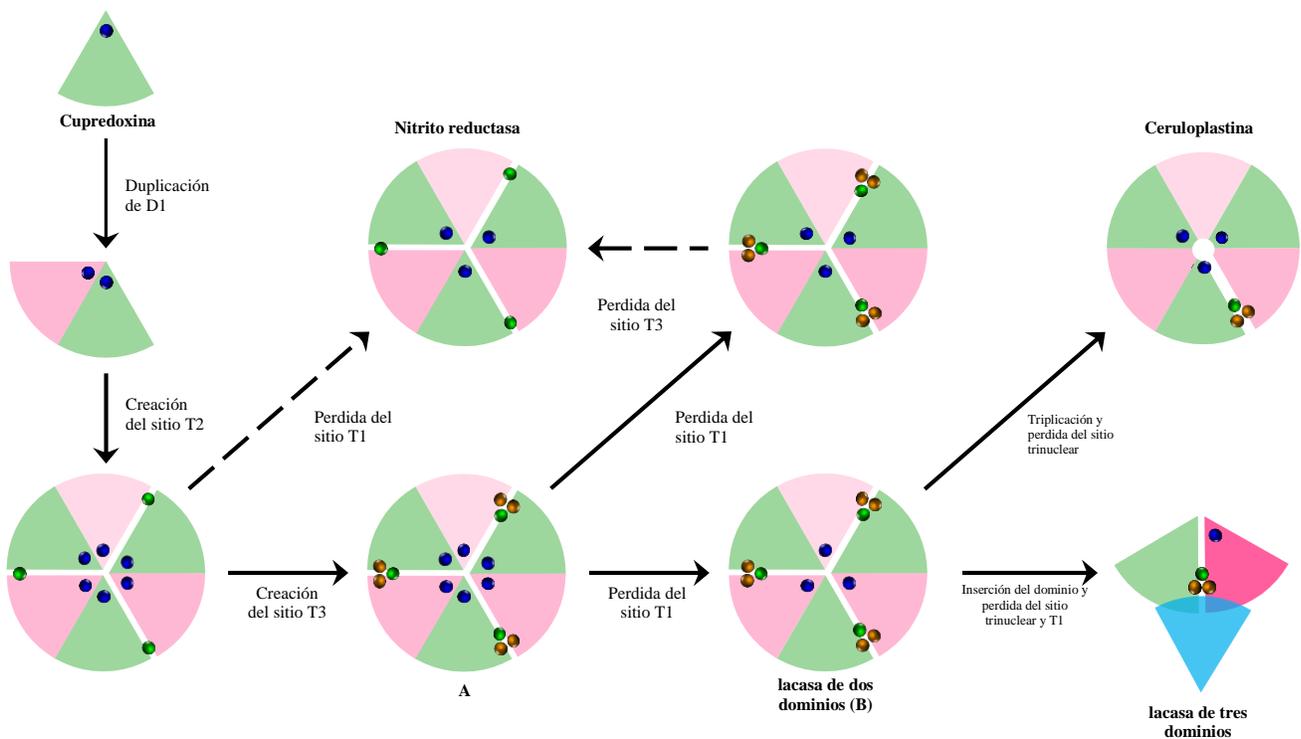


Figura 4. Modelo evolutivo de la lacasa. El ancestro común de las MCOs es la cupredoxina. Múltiples eventos evolutivos muestran los intercambios, inserciones y deleciones que dieron lugar a la enzima lacasa. Los intermediarios A y C han sido identificados vía screening genómico. Líneas punteadas presentan eventos inciertos y flechas sólidas indican la vía evolutiva propuesta. Figura adaptada de Nakamura et al. Círculos: cobre T₁ (azul), cobre T₂ (verde) cobre T₃ (naranja).

1.2.4 *Trametes versicolor*

Trametes versicolor, también conocido como *Coriolus versicolor* o *Polyporus versicolor* es un hongo extremadamente común que puede encontrarse globalmente. En la naturaleza se presenta en colores variados, de allí el sufijo *versicolor*.

Este tipo de hongo produce la enzima lacasa como medio deslignificante de la celulosa para que el hongo logre sustraer los nutrientes de organismos vegetales superiores [14]. Por esta razón se han utilizado de estos hongos en biorremediación, y también han sido utilizados en detoxificación de suelos *in situ* y en biorreactores para la decoloración de efluentes industriales, entre otras aplicaciones [18-20].

La lacasa con mayor potencial redox es la excretada por *T. versicolor*. Dos de estas lacasas fúngicas han sido cristalizadas y depositadas en el **Protein Data Bank (PDB)** con códigos **1KYA** [25] y **1GYC** [26].

1.3 Aplicaciones Industriales y Biotecnológicas de la Lacasa

La lacasa puede oxidar una amplia gama de sustratos, teniendo como único subproducto de reacción el agua [27]. Esto hace que la lacasa sea un candidato atractivo para su aplicación en diferentes procesos industriales [18-20, 27, 28]. De hecho, el uso potencial de la lacasa para fines industriales y biotecnológicos es un área de gran potencial para investigación (**Figura 5**)

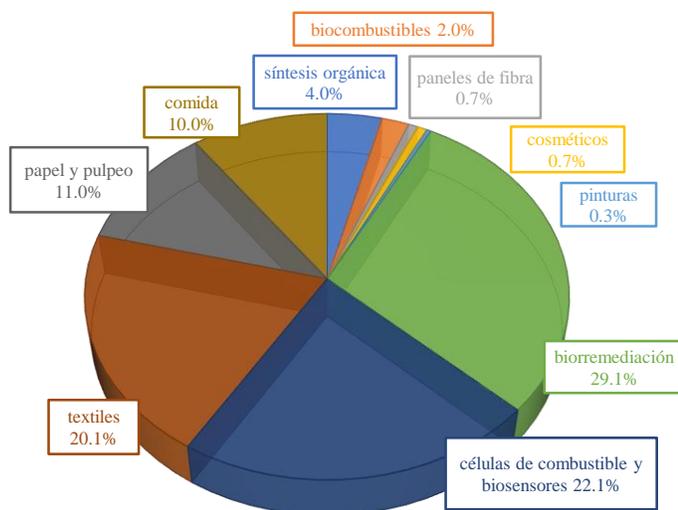


Figura 5. Desglose de las aplicaciones biotecnológicas de la lacasa. Datos Extraídos del NCBI utilizando palabras clave Laccase* en conjunto con paint*, cosmetic*, fibreboard*, biofuel*, organic* synthesis, food* industry, pulp* and paper* industry, textil* industry, biosensor* y bioremediation* alternadamente [8].

25. Bertrand T, Jolival C, Briozzo P, et al. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*. 2002, 41: 7325-33 doi: [10.1021/bi0201318](https://doi.org/10.1021/bi0201318)
26. Piontek K, Antorini M, Choinowski T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers., *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 37663-9. doi [10.1074/jbc.M204571200](https://doi.org/10.1074/jbc.M204571200)
27. Su J, Fu J, Wang Q, et al. Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2018, 38(2): 294-307. doi: [10.1080/07388551.2017](https://doi.org/10.1080/07388551.2017)
28. Upadhy P, Shrivastava R, Agrawal PK. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*. 2016.;6(1): 15. doi:[10.1007/s13205-015-0316-3](https://doi.org/10.1007/s13205-015-0316-3)
29. Virk AP, Sharma P, Capalash N. Use of laccase in pulp and paper industry. *Biotechnol Progress*. 2012.;28(1): 21-32. doi: [10.1002/btpr.727](https://doi.org/10.1002/btpr.727)

Los procesos tradicionales de deslignificación y pulpeo en la industria del papel requieren de altas cantidades de oxidantes químicos. Con el fin de establecer procesos más seguros, ecológicos y ambientales, actualmente las industrias comienzan a utilizar enzimas. A la luz del uso de enzimas, la lacasa es la más promisoría para los procesos de deslignificación a escala industrial [29], lográndose con esto una disminución significativa en los contaminantes producidos por los procesos tradicionales de deslignificación [30].

Hoy en día, la industria del pulpeo en Estados Unidos cuenta con una serie de patentes, en la cual se utiliza lacasa de *Trametes versicolor* en combinación con mediadores químicos con la finalidad de tratar diferentes tipos de fibras y obtener procesos ambientalmente amigables, denominado Lignozym-process®. En la **Tabla 1** hay un compendio de las tres principales industrias y sus productos.

Tabla 1: Preparados Comerciales a Base de Lacasa para Procesos Industriales

	<i>Aplicación principal</i>	<i>Marca</i>	<i>Empresa</i>
<i>Alimentos</i>	Fabricación de cerveza	Flavourstar	Advanced Enzyme Technologies Ltd. (India)
	Mejoramiento del color en té, jugo, ...etc.	LACCASE Y120	Amano Enzyme USA Co. Ltd.
	Corcho	Suberace	Novozymes (Dinamarca)
<i>Papel</i>	Blanqueo de la Pulpa	Lignozym-process	Lignozym GmbH (Alemania)
	Deslignificación de la pulpa de papel	Novozym 51003	Novozymes (Dinamarca)
<i>Textil</i>	Blanqueamiento tipo Denim	Bleach Cut 3-S	Season Chemicals (China)
		DeniLite	Novozymes (Dinamarca)
		ZyLite	Zytext Pvt. Ltd. (India)
	Refinamiento tipo Denim	Cololacc BB	Colotex Biotechnology Co. Ltd. (Hong Kong)
		Ecostone LC10	AB Enzymes GmbH (Alemania)
blanqueamiento y sombreado tipo Demin	IndiStar	Genencor Inc. (Rochester, USA)	
	Novoprime Base 268	Novozymes (Dinamarca)	
	Primagreen Ecofade LT100	Genencor Inc. (Rochester, USA)	

30. Paz A, Carballo J, Pérez M., et al. Biological treatment of model dyes and textile wastewaters. *Chemosphere*. 2017, 181: 168-177. doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.04.046](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.046)
31. Du X, Li J, Gellerstedt G, et al. Understanding pulp delignification by laccase-mediator systems through isolation and characterization of lignin-carbohydrate complexes. *Biomacromolecules*. 2013. 14 (9): 3073– 3080. doi: [10.1021/bm4006936](https://doi.org/10.1021/bm4006936)

Múltiples procesos envuelven la utilización de la lacasa en la industria textil, tanto que algunos de ellos han sido comercializados por empresas, ejemplo de ello son los productos: Denilite y Novoprime Base 268 de Novozymes, PrimaGreen EcoFade LT100 y Ecostone LC10 de Genenchor. Es usada para mejorar la blancura del algodón y para los acabados de la mezclilla en la producción de jeans, así como de otras telas tipo denim con fines de obtener un aspecto desteñado [31]. La degradación de moléculas contaminantes puede ser utilizada de la misma manera en la biorremediación de aguas y suelos [32].

En la industria cosmética, la lacasa es utilizada como una alternativa suave y factible para la decoloración de cabello, aclarado de la piel y en higiene bucal [33, 34]. Las aplicaciones de lacasa en la industria de los alimentos son variadas y bastas. La estabilización del vino y la cerveza puede lograrse mediante la reducción los polifenoles al adicionarse lacasa en el proceso. En el mismo camino, la clarificación y estabilización de jugos de frutas se facilita al usar lacasa en combinación con técnicas de ultrafiltración [35].

La preparación de lacasa “Suberase” producida por Novozymes para uso comercial, es utilizada para el tratamiento de corcho, dado que el 2,4,6-tricloroanisol contenido en el corcho de los tapones del vino a concentraciones de 10ppt pueden alterar el sabor y a concentraciones mayores de 100ppt destruirlo. Es así que la oxidación y polimerización previene la lixiviación del tricloroanisol de los tapones de corcho, minimizando el deterioro del vino por contaminación. En la industria de la panificación la lacasa es utilizada para mejorar la fuerza y estabilidad de la masa reduciendo la adherencia. Así también, es usada en el tratamiento de otros alimentos, ralentizando su deterioro o mejorando sus propiedades organolépticas [36].

-
32. Chauhan PS, Goradia B, Saxena A. Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech*. 2017, 7(5): 323. doi: [10.1007/s13205-017-0955-7](https://doi.org/10.1007/s13205-017-0955-7)
 33. Yang J, Li W, Ng TB, and et al. Laccases: production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 16(8): 832. doi: [10.3389/fmicb.2017.00832](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00832)
 34. Mate DM, Alcalde M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology*. 2017, 10(6): 1457-1467. doi: [10.1111/1751-7915](https://doi.org/10.1111/1751-7915)
 35. Osma JF, Toca-Herrera JL, Rodríguez CS. Uses of laccases in the food industry. *Enzyme research*. 2010, 918761. doi: [10.4061/2010/918761](https://doi.org/10.4061/2010/918761)
 36. Lettera V, Pezzella C, Cicatiello P, et al. Efficient immobilization of a fungal laccase and its exploitation in fruit juice clarification. *Food Chemistry*. 2016, 196: 1272-8. doi: [10.1016/j.foodchem.2015.10.074](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.074)
 37. Kudanga T, Nemađziva B, Le Roes-Hill M. Laccase catalysis for the synthesis of bioactive compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017, 101(1): 13-33. doi: [10.1007/s00253-016-7987-5](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7987-5)
 38. Kudanga T, and Le Roes-Hill M. Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, 98(15): 6525-42. doi: [10.1007/s00253-014-5810-8](https://doi.org/10.1007/s00253-014-5810-8)
 39. Kılıç N, Nasiri F, Cansaran DD. Fungal laccase enzyme applications in bioremediation of polluted wastewater. *Phytoremediation*. 2016, 4: 201-209. doi: [10.1007/978-3-319-41811-7_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41811-7_11)

En química orgánica, la lacasa ha sido utilizada para la síntesis de quinonas y nuevos antibióticos, para la condensación oxidativa de colorantes de indamina, para la oxidación selectiva de azúcares derivados de ácidos carboxílicos [36, 37].

La lacasa puede ser inmovilizada sobre electrodos facilitando su integración en dispositivos bio-electroquímicos para mediar la transferencia directa de electrones, en biosensores para la determinación de polifenoles en el vino. En cooperación con la glucosa-oxidasa, la lacasa puede ser utilizada para la generación de biocombustibles y alimentar sensores y transmisores para vigilancia médica sin necesidad de energización externa [38].

Además del tratamiento de efluentes en la industria papelera, la industria textil, las industrias cerveceras y de aceites, la lacasa son capaces de degradar xenobióticos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), clorofenoles, compuestos fitosanitarios y fármacos (contaminantes emergentes) presentes en agua o suelos [39, 40].

1.4 Estabilidad a Altas Temperaturas

Las células sobreviven a una gran variedad de condiciones por lo que las proteínas realizan sus funciones de una manera orquestada y eficiente. La función de las proteínas, especialmente en las enzimas, se encuentra optimizada a través de la evolución para que coincida con su entorno ambiental, adaptadas muchas de ellas para sobrevivir en condiciones extremas, ejemplo de ello sería las Temperatura o el pH [41 - 43]. Basados en su temperatura, los macroorganismos pueden ser clasificados en cuatro grupos **Tabla 2**.

Tabla2. Clasificación de los Organismos con Base a la Temperatura

Clase	Temperatura °C
Psicrófilos	5 - 20
Mesófilos	20 – 40
Termófilos	40 – 80
Hipertermófilos	80 >

40. Naghdi M, Taheran M, Brar SK. Immobilized laccase on oxygen functionalized nanobiochars through mineral acids treatment for removal of carbamazepine. *Science of the Total Environment*. 2017, 584-585:393-401. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.021
41. Rampelotto PH. Extremophiles and extreme environments. *Life (Basel)*. 2013, 3(3): 482–485. doi: 10.3390/life3030482
42. Gupta. GN, Srivastava S, KhareSK. et al. Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Bioresearch*. 2014, 7(2): 371-380. doi: 10.5958/2230-732X.2014.00258.7

Desde el punto de vista de la biología celular, los componentes de la membrana juegan un papel importante en el caso de la adaptación en ambientes extremos [43]. Es por ello que en la adaptación a temperaturas extremas, en su mayoría los componentes celulares como las proteínas, pueden ser termoestables [44].

Complejos enzimáticos de microorganismos extremófilos han sido de interés a través de los años por sus características únicas, especialmente por su resistencia a altas temperaturas. Tal habilidad ha atraído gran atención de científicos e investigadores por descubrir los mecanismos de estabilidad en este tipo de enzimas y debido a la existencia de microorganismos capaces de vivir en condiciones extremas, se ha despertado el interés en el estudio de sus componentes macromoleculares [45].

Hoy en día, las aplicaciones industriales de enzimas están continuamente expandiéndose. Pero, para que una enzima posea características óptimas para el entorno industrial, debe de cumplir con características tales como: tener una actividad y estabilidad a altas temperaturas y a altas concentraciones de solventes orgánicos, sustratos y productos [46, 47]. Específicamente, trabajar a altas temperaturas es favorable en aplicaciones industriales debido a que ello incrementa la solubilidad, minimiza la contaminación microbiana, e incrementa las velocidades de reacción. Sin embargo, la mayoría de las enzimas con valor industrial agregado, se desnaturalizan a pocos grados por arriba de su temperatura óptima.

La mayoría de las enzimas que se encuentran disponibles de forma natural, o incluso las comerciales no son óptimas para las condiciones habituales en las cuales se llevan a cabo los procesos industriales y bioquímicos. Por lo tanto, para el aprovechamiento de una enzima, se han aplicado y desarrollado diferentes esquemas en ingeniería de proteínas con el fin de modificar sus propiedades de forma controlada. Como ya se ha descrito anteriormente, la ingeniería de proteínas ha sido objeto de una serie de investigaciones para preparar enzimas con mayor termoestabilidad que pueden ser utilizadas en aplicaciones a altas temperaturas mediante la introducción de una mínima perturbación estructural [48].

-
43. Brooks AN, Turkarslan S, Beer KD, et al. Adaptation of cells to new environments. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2011, 3(5): 544–561. doi: [10.1002/wsbm.136](https://doi.org/10.1002/wsbm.136)
 44. Bleuven C, Landry CR. Molecular and cellular bases of adaptation to a changing environment in microorganisms. *Proceedings of the Royal Society*. 2016, 283: 20161458. doi: [10.1098/rspb.2016.1458](https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1458)
 45. Cokera JA. Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. *F1000Research*. 2016, 5: F1000. doi: [10.12688/f1000research.7432.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.7432.1)
 46. Hlodan O. Evolution in Extreme Environments. *BioScience*. 2010, 60(6): 414–418, doi: [10.1525/bio.2010.60.6.4](https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.6.4)

1.4.1 Factores de Influencia en la Estabilidad Térmica de Proteínas

Fue en 1975 que se publicó el primer estudio de las posibles causas que producen estabilidad de proteínas extraídas de organismos termófilos [49]. Desde entonces, han surgido numerosos estudios teóricos y experimentales que han tenido como finalidad aclarar las bases que determinan la termoestabilidad. Sin embargo, esta cuestión sigue siendo una materia comprendida sólo parcialmente. Dentro de los estudios elaborados con fines de estudiar las razones de la termoestabilidad en proteínas, han surgido aparentes contradicciones. Tales conclusiones se deben a que las diferentes familias de proteínas adoptan distintas estrategias para adaptarse a la temperatura [40 - 51]. Cuando se considera un grupo de proteínas de diversas familias, los diferentes mecanismos de estabilización adoptados por cada familia se compensan entre sí dando lugar a una diferencia estadísticamente no significativa [52 - 55].

Así entonces, puede concluirse que no existen aminoácidos nuevos, ni modificaciones covalentes o motivos estructurales únicos en las proteínas de organismos termófilos y extremófilos que expliquen su estabilidad, respecto a sus homólogos mesófilos [49, 52, 53]. De hecho, argumentan Sterpone y colaboradores, que la mayor estabilidad de las proteínas termófilas se debe a la existencia de sutiles redistribuciones de las mismas interacciones existentes en los organismos mesófilos [51].

1.4.1.1. Enlaces Disulfuro

Los enlaces disulfuro son esenciales para el plegamiento y estabilidad en proteínas. Se cree que los enlaces disulfuro disminuyen la entropía conformacional y aumentan la energía libre del estado desnaturalizado (desplegado), proporcionando así estabilidad a la proteína plegada [54].

-
47. Littlechild JA. Enzymes from extreme environments and their industrial applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2015, 3: 161. doi: [10.3389/fbioe.2015.00161](https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00161)
 48. Shih HH, Brady J, Karplus M. Structure of proteins with single-site mutations: a minimum perturbation approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985, 82(6): 1697–1700. doi: [10.1073/pnas.82.6.1697](https://doi.org/10.1073/pnas.82.6.1697)
 49. Perutz, MF, Raidt, H. Stereochemical basis of heat stability in bacterial ferredoxins and in haemoglobin A2 *Nature*. 1975, 255: 256-259. doi: [10.1038/255256a0](https://doi.org/10.1038/255256a0)
 50. Fields PA, Dong Y, Meng X, et al. Adaptations of protein structure and function to temperature: there is more than one way to 'skin a cat'. *Journal of Experimental Biology*. 2015, 218(12): 1801-11. doi: [10.1242/jeb.114298](https://doi.org/10.1242/jeb.114298).
 51. Dong YW, Liao ML, Meng XL, et al. Structural flexibility and protein adaptation to temperature: Molecular dynamics analysis of malate dehydrogenases of marine molluscs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018, pii: 201718910. doi: [10.1073/pnas.1718910115](https://doi.org/10.1073/pnas.1718910115)
 52. Stirnemann G, Sterpone F. Mechanics of protein adaptation to high temperatures. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2017, 8(23): 5884-5890. doi: [10.1021/acs.jpcl.7b02611](https://doi.org/10.1021/acs.jpcl.7b02611)
 53. Gromiha MM, Suresh MX. Discrimination of mesophilic and thermophilic proteins using machine learning algorithms. *Proteins*. 2008, 70(4): 1274-9. doi: [10.1002/prot.21616](https://doi.org/10.1002/prot.21616)

Diversos estudios con aplicaciones biomédicas e industriales han tratado de aumentar la estabilidad por medio de la inserción de enlaces disulfuro [55, 56]. Estudios computacionales han conferido un papel crítico de los enlaces disulfuro en la estabilización térmica y estructural de proteínas. Así mismo mediante estudios *in-silico* se determinó que la riqueza de los disulfuros en organismos procariotas es extensa, identificándose un mayor número de éstos en organismos termófilos.

Por otro lado, se ha demostrado que la riqueza de enlaces disulfuro es dependiente de la longitud de la secuencia de aminoácidos, teniendo un fuerte punto de inflexión cerca de los 200 residuos entre cisteínas que formarían dicho puente [57].

1.4.1.2. Puentes Salinos

Los puentes salinos (enlaces iónicos) son claves para la rigidez de la estructura en proteínas termófilas promoviendo la tolerancia a la temperatura [58]. El puente salino es una interacción electrostática entre los grupos ácidos carboxílicos y básicos amino y guanidino. Se encuentra formado entre aminoácidos cargados, del tipo glutámico, aspártico, arginina y lisina [59].

Un extenso número de investigaciones fundamenta una relación estrecha entre el número de puentes salinos y la flexibilidad conformacional en proteínas, argumentando que estos dos factores son claves en las fuerzas que determinan la estabilidad en proteínas, contribuyendo aproximadamente según el tipo de residuos involucrados y su posición en las proteínas desde $1.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ hasta 4.5 a $6.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ [60 - 64].

Estudios realizados por Nussinov determinaron que un tercio de los puentes salinos contenidos en proteínas tienen nula exposición al solvente, es decir, están en el interior de la proteína y los dos tercios restantes se encuentran expuestos al solvente. Ante tal hecho Nussinov argumenta, que tal suceso es debido al alto costo o “penalización” sobre la energía de la proteína por la desolvatación de un puente de sal en el interior o no expuesto al solvente [56, 58, 65].

-
54. Pack SP, Yoo YJ. Protein thermostability: structure-based difference of amino acid between thermophilic and mesophilic proteins. *Journal of Biotechnology*. 2004, 111(3): 269-77. doi: [10.1016/j.jbiotec.2004.01.018](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.018)
55. Amadei A, Del Galdo S, D'Abramo M. Density discriminates between thermophilic and mesophilic proteins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2017, 13: 1-9. doi: [10.1080/07391102.2017.1385537](https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1385537)
56. Dombkowski AA, Sultana K, et al. Protein disulfide engineering. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 2014, 588(2): 206-12. doi: [10.1016/j.febslet.2013.11.024](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.024)

A partir de múltiples investigaciones realizadas con fines de estudiar los puentes salinos y estabilidad en proteínas (muchos de ellos no enlistados en las referencias) pueden ser extraídas cuatro grandes características [58 -68]:

- i. Un tercio de los residuos que estructuran un puente salino forman parte de una red de puentes salinos, dando lugar a un agrupamiento de interacciones iónicas.
- ii. Las redes de puentes salinos expresan una fuerza cooperativa de estabilización en proteínas, son reversibles, actúan en etapas y permiten las fluctuaciones de energía de la proteína.
- iii. El intercambiar un residuo cargado a una interacción simple representa un cambio de geometría menor, pero proporciona a la proteína una interacción más compleja.
- iv. La arginina es un aminoácido “conector tipo llave” o de ramificación, debido a su geometría y rotámeros.
- v. El aumento de los puentes salinos se considera una de las estrategias más eficaces para aumentar la estabilidad térmica de las proteínas [60, 62, 64].

1.4.1.3. Enlaces de Hidrógeno

El puente de hidrógeno es la más importante interacción no covalente. Los puentes de hidrógeno son centrales y fundamentales para conservar la rigidez del esqueleto proteico a altas temperaturas [69].

-
57. Bošnjaki, Bojović V, Šegvić-Bubić T, et al. Occurrence of protein disulfide bonds in different domains of life: a comparison of proteins from the Protein Data Bank. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2014, 27 (3): 65-72. doi: 10.1093/protein/gzt063
 58. Sarakatsannis JN, Duan Y. Statistical characterization of salt bridges in proteins. *Proteins*. 2005, 60(4): 732-9. doi: 10.1002/prot.20549
 59. Kumar S, Nussinov R. Salt bridge stability in monomeric proteins. *Journal of Molecular Biology*. 1999, 293(5) :1241-55. doi: 10.1006/jmbi.1999.3218
 60. Karshikoff, A.; Jelesarov, I. Salt bridges and conformational flexibility: effect on protein stability. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2008. 22(1): 606-611. doi: 10.1080/13102818.2008.10817520
 61. Makhatadze GI, Loladze VV, Ermolenko DN, et al. Contribution of surface salt bridges to protein stability: guidelines for protein engineering *Journal of Molecular Biology*. 2003, 327(5):1135-48. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00233-X
 62. Salam NK, Adzhigirey M, Sherman W, et al. Structure-based approach to the prediction of disulfide bonds in proteins. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2014, 27(10): 365-74. doi: 10.1093/protein/gzu017
 63. Fass D. Disulfide bonding in protein biophysics. *Annual Review of Biophysics*. 2012, 41: 63-79. doi: 10.1146/annurev-biophys-050511-102321
 64. Xiao S, Patsalo V, Shan B, et al. Rational modification of protein stability by targeting surface sites leads to complicated results. *National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, 110(28): 11337-42. doi: 10.1073/pnas.1222245110
 65. Strop P, Mayo S. Contribution of surface salt bridges to protein stability. *Biochemistry*. 2000 39(6): 1251-5. doi: 10.1021/bi992257j
 66. Lee CW, Wang H-J, Hwang JK, et al. Protein thermal stability enhancement by designing salt bridges: a combined computational and experimental study. *PLoS ONE*. 2014, 9(11): e112751. doi:10.1371/journal.pone.0112751
 67. Sokalingam S, Raghunathan G, Soundrarajan N, et al. A study on the effect of surface lysine to arginine mutagenesis on protein stability and structure using green fluorescent protein. *PLoS ONE*. 2012;7(7): e40410. doi:10.1371/journal.pone.0040410.
 68. Sokalingam S, Madan B, Raghunathan G, et al. In silico study on the effect of surface lysines and arginines on the electrostatic interactions and protein stability. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2013, 18(1): 18-26. doi: 10.1007/s12257-012-0516-1

La geometría del puente de hidrógeno se describe por la distancia y ángulo de enlace entre donador - aceptor es aproximadamente de 3.0 Å y 180° respectivamente [69]. Los donadores de hidrógenos y aceptores son abundantes en toda la proteína, en el esqueleto, en las cadenas laterales y en las moléculas de agua. El puente de hidrógeno se establece dentro de la cadena polipeptídica y en las vecindades circundantes del medio acuoso con la proteína [70]. La contribución promedio a la estabilidad mediante por la formación de un puente de hidrógeno en el interior de una proteína es de aproximadamente 0.6 a 1.2 kcal mol⁻¹ [70, 71].

1.4.1.4. Efecto Hidrofóbico

El efecto hidrofóbico se encuentra en el interior de la proteína, y estudios confirman que son una fuerza importante al direccionar del plegamiento [72]. La interacción hidrofóbica es el efecto que se produce debido al agrupamiento de residuos hidrofóbicos durante el plegamiento de la proteína [73]. Generalmente este tipo de interacciones son utilizadas para mejorar la termoestabilidad de las proteínas mediante a la inserción de residuos de mayor hidrofobicidad en regiones internas de las proteínas [72, 73].

1.4.1.5. Interacción entre Anillos Aromáticos

Las interacciones entre anillos aromáticos han surgido en los últimos años como una alternativa para controlar la función y estructura en proteínas [75]. Este tipo de fuerza incluye la interacción catión-aromático (catión- π) y el apilado aromático- aromático (π - π stacking), siendo el primero más fuerte que el segundo [74, 75].

-
69. Pace CN, Scholtz JM, Grimsley GR. Forces stabilizing proteins. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 2014, 588(14):2177-2184. doi:10.1016/j.febslet.2014.05.006
 70. Hubbard RE, Kamran HM. Hydrogen bonds in proteins: role and strength. *Essential for Life Science*. 2010. doi:10.1002/9780470015902.a0003011.pub2
 71. Pace CN, Fu H, Fryar KL, et al. Contribution of hydrogen bonds to protein stability. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 2014, 23(5): 652-661. doi:10.1002/pro.2449
 72. Mahadevi AS, Sastry GN. Cooperativity in noncovalent interactions. *Chemical Reviews*. 2016, 116 (5): 2775–2825 doi: 10.1021/cr500344e
 73. Camilloni C, Bonetti D, Morrone A, et al. Towards a structural biology of the hydrophobic effect in protein folding. *Scientific Reports*. 2016, 6 :28285. doi:10.1038/srep28285
 74. Madhusudan MK, Mahalakshmi R. Implications of aromatic–aromatic interactions: From protein structures to peptide models. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. 2015, 24(12): 1920-1933. doi:10.1002/pro.2814
 75. Breberina LM, Milčić M.K, Nikolić MR, et al. Contribution of anion- π interactions to the stability of Sm/LSm proteins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2015, 20: 475. doi: 10.1007/s00775-014-1227-1

Estudios han estimado que la interacción entre un catión y la nube de electrones en pares aromáticos puede contener dos veces la energía de una interacción iónica [76]. Geométricamente, una interacción catión- π formado entre un residuo cargado positivamente (lisina, arginina,) y el centroide de un anillo aromático (fenilalanina, tirosina, triptófano) se encuentra optimizado a 7.0 Å [76, 77].

Estudios han cuantificado que aproximadamente el 30% de los triptófanos localizados en la superficie se encuentran estabilizados por medio de una interacción catión- π , y comparados con las proteínas mesófilas, las proteínas termoestables contienen un número mayor de interacciones catión- π . Por lo tanto, mediante el aumento estas interacciones podrían mejorarse la adaptabilidad térmica de las proteínas mesófilas. Por lo que, una amplia densidad de aminoácidos aromáticos en el núcleo hidrofóbico de la proteína puede tener una gran influencia en la estabilidad térmica de las proteínas [77].

1.4.1.6. Reducción de la Flexibilidad

La estabilidad conformacional puede verse aumentada mediante una mutación que disminuya la libertad conformacional, como lo sería la sustitución de un residuo por una prolina o de una glicina por una alanina [78, 79]. Estas sustituciones pueden ser aplicadas de manera sencilla sobre asas o giros. La reducción de la longitud de asas (loops) puede aumentar la estabilidad al aumentar su compactación y estabilizar interacciones en la estructura secundaria [80]. Disminuir la flexibilidad de los extremos N y C terminal puede tener efectos similares [81 - 83]. Sin embargo, Colombo y Merz demostraron a más de una década, que no es requisito indispensable que las enzimas termófilas; sean menos flexibles que sus contrapartes mesófilas, no obstante, deben de conservar su estructura y parte de su flexibilidad para retener su actividad [84].

-
76. Lanzarotti E, Biekofsky RR, Estrin DA, et al. Aromatic–aromatic interactions in proteins: beyond the dimer. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2011, 51(7):1623–1633 doi: [10.1021/ci200062e](https://doi.org/10.1021/ci200062e)
77. Pace CN, Scholtz JM, Grimsley GR. Forces stabilizing proteins. *Federation of European Biochemical Societies letters*. 2014, 588(14): 2177-2184. doi:[10.1016/j.febslet.2014.05.006](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.006)
78. Schmidt T, Situ AJ, Ulmer TS. Structural and thermodynamic basis of proline-induced transmembrane complex stabilization. *Scientific Reports*. 2016, 6:29809. doi: [10.1038/srep29809](https://doi.org/10.1038/srep29809)
79. Scott KA, Alonso DO, Sato S, et al. Conformational entropy of alanine versus glycine in protein denatured states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, 104(8): 2661-6. doi: [10.1073/pnas.0611182104](https://doi.org/10.1073/pnas.0611182104)
80. Yu H, Yan Y, Zhang C, Dalby PA. Two strategies to engineer flexible loops for improved enzyme thermostability. *Scientific Reports*. 2017, 7:41212. doi:[10.1038/srep41212](https://doi.org/10.1038/srep41212).

1.4.2. Estudios de Estabilidad Térmica en Lacasa

La estabilidad térmica en lacasas varía significativamente entre organismos, por lo cual Hildén y colaboradores establecieron que la lacasa es dependiente de la temperatura de crecimiento del organismo que la excreta. Las lacasas con mayor estabilidad térmica han sido aisladas de bacterias, mientras que las lacasas fúngicas disminuyen drásticamente su estabilidad y actividad a temperaturas superiores de 60°C [84].

Entre los basidiomicetos fúngicos y mesófilos, ciertas especies de *Corioloropsis* y *Trametes* expresan lacasas con una estabilidad térmica excepcionalmente alta. Se ha reportado de *Corioloropsis gallica* produce una lacasa termoestable la cual es utilizada en la decoloración y reblandecimiento de la pulpa de paja, con una actividad hasta 70°C y una $T_{1/2}$ de 8 días a 60°C.

Interesantemente otra lacasa proveniente del organismo *Trametes gallica* muestra una estabilidad pobre con una $T_{1/2}$ de 10 min a 60°C. Esto es probablemente explicado por la diversidad de lacasas y las especies de procedencia. [84]. En la **Tabla 3** del siguiente Capítulo puede apreciarse una variedad de lacasas termoestables en conjunto con sus respectivas $T_{1/2}$.

En la revisión hecha por Hildén y colaboradores, se argumenta que la termoestabilidad y termotolerancia en la lacasa es, de hecho, resultado de la acción conjunta de más de un factor como lo es: la cohesión de los cuatro átomos de cobre al sujetar los dominios estructurales, acotando la movilidad en las secciones interdominio, las redes densas de puentes de hidrógeno y la existencia de múltiples pares iónicos (puentes salinos) [84].

-
81. Mahanta P, Bhardwaj A, Kumar K, et al. Structural insights into N-terminal to C-terminal interactions and implications for thermostability of a (β/α) 8-triosephosphate isomerase barrel enzyme. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 2016, 282: 3543–3555. doi:10.1111/febs.13355
 82. Lu Z, Wang Q, Jiang S, et al. Truncation of the unique N-terminal domain improved the thermostability and specific activity of alkaline α -amylase Amy703. *Scientific Reports*. 2016, ;6:22465. doi: 10.1038/srep22465
 83. Colombo G, Merz KM. Stability and activity of mesophilic subtilisin e and its thermophilic homolog: Insights from molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*. 1999, 121 (29): 6895–6903. doi: 10.1021/ja990420s
 84. Hildén K., Hakala K, Lundell, T. Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnology Letters*. 2009, 31: 1117. doi.org/10.1007/s10529-009-9998-0
 85. Nagamune T. Biomolecular engineering for nanobio/bionanotechnology. *Nano Convergence*. 2017, 4(1):9. doi:10.1186/s40580-017-0103-4.
 86. Yu F, Cangelosi VM, Zastrow ML, et al. Protein design: toward functional metalloenzymes. *Chemical reviews*. 2014, 114(7) :3495-3578. doi:10.1021/cr400458x.
 87. Chica RA. Protein engineering in the 21st Century. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 2015, 24(4): 431-433. doi:10.1002/pro.2656.
 88. Bashier S.M., Chellappan S. Enzyme Engineering. *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology*. Springer, Singapore. 2017. doi: 10.1007/978-981-10-4284-3_6
 89. Acebes S, Fernandez E, Monza E, et al. Rational enzyme engineering through biophysical and biochemical modeling. *ACS Catalysis*, 2016, 6 (3): 1624–1629. doi: 10.1021/acscatal.6b00028

1.5 Ingeniería de Proteínas y Diseño Racional

El interés por modificar la funcionalidad de las proteínas, o incluso crear funciones nuevas, ha tomado cada vez más fuerza debido al gran número de aplicaciones industriales que requieren de enzimas como biocatalizadores, y que muchas veces deben resistir condiciones extremas sin perder actividad, como eficiencia a muy bajas o muy altas temperaturas y valores de pHs, tolerar agentes desnaturalizantes u otros productos químicos, y trabajar en la ausencia de ligandos y proteínas accesorias [85].

Además, estas proteínas deben ser estables y estar adaptadas para las condiciones industriales, sin dejar de lado su alta actividad específica y su especificidad por un sustrato dado. Asimismo, deben formar el producto deseado con la mayor eficacia y eficiencia posibles. Además de que deben ser fáciles de producir y a bajo costo para que los procesos sean rentables [86].

Es así como la ingeniería de proteínas hoy en día ha generado avances en la modificación de enzimas con aplicación potencial en la industria y, mediante los procesos de ingeniería racional de proteínas y evolución dirigida, muchas enzimas con potencial industrial han sido optimizadas [87, 88, 89].

Existen dos estrategias para diseñar proteínas que funcionen mejor bajo condiciones inusuales. La primera de ellas, denominada Evolución Dirigida, ha sido utilizada tradicionalmente con fines de estudiar la estabilidad térmica en proteínas. Esta técnica es una simulación de la evolución natural puesta en el laboratorio. Esta técnica no requiere conocimientos de la relación estructura-función en proteínas, pero sí requiere de una exhaustiva librería de mutaciones [88].

En contraste a esto, el Diseño Racional utiliza un proceso de mutación dirigida, que combinada con la información estructural de la proteína permite diseñar de manera fundamentada mejoras en función o estabilidad [89].

-
90. Yang H, Liu L, Li J. et al. Rational design to improve protein thermostability: recent advances and prospects. *ChemBioEng Reviews*, 2015, 2: 87–94. doi:10.1002/cben.201400032
 91. Pardo I and Camarero S. Laccase engineering by rational and evolutionary design. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015, 72(5):897-910. doi: 10.1007/s00018-014-1824-8
 92. Tiwari MK, Singh R, Singh RK, et al. Computational approaches for rational design of proteins with novel functionalities. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2012, 2: e201209002. doi:10.5936/csbj.201209002
 93. Huang PS, Boyken SE, Baker D. The coming of age of de novo protein design. *Nature*. 2016, 537(7620): 320-7. doi: 10.1038/nature19946

A medida que ha crecido el estudio y la comprensión de los mecanismos de estabilidad térmica en proteínas termófilas, el Diseño Racional ha logrado establecer mejoras en las características de estabilidad térmica en proteínas y ha ganado ventajas sobre las técnicas de evolución dirigida [90 - 94].

Debido a su amplio rango de acción, las lacasas tienen un gran potencial biotecnológico, tal y como se ha comentado a lo largo del presente trabajo. En los últimos 20 años uúmerosos estudios de Evolución Dirigida y Diseño Racional han sido desarrollados sobre la lacasa [90 - 94] con fines de obtener propiedades específicas [91]. Dados los avances en tecnología y la disponibilidad de estructuras en el Protein Data Bank de la enzima lacasa, es que se han logrado los cambios descritos por Pardo y colaboradores [91]. Es así que mediante el diseño molecular se ha obtenido lacasas más activas y robustas a las encontradas en la naturaleza.

1.5.1 Aproximación Computacional

Uno de los subgéneros del Diseño Racional es el diseño computacional de proteínas. El diseño de proteínas “*in-silico*” nació de la idea por proponer diseños que satisfagan alguna necesidad estructural o de funcional sin la necesidad de contar con grandes recursos [92]. El diseño racional ha avanzado hasta el punto de que actualmente es posible diseñar una amplia gama de proteínas desde cero, con una precisión a nivel atómico [93].

De manera general, sabiendo que existen 20^N posibles secuencias para una proteína de N aminoácidos donde la naturaleza por evolución solo ha muestreado un subespacio infinitesimal, es que el diseño racional se tiene que fundamentar en una serie de supuestos, reglas y conjuntos de datos empíricos.

Los programas (computacionales) de diseño de proteínas utilizan modelos matemáticos que simulan las fuerzas físicas y químicas de las proteínas en su entorno natural, y para que estos modelos sean manejables, las fuerzas utilizan modelos matemáticos “simplistas” [94]. Dentro del diseño hay dos grandes corrientes a) el diseño mediante el entendimiento de las relaciones estructura-función, y b) el diseño *de novo* [93].

94. Poluri KM, Gulati K. Rational designing of novel proteins through computational approaches. *Protein Engineering Techniques*. Springer Briefs in Applied Sciences and Technology. Springer, Singapore 2017, pp 61-83. doi: 10.1007/978-981-10-2732-13

1.6 Dinámica Molecular

La Dinámica Molecular (MD) es un tipo de cálculo que se desarrolla a través de la mecánica molecular, simulando los movimientos de partículas, átomos o moléculas de sistemas biológicos, a partir de primeros principios y mediante la integración numérica de las ecuaciones clásicas de movimiento propuestas por Newton, para todos las partículas, átomos o moléculas del sistema simulado, a medida que evoluciona temporalmente en respuesta a las fuerzas que actúan entre ellas [95].

La DM es una de las principales herramientas para el estudio de biomoléculas. Las simulaciones de DM permiten el estudio de procesos dinámicos complejos de los sistemas biológicos tales como: estabilidad de proteínas, cambios conformacionales, reconocimiento molecular, transporte de iones, etc [96]. La DM es una herramienta teórica clave en el estudio de proteínas [97]. La primera simulación de una proteína fue realizada por MacCammon y colaboradores en 1977, con el estudio del inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI) [98]. Desde entonces y hasta hoy, la técnica ha sido utilizada de manera amplia incrementando el número de investigaciones que la utilizan año a año hasta ser utilizada como una técnica especializada en problemas particulares.

La DM se basa en la segunda ley de Newton, $F = ma$, donde F es la fuerza ejercida sobre una partícula, m es su masa y a su aceleración. Conociendo la fuerza ejercida sobre cada átomo es posible determinar su aceleración en el sistema. La integración de las ecuaciones de movimiento produce así entonces una “trayectoria” que describe las posiciones, velocidades y aceleraciones de las moléculas en función del tiempo. A partir de esta trayectoria, es posible determinar los valores y propiedades del sistema. El método es determinístico: una vez que se conocen las posiciones y velocidades iniciales de cada átomo, en principio se puede predecir el estado del sistema para cualquier valor del tiempo.

-
95. Childers MC, Daggett V. Insights from molecular dynamics simulations for computational protein design. *Molecular Systems Design & Engineering*. 2017, 2(1) :9-33. doi:10.1039/C6ME00083E
 96. Hospital A, Goñi JR, Orozco M, et al. Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry AABC*. 2015, 8: 37-47. doi:10.2147/AABC.S70333
 97. De Vivo M, Masetti M, Bottegoni G. Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016, 59 (9): 4035–4061. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01684
 98. McCammon JA, Gelin BR, Karplus M. Dynamics of folded proteins. *Nature*. 1977, 267(5612) :585-90. doi:10.1038/267585a0
 99. Karplus M, McCammon JA. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2002, 9:646-652, doi:10.1038/nsb0902-646

El método consiste en la integración del sistema de ecuaciones diferenciales para la segunda ley de Newton (**Ec. 1**)

$$F_i = m_i a_i = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \dots \mathbf{1}$$

dónde: F_i es la fuerza del átomo i

m_i es la masa del átomo i

a_i es la aceleración del átomo i

$\frac{d^2 r_i}{dt^2}$ es la segunda derivada de la posición el átomo i con respecto al tiempo

donde, la fuerza sobre cada átomo es el negativo de la derivada para la energía con respecto a la posición de cada átomo (**Ec. 2**)

$$F_i = -\frac{\partial U}{\partial r_i} \dots \mathbf{2}$$

dónde: F_i es la fuerza del átomo i

U_i es la energía del átomo i

r_i es la aceleración del átomo i

En conjunto, si las coordenadas de la molécula y su conjunto de velocidades se conocen, entonces las fuerzas que actúan sobre cada átomo pueden ser calculadas y de allí generar un nuevo conjunto de coordenadas, a partir de la cual nuevas fuerzas pueden ser calculadas [99, 100].

El comportamiento dinámico del sistema está directamente relacionado con la función de energía que se utiliza para describir las interacciones entre partículas.

-
100. Cao LR, Zhang CY, Zhang DL, et al. Recent developments in using molecular dynamics simulation techniques to study biomolecules. *Acta Physico-Chimica Sinica*. 2017, 33 (7): 1354-1365. doi: [10.3866/PKU.WHXB201704144](https://doi.org/10.3866/PKU.WHXB201704144)
101. Kheirodin M, Pishkenari HN, Moosavi A et al. Study of biomolecules imaging using molecular dynamics simulations. *NANO* 2015, 10: 1550096. Doi:[10.1142/S1793292015500964](https://doi.org/10.1142/S1793292015500964)
102. Petrenko R, Jaroslaw M Molecular dynamics. *Essential for Life Science*. 2010 doi: [10.1002/9780470015902.a0003048.pub2](https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003048.pub2)
103. Karplus M. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Accounts of Chemical Research*, 2002, 35(6): 321-323 doi: [10.1021/ar020082r](https://doi.org/10.1021/ar020082r)

Comúnmente, dicha función es separable en términos que representan interacciones covalentes [enlaces y ángulos (**Ec. 3 - 6**), (**Figura 6A**)] y no covalentes [fuerzas de Van der Waals y de Coulomb (**Ec. 7 y 8**), (**Figura 6B**)].

Bajo un esquema simple pero altamente funcional, las interacciones covalentes pueden ser descritas por los siguientes términos [103, 105]:

$$U_{ligadura} = \sum_{i=1}^{N_b} \frac{1}{2} k_i^b (r_i - r_{0,i})^2 \dots \mathbf{3}$$

$$U_{angulo} = \sum_{i=1}^{N_\theta} \frac{1}{2} k_i^\theta (\theta_i - \theta_{0,i})^2 \dots \mathbf{4}$$

$$U_{diedro} = \sum_{i=1}^{N_\varphi} \frac{1}{2} k_i^\varphi \cos(\varphi_i - \varphi_{0,i})^2 \dots \mathbf{5}$$

$$U_{impropio} = \sum_{i=1}^{N_\xi} \frac{1}{2} k_i^\xi (\xi_i - \zeta_{0,i})^2 \dots \mathbf{6}$$

Las interacciones descritas en por las ecuaciones 3 a 6 representan los potenciales armónicos para, un enlace simple r , un ángulo de enlace θ , para los ángulos diedros φ , así como para el ángulo impropio ξ . Donde: $r_{0,i}$, $\theta_{0,i}$, $\varphi_{0,i}$, $\zeta_{0,i}$ son las respectivas constantes en el en la conformación de mínima energía y r_i , θ_i , φ_i , ξ_i son las variables en función del tiempo [99, 102, 103].

Las interacciones no covalentes entre partículas $i - j$ se describen generalmente, por sus interacciones electrostáticas mediante la ley de Coulomb (**Ec. 7**):

$$U_{Coulomb} = \sum_{i < j} \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \dots \mathbf{7}$$

y las interacciones neutras entre los átomos son descritas por un potencial tipo Lennard-Jones

$$U_{L,J} = \epsilon_{ij} \sum_{i < j} \left[\left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} + \left(\frac{B_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \dots \mathbf{8}$$

donde r_{ij} es la distancia entre los átomos i - j , q es la carga para cada átomo y ϵ es la constante dieléctrica del medio. La expresión de la energía total de un sistema es la suma de los términos de la energía potencial entre sus partes y a menudo se denomina *campo de fuerzas* (**Ec. 9**), entendido como la suma de cada uno de los casos mostrados en las ecuaciones 3 a 8 dentro de una molécula o de un sistema de varias de ellas [104].

Esta suma representa la expresión matemática de la energía potencial del sistema que experimenta debido a la presencia de todos los átomos que lo integran.

$$U = U_{ligadura} + U_{angulo} + U_{diedro} + U_{impropio} + U_{coulomb} + U_{lj} \dots \mathbf{9}$$

Normalmente, los campos de fuerza (que son el conjunto de parametrizaciones realizadas a las moléculas de agua, iones y monómeros que conforman a las macromoléculas se encuentran formulados a partir de observaciones experimentales.

Hoy en día, la dinámica molecular se aplica para el análisis de prácticamente cualquier sistema fisicoquímico de interés. Ejemplos de esto son el estudio de cambios de fase, solubilidad de moléculas, viscosidad de líquidos, pegamentos, pero quizás el mayor interés que está surgiendo es su aplicación a la biología.

-
104. Vlachakis D, Bencurova E, Papangelopoulos N et al. Chapter seven: Current state-of-the-art molecular dynamics methods and applications. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2014, 94:269-313. doi: [10.1016/B978-0-12-800168-4.00007-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800168-4.00007-X)
105. Lopes PE, Guvench O, MacKerell AD Jr. Current status of protein force fields for molecular dynamics simulations. *Methods in Molecular Biology*. 2015. 1215:47-71. doi: [10.1007/978-1-4939-1465-4_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1465-4_3)
106. Nussinov R, Tsai CJ. Free energy diagrams for protein function. *ACS Chemical Biology*. 2014, 21(3): 311-8. doi: [10.1016/j.chembiol.2013.12.015](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.015).
107. Dill KA, MacCallum JL. The protein-folding problem, 50 years on. *Science*. 2012, 338(6110): 1042-6. doi: [10.1126/science.1219021](https://doi.org/10.1126/science.1219021)
108. Huang YM, Chen W, Potter MJ, Chang CA. Insights from free-energy calculations: protein conformational equilibrium, driving forces, and ligand-binding modes. *Biophysical Journal*. 2012, 103(2): 342-351. doi: [10.1016/j.bpj.2012.05.046](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.05.046).
109. Matubayasi N. Free-energy analysis of protein solvation with all-atom molecular dynamics simulation combined with a theory of solutions. *Current Opinion in Structural Biology*. 2017, 43:45-54. doi: [10.1016/j.sbi.2016.10.005](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.10.005)
110. Costa MG, Batista PR, Bisch PM, Perahia D. Exploring free energy landscapes of large conformational changes: molecular dynamics with excited normal modes. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2015, 11(6):2755-67. doi: [10.1021/acs.jctc.5b00003](https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00003)
111. Ford MC, Babaoglu K. Examining. The feasibility of using free energy perturbation (FEP+) in predicting protein stability. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2017, 57(6):1276-1285. doi: [10.1021/acs.jcim.7b00002](https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00002)

La DM, permite explorar la geometría del sistema en la búsqueda de múltiples conformaciones ya sea en proteínas, ADN y moléculas pequeñas por lo que está siendo aplicada al modelado molecular, diseño racional y entendimiento de enfermedades, entre otros [105].

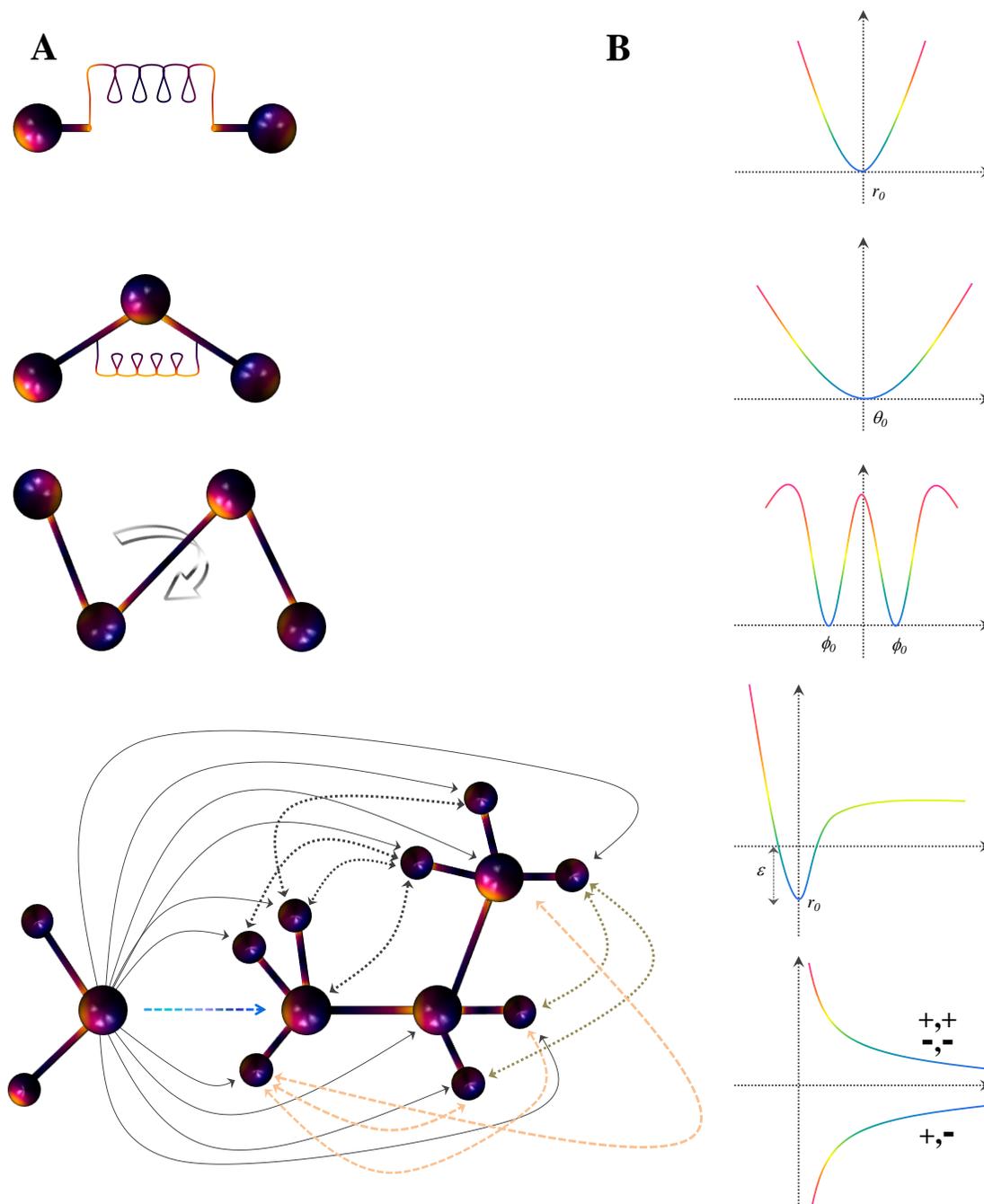


Figura 6. Representación esquemática de los componentes de campo del campo de fuerzas (*force fields*). Se compone de la suma de una serie de términos que modelizan las tensiones de los enlaces, ángulos, torsiones, interacciones de van der Waals y electrostáticas. a) Modelo molecular de cada tipo de interacción, b) representación gráfica del perfil de potencial para cada interacción del campo de fuerza.

1.7 Energía Libre

Uno de los aspectos de mayor relevancia en proteínas es la energía libre. Dado que se relaciona con una gran variedad de propiedades fisicoquímicas y la estabilidad en proteínas [106]. Una representación de la energía libre de una proteína puede ser descrita mediante un embudo energético, como el apreciado en la **Figura 7** [107].

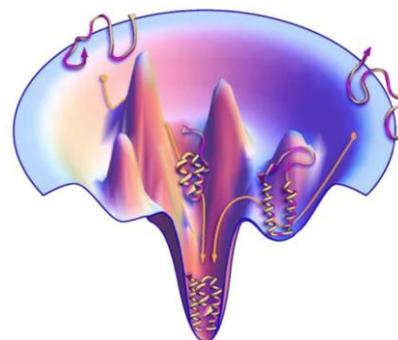


Figura 7. Paisaje energético para el plegamiento de una proteína. Uno de los mayores enigmas estudiados en proteínas, argumenta que éstas se pliegan rápidamente debido a que las fuerzas de plegamiento generan un paisaje de energía en forma de embudo, con un gradiente hacia energías cada vez menores. Imagen tomada de Dill KA 2012 [107].

Estudios computacionales de la interconversión del estado plegado al desplegado, han servido para el entendimiento del cambio en la energía libre (ΔG), en proteínas **Figura 8** [108, 109]. Una estrategia eficaz para comprobar los cambios estructurales ligados a la energética de las proteínas es la delección o inserción de residuos, con fines de cuantificar tipos de interacciones y sus contribuciones a la energía en función de su localización, estructura o microambiente [110 - 114].

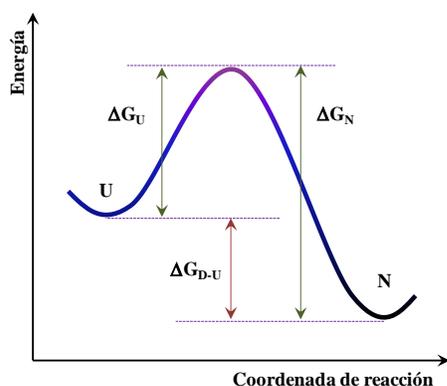
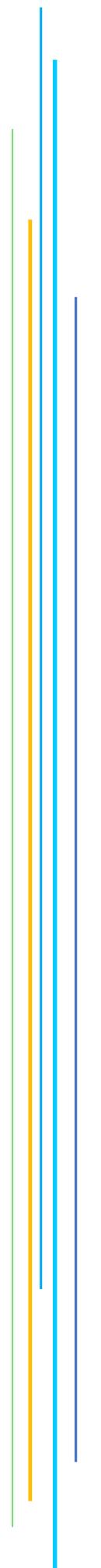


Figura 8. Coordenada de reacción. Perfil de energía potencial para una reacción de plegamiento.

-
112. Hage KE, Mondal P, Meuwly M. Free energy simulations for protein ligand binding and stability. *Molecular Simulation*. 2018, doi: [10.1080/08927022.2017.1416115](https://doi.org/10.1080/08927022.2017.1416115)
113. Gromiha MM. Prediction of protein stability upon point mutations *Biochemical Society Transactions*. 2007, 35(6):1569-73. doi: [10.1042/BST0351569](https://doi.org/10.1042/BST0351569)
114. Sánchez IE, Tejero J, Gómez-Moreno C. et al. Point mutations in protein globular domains: contributions from function, stability and misfolding. *Journal of Molecular Biology*. 2006, 363(2) :422-32. doi: [10.1016/j.jmb.2006.08.020](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.08.020)

OBJETIVOS



Nuestro objetivo es proponer una metodología para predecir, comparar y cuantificar el efecto relativo de la introducción de un par iónico en la enzima mesófila lacasa proveniente del hongo *Trametes versicolor*.

- Caracterizar el comportamiento estructural de la proteína lacasa de *Trametes versicolor* en función de la temperatura [**298.15 K** (25°C), **323.15 K** (50°C), y **348.15 K** (75°C)].
- El aplicar un método computacional que permita analizar y clasificar el grado de estabilidad entre la enzima silvestre y sus mutantes.
- Establecer una interpretación molecular de la inserción de un par iónico en la superficie de la enzima lacasa mesófila.
- Determinar las contribuciones a la estabilidad por la inserción de un par iónico en la sección de interacción entre dominios.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 2.1 Modelado de la Enzima Lacasa
- 2.2 Generación de Variantes Quiméricas
- 2.3 Mutantes Control
- 2.4 Mutantes con Potencial Estabilizante
- 2.5 Dinámica Molecular
- 2.6 Análisis de la Estructura Secundaria
- 2.7 Puentes de Hidrógeno
- 2.8 Estabilidad de la Simulación y Empaquetamiento
- 2.9 Fluctuaciones de Cadenas Laterales
- 2.10 Distancia de Interacción Dominio:Dominio y
Aminoácido:Aminoácido
- 2.11 Aproximación de la Energía Libre (MM/PBSA)
- 2.12 Componentes Principales y Agrupamiento



La metodología utilizada en el presente trabajo puede ser observada de manera general en la **Figura 9**. Cada punto expuesto dentro de la **Figura 8** se encuentra explicado de manera detallada en las secciones subsecuente.

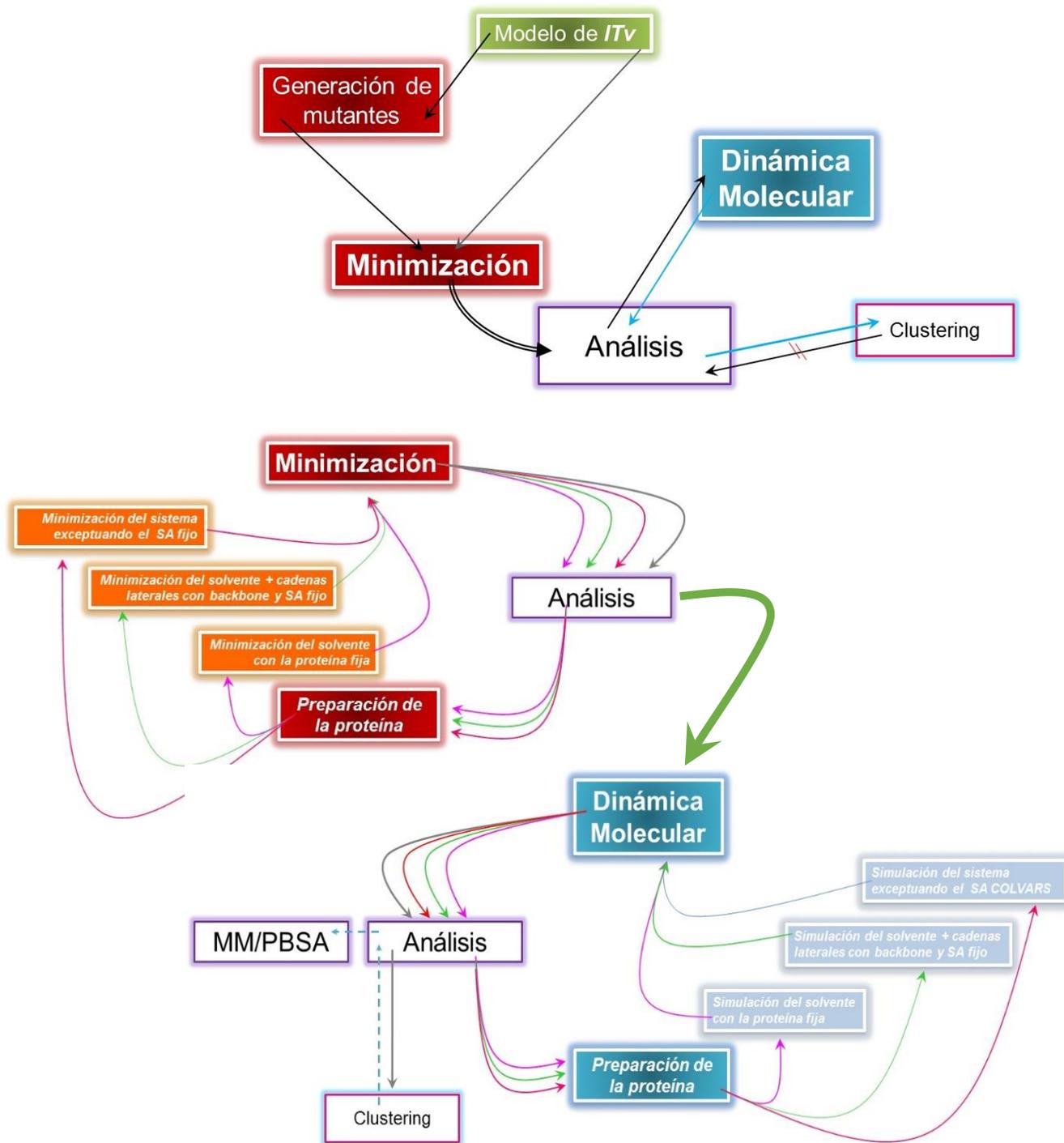


Figura 9. Protocolo de trabajo. Panel A protocolo general del trabajo de tesis. Panel B protocolo de minimización. Panel C protocolo de simulación.

2.1 Modelado de la Enzima Lacasa

El modelo tridimensional de la enzima lacasa (**wtTv**) se obtuvo utilizando la secuencia de aminoácidos, proveniente del hongo *Trametes versicolor* (**Tv**), depositado en el GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) [115] con número de acceso (ID): AY049725.1, donada por el Dr. Marcos López y el Dr. Gustavo Viniegra, expresada en la levadura *Pichia pastoris* por Profesor Alan Dobson en el Environmental Research Institute (University College Cork) [116].

El modelo se construyó a partir un análisis comparativo entre la secuencia de la enzima **ITv** y las secuencias de las estructuras cristalográficas de la enzima lacasa depositadas en el PDB (<http://rcsb.org> [117]) vía el algoritmo **PSI-BLAST** (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con ayuda del software **Molecular Operating Environment (MOE)** [118].

2.2 Generación de Variantes Quiméricas

Se identificaron los residuos cargados de la lacasa cercanos a un aminoácido neutro de un dominio contiguo. La búsqueda de posibles aminoácidos a sustituir se realizó considerando la hipótesis planteada por Kanamura y colaboradores en el año 2003 [24], el cual afirma que la lacasa está constituida por bloques a los cuales denomino “Dominios Estructurales” y que éstos, a su vez han ido intercambiándose a lo largo de la evolución. Así entonces, el par de aminoácidos encontrados para diseño de la mutante fueron caracterizados por:

- i. ser lejanos en su secuencia de aminoácidos,
- i. encontrarse en dominios adyacentes,
- ii. que la distancia espacial del centro de carga del residuo cargado (Lys, Arg, Glu, Asp) estuviese a una distancia entre 6 Å a 8 Å del residuo neutro (Ala, Val, Leu, Ile) a mutar,
- iii. tener un área superficial accesible al solvente mayor a 75%,

115. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, et al. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2005, 33(Database Issue): DC4-DC8. doi:10.1093/nar/gki063

116. López M, Loera O, Guerrero-Olazarán M. et al. Cell growth and *Trametes versicolor* laccase production in transformed *Pichia pastoris* cultured by solid-state or submerged fermentations *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2010; 85: 435-440. doi: 10.1002/jctb.2306

117. Rose PW, Prlić A, Altunkaya A, et al. The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic Acids Research*. 2017; 45: DB71-DB81. doi:10.1093/nar/gkw1000

118. Chemical Computing Group Inc. Molecular Operating Environment (MOE). 2013.08; *Chemical Computing Group ULC*, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2017

2.3 Mutantes Control

A medida de satisfacer la metodología propuesta, se construyeron:

a) tres controles positivos de los cuales,

i) una mutante proviene la enzima β -glucosidasa (***β glu***), resultado de los trabajos realizados por el Dr. Zubillaga y colaboradores, en el cual dicho estudio mostró que la mutante H62R incrementó su estabilidad térmica en 0.95 kcal/mol y T_m de 3.0°C [119], y

ii) las dos mutantes provenientes de la enzima lacasa del hongo *Bacillus subtilis* (***Bs***), igualmente termoestables; E188R y E188K, producidas por Mollania y colaboradores [120], quienes demostraron que las variantes E188K y E1888R incrementaron su temperatura de inactivación hasta en 5°C, y

b) un control negativo, la mutante E142A para *Trametes versicolor* construida mediante la disrupción de un puente salino nativo que une los dominios A y B [121].

La estructura silvestre de *Bacillus subtilis* (***wtBs***) se construyó mediante el software **Modeller** [122], las variantes *wt β glu* y *wtBs* de fueron realizadas acorde al protocolo mencionado en el punto 2.2.

2.4 Mutantes con Potencial Estabilizante

En una primera aproximación, las variantes de mayor significancia fueron determinadas mediante minimización de energía, descartándose toda aquella que tuvieran una energía desfavorable comparada con la lacasa silvestre ($\Delta E_{mut-wt} > 0$).

-
119. Zubillaga RA, García E, Camarillo M, et al. Effect of a new ionic pair on the unfolding activation barrier of beta-glucosidase B. *Protein and Peptide Letters*. 2006, 13(2): 113-8. doi: [10.2174/092986606775101698](https://doi.org/10.2174/092986606775101698)
120. Mollania N, Khajeh K, Ranjbar B, et al. Enhancement of a bacterial laccase thermostability through directed mutagenesis of a surface loop. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011;49(5):446-52. doi: [10.1016/j.enzmictec.2011.08.00](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.08.00)
121. Matsuura Y, Takehira M, Sawano M, et al. Role of charged residues in stabilization of *Pyrococcus horikoshii* CutA1, which has a denaturation temperature of nearly 150 °C. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 2012, ;279(1): 78-90. doi: [10.1111/j.1742-4658.2011.08400.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08400.x)
122. B. Webb, A. Sali. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2014, 54:5.6.1-5.6.37. doi: [10.1002/cpbi.3](https://doi.org/10.1002/cpbi.3)

La preparación del sistema se realizó mediante la plataforma **CHARMM-GUI** (<http://charmm-gui.org>) [123], y cada sistema fue simulado a condiciones cercanas a las fisiológicas (0.15 mol/L de KCl). El cálculo de energía se efectuó con el Software **NANOSCALE Molecular Dynamics** [124] versión 2.7 (**NAMD-2.7**) utilizando el campo de fuerzas **CHARMM-35b2**, **toppar C22/CMAP** [125] y la visualización con **Visual Molecular Dynamics (VMD)** [126]. Dado que el campo de fuerzas **CHARMM**, carece de la parametrización para átomos de cobre y debido a que el **Sitio Activo (SA)** de la lacasa está constituido de átomos de cobre, es que se introdujeron los parámetros determinados por Ungar y colaboradores (**Figura 10**) [127], para este tipo de átomos mediante el módulo de Variables Colectivas (**COLVARS**) [128].

Classical Molecular Dynamics Simulation of the Photoinduced Electron Transfer Dynamics of Plastocyanin

Lowell W. Ungar, Norbert F. Scherer, and Gregory A. Voth
Department of Chemistry, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104-6323 USA

TABLE 1 Copper-protein interaction parameters added to the CHARMM22 all-atom protein parameter set

	Bonds		
	r_0	k_r	
Cu-S*	2.10 Å (excited: 2.40)	110 kcal/mol Å	
Cu-N	2.05	110	
	Angles		
	θ_0	k_θ	
Cu-S-C	95°	15 kcal/mol	
Cu-N-Cph1	130	20	
Cu-N-Cph2	126	20	
S-Cu-N	130	20	
N-Cu-N	100	20	
	Dihedral angles		
	ϕ_0	k_ϕ	n
Cu-S-C-C*	0°	0.24 kcal/mol	1
Cu-S-C-C	0	0.15	2
Cu-S-C-C	0	0.27	3
Cu-S-C-H	0	0.20	3
Cu-N-C-C	180	1.00	2
Cu-N-C-H	180	1.00	2
Cu-N-C-N	180	1.00	2
	Improper torsions		
	ω_0	k_ω	
N-C-C-Cu	0°	0.45 kcal/mol	
Cu-S-N-N	0	3.50	
Cu-N-S-N	0	3.50	
Cu-N-N-S	0	3.50	
	van der Waals interactions		
	r_{min}	E_{min}	
Cu	1.09 Å	0.25 kcal/mol	
Cu-O	4.50	0.10	

* Unless otherwise specified, atoms refer to all atom types of the designated element.

* Note that some dihedral angles have multiple terms in the potential.

TABLE 2 Atomic partial charges for copper and ligand residues used in the molecular mechanics potential

	Copper	Cysteine	Histidine	
Cu	0.98 e	S -0.43 e	N $_{\delta 1}$ -0.62 e	
		C $_{\beta}$ -0.21	C $_{\gamma}$ 0.22	
			C $_{\beta}$ -0.08	
			C $_{\delta 2}$ 0.05	H $_{\delta 2}$ 0.11 e
			N $_{\epsilon 2}$ -0.42	H $_{\epsilon 2}$ 0.37
			C $_{\epsilon 1}$ 0.28	H $_{\epsilon 1}$ 0.15
Residue*	0.98	-0.46	0.24	

* Totals are for whole residues (including unchanged backbone and hydrogen atom charges).

Figura 11. Parámetros utilizados para la simulación de los átomos de cobre [127] en las lacasas silvestres de wtTv, wtBs y sus mutantes y mutantes

La proteína fue embebida y simuladas mediante solvente explícito (modelo molecular tipo Lennard-Jones (TIP3P) [129]) en una caja con aproximadamente 60,000 mil moléculas de agua, generándose un espesor de 10 Å entre la superficie de la proteína y las fronteras (**Figura 11**), hasta una densidad de 1 g*ml⁻¹. Las aguas cristalográficas encontradas en el molde fueron superpuestas al modelo y conservadas en cada sistema. Los sistemas fueron minimizados por etapas. La relajación de la proteína (minimización con el método de máxima pendiente o steepest descent) se efectuó hasta 5x10⁴ pasos de simulación en cada etapa, liberando el sistema por secciones: a) Solvente, b) solvente + cadenas laterales y c) solvente + proteína exentando. El sitio activo fue “congelado” o manteniéndolo fijo bajo un criterio de “constraint” para cada etapa de minimización en cada etapa de minimización, debido a que el módulo COLVARS no son reconocidas por NAMD en los procesos de minimización, ver **Apéndice Min**.

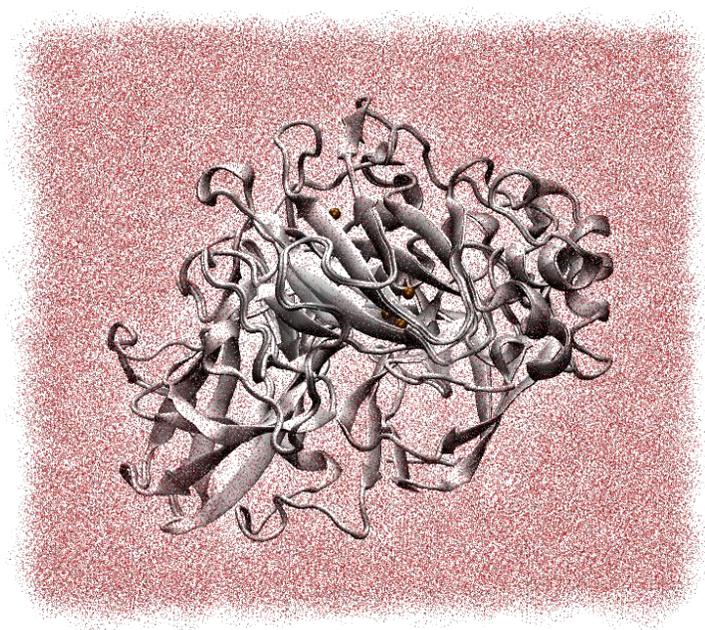


Figura 11. Representación esquemática del sistema para *Trametes versicolor*. En rojo: la capa de solvatación con un espesor de 10 Å. En gris: enzima wtTv. En color ocre: átomos de cobre del SA.

-
123. Jo S., Kim T, Iyer VG, et al. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*. 2008, (11):1859-1865. doi: [10.1002/jcc.20945](https://doi.org/10.1002/jcc.20945)
124. Phillips JC, Braun R, Wang W, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*. 2005;26: 1781-1802. doi: [10.1002/jcc.20289](https://doi.org/10.1002/jcc.20289)
125. MacKerell, Jr. AD, Bashford DM, Dunbrack, Jr. RL, et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1998, 102: 3586–3616. doi: [10.1021/jp973084f](https://doi.org/10.1021/jp973084f)
126. Humphrey W, Dalke A, Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 1996, 14(1): 33-38. doi: [10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
127. Ungar LW, Scherer NF, Voth GA. Classical molecular dynamics simulation of the photoinduced electron transfer dynamics of plastocyanin. *Biophysical Journal*. 1997;72: 5-17. doi: [10.1016/S0006-3495\(97\)78642-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78642-9)
128. Fiorin G., Klein ML., Hémin J. Using collective variables to drive molecular dynamics simulations. *Molecular Physics*. 2013, 111(22-23): 3345–3362. doi.org/[10.1080/00268976.2013.813594](https://doi.org/10.1080/00268976.2013.813594)
129. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*. 1983, 79: 926 doi: [10.1063/1.445869](https://doi.org/10.1063/1.445869).

2.5 Dinámica Molecular

Las simulaciones de DM fueron efectuadas acorde a las condiciones descritas en la minimización y utilizando el módulo COLVARS (**Apéndice COLVARS**). La integración de la ecuación de Newton se determinó mediante el algoritmo Leapfrog Verlet con un tiempo de integración de 1 femtosegundos. Para mantener fija la distancia en los enlaces que involucran átomos de hidrógeno se utilizó la restricción **SHAKE**, y los pares no enlazantes fueron reconstituidos cada 25 femtosegundos a un radio de corte de 12 Å. Las interacciones a larga distancia se realizaron mediante el método descrito por Ewald (**Particle Mesh Ewald - PME**). El ensamble termodinámico bajo el cual se realizaron las simulaciones fue de tipo **NTP**.

En la segunda etapa, se realizó la simulación a tres temperaturas, **298.15 K** (25°C), **323.15 K** (50°C), y **348.15 K** (75°C) por un tiempo de 20 a 30 ns por sistema. En la simulación el sistema fue calentado mediante un acoplamiento térmico. Una vez calentado el sistema, éste se mantuvo constante reasignando los vectores de velocidad a cada átomo a través de una distribución de Boltzmann para la temperatura. Para que el sistema fuese equilibrado tomó alrededor del 60 al 80 % del tiempo de simulación, por lo que se utilizaron los últimos 5 ns de simulación para realizar los análisis energéticos y estructurales correspondientes [130, 131], ver **Apéndice Run**.

Cada sistema fue simulado por triplicado [132, 133], y realizado en el Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo (**LSVP**) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. El análisis de la dinámica molecular se realizó con paquetería “in home” con una computadora equipada para tal efecto con: un par de procesadores Intel® Xeon® E5-2620 v3, dos tarjetas NVIDIA GeForce GTX 980 Ti Overclocking, 16 memorias Kingston HyperX FURY DDR4 para un total de 128Gb en RAM sobre una plataforma Linux, Ubuntu 15.10.

-
130. Haider S, Parkinson GN, Neidle S. Molecular dynamics and principal components analysis of human telomeric quadruplex multimers. *Biophysical Journal*. 2008;95(1): 296-311. doi: [10.1529/biophysj.107.120501](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120501)
 131. Niu Y, Pan D, Shi D, et al. Influence of chirality of crizotinib on its MTH1 protein inhibitory activity: insight from molecular dynamics simulations and binding free energy calculations. *PLoS One*. 2015;10(12): e0145219. doi: [10.1371/journal.pone.0145219](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145219)
 132. Lane TJ, Shukla D, Beauchamp KA, et al. To milliseconds and beyond: challenges in the simulation of protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*. 2013, 23:58-65. doi: [10.1016/j.sbi.2012.11.002](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.11.002).
 133. Krishnan R, Walton EB, Van Vliet KJ. Characterizing rare-event property distributions via replicate molecular dynamics simulations of proteins. *Journal of Molecular Modeling*. 2009, 15: 1383-1389. doi: [10.1007/s00894-009-0504-3](https://doi.org/10.1007/s00894-009-0504-3)
 134. Rithvik M, Nageswara RG. A Comparative Study of Methodologies of Protein Secondary Structure. *Computational Intelligence Techniques for Comparative Genomics*. SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology. Springer, Singapore, 2015 pp:37-45. doi: [10.1007/978-981-287-338-5_3](https://doi.org/10.1007/978-981-287-338-5_3)
 135. Mezei M. Simulaid: a simulation facilitator and analysis program, *Journal of Computational Chemistry*. 2010, 31: 2658-2668. doi: [10.1002/jcc.21551](https://doi.org/10.1002/jcc.21551)

2.6 Análisis de la Estructura Secundaria

Las fluctuaciones de estructura secundaria en la proteína a lo largo de la simulación se estudiaron mediante el protocolo **Dictionary of Protein Secondary Structure (DSSP)** [134] incluido en el paquete computacional de análisis para simulación molecular **Simulaid**, escrito por M. Mezei [135].

2.7 Puentes de Hidrógeno

Se consideraron, como puentes de hidrógeno (**Hb**) “cuantificables” a los puentes establecidos en el seno de la proteína, en una interacción proteína-proteína, determinándose promedio, tiempo de vida media y número total de Hb a lo largo de la simulación [136] utilizando el programa Simulaid [135].

2.8 Estabilidad de la Simulación y Empaquetamiento

La determinación de la estabilidad en la simulación se realizó mediante la **Root Mean Square Deviation (RMSD)** [137], (**Ec. 10**), con respecto a la estructura minimizada de partida. El comportamiento sobre el tamaño y la compactación de la lacasa en la simulación fue estudiado a partir del **Radio de Giro (Rg)** [138], (**Ec. 11**).

$$RMSD_{(v,w)} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^n ||v_i - w_i||^2} \dots \mathbf{10}$$

donde, en la **ecuación 10**, N es el número de átomos (C_α), v_i y w_i las coordenadas de la proteína v y w en el átomo i , siendo w las coordenadas de la proteína de referencia.

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum m_i r_i^2}{\sum m_i}} \dots \mathbf{11}$$

donde, en la **ecuación 11**, r_i es la distancia entre el átomo i y el centro de masas de la proteína y m_i la masa de este.

136. Kufareva I, Abagyan R. Methods of protein structure comparison. *Methods in Molecular Biology*. 2012, 857: 231-57. doi: [10.1007/978-1-61779-588-6_10](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6_10)

2.9 Fluctuaciones de Cadenas Laterales

El nivel de flexibilidad local o de las fluctuaciones en las cadenas laterales de la lacasa y sus variantes quiméricas fue calculado mediante el **Root Mean Square fluctation (RMSf)** [139, 140], (**Ec. 12**), vía SIMULOID.

$$RMSf = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=0}^T (w_t^{ri} - w_{pro}^{ri})^2} \dots \mathbf{12}$$

donde, T es el tiempo de producción expresado como número de instantánea, R_t^{ri} son las coordenadas del átomo i (C_α), de la estructura w al tiempo t y w_{pro}^{ri} las coordenadas promedio del átomo i (C_α), de la estructura w a lo largo de la trayectoria.

2.10 Distancia de Interacción Dominio:Dominio y Aminoácido:Aminoácido

La distancia, a lo largo de la simulación fue monitoreada sobre: i) centros de masa entre dominio:dominio de las mutantes y (ii) entre centros de masa en un corte de 5 aminoácidos por arriba y por debajo en la secuencia de cada uno de los aminoácidos generadores del nuevo puente salino [141, 142]. (**ver Apéndice Distancia**)

-
137. Prieto C, De Las Rivas J. Structural domain-domain interactions: assessment and comparison with protein-protein interaction data to improve the interactome. *Proteins*. 2010, 78(1): 109-17. doi: [10.1002/prot.22569](https://doi.org/10.1002/prot.22569)
 138. Smilgies DM, Folta-Stogniew E. Molecular weight-gyration radius relation of globular proteins: a comparison of light scattering, small-angle X-ray scattering and structure-based data. *Journal of Applied Crystallography*. 2015, 48(Pt 5): 1604-1606. doi: [10.1107/S1600576715015551](https://doi.org/10.1107/S1600576715015551)
 139. Fuglebakk E, Echave J, Reuter N. Measuring and comparing structural fluctuation patterns in large protein datasets. *Bioinformatics*. 2012, 28(19): 2431-40. doi: [10.1093/bioinformatics/bts445](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts445)
 140. Zhang D, Lazim R. Application of conventional molecular dynamics simulation in evaluating the stability of apomyoglobin in urea solution. *Scientific Reports*. 2017, 7:44651. doi: [10.1038/srep44651](https://doi.org/10.1038/srep44651)
 141. Best RB, Hummer G, Eaton WA. Native contacts determine protein folding mechanisms in atomistic simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, 110 (44): 17874-17879. doi: [10.1073/pnas.1311599110](https://doi.org/10.1073/pnas.1311599110)
 142. Chennubhotla C, Bahar I. Signal propagation in proteins and relation to equilibrium fluctuations. *PLOS Computational Biology*. 2007, (9): 1716-26. doi: [10.1371/journal.pcbi.0030172](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030172)
 143. Brooks BR, Brooks CL 3rd, Mackerell AD Jr. CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of computational chemistry*. 2009, 30(10): 1545-614. doi: [10.1002/jcc.21287](https://doi.org/10.1002/jcc.21287)
 144. Brice AR, Dominy BN. Analyzing the robustness of the MM/PBSA free energy calculation method: application to DNA conformational transitions. *Journal of computational chemistry*. 2011, 32(7): 1431-40. doi: [10.1002/jcc.21727](https://doi.org/10.1002/jcc.21727)
 145. Nguyen TT, Mai BK, Li MS. Study of tamiflu sensitivity to variants of A/H5N1 virus using different force fields. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2011, 51(9): 2266-76. doi: [10.1021/ci2000743](https://doi.org/10.1021/ci2000743)
 146. Zhan D, Yu L, Jin H, Guan S, Han W. Molecular modeling and MM-PBSA free energy analysis of endo-1,4-β-xylanase from *Ruminococcus albus* 8. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, 15(10):17284-303. doi: [10.3390/ijms151017284](https://doi.org/10.3390/ijms151017284)
 147. Homeyer N, Gohlke H. Extension of the free energy workflow FEW towards implicit solvent/implicit membrane MM-PBSA calculations. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015, 850(5): 972-82. doi: [10.1016/j.bbagen.2014.10.013](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.013)

2.11 Aproximación de la Energía Libre (MM/PBSA)

El cambio de energía libre (ΔG) en wtTv, wtBs, wt β glu y sus mutantes se determinó según la técnica de **Molecular Mechanics / Poisson Boltzmann Surface Area (MM/PBSA)**. utilizando el Software Chemistry at **HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM)** en su versión **c35b2** [143]. **MM/PBSA** se calculó como la suma de la energía interna de la proteína y la energía por solvatación (**Ec. 13**) [144 - 148]:

$$\bar{W} = U(\bar{r}_1, \dots, \bar{r}_n) + \Delta G_{solv}(\bar{r}_1, \dots, \bar{r}_n) \dots \mathbf{13}$$

donde:

$$U(\bar{r}_1, \dots, \bar{r}_n) = \Delta E_{MM} - T\Delta S \dots \mathbf{14}$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{MM-interna} + \Delta E_{MM-externa} \dots \mathbf{15}$$

Y

$$\Delta G_{solv} = \Delta G^{polar}(\bar{r}_1, \dots, \bar{r}_n) + \Delta G^{nonpolar}(\bar{r}_1, \dots, \bar{r}_n) \dots \mathbf{16}$$

$$= \Delta G_{PB} + \Delta G_{SA} \dots \mathbf{17}$$

□

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv} - T\Delta S \dots \mathbf{18}$$

donde, ΔE_{MM} (**Ec. 15**) es la energía calculada por **Mecánica Molecular** e incluye los términos: $\Delta E_{MM-interna}$ (como el cambio en energía estimada por enlaces, ángulos y ángulos diedros) y $\Delta E_{MM-externa}$ (como el cambio de energía estimada a partir de las fuerzas electrostática y de Van der Waals).

148. Hou T, Wang J, Li Y, Wang W. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2011, 51(1):69-82. doi: [10.1021/ci100275a](https://doi.org/10.1021/ci100275a)

149. Kuhn B, Kollman PA. Binding of a diverse set of ligands to avidin and streptavidin: an accurate quantitative prediction of their relative affinities by a combination of molecular mechanics and continuum solvent models. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2000;43: 3786-3791. doi: [10.1021/jm000241h](https://doi.org/10.1021/jm000241h)

150. Sitkoff D., Sharp K. A. and Honig B. Accurate calculation of hydration free-energies using macroscopic solvent models. *The Journal of Physical Chemistry A*. 1994, 98: 1978-1988. doi: [10.1021/j100058a04](https://doi.org/10.1021/j100058a04)

Por otro lado, el termino ΔG_{sol} es la diferencia de energía debido al costo de solvatación/desolvatación electrostática (denominada contribución polar o ΔG_{PB}), más el componente no electrostático de contribución al proceso de desolvatación (denominado componente no-polar o ΔG_{SA}) como se describió en la **ecuación 16 y 17**.

Típicamente, la contribución no polar de la energía libre de solvatación (**Ec. 19**) es estimada mediante el Área Superficial Accesible al Solvente (**SASA**) afectada por un coeficiente fenomenológico de la tensión superficial γ y una constante de ajuste β [149 - 151];

$$\Delta G_{SA} = \gamma SASA + \beta \dots \mathbf{19}$$

$$\text{con } \gamma = 0.00542 \text{ kcal/mol/\AA}^2$$

$$\beta = 0.92 \text{ kcal/mol}$$

Asumiendo una respuesta lineal durante el proceso y un potencial electrostático pequeño, la contribución electrostática de la energía libre de solvatación (**Ec 20**) es calculada a partir del campo del solvente acorde a la **ecuación 20**.

$$\Delta G_{PB} = \Delta G_{elec} = \frac{1}{2} \sum_{\alpha} Q_{\alpha} [\phi_s(r_{\alpha}) - \phi_v(r_{\alpha})] \dots \mathbf{20}$$

donde: ϕ_v y ϕ_s son el potencial de carga en el vacío y del solvente respectivamente y Q_{α} la carga del átomo α .

-
151. Im w, Beglov D Roux B. Continuum solvation model: Computation of electrostatic forces from numerical solutions to the Poisson-Boltzmann equation. *Computer Physics Communications*. 1998, 111:59-75. doi: 10.1016/S0010-4655(98)00016-2
152. Fogolari F, Brigo A, Molinari H. The Poisson-Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology. *Journal of Molecular Recognition*. 2002, 15(6):377-92. doi: 10.1002/jmr.577
153. Qi R, Botello-Smith WM, Luo R. Acceleration of linear finite-difference Poisson-Boltzmann methods on graphics processing units. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2017 Jul 11;13(7):3378-3387. doi: 10.1021/acs.jctc.7b00336
154. Brice AR, Dominy BN. Analyzing the robustness of the MM/PBSA free energy calculation method: application to DNA conformational transitions. *Journal of Computational Chemistry*. 2011, 32(7): 1431-40. doi: 10.1002/jcc.21727
155. Owen BB, Miller RC, Milner CE, et. al. The dielectric constant of water as a function of temperature and pressure. *Journal of Computational Chemistry*. 1961, 65 (11): 2065–2070. doi: 10.1021/j100828a035
156. Fogolari F, Moroni E, Wojciechowski M, et al. MM/PBSA analysis of molecular dynamics simulations of bovine-lactoglobulin: freeenergy gradients in conformational transitions?. *Proteins* 2005. 59: 91–103. Doi: 10.1002/prot.20384.
157. Pande VS, Grosberg AY, Tanaka T. Statistical mechanics of simple models of protein folding and design, *Biophys. Journal*. 1997. 73:3192–3210. doi:10.1016/S0006-3495(97)78345-0.
158. Meyer T, Ferrer-Costa C, Pérez A. Essential dynamics: a tool for efficient trajectory compression and management. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2006, 2(2): 251-8. doi: 10.1021/ct050285b
159. David CC, Jacobs DJ. Principal component analysis: a method for determining the essential dynamics of proteins. *Methods in Molecular Biology*. 2014, 1084: 193-226. doi: 10.1007/978-1-62703-658-0_11
160. Bhakat S, Martin AJ, Soliman ME. An integrated molecular dynamic, principal component analysis and residue interaction network approach reveals the impact of M184V mutation on HIV. *Molecular BioSystems*. 2014, 10(8): 2215-28. doi: 10.1039/c4mb00253a

Así entonces, el potencial electrostático $\phi(r)$ es resuelto al solucionar la ecuación de **Poisson-Boltzmann Linealizada (LPB) (Ec. 21)**, en diferencias finitas (**ver Apéndice PB-DF**) [152, 154].

$$\nabla[\varepsilon(r)\nabla\phi(r)] = \kappa'^2(r)\varepsilon(r)\phi(r) - 4\pi\rho(r) \dots \mathbf{21}$$

donde, $\varepsilon(r)$ es la constante dieléctrica, $\rho(r)$ la densidad de carga fijada por el soluto, y κ' la longitud de apantallamiento modificado de Debye-Hückel (**Ec 22**), definida como [154]:

$$\kappa'^2 = \frac{2Ie^2}{\varepsilon(r)k_B T} \dots \mathbf{22}$$

Con

$$I = \frac{1}{2} \sum_i n_i \left(\frac{q_i}{e}\right)^2 \dots \mathbf{23}$$

donde, e es la carga del protón, I la intensidad o fuerza iónica, k_B es la constante de Boltzmann, y T es la temperatura, n_i la densidad del ion i y q_i es la carga del ion i .

El espacio para el grid para tal efecto fue fijado en 0.5 Å, y el largo para la dimensión fue extendido hasta un 20% más allá de la proteína [154]. El radio de Van der Waals para los iones se utilizó acorde a lo dispuesto en los archivos Toppar.

Los valores utilizados para la constante dieléctrica (ε) fueron acordes a la temperatura de simulación [155]: para el solvente de 78.54 a 273.15 K, 69.94 a 323.15 K y 62.69 para 348.15 K y para el núcleo de la proteína de 2. Para el cálculo de ΔG_{PB} , fueron utilizados los mismos iones y concentración de sal que al correr las simulaciones de dinámica molecular (KCl, 0.15 M), ver **Apéndice MM/PBSA**.

La entropía de la proteína no fue calculada para el presente trabajo, esto en base a las suposiciones frecuentemente realizadas por Figolari et al. 2005 [156] y Pande et al. 2007 [157], donde, se asume que la entropía conformacional de proteínas globulares es similar y prácticamente la misma a lo largo de toda la simulación por dinámica molecular.

De manera precisa nuestro trabajo, se ocupa de estudiar los cambios en la estructura debidos a las mutaciones de un solo punto, lo cual genera perturbaciones pequeñas a la estructura.

2.12 Componentes Principales y Agrupamiento

El análisis de una proteína, mediante Componentes Principales (PCA), reduce el espacio de conformaciones a un subespacio “esencial” reduciendo los grados de libertad que describen los movimientos más relevantes para la función de una proteína [158 - 160].

Actualmente, PCA se emplea comúnmente para examinar la dinámica de una proteína, ejemplo, la comparación de diferentes simulaciones de una proteína [16], comparación de una proteína con y sin su sustrato [161], o para realizar el análisis del comportamiento de una proteína ante una mutación [162].

Del análisis por PCA se obtuvo un ensamble o clúster, el cual ha sido utilizado en simulaciones con fluctuaciones altas como lo muestran Shulten y colaboradores [163, 164], con la finalidad de identificar movimientos y fluctuaciones en proteínas para simulaciones largas. El Análisis por PCA para todos nuestros sistemas fue realizado vía el programa **Carma** [165].

En la mayor parte de los casos, con los 3 o 5 primeros componentes principales (PCs) se explica la mayor parte de la varianza de los datos, de manera que la representación tridimensional de los tres primeros componentes principales suele cubrir el 60-80% de los efectos o características observables. Mediante Carma se analizaron los agrupamientos del subespacio conformacional para los tres primeros PCs, usando un corte en el RMSD de 2.4 Å.

La probabilidad de densidad de la distribución de estos tres PCs fue calculada como la función de la disribucion de las poblaciones acorde a la **ecuación 24** [165].

$$\Delta G = -k_b T \ln \left[\frac{p_i}{p_{max}} \right] \dots \mathbf{24}$$

dónde: k_b es la constante de Boltzman, T la temperatura, p_i la probabilidad de distribución para el componente principal i y p_{max} es la máxima probabilidad para las tres componentes principales, ver **Apéndice PCA**.

161. Liu M, Wang L, Sun X. Investigating the impact of Asp181 point mutations on interactions between PTP1B and phosphotyrosine substrate. *Scientific Reports*. 2014, 4: 5095. doi: 10.1038/srep05095

162. Srikumar PS, Rohini K, Rajesh PK. Molecular dynamics simulations and principal component analysis on human laforin mutation W32G and W32G/K87A. *The Protein Journal*. 2014, 33(3): 289-95. doi: 10.1007/s10930-014-9561-2.

163. Liu Y, Strümpfer J, Freddolino PL. Structural characterization of λ -repressor folding from all-atom molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2012, 3(9): 1117-1123. doi: 10.1021/jz300017c

164. Balsema MA, Wriggers W., Oono Y., Schulten K. Principal component analysis and longtime protein dynamics. *The Journal of Physical Chemistry*. 1996, 100(7): 2567–2572. doi: 10.1021/jp9536920

165. Glykos NM. Software news and updates. Carma: a molecular dynamics analysis program. *Journal of Computational Chemistry*. 2006, 27 (14): 1765–1768. doi: 10.1002/jcc.20482

RESULTADOS Y DISCUSIONES

- 3.1 Construcción del Modelo wT_v
- 3.2 Generación de Mutantes
- 3.3 Discriminación de Mutante con Potencial Termoestable
- 3.4 La Dinámica
 - 3.4.1 Estabilidad
 - 3.4.1.1 Raíz de la Desviación Cuadrática Media
 - 3.4.1.2 Compactación Estructural
 - 3.4.1.3 Estructura Secundaria
 - 3.4.1.4 Análisis de Movilidad
 - 3.4.2 Evaluación de la Energía
 - 3.4.2.1 MM/PBSA
 - 3.4.2.2 Puentes de Hidrógeno
 - 3.4.2.3 Distancias de Interacción
 - 3.4.2.4 Agrupamiento
 - 3.4.2.5 Estructuras de Mayor Estabilidad

3.1 Construcción del Modelo wtTv

El modelo de la enzima silvestre lacasa proveniente del hongo *Trametes versicolor* (wtTv), fue construido con la secuencia Y049725.1 (**Apéndice Secuencia**) [116, 166]. La secuencia Y049725.1 (**ITv**) cuenta con una longitud de 499 aminoácidos. Se realizó una búsqueda de homólogos con el programa **Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)** mediante el algoritmo **Position Specific Iterated BLAST (PSI-BLAST)** [167]. Como filtro de selección se consideraron solo aquellas estructuras cristalográficas que no tuviesen zonas sin resolver en el cristal. De ellas se eligió **1GYC** [28] (**Figura 12**) sobre más de 50 MOCs cristalizadas, por contener el mismo número de aminoácidos en su secuencia y una identidad del 97% (15 aminoácidos de diferencia) a **ITv**. Por otro lado, los porcentajes de identidad entre las otras MCOs y **ITv** son menores o iguales al 77%.

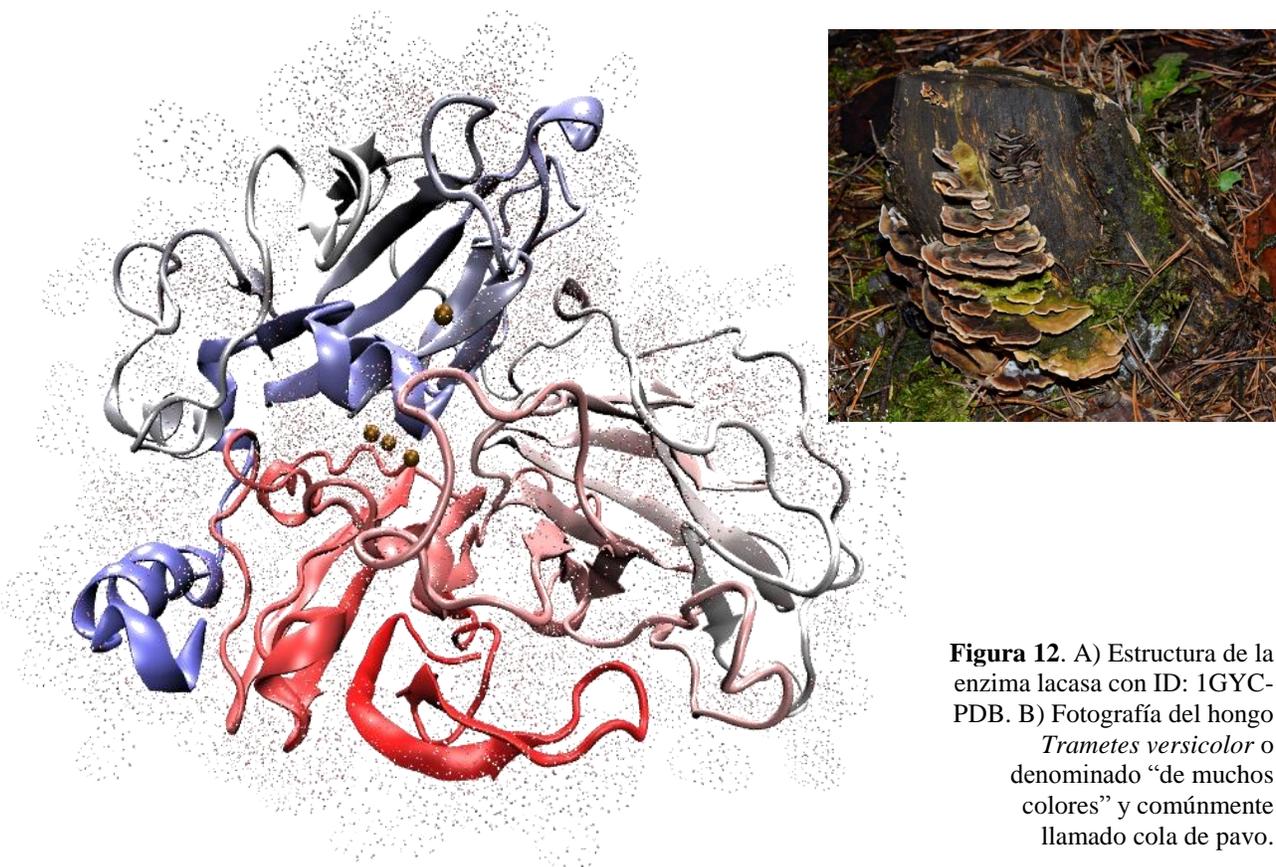


Figura 12. A) Estructura de la enzima lacasa con ID: 1GYC-PDB. B) Fotografía del hongo *Trametes versicolor* o denominado “de muchos colores” y comúnmente llamado cola de pavo.

166. O’Callaghan J, O’Brien MM, McClean K. Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002, 29(2):55-9. doi:10.1038/sj.jim.7000268
167. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA., et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*.1997, 25(17): 3389-3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389

wtTv fue construido al hilar la secuencia de lTv sobre la estructura cristalográfica de 1GYC. La diferencia entre lTv y 1GYC encontrada fue de 15 aminoácidos, 10 de ellos en sitios sobre la superficie, 3 en el centro de la proteína y 2 en la sección interdominio. La sustitución de estos 15 aminoácidos fue realizada a mano mediante el plugin “mutante” en MOE, optando por el rotámetro con el posicionamiento de menor energía.

El alineamiento entre lTv y 1GYC se encuentra plasmado en la **Figura 13**, en color rojo se presentan las variantes entre secuencias, así mismo, en esta **Figura 13** se observa la composición en estructura secundaria de cada dominio: Dominio A (DA): color Rosa, Dominio B (DB): color Azul y Dominio C (DC): color verde.

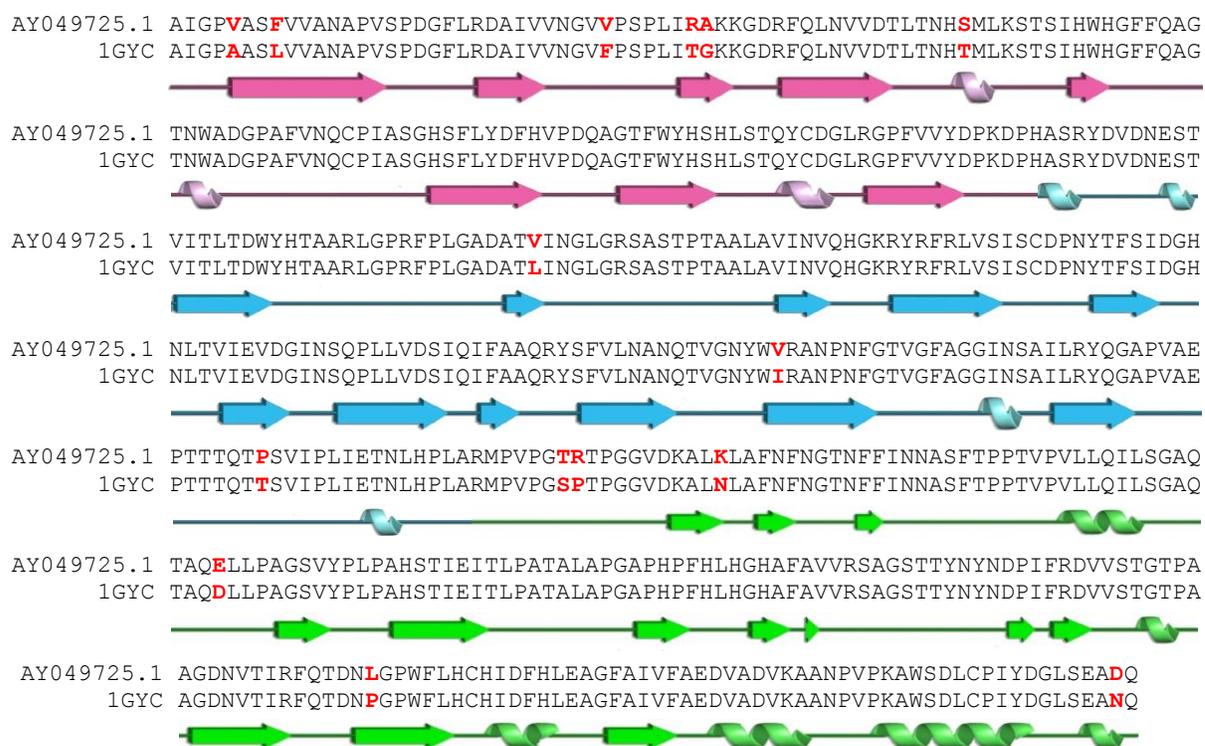


Figura 13. Alineamiento entre lTv y 1GYC utilizando Clustal-O [168]. En color rojo, se encuentran los 15 residuos no conservados. La composición aproximada de estructura secundaria, así como la delimitación de los dominios estructurales esta ilustrada por debajo del alineamiento (DA-rosa, DB-azul, DC-verde).

El modelo final, wtTv de la enzima lTv puede ser apreciado en la **Figura 14**. La superposición de Cα entre 1GYC y wtTv mostró un RMSD de solamente 0.4 Å.

168. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, et. al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. 2011, 7:539. doi: 10.1038/msb.2011.75

Estructuralmente cada uno de los tres dominios contienen un plegamiento similar tipo cupredoxina, mayoritariamente del tipo beta sándwich conectada por asas de diferentes longitudes. Esta topología se encuentra en pequeñas proteínas como la azurina o la plastocianina. El plegamiento de wtTv fue caracterizado mediante el servidor **Protein Structure Classification Database (CATH)** [169] dando lugar a aproximadamente 2000 dominios con este tipo de plegamiento ensamblados mediante asas de interconexión dominio:dominio.

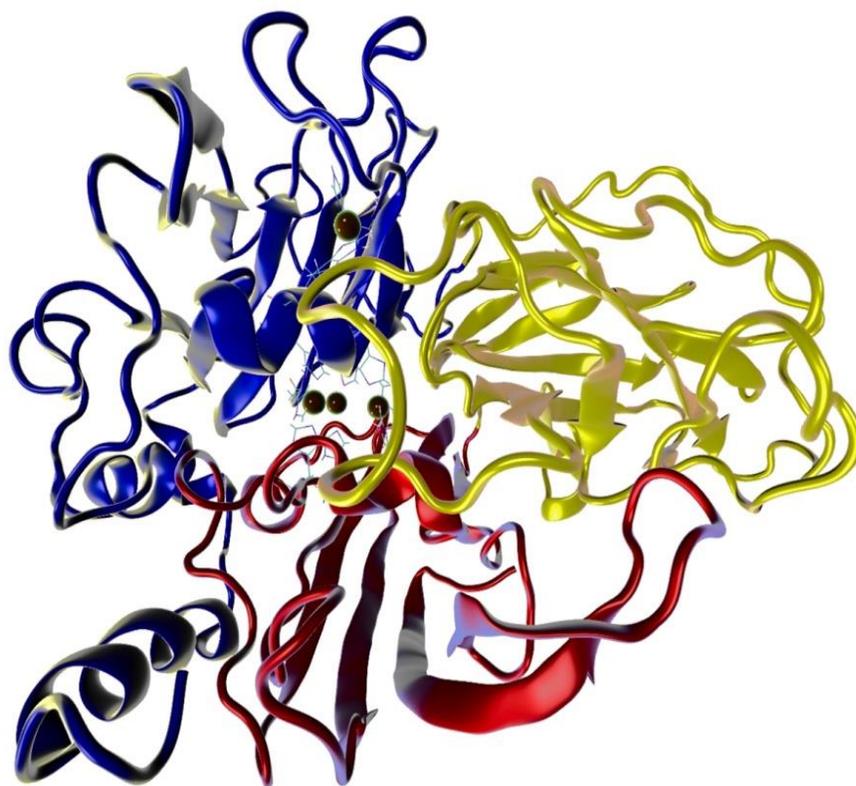


Figura 14. Modelo de la enzima lacasa wtTv. En colores se representan los dominios característicos de esta clase de proteínas. En color azul el dominio D_A, en rojo D_B y en color amarillo D_C. En color cian se presentan los aminoácidos que ligan a los átomos de cobre (esferas en color ocre) del sitio activo.

Dentro del **European Molecular Biology Laboratory (EMBL)** se han identificado 1200 secuencias no redundantes para la enzima lacasa. Un alineamiento múltiple mostró la importancia y conservación de los aminoácidos que ligan el cobre del sitio activo (**Figura 15**). Como se observa en la **Figura 15** dichos aminoácidos se encuentran altamente conservados, incluso cuándo las secuencias de aminoácidos poseen una baja similitud.

169. Dawson NL; Lewis TE; Das S, et al. CATH: an expanded resource to predict protein function through structure and sequence. *Nucleic Acids Research*. 2017, 45: DB89–DB95. doi:10.1093/nar/gkw10987

En la **Figura 15** se aprecia que los aminoácidos mayormente conservados: doce residuos de histidina y un residuo de cisteína implicados en la coordinación de los átomos de cobre [135].

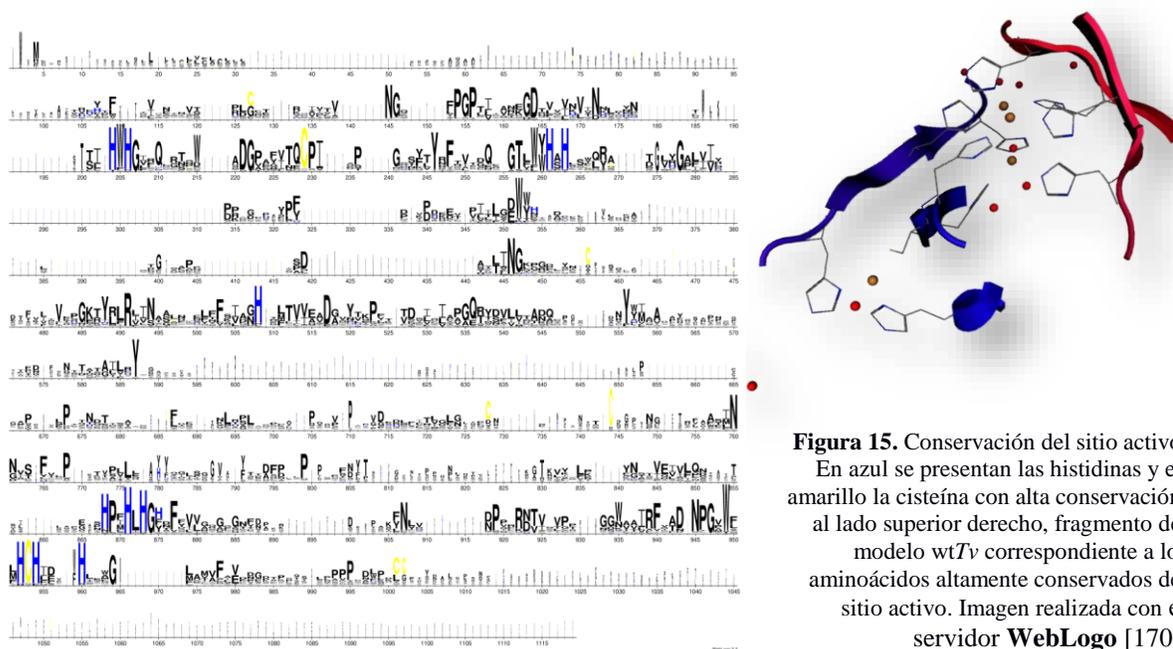


Figura 15. Conservación del sitio activo. En azul se presentan las histidinas y en amarillo la cisteína con alta conservación, al lado superior derecho, fragmento del modelo wtTv correspondiente a los aminoácidos altamente conservados del sitio activo. Imagen realizada con el servidor **WebLogo** [170].

La longitud de cada dominio para wtTv se determinó con la base de datos Structural Classification of Proteins (SCOP2) [171] donde: el dominio “A” está formado por los primeros 130 aminoácidos, el dominio “A” por los 168 aminoácidos subsecuentes, partiendo del aminoácido número 132 hasta el 300 y por último el dominio “C” estructurado por 198 aminoácidos, del 301 hasta el 499. Es así como wtTv es constituida por: siete hojas beta (treinta y un hebras), ocho beta hairpins, nueve beta bucles, catorce hélices alfa, ocho beta turns, seis gamma turns y 2 puentes disulfuro según PDBsum [172], como se muestra en la **Figura 13**. Un mayor detalle de la estructura y topología puede ser apreciado en el **Apéndice Topo-2D**

Una vez constituido el modelo wtTv, realizamos un análisis estructural exhaustivo del sitio catalítico. Para tal efecto se realizó una superposición estructural de las 32 estructuras cristalográficas contenidas en el PDB homólogas a Itv hasta el 2010 (**Figura 16**).

170. Gavin EC, Gary H, John-Marc C, et. al. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*. 2004; 14(6): 1188–1190. doi: 10.1101/gr.849004
 171. Andreeva A, Howorth D, Chothia C, et. al. SCOP2 prototype: a new approach to protein structure mining. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(Database issue):DC10-DC14. doi:10.1093/nar/gkt1242
 172. De Beer TA1, Berka K, Thornton JM, Laskowski RA. PDBsum additions. *Nucleic Acids Research*. 2014;42 (Database issue):DB92-6. doi: 10.1093/nar/gkt940

La superposición estructural nos permitió corroborar que las lacasas de tres dominios se componen en su sitio activo por 4 átomos de cobre, 10 histidinas y una cisteína. En el caso de wtTv, los átomos de cobre se encuentran acoplados de la siguiente manera:

- i) Cu-T₁/His395/His458/Cys453,
- ii) Cu-T₂/His64/His398,
- iii) Cu-T_{3a}/His66/His109/ His45
- iv) Cu-T_{3b}/His111/ His400/ His452.

Estructuralmente el acoplamiento de tipo mononuclear descrito en “i” se encuentra localizado en la zona más expuesta del SA, mismo que es donde tendría lugar el reconocimiento del sustrato. Por otro lado, los acoplamientos “ii, iii y iv” se amalgaman para dar lugar a agrupamiento trinuclear, formado por los dos átomos tipo Cu-T₃ y un átomo Cu-T₂.

El agrupamiento trinuclear se sitúa embebido entre los dominios “a” y “b”. En conjunto los cuatro acoplamientos del cobre darían lugar a un llamado “agrupamiento tetranuclear” (**Figura 16**). La superposición del sitio activo entre wtTv y las 32 estructuras cristalográficas se determinó con un RMSD menor a 0.5Å, el cual es un valor confiable para aseverar que el sitio activo se modeló correctamente.

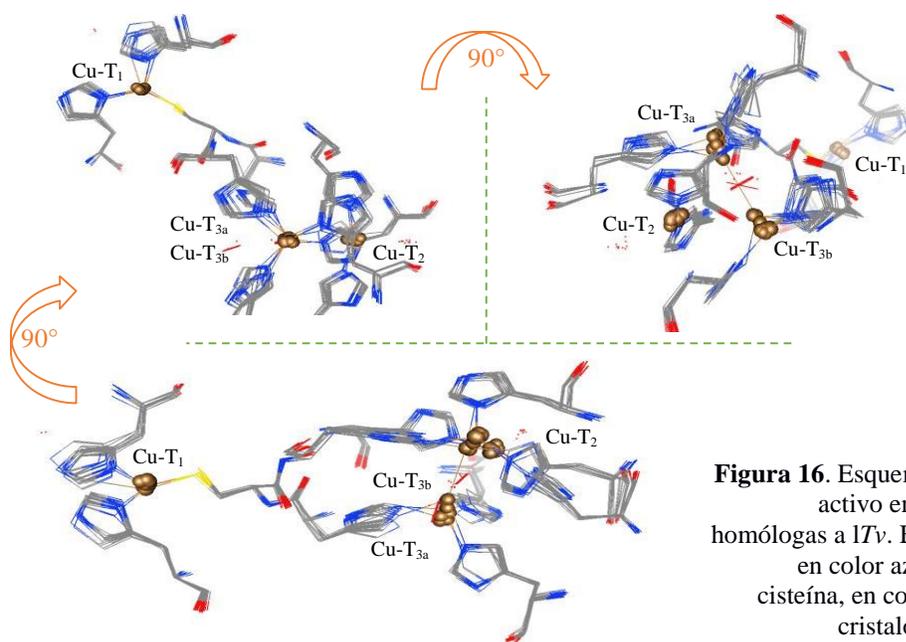


Figura 16. Esquema de la superposición del sitio activo en 32 estructuras cristalográficas homólogas a lTv. En color ocre: átomos de cobre, en color azul, gris y amarillo: histidinas y cisteína, en color rojo: moléculas de agua co-cristalográficas ligadas al sitio activo.

3.2 Generación de Mutantes

Con el fin de elucidar los sitios lábiles para la implementación de los puentes salinos y teniendo en cuenta los estudios evolutivos de la lacasa, los cuales muestran que ésta ha sido ensamblada en bloques a través del tiempo, se estudió los contactos interdominio de wtTv mediante "alanine scanning" en el servidor **Robetta** [173], mostrado en la **Figura 17**.

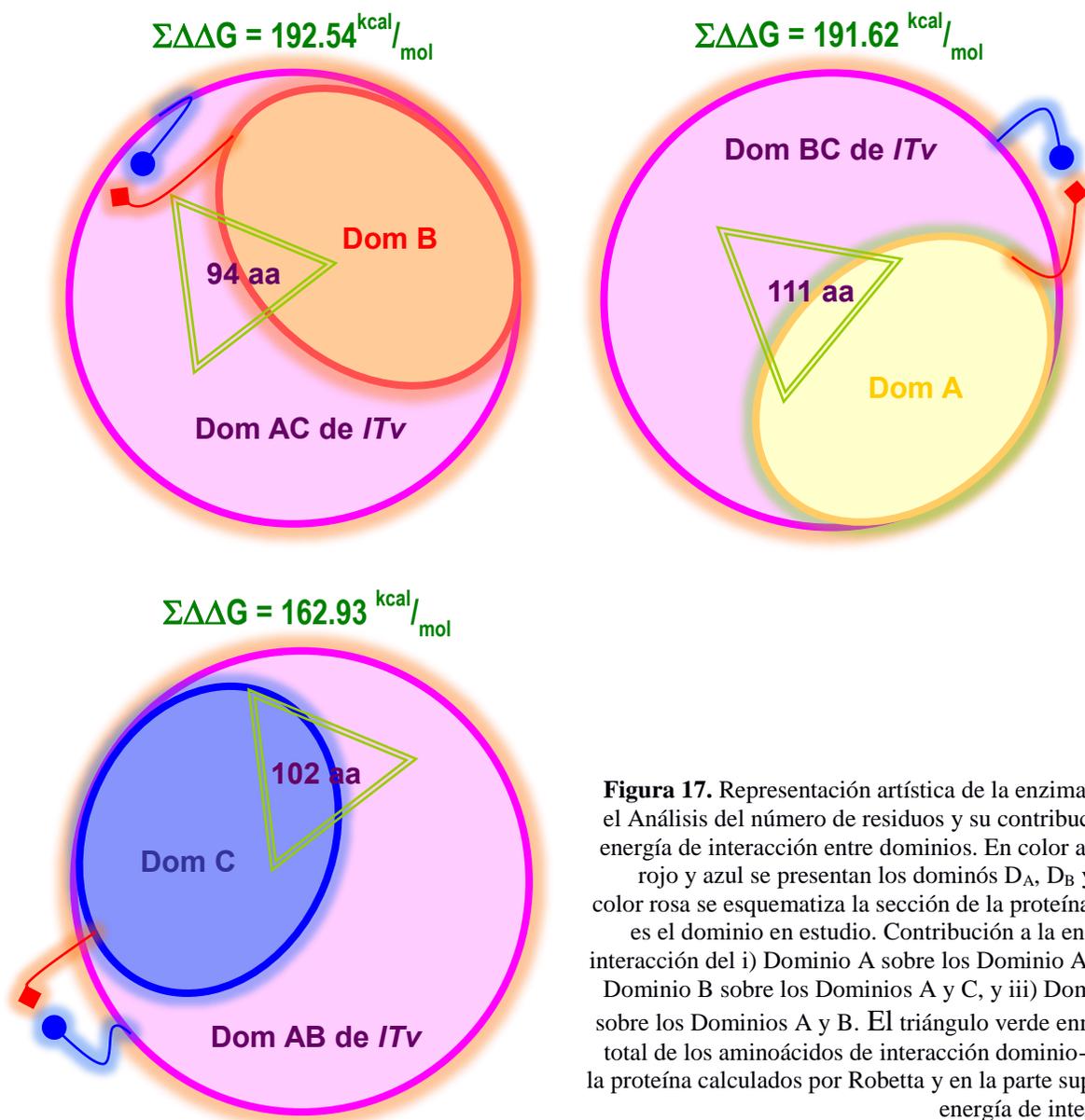


Figura 17. Representación artística de la enzima ITv. En el Análisis del número de residuos y su contribución a la energía de interacción entre dominios. En color amarillo, rojo y azul se presentan los dominios D_A, D_B y D_C, en color rosa se esquematiza la sección de la proteína que no es el dominio en estudio. Contribución a la energía de interacción del i) Dominio A sobre los Dominio A y B, ii) Dominio B sobre los Dominios A y C, y iii) Dominios C sobre los Dominios A y B. El triángulo verde enmarca el total de los aminoácidos de interacción dominio-resto de la proteína calculados por Robetta y en la parte superior la energía de interacción.

173. Kortemme T, Kim DE, Baker D. Computational alanine scanning of protein-protein interfaces. *Science's STKE* 219: p12, 2004. doi: 10.1126/stke.2192004p12

Las “antenas” en la **Figura 17**, representan la idea general de nuestro trabajo, la implementación de una “cerradura iónica” mediante la inserción de un puente salino interdominio en la superficie, enmarcado. Acorde a la **Figura 17** la sección más lábil de la proteína se encuentra en la región de interacción entre los Dominio C:B y el Dominio A ($D_C:D_B-D_A$) con un promedio de $1.59 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{aa}^{-1}$.

Por otro lado, mediante la formalización de insertar un puente salino en la superficie de wtTv, se decidió realizar un análisis del número y tipo de contactos no enlazantes interdominio (**Tabla 3**) para una variedad de lacasas termoestables [174] como son *Bacillus subtilis*, *Thermus thermophilus* (2XU9), *Pycnopus cinnabarinus* (2XYB), *Pyrobaculum aerophilum* (3AW5), *Streptomyces sviveus* (4M3H), *Pycnopus sanguineus* (5NQ7), y las enzimas, papaína (9PAP), complemento del factor humano D (5MT4) y triosephosphate isomerase, (7TIM). En el caso de la lacasa de *P. sanguineus* se analizaron las tres isoformas depositadas en el PBD y de *S. sviveus* además de analizar los contactos interdominio se analizaron los contactos intramonómeros, dado que ésta es una de las lacasas denominadas como “pequeñas”, conformadas por dos dominios estructurales.

Para tal efecto realizamos la búsqueda de los contactos interdominio en las estructuras a través de PDBsum, observándose que wtTv tiene un número reducido de contactos de interacción dominio:dominio en comparación a la mayoría de las lacasas termoestables. Como se puede apreciar sobre la **Tabla 3**, la densidad de columnas rojas es alta, indicando que las relaciones entre el número de residuos de interacción entre dominio por puente de hidrógeno suelen ser mayores en las enzimas termoestables, en otro sentido matemático, aunque en la misma vía, se observó que esta misma clase de lacasas contienen una menor área superficial por puente de Hidrógeno o Contacto no Enlazante en comparación con la estructura de wtTv.

Las características estructurales estudiadas hasta el momento, las hipótesis evolutivas de la lacasa, en conjunto con la idea de que incluso, el despliegue parcial entre dominios ineludiblemente provocaría el rompimiento de los contactos interdominio, nos llevó a establecer que el mejor sitio para introducir la interacción estabilizante (**grapa estructural**) sería entre cadenas laterales contiguas para dominios adyacentes en la superficie de wtTv.

174. Hildén K1, Hakala TK, Lundell T. Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnology Letters*. 2009 (8):1117-28. doi: 10.1007/s10529-009-9998-0.

Tabla 3. Estadística de Interacción para wtTv, Proteínas Diméricas y Termoestables [175]*

Organismo	Tm	Interacción Dom:Dom	RI/Hb	RI/CnE	Å ² /Hb	Å ² /CnE
<i>Trametes versicolor Lac1</i>	60°C	wtTv A : B	3.88	0.307	184.44	0.068
		wtTv A : C	4.79	0.319	220.93	0.068
		wtTv B : C	3.43	0.312	178.00	0.062
<i>Bacillus Subtilis</i>	~ 2 h at 80°C	wtBs A : B	5.47	0.325	320.33	0.052
		wtBs A : C	5.44	0.336	254.22	0.064
		wtBs B : C	3.06	0.320	145.94	0.066
<i>Thermus thermophilus</i>	~ 14 h at 80°C	2XU9 A : B	6.42	0.418	317.33	0.048
		2XU9 A : C	4.50	0.308	214.88	0.068
		2XU9 B : C	3.12	0.319	133.82	0.073
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	~ 2 h at 80°C	2XYB A : B	2.84	0.283	141.64	0.071
		2XYB A : C	4.12	0.267	185.29	0.083
		2XYB B : C	3.07	0.280	151.53	0.072
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	~ 5.5 h at 80°C	3AW5 A : B	3.57	0.352	189.36	0.054
		3AW5 A : C	4.78	0.321	211.67	0.070
		3AW5 B : C	4.00	0.305	188.81	0.070
<i>Streptomyces sviveus</i>	~ 10 min at 80°C	4M3H A : B	3.36	0.311	163.00	0.066
		4M3H M1 : M2	3.23	0.314	158.45	0.065
		4M3H M1 : M3	3.12	0.297	146.44	0.072
		4M3H M2 : M3	3.39	0.313	153.13	0.071
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	~ 20 min a 80°C y 170 min at 75°C	5NQ7 A : B	3.12	0.321	145.56	0.067
		5NQ7 A : C	4.31	0.290	201.63	0.074
		5NQ7 B : C	3.19	0.298	166.56	0.064
		5NQ8 A : B	2.89	0.299	134.96	0.072
		5NQ8 A : C	3.58	0.271	167.26	0.079
		5NQ8 B : C	3.31	0.293	169.56	0.067
		5NQ9 A : B	3.23	0.326	162.45	0.061
		5NQ9 A : C	4.00	0.310	178.00	0.072
Papaína		9PAP A : B	3.15	0.293	155.10	0.069
		Factor D				
Factor D		5MT4 A : B	4.67	0.321	214.50	0.068
triosephosphate isomerase		7TIM A : B	2.46	0.271	125.15	0.073

* Las primeras tres líneas corresponden a los contactos interdominio en wtTv. Los símbolos A:B, A:C y C:B, indexan los contactos entre dominios A-B, A-C y B-C. Las siguientes líneas muestran los correspondientes resultados para wtBs y algunas lacasas termoestables [175]. Finalmente, las últimas tres líneas corresponden a los contactos en de papaína, factor D, y a los contactos intercadenas de TIM. En la tercera columna se muestran códigos del PDB. En las columnas de la cuatro a la siete, se observan las relaciones entre el número de residuos interdominio (RI), Área superficial (Å²) y puente de hidrógeno (Hb), contactos no enlazantes (CnE). Las celdas remarcadas en rojo, verde y control muestran las razones de cambio por arriba, debajo y similar a wtTv.

Con fines de encontrar los residuos de glicina, alanina y leucina de superficie en wtTv con potencial de ser sustituidos, se mapearon las tres secciones de interacción dominio:dominio A:B, A:C y B:C, localizándose los residuos neutros [Glicina (GLY), Alanina (ALA) y Leucina (LEU)] próximos estructuralmente a residuos cargados [Glutámico (GLU), Aspártico (ASP), Lisina (LYS) y Arginina (ARG)] pero pertenecientes a dominios adyacentes. En la **Tabla 4** se muestran las posibles combinaciones realizadas, dando lugar a 33 mutantes o mutaciones, mediante las cuales se introdujo un puente salino superficial e interdominio sobre wtTv.

Así mismo, se realizó la construcción de 3 mutantes estudiadas experimentalmente para ser tomadas como controles positivos a la metodología propuesta. La primera de ellas fue tomada de la proteína β -glucosidasa proveniente del organismo *Paenibacillus polymyxa*, y estudiada por el Dr. Rafael Zubullaga en el 2006 [123]; los dos restantes se tomaron de estudios realizados por el Dr. Mollania en el 2011 en una lacasa proveniente del hongo *Bacillus subtilis*. Aunado a esto, una de las 33 mutantes de wtTv, fue realizada para tener un control negativo; esta última mutante fue realizada mediante la interrupción de un puente salino nativo establecido con las especificaciones descritas para la construcción de las 32 mutantes restantes.

La estructura silvestre de la enzima β -glucosidasa fue tomada del Protein Data Bank con ID 2O9P [175], y sus mutantes fueron construidas por mediante sustitución directa con MOE. Por otro lado, la proteína silvestre de la lacasa de *Bacillus subtilis* fue modelada utilizando el Software Modeller teniendo como templete la estructura de la proteína lacasa CotA depositada en el PDB con ID 1GSK [176]. La conformación de cada una de las mutantes se realizó mediante una búsqueda de rotámeros, seleccionando aquellos de menor energía (**Figura 18**).

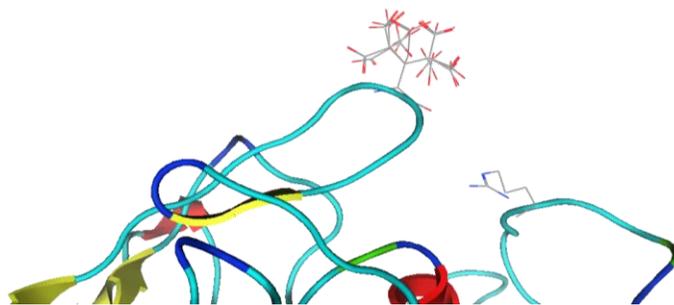


Figura 18. Esquematación de la búsqueda de rotámeros para la construcción de las mutantes para las tres proteínas wtTv, wtBs, y wt β glu.

175. Isorna P, Polaina J, Latorre-García L et. al. Crystal structures of *Paenibacillus polymyxa* beta-glucosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate specificity and give new insights into the catalytic machinery of family I glycosidases. *Journal of Molecular Biology* 2007, 371(5): 1204-18. doi: [10.1016/j.jmb.2007.05.082](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.082).
176. Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, et al. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. a laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278(21):19416-25. doi: [10.1074/jbc.M301251200](https://doi.org/10.1074/jbc.M301251200)

Tabla 4. Descripción y Localización de las Mutantes de wtTv (33), wtBs (2), y wtβglu (1)

Mutante	Vecino	Localización de la mutación	Localización del vecino	Dominios de interacción		
wtTv	GLU142	A1K	N-terminal	5ta hélice	A : B	
		A1R				
		L35K	1er hebra de la hoja beta A			
		L35R				
	ARG176	G19D	1er beta hairpin conectando la 1ra y 2da hebra de la hoja beta C	β-turn entre la 2da hebra de la hoja C y la 1ra hebra de la hoja D	A : C	
		G19E				
	ASP444	A71K	β-turn entre la 2da hebra de la hoja B y la helice H2	γ-turn entre la 6ta hebra de las hoja y la 4ta hebra de la hoja G	A : C	
		A71R				
	ASP498	A88K	β-turn entre la hélice H2 y la 4ta hebra de la hoja A	Hélice H14	B : A	
		A88R				
	ASP23	A155K	β-harpin entre la 1ra y 2da hebra de la hoja C	2da hebra de la hoja A	B : A	
		A155R				
		L158 K				
		L158R				
	ASP18	L174K	β-turn entre la 2da hebra de la hoja C y la 1er hebra de la hoja D	β-harpin conectando la 1ra y 2da hebra de la hoja A	B : A	
						L174R
						G175K
						G175R
		ARG22		A183 K		
				A183R		
				A184K		
				A184R		
	ARG161	A184D	6to beta hairpin conectando la 1er y 2da hebra de la hoja F	3er beta hairpin conectando la 1er y 2da hebra de la hoja C	C : A	
A184E						
ASP136	G334D	β-turn conectando la hélice H7 y la 1ra hebra de la hoja E	Hélice H4	B : C		
	G334E					
ASP419	L308D	6to beta hairpin conectando la 4ta y 5ta hebra de la hoja E	6to beta hairpin conectando la 4ta y 5ta hebra de la hoja E	B : C		
	L308E					
LYS59	A309K	Hélice H14	Asa entre la hélice H1 y la 2da hebra de la hoja B	C : A		
	A309R					
ARG37	E142A [#]	Hélice H5	1er hebra en la hoja B	B : A		
wtBs	ASP14	1er y 4ta hebra de la hoja A				
	GLU61					
wtβglu	GLU429	Hélice H4	Última hebra de la hoja D			

*Columna 1 nombre de la proteína, columna 2 ID de la mutante, columna 3 residuo con el cual se genera la nueva interacción iónica, columnas 3 y 4 localización estructural para la mutante y su interacción, por último, la columna 6 se encuentra la interacción (dominio:dominio) de cada mutante. En la columna 1, en las últimas cuatro filas se encuentran las mutantes del tipo control negativo E142A[#] para *Trametes versicolor* y control positivo para *Bacillus subtilis** y β-glucosidasas^o respectivamente.

3.3 Discriminación de Mutantes con Potencial Termoestable

Los cálculos para determinar la energía de cada mutante se efectuaron con el Software NAMD, utilizando el campo de fuerzas CHARMM [143], y los parámetros de ajuste al campo de fuerza toppar C22/CMAP [125].

El primer criterio de eliminación estructural se aplicó a ocho mutantes; estas mutaciones correspondían a interacciones con una distancia mayor a 8 Å, y 3 más por estar en las vecindades del sitio activo. Las últimas once mutantes se eliminaron mediante un criterio de exclusión energética; estas mutaciones presentaron una diferencia energética ínfima cuando fueron comparadas con la energía de wtTv (**Figura 19**).

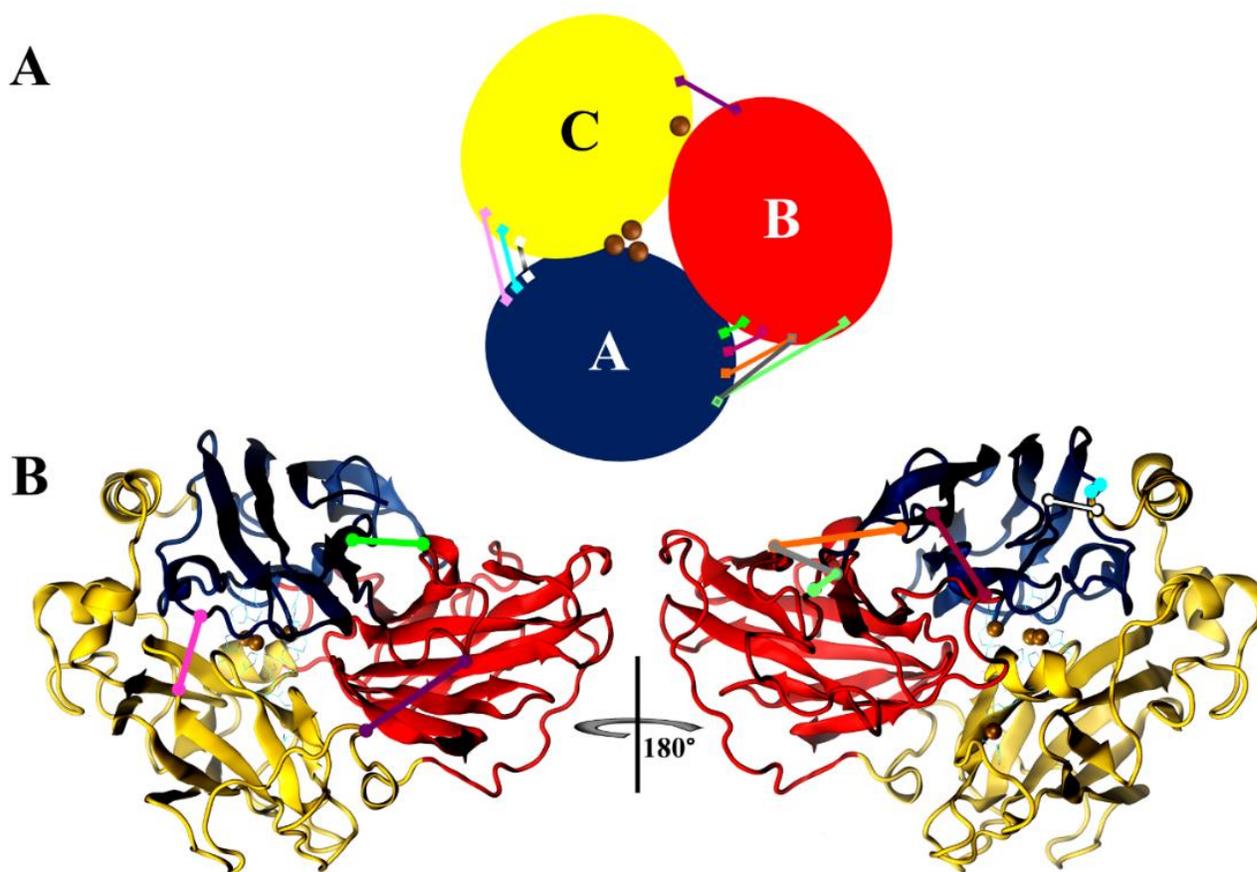


Figura 19. Estructura de la lacasa de *T. versicolor*. **A)** Descripción de wtTv los dominios se encuentran representados como elipses, la localización esquemática de los cobres se muestra como esferas (color ocre). Las líneas en color corresponden a los puentes salinos generados mediante la puntuación puntual (su localización precisa puede ser encontrada en la **Tabal 5**, bajo el mismo código de colores). Dado que dos puentes salinos resultados en las mutaciones A71R y A71K, estos se encuentran representados por la misma línea rosa, así como A88R y A88K por la misma línea cian, por lo cual solo aparecen 8 líneas para los 10 puentes de sal estudiados. El puente de sal eliminado para generar el control negativo E142A se representa en verde. **B)** Estructura con representación en “Cintas” de wtTv muestra la ubicación tridimensional de todos los puentes salinos, las líneas de color entrelazan los carbonos a de los residuos participantes.

De las treinta y tres mutantes presentadas en la **Tabla 4**, diez de éstas fueron seleccionadas para realizar las simulaciones por DM. En la **Tabla 5** se muestra la lista de las mutantes puntuales simples de aquellos residuos eléctricamente neutros capaces de producir puentes salinos con alto potencial de conferir estabilidad estructural y térmica sobre las interacciones entre dominios.

Tabla 5. Descripción y Localización de las Mutantes de wtTv *

Mutante	Vecino	Localización de la mutación	Localización del vecino	Dominios de interacción
A71K	ASP444	β -turn entre la 2da hebra de la hoja B y la hélice H2	γ -turn entre la 6ta hebra de la hoja F y la 4ta hebra de la hoja G	A : C
A71R				
A88K				
A88R	ASP498	β -turn entre la hélice H2 y la 4ta hebra de la hoja A	Hélice H14	
L158R	ASP23	β -harping entre la 1ra y 2da hebra de la hoja C	2da hebra de la hoja A	
G175R	ASP18	β -turn entre la 2da hebra de la hoja C y la 1er hebra de la hoja D	β -harping conectando la 1ra y 2da hebra de la hoja A	B : A
A184R				
A184D				
L308E	ASP136	β -turn conectando la hélice H7 y la 1ra hebra de la hoja E	Hélice H4	C : A
A497D	LYS59	Hélice H14	Asa entre la hélice H1 y la 2da hebra de la hoja B	C : A
E142A	ARG37	Hélice H5	1er hebra en la hoja B	B : A

3.4 La Dinámica

Una vez determinadas las mutantes con alto potencial de ser estudiadas por Dinámica Molecular, se procedió a realizar las simulaciones computacionales de las 17 estructuras (10 mutantes de wtTv, 4 controles y tres estructuras silvestres). Cada una de las estructuras fue simulada a **298.15 K** (25°C), **323.15 K** (50° C) y **348.15 K** (75 °C) por triplicado, para un total de 153 corridas las cuales en conjunto representaron más de 3.1 μ s.

3.4.1 Estabilidad

En todas las simulaciones, fueron monitorizados: la **Raíz de la Desviación Cuadrática Media (RMSD)** (**Figura 20 a 23**), **Radio de Giro (Rg)** (**Figuras 24 - 27**), estructura secundaria (**DSSP**) (**Figuras 28 - 30**) y la **Raíz de la Fluctuación Cuadrática Media (RMSf)** con fines de evaluar la estabilidad y fluctuaciones de los sistemas. Inicialmente analizamos el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las simulaciones. El cálculo de RMSD se efectuó sobre los átomos de la cadena principal, permitiéndonos evaluar la divergencia estructural de la proteína tomando su estructura inicial como referencia (apartado 3.3, estructuras de mínima energía).

3.4.1.1 Raíz de la Desviación Cuadrática Media

Para cada una de las 153 simulaciones se presentan en las **Figuras 20 a 23** las curvas de RMSD vs tiempo. De cada una de ellas se obtendrán y discutirán los valores de convergencia de RMSD, oscilaciones y tiempo de equilibrio, donde, el valor de convergencia para el RMSD está definido como: el promedio calculado sobre los últimos 5 ns de simulación, las oscilaciones, se definieron como: la desviación estándar del promedio de los últimos 5 ns de simulación y el tiempo de equilibrio se definió como: el tiempo para el cual la estructura de la proteína converge a un estado determinado como estable y constante o en otras palabras es el momento de la simulación donde se asume que todos los parámetros que definen el estado del sistema serán independientes del tiempo.

En la **Tabla 6** puede apreciarse el promedio de las fluctuaciones del RMSD para los últimos 5ns de simulación, el RMSD promedio, así como el tiempo para alcanzar equilibrio para cada una de las 153 simulaciones. De manera general, la magnitud de las fluctuaciones estructurales de las simulaciones realizadas para las enzimas lacasas resultaron ser mayores a lo esperado alcanzando valores hasta de 4 Å una vez equilibrados los sistemas. Sin embargo, dichas variaciones son consistentes en cada sistema estudiado, como se puede apreciar a lo largo de la **Tabla 6**. En nuestra experiencia el tipo de fluctuaciones como las mostradas en las **Figuras 20 a 23** son una característica de la lacasa, como lo muestran trabajos realizados por Bello y colaboradores, 2012 [177]; Sharma y colaboradores, 2018 [178]; Barbariga y colaboradores. 2014 [179]; Satpathy y colaboradores. 2014 [180]; Rodriguez y colaboradores, 2012 [181]; Christensen y colaboradores, 2013 [182]; Haider y colaboradore, 2008 [183]; Soni y colaboradores, 2014 [184]; Zhang y colaboradores. 2016 [185].

Tabla 6. Valores Promedios del RMSD para wtUv, wtBs, wtβglu y sus Mutantes

Mutante	298.15 K									323.15 K									348.15 K								
	Promedio (Å)			Fluctuaciones Promedio (Å/ns)			Equilibrio (ns)			Promedio (Å)			Fluctuaciones Promedio (Å/ns)			Equilibrio (ns)			Promedio (Å)			Fluctuaciones Promedio (Å/ns)			Equilibrio (ns)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
wtUv	2.3	2.4	3.1	0.13	0.11	0.09	24	15	15	2.9	2.5	3.	0.13	0.11	0.13	20	15	25	3.2	3.1	2.8	0.18	0.14	0.12	20	15	15
A71K	3.9	3.2	3.4	0.19	0.11	0.11	20	15	15	3.1	3.6	3.4	0.10	0.13	0.26	15	20	15	3.5	4.0	3.3	0.20	0.19	0.21	15	20	15
A71R	2.4	2.7	2.5	0.11	0.13	0.09	15	15	15	2.8	2.9	2.8	0.15	0.17	0.13	15	15	15	3.4	2.9	3.7	0.16	0.12	0.14	15	15	20
A88K	2.7	4.3	4.0	0.29	0.21	0.16	15	15	15	4.6	3.5	4.1	0.20	0.18	0.19	15	15	15	4.0	3.7	3.5	0.18	0.19	0.18	15	15	20
A88R	2.3	2.2	2.5	0.11	0.12	0.23	15	15	15	4.3	3.7	3.6	0.28	0.21	0.18	15	15	15	4.1	3.9	3.4	0.31	0.26	0.31	15	20	15
L158R	2.6	2.8	2.4	0.13	0.14	0.11	21	15	15	2.9	3.9	3.5	0.19	0.18	0.18	15	15	15	3.3	2.6	3.6	0.12	0.13	0.18	15	15	15
G175R	2.7	3.8	1.9	0.13	0.28	0.09	15	15	15	2.8	3.2	3.0	0.10	0.15	0.11	15	15	18	3.0	3.2	3.9	0.13	0.20	0.17	15	15	15
A184R	4.0	3.6	2.7	0.18	0.12	0.10	25	15	15	2.4	3.3	3.4	0.09	0.17	0.17	15	15	20	4.2	2.6	2.8	0.22	.19	0.20	15	15	15
A184D	2.7	3.8	2.7	0.13	0.17	0.12	15	20	15	3.8	3.7	2.9	0.14	0.18	0.14	15	15	15	2.9	3.6	3.2	0.14	0.19	0.14	15	15	20
A497D	2.2	2.7	2.9	0.10	0.13	0.14	15	15	15	3.1	3.1	3.2	0.25	0.13	0.23	25	15	15	2.7	3.6	2.3	0.15	0.26	0.09	15	15	15
L308E	2.8	2.7	3.1	0.12	0.15	0.12	15	15	15	2.7	3.2	2.6	0.09	0.10	0.10	15	15	15	3.1	3.0	2.8	0.21	0.15	0.30	17	15	15
E142A	3.1	2.8	2.6	0.12	0.12	0.10	15	15	15	2.6	2.8	3.1	0.15	0.11	0.24	15	15	15	3.8	3.6	3.2	0.15	0.18	0.15	15	15	15
wtBs	2.3	2.5	2.4	0.09	0.07	0.09	20	20	20	3.1	2.3	2.6	0.09	0.10	0.13	20	20	22	2.8	2.9	3.1	0.10	0.14	0.15	20	20	20
E188K	1.8	2.0	2.3	0.07	0.06	0.23	20	20	20	3.2	2.1	2.7	0.13	0.10	0.10	20	20	20	2.9	3.4	2.4	0.13	0.18	0.14	20	20	20
E188R*	2.1	2.1	2.1	0.10	0.07	0.14	20	20	20	2.1	2.2	2.1	0.09	0.10	0.10	20	20	20	2.9	2.7	2.6	0.24	0.16	0.12	20	20	20
wtβglu	1.6	1.7	1.4	0.08	0.07	0.05	15	15	15	1.6	1.6	1.8	0.05	0.11	0.10	15	15	15	1.5	1.6	1.6	0.07	0.05	0.09	15	15	15
H62R	1.4	1.5	1.3	0.04	0.06	0.08	15	15	15	1.7	1.5	1.6	0.06	0.06	0.07	15	15	15	1.7	1.3	1.3	0.09	0.06	0.06	15	15	15

Los RMSDs de las simulaciones se mantienen por debajo de los 4 Å, indicando que las estructuras son estables a lo largo de la trayectoria, sin sufrir alteraciones graves de sus conformaciones respecto a la estructura de partida.

En la **Figura 20** se muestran los RMSDs en función del tiempo para los esqueletos polipeptídicos de cada una de las conformaciones proteicas de las enzimas silvestres con respecto a sus correspondientes estructuras iniciales. De igual manera se monitorizó dicho parámetro en sus mutantes. Los valores promedio de RMSDs se muestran en la tabla 6. A temperatura ambiente dichos valores promedios se mantienen estables una vez alcanzado el estado de equilibrio, en torno a 3 Å. Este hecho indica que la estructura es estable a lo largo de la trayectoria.

En el caso de wtTv fue necesario alargar el ensayo de una réplica a 298.15 K y de dos a 323.15 K debido a que a los 20 ns aún no se alcanzaba el equilibrio de éstas. Al prolongar el tiempo de la dinámica se observó que el RMSD de dichas réplicas comenzaron a estabilizarse y tras ello, durante el tiempo restante de la dinámica los valores de RMSD se mantuvieron constantes alrededor de los 3.5 Å.

Cuando la temperatura se incrementa hasta 348.15 K (líneas rojas, **Figura 20**), los RMSDs para el esqueleto (**Tabla 6**) alcanzan valores comprendidos entre 3 Å para la enzima silvestre de *Bacillus* y 3.5 Å nm para wtTv, lo que indica cambios no significativos en las proteínas estudiadas con respecto a sus respectivas estructuras iniciales en la trayectoria. Para las temperaturas de 298.15 K y 323.15 K el RMSD aumenta gradualmente hasta valores superiores a 2.5 Å para posteriormente estabilizarse pasados los 15 ns de simulación.

-
177. Bello M, Valderrama B, Serrano-Posada H. Molecular dynamics of a thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: structural differences between the apo and holo forms. *PLoS One*. 2012; 7(7): e40700. doi: [10.1371/journal.pone.0040700](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040700)
 178. Sharma KK, Singh DB, Rawat S. Molecular dynamics simulation studies suggests unconventional roles of non-secretary laccases from enteropathogenic gut bacteria and *Cryptococcus neoformans* serotype D. *Computational Biology and Chemistry*. 2018;73:41-48. doi: [10.1016/j.compbiolchem.2018.01.010](https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.01.010)
 179. Barbariga M, Curnis F, Spitaleri A, et al. Oxidation-induced structural changes of ceruloplasmin foster ngr motif deamidation that promotes integrin binding and signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(6):3736-3748. doi: [10.1074/jbc.M113.520981](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.520981)
 180. Satpathy B, Konkimalla, VB, Ratha J. In-silico rational protein engineering and design approach to improve thermostability of a haloalkane dehalogenase enzyme. *Current Research in Bioinformatics*. 2015, 4(2): 34-46. doi: [10.3844/ajbsp.2015.34.46](https://doi.org/10.3844/ajbsp.2015.34.46)
 181. Rodríguez EJ, Kihara D. Fitting multimeric protein complexes into electron microscopy maps using 3d zernike descriptors. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2012;116(23):6854-6861. doi: [10.1021/jp212612t](https://doi.org/10.1021/jp212612t)
 182. Christensen NJ, Kepp KP. Stability mechanisms of a thermophilic laccase probed by molecular dynamics. *PLoS One*. 2013;8: e61985. doi: [10.1371/journal.pone.0061985](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061985)
 183. Haider S, Parkinson GN, Neidle S. Molecular dynamics and principal components analysis of human telomeric quadruplex multimers. *Biophysical Journal*. 2008;95(1):296-311. doi: [10.1529/biophysj.107.120501](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120501)
 184. Soni S, Tyagi C, Grover A, Goswami SK. Molecular modeling and molecular dynamics simulations based structural analysis of the SG2NA protein variants. *BMC Research Notes*. 2014;7: 446. doi: [10.1186/1756-0500-7-446](https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-446)
 185. Zhang Y, Ding Y. Molecular dynamics simulation and bioinformatics study on chloroplast stromal ridge complex from rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Bioinformatics*. 2016;17: 28. doi: [10.1186/s12859-016-0877-0](https://doi.org/10.1186/s12859-016-0877-0)

En las simulaciones para las tres proteínas silvestres, las trayectorias de las proteínas lacasas (*wtTv* y *wtBs*) muestran valores de RMSD que indican un comportamiento diferente en comparación a la proteína silvestre β -glucosidasa (*wt β glu*). Mientras que las lacasas experimentan un rápido incremento del RMSD en los primeros 5 ns de trayectoria, *wt β glu* sufre un ascenso menos estrepitoso.

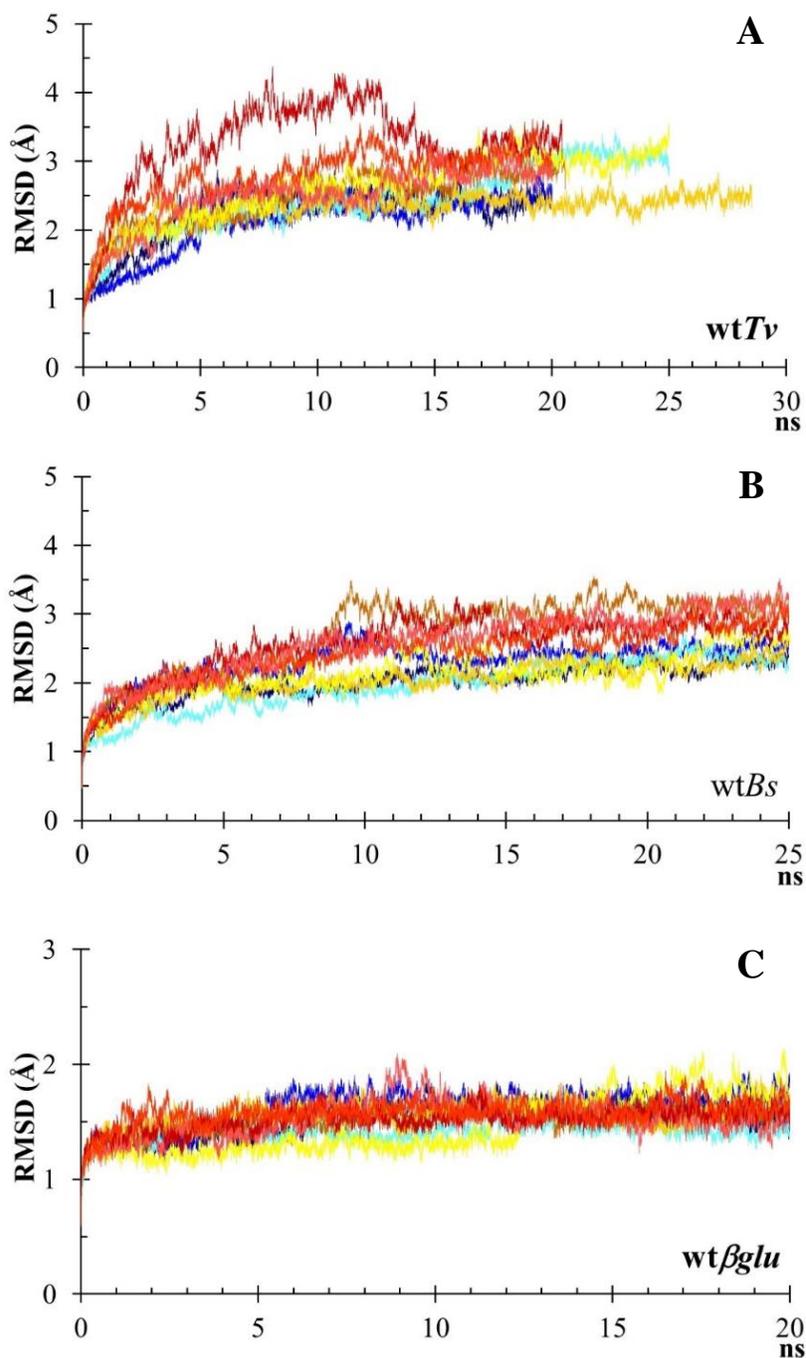


Figura 20. Raíz de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) con respecto a la estructura de mínima energía en los átomos de Cadena principal de las estructuras silvestres (*wtTv*, *wtBs* y *wt β glu*) para cada condición simulada. Cada gama de color representa los triplicados para cada sistema, en colores azul, amarillo y rojo las simulaciones a • 298.15 K • 323.15 K y • 348.15 K, respectivamente.

Estos resultados sugieren que tanto wtTv como wtBs generan cambios estructurales altamente definidos por su naturaleza conformada por tres dominios, no así wt β glu, la cual se encuentra constituida de un solo dominio. En el caso de las simulaciones de *Bacillus subtilis*, estas se equilibran a partir el nanosegundo 10, con un RMSD de ~ 2 Å a 298.15 K y 323.15 K, y de ~ 2.75 para 348.15 K.

Las estructuras de la β -glucosidasa se muestran **Figura 20C**, que permite apreciar que el proceso de calentamiento sucede rápidamente alcanzando el equilibrio a menor tiempo, con oscilaciones de hasta $0.05 \text{ \AA} \cdot \text{ns}^{-1}$ y un RMSD promedio de 1.5 \AA para los últimos 5 nanosegundos de simulación. Esto es significativamente más rápido y menor comparado contra los otros dos sistemas silvestres, ya que tomando el caso de wtTv las oscilaciones son de $0.15 \text{ \AA} \cdot \text{ns}^{-1}$ y en wtBs se encuentran $0.20 \text{ \AA} \cdot \text{ns}^{-1}$ como se puede ser apreciado a lo largo de la **Figura 20**.

El RMSD de los controles negativo y positivos (**Figura 21**) se comportan de manera similar. La mutante E142A (control negativo, **Figura 21A**), el equilibrio de las simulaciones se alcanza alrededor del décimo nanosegundo fluctuando en valores próximos de 2.25 \AA y 3.75 \AA , con oscilaciones mayores en comparación wtTv de $\sim 0.4 \text{ \AA} \cdot \text{ns}^{-1}$ para las corridas a 348.15 K, denotando que el efecto de la temperatura sobre las vibraciones atómicas en la mutante E142A son mayores que las estudiadas para la proteína silvestre.

De manera semejante, las mutantes de la lacasa de *Bacillus subtilis* (**Figura 21B**): E188K y E188R tienen un comportamiento similar a su estructura silvestre. En particular E188K alcanza su estado de equilibrio para el nanosegundo 10 a 298.15 K y 323.15 K, mientras que para la temperatura de 348.15 K lo alcanza cerca del nanosegundo 20, pero en un rango el cual puede ir desde 1.8 \AA a 3.5 \AA . Sin embargo, una de las tres réplicas realizadas a 323.15 K mostró un comportamiento errático aproximadamente a los 4 ns, para posteriormente equilibrarse en el nanosegundo 15 a 3 \AA .

La mutante E188R presenta un calentamiento ascendente hasta ~ 3 ns, adoptando conformaciones estables entre los 2.0 y 3.0 \AA a partir del nanosegundo 20 como se aprecia en la **Figura 21C**. Las oscilaciones para cada una de las mutantes de *Bacillus subtilis* son menores en comparación las determinadas para su enzima silvestre, como puede ser apreciado en la **Tabla 6**, del orden de $\sim 0.15 \text{ \AA} \cdot \text{ns}^{-1}$ en comparación a wtBs que son de $0.25 \text{ \AA} \cdot \text{ns}^{-1}$.

La mutante de β -glucosidasa H62R (**Figura 21D**) se estabiliza rápidamente en el primer nanosegundo alrededor de 1.25 Å a 1.75 Å, con oscilaciones sobre la estructura del orden de $\sim 0.15 \text{ \AA} \cdot \text{ns}^{-1}$.

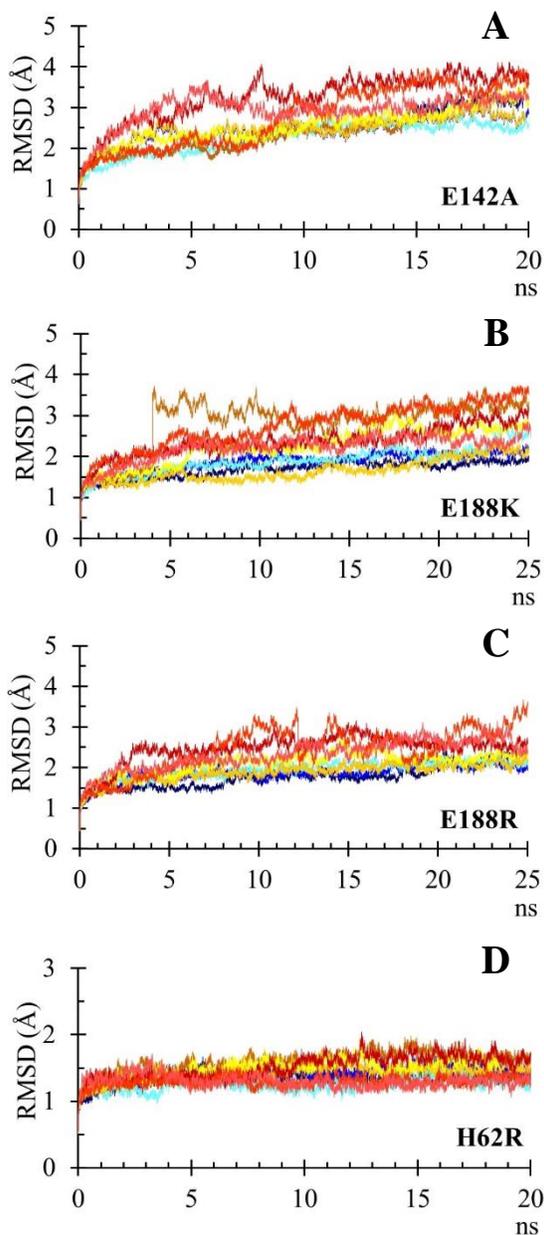


Figura 21. Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) en los átomos de cadena principal de las estructuras control negativo y positivo (E142A, H62R, E188K y E188R) para cada condición simulada. Cada gama de color representa los triplicados para cada sistema, en colores azul, amarillo y rojo se aprecian las corresponden simulaciones a • 298.15 K • 323.15 K y • 348.15 K.

A continuación, en lo que respecta a las mutantes de alto potencial térmico correspondientes a las mutaciones negativas (**Figura 22**): A71K, A71R, A88K, A88R, G175R y L158R. De manera general estas muestran mayores oscilaciones con respecto a su estructura de partida y en comparación con la proteína silvestre.

Cerca del nanosegundo 10 y 15 todos los sistemas parecen tener conformaciones metaestables que van siendo explotadas durante la simulación, para que el equilibrio fluctuó en un intervalo de 2.0 a 4.0 Å.

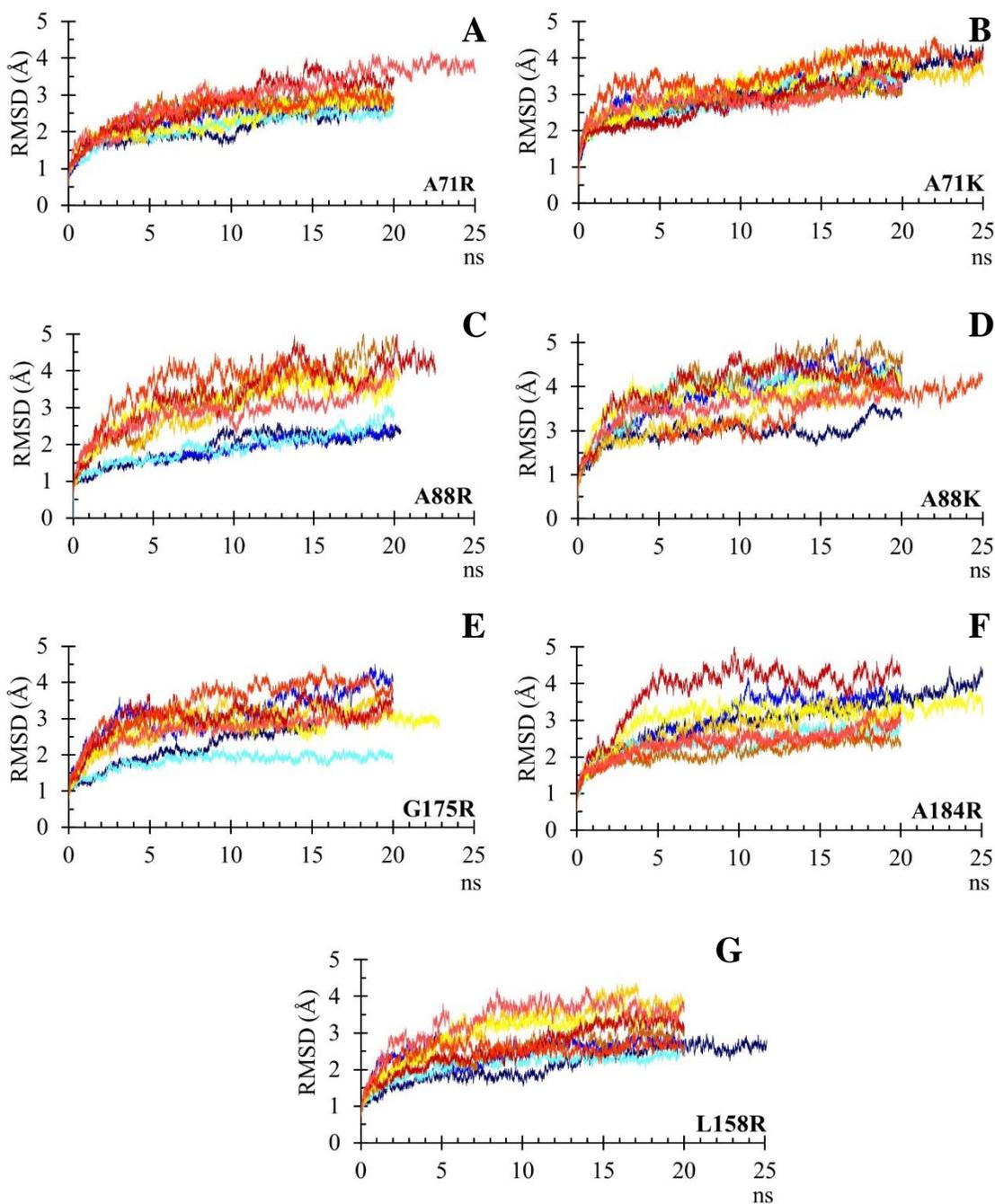


Figura 22. Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) en los átomos de cadena principal de las mutantes negativas (A71K, A71R, A88K, A88R, A184R, G175R, L158R). En color azul, amarillo y rojo se aprecian las simulaciones a •298.15 K •323.15 K y •348.15 K.

Las simulaciones de la mutante A88K a 298K (**Figura 22**) se observa que las oscilaciones de la estructura salen del patrón mostrado en comparación con las otras mutantes, incrementando su RMSD en la zona de equilibrio aproximadamente a 5 Å, debido probablemente a una repulsión de la proteína por este tipo de residuo. Los RMSD para las mutantes A71R, A88R y A158R son menores en comparación con wtTv. Por otro lado, en los valores altos de RMSD para las mutantes A77K y A88K se divisan valores superiores en las fluctuaciones hasta de $\sim 0.6 \text{ \AA} \cdot \text{ns}^{-1}$, alcanzando el estado equilibrado en $\sim 3.0 \text{ \AA}$ y $\sim 4.0 \text{ \AA}$ respectivamente. A temperaturas bajas las mutantes A71K y A88R se muestran como las mutantes mejor conservada con referencia a su estructura de partida y por debajo de wtTv hasta en $0.7 \text{ \AA} \cdot \text{ns}^{-1}$. Consideremos ahora el RMSD a 323.15 K, este se muestra estable y lo cual denota que los sistemas se encuentran en el equilibrio del nanosegundo 15 en adelante alcanzando un valor límite de 3.5 Å en el caso de las mutantes A88K y A88R. De manera categórica a lo largo de la **Figura 22**, se puede observar que el grado de fluctuaciones presentes en las simulaciones a 323.15 K es mayor en comparación a las simulaciones realizadas a 298.15 K.

Habría que decir también, que al aumentar la temperatura de simulación hasta 348.15 K los valores de RMSD cuentan con un perfil entre lo plasmado por las de las simulaciones realizadas a 298.15 y 323.15 K. Es conveniente subrayar que las mutantes A88K, A88R y A71K presentan oscilaciones superiores a wtTv, por otro lado, A71R y L158R desarrollan el mismo grado de variación que wtTv a lo largo de las simulaciones.

Examinemos brevemente ahora las mutantes positivas (**Figura 23**): A184D, A497D y L308E. En lo respectivo a la mutante A184D presenta un largo calentamiento de $\sim 10 \text{ ns}$ con oscilaciones de $\sim 0.35 \text{ \AA} \cdot \text{ns}^{-1}$ a lo largo de las simulaciones y un valor máximo-mínimo entre temperaturas de que va del 2.5 a 4.0 Å. En este mismo sentido, una de las tres réplicas a 298.15 K y 348.15 K se comportan fuera de lo esperado, siendo necesario alargar el ensayo por 5 ns debido a que en estas, se producen divergencias estructurales (saltos en el RMSD) amplias a lo largo de la simulación, al incrementar el tiempo de dinámica se observó que el RMSD para 298.15 K y 348.15 K se mantuvieron constantes en ~ 3.5 y 3.0 \AA , tras una oscilación amplia en torno a los $0.13 \text{ \AA} \cdot \text{ns}^{-1}$. Algo semejante ocurre con A497D, en particular el comportamiento de una corrida a 323.15 K es no convencional ya que en los primeros dos nanosegundos presento un pico de 3.8 Å, para después comenzar un descenso a lo largo de los siguientes 13 nanosegundos, encontrando el equilibrio en 3.0 Å.

En el caso particular en la última quiera L308E, independientemente de la temperatura converge en ~ 2.5 Å aproximadamente a un conjunto de conformaciones parecidas, véase la **Figura 23**, lo que indica cambios estructurales no significativos en las proteínas estudiadas con respecto a sus estructuras iniciales para cada trayectoria.

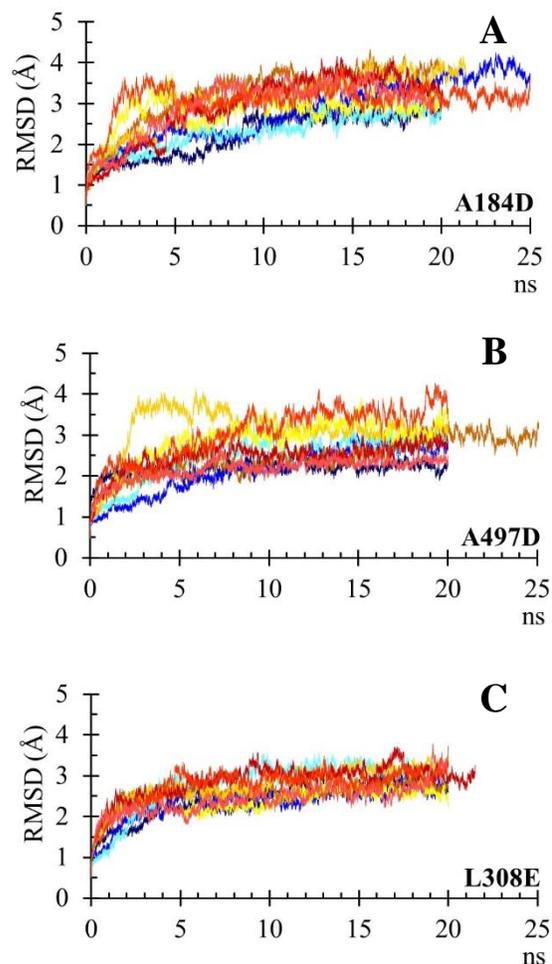


Figura 23. Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) en los átomos de cadena principal de las mutantes positivas (A184D, A497D y L308E) para cada condición simulada. La gama de color representa los triplicados para cada temperatura, en colores azul, amarillo y rojo se aprecian las simulaciones a • 298.15 K • 323.15 K y • 348.15 K.

En general se observa que *wtβglu* y sus mutantes presentan oscilaciones pequeñas y encuentran el equilibrio más temprano en comparación a las proteínas de lacasa, este comportamiento puede ser debido a que la *wtβglu* es una proteína de tipo monomérica, lo cual contrasta con los tres dominios de lacasa, así como con los metales que alberga en su centro activo, sugiriendo que las fluctuaciones de la simulación son intrínsecas a la naturaleza proteica de cada enzima, apreciándose que los comportamientos de los sistemas son sistemáticos y que las simulaciones están reflejando comportamientos apropiados a cada uno de ellos.

3.4.1.2 Compactación Estructural

El radio de giro es un parámetro indicativo del grado de compactación de la proteína, definido como la distancia cuadrática media de cada átomo de la proteína a su centroide. En las **Figuras 24 a 27** se muestra la evolución del Rg en función del tiempo y en la **Tabla 7** los valores de los valores estimados para cada una de las 153 simulaciones.

Es importante destacar que el Rg se mantiene constante con el tiempo de trayectoria para todas las proteínas estudiadas, con sutiles diferencias en el comportamiento según la proteína y forma.

Tabla 7. Valores Promedios del Radio de Giro para wtTv, wtBs, wtβglu y sus Mutantes

Mutante	298.15 K						323.15 K						348.15 K					
	R ₁		R ₂		R ₃		R ₁		R ₂		R ₃		R ₁		R ₂		R ₃	
	* Promedio (Å)	* Fluctuaciones Promedio (Å/ns)	* Promedio (Å)	* Fluctuaciones Promedio (Å/ns)	* Promedio (Å)	* Fluctuaciones Promedio (Å/ns)	* Promedio (Å)	* Fluctuaciones Promedio (Å/ns)	* Promedio (Å)	* Fluctuaciones Promedio (Å/ns)	* Promedio (Å)	* Fluctuaciones Promedio (Å/ns)	* Promedio (Å)	* Fluctuaciones Promedio (Å/ns)	* Promedio (Å)	* Fluctuaciones Promedio (Å/ns)	* Promedio (Å)	* Fluctuaciones Promedio (Å/ns)
1GYC	21.61																	
wtTv	22.7	0.10	23.2	0.07	22.7	0.05	22.7	0.06	23.0	0.07	22.6	0.06	22.7	0.05	23.0	0.10	23.2	0.12
A71K	23.4	0.07	23.1	0.06	22.9	0.06	23.3	0.08	23.0	0.08	23.0	0.11	23.2	0.10	23.2	0.10	23.2	0.11
A71R	22.8	0.06	22.8	0.08	22.7	0.05	23.1	0.10	22.	0.09	22.8	0.07	22.7	0.09	23.1	0.10	23.0	0.08
A88K	22.9	0.13	23.4	0.07	23.3	0.7	23.8	0.10	23.2	0.08	23.5	0.08	23.5	0.10	23.2	0.09	23.2	0.09
A88R	22.5	0.05	22.5	0.05	22.6	0.10	23.5	0.15	23.1	0.08	22.9	0.08	23.4	0.11	23.2	0.12	23.3	0.12
L158R	22.6	0.05	22.8	0.07	22.6	0.07	23.0	0.11	23.5	0.10	23.4	0.10	23.1	0.08	22.7	0.06	23.2	0.11
G175R	22.9	0.06	23.3	0.12	22.5	0.05	22.9	0.08	23.2	0.08	23.2	0.06	23.0	0.07	23.0	0.10	23.4	0.09
A184R	23.1	0.07	22.5	0.10	22.6	0.05	22.5	0.06	22.	0.06	23.1	0.08	23.4	0.09	22.9	0.10	22.7	0.08
A184D	22.8	0.06	22.8	0.06	23.1	0.06	23.1	0.08	23.2	0.08	22.9	0.06	23.3	0.12	23.1	0.08	23.0	0.07
A497D	22.7	0.06	22.6	0.06	23.2	0.09	23.0	0.06	23.0	0.09	22.9	0.09	22.8	0.07	23.0	0.10	22.3	0.05
L308E	23.0	0.06	22.9	0.06	23.0	0.06	22.8	0.06	23.2	0.06	22.8	0.07	23.0	0.16	22.8	0.22	23.0	0.08
E142A	22.6	0.06	22.6	0.06	22.6	0.05	22.4	0.06	22.6	0.06	22.8	0.06	22.6	0.06	22.8	0.08	22.9	0.07

Los resultados obtenidos a alta temperatura tampoco muestran grandes desigualdades entre proteína silvestre de *Trametes versicolor* y sus mutantes. En el caso de wtTv se incrementa su Rg (**Figura 24**) al principio de la trayectoria para posteriormente recuperarse gradualmente. Las Mutantes de arginina mantienen estables sus Rg una vez alcanzado el equilibrio. Sin embargo, A71K y A88K, ambas formas ven incrementado su Rg sin recuperar su valor de partida en ningún momento.

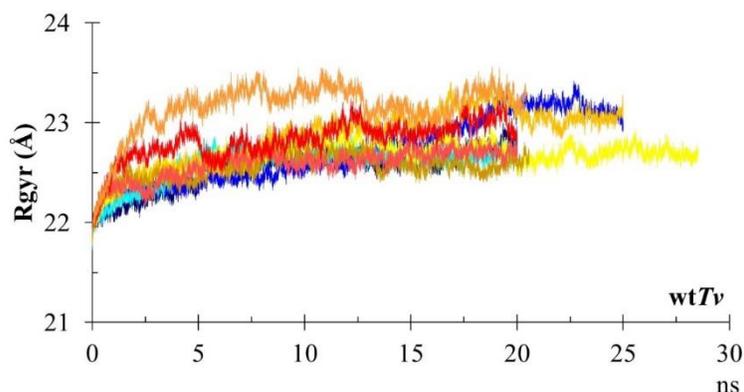


Figura 24. Radio de giro (R_g) a lo largo de las trayectorias para wtTv. La gama de color representa los triplicados para cada temperatura, en colores azul, amarillo y rojo se aprecian las simulaciones a • 298.15 K • 323.15 K y • 348.15 K.

La distancia de la superficie al centroide entre las estructuras de wtTv y sus mutantes son similares y no mayores a 23.5 Å, dado que las diferencias entre sistemas se muestran pequeñas, estas pueden ser descritas como una consecuencia de los cambios puntuales que se realizaron sobre wtTv [186, 187]. Así mismo, se calculó el Rg para la estructura cristalográfica 1GYC y wtTv teniendo obteniéndose un valor de 21.606 y 21.795 respectivamente.

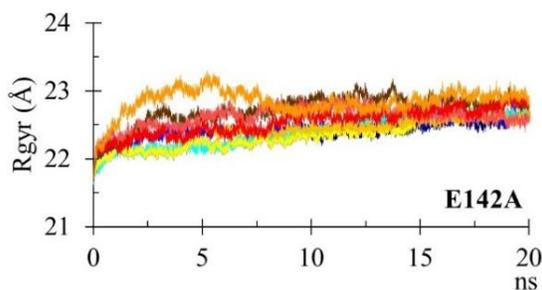


Figura 25. Radio de giro (R_g) a lo largo de las trayectorias para la estructura control negativo E142A. La gama de color representa los triplicados para cada temperatura, en colores azul, amarillo y rojo se aprecian las simulaciones a • 298.15 K • 323.15 K y • 348.15 K.

186. Lobanov M, Bogatyreva NS, Galzitskaia OV. Radius of gyration is indicator of compactness of protein structure. *Molekuliarnaia biologii (Mosk)*. 2008;42(4):701-6. doi: 10.1134/S0026893308040195
187. Luan B, Lyle N, Pappu RV, Raleigh DP. Denatured state ensembles with the same radii of gyration can form significantly different long-range contacts. *Biochemistry*. 2014;53(1):39-47. doi: 10.1021/bi4008337

En las **Figuras 25** y **26** puede apreciarse que las mutantes positivas, así como el control negativo experimentan una compactación, hasta 0.5 \AA en comparación a *wtTv* a 298.15 K . Por otro lado, en la **Figura 26** se observa un aumento en el R_g para la mutación A88K y A88R, lo cual permite ver en conjunto con el RMSD que este tipo de residuos, situados en a la superficie de la enzima lacasa no son favorables para el empaquetamiento.

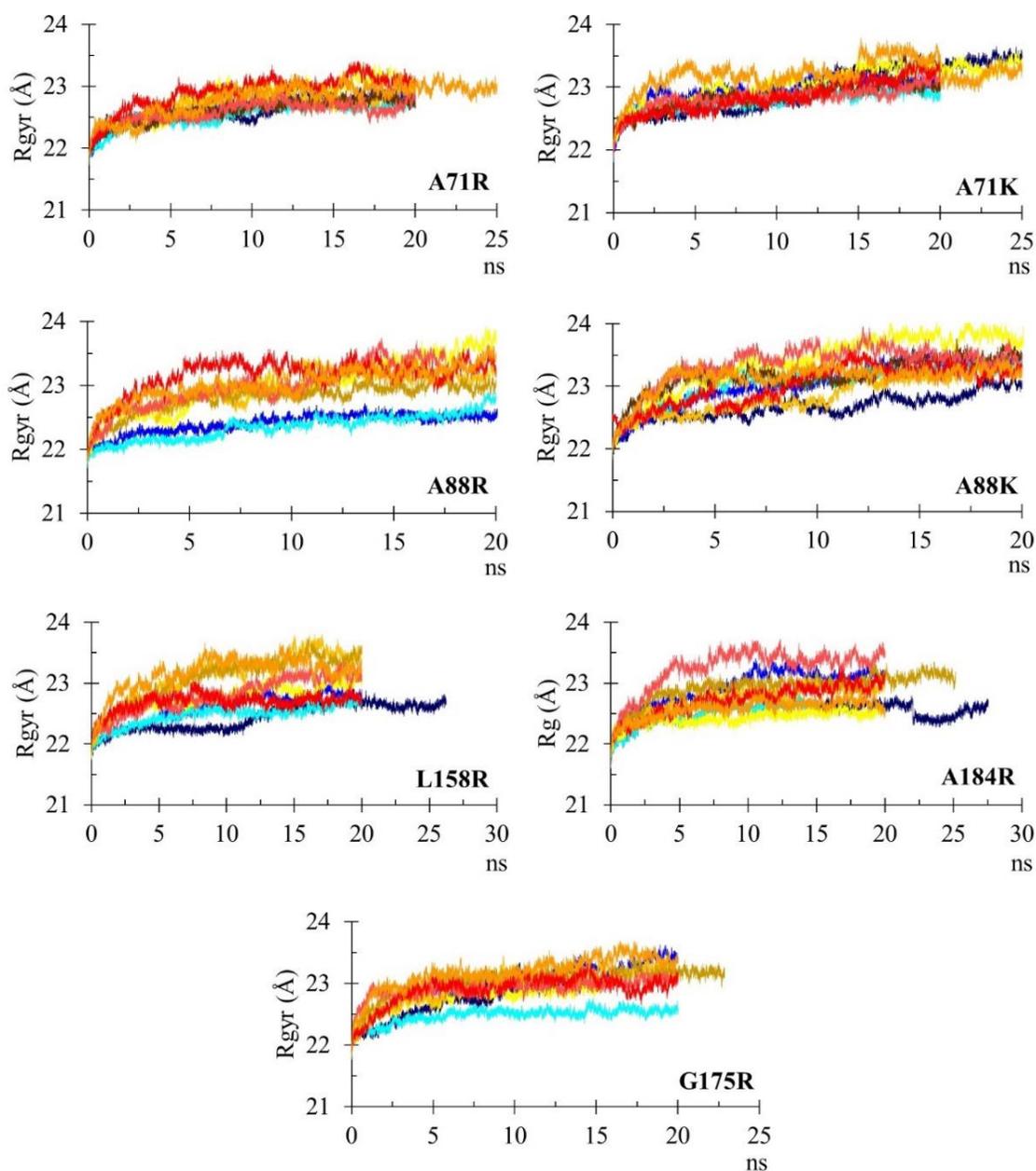


Figura 26. Radio de giro (R_g) a lo largo de las trayectorias para las mutaciones positivas A71R, A71K, A88R, A88K, L158R, G175R y A184R. La gama de color representa los triplicados para cada temperatura, en colores azul, amarillo y rojo se aprecian las simulaciones a $\bullet 298.15 \text{ K}$ $\bullet 323.15 \text{ K}$ y $\bullet 348.15 \text{ K}$.

El empaquetamiento a 323.15 K toma un perfil diferente en comparación a las simulaciones realizadas a 298.15 K. En las **Figuras 24 a 27** se aprecia un incremento de hasta 1 Å para las simulaciones a 323.15 K en comparación a las realizadas a 298.15 K. Este comportamiento no convencional surge a lo largo de cada análisis, y de manera constante, siendo así que puede asumirse que los sistemas no son tolerantes a dicha temperatura.

Un análisis más detallado sobre el Rg a 323.15 K nos permitió apreciar que, aunque dicho aumento oscila hasta un máximo de 1 Å, al momento que la estructura se encuentra en equilibrio este no causa desplegamiento sobre las estructuras, no obstante, consideramos que la simulación a 323.15 K para las enzimas se encuentra con un mayor grado de estrés aun comparado con las simulaciones a 348.15 K. Para 348.15 K se encontró que las mutantes A142E y A71R disminuyen su empaquetamiento en comparación al resto de las simulaciones, ya que estas dos mutantes revelan empaquetamientos por debajo de wtTv.

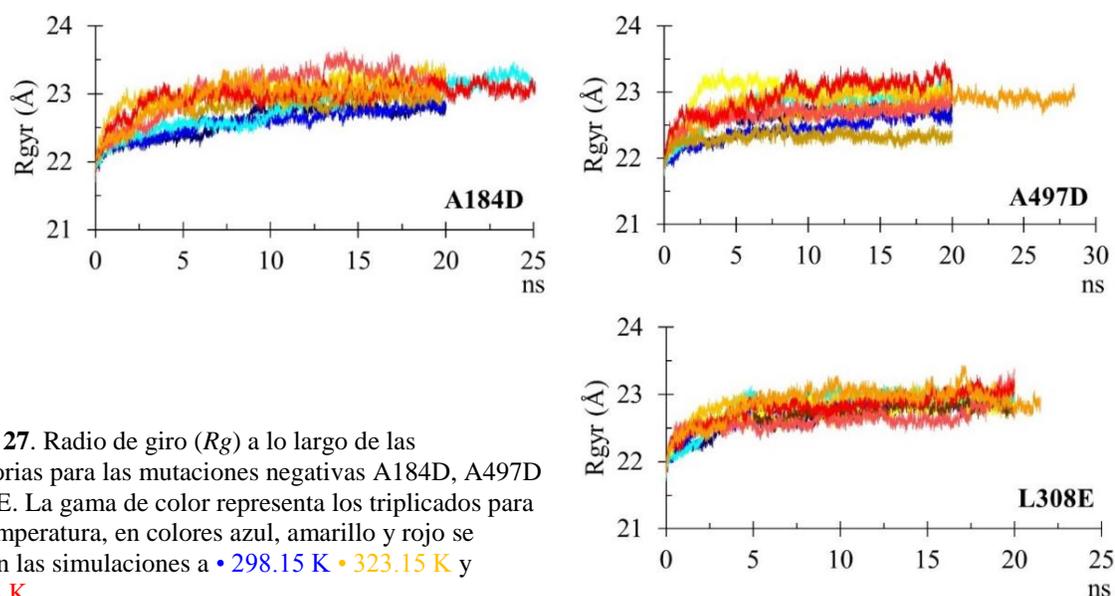


Figura 27. Radio de giro (R_g) a lo largo de las trayectorias para las mutaciones negativas A184D, A497D y L308E. La gama de color representa los triplicados para cada temperatura, en colores azul, amarillo y rojo se aprecian las simulaciones a • 298.15 K • 323.15 K y • 348.15 K.

Al constatar de manera aleatoria el Rg con una serie de visualizaciones de la estructura a lo largo de sus simulaciones, se aprecia que a pesar de los pequeños cambios en la compactación de las proteínas estas mantienen su forma globular sin mayores cambios y fluctuaciones, sugiriendo que se ha alcanzado el equilibrio de las simulaciones [188].

188. Battisti A, Ciasca G, Grottesi A, Tenenbaum A. Thermal compaction of the intrinsically disordered protein tau: entropic, structural, and hydrophobic factors. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2017;19(12):8435-8446. doi: 10.1039/c6cp07683a

3.4.1.3 Estructura Secundaria

Teniendo en cuenta los análisis anteriormente expuestos, a partir de la presente sección y en las subsecuentes nos daremos a la tarea por mostrado que la lacasa presenta variaciones conformacionales en función de la temperatura y que cada una de nuestras mutantes presentan una movilidad de fácil diferenciación

Para determinar si los sistemas están o no teniendo efectos locales debido a las mutaciones nos dimos a la tarea de evaluar el contenido de estructura secundaria utilizando las definiciones del **Dictionary of Secondary Structure for Proteins (DSSP)** [187].

En relación con las simulaciones, los sistemas a 298.15 K y 348.15 K presentan un recuento de estructura secundaria sin cambios estrepitosos sobre la estructura secundaria, con hojas beta altamente conservadas, evidenciando así una estructura secundaria intacta para las dos temperaturas.

En las **Figuras 28 a 30** se representa la evolución temporal de la estructura secundaria en la lacasa a cada condición simulada (en la **Figura 28 a 30** sólo se muestra un sistema por temperatura). En un primer análisis podemos observar en la lacasa a 323.15 K, que la estructura secundaria (Calculada como la suma de hojas tipo: antiparalela, paralela, paralela/antiparalela y antiparalela doble, y hélices tipo: 3, 4, 5 y lambda) presenta inconsistencias en comparación a las simulaciones realizadas a 298.15 K y 348.15 K.

Lo anterior puede ser visto a mayor detalle en la **Figura 29**, donde se observa para 323.15 K el menor valor de estructura secundaria siendo notoria la disminución de la cantidad de hojas beta; lo que explicaría su alto valor de RMSD.

La frecuencia con las cuales aparecen los elementos de estructura secundaria de cada residuo sobre las estructuras puede apreciarse en la **Figura 28** [189 - 192]. Se observa que el tipo de estructura secundaria depende de su prevalencia en cada estructura, en general los de conservación de estructura secundaria no presentan cambios por arriba del 10%.

-
189. Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 1983, 22(12):2577-2637. doi: [10.1002/bip.360221211](https://doi.org/10.1002/bip.360221211)
190. Zacharias J, Knapp EW. Protein secondary structure classification revisited: processing DSSP information with PSSC. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2014; 54(7):2166-79. doi: [10.1021/ci5000856](https://doi.org/10.1021/ci5000856)
191. Dong X, Su X, Yu J, et. al. Homology modeling and molecular dynamics simulation of the HIF2 α degradation-related HIF2 α -VHL complex. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2017; 71:116-123. doi: [10.1016/j.jmgm.2016.11.011](https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.11.011)
192. Joosten RP, te Beek TA, Krieger E, et. al. A series of PDB related databases for everyday needs. *Nucleic Acids Research*. 2011; 39:D411-9. doi: [10.1093/nar/gkq1105](https://doi.org/10.1093/nar/gkq1105)

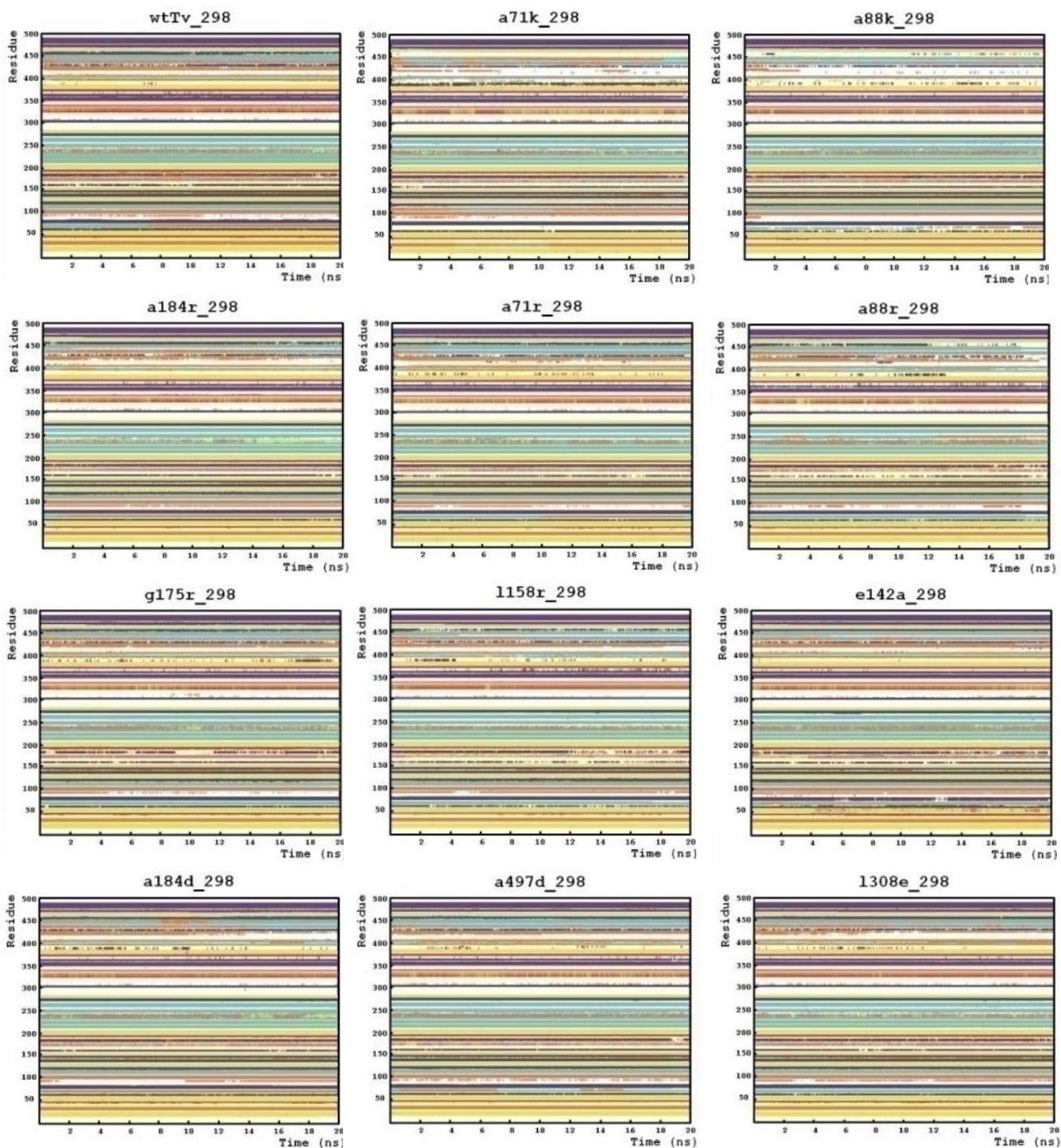


Figura 28. Conservación de la estructura secundaria como una función del tiempo, para las simulaciones de wtTv y sus mutante respectivamente efectuadas a 298.15 K (25°C). Gama de colores para la prevalencia estructural, ● hoja antiparalela, ● hoja paralela, ● hojas paralelas/antiparalela, ● hoja antiparalela doble, ● hélice 3, ● hélice 4, ● hélice 5.

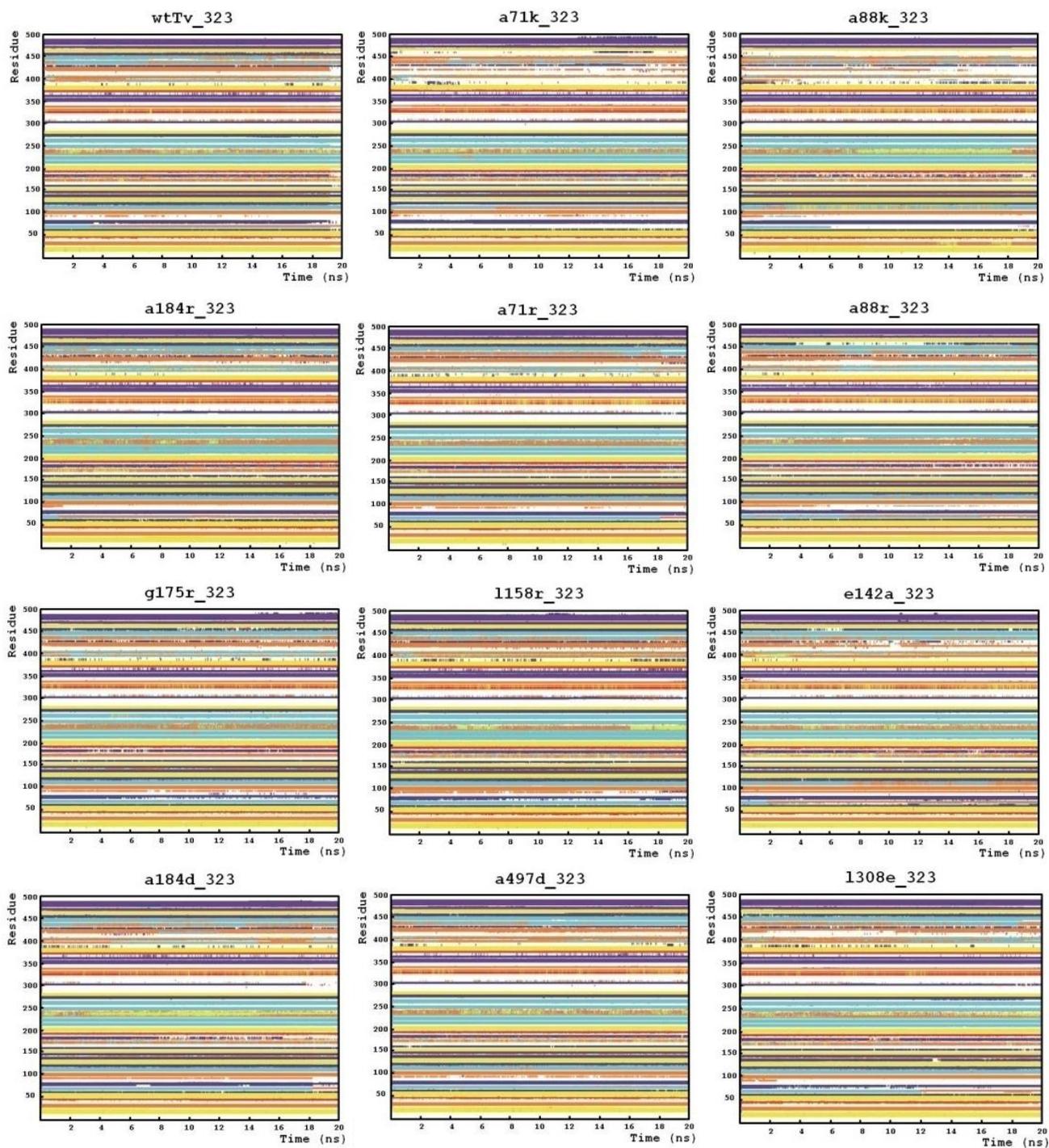


Figura 29. Conservación de la estructura secundaria como una función del tiempo, para las simulaciones de wtTv y sus mutante respectivamente efectuadas a 323.15 K (50°C). Gama de colores para la prevalencia estructural, ● hoja antiparalela, ● hoja paralela, ● hojas paralelas/antiparalela, ● hoja antiparalela doble, ● hélice 3, ● hélice 4, ● hélice 5.

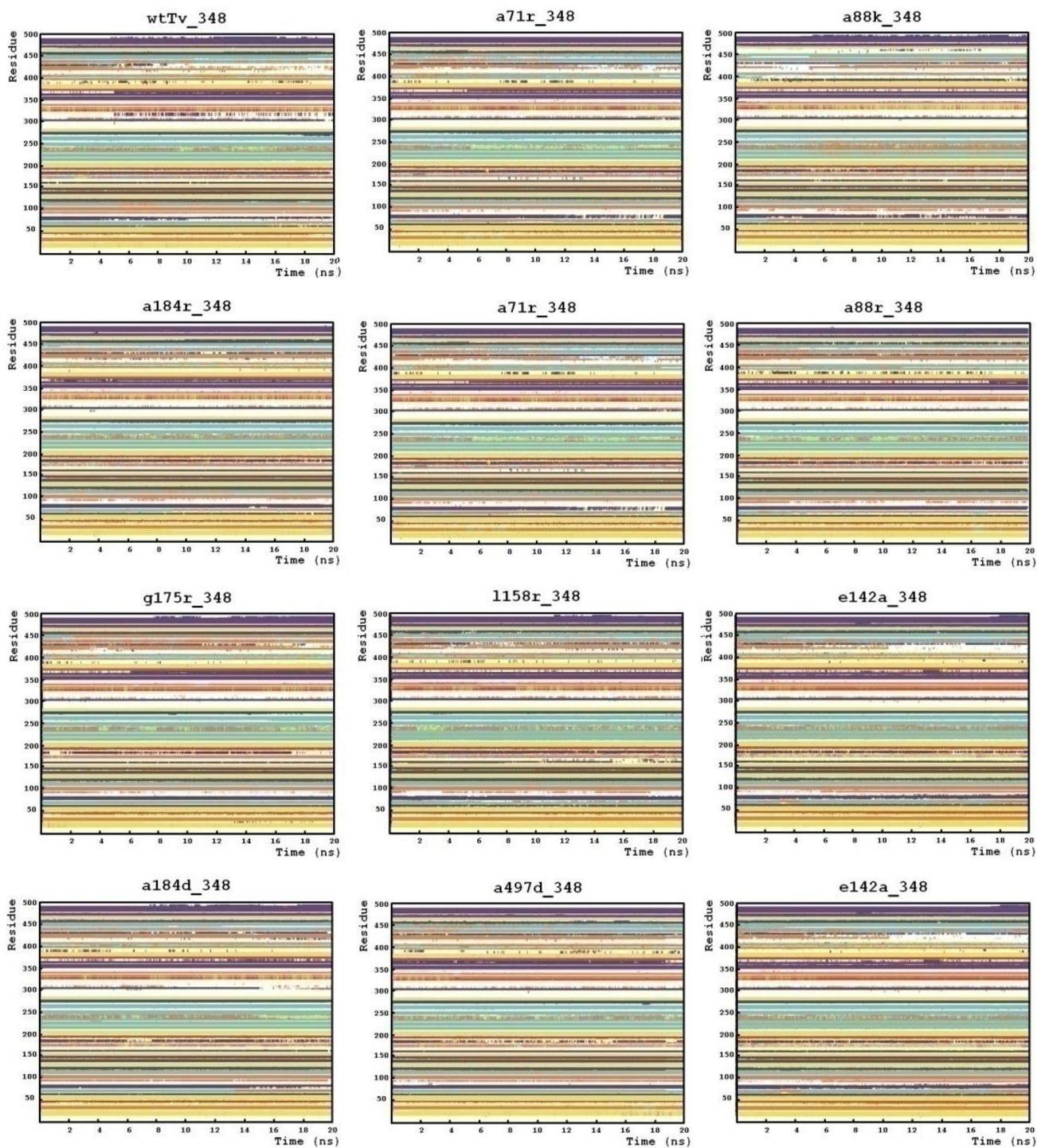


Figura 30. Conservación de la estructura secundaria como una función del tiempo, para las simulaciones de wtTv y sus mutante respectivamente efectuadas a 348.15 K (75°C). Gama de colores para la prevalencia estructural, ● hoja antiparalela, ● hoja paralela, ● hojas paralelas/antiparalela, ● hoja antiparalela doble, ● hélice 3, ● hélice 4, ● hélice 5.

En detalle, sobre la **Figura 28** se estima que la mayoría de las mutantes presentan disrupción de la estructura generalizada a lo largo de toda su estructura, por otro lado, la estructura en las vecindades del Cu-T₃ se mantiene conservada, esto ya que el estudio de la conservación mediante DSSP muestra como la hoja paralela y antiparalela correspondiente a los aminoácidos 400-450 no presenta sesgadas relevantes a lo largo de las líneas descriptivas de estructura.

De igual manera sobre esta figura puede ser apreciada la mutante A88K como la estructura de mayor alteración y A71R como la mayor conservación de estructura conservada. Dichos resultados se llevan de la mano con lo discutido en secciones anteriores, en concordancia con el RMSD y el Rg, donde se muestra que la mutante A88K como alteraciones estructurales, de equilibrio y estructura significativos en comparación con A71R y wtTv.

Una inspección visual realizada a cada mutante mediante VMD no arrojó resultados significativos sobre la pérdida de estructura, lo cual es una señal de que los puentes salinos no afectan de forma silvestre de la estructura.

No obstante, la mutante A88R muestra la mayor disrupción en su décima α -hélice (visualización vía VMD), la cual contribuyen estructuralmente a la formación del sitio activo en la vecindad del Cu-T₃, por otro lado, E142A es la mutante de mayor afectación global lo cual era de esperarse y se encuentra acorde con las aseveraciones realizadas cuando se propuso la disrupción de la interacción iónica propuesta al generar dicha mutante. La evolución de estructura secundaria en las simulaciones a 323.15 K (75°C), **Figura 29**, presenta una disrupción en mayor grado para las mutantes de lisina (A71K, A88K), en comparación a las mutantes de arginina (A71R, A88R, L158R).

Las fluctuaciones estructurales para los sistemas a 348.15 K (75°C) pueden ser apreciados en la **Figura 30**. Los cambios estructurales presentados, aparentan ser drásticos en comparación a las simulaciones llevadas a cabo a temperaturas menores, de un modo similar a los casos anteriores, las mutantes de arginina son aquellas que presentan nulas afectaciones ante el incremento de la temperatura.

Por otro lado, los cambios estructurales que sufren todos los sistemas a esta temperatura, incluyendo wtTv se muestran de manera generalizada en las vecindades del sitio activo residuos HIS64, HIS66, HIS109, HIS111, HIS395, HIS398, HIS400, HIS452, CYS453, HIS454 Y HIS458.

El comportamiento mostrado por los sistemas estudiados en conjunción con el Rg, describen cómo las mutantes de lisina conllevan oscilaciones de mayor amplitud en comparación a wtTv, de allí que esta fluctuación puede ser correlacionada con la pérdida de estructura secundaria [193, 194] presentada en los diagramas DSPP a la temperatura de 323.15 K (50°C).

Dicha variación sobre la calidad de la estructura secundaria a lo largo de la simulación puede ser explicada como un efecto de la mutación, situación que puede ser apreciada de manera significativa al analizar la pérdida de estructura secundaria en las mutantes de lisina, no así en las mutantes de arginina. Por otro lado, se observa a lo largo de las **Figuras 28 a 30** que la pérdida de estructura es fluctuante, ya que la proteína regresa a su estructura silvestre en los últimos 5 ns de simulación.

De manera general se puede decir, que los sistemas se comportan ordenados a lo largo de las simulaciones a cualquier temperatura, que la diferencia para el grado de compactación es similar, indicando así que tanto wtTv como en sus mutantes conservan su estado globular a lo largo de todas las simulaciones.

3.4.1.4 Análisis de Movilidad

Como es de esperar la movilidad de los átomos en la proteína debería aumentar en relación directa con la temperatura. Por tanto, se decidió realizar una comparación entre Raíz de la Fluctuación Cuadrática Media (**RMSf**) de los átomos de cadena principal wtTv y el factor-B (fluctuación de los átomos sobre sus posiciones promedio y proporcionan información importante sobre la dinámica de la proteína) de la estructura cristalográfica 1GYC. (**Figura 31**), esto con fines de validar nuestros resultados, ya que de estar correlacionados estos dos parámetros nuestros datos tendrían una confirmación robusta

Es así, que a través de la **Figura 31** se determinó que la simulación de wtTv, cuenta con una correlación satisfactoria entre los datos experimentales y los determinados vía dinámica molecular, un perfil apropiado, así como una fuerte correlación la intensidad y localización de las fluctuaciones en función de la temperatura.

193. Owen MC, Csizmadia IG, Viskolcz B, et. al. Protein stability and unfolding following glycine radical formation. *Molecules*. 2017; 22(4). pii: E655. doi: 10.3390/molecules22040655

De manera similar, se puede observar que los dos primeros dominios cuentan con la región más laxa (de mayor fluctuación), situada en las asas de interconexión, fundamentando que la localización para la mayoría de las interacciones estabilizantes se encuentra situada entre las caras de los dominios A y C.

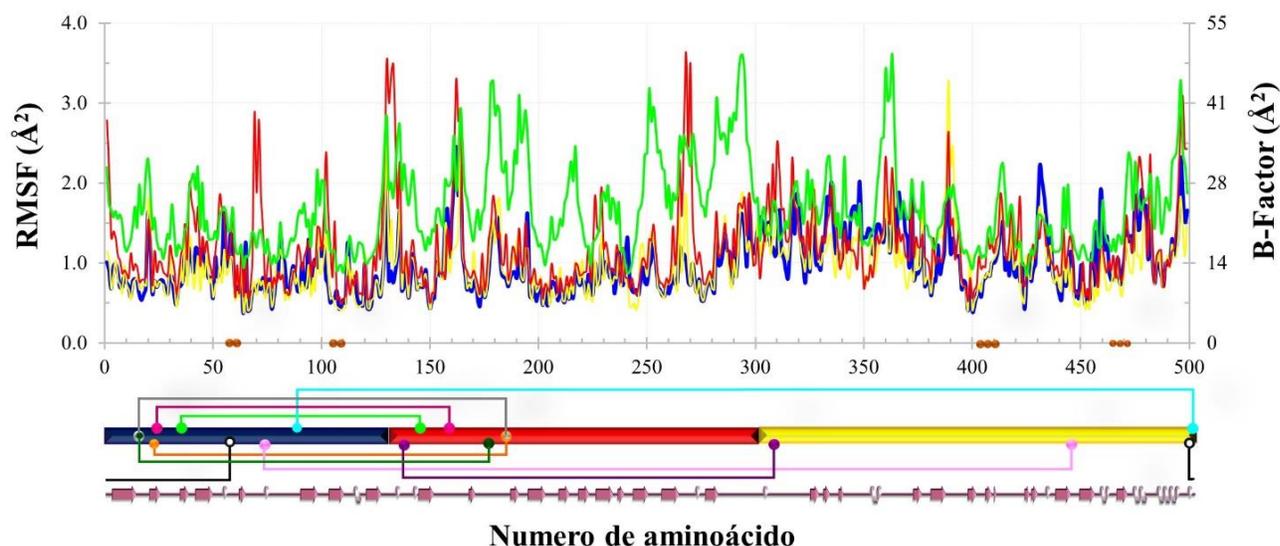


Figura 31. Comparación de las fluctuaciones de cadenas laterales entre el factor-B de la estructura cristalográfica 1GYC (líneas verdes) y el RMSF calculado para wtTv a •298.15 K •323.15 K y •348.15 K. Los átomos de cobre se encuentran se señalan como esferas de color ocre sobre el eje X y a su vez superpuestos sobre los residuos del sitio activo. La longitud de los dominios A, B y C se encuentra esquematizada por las barras en color azul, rojo y amarillo respectivamente: sobre ellas, se describen en líneas de color la localización de las mutaciones estudiadas, acorde al código de color descrito en la **Tabla 2**. En la parte inferior, se muestra la estructura secundaria para wtTv: laminas beta flechas y hélices en bucles.

Por su parte, al analizar curvas similares a las de la **Figura 31** para la totalidad de los sistemas estudiados a 298.15 K (datos no presentados) podemos concluir que éstos se mantienen estables, con un ligero aumento de su RMSF en la región C-terminal. Por su parte las simulaciones a 323.15 K presentaron valores de RMSF bajos, pero con patrones de fluctuación similares. Al analizar los sistemas a 348.15 K, es evidente que dicho aumento de temperatura conlleva una relación directa con la movilidad de los residuos en la proteína. No obstante, sobre la **Figura 31**, se observa un patrón de fluctuación similar al determinado por la estructura cristalográfica 1GYC.

194.de Bakker PI, Hünenberger PH, McCammon JA. Molecular dynamics simulations of the hyperthermophilic protein sac7d from *Sulfolobus acidocaldarius*: contribution of salt bridges to thermostability. *Journal of Molecular Biology*. 1999; 285(4):1811-30. doi: 10.1006/jmbi.1998.2397

Cabe destacar que la región comprendida entre las vecindades de los residuos que ligan a los átomos de cobre comprende las secciones de la proteína de menor fluctuación, así mismo nuestros datos sugieren a través de los resultados observados en los sistemas en alta y baja temperatura, que existe una correlación entre las fluctuaciones de la wT_V y sus mutantes, derivadas de las simulaciones, y la fluctuación medida por el factor-B en la estructura cristalográfica 1GYC de lacasa

Hasta este momento hemos observamos que el R_g incrementa con el aumento de la temperatura, exceptuando las mutantes A71R y A88R, que el RMSD conlleva fluctuaciones periódicas siendo estas dos mismas mutantes la que alcanzan el equilibrio a menor tiempo de simulación, estos dos resultados en conjunto sugieren que los sistemas A71R y A88R ven disminuida su movilidad y se compactan. Por otro lado, las variaciones conformacionales analizadas hasta ahora muestran que existen características diferenciables entre las mutaciones como función del gradiente térmico. Sin embargo, parece haber semejanzas entre mutaciones de residuos similares, como sería el caso de lisinas, alaninas, glutámicos y aspárticos.

Para corroborar de manera detallada, si existen similitudes entre los diferentes tipos de mutantes más adelante se mostrará el análisis realizado mediante técnicas de “clustering” (agrupamiento de estructuras en base a su cercanía conformacional), mismo que nos permitió estudiar el comportamiento esencial de nuestra proteína.

3.4.2 Evaluación de la Energía

Una vez obtenidos los resultados de la conservación de estructura y equilibrio de la dinámica, y empaquetamiento de cada sistema, se procedió realizar un análisis de la energía de cada una de las mutantes y sus controles positivos y negativos mediante una técnica de aproximación a la energía, la cual combina protocolos de mecánica molecular, electrostática, solvatación y entropía (**MM/PBSA**) con fines de obtener la diferencia en la energía libre. Una vez determinada la energía se procedió al estudio particular de los factores preponderantes en la estabilidad estructural (formación de puentes de hidrógeno, número de contactos nativos y distancias de interacción) sobre las mutantes de mayor relevancia. Para corroborar de manera más detallada, si existen similitudes entre las diferentes mutaciones en función de la temperatura realizamos un análisis de las trayectorias que nos permitió estudiar el comportamiento esencial de nuestra proteína.

Dado que el objetivo de la presente sección es realizar una evaluación de los aspectos de mayor relevancia estructural y energética de nuestras dinámicas, dado que son diversas las características por medir y que estas a su vez son la conjunción de numerosas causas que actúan conjuntamente sobre cada sistema. Dado que, al recoger la información de nuestras muestras de datos, y con fines de estudiar el mayor número posible de variables correlacionadas, se tomó la decisión por realizar un análisis tipo “agrupamiento” extraídas por **Análisis de Componentes Principales (PCA)**, debido que este tipo de técnicas permiten estudiar las relaciones que se presentan entre un gran número de variables correlacionadas (que miden información común) para ser transformadas en un conjunto de nuevas variables no-correlacionadas entre sí (que no tenga repetición o redundancia en la información). Con este análisis, fue posible obtener agrupaciones estructurales con base a los cambios conformacionales de la lacasa, mismos que permitieron suavizar el análisis de resultados.

Es así, en las subsiguientes secciones encontraremos análisis sobre la formación de puentes de hidrógeno internos, distancias de interacción entre dominios y entre aminoácidos en las vecindades de las mutaciones prometentes de ser analizas.

3.4.2.1 MM/PBSA

Con la intención de estimar el efecto de las mutaciones a la energía de la proteína silvestre (*wtTv*), se realizó un estudio de las estructuras generadas por las simulaciones mediante el protocolo tipo MM/PBSA. Estas estructuras fueron extraídas **a partir de los últimos 5 ns** de cada una de las 153 simulaciones. En las **Figuras 32 a 34**.se observa la evolución de la energía calculada vía MM/PBSA con respecto del tiempo de simulación.

En la **Figura 32** describe a las proteínas silvestres, la **Figura 33** agrupan a los sistemas control negativo (E142A, E188K, E188R y H62R), por último, en la **Figura 34** se encuentran agrupadas las mutantes positivas. Cada una de estas figuras contiene las réplicas realizadas sobre cada mutación. Las temperaturas se describen con la misma gama de colores usada anteriormente, para el comportamiento a 298.15 K (25°C) se la gama de colores azul, para 323.15 K (50°C) amarillo y por último rojo en las simulaciones a 348.15 K (75 °C).

Los sistemas simulados a una temperatura de 348.15 K tienden en todos los casos a generar valores mayores que los simulados a 298.15 K, presentando valores intermedios para las simulaciones a temperatura de 323.15 K.

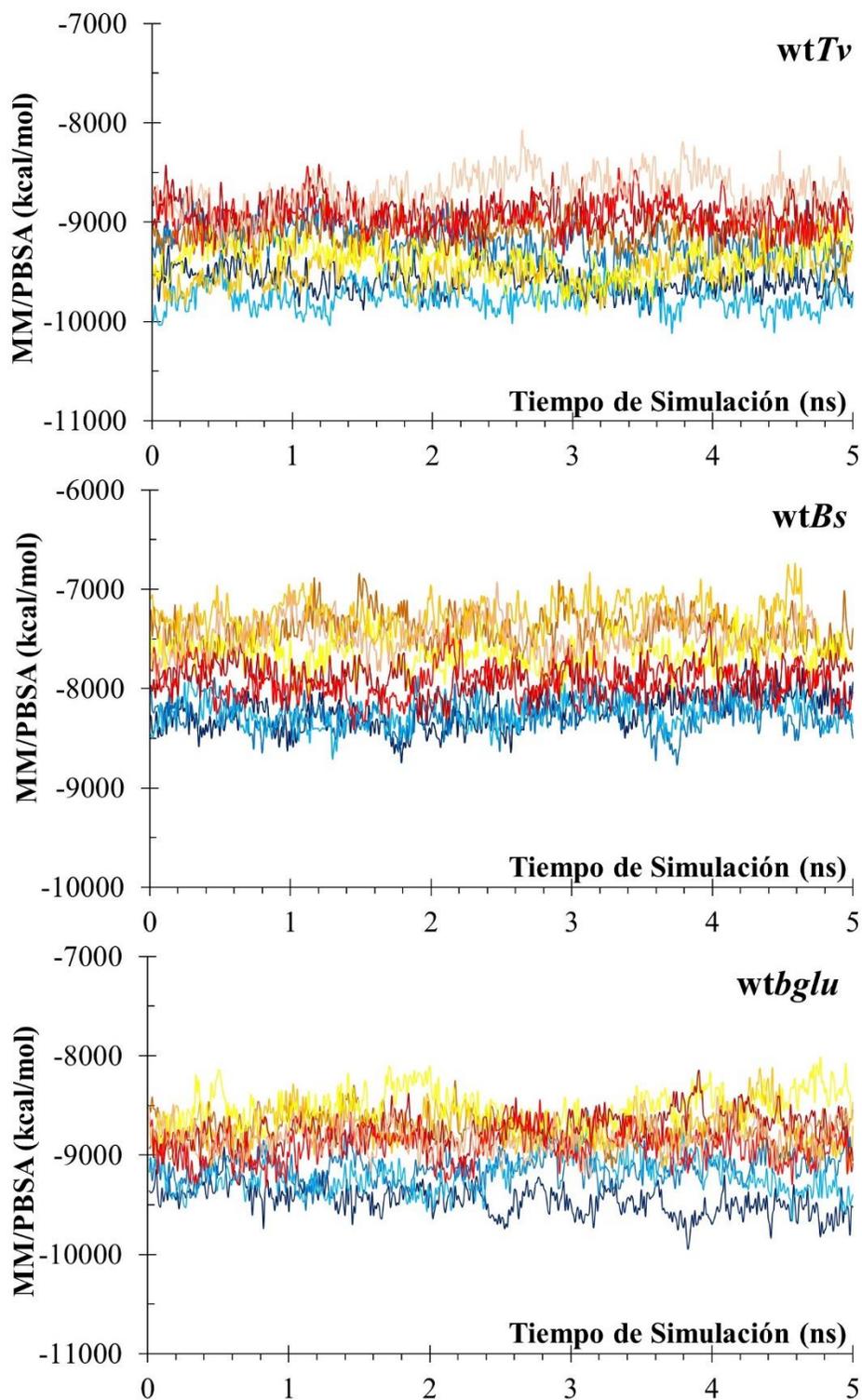


Figura 32. Evolución de la energía obtenida con el protocolo MM/PBSA para wtTv, wtBs y wtβglu a lo largo de los últimos 5 ns de simulación. Gama de colores en azul, amarillo y rojo corresponden a las corridas para las temperaturas de • 298.15 K • 323.15 K y • 348.15 K (25°C, 50°C y 75°C), respectivamente.

Aunque este comportamiento es el experimentalmente esperado, el resultado computacional es relevante al obtenerse para corridas independientes, por triplicado y en los 17 sistemas. Este es uno de los resultados que valida las condiciones de simulación como representativas de las moléculas en estudio.

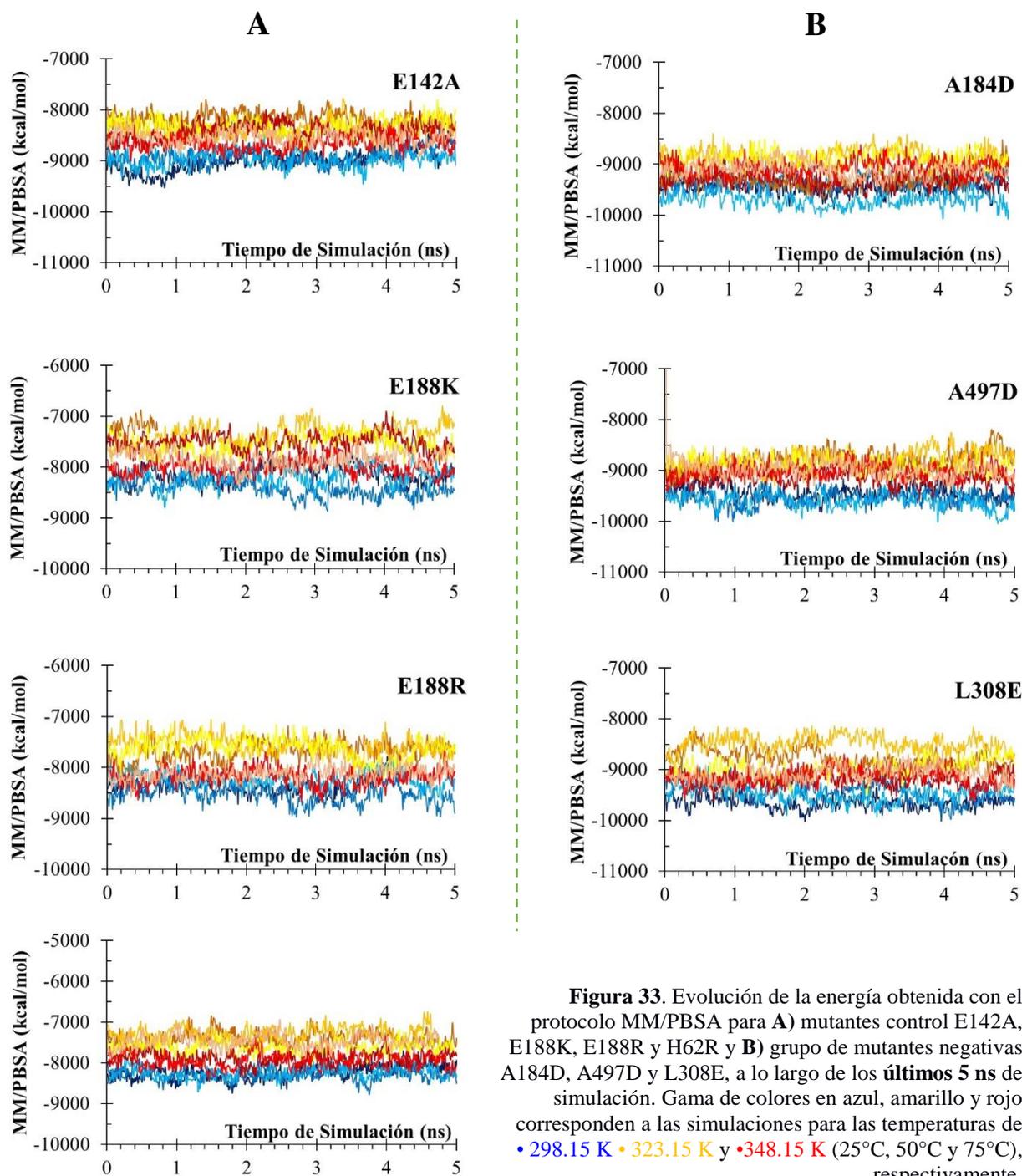


Figura 33. Evolución de la energía obtenida con el protocolo MM/PBSA para **A)** mutantes control E142A, E188K, E188R y H62R y **B)** grupo de mutantes negativas A184D, A497D y L308E, a lo largo de los **últimos 5 ns** de simulación. Gama de colores en azul, amarillo y rojo corresponden a las simulaciones para las temperaturas de • 298.15 K • 323.15 K y • 348.15 K (25°C, 50°C y 75°C), respectivamente.

El resultado descrito en esta serie de gráficos muestra que las temperaturas altas generan valores de energías mayores. No obstante, sus fluctuaciones no permiten vislumbrar de manera precisa las diferencias de energía entre sistemas.

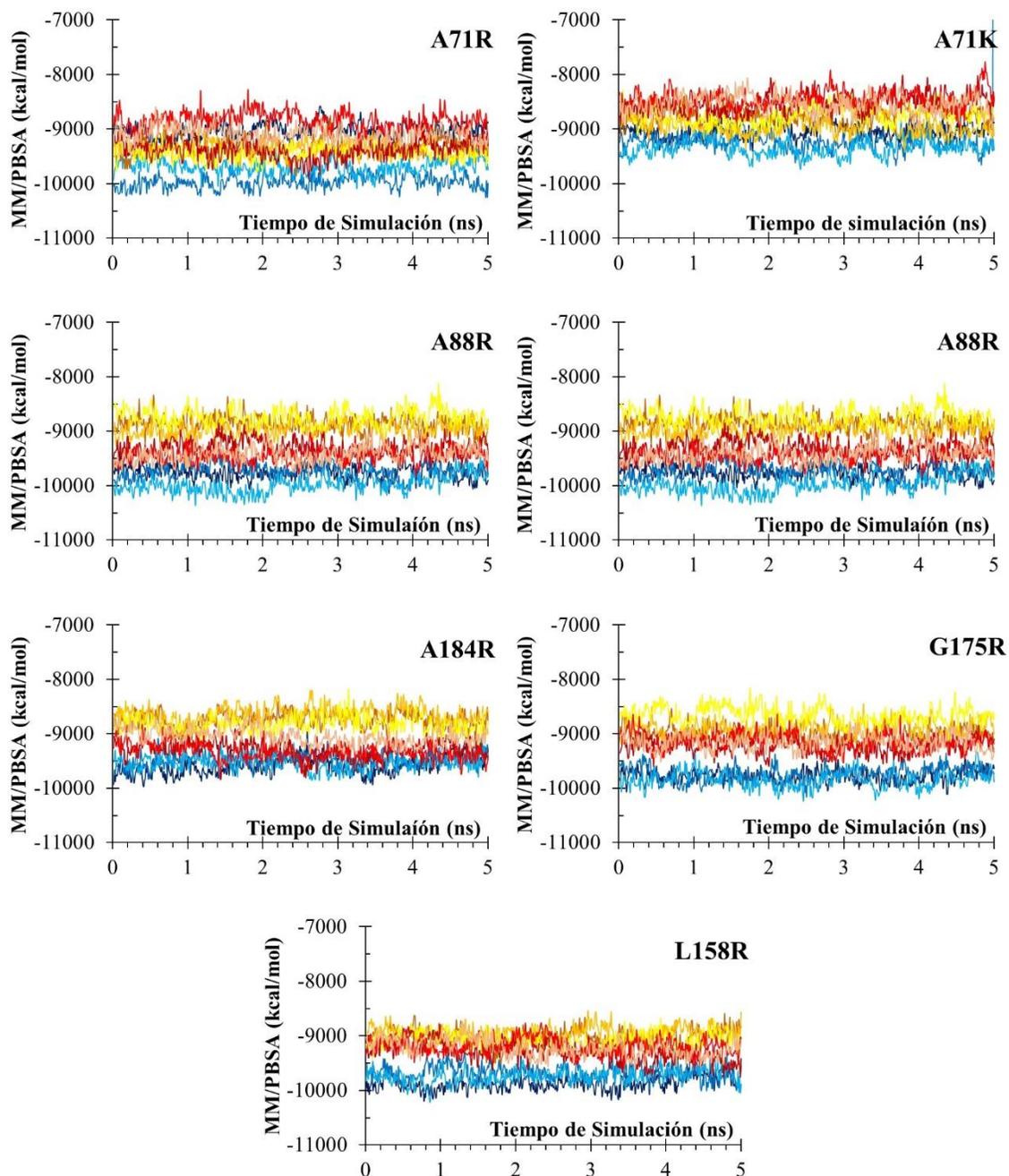


Figura 34. Evolución de la energía obtenida con el protocolo MM/PBSA para el grupo de mutantes positivas A71R, A71K, A88R, A88K, A184R, G175R y L158R a lo largo de los **últimos 5 ns de simulación**. Gama de colores en azul, amarillo y rojo corresponden a las simulaciones para las temperaturas de • 298.15 K • 323.15 K y • 348.15 K (25°C, 50°C y 75°C), respectivamente.

Con fines de contrastar las mutantes de mayor estabilidad, el conjunto de las simulaciones de cada sistema (15,000 valores) fue promediado y comprado con los valores obtenidos para la proteína silvestres wtTv, wtBs y wtβglu.

Dichas diferencias en energía se muestran en la **Figura 35**. En ella, los valores negativos denotan energías estabilizantes respecto a su correspondiente estructura silvestre, mientras que valores positivos indican estabilización energética del sistema.

Dentro de esta figura se aprecia que wtβglu se torna fuertemente estable debido la mutación H62R, por lo contrario, el control negativo E142A se denota fuertemente desestabilizante, como lo esperaríamos por la pérdida de un puente salino. Por otro lado, los resultados de las mutaciones E188K y E188R que usamos en este trabajo como controles positivos, muestran una alta estabilización de la estructura de acuerdo con lo descrito por Mollania y colaboradores [124]. Interesantemente, las mutaciones dentro de la **Figura 35** presentan una variedad de comportamientos, observándose de forma particular que la incorporación de los residuos de arginina es promisorio con fines de conferir estabilización estructural a la enzima lacasa de *T. versicolor*.

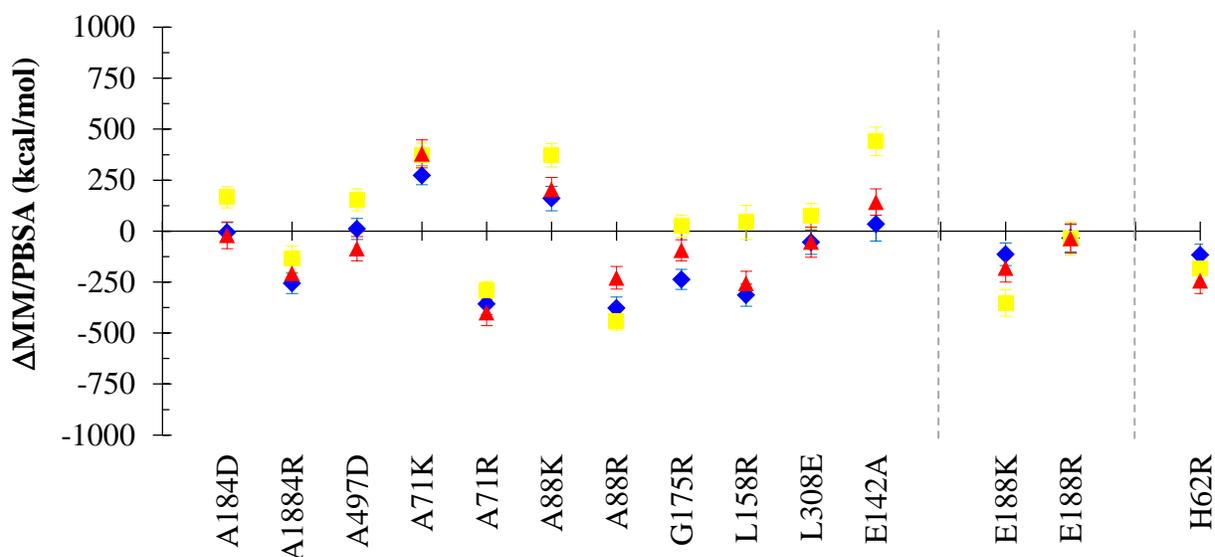


Figura 35. Cuantificación del cambio de energía calculado por MM/PBSA para cada sistema respecto a su correspondiente estructura silvestre (wtTv). Diferencia de la energía de los datos promediados para las mutantes con respecto a su enzima silvestre correspondiente. Cada mutante se encuentra representada a tres diferentes temperaturas • 298.15 K • 323.15 K y • 348.15 K (25°C, 50°C y 75°C). La mutante E142A corresponde al control negativo mientras que E188K, E188R, H62R corresponden a controles positivos.

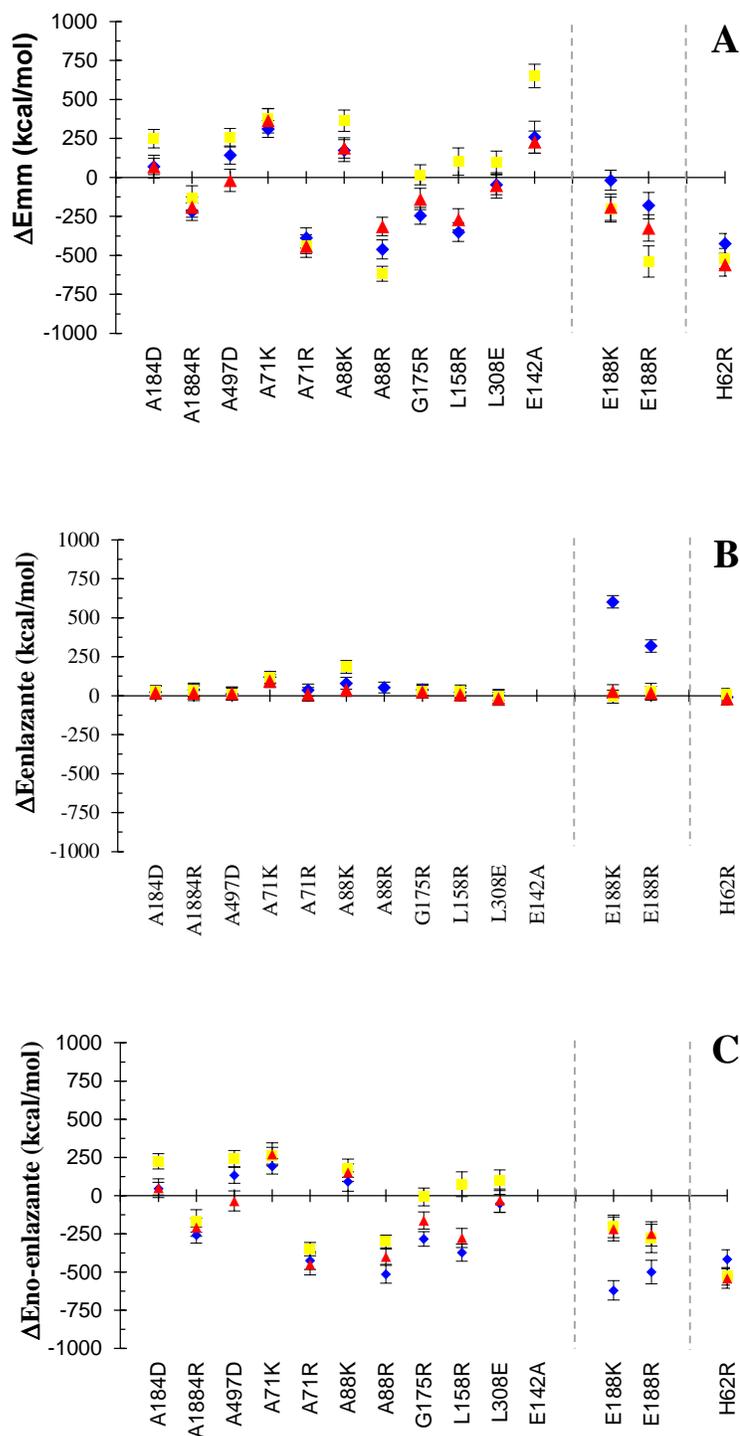
Por otro lado los resultados que se muestran en la **Figura 35**, con respecto a los sistemas estudiados a 323.15 K (puntos amarillos) no se aprecian con una localización intermedia entre 298.15 K y 348.15 K como se esperaba. Así mismo, la energía de las mutaciones A71R, A88R, G175R y A158R (mutantes de arginina) se encuentra por debajo de la energía calculada para la enzima silvestre *wtTv*. Habría que decir también, que el comportamiento entre las mutantes **A71K, A88K y A71K, A88K** son significativamente distantes ya que exponen una conducta inversa entre ellas, así también se aprecia que las mutantes de lisina tengan un comportamiento próximo al mostrado por el testigo negativo.

Otro rasgo que destacar dentro de la **Figura 35**, respecto a las mutantes A71R y A88R es la pérdida de energía para la desestabilización con respecto a la lacasa silvestre *wtTv*. En contraste con lo anterior, el caso de las mutaciones de lisina (A71K y A88K) generaron resultados opuestos a las mutaciones de arginina, dando lugar a una ganancia en la energía con respecto a la enzima silvestre, desestabilizando los sistemas. Es por ello que mediante los resultados presentados se aprecia que las mutantes A71R y A88R son mejores que A71K y A88K aún localizadas en el mismo sitio, dicha preferencia se ha reportado (experimentalmente y computacionalmente) para otros casos [71, 72, 123, 124, 125]. Ya que los resultados entre estos dos tipos de mutantes arrojan datos considerablemente alejados en sus energías y debido que el protocolo de MM/PBSA se encuentra generado por múltiples contribuciones, es interesante mostrar el desglose y análisis de cada una de las contribuciones de dicho protocolo.

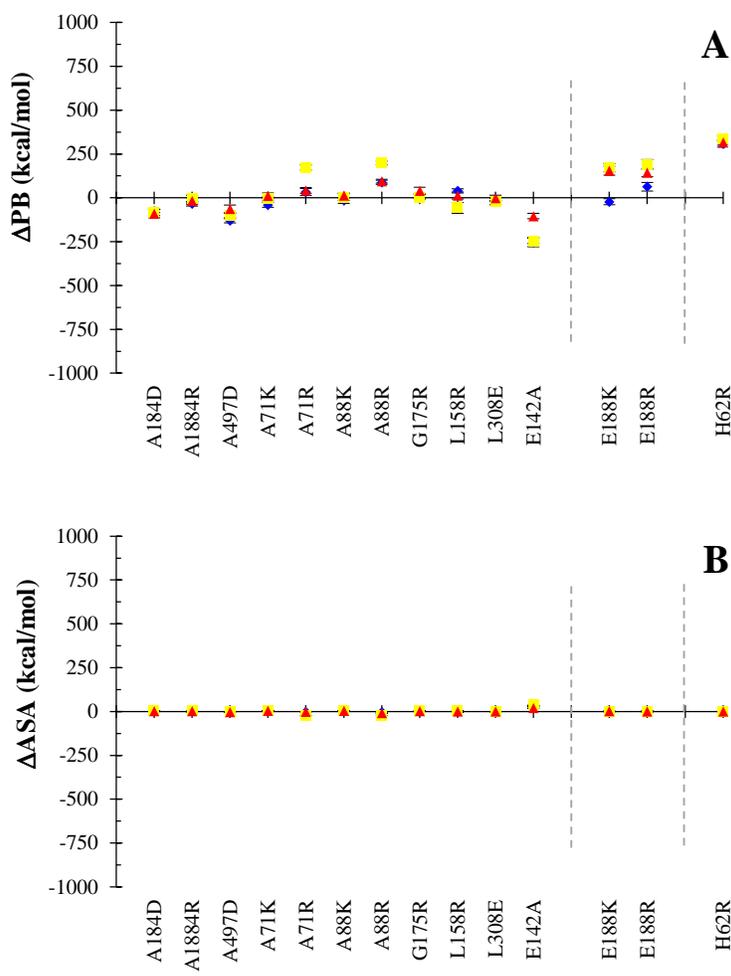
Dicho lo anterior, examinaremos brevemente la contribución de cada factor. Como se aprecia en las **Figuras 36 y 37** el mayor cambio está dado por el componente del campo de fuerza de mecánica molecular, particularmente en su contribución electrostática, demostrando que la energética de las proteínas *wtTv*, *wtBs* y *wtβglu* y sus mutantes son fuertemente dependiente de las interacciones iónicas. La energía calculada por Mecánica Molecular se puede desglosar en dos términos, energía enlazante y no-enlazante, se tuvo a bien el realizar la gráfica de dichas contribuciones (**Figuras 36**), en esta se aprecia que la contribución a la energía por el término enlazante contribuye a lo más con el 15% de la energía total. Sin lugar a duda, es posible interpretar que a **Figura 36B** es una réplica de la **Figura 36A**, dando sustento a nuestra aseveración de que la mayor contribución a la energía proviene de los términos no enlazantes.

Otro rasgo que encontramos en la serie de figuras MM/PBSA, es que las mutantes G175R y L158R presentan un comportamiento de baja energía a temperaturas de 298.15 K y 348.15 K, la simulación a 323.15 K exhibe una contribución electrostática negativa.

Figura 36. Cuantificación de los componentes enlazantes y no enlazantes al protocolo MM/PBSA. Panel **A**) contribución por mecánica molecular a la energía, determinada como la suma de las energías enlazantes y no enlazantes, panel **B**) Contribución enlazante determinada como las contribuciones de energía por ángulos, torsiones y diedros y panel **C**) contribución no-enlazante determinada mediante las contribuciones de energía electrostática y de van der Waals, respecto a las enzimas silvestres *wtTv*, *wtBs* y *wtβglu*. Código de colores para los sistemas simulados a diferentes temperaturas • 298.15 K • 323.15 K y • 348.15 K (25°C, 50°C y 75°C).



Por otra parte, la contribución a la energía por el componente de tipo Poisson-Boltzman se encuentra graficado en la **Figura 37A**, donde, el comportamiento entre los sistemas se aprecia cuasi-homogéneo, con la excepción de los controles positivo y negativo. Por lo que se refiere a la **Figura 37B** la en ella se aprecia que la contribución a la energía dado por el cambio en el área de solvatación es muy pequeña comparativamente.



Las contribuciones del componente Poisson-Boltzman a la energía presentadas por los controles positivos son conllevan una compensación negativa (favorable), mientras tanto, el control negativo genera una compensación positiva a la energía. Lo dicho hasta aquí supone que las contribuciones individuales de estabilización y desestabilización de solvatación se compensan dando una contribución global casi cero, con cual podría subrayarse que de la ganancia o pérdida de estabilidad son atribuibles a una gran numero de factores.

Hecha esta salvedad, sobre las mismas figuras se puede observar que el contribuyente más importante a la energía en las mutantes de *T. versicolor* se ven es el potencial electrostático.

De manera puntual, el caso del control negativo, E142A, la interrupción del puente salino y procesos desfavorables a la estabilización de wtTv. En lo en particular la contribución no polar (**Figura 37B**) es nula a MM/PBSA como lo ya descrito anteriormente para el resto de los sistemas estudiados.

3.4.2.2 Puentes de Hidrógeno

Dado que la fuerza de un puente de hidrógeno depende su microambiente, múltiples trabajos sobre este suceso han establecido que las enzimas termófilas tienen mayor estabilidad estructural debido a una red de dichos puentes [195, 196], de forma que el valor de la contribución media de un puente de hidrógeno entre cadenas laterales proteicas se encuentra en torno a 0.5 kcal* mol^{-1} [197]. Es por ello que a continuación realizamos un análisis estadístico sobre el número de puentes de hidrógeno (**Tabla 8**).

En la **Tabla 8**, se observa que los valores para las mutantes de arginina son superiores a wtTv, en aproximadamente 0.05 puente de hidrógeno por aminoácido y con una vida media de 100 a 150 ps por arriba. en el caso de E142A el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) al igual que el número de puentes de hidrógeno disminuye.

Tabla 8. Estadísticas para Puentes Hidrógeno*

		wtTv	A71K	A71R	A88K	A88R	E142A	wtβglu	H62R
298.15 K	puente de hidrógeno por aminoácido	2.63	2.58	2.68	2.63	2.68	2.69	3.46	3.49
	$t_{1/2}$ (ps)	571	651	722	680	670	575	1078	1175
323.15 K	puente de hidrógeno por aminoácido	2.65	2.56	2.69	2.60	2.64	2.63	3.44	3.44
	$t_{1/2}$ (ps)	536	475	548	509	611	488	882	919
348.15 K	puente de hidrógeno por aminoácido	2.64	2.53	2.60	2.55	2.60	2.61	3.43	3.46
	$t_{1/2}$ (ps)	403	376	495	385	485	403	753	794

195. Amadei A, Linssen AB, Berendsen HJ. Essential dynamics of proteins. *Proteins Structure Function and Bioinformatics*, 1994, (17):412 – 425. doi: [10.1002/prot.340170408](https://doi.org/10.1002/prot.340170408)

196. Gromiha MM, Pathak MC, Saraboji K, et. al. Hydrophobic environment is a key factor for the stability of thermophilic proteins. *Proteins*. 2013, (81):715-721. doi: [10.1002/prot.24232](https://doi.org/10.1002/prot.24232)

197. Takano K, Scholtz JM, Sacchettini JC, Pace CN. The contribution of polar group burial to protein stability is strongly context-dependent. *The Journal of Physical Chemistry* 2003 (278):31790-31795. doi: [10.1074/jbc.M304177200](https://doi.org/10.1074/jbc.M304177200)

Por otro lado, en la **Figura 38**, densidad de puentes de hidrógeno pueden ser observadas dos campanas, la primera permite apreciar que la densidad se encuentra en un intervalo de 160 a 175 residuos de aminoácidos para una frecuencia de dos puentes de hidrógeno y la segunda con un intervalo de 65 a 75 residuos con al menos cuatro puentes de hidrógeno a lo largo de la simulación.

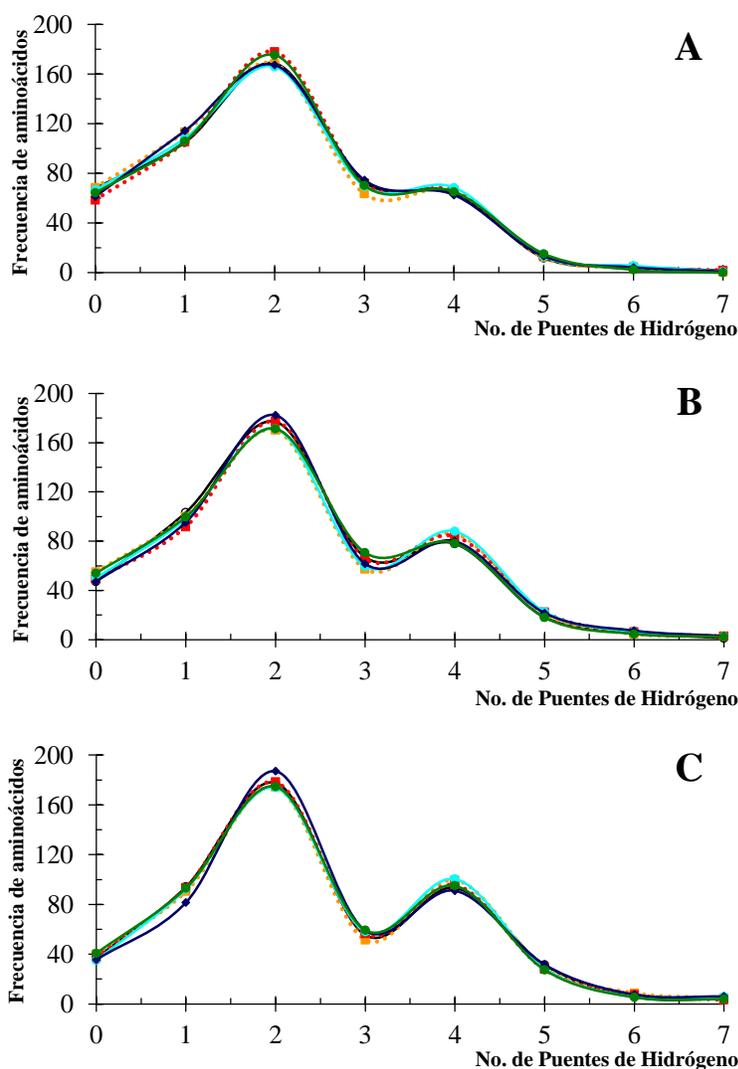


Figura 38 Frecuencia en el número de puentes de hidrógeno como función del Número de Residuos. Código de colores: wtTv, A71K, A71R, A88K, A88R, E142A. De arriba hacia abajo panel **A**, **B** y **C** simulaciones realizadas a 298.15 K, 323.15 K y 348.15 K respectivamente

La diferencia sobre el total de puentes de hidrógeno puede variar desde -25 puentes para las mutantes de Lisina hasta +65 (**Tabla 8, figura 41**) para las mutantes de arginina. En lo consiguiente dichas diferencias muestran como las mutantes de arginina generan un cambio a favor de la formación de interacciones estabilizantes.

En la gráfica realizada a 298.15 K se aprecia como la curva de la mutante A71R y A88R contienen 50 y 25 nuevos puentes de hidrógeno respectivamente. En el caso de las simulaciones a 323K y 348.15 K se muestra una ganancia de 65 y 20, 35 y 25 nuevos puentes para A71R y A88K.

3.4.2.3 Distancia de interacción

La habilidad de hacer predicciones exitosas implica el entendimiento de la relación entre la secuencia y la estructura de la proteína. Considerando que los contactos entre los residuos incorporados en las mutantes incorporaron un puente salino interdominio, estos mismos podrían afectar la estructura acercando los dominios o al menos las regiones cercanas a la nueva interacción, lo que podría reflejarse en una ganancia en la estabilidad estructural, debido a lo cual examinaremos brevemente las distancias entre dominios y vecindades de las mutaciones.

Acorde con lo mencionado anteriormente, la determinación de la distancia entre dominios ($D_A:D_B$ o $D_A:D_C$), definida como la distancia entre centros de masa en dominios contiguos y aminoácidos-aminoácido, definida como la distancia entre centros de masa para una sección 5 aminoácidos arriba y 5 aminoácidos debajo de los residuos a evaluar, en la sección de interacción para los dominios A y B (**A:B**) o dominios A y C (**A:C**).

El cálculo de distancias fue realizado utilizando un script in-home en VMD, tomando los últimos 5 ns de las simulaciones realizadas para wtTv, A71K, A71R, A88K, A88R, y E142A.

En la **Figura 39** se aprecia la distancia en función del número de estructuras determinadas a lo largo del tiempo de simulación dentro de esta gráfica sólo se encuentran los promedios de las distancias entre dominios $D_A:D_B$ y $D_A:D_C$ ya que son los dominios involucrados para las mutantes descritas en el párrafo anterior.

Las distancia calculada para el testigo negativo E142A que tiene correspondencia entre la sección de interacción de los dominios $D_B:D_A$ se aprecia similar a la enzima silvestre para las temperaturas 298.15 K y 348.15 K, **Figuras 39**, no así para la temperatura de 323.15 K, a esta temperatura (323.15 K) se aprecia un alejamiento de los dominios para dicha mutante, dada la estreches de la campana puede proponerse que la mutante, a pesar generar una mayor distancia, la sección de interacción entre dominios contiene fluctuaciones de menor magnitud.

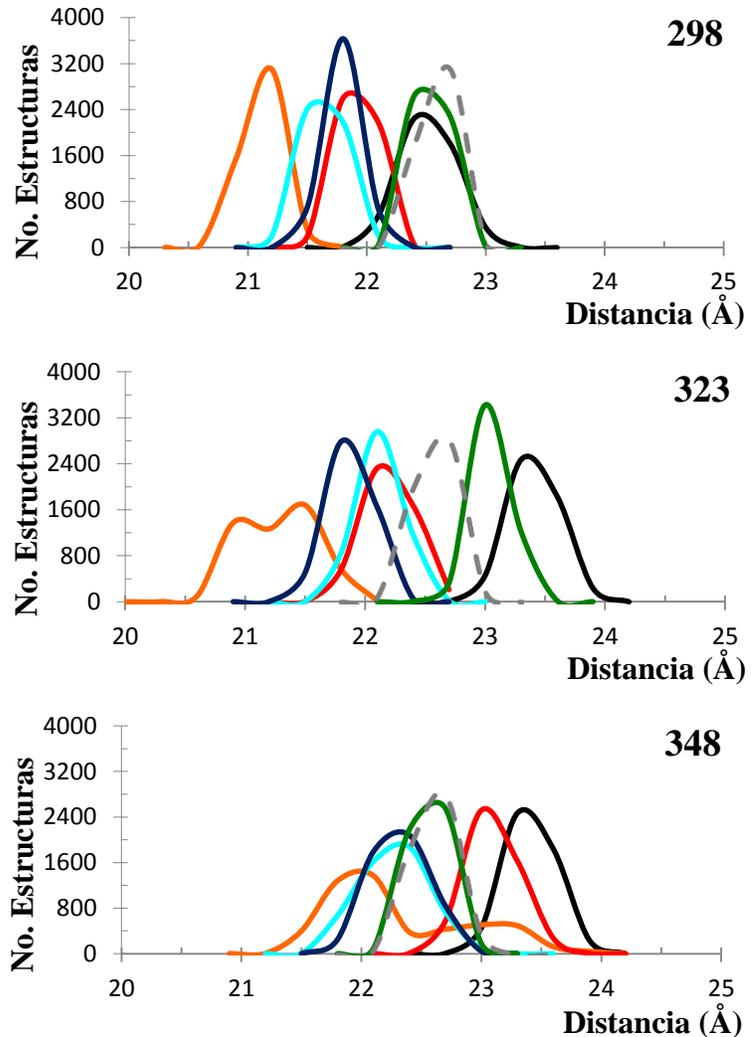


Figura 39. Distribución de la distancia entre centros de masa para los dominios D_A y D_C (mutantes) y para D_B y D_C (mutante negativa). Código de colores: wtTv, A:B (E142), wtTv, A:C A71K, A71R, A88K, A88R, y E142A. De arriba hacia abajo panel a, b, y c, simulaciones realizadas a 298.15 K, 323.15 K y 348.15 K respectivamente

Por otro lado, se aprecia que la mutante A71K presenta un comportamiento distinto a 323.15 K y 348.15 K en comparación a las demás mutantes, esta mutante presenta un comportamiento bimodal lo cual denota que la mutante A71K radicaliza a la enzima en dos estados estructurales. En contraste con la mutante A71R, esta presenta cambios y acercamientos en la sección de interacción dominio:dominio, el desplazamiento a la izquierda para el juego de dominios $D_A:D_C$ permite ver que la distancia de interacción en promedio se redujo en 0.5 Å a 298.15 K, 1.0 Å a 323.15 K y 0.5 Å a 348.15 K. De igual manera la mutante A88R presenta un comportamiento similar a A71R, con una disminución en la distancia de interacción dominio:domino de 0.75 Å a 298K, 1.5 Å a 323.15 K y 0.75 Å a 348.15 K. Es así como las mutantes de lisina y arginina analizadas promueven el acercamiento de los dominios donde se encuentran localizadas, esto en comparación con la proteína silvestre wtTv.

Así mismo, se aprecia que el control negativo incrementa la distancia entre dominios, como sería de esperarse debido a la disrupción del puente salino contenido en su estructura silvestre. En esta sección se analizó la distancia para un segmento de 5 residuos previos y 5 residuos posteriores a la mutación (Figura 40 y 41).

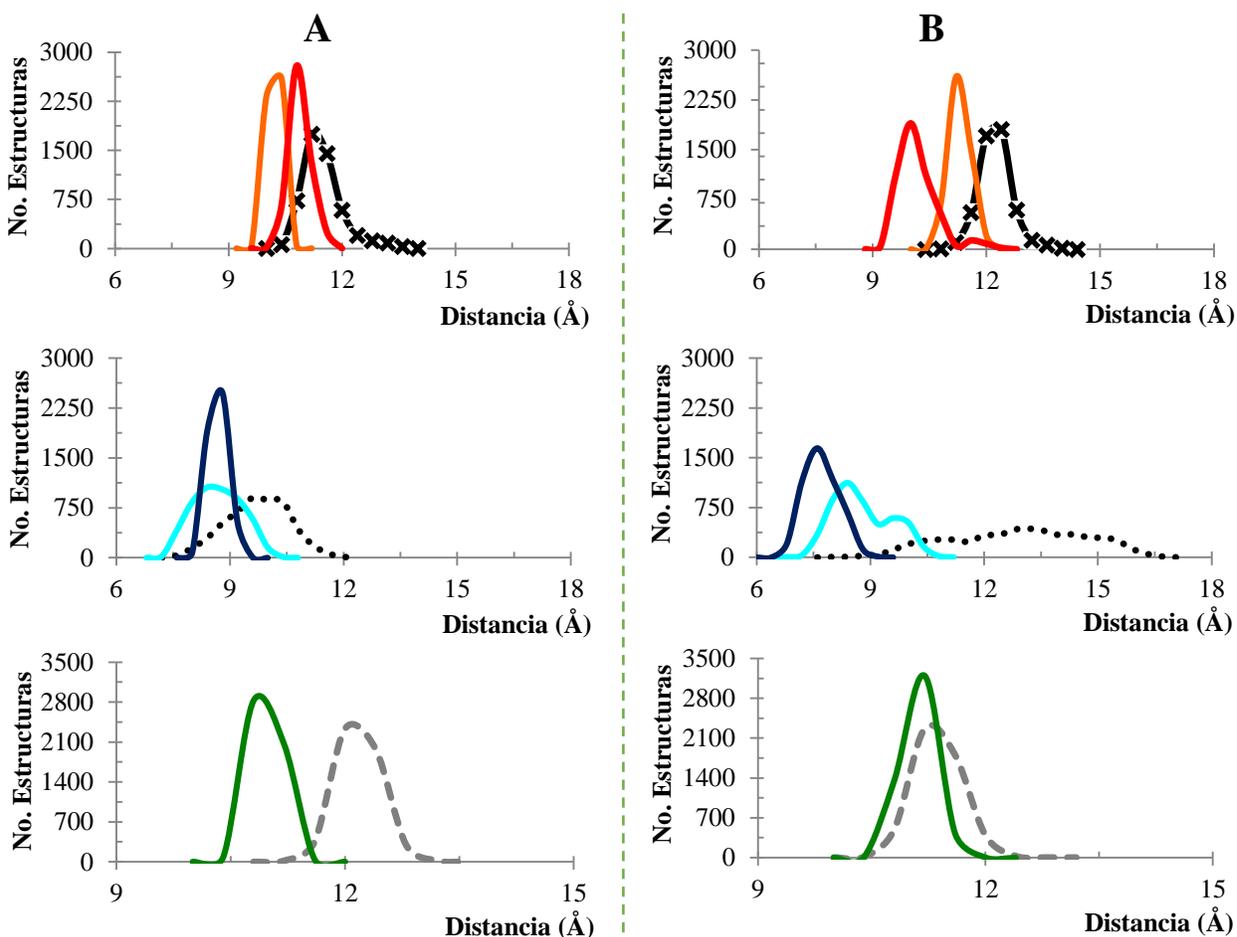


Figura 40. Distribución de la distancia entre aminoácidos formadores del Puente Salino. Código de colores: wtTv (x71), wtTv (●88), wtTv (-142), A71K, A71R, A88K, A88R, E142A. Panel A) y B) simulaciones realizadas a 298.15 K (25°C) y 323.15 K (50°C).

Al analizar el comportamiento de las mutantes, se observa que la mutante A71R contiene menos fluctuaciones con respecto a la proteína silvestre wtTv, esto debido a que la curva es más estrecha en comparación a las curvas descritas para wtTv, este mismo comportamiento sucede con la mutante A71K. Con relación a la mutante A88R su curva se aprecia estrecha y desplazada a la izquierda de las generadas por wtTv.

Con relación a la mutantes A88K, esta presenta múltiples comportamientos que van desde una curva con mayor amplitud hasta una con dos curvas, lo cual indica un aumento en la distancia en las vecindades de la mutación, así como la formación dos microconfiguraciones altamente pobladas alrededor del puente salino.

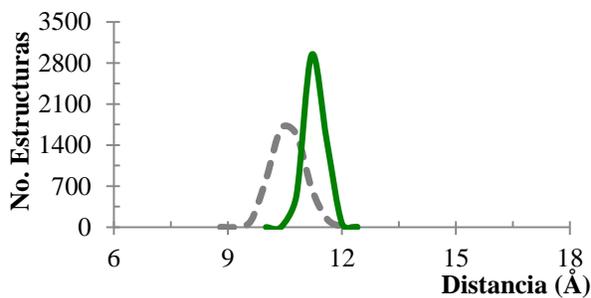
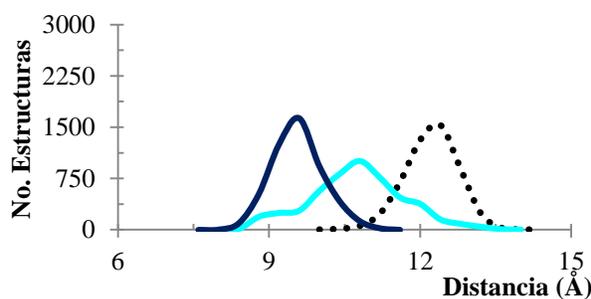
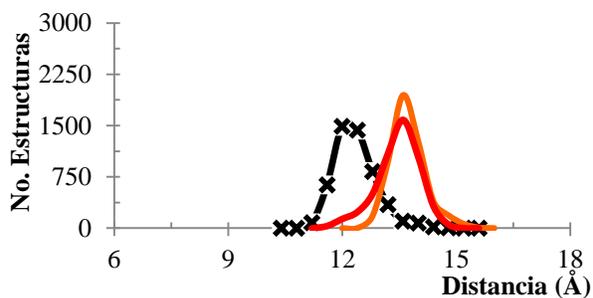


Figura 41. Distribución para la distancia entre los aminoácidos que dan lugar al puente salino. Código de colores: wtTv (x71), wtTv (•88), wtTv (-142), A71K, A71R, A88K, A88R, E142A. Simulación a 348.15 K (75°C).

Con respecto a la mutante testigo negativa, E142A, esta presenta un corrimiento a la derecha de wtTv a 348K, y campana de mayor anchura indicando una mayor amplitud. Sin embargo, el promedio de los resultados para las tres diferentes corridas probablemente enmascare algunos efectos, tales como las fluctuaciones de los datos y la divergencia entre corrida.

Dado que los datos generados mediante dinámica molecular representan una gran colección de estructuras, con más de 50,000 por sistema (153 simulaciones = 7.65 x10⁴ estructuras), se tienen un número de variables asociadas con dichos datos colectados como lo sería la intensidad en la energía, número puentes de hidrógeno, distancias, los procesos de solvatación, entre otros, se determinó extraer la información de mayor relevancia que permitiera un entendimiento de las contribuciones de cada uno de estas variables a la estabilidad estructural mediante una estrategia de muestreo adecuada. Con fines de estudiar la similitud de dichas estructuras se realizó un análisis tipo agrupamiento sustraído a partir de técnicas de componente principales

3.4.2.4 Agrupamiento

En todos los sistemas simulados (3 proteínas silvestres y 15 mutantes) prácticamente la mitad de estos átomos son hidrógenos y durante la simulación sus movimientos fueron restringidos por el algoritmo SHAKE. Por este motivo, aproximadamente la mitad de los átomos en las simulaciones fueron realmente móviles, y los sistemas tienen $3N/2$ grados de libertad, donde N representa el número de átomos de proteína. Considerando lo anterior, las coordenadas provenientes de los últimos 5 ns de simulación fueron transformados para un Análisis de Componentes Principales (PCA), donde la semejanza entre los dos principales eigenvectores fue usada para clasificar la similitud de las estructuras (agrupamiento) de cada una de las 153 simulaciones. Sirva de ejemplo la **Figura 42** donde se muestra un diagrama típico de caracterización por PCA que clasifica las 5000 estructuras en tres cúmulos (análisis sobre A71R a 323.15 K).

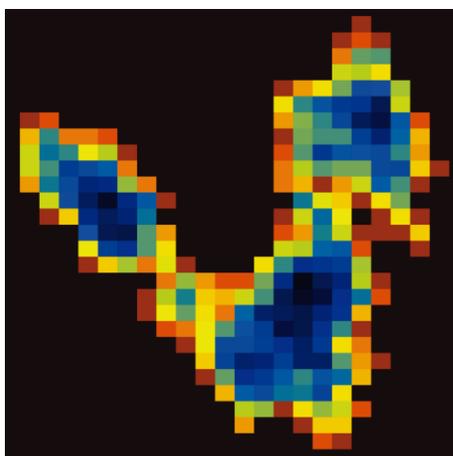


Figura 42. Ejemplo de la agrupación de estructuras en cúmulos (clustering). Ejemplo del resultado con los tres agrupamientos calculados para la simulación de la mutante A71R. Sobre el eje vertical y horizontal se representan los dos componentes principales más importantes. En color azul oscuro se aprecia la mayor densidad de estructuras que da origen a la formación de tres agrupamientos. La estructura promedio de ese conjunto es la representativa para análisis futuro.

De otra manera, un clúster o agrupamiento se encuentra conformado por un conjunto de estructuras similares y cercanas en su RMSD dada una simulación de dinámica molecular. A continuación, se analizan las variaciones en energía y conformación encontradas sobre cada agrupamiento para cada simulación realizada.

Sobre la **Figura 42** se determina el cambio en energía en función del RMSD de cada set de los agrupamientos determinados en cada sistema. A lo largo del eje de las abscisas se encuentra el RMSD y sobre el eje de la ordenada al origen se encuentra el cambio en de energía calculado por MM/PBSA.

Conviene subrayar que, cada punto d el grafico comprendido por la **Figura 42**, plasmados a lo largo de los ejes RMSD y Δ MM/PBSA proviene de la comparación de agrupamiento a agrupamiento entre una mutación y la enzima silvestre. Así mismo, cada color alude a un tipo de mutación realizada, para arginina color azul, aspártico/glutámico color rojo, lisina color cian, control positivo y negativo en amarillo y verde respectivamente.

Los puntos sombreados en color rosa a la derecha representan los tres valores de menor RMSD para cada mutante y los puntos vacíos corresponden a comparaciones entre agrupamientos de enzimas silvestres para una misma corrida.

El conjunto de datos colectados a 298.15 K (**Figura 43A**), se encuentra delimitado en zonas, por ejemplo: i) el extremo inferior izquierdo, es la zona de menor energía (en comparación a la enzima silvestre) y menor RMSD (estructura con menor divergencia estructural con la enzima silvestre) y ii) el extremo superior derecho, es la zona de mayor energía (en comparación a la enzima silvestre) y mayor RMSD (estructura con mayor divergencia estructural con la enzima silvestre).

De esta misma manera cabe destacar que cualquier posición por encima de la línea de energía es un bloque de agrupamientos que conlleva una desestabilización en su estructura con respecto a la enzima silvestre.

Al mismo tiempo, dentro de la **Figura 43** encontramos en la parte superior del **panel B** (graficado sobre un eje secundario) la distribución y promedio RMSD y en la parte inferior la distribución y promedio del cambio de energía entre la mutante y la enzima silvestre. Asociado a lo anterior con circunferencias de color verde se encuentran delimitados las comparaciones entre agrupamientos de una misma enzima silvestre (círculos huecos).

Controles positivos, sirva el siguiente ejemplo para demostrar la localización de las mutantes y la utilidad de dicha figura. Sea el control positivo, mutante H62R (puntos color amarillo) localizada en la zona de menor energía y divergencia estructural (cambio en el RMSD al superponer al menos: un agrupamiento de la enzima mutante sobre al menos otro agrupamiento de la enzima silvestre), tendría como significado que dicha mutación estabilizaría la estructura *wtβglu*, este aglomerado de puntos amarillos se encuentra conformado por 19 agrupamientos donde cada simulación contribuye con 2, 3 o hasta 4 de ellos. Por otro lado, el control negativo, la mutante E142A (puntos verdes), se encuentran localizada a la derecha de cada gráfica, zona de mayor energía y divergencia estructural, determinando que dicha mutación perturba la estructura silvestre *wtTv*, generando a su vez una ganancia de energía para la estabilización. Es así que cualquier agrupamiento localizado en las proximidades de los puntos amarillos y por debajo de la línea horizontal de energía son mutaciones de alta probabilidad para estabilizar la estructura nativa, por el contrario agrupamientos cercanos a los puntos verdes y por arriba de la línea horizontal de energía son mutaciones con una alta posibilidad de desestabilización estructural.

Como se muestra sobre las gráficas de la **Figura 43 a 45**, los puntos azules (grupo de mutantes de arginina) se encuentran próximos a los puntos amarillos y por debajo de la línea horizontal de energía, son mutaciones estabilizantes de la estructura para *wtTv*. En contraste los puntos cian (grupo de mutantes de lisina) se encuentran cercanos a los puntos verdes y por arriba de la línea horizontal de energía demostrando que este tipo de sistemas desestabilizan la estructura además de tener una fuerte ganancia de energía para tal efecto. Así mismo, los puntos rojos correspondientes a las mutaciones ácidas (cargadas positivas) muestran un comportamiento intermedio. En dichas graficas se puede apreciar el ordenamiento acorde a las contribuciones estabilizantes de cada mutante, en particular se observa que las mutaciones optimas y de mayor contribución son aquellas que se promovieron en los sitios 71 y 88 al intercambiar un residuo de alanina por uno de arginina. Teniendo como mutante de mayor estabilidad a las temperaturas de 298.15 K (25°C) y 348.15 (75°K) la mutante A88K, obstante a 323.15 K (50°C) la mutación de mayor estabilización cambia de A88R a A71R, en este mismo sentido es interesante observar que algunos de los residuos cargados cuentan con efectos contundentes sobre si pueden o no ser estabilizantes de la estructura silvestre de *T. versicolor*.

Sin embargo, dichos comportamientos han sido reportado para otras mutantes de lacasa, por ejemplo, mediante el remplazo de una cadena lateral de aspartato por una prolina estudiada por Huang y colaboradores [198], quien logro disminuir la movilidad de un asa confiriendo estabilidad estructural y generar una lacasa termoestable. Este resultado se asemeja a la buscado mediante nuestro trabajo, con lo cual nuestros resultados pueden ser correlacionados con las investigaciones realizadas por Huang.

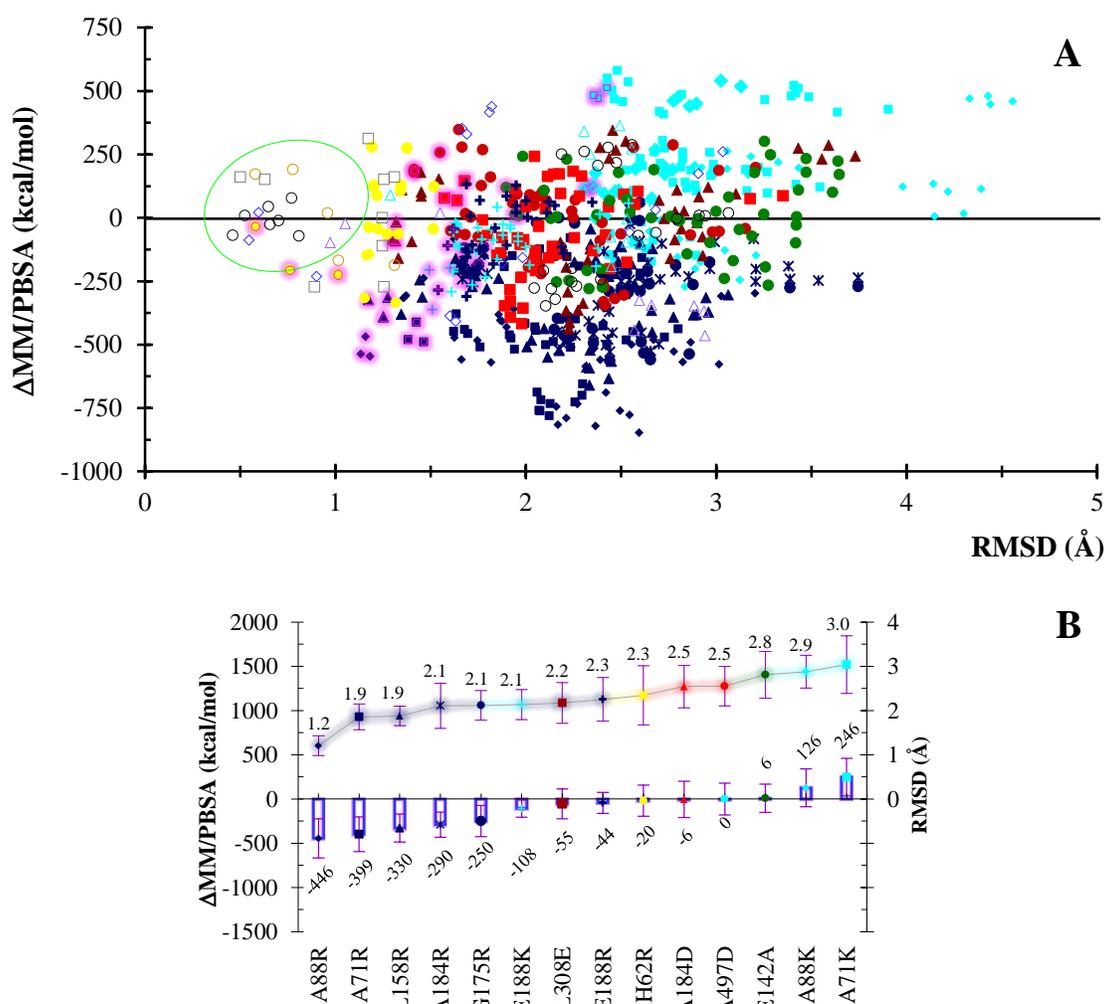


Figura 43. Grafica de análisis del agrupamiento a **298.15 K** (25°C). Panel A) comparación estructural y energética entre agrupamientos. Cada punto corresponde a la comparación entre un agrupamiento silvestre y uno mutante. Código de colores para las mutaciones: arginina (azul), aspártico/glutámico (rojo), lisina (cian), control positivo y negativo, amarillo y verde respectivamente. Los puntos sombreados a la derecha representan los tres valores de menor RMSD para cada mutante. Puntos vacíos corresponden a comparaciones entre agrupamientos de una misma corrida Panel B) distribución de energía y similitud estructural para cada conjunto de agrupamientos de cada mutante

Cuando los diagramas de las **Figura 43 a 45** son comparados un agrupamiento de agrupamientos con tendencias semejantes reluce (zona de menor energía y divergencia estructural) en la parte baja e izquierda de cada gráfica. Por otro lado, dicha reproducibilidad de tendencias sobre todas las simulaciones a diferentes temperaturas da certeza y provee una valides a nuestra metodología.

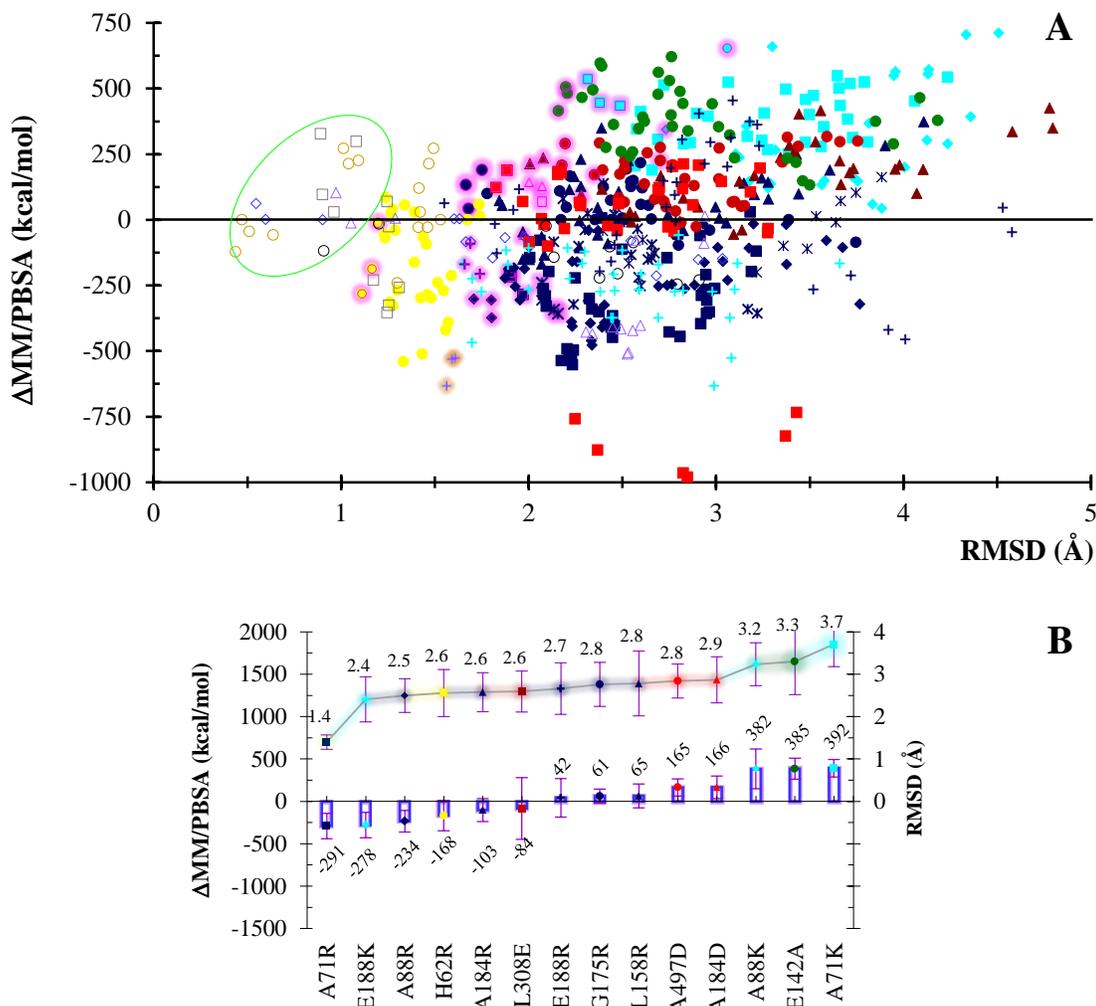


Figura 44. Grafica de análisis del agrupamiento a **323.15 K** (50°C). Panel **A**) comparación estructural y energética entre agrupamientos. Cada punto corresponde a la comparación entre un agrupamiento silvestre y uno mutante. Código de colores para las mutaciones: arginina (azul), aspártico/glutámico (rojo), lisina (cian), control positivo y negativo, amarillo y verde respectivamente. Los puntos sombreados a la derecha representan los tres valores de menor RMSD para cada mutante. Puntos vacíos corresponden a comparaciones entre agrupamientos de una misma corrida Panel **B**) distribución de energía y similitud estructural para cada conjunto de agrupamientos de cada mutante.

Por otro lado el incremento en la divergencia estructural que se acompaña de manera proporcional con el aumento de la temperatura genera cambios dramáticos sobre la energía de estabilización [199, 200], lo cual nos permite vislumbrar entre la calidad estructural de las mutantes sugeridas con fines de tomar aquellas mutantes de mayor significancia para la estabilidad estructural.

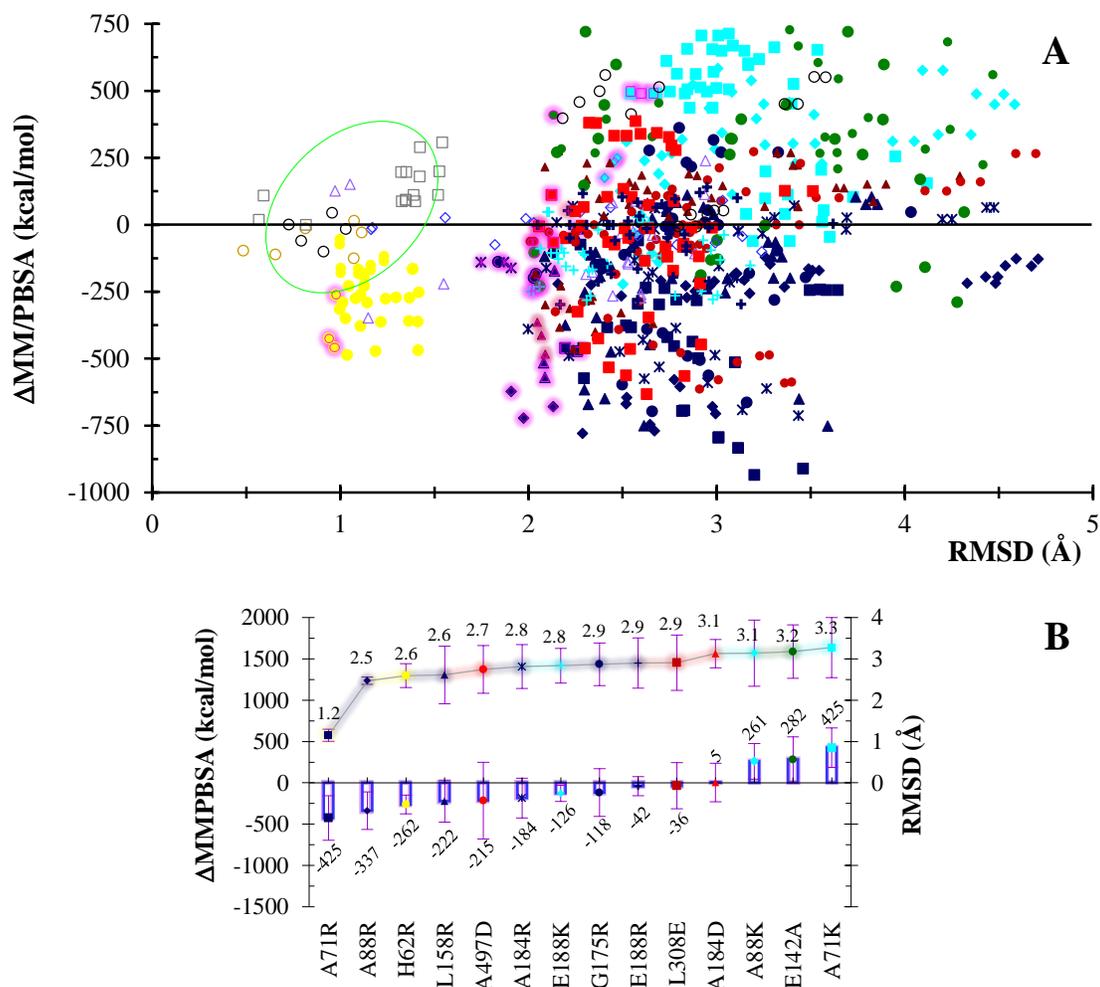


Figura 45. Grafica de análisis del agrupamiento a **348.15 K (75°C)**. Panel **A**) comparación estructural y energética entre agrupamientos. Cada punto corresponde a la comparación entre un agrupamiento silvestre y un mutante. Código de colores para las mutaciones: arginina (azul), aspártico/glutámico (rojo), lisina (cian), control positivo y negativo, amarillo y verde respectivamente. Los puntos sombreados a la derecha representan los tres valores de menor RMSD para cada mutante. Puntos vacíos corresponden a comparaciones entre agrupamientos de una misma corrida Panel **B**) distribución de energía y similitud estructural para cada conjunto de agrupamientos de cada mutante.

199. Jelesarov I, Karshikoff A. Defining the role of salt bridges in protein stability. *Methods in Molecular Biology*. 2009;490: 227-260. doi: 10.1007/978-1-59745-367-7_10

200. Polak J, Jarosz-Wilkolazka A. Structure/redox potential relationship of simple organic compounds as potential precursors of dyes for laccase-mediated transformation *Biotechnology Progress*. 2012;28: 93-102. doi: 10.1002/btpr.713

Las dos subsecuentes figuras pretenden ser un acercamiento de las **Figuras 43 a 45** a las zonas con los agrupamientos de mayor estabilidad energética y estructural. En lo referido a la **Figura 46**, en esta se observa el conjunto de agrupamientos localizados en la zona de menor energía y divergencia estructural observado sobre cada una de las simulaciones realizadas, mutantes y controles negativos y positivos, panel **A**) 298.15 K (25°C), panel **B**) 323.15 K (50°C) y panel **C**) 348.15 K (75°C). Por su parte, en la **Figura 47** encontramos graficado para su eje secundario la distribución y promedio de la divergencia estructural, en el eje principal y en la parte inferior se encuentra descrita la distribución y promedio del cambio de energía. Para la comprensión de las **Figuras 46 y 47** hay que en considerar que en la realización de dichas graficas se tomaron los 3 agrupamientos de menor energía y mayor semejanza estructural a la enzima silvestre, donde, cada punto refleja el cambio de energía en función de la similitud estructural entre una agrupación de la enzima mutante y la silvestre.

Dentro de las **Figuras 46 y 47**, en sus extremos se aprecian los agrupamientos más significativos, en puntos de color amarillo en la zona de menor energía y divergencia estructural (inferior derecha) se encuentra localizada uno de los controles negativos, el correspondiente a la mutante de β -glucosidasa H62R. En la zona de mayor energía y divergencia estructural (superior izquierda) se encuentran localizadas las mutantes de lisina realizadas sobre la estructura silvestre de *T. versicolor*, particular mente en esta zona se logra enfatizar sobre los efectos en la energía y estructura por la acción de introducir un cambio en la superficie proteica entre los residuos alanina \rightarrow lisina, donde dicho cambio presenta disrupciones aún mayores que las comparadas con el control negativo, en el cual como ya se ha mencionado se inhabilito un puente salino nativo.

Es así como, la tendencia en la distribución de las mutantes se aprecia con mayor claridad sobre la **Figura 46**, denotando que agrupamientos correspondientes a las mutantes de lisina mismas (extremo superior izquierdo) se encuentran estructuralmente perturbadas y energéticamente desfavorecidas, aun em mayor proporción al control negativo. No obstante las mutantes de arginina se encuentran localizadas por debajo la línea de energía y con RMSD bajos, denotando que este tipo de residuos son favorecidos para su introducción la estructura silvestre de *T. versicolor*.

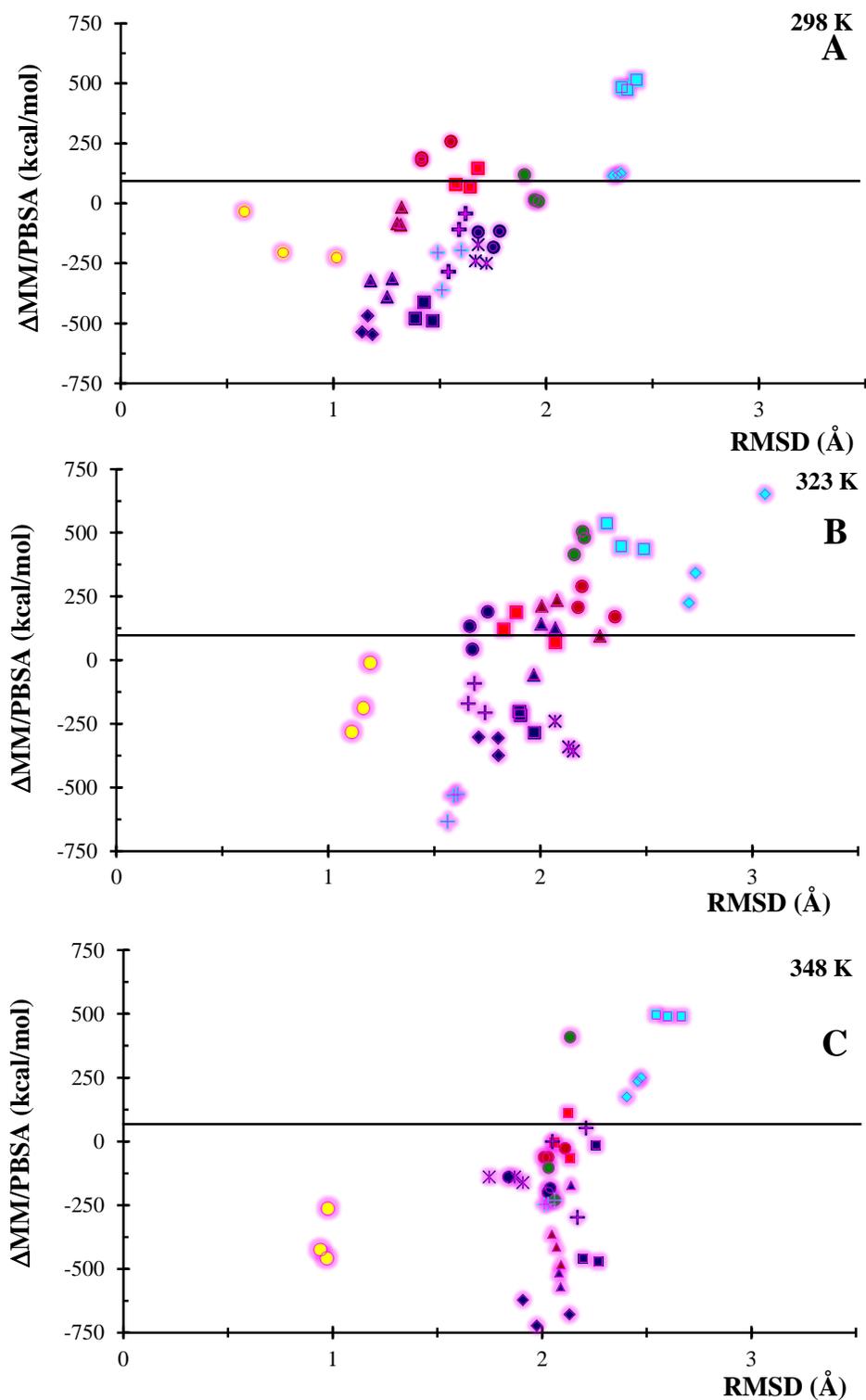


Figura 46. Comparación estructural y energética de los tres agrupamientos mejor posicionados en función a su estructura silvestre. Las gráficas muestran el análisis realizado sobre los 3 agrupamientos de menor RMSD y energía. De arriba hacia abajo panel **A**, **B** y **C**, simulaciones a 298.15 K, 323.15 K y 348.15 K respectivamente.

Nuevamente, en la **Figura 47** en su **panel A** (simulación a 298.15 K) se hace plausible el patrón encontrado sobre el panel B de las **Figuras 43 a 45**, en el cual se mantienen cuantitativamente las mutaciones: A88R, A71R y L158R como de mayor potencial estabilizante o promisorias energéticamente.

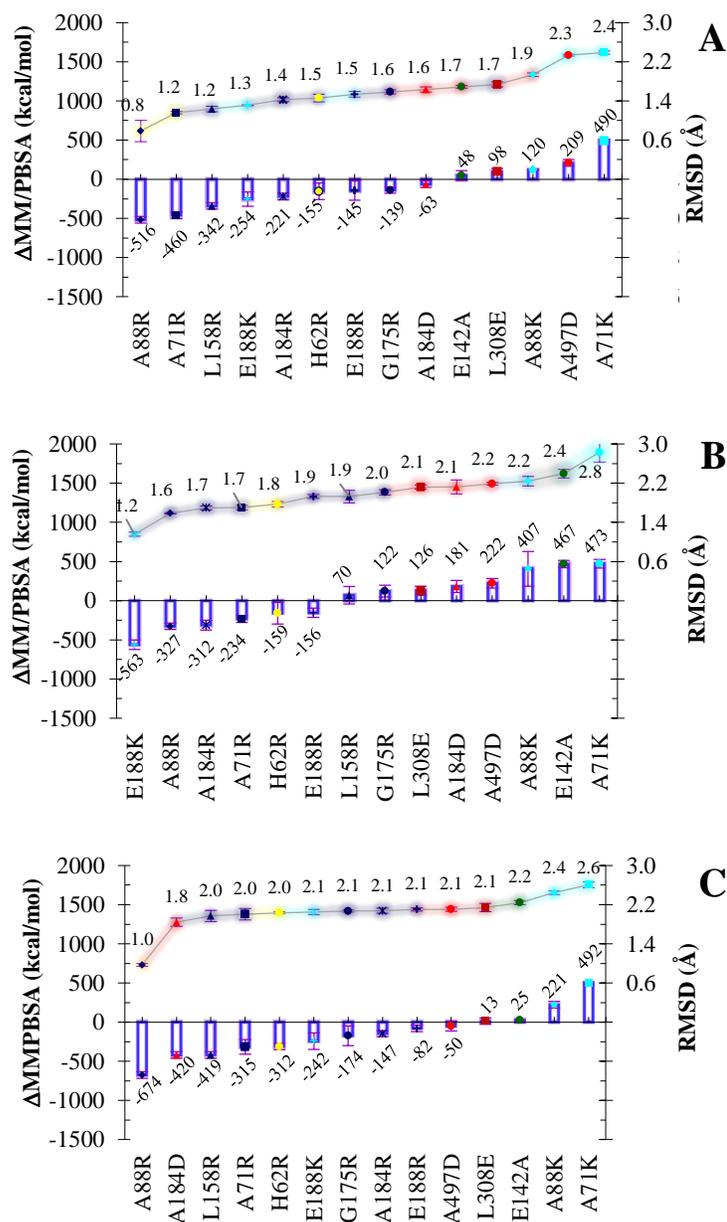


Figura 47. Estadístico de la comparación estructural y energética de los tres agrupamientos mejor posicionados en función a su estructura silvestre. Las gráficas muestran las distribuciones y similitudes estructurales para cada conjunto de los 3 agrupamientos de cada mutante. De arriba hacia abajo panel **A**, **B** y **C**, simulaciones a 298.15 K, 323.15 K y 348.15 K respectivamente.

En lo correspondiente al **panel B y C** de la **Figura 47** (simulación a 323.15 K y 348.15 K) estos muestran un cambio en las posiciones por la segunda y tercera mutante de mayor resistencia estructural (cuestión no evidente al estudiar la totalidad de los agrupamientos para esta mutante), quedando plasmados de menor a mayor para la simulación a 323.15 K las mutantes de *T. versicolor* A88R, A184D, a71R y para la simulación a 3348.15 las mutantes a88R, A184D y L158R.

Interesantemente, las mutantes de carácter ácido (puntos rojos), exceptuando la simulación de A184D a 348.15 K, generan cambios no significativos a la energía y la estructura de wtTv.

3.4.3 Estructuras de Mayor Estabilidad

Como se determinó en la sección el par de mutantes A71R/A71K y A88R/A88K presentan divergencias en lo correspondiente al efecto desestabilizador, como por ejemplo, que el residuo de arginina es ligeramente mayor que la lisina o que la distancia desde el carbón alfa al centro de la carga eléctrica positiva es similar, es por ello que en las siguientes acciones trataremos de estudiar dos componentes, como lo son el número de puentes de hidrógeno y la afectación la distancia de interacción domino:dominio y aminoácido-aminoácido generadas por la inserción del puente salino. De esta manera dicho comportamiento sea estudiado, analizado y comparado en múltiples proteínas, investigaciones e investigadores, como por ejemplo las efectuadas entre otros por: Xiao y colaboradores, 2013 [68]; Sokalingam y colaboradores, 2012, y 2013 [71, 72]; Yang y colaboradores, 2015 [94]; Pardo y colaboradores, 2015 [95]; Poluri y colaboradores, 2017 [98]; Satpathy y colaboradores, 2015 [180]; Christensen y colaboradores, 2013 [182]; Huang y colaboradores, 2016 [197]; Mrabet y colaboradores, 1992 [199]; Matsutani y colaboradores, 2011 [201]; Toledo-Núñez y colaboradores, 2012 [204].

De manera general, el análisis comparativo de las estructuras demostró: que la sustitución de una alanina por un residuo de arginina provee una reducción en la distancia de interacción en comparación con las sustituciones por un residuo de lisina (**Figura 48**), así también, como un número menor en las fluctuaciones.

En la **Figura 48** Se puede apreciar dicha disminución, en los **paneles A y C** se comparan las diferencias entre la mutante A71R y su estructura silvestre. Claramente se aprecia una reducción en el **panel C** y un alejamiento de las interacciones carga-carga en el **panel A**.

Así entonces, la reducción en la distancia muestra que el intercambio de una arginina colocada en la superficie de la proteína tiene como consecuencia un acercamiento de los dominios y con ello se espera un fortalecimiento de los contactos entre ellos, aumentando la estabilidad estructural, por otro lado, comportamientos extremos presentados entre mutantes de la misma clase han sido estudiados y reportados con anterioridad, demostrando una fuerte preferencia por residuos de arginina [201].

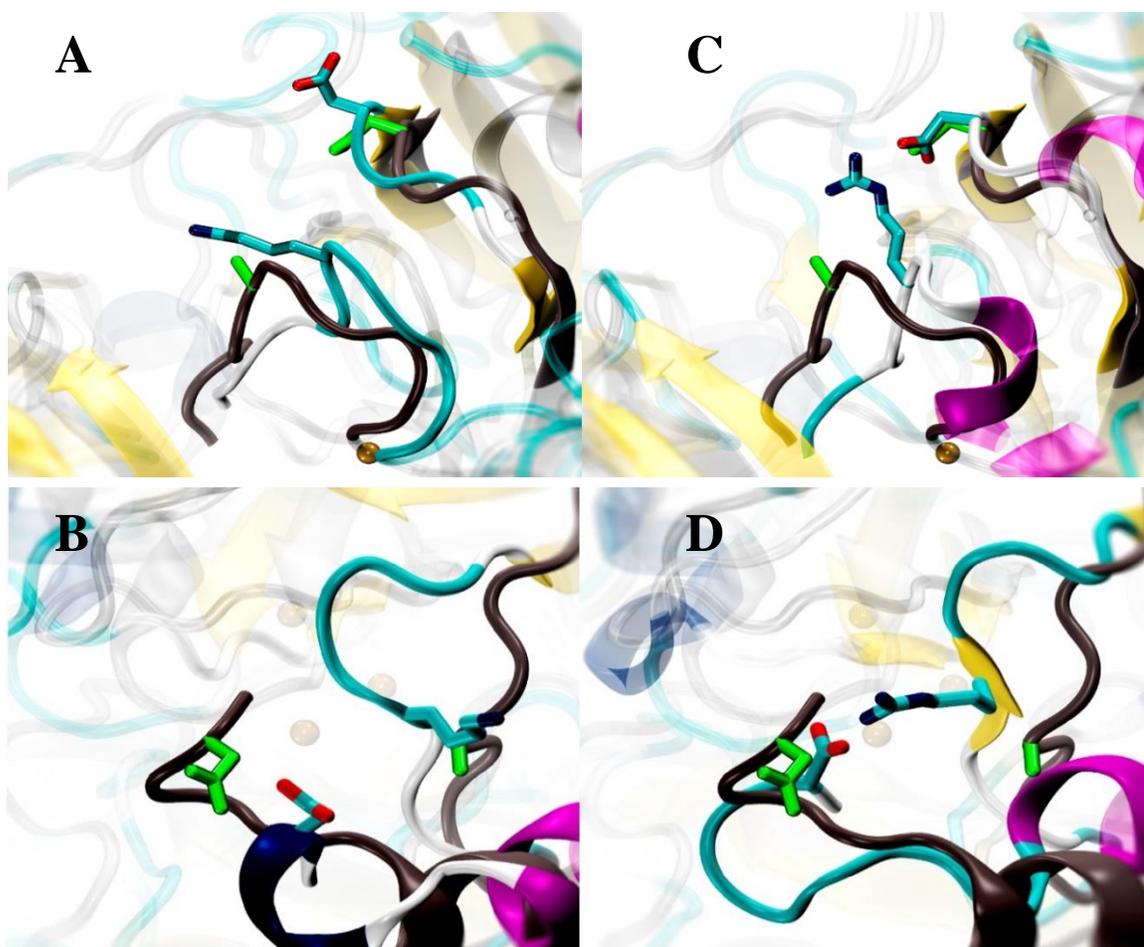
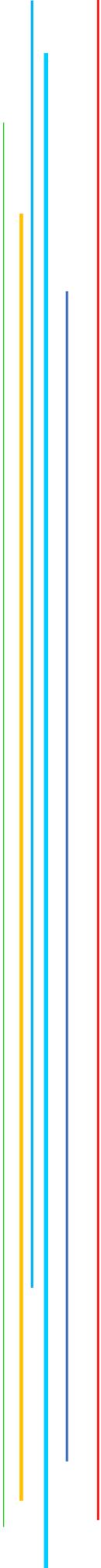


Figura 48. Comparación entre residuos arginina y lisina para el mismo puente salino. La estructura en listones representa el esqueleto de las estructuras y la estructura de wtTv se representa en negro la cadena principal y en verde la lateral. Panel **A**) Comparación entre la mutante A71K y de la enzima silvestre. Panel **B**) Comparación entre la mutante A71R y wtTv. Distancias promedio entre la cargas positiva y negativa son de 9.1 ± 1.0 y 3.8 ± 0.3 Å, respectivamente. En los paneles **A** y **D** se encuentran comparadas las mutantes A88K y A88R, la distancia para estas mutantes entre cargas corresponde a 9.4 ± 1.0 para la mutante de lisina y 4.3 ± 0.2 para la mutante de arginina

En el mismo camino, estudios genómicos han demostrado que interacciones iónicas formadas por un residuo de arginina se encuentran evolutivamente favorecidos y conservados de igual manera en enzimas termoestables [202]. Así también y aunque los dos tipos de mutación conllevan la integración de una nueva carga positiva, se ha demostrado mediante investigaciones que la densidad de carga y tipo de aminoácidos es un factor significativo en la disociación de subunidades proteicas [203, 204], lo cual daría una explicación a los resultados encontrados entre las mutaciones de lisina/ arginina ya que la carga puntual del grupo amino de la lisina y la carga resonante en el grupo guanidino de la arginina son diferentes.

-
201. Matsutani M, Hirakawa H, Nishikura M, et al. Increased number of arginine-based salt bridges contributes to the thermotolerance of thermotolerant acetic acid bacteria, *Acetobacter tropicalis* SKU1100. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;409: 120-711 4. doi: [10.1016/j.bbrc.2011.04.126](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.126)
 202. Zoe H, Helena H, Joseph AM, et al. The role of salt bridges, charge density, and subunit flexibility in determining disassembly routes of protein complexes. *Structure*. 2013;21: 1325–1337. doi: [10.1016/j.str.2013.06.004](https://doi.org/10.1016/j.str.2013.06.004)
 203. Mrabet NT, Van den Broeck A, Van den Brande I, et al. Arginine residues as stabilizing elements in proteins. *Biochemistry*. 1992;31: 2239-2253. doi: [10.1021/bi00123a005](https://doi.org/10.1021/bi00123a005)
 204. Toledo-Núñez C, López-Cruz JI, Hernández-Arana A. Thermal denaturation of a blue-copper laccase: formation of a compact denatured state with residual structure linked to pH changes in the region of histidine protonation. *Biophysical Chemistry*. 2012;167: 36-42. doi: [10.1016/j.bpc.2012.04.004](https://doi.org/10.1016/j.bpc.2012.04.004)

CONCLUSIONES



Los resultados previamente discutidos, muestran que la enzima lacasa es un buen modelo para la búsqueda de determinantes de estabilidad interdominio, esto debido a su composición estructural, la cual se encuentra ensamblada por tres dominios. Dichas características nos permitieron proponer y probar el efecto estabilizador de diferentes puentes salinos en la sección de interacción entre dominios.

La metodología propuesta en nuestro trabajo mostró ser precisa para detectar el efecto de las mutantes propuestas, en el marco de controles positivo y negativo. Así mismo, los procedimientos realizados a lo largo de nuestro trabajo demostraron ser robustos, ya que cada una de las simulaciones realizadas por triplicado produjo resultados consistentes, así como también las simulaciones independientes a tres temperaturas distintas.

En nuestro trabajo hemos propuesto y evaluado diferentes puentes salinos interdominio diseñados con el fin de estabilizar la estructura de la lacasa del hongo *T. versicolor*, para tal efecto generamos un protocolo de simulación por dinámica molecular el cual fue realizado por triplicado y llevado a cabo a tres diferentes temperaturas.

La comparación entre las mutantes y sus correspondientes enzimas silvestres revelaron una diversidad de efectos en el conjunto de las 10 mutantes propuestas, donde, dos de ellas demostraron ser consistentemente estabilizantes, en lo cual fue clara la importancia de la estimación de energía vía un modelo de Poisson-Boltzman dentro del modelo coulombico, al igual que la clasificación estructural mediante el agrupamiento para cada corrida de dinámica molecular.

Con respecto a la enzima lacasa, es interesante observar que puede ser estabilizada estructuralmente mediante la inserción de una mutación simple para la formación de un puente salino con la capacidad de establecer una interacción interdominio que funja como grapa estructural., como se aprecia en el caso de las mutantes A71R y A88R. En el mismo camino la metodología y los procesos realizados en el diseño racional e ingeniería de proteínas nos permitieron observar que no todos los sitios estudiados de inserción potencial de puente salinos interdominio logran estabilizar la estructura.

Interesantemente, mutaciones con localización en el mismo sitio y especificaciones geométricas y químicas semejantes como lo son los residuos de lisina y arginina, muestra un efecto opuesto entre ellos en lo referente a la energía de estabilización, estos aspectos de igual manera han sido reportado previamente por un gran número de investigadores.

Por otro lado, la estimación de la energía electrostática mediante un modelo coulombico simple no es suficiente para el estudio adecuado del efecto de un puente salido sobre la estructura proteica, por lo cual encontramos que, modelos como MM/PBSA son requeridos con la finalidad y proponer y proveer una correcta estimación de la energía electrostática.

La simulación por dinámica molecular es una herramienta poderosa para realizar estudios estructurales, como el efecto producido al introducir contactos potencialmente estabilizantes. Sin embargo, las fluctuaciones intrínsecas a esta técnica pueden enmascarar por promediado algunos análisis comparativos como los estudiados entre nuestra mutantes y sus estructuras silvestres.

La introducción de un aminoácido cargado en una localización apropiada puede dar lugar a cambios conformacionales que refuercen uno o más interacciones ya existentes, produciéndose y efecto cooperativo. Es efecto estabilizante producido en la proteína también depende de los cambios producidos en las interacciones no covalentes vecinas, es decir, la introducción de un grupo cargado no tiene un efecto puramente electrostático

Por lo cual, y para superar este inconveniente, una clasificación estructural vía PCA-agrupamiento puede ser una solución plausible para filtrar estructuras atípicas o fuera de la media estructural, así como para ensamblar conjuntos de conformaciones similares con características estructurales parecidas facilitando los estudios y análisis.

Nuestro trabajo no solo propone alguna mutante termoestable de wtTv, si no, más aún la metodología empleada puede ser extrapolada en futuras investigaciones sobre los efectos estabilizantes de nuevas mutantes, simples o múltiples para cualquier proteína dependiente de cobre, así como para el estudio de los efectos sinérgicos o aditivos de las interacciones estructurales generadas por alguna mutante. En el mismo camino, muestra metodología puede ser utilizada en estructuras proteicas multidominio o multimericas.

ARTICULOS GENERADOS PARTIR DEL PRESENTE TRABAJO

- 4.1 Molecular dynamics on laccase from *Trametes versicolor*
to examine thermal stability induced by salt bridges
- 4.2 In silico Design of Laccase Thermostable Mutants From
Lacc 6 of *Pleurotus ostreatus*

4.1 Molecular dynamics on laccase from *Trametes versicolor* to examine thermal stability induced by salt bridges

Chemical Physics 517 (2019) 253–264



Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Physics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemphys



Molecular dynamics on laccase from *Trametes versicolor* to examine thermal stability induced by salt bridges



Leonardo David Herrera-Zúñiga^{a,b}, Cesar Millán-Pacheco^c, Gustavo Viniegra-González^d, Elba Villegas^e, Leticia Arregui^f, Arturo Rojo-Domínguez^{f,*}

^aÁrea de Biofísicoquímica, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340, Ciudad de México, Mexico

^bTecnológico de Estudios Superiores del Estado de México, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Paraje San Isidro s/n, Barrio de Tecamachalco, La Paz, Estado de México, C.P. 56400, Mexico

^cFacultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad No. 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62209, Mexico

^dDepartamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340, Ciudad de México, Mexico

^eCentro de Investigación en Biotecnología-UAEM, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62209, Mexico

^fDepartamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa, C.P. 05348, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Thermostability
Fungal laccase
Molecular dynamics simulations
Cluster analysis
Electrostatics
MMPBSA

ABSTRACT

Enzymes have demonstrated their capacity to acquire thermostability with precise single-residue mutations. We developed a methodology to propose and evaluate stabilizing salt-bridge interactions into the structure of laccase. This oxidoreductase folds into three similar and interacting immunoglobulin-like domains. We identified structural positions prone to strengthen interdomain contacts with a single salt bridge. Ten mutated enzymes were modeled, along with positive and negative controls. We evaluated the mutated structures at three temperatures, with 153 molecular dynamics simulations. Results demonstrated that a computational methodology combining triplicates of molecular dynamics, Poisson-Boltzmann electrostatics and clustering based in principal component analysis, is robust and reliable. Arginine mutants were better than lysine to confer thermostability, and the results indicated that the complex network of interactions in a protein structure requires this type of combined approach to assess the effects of mutations.

1. Introduction

Structure is crucial for biological function. Both experimental and computational efforts have been performed in order to propose mutations to enhance stability of protein molecules. This improved stability allows the use of mutated protein molecules in technological applications where conditions are far from the natural environment of the bioactive molecule. Analysis of enzymes from mesophilic and thermophilic organisms has identified several general contributors to structural stabilization [1]. For example, some contributors are larger hydrophobic cores [2,3], additional polar interactions including hydrogen bonding [4–6], structural rigidity [7,8], glycosylation [2,4], and frequently an increased number of salt bridges [9–12]. With respect to computational efforts, molecular dynamics simulations (MD) and force field energy-calculations are two of the most frequently used tools in the search for thermostability, since the former allows estimation of the

structural effects of potentially relevant mutations and the latter is a comparative criterion to contrast the mutant with the wildtype structure [13,14].

The inclusion of salt bridges in proteins is one of the strategies to enhance thermostability. Salt bridges are interactions between residues supporting opposite charges that are close enough ($< 4 \text{ \AA}$) to experience the attraction. These interactions are relevant for thermostable proteins because they represent plausible modifications that can be done on the surface of the protein to increase rigidity and decrease free energy [15]. They can be studied by experimental approaches like pKa perturbation and mutant productions. In the former case, the relative free energy gained or lost when ionizable groups are protonated is followed by an atom-resolution technique such as NMR. With mutant species, the coupling free energy between interacting charges is obtained by a double mutant cycle [16]. Force field energy, Poisson-Boltzmann calculations or molecular dynamics simulations, alone or in

* Corresponding author.

E-mail address: arojo@correo.cua.uam.mx (A. Rojo-Domínguez).

<https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2018.10.019>

Received 19 June 2018; Received in revised form 24 September 2018; Accepted 27 October 2018

Available online 28 October 2018

0301-0104/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

combination are some of the computational approaches to understand the effect of salt bridges over proteins [17,18]. Force fields evaluate the energy based on the atom coordinates of a structure; Poisson Boltzmann-based simulation uses a more complex electrostatic model with different dielectric constants for protein and solvent at each simulation temperature; and MD follows the effect of a new salt bridge over the original protein structure [19]. Addition of a salt bridge to a protein is reasonably expected to be a stabilizing interaction, but in the complex environment of the protein, it could result in neutral or negative effects. A robust and sensible method to predict when salt bridges will result in protein stability is a relevant goal in protein design.

Laccases are oxidoreductases used by some organisms like fungi to degrade the polyphenolic structure of lignin in wood as part of its digestion. Also, plants and other organisms use laccases in anabolic pathways to synthesize phenolic metabolites. These enzymes are widely used in industrial processes which require strong oxidative reactions like fabric color treatments, biomass processing for biofuel production, bioremediation of wastes in water and soils, etc. [20–24] and also for biosynthesis *in vitro* [25]. These usages require laccase activity over a wide range of salinity, pH and temperature. The molecular geometry of this group of enzymes is composed of three structural domains which share a common cupredoxin-like topology [26] similar to an immunoglobulin fold. This fold is formed by a beta sandwich composed by 8–12 antiparallel strands, with a complex connectivity going from one of the sheets to the other and a significant and well defined hydrophobic core [27]. Only the C-terminus structural domain maintains its capacity to shelter a copper ion, while the arrangement of the three domains forms a new binding site for a complex structure of three copper ions coordinated to eight histidine residues coming from the first and last domains. This assembly makes interdomain interactions crucial to maintaining copper binding and thus its oxidoreductase activity.

In this work, we propose a methodology to evaluate structural stability induced by mutations which produce ion pairs, isolated from other contributors to stability. The methodology centers on the analysis of data from MD simulations to get molecular information [28]. Laccase was used as a test case due to its importance in industrial and biological processes and also because of its three-domain structure. Since each domain is a well-packed structure, we tested the effect of interdomain salt bridges induced by point mutations in the energetics of the mutant structures and compared them with structures used as positive and negative controls.

2. Methods

2.1. Modeling and analysis

Homology modeling of wild-type and the 11 mutants of *Trametes versicolor* (Tv) laccase (See Table 1 and Fig. S1 in the Supplementary data) was performed with the Molecular Operating Environment package (MOE, www.chemcomp.com) [29] using PDB file 1GYC as a template. We initially started with 33 *Trametes versicolor* single-point mutants able to potentially form interdomain salt bridges. All of them were then energy minimized yielding 10 of them with energies below that of the wtTv laccase structure. The eleventh mutant (E142A) was generated as a negative control by a single-point mutant removing an existing interdomain salt-bridge. On the other hand, as a positive control, the wildtype β -glucosidase was taken from PDB file 2O9P, and its H62R thermostable mutant was also modeled with MOE. Another positive control was built from wildtype *Bacillus subtilis* laccase and its two mutants (E188K/R) were modeled using Modeller [30] package, with CotA laccase PDB ID:1GSK used as a template. Interface contacts were estimated with the PDBsum server (www.ebi.ac.uk/pdbsum) [31]. The acronyms used throughout this work are summarized in the Table S1 in the Supplementary data.

2.2. System setup and simulation protocols

All molecular dynamics simulations were performed using NAMD2.7 package [32] and CHARMM (toppar C22/CMAP parameters) [33] with a time step of 1 fs. Bonded hydrogen atoms were constrained with SHAKE algorithm as implemented in NAMD2.7. Long-range electrostatics was treated with Ewald particle mesh model. A 10-Å switch and 12-Å cutoff for non-bonded interactions were used, as employed for parameterization, and the non-bonded list was updated every 25 steps. Periodic boundary conditions with isotropic molecule-based scaling were applied. Berendsen temperature coupling method [34] was used to efficiently couple the system to a thermal bath and maintain the system close to the target temperature to approximate the simulation to an isothermal-isobaric ensemble.

In every one of the 17 structures studied, the system was built with CHARMM-GUI (<http://www.charmm-gui.org/>) [35]. All systems were solvated with TIP3P water in a rectangular box that extended to at least 1 nm between the protein and the edge of the box involving about 24 thousand water molecules, in a physiological solution of KCl (0.15 mol L^{-1} , Table S2). Basic and acid residues were protonated at pH = 7.0 on each of our models and simulations. All crystallographic waters from PDB files were conserved.

Previous to each MD simulation all solvated systems were energy minimized with NAMD2.7 with 50,000 steps of conjugate gradient algorithm. MD runs were carried out to simulate 20–30 ns, and consistently only the last 5 ns of each simulation were used for analysis [36,37], storing snapshots every ps. A total of 153 runs were performed, counted as 17 different species (eleven mutants of *Trametes versicolor* laccase, two mutants CotA of *Bacillus subtilis* laccase and one of β -glucosidase, and the three corresponding wildtype structures). For each of the mutant structures and all three wild-type reference structures, we carried out MD simulations at 298.15 K, by triplicate [38]. Similar simulations were performed at 323.15 K and 348.15 K, also by triplicate. In short, we performed nine runs (three for each temperature) on each of the 17 structures (3 wt and 14 mutants) for a total of 153 independent simulations.

2.3. MM/PBSA approach

The free energies of wild-type *Trametes versicolor* laccase (wtTv), *Bacillus subtilis* laccase (wtBs), bacterial β -glucosidase B (wt β glu) and their mutants were calculated with the MM/PBSA methodology [38] using CHARMM (version 35b2). Briefly, the free energy of each conformation sampled from MD simulation is expressed as a potential of mean force W . It is calculated as the sum of the intramolecular energy of the protein (U) and a solvation free energy term that is further split in polar ($\Delta G^{\text{polar,electrostatic}}$) and nonpolar ($\Delta G^{\text{nonpolar,hydrophobic}}$) terms [39], described in the Eq. (1).

$$\bar{W} = U(\bar{r}_1, \dots, \bar{r}_n) + \Delta G^{\text{polar}}(\bar{r}_1, \dots, \bar{r}_n) + \Delta G^{\text{nonpolar}}(\bar{r}_1, \dots, \bar{r}_n) \quad (1)$$

All structures were previously energy-minimized to remove high energy spots, like van der Waals clashes, with all atoms in the structure unrestrained. Then a more accurate solvent model (the generalized Born solvent-accessible model) was used in order to reduce artifacts caused by the missing solvent. The entropy of the protein is neglected altogether here based on the assumption frequently made that the entropy of similar compact conformations is practically the same [39,40]. Since we deal in this work with changes due to single-point mutant structures, their comparative change is expected to be small. The polar energy (ΔG^{polar}) has been computed according to the Poisson-Boltzmann theoretical framework as the difference in free energy for a hypothetical charging process of the solute *in vacuo* and in ionic solvent. Grid spacing was set to 0.5 Å, and the longest linear dimension of the grid was extended to at least 20% beyond the protein. Parse radii were employed for all atoms [41]. Pauling van der Waals radii by ions were used

Table 1
Description of enzyme mutants of wtTv (11 mutants), wtBs (2 mutants), and wtβglu (1 mutant).

Mutant	Partner	Mutation location	Partner location	Interacting domains and line colors in Fig. 1B		
Mutants of wtTv	A184D	ARG22	β-turn connecting sheet C and D	2nd strand of sheet A	B:A orange, right	
	A184R	ASP18		β-harping between 1st and 2nd strands in sheet A	B:A gray, right	
	A497D	LYS59	14th helix	β-turn between 1st helix and 2nd strand in sheet B	C:A black/white, right	
	A71K	ASP444	β-turn connecting 2nd strand in sheet B and helix two	γ-turn between 6th strand in sheet B and 4th strand in sheet G	A:C pink, left	
	A88K	ASP498	β-turn between 2nd helix and 4th strand in sheet A	14th helix	A:C cyan, right	
	A88R	ASP18	between 2nd strand in sheet C and 5th strands in sheet D	β-harping 1st and 2nd strands in sheet A	B:A light green, right	
	G175R	ASP23	β-harping between 1st and 2nd strands in sheet C	2nd strand in sheet A	B:A magenta, right	
	L158R	ASP136	β-turn between 7th helix and 1st strand in sheet E	16th helix	C:A purple, left	
	E142A [#]	ARG37	5th helix	1st strand in sheet B	B:A green, left	
	Mutant of wtBs	E188K ⁺ E188R ⁺	ASP14 GLU61	1st and 4th strand of sheet A		
		Mutant of wtβglu	H62R ⁺	GLU429	4th helix	last strand in sheet D

Mutant and partner residues constitute salt-bridge interactions. Negative and positive control mutants were identified by [#] and ⁺, respectively. Color code for lines in Figs. 1 and 3 are given in the last column. Location of these positions with respect to secondary structure elements can be followed in Fig. 3. Right or left indicate the localization of the color line in Fig. 1B.

according to the force field. The value of the exterior dielectric constant was set according to the run temperature (78.54 at 298.15 K, 69.94 at 323.15 K and 62.69 at 348.15 K), and the solute dielectric constant was set to 2.0 in the three temperatures [42]. The same-type of ions and salt concentration were used for each DM run. Non-polar solvation energy ($\Delta G^{\text{nonpolar}}$) is proportional to the solvent-accessible surface area (SASA) $\Delta G^{\text{nonpolar}} = \gamma \text{SASA} + \beta$, where the surface tension coefficient γ has been taken equal to 0.00542 kcal (mol⁻¹ Å⁻²) and $\beta = 0.92$ kcal mol⁻¹ [43]. Note that MM/PBSA free energies reported hereafter are extremely large because they are given relative to a non-physical reference state, but the relevant figures for our work rely on comparative analysis between a wild-type and a mutant species, turning irrelevant the reference state, and yielding reasonable energy amounts.

2.4. Cluster energy approach

The ensemble of snapshots obtained from an MD simulation in principle approximates to a thermodynamic ensemble. Theoretical and numerical inaccuracies of both MD and PBSA methodologies, however, lead to some fluctuations in the computed MM/PBSA energy. The cluster energy approach proposed by Schulten K. et al. [44] was applied to gather representative states and filter some outlier structures. The principal component analysis approach was developed to reveal the most important motions in wildtype and mutant enzymes according to the protocol established by Sengupta et al. [45]. A conformational search is carried out through cartesian Principal Component Analysis (PCA) by generating clusters of all the snapshots that are close structurally to each other in an RMSD cutoff of 2.4 Å using Carma Software [46]. The effectiveness of principal component analysis (PCA) is a widely established technique for finding global and correlated motions in atomic simulations develop by MD simulations [47,48]. This study was carried out using the first three principal components generated through Carma, obtaining the most populated clusters, the RMSD cutoff used as a measure of the center of each cluster was 2.4 Å. The probability distribution between the first two principal components was made on the alpha carbon atoms. The free energy (ΔG) is calculated according to Eq. (2), assuming a Boltzmann distribution of previously obtained populations [46].

$$\Delta G = -k_b T \ln \left[\frac{P}{P_{\max}} \right] \quad (2)$$

In the Eq. (2), k_b is Boltzmann's constant, T the temperature in absolute units, and P over P_{\max} is the ratio between the probability obtained from the distribution of the first two principal components and the maximum probability, respectively [46].

All simulations were performed at the LANCAD (Laboratorio Nacional de Cómputo de Alto Desempeño) at the Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo (LSVP), from the Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I, Mexico). The analysis was performed using scripts written in home with CHARMM version 35b2 and Simulaid programs [33,49]. Visual analysis of protein structures was carried out using VMD [50]. The copper ions on the active site of laccase enzyme were modeled declaring and using collective variables (COLVAR module [51]) on NAMD, and their parameters were taken from Lowell W. et al. [52]. The general flow chart of the methodology is depicted in the Supplementary Fig. S1.

3. Results and discussion

For homology modeling, we used the 519 aa sequence of *Trametes versicolor* fungal laccase from gene lac1 as expressed by Lopez et al. [53], with GenBank accession number AY049725.1. Homologous sequences from the Protein Data Bank were searched with BLAST, and 1GYC was located. Although 1GYC lacks the first 20 residues of AY049725.1, in the rest of its sequence it is a closely-related homolog, with 97% identity also from *T. versicolor* fungus, and with no indels in the sequence alignment. Homology model building was based on the 499 aa of 1GYC as a template, replacing 15 residues on it (Supplementary Table S3): ten of them on external sites, three conservative changes in the interior of the first two domains, and two conservative and correlated changes in the interdomain region of these two domains. The overall RMS distance of alpha carbons between 1GYC and the homology model (wtTv) of our sequence was 0.4 Å, indicative that side chain replacements produced no significant structural changes.

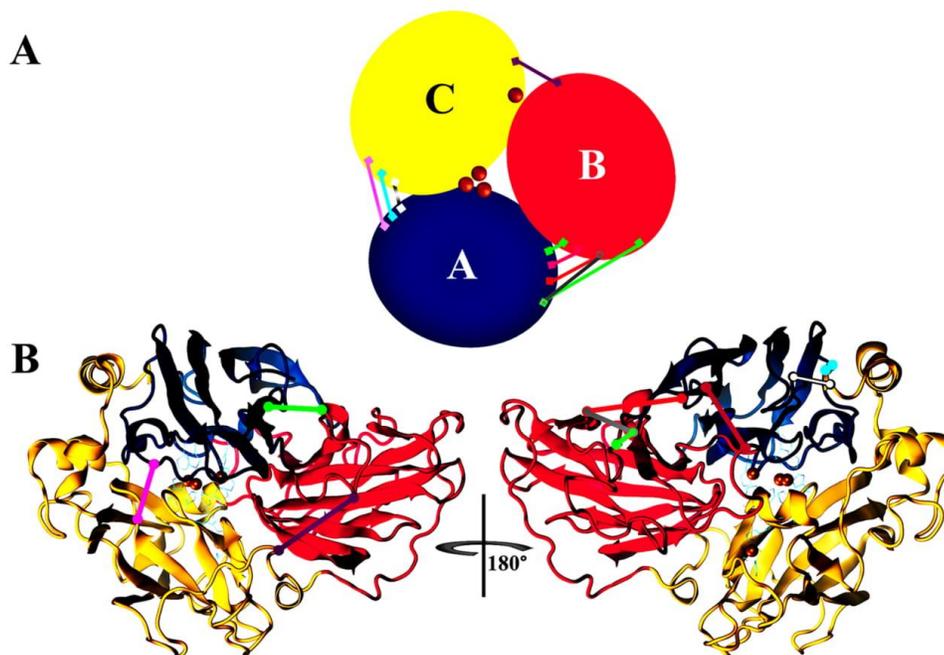


Fig. 1. Structure of *T. versicolor* laccase. A. Depiction of wtTv domains represented with large ellipses, and the schematic location of copper ions shown by brown spheres. Lines correspond to the salt bridges generated by single point mutations (see Table 1 for full-color code). Since two different salt bridges occur in the same place with A71R and A71K mutations, they are represented by the same pink line, as well as A88R and A88K by the same cyan line, so only 8 lines appear for the 10 salt bridges studied. The deleted salt bridge in the negative-control mutation E142A is also depicted (green). B. Ribbon structure of wtTv showing the location of all salt bridges introduced, shown as a color line joining the α -carbons of participating residues. The salt bridge deleted in the negative control is also shown as a green line at left.

3.1. Mutant design

Each one of the three domains in laccase chain (designated from now on as A, B, and C) has a similar compact immunoglobulin-like fold, composed of a beta sandwich and loops of variable length, with several of them connecting strands of different sheets (Fig. 1). This fold has been named as cupredoxin-like and is characterized in the CATH superfamily 2.60.40.420 with more than 2200 domains known [54]. Due to its complex topology and tight packing, this type of domain is difficult to unfold; therefore to propose the location of potentially stabilizing salt-bridges, we focused our analysis on the interdomain contacts of laccase. So, we compared the domain-domain contacts in laccase with interdomain or interchain interfaces of similar size proteins. For example, those between papain left and right domains (9PAP), between the C- and N-termini domains of human complement D (5MT4), and also with the interchain contacts in triosephosphate isomerase (7TIM) homodimer (Supplementary Table S4). Comparatively, *T. versicolor* laccase interdomains present a reduced number of hydrogen bonds and non-bonded contacts when compared with the other molecules, especially in comparison with other thermotolerant and thermostable laccases. The structural characteristics of the wtTv laccase along with the idea that even partial disruption of interdomain contacts ineludibly would affect activity, led us to propose that one of the best sites for introducing stabilizing salt-bridges would be between contiguous side chains from different domains. Care was also taken to avoid alteration of the oxidoreductase due to the introduction of the new salt-bridge interactions, so they were proposed on the surface of the enzyme far from the multicopper site and also from the water channel where water molecules produced during catalytic cycles are released [55].

To propose the location of the stabilizing salt bridges, we analyzed the wtTv structure to identify acid or basic residues in the structure, adjacent to an electrically neutral side chain in a contiguous domain. Table 1 shows a list of single point mutations of those electrically neutral residues able to produce salt bridges with potential stabilizing effect on interdomain interactions. In this work we propose and studied a total of 10 mutations creating salt bridges (color lines in Fig. 1), along with four reference structures to be used to validate our results; one of them was a mutation which deletes an already existing interdomain salt-bridge in *T. versicolor* laccase (E142A), as a negative control (Fig. 1). In contrast, as positive controls we also studied three salt-bridge mutants reported to induce thermostability: one in bacterial β -glucosidase (H62R) increasing denaturation temperature in about 3.0 °C [56,57] and two in *Bacillus* sp. laccase (E188K and E188R). During analysis, each control mutant was compared to its corresponding wild-type structure, denoted herein as wtTv, wt β glu and wtBs, respectively. Regarding the wtBs mutants, the increased thermal stability of laccase from *Bacillus* HR03 was found by site-directed point mutations of E188 replacing this residue two times by two positive residues (Lys and Arg). The E188K variant was stabilized by 5 °C, while E188R mutation showed a moderate stability improvement compared to the wtBs [58].

3.2. Molecular dynamics simulations

Starting from wtTv structure, we constructed all 11 mutants (10 potentially stabilizing and the negative control) by homology modeling. The *Bacillus subtilis* wild-type and its mutants E188K and E188R were built using Modeller [30] utilizing as template CotA laccase, with PDB

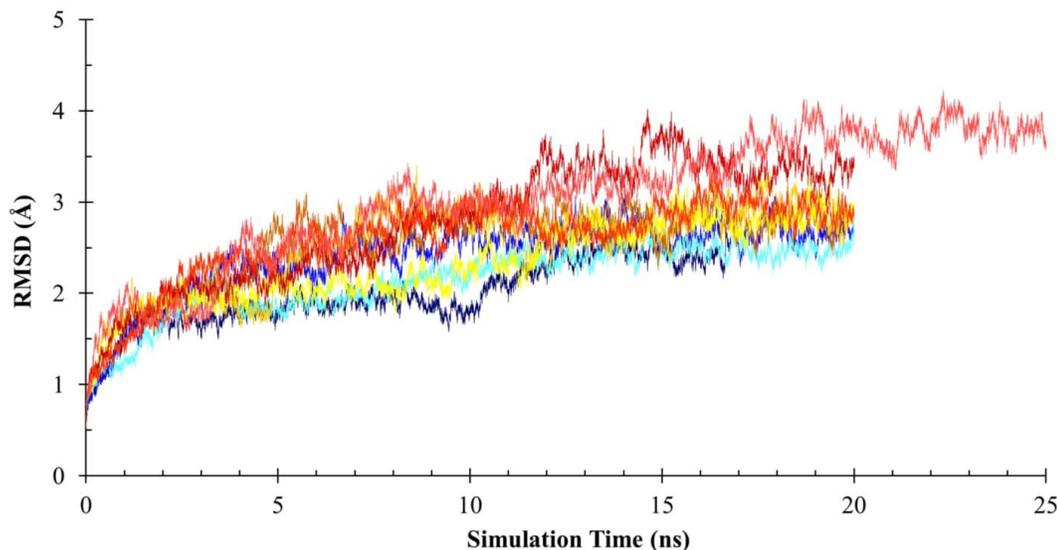


Fig. 2. Alpha carbon RMSD of molecular dynamics simulations of A71R mutant. Blue, yellow and red hues correspond to triplicated runs at 298.15, 323.15 and 348.15 K, respectively. Equivalent figures for the rest of the mutants and the wildtype structures are included in the Supporting information as Figs. S2–S5. All runs were carried out at pH 7.0 and 0.15 mol L^{-1} of KCl.

code 1GSK. Also, we used the crystallographic structure of wt β glu reported in the PDB (code 2O9P) and modeled its thermostable H62R mutant. The simulations on all 17 structures (14 mutants and 3 wt references, Table 1) required up to 10 ns to reach stability, and most of our runs were 20 ns long. All runs were carried out at pH 7.0 with an ionic strength of KCl 0.15 mol L^{-1} . Fig. 2 shows a typical RMSD evolution on time of alpha carbons for the nine runs of A71R mutant of *T. versicolor* laccase, it shows the typical process to attain thermal equilibrium of the system. The equivalent figures for wild-type species and the rest of the mutant structures are included as Supporting information (Supplementary Figs. S2–S5). To allow for proper equilibration and to test the steadiness of simulations, some MD simulations were allowed to run more than 20 ns, finding a stable behavior. The entire set of 153 MD runs sums more than $3.1 \mu\text{s}$ of MD simulation. To be consistent in the data collection from the runs, in all cases only the last 5 ns of simulation were used for further analysis, comprising 5000 snapshots at 1 ps intervals for each simulation. Remarkably, the intensity of RMSD fluctuations during simulations, like those shown for A71R in Fig. 2, were somewhat higher than we expected, and also higher than those obtained for wt β glu and also for its H62R mutant. This behavior was consistent with the runs for all laccase mutants (108 in total), but in our experience, it is worth analyzing its origin as indicative of structural information [59]. We compared the amplitude of RMSD and fluctuations in the equilibrium region of the DM with the equivalent reported for other systems (dimeric or multimeric proteins) and laccases simulations [4,60]. Since laccase is structurally organized in packed domains, it is expected that its RMSD values approach those from the relative movement of chains in multimeric proteins [61–64]. Since we did not use fixed copper atoms but used a tethering scheme by COLVAR (see Methods) we diagnosed a less packed structure in the internal interdomain region of the laccase structure, attributed to higher fluctuation in simulations of this enzyme, both from *T. versicolor* and *B. subtilis* and from other previously published MD simulations of laccases [4,60]. Noteworthy, this comparative analysis of MD trajectories gave us indirect confidence in the equilibrium conditions of the runs analyzed in this work.

To further validate that our results correspond to a reasonable description of the molecular system, we compared the RMS-fluctuations at three different temperatures for each amino acid of wt7y, averaged in three independent replicas, with the experimental B-factor in 1GYC (Fig. 3). Also, we submitted all laccase mutants to the Elastic Network Model, as implemented in eNémo server (<http://www.sciences.univ-nantes.fr/elnemo>) [65], to have an independent estimation of the local chain flexibility as predicted B-factor (Fig. S6). We found a satisfactory qualitative correlation between data from computational and experimental sources and our simulation, at the three simulated temperatures. We also observed repeatability in our results; and as expected, higher fluctuations were observed with higher temperature. It is evident from this figure that the first two domains have most of the highest fluctuating regions, which occur mainly in loop regions connecting secondary structure elements. Most of the potential stabilizing interactions are located precisely between these two domains. Also, it can be seen that copper ions are located in relatively rigid segments.

3.3. Salt-bridge stabilization

With the aim of estimating the effect of mutations, MM/PBSA energy was calculated for each of the 5000 snapshots collected during the last 5 ns of the simulations (Fig. 4). This procedure was also performed for each of the three replicas in each of the runs. All traces in Fig. 4 show fluctuations around a constant value, although they did not reach precisely the same average energy value, as a consequence of the random assignment of velocities inherent to MD simulations. This is a typical result of MD indices when replicas of the same molecular system and simulation parameters are performed as has been previously described [30,66]. However, MM/PBSA energies for A71R at 348.15 K (red hues in Fig. 4) tend to be higher than those from simulations at 298.15 K (blue hues) with intermediate values for the middle temperature. This comparative result is similar in all simulations for wt and mutant species and shows that during simulations at higher temperatures interactions are somewhat weaker than at lower temperature, due to a broader structural fluctuation. To compare the structural stability of mutants respect to

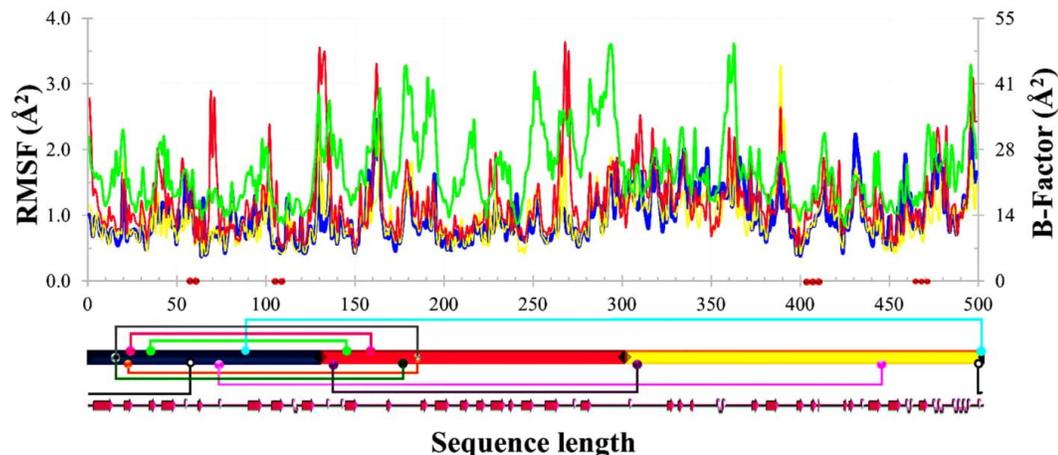


Fig. 3. Local fluctuation of wtTv during MD simulations. Comparisons of RMS fluctuations in simulations to B-factors from crystallized laccase (green line) are represented for the three runs averaged at 298.15 (blue), 323.15 (yellow) and 348.15 K (red). Residues interacting with copper ions are shown on the x axis with a brown circle. The extent of domains A, B and C are indicated with the bar in blue, red and yellow, respectively. Along with this bar, color lines describe the studied salt bridge interactions, with the same color code of Table 1 and Fig. 1. At the bottom, secondary structure elements along the wtTv sequence are shown: beta strands with magenta arrows and helices in white. An equivalent comparison of our MD simulations to fluctuations calculated by eINémo is shown in Fig. S6 of Supplementary data.

wildtype, the set of 15,000 energy values from each triplicate of MD simulations was averaged at each temperature, and the average from the respective wildtype MD runs was subtracted (i.e., wtTv, and also wtBs and wtβglu for the positive controls). Energy differences are presented in Fig. 5 for the ten different mutants and for the positive and negative controls (Table S5). Negative values denote a stabilized structure with respect to the wt reference, while positive results indicate that the mutation affected its molecular environment in a destabilizing way. As expected for positive control, wtβglu and wtBs are stabilized by H62R, E188K, and E188R mutations respectively. On the other hand, the E142A negative control for laccase is destabilized. Interestingly mutations of wtTv show a variety of behaviors. Several of the salt bridges demonstrated were destabilizing, and most mutations incorporating arginine residues were the most promising to confer thermostabilization.

Further analysis of these results showed that averaging data from three different runs might mask some of the effects, such as fluctuation of data and divergence between runs presented in Fig. 4. Also, averaged data in Fig. 5 for 323.15 K (yellow points) are not intermediate respect to the extreme temperatures. Results from these two figures encouraged us to find a different mode of data analysis. Exploring details of the snapshots obtained during the runs, and comparing mutant to wildtype conformations, made evident that some common structural characteristics were repeatedly visited during simulations. To gather and classify such structural features, the set of structures collected during each replica of MD simulations was submitted to a clustering algorithm. The wtTv, wtBs laccases and β-glucosidase are composed of 7495, 8090 and 7052 atoms (N), respectively, about half of them are hydrogen atoms restricted by the SHAKE algorithm, so during dynamics simulations,

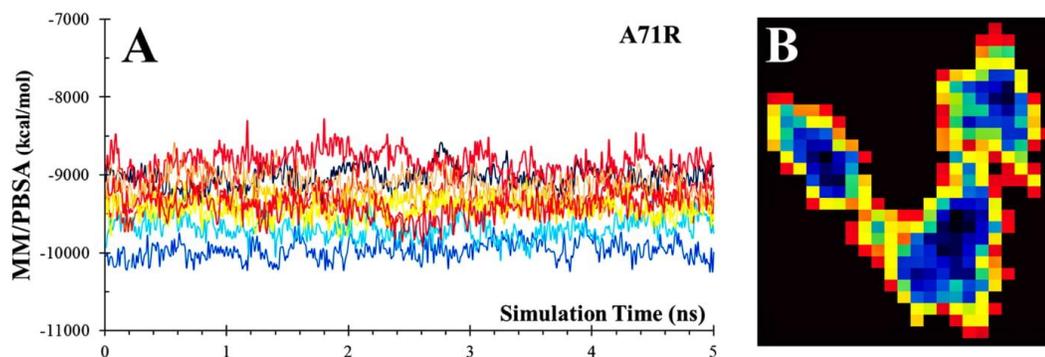


Fig. 4. A. Time evolution of electrostatic energy for the A71R mutant. Blue, yellow and red hues correspond to the three replicas of runs at 298.15, 323.15 and 348.15 K, respectively, as in Fig. 2. Equivalent figures for the rest of the structures are included in the Supporting information (Fig. S7–S10). Although energies are calculated with respect to an arbitrary reference state, this state becomes irrelevant when canceled by subtraction of wt to a mutant structure. B. Example of clustering of one of the runs of A71R. Vertical and horizontal axes are the two most significant principal-components, determined from structural characteristics of the 5000 snapshots taken from one of the three MD simulations for this mutant. Dark blue colors represent the higher population of structures. In this case, the set of snapshots was classified into three main groups of similar structures, or clusters.

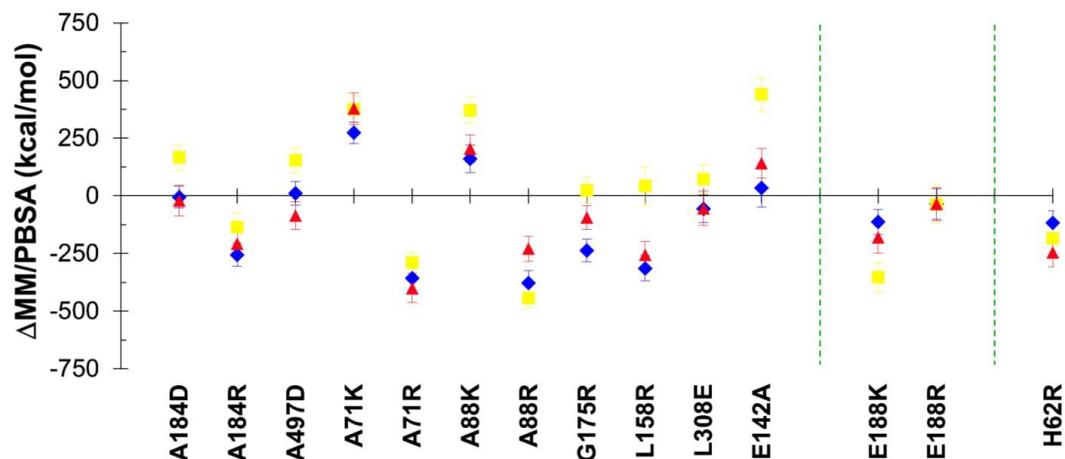


Fig. 5. Stabilizing effect of mutants. Average energy from simulations of mutants with respect to the average energy from their corresponding wildtype structure. Each mutation is represented at the three temperatures studied 298.15 (blue), 323.15 (yellow) and 348.15 K (red), and includes snapshot averages over the three replicas of MD simulations. E142A corresponds to a negative control on wtTv. E188K and E188R correspond to positive controls on wtBs, and H62R to a positive control of wt β glu.

only half of the atoms of the proteins were actually free to move independently. The 3 (N/2) degrees of structural freedom were transformed by a principal components analysis, and the two most representative abstract eigenvectors (or abstract principal components) were used to classify the similar structures from each of the 153 runs, into typically two or three clusters (Fig. 4B). Therefore, each cluster is formed by a set of similar structures from an MD simulation with significant divergences to those in other clusters of the same run. An archetypal structure for every cluster is selected, representing all the structures of that set. Then the energy and conformation of all archetypes of mutant clusters were compared to each one from its wildtype clusters. Differences in energy between mutant and wildtype archetypal structures, as well as the RMSD between them, are plotted in Fig. 6, at the three different temperatures assayed (filled points). Each of these points is the comparison between the representative structure of a cluster for a mutant and that of a cluster from its corresponding wildtype structure.

3.4. Mutant structures are similar to their wt

From the complex set of data collected at 298.15 K shown in Fig. 6A we can identify the yellow points corresponding to the positive control of H62R mutant of β -glucosidase respect to wt β glu. They segregate at the lower left zone of the diagram, (low RMSD values) meaning that mutation in this enzyme stabilized the structure (as reported experimentally) and did not cause significant changes in its structure. Regarding the other positive controls, clusters from E188K, E188R mutants of Bs-laccase were compared to those of wtBs. The E188K and E188R clusters have a behavior similar to H62R mutation; the points corresponding to the two Bs-laccase mutants are located mainly in the negative energy zone, too. However, the structure of Lys mutant shows an RMSD closer to wild-type enzyme compared to Arg mutant. The positions of E188K, E188R, and H62R in the negative energy zone signify that mutations stabilized the structures of wtBs and wt β glu respectively, as expected for positive control. The negative control points (green) are located mainly at right, as a result of a significant structural perturbation caused by the mutation. Its position above the zero energy line is a consequence of the loss of a salt bridge, thus destabilizing the structure. The average RMSD values are 1.46, 1.53, 1.31 and 1.69 Å for

H62R, E188R, E188K, and E142A controls at 298 K, respectively; while differences in energy are $-154 (\pm 105)$, $-144 (\pm 124)$, $-253 (\pm 93)$ and $+47 (\pm 61)$ kcal/mol, for positive controls and negative controls. Although Lys mutant of wtBs have a stabilizing behavior, it is of lower magnitude than in the Arg mutant. The rest of the filled points corresponds to cluster-comparison results from the remaining 10 Ty-laccase mutants. Cluster data collation in Fig. 6 is accessible on Table S6. Blue points are closer to the yellow ones showing a stabilizing behavior for most of the mutants introducing an arginine residue. In contrast, cyan points are nearer the negative control indicating that lysine is not stabilizing the structure. Red points correspond to mutants introducing acid side chains, and show intermediate positions. The right panel presents the averages calculated from all the points of the same mutant, representing an alternative view of the same relative distribution. It is interesting to note that some of the charged residues introduced in wtTv laccase resulted in destabilizing salt bridges. This type of destabilizing charged residue has been reported for other laccase mutants, for example replacing an aspartate side chain for a proline promotes stabilization of the structure [67].

3.5. Basic residues in wtTv

We designed two pairs of mutants where an arginine or a lysine is inserted in the same position: one pair is A71R and A71K, and the other is A88R and A88K. Although arginine is slightly larger than lysine, the distance from the alpha carbon to the center of the positive electric charge is almost the same. Nevertheless, strong divergences were aroused in the stabilizing effect in each pair. This is graphically seen in Fig. 6A where mutants with arginine residues (blue) are systematically situated in lower energy regions than mutants where lysine was inserted (cyan). This same behavior is observed at the three temperatures studied. Arginine side chains showed a higher probability of stabilizing electrostatic-interactions than lysine during the MD simulation. Comparative analysis of cluster-representing structures from MD simulations demonstrates that the distance to the partner in the salt bridge is smaller than in the case of arginine than in lysine and shows lower fluctuations (Fig. 7). Although the same formal charges are involved in each of these salt bridges, it has been experimentally demonstrated by mass spectrometry that charge density is a significant factor for domain

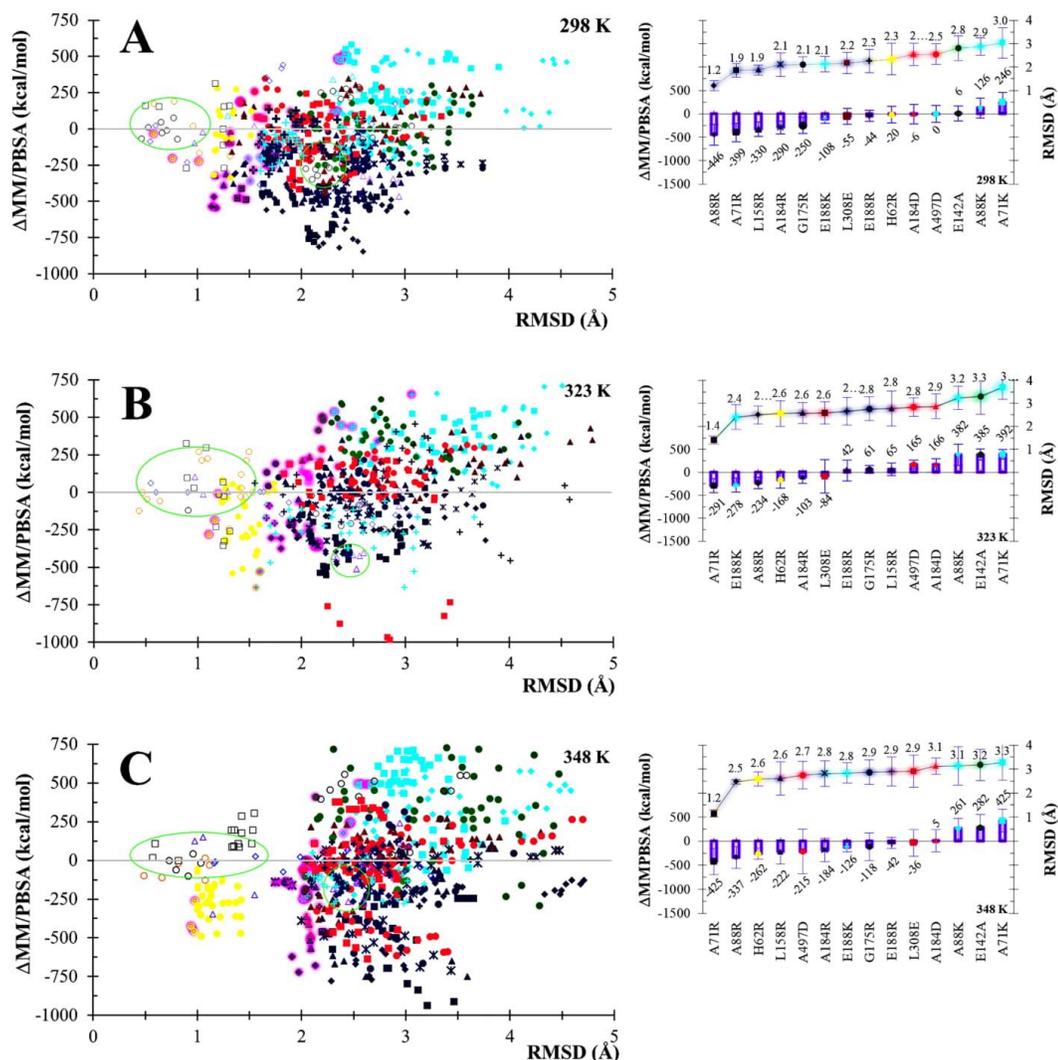


Fig. 6. Energetic and structural comparison of clusters. Left. Each point corresponds to a comparison between the archetypal structure of a cluster from a mutant and one of its corresponding wild-type structures. The vertical axis is the energy difference between the representative structures of the pair of clusters compared, while the horizontal axis is their structural difference expressed as RMSD. Each color stands for one type of residues incorporated by single mutation to form a salt bridge: arginine (blue), aspartic or glutamic acid (red), lysine (cyan). Positive and negative controls are shown in yellow and green respectively. Shadowed points are the three leftmost comparisons for each mutant (lowest RMSD, the most similar mutant to wt structures) and they are shown isolated in Fig. 8. Also, empty points represent comparisons between clusters but respect to others of the same mutant instead of comparing to wildtype clusters (see text). Right. Energy and structural differences for each mutant were averaged from data shown at left. Error bars correspond to one standard deviation from the mean. From top to bottom, the results display runs at A) 298.15, B) 323.15 and C) 348.15 K, respectively.

or subunit dissociation [68]. This report is in clear agreement with our comparative results between the punctual charge of the amino group of the lysine side chain and the resonant dispersed charge in the guanidinium group in arginine. Water seems to compete for the electric charge more in lysine than in arginine (Supplementary Fig. S11). Our MD simulations also show that surface arginine side-chains are better contributors to stability. This differential behavior has been reported

before in experimental studies where arginine residues are preferred [67]. Also, genomic studies have demonstrated that salt bridges formed with arginine are preferred in most cases to generate thermostable enzymes [69]. Nevertheless, there are also some reports where the introduction of a lysine residue in a specific site of laccase is better than arginine in the same position [69–73], so generalization has some exceptions.

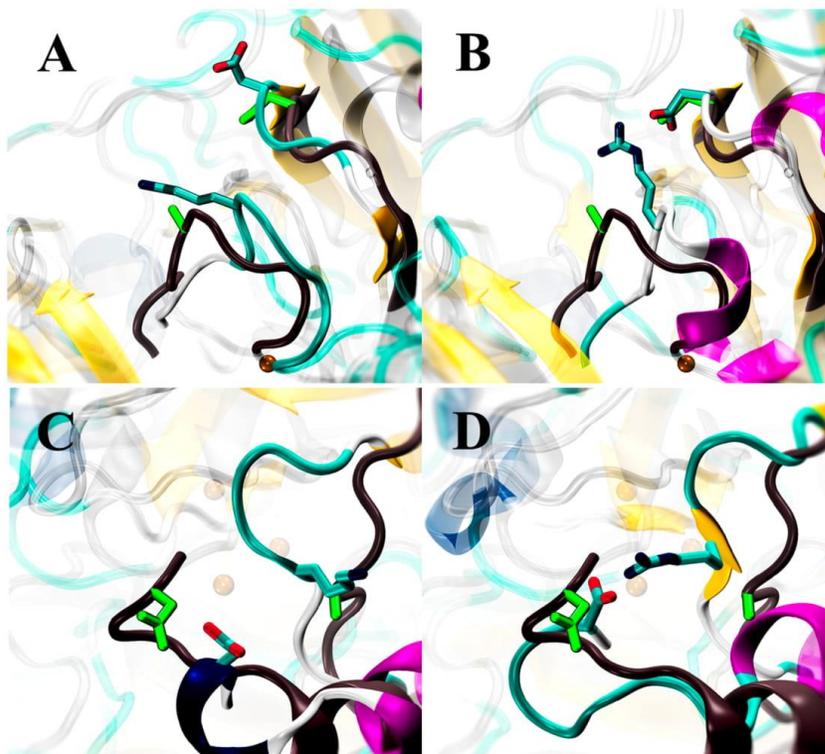


Fig. 7. Arginine compared to lysine in the same salt bridge. A. A71K mutant compared to wildtype structure from representative clusters of MD simulations. B. A71R mutant also compared to its wildtype structure. Distances (averaged on archetypal structures of each cluster) between positive and negative formal charges are 9.1 ± 1.0 and 3.8 ± 0.3 Å, respectively. Ribbons in each panel represent the backbone of mutant (blue) and wildtype (black) structures; green side chains correspond to wildtype. C and D. Comparison of A88K and A88R, similar to those of panel A. Distances between formal charges are in this case 9.4 ± 1.0 for lysine and 4.3 ± 0.2 Å for arginine respectively.

3.6. Comparison of the same structures in wtTv

As another internal validation of our MD data, each cluster for a particular structure (mutant or wildtype) was compared against the rest of the clusters for the same structure. In Fig. 6 left, these data are presented as empty points. For the sake of simplicity, only data from both wildtype structures and H62R, A88R and A88K mutants are shown, but they are representative of behaviors of the whole set of comparisons. The set of empty points at energy-difference values near to zero circled at the left of Fig. 6, corresponding to the cluster comparison of a structure with respect to the rest of the clusters of the same MD run. As expected, all cluster-representative structures compared are similar, as is reflected by low RMSD values. The energy differences are small when compared to the rest of the points in the picture, meaning that no strong fluctuations are found inside the same MD run, in agreement with data from Fig. 4. Other empty points can be found dispersed in the graph, where they also correspond to cluster comparisons of the same wt or mutant structure but in this case from different MD runs. For example, those circled in the middle of the graph. Again, energies are typically low respect to mutant-wt comparisons (filled points) but somewhat higher than those from the same MD run. The same result is found with their RMSD values, since variability in the structure is a consequence of different seeds and initial velocities in each triplicate simulation, which makes each simulation unique. During the length of the simulations, each run visits different nearby parts of the conformational space. The use of clustering allows identifying

representative or archetypal structures for each region of the conformational space and reduces noise from structural and energetic fluctuations inside the cluster. From the analysis of all these empty- and filled-points in Fig. 6 we can state that despite fluctuations in an MD simulation run, or among their triplicates, differences in energy between mutant and wildtype structures are higher and thus significant. Moreover, structural divergence caused by mutations is moderate or similar to that observed for clusters from the same species, except for points above 3 Å, where no empty symbols are found. These latter points correspond to the significant effect of the disruption of a salt bridge in the negative control (green) and for most of the salt bridges introduced with lysine side chains (cyan).

3.7. Effect of temperature

When these scatter diagrams (Fig. 6) are compared at the three different temperatures studied in the MD runs, a similar grouping of data is obtained. This qualitative similarity concedes high robustness to our methodology since each temperature corresponds to independent simulations of 14 mutants ran by triplicate and 3 wildtype structures (two laccases and one β -glucosidase) also ran three times. Again, the snapshots of the last 5 ns of every mutant runs were clustered and compared respect to wildtype clusters. Averaged RMSD values increase with temperature, while energy tends to be less positive (more stabilizing) in agreement with the proposals of Jelesarov et al. [71].

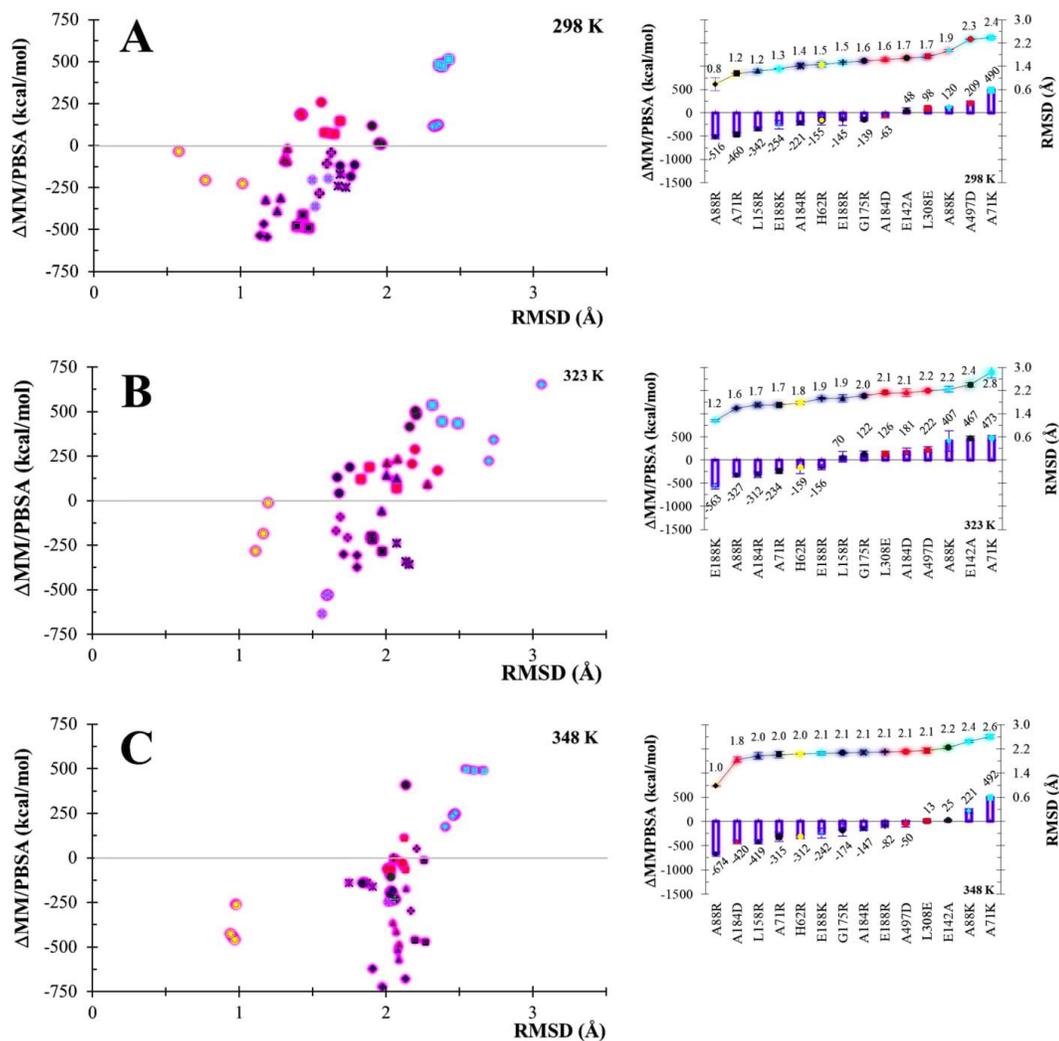


Fig. 8. Comparison of clusters of mutants most structurally similar to their wildtype. Only the three points with the lowest RMS from each mutant-wt comparison are shown. Averages at right were recalculated for the reduced set of points.

3.8. Structurally similar clusters

Fig. 8 presents a data subset of Fig. 6 showing only the mutant clusters with structures more similar to those of their wild-type (subset data collection is available in the Supplementary Table S7). This means that from comparisons of every cluster of each mutant respect to all their wildtype clusters, only the three with the lowest RMS values are presented (leftmost of the whole set of mutant-wildtype clusters). The rationale is to study mutant-wt differences only from the most similar conformations, thus filtering energy differences arising from structural divergence generated during MD simulations. Here the scattering distribution is more evident, showing the points corresponding to the introduced lysine-sidechains even more structurally disturbing and energetically destabilizing than the negative control. Averages at the right of this figure correspond only to the points shown at left. Again the

pattern is qualitatively maintained at the three studied temperatures, with higher RMSD values and more negative energies as the temperature increases. Interestingly, the three salt bridges introduced with an acid residue (red) show a neutral or slightly disruptive effect both in energy and in structure, with intermediate positions in diagrams of Figs. 6 and 8 respect to arginine and lysine mutants.

4. Conclusions

Laccase was a good test case in the search for stability determinants due to its modular structure composed of three relatively stable domains. They are associated to form the active structure, with three out of four copper ions in the interdomain regions. These characteristics allowed us to propose and test the stabilizing effect of interdomain salt bridges. The laccase viewed in this modular form is an excellent model

to approach the understanding of the quaternary structural stabilization.

The methodology proposed here showed to be precise to detect and locate positive and negative controls in extreme positions as shown in Figs. 6 and 8. Also, the procedure demonstrated was robust, since triplicated runs yielded consistent results, as well as the independent simulations, ran at three different temperatures.

Concerning laccase, it is interesting to note that it is possible to stabilize its structure with a single mutation forming an interdomain salt bridge, as the cases of A71R or A88R. However, not every interdomain salt bridge succeeded to stabilize the structure. Interestingly, mutations in the same site but introducing a different basic side chain, lysine instead of arginine, showed an opposed effect on stability in wtTv, as discussed in other reports of experimental and theoretical studies [73]. On the other hand, we determined that energy estimations form simple Coulombic electrostatics model is not sufficient to analyze the salt bridge effects. We found that models like PBSA are required for proper electrostatic energy estimation.

Molecular dynamics simulations are a powerful tool for structural studies, like in the study of introducing potential stabilizing contacts. Nevertheless, geometrical fluctuations intrinsic to this technique may mask some comparative analyses like those of a single mutant with respect to its wildtype structure. To surpass this inconvenience, structure classification by clustering proved to be a plausible solution to filter fluctuations from some outlier snapshots and to assemble sets of similar conformers. We did not include in our calculations any entropic estimation from single mutant structures with respect to their wt structures. These estimations augment the dispersion of results and are small enough (about 10–20 kcal/mol) to be disregarded. Also, care must be taken when analyzing multiple mutant systems or small proteins, since a significant change in the number of atoms between mutant and wt structures might introduce considerable errors.

In this work, we proposed and evaluated different interdomain salt bridges designed with the aim to stabilize the structure of *T. versicolor* laccase. A computational protocol of MD simulations was generated and tested by triplicate runs and at three different temperatures. Comparison of results between mutants and their corresponding wildtype structures revealed a diversity of effects in the set of 10 mutants proposed, two of them consistently demonstrated to be stabilizing. It was clear that the Poisson-Boltzmann estimation of electrostatics is preferred over Coulombic models for the utility of clustering for the internal classification of structures in an MD simulation run. Our work not only proposes some thermostable mutants of wtTv, but presents a methodology developed that can be employed to further explore the effect on the stability of new single or multiple mutants in laccases from different species, and the additive or synergic effects of the interaction of mutations inside a structure. Also, it can be used in other multi-domain enzymes and even to be extrapolated to explore stabilization between chains constituting oligomeric biomolecules.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the computing time granted by LANCAD and CONACyT on the supercomputer Yolita at LSPV UAM-Iztapalapa. We wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) and Programa para el Desarrollo Profesional Docente para el Tipo Superior (PRODEP, SEP) for supporting this research and providing graduate scholarships.

Conflict of interest statement

The authors report no conflicts of interest in this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2018.10.019>.

References

- [1] X.X. Zhou, Y.B. Wang, Y.J. Pan, W.F. Li, Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins, *Amino Acids* 34 (2008) 25–33, <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0589-x>.
- [2] C. Vieille, G.J. Zeikus, Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65 (2001) 1–43, <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001>.
- [3] J. Chen, W.E. Stites, Packing is a key selection factor in the evolution of protein hydrophobic cores, *Biochemistry* 40 (2001) 15280–15289, <https://doi.org/10.1021/bi011776v>.
- [4] N.J. Christensen, K.P. Kepp, Stability mechanisms of a thermophilic laccase probed by molecular dynamics, *PLoS One* 8 (2013) e61985, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061985>.
- [5] I. Matsui, K. Harata, Implication for buried polar contacts and ion pairs in hyperthermostable enzymes, *FEBS J.* 274 (2007) 4012–4022, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05956.x>.
- [6] W.F. Li, X.X. Zhou, P. Lu, Structural features of thermozymes, *Biotechnol. Adv.* 23 (2005) 271–281, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.002>.
- [7] S. Radestock, H. Gohlke, Protein rigidity and thermophilic adaptation, *Proteins* 79 (2011) 1089–1108, <https://doi.org/10.1002/prot.22946>.
- [8] P.C. Rathi, S. Radestock, H. Gohlke, Thermostabilizing mutations preferentially occur at structural weak spots with a high mutation ratio, *J. Biotechnol.* 159 (2012) 135–144, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.01.027>.
- [9] B. Sohini, S. Srikanta, Turning a mesophilic protein into a thermophilic one: a computational approach based on 3D structural features, *J. Chem. Inf. Model.* 49 (2009) 1741–1750, <https://doi.org/10.1021/ci900183m>.
- [10] S. Kumar, R. Nussinov, How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell Mol. Life Sci* 58 (2001) 1216–1233, <https://doi.org/10.1007/PL00000935>.
- [11] J.H. Missimer, M.O. Steinmetz, R. Baron, F.K. Winkler, R.A. Kammerer, X. Daura, W.F. van Gunsteren, Configurational entropy elucidates the role of salt-bridge networks in protein thermostability, *Protein Sci.* 16 (2007) 1349–1359, <https://doi.org/10.1110/ps.062542907>.
- [12] A.V. Gribenko, M.M. Patel, J. Liu, S.A. McCallum, C. Wang, G.I. Makhatadze, Rational stabilization of enzymes by computational redesign of surface charge-charge interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 2601–2606, <https://doi.org/10.1073/pnas.0808220106>.
- [13] X. Huang, D. Gao, C.G. Zhan, Computational design of a thermostable mutant of cocaine esterase via molecular dynamics simulations, *Org. Biomol. Chem.* 9 (2011) 4138–4143, <https://doi.org/10.1039/c0ob00972e>.
- [14] M.G. Pikkemaat, A.B. Linssen, H.J. Berendsen, D.B. Janssen, Molecular dynamics simulations as a tool for improving protein stability, *Protein Eng.* 15 (2002) 185–192, <https://doi.org/10.1093/protein/15.3.185>.
- [15] C. Strub, C. Alies, A. Lougarre, C. Ladurantje, J. Czapllicki, D. Fournier, Mutation of exposed hydrophobic amino acids to arginine to increase protein stability, *BMC Biochem.* 5 (2004) 9, <https://doi.org/10.1186/1471-2091-5-9>.
- [16] H.R. Bosshard, D.N. Marti, I. Jelesarov, Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings, *J. Mol. Recognit.* 17 (1) (2004) 1–16, <https://doi.org/10.1002/jmr.657>.
- [17] I. Jelesarov, A. Karshikoff, Defining the role of salt bridges in protein stability, *Methods Mol. Biol.* 490 (2009) 227–260, https://doi.org/10.1007/978-1-59745-367-7_10.
- [18] P. Strop, S.L. Mayo, Contribution of surface salt bridges to protein stability, *Biochemistry* 39 (2000) 1251–1255, <https://doi.org/10.1021/bi992257j>.
- [19] L. Zhang, M. Buck, Molecular simulations of a dynamic protein complex: role of salt-bridges and polar interactions in configurational transitions, *Biophys. J.* 105 (2013) 2412–2417, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.09.052>.
- [20] P. Upadhyay, R. Shrivastava, P.K. Agrawal, Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase, *3 Biotech* 6 (1) (2016) 15, <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0316-3>.
- [21] E.N. Prasetyo, S. Semlitsch, G.S. Nyanhongo, Y. Lemmouchi, G.M. Guebitz, Laccase oxidation and removal of toxicants released during combustion processes, *Chemosphere* 144 (2016) 652–660, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.082>.
- [22] D.M. Mate, M. Alcalde, Laccase engineering: from rational design to directed evolution, *Biotechnol. Adv.* 33 (1) (2015) 25–40, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.007>.
- [23] T. Kudanga, G.S. Nyanhongo, G.M. Guebitz, S. Burton, Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review, *Enzyme Microb. Technol.* 48 (3) (2011) 195–208, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.007>.
- [24] L.I. Ramírez-Cavazos, C. Junghanns, N. Ornelas-Soto, D.I. Cárdenas-Chávez, C. Hernández-Luna, P. Demarche, E. Enaud, R. García-Morales, S.N. Agathos, R. Parra, 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 (2014) 32–42, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.06.006>.
- [25] J. Polak, A. Jarosz-Wilkolazka, K. Szalapatka, M. Graz, M. Osińska-Jaroszuk, Laccase-mediated synthesis of a phenoxazine compound with antioxidative and dyeing properties—the optimisation process, *N. Biotechnol.* 33 (2016) 255–262, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.09.004>.
- [26] K. Nakamura, T. Kawabata, K. Yura, N. Go, Novel types of two-domain multi-copper oxidases: possible missing links in the evolution, *FEBS Lett.* 553 (2003) 239–244,

- [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01000-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01000-7).
- [27] L.G. Rydén, L.T. Hunt, Evolution of protein complexity: the blue copper-containing oxidases and related proteins, *J. Mol. Evol.* 36 (1993) 41–66, <https://doi.org/10.1007/BF02407305>.
- [28] J. Correa-Basurto, M. Bello, M.C. Rosales-Hernández, M. Hernández-Rodríguez, I. Nicolás-Vázquez, A. Rojo-Domínguez, J.G. Trujillo-Ferrara, R. Miranda, C.A. Flores-Sandoval, QSAR, docking, dynamic simulation and quantum mechanics studies to explore the recognition properties of cholinesterase binding sites, *Chem. Biol. Interact.* 209 (2014) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.12.001>.
- [29] Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2017, <http://www.chemcomp.com>.
- [30] B. Webb, A. Sali, Comparative protein structure modeling using modeller, *Curr. Protocols Bioinf.* 54 (2014) 5.6.1–5.6.37, <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>.
- [31] T.A. de Beer, K. Berka, J.M. Thornton, R.A. Laskowski, PDBsum additions, *Nucl. Acids Res.* 42 (2014) D292–D296, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt940>.
- [32] J.C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R.D. Skeel, L. Kalé, K. Schulten, Scalable molecular dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1781–1802, <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.
- [33] A.D. MacKerell Jr., D. Bashford, M. Bellott, R.L. Dunbrack Jr., J.D. Evanseck, M.J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczyka, F.T.K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D.T. Nguyen, B. Prodhom, W.E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkerich, J.C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin, M. Karplus, All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 3586–3616, <https://doi.org/10.1021/jp973084f>.
- [34] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, A. DiNola, J.R. Haak, Molecular-dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684–3690, <https://doi.org/10.1063/1.448118>.
- [35] S. Jo, T. Kim, V.G. Iyer, W. Im, CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM, *J. Comput. Chem.* 29 (2008) 1859–1865, <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
- [36] S. Haider, G.N. Parkinson, S. Neidle, Molecular dynamics and principal components analysis of human telomeric quadruplex multimers, *Biophys. J.* 95 (1) (2008) 296–311, <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120501>.
- [37] Y. Niu, D. Pan, D. Shi, Q. Bai, H. Liu, X. Yao, Influence of chirality of Crizotinib on its MTH1 protein inhibitory activity: insight from molecular dynamics simulations and binding free energy calculations, *PLoS One* 10 (12) (2015) e0145219, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145219>.
- [38] R. Krishnan, E.B. Walton, K.J. Van Vliet, Characterizing rare-event property distributions via replicate molecular dynamics simulations of proteins, *J. Mol. Model.* 15 (2009) 1383–1389, <https://doi.org/10.1007/s00894-009-0504-3>.
- [39] F. Fogolari, E. Moroni, M. Wojciechowski, M. Baginski, L. Ragona, H. Molinari, MM/PBSA analysis of molecular dynamics simulations of bovine-lactoglobulin: free energy gradients in conformational transitions? *Proteins* 59 (2005) 91–103, <https://doi.org/10.1002/prot.20384>.
- [40] V.S. Pande, A.Y. Grosberg, T. Tanaka, Statistical mechanics of simple models of protein folding and design, *Biophys. J.* 73 (1997) 3192–3210, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78345-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78345-0).
- [41] D. Sitkoff, K.A. Sharp, B. Honig, Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models, *J. Phys. Chem. A* 98 (1994) 1978–1988, <https://doi.org/10.1021/j100058a043>.
- [42] T. Hou, J. Wang, Y. Li, W. Wang, Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods: I. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations, *J. Chem. Inf. Model.* 51 (2011) 69–82, <https://doi.org/10.1021/ci100275a>.
- [43] B. Kuhn, P.A. Kollman, Binding of a diverse set of ligands to avidin and streptavidin: an accurate quantitative prediction of their relative affinities by a combination of molecular mechanics and continuum solvent models, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 3786–3791, <https://doi.org/10.1021/jm000241h>.
- [44] Y. Liu, J. Strümpfer, P.L. Freddolino, M. Gruebele, K. Schulten, Structural characterization of λ -repressor folding from all-atom molecular dynamics simulations, *J. Phys. Chem. Lett.* 3 (2012) 1117–1123, <https://doi.org/10.1021/jz300017c>.
- [45] J.C. Jose, P. Chatterjee, N. Sengupta, Cross dimerization of amyloid- β and α -synuclein proteins in aqueous environment: a molecular dynamics simulation study, *PLoS One* 11 (9) (2014) e106883, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106883>.
- [46] N.M. Glykos, Software news and updates. Carma: a molecular dynamics analysis program, *J. Comput. Chem.* 27 (2006) 1765–1768, <https://doi.org/10.1002/jcc.20482>.
- [47] M.A. Balseira, W. Wriggers, Y. Oono, K. Schulten, Principal component analysis and long time protein dynamics, *J. Phys. Chem.* 100 (7) (1996) 2567–2572, <https://doi.org/10.1021/jp9536920>.
- [48] C.C. David, D.J. Jacobs, Principal component analysis: a method for determining the essential dynamics of proteins, *Methods Mol. Biol.* 1084 (2014) 193–226, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-658-0_11.
- [49] M. Mezei, Simulaid: a simulation facilitator and analysis program, *J. Comput. Chem.* 31 (2010) 2658–2668, <https://doi.org/10.1002/jcc.21551>.
- [50] W. Humphrey, A. Dalke, K.V.M.D. Schulten, Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33–38, [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- [51] G. Fiorin, M.L. Klein, J. Héning, Using collective variables to drive molecular dynamics simulations, *Mol. Phys.* 111 (22–23) (2013) 3345–3362, <https://doi.org/10.1080/00268976.2013.813594>.
- [52] L.W. Ungar, N.F. Scherer, G.A. Voth, Classical molecular dynamics simulation of the photoinduced electron transfer dynamics of plastocyanin, *Biophys. J.* 72 (1997) 5–17, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78642-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78642-9).
- [53] M. López, O. Loera, M. Guerrero-Olazarán, J.M. Viader-Salvadó, J.A. Gallegos-López, F.J. Fernández, E. Favela-Torres, G. Viniestra-González, Cell growth and *Trametes versicolor* laccase production in transformed *Pichia pastoris* cultured by solid-state or submerged fermentations, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85 (4) (2010) 435–440, <https://doi.org/10.1002/jctb.2306>.
- [54] I. Sillitoe, T.E. Lewis, A. Cuff, S. Das, P. Ashford, N.L. Dawson, N. Furnham, R.A. Laskowski, D. Lee, J.G. Lees, S. Lehtinen, R.A. Studer, J. Thornton, C.A. Orengo, CATH: comprehensive structural and functional annotations for genome sequences, *Nucl. Acids Res.* 43 (2015) D376–D381, <https://doi.org/10.1093/nar/gku947>.
- [55] F.J. Enguita, L.O. Martins, A.O. Henriques, M.A. Carrondo, Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 19416–19425, <https://doi.org/10.1074/jbc.M301251200>.
- [56] M. Camarillo-Cadena, G. Garza-Ramos, M. Peimbert, J. Polaina, G. Pérez-Hernandez, R.A. Zubillaga, Additive effect of single amino acid replacements on the kinetic stability of β -glucosidase B, *Protein J.* 31 (2012) 615–622, <https://doi.org/10.1007/s10930-012-9445-2>.
- [57] R.A. Zubillaga, E. García-Hernández, M. Camarillo-Cadena, M. León, J. Polaina, Effect of a new ionic pair on the unfolding activation barrier of beta-glucosidase B, *Protein Pept. Lett.* 13 (2) (2006) 113–118, <https://doi.org/10.2174/092986606775101698>.
- [58] N. Mollania, K. Khajeh, B. Ranjbar, S. Hosseinkhani, Enhancement of a bacterial laccase thermostability through directed mutagenesis of a surface loop, *Enzyme Microb. Technol.* 49 (5) (2011) 446–452, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.08.001>.
- [59] A. Hernandez-Flores, M.J. Almaraz-Barrera, D. Lozano-Amado, J. Correa-Basurto, A. Rojo-Domínguez, E. Luna-Rivera, M. Schnoor, N. Guillen, R. Hernandez-Rivas, M. Vargas, A new nucleocytoplasmic RhoGAP protein contributes to control the pathogenicity of *Entamoeba histolytica* by regulating EhRacC and EhRacD activity, *Cell Microbiol.* 18 (2016) 1653–1672, <https://doi.org/10.1111/cmi.12603>.
- [60] M. Bello, B. Valderrama, H. Serrano-Posada, E. Rudolfo-Piñera, Molecular dynamics of a thermostable multicopper oxidase from *Thermus thermophilus* HB27: structural differences between the apo and holo forms, *PLoS One* 7 (7) (2012) e40700, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040700>.
- [61] Y. Zhang, Y. Ding, Molecular dynamics simulation and bioinformatics study on chloroplast stromal ridge complex from rice (*Oryza sativa* L.), *BMC Bioinf.* 17 (2016) 28, <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0877-0>.
- [62] D.S. Kanibolotsky, O.V. Novosylna, C.M. Abbott, B.S. Negruskii, A.V. El'skaya, Multiple molecular dynamics simulation of the isoforms of human translation elongation factor 1A reveals reversible fluctuations between “open” and “closed” conformations and suggests specific for eEF1A1 affinity for Ca²⁺-calmodulin, *BMC Struct. Biol.* 8 (2008) 4, <https://doi.org/10.1186/1472-6807-8-4>.
- [63] L.M. Espinoza-Fonseca, D. Kast, D.D. Thomas, Molecular dynamics simulations reveal a disorder-to-order transition on phosphorylation of smooth muscle myosin, *Biophys. J.* 93 (6) (2007) 2083–2090, <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.095802>.
- [64] S. Soni, C. Tyagi, A. Grover, S.K. Goswami, Molecular modeling and molecular dynamics simulations based structural analysis of the SG2NA protein variants, *BMC Res. Notes* 7 (2014) 446, <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-446>.
- [65] K. Suhre, Y.H. Sanejouand, ElNemo: a normal mode web-server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement, *Nucl. Acids Res.* 32 (2004) W610–W614, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh368>.
- [66] T.J. Lane, D. Shukla, K.A. Beauchamp, V.S. Pande, To milliseconds and beyond: challenges in the simulation of protein folding, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23 (2013) 58–65, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.11.002>.
- [67] L. Huang, Y. Liu, X. Liu, L. Ban, Y. Wang, M. Li, F. Lu, Functional expression of *Trametes versicolor* thermotolerant laccase variant in *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Bioequip.* 30 (2016) 261–269, <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1134278>.
- [68] H. Zoc, H. Helena, A.M. Joseph, A.T. Sarah, V.R. Carol, The role of salt bridges, charge density, and subunit flexibility in determining disassembly routes of protein complexes, *Structure* 21 (2013) 1325–1337, <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.06.004>.
- [69] N.T. Mrabet, A. Van den Broeck, I. Van den Brande, P. Stanssens, Y. Laroche, A.M. Lambeir, G. Matthijssens, J. Jenkins, M. Chiadmi, H. van Tilbeurgh, F. Rey, J. Janin, W.J. Quax, I. Lasters, M. De Maeyer, S.J. Wodak, Arginine residues as stabilizing elements in proteins, *Biochemistry* 31 (1992) 2239–2253, <https://doi.org/10.1021/bi00123a005>.
- [70] M. Matsutani, H. Hirakawa, M. Nishikura, W. Soemphol, I.A. Ali, T. Yakushi, K. Matsushita, Increased number of Arginine-based salt bridges contributes to the thermotolerance of thermotolerant acetic acid bacteria, *Acetobacter tropicalis* SKU1100, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409 (1) (2011) 120–124, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.126>.
- [71] I. Jelasarov, A. Karshikoff, Defining the role of salt bridges in protein stability, *Methods Mol. Biol.* 490 (2009) 227–260, https://doi.org/10.1007/978-1-59745-367-7_10.
- [72] J. Polak, A. Jarosz-Wilkolazka, Structure/redox potential relationship of simple organic compounds as potential precursors of dyes for laccase-mediated transformation, *Biotechnol. Prog.* 28 (1) (2012) 93–102, <https://doi.org/10.1002/btpr.713>.
- [73] S. Sokalingam, G. Raghunathan, N. Soundarajan, A study on the effect of surface lysine to arginine mutagenesis on protein stability and structure using green fluorescent protein, *PLoS One* 7 (7) (2012) e40410, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040410>.



In silico Design of Laccase Thermostable Mutants From Lacc 6 of *Pleurotus Ostreatus*

Rubén Díaz^{1*}, Gerardo Díaz-Godínez¹, Miguel Angel Anducho-Reyes²,
Yuridia Mercado-Flores² and Leonardo David Herrera-Zúñiga^{3,4*}

¹ Laboratory of Biotechnology, Research Center for Biological Sciences, Autonomous University of Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico, ² Agrobiotechnology Laboratory, Polytechnic University of Pachuca, Hidalgo, Mexico, ³ Division of Environmental Engineering Technology of Higher Studies of East Mexico State, Mexico City, Mexico, ⁴ Area of Biophysical Chemistry, Department of Chemistry, Metropolitan Autonomous University-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Zofia Piotrowska-Seget,
University of Silesia of Katowice,
Poland

Reviewed by:

Mirosława Slaba,
University of Lodz, Poland
Guiying Li,
Guangdong University of Technology,
China
Zhen Gao,
Nanjing Tech University, China

*Correspondence:

Rubén Díaz
rdiazgod@hotmail.com
Leonardo David Herrera-Zúñiga
ldhz04@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Microbiotechnology, Ecotoxicology
and Bioremediation,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 26 July 2018

Accepted: 26 October 2018

Published: 14 November 2018

Citation:

Díaz R, Díaz-Godínez G,
Anducho-Reyes MA,
Mercado-Flores Y and
Herrera-Zúñiga LD (2018) In silico
Design of Laccase Thermostable
Mutants From Lacc 6 of *Pleurotus*
Ostreatus. *Front. Microbiol.* 9:2743.
doi: 10.3389/fmicb.2018.02743

Fungal laccase enzymes have a great biotechnological potential for bioremediation processes due to their ability to degrade compounds such as p -diphenol, aminophenols, polyphenols, polyamines, and aryldiamines. These enzymes have activity at different pH and temperature values, however, high temperatures can cause partial or total loss of enzymatic activity, so it is appropriate to do research to modify their secondary and/or tertiary structure to make them more resistant to extreme temperature conditions. *In silico*, a structure of the Lacc 6 enzyme of *Pleurotus ostreatus* was constructed using a laccase of *Trametes versicolor* as a template. From this structure, 16 mutants with possible resistance at high temperature due to ionic interactions, salt bridges and disulfide bonds were also obtained *in silico*. It was determined that 12 mutants called 4-DB, 3-DB, D233C-T310C, F468P, 3-SB, L132T, N79D, N372D, P203C, P203V, T147E, and W85F, presented the lowest thermodynamic energy. Based on the previous criterion and determining the least flexibility in the protein structures, three mutants (4-DB, 3-DB, and P203C) were selected, which may present high stability at high temperatures without affecting their active site. The obtained results allow the understanding of the molecular base that increase the structural stability of the enzyme Lacc 6 of *Pleurotus ostreatus*, achieving the *in silico* generation of mutants, which could have activity at high temperatures.

Keywords: laccase, *Pleurotus ostreatus*, Lacc 6, mutants, energy minimization

INTRODUCTION

One of the greatest qualities studied and demanded by protein engineering in the environmental and biotechnological fields is the search for conformational and structural stability of proteins when subjected to high temperatures, due to the fact that a high percentage of industrial processes are carried out in such conditions.

The native structure of a protein is stabilized by physicochemical interactions (Djikaev and Ruckenstein, 2008; Das et al., 2018); nevertheless, the free energy between the folded and unfolded states has been estimated in an order of 5–20 kcal/mol, which would be equivalent to breaking a small number of such interactions (Venkataramani et al., 2013; Nawaz et al., 2015; Dubey et al., 2017), in this way, structural stability turns out to be a delicate balance of interactions. Proteins can lose their stability and be denatured by various physicochemical treatments such as: heat, pressure, pH, urea or guanidine chloride, among others (Govardhan, 1999). When the bonds that maintain the native structure of a protein are broken, most of the time it loses its functionality due

to structural destabilization. One of the processes of protein denaturation most studied is by heat, which occurs in a relatively narrow temperature range. That is why there are multiple proposals to increase their structural resistance at high temperatures (Gao et al., 2016; Kumar et al., 2016; Kean et al., 2017). An example is the hydrophobic packaging where the amino acid residues are oriented toward the protein core, being the main stability factors (Reed et al., 2013; Luna-Martínez et al., 2016); It should be mentioned that studies on directed mutations carried out for the filling of hydrophobic cavities have resulted in an improvement of stability by hydrophobic packaging (Christensen and Kepp, 2013a; Oda and Kinoshita, 2015). Likewise, electrostatic interactions that occur between amino acids of opposite charge, also have great importance to maintain the stability of the conformation of the protein (Sohini and Srikanta, 2009; Christensen and Kepp, 2013a).

In studies on protein flexibility, it has been found that mutations through which conformational degrees of freedom are reduced confer structural resistance to proteins (Zhou et al., 2008; Gribenko et al., 2009). A type of covalent bond that allows the reduction of flexibility is formed by the union of two cysteines, called disulfide bridge and is considered as a primary factor for stability (Radestock and Gohlke, 2011). However, the success in stabilization by disulfide bridges in protein engineering is dependent on the conformational change caused by the themselves folding and the effects of substituting the native residues with cysteines (Pappenberger et al., 1997). Other tactics to reduce flexibility is the substitution of free chain amino acids for prolines and the shortening in the length of loops, which can increase the stability of proteins by compaction. Although today part of the knowledge about flexibility, mobility and protein dynamics are derived from experimental data, it is true that currently there is no experimental technique to monitor conformational changes at the molecular level and atomic resolution as a function of time. For this reason, the molecular, conformational, flexibility and mobility details are often studied by computational simulation techniques providing a possibility to obtain dynamic information on the functionality of proteins (Anbar et al., 2012; Yakimov et al., 2016).

On the other hand, the laccase enzymes (EC.1.10.3.2) that belong to the family of multicopper-oxidases, can oxidize numerous compounds with an oxide-reduction potential that varies between 500 and 800 mV, such as the ρ -diphenol, aminophenols, polyphenols, polyamines and aryl diamines (Xu, 2005). They are N-glycosylated proteins (10–45% of their molecular mass), in general, they are in monomeric form with molecular weight of 20–80 kDa, their pI is between 2.6 and 4.5, being biologically active at pH 2.0–8.5 (Wesenberg et al., 2003; Díaz et al., 2013). These enzymes have been described in bacteria, fungi, plants and insects and more than 100 different proteins have been identified (Shuresh-Kumar et al., 2003). Its physiological function in plants is in the lignification process and in fungi in morphogenesis processes (formation of spores, pigments of fruiting bodies), pathogenesis, virulence and degradation of lignin, but it has also been reported that in some insects act in the formation of cuticle in the process of sclerotization (Kramer et al., 2001) and in bacteria have the

function of monomer cross-linking, polymer degradation and the breakdown of aromatic rings (Sharma et al., 2007). The laccases have a great biotechnological potential, for example in the whitening of paper pulp, in the stabilization of wines and beers, in the food industry, in the cosmetic and pharmaceutical industries and in various bioremediation processes including discoloration of textile dyes and degradation of xenobiotic compounds (Mayer and Staples, 2002).

The laccase enzyme Lacc 6 produced by *Pleurotus ostreatus* has shown a high level of expression under different development conditions and has been partially characterized, determining its molecular weight, pI, optimum pH of activity, Km on different substrates, etc. (Baldrian, 2006; Díaz et al., 2013), because of the above, it was considered to be modified through protein engineering obtaining *in silico* mutants with greater thermodynamic stability, for its possible application in the degradation of polluting compounds of phenolic origin and recalcitrants that are in extreme temperature conditions.

In this research, a structure of the Lacc 6 enzyme of *Pleurotus ostreatus* was constructed *in silico*, using a laccase of *Trametes versicolor* as a template. From this structure, 16 mutants with possible resistance at high temperature due to ionic interactions, salt bridges and disulfide bonds were also obtained *in silico*.

MATERIALS AND METHODS

Modeling of Lacc 6 of *Pleurotus ostreatus*

The initial alignment was made using ClustalO¹ and the secondary structure prediction with Predictprotein program². The template structure to Lacc 6 model with the highest degree of homology, was search (non-redundant) in BLAST server (Basic Local Alignment Search Tool) through PDB³ (Boratyn et al., 2012). The structural model of the native Lacc 6 laccase from *Pleurotus ostreatus* was carried out using the Modeller computer package⁴ (Webb and Sali, 2016).

Preparation of Mutant Proteins of Lacc 6

The thermostable Lacc 6 quimeric protein was determined by two ways: 1) making an exhaustive literature search to find all laccases with t1/2 over 55°C (Hildén et al., 2009) to structure multiple models of them with Modweb-ModBase server⁵ to find the invariant structural motif-interactions, and 2) finding the most favorable and thermodynamic residue shift in Lacc 6 by PopMusic server⁶ (Dehouck et al., 2011), each of any shift were constructed using UCSF CHIMERA⁷ with SWAPAA algorithm that performs a side chain replacement by rotamers

¹<http://www.clustal.org/omega/>

²<https://www.predictprotein.org/>

³<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

⁴<https://salilab.org/modeller/>

⁵<https://modbase.compbio.ucsf.edu/modweb/>

⁶<http://dezyme.com/>

⁷<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>

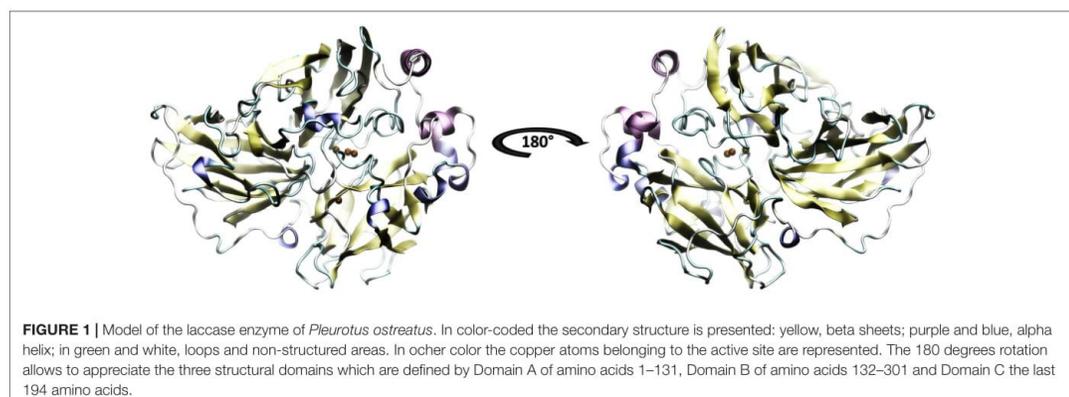


TABLE 1 | Catalytic properties at high temperatures of laccase enzymes and accessions data.

Organism	$t_{opt}(^{\circ}C)$	$t_{1/2}(^{\circ}C)$	$t_{1/2}(h)$	UniPropt-Entry	PDB ID or Template	% Homology	Reference
<i>Albatrella dispansus</i>	70	nr	nr		–	–	Wang and Ng, 2004
<i>Basidiomycete PM1 (CECT 2971)</i>	80	nr	nr	Q12571	5ANH	–	Coll et al., 1993
<i>Coprinus cinereus</i>	60–70	60	0.5	Q9Y780	1HFU	–	Schneider et al., 1999
<i>Corioloopsis gallica (A-241)</i>	70	60	nr	Q9P8G4	1GYC 3KW7 5NQ8	65 65 65	Calvo et al., 1998
<i>Daedalea quercina (CCBAS528)</i>	70	65	0.5	Q6VPS6	1GYC 2XYB 5NQ8	74 67 68	Dedeyan et al., 2000
<i>Marasmius quercophilus</i>	75–80	40	48	AF162785	5ANH 2HRG 5A7E	99 97 96	Baldrian, 2006
<i>Physisporinus rivulosus</i>	nr	70	1.0	I1W1V7	3KW7 5NQ7 2XYB	73 70 70	Hildén et al., 2007
<i>Steccherinum ochraceum</i>	70	70	1.7	I1SB14	5ANH	–	Chernykh et al., 2008
<i>Trametes gallica</i>	70	nr	nr	C5IXN8	3KW7 5A7E 4A2D	73 71 71	Dong and Zhang, 2004
<i>Trametes versicolor</i>	80	nr	nr	Q5IR80	1GYC 3X1B 5LDU	99 77 80	Koschorreck et al., 2008
<i>Tricholoma giganteum</i>	70	nr	nr		–	–	Wang and Ng, 2004
<i>Peniophora sp. UD4</i>	70	nr	nr	A0A2I6HE30	2QT6 4JHU 4A2D	63 63 62	Jordaan and Leukes, 2003
<i>Melanocarpus albomyces</i>	60–70	60	5.0	Q70KY3	2Q90	–	Kiiskinen et al., 2004
<i>Myceliophthora thermophila</i>	nr	70	0.3	G2QG31	1GW0 3PPS 3SQR	75 68 37	Berka et al., 1997

$t_{opt}(^{\circ}C)$: Optime temperature, $t_{1/2}(^{\circ}C)$: Media temperature, $t_{1/2}(h)$: Media time, nr: Not reported.

to find their structural motifs invariants such as salt bridges, ionic interactions and disulfide bonds (Fersht et al., 1986). The structural invariant interactions between Lacc 6 and models or structures of thermostable laccases can be see in **Table 2**. Location of each mutation was obtained by Lacc 6 model overlap with any thermostable laccases. Were determined structurally

the networks of conserved electrostatic interactions of thermal laccases (**Table 2**, Columns 2 and 3).

By another way, the PoPMuSic hot points (most favorable thermodynamic residue shift) with the ability to confer structural stability to Lacc 6 at high temperatures can be see in **Table 3**.

search selecting the lowest score and shocks between the new side chain and chains of its neighborhood (Fersht et al., 1986).

Minimization of Thermodynamic Energy of Lacc 6 Mutants

Once the mutants were built, they were minimized by the steepest descent protocol up to 0.01 kcal/mol, with the NAMD 2.12 package (Scalable Molecular Dynamics) (Phillips et al., 2005), using the CHARMM36 (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics) force field (Huang et al., 2017), it was performed with explicit solvent at a physiological sodium chloride (NaCl) ion concentration of 0.15 M, the parameters for the copper atoms were taken from Ungar et al. (1997).

Normal Mode Analysis

After the minimization, the structures with the lowest energy, these assumed as the most stable energetically (thermostable mutants) (Burkoff et al., 2012), to later be studied through by the Normal Modes theory with the eNémo server, available at <http://www.sciences.univ-nantes.fr/elnemo/> (Suhre and Sanejouand, 2004). The thermostable mutants were always contrasted with Lacc 6 throughout all the work, and all images were constructed using Visual Molecular Dynamics (VMD) Software (Humphrey et al., 1996).

RESULTS

The Lacc 6 sequence of *Pleurotus ostreatus* shown below (UniProtKB: A0A067NQH1_PLEOS), which is constituted by 533 amino acids, where the first 21 residues correspond to the signal peptide.

10	20	30	40	50
MAVAFVALVS	LALALVRVEA	SIGPRGTLNI	ANKVIQPDGF	SRSTVLAGGS
60	70	80	90	100
YPGPLIKGKT	GDRFQINVVN	KLADTSMPVD	TSIHWHLGFV	KGHNWADGPA
110	120	130	140	150
MVTQCPIVPG	HSFLYDFEVP	DQAGTFWYHS	HLGTQYCDGL	RGPLVVYSKN
160	170	180	190	200
DPHKRLYDVD	DESTVLTVGD	WYHAPSLSLT	GVPHPDSTLF	NGLGRSLNGP
210	220	230	240	250
ASPLYVMNVV	KGKRYRIRLI	NTSCDSNYQF	SIDGHTFTVI	EADGENTQPL
260	270	280	290	300
QVDVQVIFAG	QRYSLVLNAN	QAVGNYWIRA	NPNSGDPGFE	NQMNSAILRY
310	320	330	340	350
KGARSIDPTT	PEQNATNPLR	EYNLRPLIKK	PAPGKPFPGG	ADHNINLNFA
360	370	380	390	400
FDPATALFTA	NNHTFVPPTV	PVLLQILSGT	RDAHDLAPAG	SIYDIKLDGV
410	420	430	440	450
VEITMPALVF	AGPHPLHLHG	HTEAVRSAG	SSTYNYENPV	RRDVVSGIDD
460	470	480	490	500
PTDNTVIRFV	ADNAGPWLH	CHIDWHLDLG	FAVVFAEGVN	QTAAANPVPE
510	520	530		
AWNNLCPIYN	SSNPSKLLMG	TNAIGRLPAP	LKA	

The secondary structure prediction of Lacc 6 was performed in Predictprotein program⁸ (Yachdav et al., 2014). The initial alignment was performed using 142 laccase sequences from *Trametes* using the ClustalO program⁹ (Sievers et al., 2011) and the best homologous structure obtained with the BLAST server was the laccase of *Trametes versicolor* 1GYC (Protein Data Bank, PDB), it is worth mentioning that the alignment was consistent with the template structure and the active sites were perfectly aligned between them. Consequently, 1GYC structure was used as a template to make the model of Lacc 6, the homology between its sequence and 1GYC was close to 62% (UniProt Consortium 2012; Coluzza, 2017). The model of Lacc 6 (Figure 1) was built through Modeller computer package with a DOPE score of -1.88 . On the other hand, the Lacc 6 model and the prediction of its secondary structure were highly related. The motifs of the Lacc 6 model were characterized by the PDBsum program, by which it was determined that the scaffolding of Lacc 6 consists of: 7 β -sheets, 9 β -hairpin, 8 β -bulge, 28 β -sheets, 10 α -helices (2 of them with helix-helix interactions), 44 β -turns, 8 γ -turns, and 2 disulfide bridges. Once the model was constructed and verified, it was proceeded to be minimized with the purpose of eliminating the steric shocks.

To generate a thermostable mutant of Lacc 6 according to structural evolution, an exhaustive search of literature on laccases with thermal resistance was carried out (Pezeshgi-Modarres et al., 2016; Coluzza, 2017), of which almost all those found were modeled and reported in Table 1.

Once discovered the thermostable laccases and built their models, this type of proteins was studied with the purpose

⁸ <https://www.predictprotein.org/>

⁹ <http://www.clustal.org/omega/>

TABLE 2 | Mutants with potential to confer thermal stability or disturbance the active site of the enzyme Lacc 6.

	Alignment	Disulfide bridges	Ionic interactions	Disturbance of active site
Mutant	S431D	D233C-T310C	G234R	F468P
	I217F	H184C-S284C	S264E	F481M
	V79D	K396C-D399C	T147E	G420L
	N275K	N94C-G465C	G234K/Q271E/N270D (3-SB)	L132T
	N275R	D233C-T310C/H184C-S284C	G234E/Q271K/N270R	L416I
	V372D	D233C-T310C/H184C-S284C/ K396C-D399C (4-DB)	G234D/Q271K/N270R	L469F
	Q65R	D233C-T310C/H184C- S284C/K396C-D399C/N94C- G465C	G234R/Q271E/N270D (3-SB)	W85V
				S130D
				W85F

Second column shows the mutations obtained by multiple alignment, these residues are highly conserved over time; in columns three to five, the mutants were built through structure-overlapping between Lacc 6 and the all other models/structures to find the conservative structures motifs. Disulfide bridges and Ionics interacciones are deposited in three and four columns, respectively. In the last column are the mutants that can break the active site.

TABLE 3 | Main mutations obtained by PoPMuSIC program.

	Hot points	Shift	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
1	203	PRO → VAL	-1.91
2	203	PRO → CYS	-1.89
3	487	GLU → ILE	-1.75
5	487	GLU → TYR	-1.75
6	170	ASP → TYR	-1.5
7	170	ASP → PHE	-1.47
8	399	ASP → MET	-1.37
9	142	GLY → PHE	-1.35
10	183	PRO → TRP	-1.2

The 10 mutants (shift residue) with the best and favorable energy in contrast to Lacc 6. The amino acid sequence number is found in second column, in the next column is the hot poin residue and their shift, the last column present the $\Delta\Delta G$ between Lacc 6 and mutant protein.

Table 3 contains the shift residue information, the evolutionary invariants with high capacity of confer thermoresistant in Lacc 6 enzyme sequences are reflected on this. The alignment (**Figure 2**) of the 16 structures, created by WebLogo program¹⁰, capture the conservation propensity of each mutate residue set in column 3, with this approach we can see that the best single mutant is P203V showing a $\Delta\Delta G = -1.91$ kcal/mol below the Lacc 6.

Based on the **Tables 2, 3**, a mutant energy minimization was performed in each one, to define the most suitable shift that could confer structural resistance to Lacc 6 (Liwo et al., 2002; Nakagawa and Peyrard, 2006). The mutant energy ponderation on the **Table 4** shows that 4-DB, 3-DB, and D233C-T310C (highlighted in gray), are the most favorable energy mutants with the ability to confer structural thermal-resistance. In this singular way, was appreciate that the best designed laccases by the evolution are those with a disulfide bridges networks such as the mutants mentioned above.

¹⁰<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>

Once the energy differences were quantified and analyzed, was continued with a Normal Modes study of the thermostable mutants (4-DB, 3-DB, D233C-T310C, 3-SB, F468P, L132T, and others). The intention of Normal Modes Study is know the collective and correlated movements of the lower energy mutant modes (Tama and Sanejouand, 2001). The modes emitted by the ElNemo program include six trivial zero order frequencies. This study focused on mode 7, corresponds to the protein internal movements identified in direction of maximum movement; 10 snapshots of any structure (referring to the minimized initial structure) were obtained to display and represent the mode dynamics. The difference in the mean squared value of the normalized displacement (R^2) of each alpha carbon ($C\alpha$) is plotted as a function of the number of residues, where for all residues, significantly mobile regions are seen above and still below the line in the graph of **Figure 3**.

The movements of the $C\alpha$ for normal mode 7 are plotted as a function of the number of residues. The residue with the least displacement appears with a minimum value of R^2 below the line at the origin. The higher amplitude values are due to the zones near to the cavity and to the terminal helix, the latter usually being a meaningless section since it is usually an artifact of the software itself, it is usually eliminated before calculations (Altschul et al., 1990).

At a higher energy as shown in **Table 4**, but still moderate, with a change in the higher R^2 for the 4-DB mutant, it exhibits vibrational movements and a flexibility more intense compared to Lacc 6, on the other hand, the 3-DB mutant also shows an even more moderate energy decrease than 4-DB, and also leads to a reduction in the change of R^2 , becoming a more rigid and less fluctuating structure as shown in **Figure 4**. The results show that for most of the mutants in which the change in the neighborhoods of the active site was made, it was disturbed as shown in **Figure 5**, where the L132T mutant is observed. These results indicate that most of the Lacc 6 regions and their mutants behave as a coupled structure that is mutually flexible or rigid, regardless of the energy calculated by the minimization. Inside the protein, displacement is close to 0. At the ends was

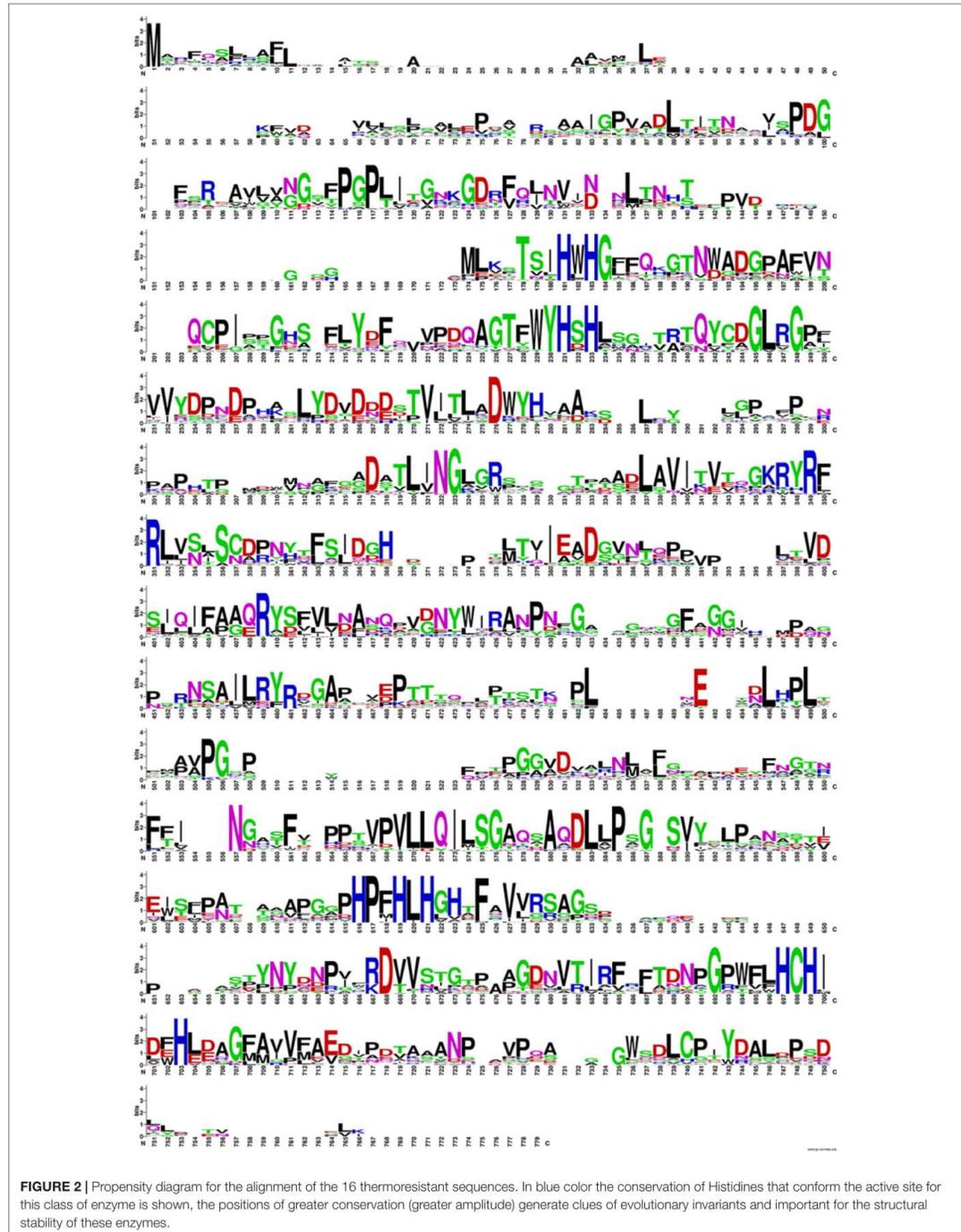


FIGURE 2 | Propensity diagram for the alignment of the 16 thermoresistant sequences. In blue color the conservation of Histidines that conform the active site for this class of enzyme is shown, the positions of greater conservation (greater amplitude) generate clues of evolutionary invariants and important for the structural stability of these enzymes.

TABLE 4 | Energy difference between the native enzyme and their mutants.

Method	Mutant	ΔE (kcal/mol)	
PoPMuSIC	D170F	0.067	
	D170T	0.063	
	D399M	0.009	
	E487I	0.040	
	E487Y	0.091	
	G142F	0.066	
	P183T	0.094	
	P203C	-0.063	
	P203V	-0.025	
	Alignment	G431D	0.013
I217F		0.020	
N275K		0.068	
N275R		0.045	
N372D		-0.003	
N79D		-0.050	
Q65R		0.007	
Ionic interaction		G234D-N271K-N270R	0.073
	G234E-N271K-N270R	0.059	
	G234k-N271E-N270D	-0.010	
	G234R (3-SB)	0.184	
	G234R-N271E-N270D	-0.094	
	S264E	0.038	
Disulfide bridges	T147E	-0.044	
	D233C-T310C/H184C-S284C (3-DB)	-0.131	
	D233C-T310C/H184C-S284C/K396C-D399C (4-DB)	-0.177	
	D233C-T310C/H184C-S284C/K396C-D399C/N94C-G465C	-0.100	
	D233C-T310C	-0.064	
	H184C-S284C	-0.037	
	K396C-D399C	0.007	
	N94C-G465C	-0.091	
	Disturbance of active site	F468P	-0.022
		F481M	0.136
G420L		-0.084	
L132T		0.029	
L416I		-0.009	
L469F		0.014	
M85V		-0.017	
S130D		-0.042	

In the first column are represented the search method for the proposed mutants; second column, the proposed residue shift for the mutants design and the last column presents the mutant energy after the minimization, taking as a baseline the Lacc 6 energy.

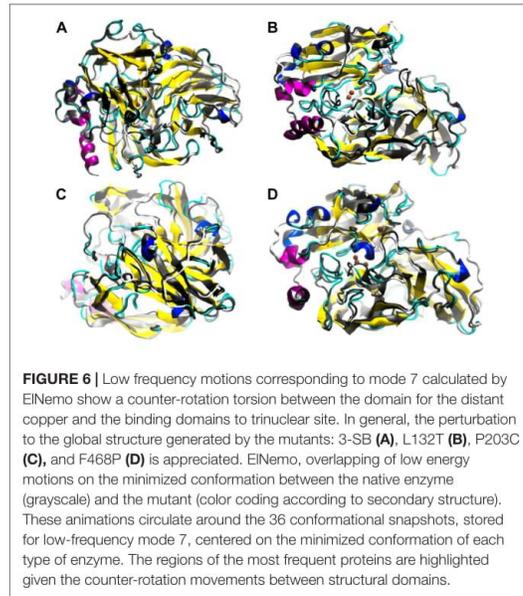
observed a projection of displacement in the neighborhoods of the mutations; Left upper panel, D233C/T310C mutation; Right upper panel, K396C/D399C mutation and lower right panel, H184C/S284C mutation. On the mode 7, the native protein has greater variation compared to the mutant protein (Figure 6).

TABLE 5 | Root Mean Squared Deviation (RMSD) values and displacement (fraction) for the mutant enzymes compared to Lacc 6.

Mutant	Mode	RMSD	Fraction of displacement
4-DB	7	1.097	0.3211
	8	1.109	0.0883
	9	1.109	0.5263
3-DB	7	1.004	0.0134
	8	1.004	0.5754
	9	1.004	0.5323
D233C-T310C	7	1.016	0.2418
	8	1.016	0.1575
	9	0.998	0.3829
F468P	7	1.004	0.4454
	8	1.004	0.0866
	9	0.999	0.5285
3-SB	7	1.014	0.1945
	8	1.014	0.1693
	9	1.011	0.5415
L132T	7	0.97	0.0466
	8	0.97	0.3889
	9	0.97	0.4427
N79D	7	1.044	0.0363
	8	1.044	0.4279
	9	1.034	0.4928
N372D	7	1.02	0.0716
	8	1.02	0.3694
	9	1.02	0.5128
P203C	7	0.966	0.055
	8	0.966	0.3882
	9	0.966	0.5439
P203V	7	1.028	0.0161
	8	1.028	0.5793
	9	1.028	0.5364
T147E	7	0.98	0.0597
	8	0.98	0.347
	9	0.98	0.5303
W85F	7	1.03	0.0271
	8	1.03	0.5306
	9	1.03	0.5073
Lacc 6	7		0.0794
	8		0.2892
	9		0.3396

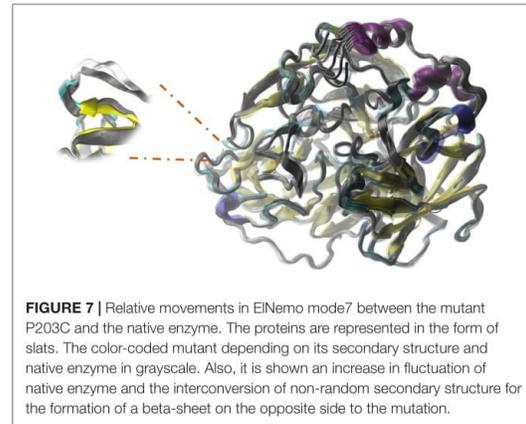
Column number 1 are the models of lower energy; in column 2, are the normal mode 7-9; in the column 3 the RMSD vs. Lacc 6; and the last column shows the fraction of residues that are significantly affected by a given mode.

The three lower frequency movements, 7, 8, and 9, were selected as global representations of the movements (Table 5). Normal mode 7 was selected because values close to zero allow localized movements to be visualized, since normal low-frequency modes are expected to have collective characters, especially those related to the functional conformations of the protein (Tama and Sanejouand, 2001). In addition, as shown in Figure 7, the residues underwent significant displacement, although the structural deviation is small since the differences in RMSD (Root Mean Square Deviation) between the native



of this same enzyme, to improve its stability in non-optimal conditions of activity for its possible synthesis and application in the degradation of agroindustrial residues that have been underutilized.

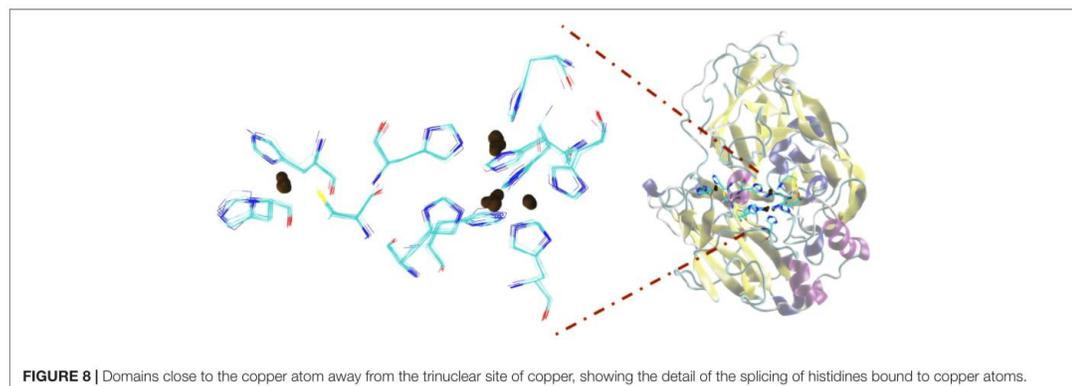
Agroindustrial wastes are a source of environmental pollution, since its composition is rich in lignin, cellulose and hemicellulose that require enzymatic complexes for its decomposition. For example, in 2006, Mexico produced about 76 million tons of agroindustrial waste from 20 types of cultivation and there are no physical, chemical, or enzymatic transformation techniques for their use (Valdez-Vazquez et al., 2010). Laccases have been associated with various biological functions, depending on the organism and its developmental conditions, are secreted into

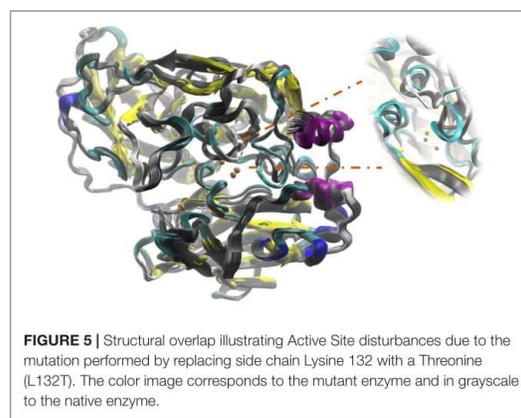
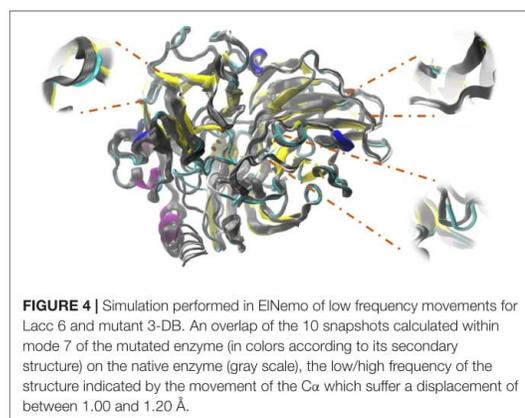
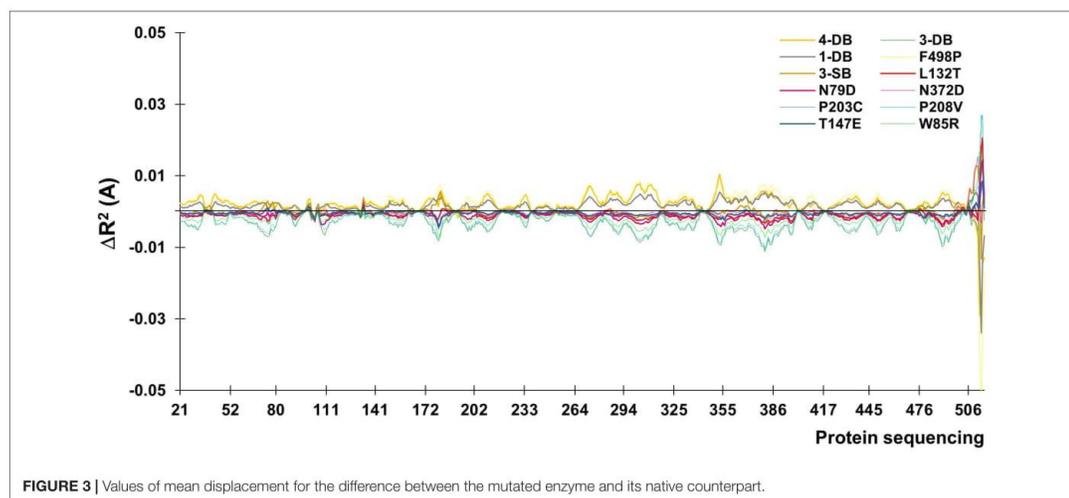


multiple isoforms and its most well-known and studied function is the degradation of lignin (Téllez-Téllez et al., 2008; Díaz et al., 2013).

On the other hand, these types of enzymes have applications of great interest in the industry and within their characteristics must be produced at low cost, be stable to the working conditions in wide ranges of pH and temperature for the treatment of pollutants (Téllez-Téllez et al., 2008; Miele et al., 2010; Díaz et al., 2013). In this study a proposal is made of an improved laccase that shows a minimum activation energy that allows it to be stable and active under adverse reaction conditions.

Several studies have been carried out on the generation of *Pleurotus ostreatus* laccase enzyme mutants as an alternative to be applied in the biodegradation of xenobiotic and/or recalcitrant compounds as reported by Miele et al. (2010), who randomly performed the generation of 2300 mutants of the POXA1b (Lacc 6) isoenzyme of *Pleurotus ostreatus* to develop biocatalysts from this enzyme, but no proposal has been made to know how the possible mutations occurred on the active site of this enzyme and to obtain models that would show the effect on the trinuclear





protein and its mutants are about 1 Å, as can be seen in **Table 5**. Mode 7 shows a counter-rotation torsion between the structural domains, as can be seen in **Figure 6**, which would imply inclination and helical flexion, also one can observe that one of the domains rotate around an axis perpendicular to the plane of the membrane, while the others rotate around an inclined axis, this type of movements have not been described for this type of proteins.

Flexibility and low energy motions were compared between the Lacc 6 and its mutants, Elnemo indicated that the low energy motions between the enzymes for their mutant and native form contain a nucleus in the protein that is immobile except for the L132T and F468P mutants (**Figures 6B,D**) for which the disturbance of the active site underwent significant alterations, in addition to some mobile external secondary structures.

Figures 4–7 make it possible to appreciate that the more flexible regions act as an interdomain hinge which allows coordinated movements of counter-rotational of each of these. Elnemo mode 7 shows the near domain to remote copper from the trinuclear copper site, it curves and straightens significantly according to the swinging of the contiguous domains, because the copper binding site implies a face of this domain (**Figure 8** and **Figure 1**), these motions could be coupled to binding to the substrate or affect their affinity, especially in mutants designed to disturb the active site.

DISCUSSION

In this study, a bioinformatic analysis of enzyme Lacc 6 of *Pleurotus ostreatus* and minimization of energy of mutants

- enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3151–3157.
- Boratyn, G. M., Schäffer, A. A., Agarwala, R., Altschul, S. F., Lipman, D. J., and Madden, T. L. (2012). Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biol. Direct.* 7:12. doi: 10.1186/1745-6150-7-12
- Burkoff, N. S., Várnai, C., Wells, S. A., and Wild, L. D. (2012). Exploring the energy landscapes of protein folding simulations with bayesian computation. *Biophys. J.* 102, 878–886. doi: 10.1016/j.bpj.2011.12.053
- Calvo, A. M., Copa-Patiño, J. L., Alonso, O., and González, A. E. (1998). Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Corioliopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Arch. Microbiol.* 171, 31–36. doi: 10.1007/s002030050674
- Chernykh, A., Myasoedova, N., Kolomitseva, M., Ferraroni, M., Briganti, F., Scozzafava, A., et al. (2008). Laccase isoforms with unusual properties from the basidiomycete *Steccherinum ochraceum* 1833. *J. Appl. Microbiol.* 105, 2065–2075. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03924.x
- Christensen, N. J., and Kepp, K. P. (2013a). Stability mechanisms of a thermophilic laccase probed by molecular dynamics. *PLoS One* 8:e61985. doi: 10.1371/journal.pone.0061985
- Christensen, N. J., and Kepp, K. P. (2013b). Stability mechanisms of laccase isoforms using a modified FoldX protocol applicable to widely different proteins. *J. Chem. Theory Comput.* 9, 3210–3223. doi: 10.1021/ct4002152
- Coll, P. M., Fernández-Abalos, J. M., Villanueva, J. R., Santamaría, R., and Pérez, P. (1993). Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2607–2613.
- Coluzza, I. (2017). Computational protein design: a review. *J. Phys. Condens. Matter.* 29:143001. doi: 10.1088/1361-648X/aa5c76
- Das, S., Eisen, A., Lin, Y. H., and Chan, H. S. (2018). A lattice model of charge-pattern-dependent polyampholyte phase separation. *J. Phys. Chem. B.* 122, 5418–5431. doi: 10.1021/acs.jpcc.7b11723
- Dedeyan, B., Klonowska, A., Tagger, S., Tron, T., Lacazio, G., Gil, G., et al. (2000). Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. *Appl. Environ. Microb.* 66, 925–929. doi: 10.1128/AEM.66.3.925-929.2000
- Dehouck, Y., Kwasigroch, J. M., Gilis, D., and Rooman, M. (2011). PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality. *BMC Bioinformatics* 12:151. doi: 10.1186/1471-2105-12-151
- Díaz, R., Téllez-Téllez, M., Sánchez, C., Díaz-Godínez, G., and Soriano-Santos, J. (2013). Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentations. *Electron. J. Biotechnol.* 16. doi: 10.2225/vol16-issue4-fulltext-6
- Djikaev, Y. S., and Ruckenstein, E. (2008). Temperature effects on the nucleation mechanism of protein folding and on the barrierless thermal denaturation of a native protein. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10, 6281–6300. doi: 10.1039/b807399f
- Dong, J. L., and Zhang, Y. Z. (2004). Purification and characterization of two laccase isoenzymes from a ligninolytic fungus *Trametes gallica*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 34, 179–194. doi: 10.1081/PB-120030876
- Dubey, M. K., Zehra, A., Aamir, M., Meena, M., Ahirwal, L., Singh, S., et al. (2017). Improvement strategies, cost effective production, and potential applications of fungal glucose oxidase (GOD): current updates. *Front. Microbiol.* 8:1032. doi: 10.3389/fmicb.2017.01032
- Ferrario, V., Chernykh, A., Fiorindo, F., Kolomytseva, M., Sinigoi, L., Myasoedova, N., et al. (2015). Investigating the role of conformational effects on laccase stability and hyperactivation under stress conditions. *Chembiochem.* 16, 2365–2372. doi: 10.1002/cbic.201500339
- Fersht, A. R., Leatherbarrow, R. J., and Wells, T. N. C. (1986). Quantitative analysis of structure–activity relationships in engineered proteins by linear free-energy relationships. *Nature* 322, 284–286. doi: 10.1038/322284a0
- Festa, G., Autore, F., Fraternali, F., Giardina, P., and Sanna, G. (2008). Development of new laccases by directed evolution: functional and computational analyses. *Proteins* 72, 25–34. doi: 10.1002/prot.21889
- Gao, X., Zeng, J., Yi, H., Zhang, F., Tang, B., and Tang, X. F. (2016). Four inserts within the catalytic domain confer extra stability and activity to hyperthermostable pyrolysin from *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e03228-16. doi: 10.1128/aem.03228-16
- Ghosh, M., Sodhi, S. S., Sharma, N., Mongre, R. K., Kim, N., Singh, A. K., et al. (2016). An integrated in silico approach for functional and structural impact of non-synonymous SNPs in the MYH1 gene in Jeju Native Pigs. *BMC Genetics* 17:35. doi: 10.1186/s12863-016-0341-1
- Govardhan, C. (1999). Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 331–335. doi: 10.1016/S0958-1669(99)80060-3
- Gribenko, A. V., Patel, M. M., Liu, J., McCallum, S. A., Wang, C., and Makhatazde, G. I. (2009). Rational stabilization of enzymes by computational redesign of surface charge-charge interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 2601–2606. doi: 10.1073/pnas.0808220106
- Hildén, K., Hakala, T. K., and Lundell, T. (2009). Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnol. Lett.* 31, 1117–1128. doi: 10.1007/s10529-009-9998-0
- Hildén, K., Hakala, T. K., Maijala, P., Lundell, T. K., and Hatakka, A. (2007). Novel thermotolerant laccases produced by the white-rot fungus *Physosporinus rivulosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 301–309. doi: 10.1007/s00253-007-1155-x
- Huang, J., Rauscher, S., Nawrocki, G., Ran, T., Feig, M., de Groot, B. L., et al. (2017). CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat. Methods* 14, 71–73. doi: 10.1016/j.bpj.2016.11.971
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
- Jordaan, J., and Leukes, W. D. (2003). Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungi. *Enzyme. Microb. Technol.* 33, 212–219. doi: 10.1016/S0141-0229(03)00116-9
- Kean, K. M., Porter, J. J., Mehl, R. A., and Karplus, P. A. (2017). Structural insights into a thermostable variant of human carbonic anhydrase II. *Protein Sci.* 27, 573–577. doi: 10.1002/pro.3347
- Kiiskinen, L. L., Rättö, M., and Kruus, K. (2004). Screening for novel laccase-producing microbes. *J. Appl. Microbiol.* 97, 640–646. doi: 10.1016/S0141-0229(03)00116-9
- Koschorreck, K., Richter, S. M., Swierczek, A., Beifuss, U., Schmid, R. D., and Urlacher, V. B. (2008). Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs. *Arch. Biochem. Biophys.* 474, 213–219. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.009
- Kramer, K. J., Kanost, M. R., Hopkins, T. L., Jiang, H., Cheng-Zhu, Y., Xu, R., et al. (2001). Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal system. *Tetrahedron* 57, 385–392. doi: 10.1016/S0040-4020(00)00949-2
- Kumar, S., Prakash, S., Gupta, K., Dongre, A., Balaran, P., and Balaran, H. (2016). Unexpected functional implication of a stable succinimide in the structural stability of *Methanocaldococcus jannaschii* glutaminase. *Nat. Commun.* 7:12798. doi: 10.1038/ncomms12798
- Liwo, A., Arlukowicz, P., Czaplewski, C., Oldziej, S., Pillardy, J., and Scheraga, H. A. (2002). A method for optimizing potential-energy functions by a hierarchical design of the potential-energy landscape: application to the UNRES force field. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1937–1942. doi: 10.1073/pnas.032675399
- Luna-Martínez, O. D., Vidal-Limón, A., Villalba-Velázquez, M. I., Sánchez-Alcalá, R., Garduño-Juárez, R., Uversky, V. N., et al. (2016). Simple approach for ranking structure determining residues. *PeerJ* 4:e2136. doi: 10.7717/peerj.2136
- Mayer, A. M., and Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60, 551–565. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00171-1
- Miele, A., Giardina, P., Sanna, G., and Faraco, V. (2010). Random mutants of a *Pleurotus ostreatus* laccase as new biocatalysts for industrial effluents bioremediation. *J. Appl. Microbiol.* 108, 998–1006. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04505.x
- Nakagawa, N., and Peyrard, M. (2006). The inherent structure landscape of a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 5279–5284. doi: 10.1073/pnas.0600102103
- Nawaz, M. A., Rehman, H. U., Bibi, Z., Aman, A., and Ul Qader, S. A. (2015). Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix. *Biochem. Biophys. Rep.* 4, 250–256. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.09.025
- Oda, K., and Kinoshita, M. (2015). Physicochemical origin of high correlation between thermal stability of a protein and its packing efficiency: a theoretical

copper region by modifying amino acids adjacent to the histidines bound to these metals as is done in this research.

On the other hand, Prins et al. (2015), observed the effect of mutations near the Cu 1 copper site of *Streptomyces coelicolor* A3 (2), to evaluate their biochemical characteristics against the native enzyme, obtaining three mutations (M298F, V290N, and V290A), the V290N mutant showed approximately double the activity, four to five times greater was the activity of the mutant M298F, however, the thermostability was decreased. In contrast to this study, where the proposed mutations (3-DB, 3-SB, P203C) allowed us to see the effect on the secondary structure of the protein; the changes occurring in the active site region and the energy minimization suggests an increase in the thermostability of the protein and that could tolerate higher to optimal temperatures for prolonged times. Such mutants may be candidates for *in vitro* expression, as shown in multiple works (Christensen and Kepp, 2013a; Ghosh et al., 2016), in which *in silico* studies allow the generation and identification of molecular bases in an expeditious manner which are difficult to quantify experimentally, and *in vitro* studies are feasibly reproduced by *in silico* studies (Zou et al., 2016), showing that computational tools are a primary aid in the structural study of proteins. Given the results, the production of mutant enzymes is suggested through genetic engineering to be used in bioremediation processes.

In recent years, computational design has been successfully applied for the thermostabilization of enzymes with potential use in biotechnological processes, mimicking the evolution in the laboratory to develop more stable enzyme variants and, more recently, using rational strategies of computer-assisted enzymatic engineering. Festa et al. (2008) performed one of the first notable works in the computational stabilization of a laccase, presented a screening library of 1100 clones of the mutant 1M9B obtained from *Pleurotus ostreatus*, and showed a single mutation (L112F) giving rise to a more active enzyme but less stable with respect to the native enzyme (POXA1b or Lacc 6), same enzyme used in our research.

On the other hand, Christensen and Kepp (2013a,b), exhaustively studied the isoforms of the laccase of *Trametes versicolor* by molecular dynamics and other computational techniques in which they predict and rationalize a laccase to provide stability to mutations of multiple sites in its structure, showing that it is possible to generate stable mutants through computational studies, although to carry it out it turned out to be expensive. Ferrario et al. (2015), tested a thermal treatment with simulations of molecular dynamics on a laccase enzyme, observed that the enzyme conserved its geometry even making conformational changes in the labile parts. In contrast to our research in which through the protocol

used to increase the thermal stability of Lacc 6 based on a rational approach by means of multiple methods including phylogenetic analysis, comparison with homologous proteins (particularly thermophilic), optimization of charged interactions (saline bridges and hydrogen bonds), optimization of waste and loops that show unfavorable Ramachandran angles as well as high B factors and computational design based on the structure, suggest a fast and inexpensive computational alternative.

CONCLUSION

Normal modes indicate that the nucleus of the mutants is found without significant motions, however, the exposed sections and in particular the domain of the distant copper undergo movements counter-rotation and global compression. Likewise, it is predicted that lower energy mutants such as 3-DB, 3-SB, P203C minimize fluctuations by making the skeleton less flexible in the vicinity of them, decreasing the range of motions. In the same way it is found that the mutants L132T and D468P generate a conformational change in the vicinity of the active site. This work predicts the global movements of the enzyme laccase, while providing a new perspective of these enzymes. This allows us to discuss the character of the movement in multiple structures on the same basis and as expected the normal low frequency modes from the modeling of the elastic network provide a good description of the global movements of this enzyme, which allows us to understand the molecular basis of the structural stability of the Lacc 6 enzyme of *Pleurotus ostreatus* and its mutants. This suggests that it will have greater stability in its structure that will allow it to have oxidase activity at temperatures above the optimum.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RD performed the experimental design, directed the over-all study, and also drafted the manuscript. YM-F, GD-G and MA-R helped perform the analysis of results and revised the manuscript. LH-Z performed the protein modeling and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This study was funded by the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) for supporting this research (National sabbatical stay of Rubén Díaz Godínez) and the Polytechnic University of Pachuca.

REFERENCES

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Anbar, M., Gul, O., Lamed, R., Sezerman, U. O., and Bayer, E. A. (2012). Improved thermostability of *Clostridium thermocellum* endoglucanase Cel8A by using consensus-guided mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3458–3464. doi: 10.1128/aem.07985-11
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS. Microbiol. Rev.* 30, 215–242. doi: 10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x
- Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., et al. (1997). Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant

- study for staphylococcal nuclease mutants. *Biophys. Physicobiol.* 12, 1–12. doi: 10.2142/biophysico.12.0_1
- Pappenberger, G., Schurig, H., and Jaenicke, R. (1997). Disruption of an ionic network leads to accelerated thermal denaturation of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J. Mol. Biol.* 274, 676–683. doi: 10.1006/jmbi.1997.1421
- Pezeshgi-Modarres, H. P., Mofradab, M. R., and Sanati-Nezhad, A. (2016). Protein thermostability engineering. *RSC Adv.* 6, 115252–115270. doi: 10.1039/C6RA16992A
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., et al. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802. doi: 10.1002/jcc.20289
- Prins, A., Kleinsmidt, L., Khan, N., Kirby, B., Kudanga, T., Vollmer, J., et al. (2015). The effect of mutations near the T1 copper site on the biochemical characteristics of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Enzyme Microb. Tech.* 68, 23–32. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.10.003
- Radestock, S., and Gohlke, H. (2011). Protein rigidity and thermophilic adaptation. *Proteins* 79, 1089–1108. doi: 10.1002/prot.22946
- Reed, C. J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V., and Evilia, C. (2013). Protein Adaptations in Archaeal Extremophiles. *Archaea* 2013:373275. doi: 10.1155/2013/373275
- Schneider, P., Caspersen, M. B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L. K., Østergaard, P. R., et al. (1999). Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 502–508. doi: 10.1016/S0141-0229(99)00085-X
- Sharma, P., Goel, R., and Capalash, N. (2007). Bacterial laccase. *World J. Microb. Biot.* 23, 823–832. doi: 10.1007/s11274-006-9305-3
- Shuresh-Kumar, S. V., Prashant, S., Durani, S., and Pramod, W. (2003). Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 386–394. doi: 10.1002/bit.10681
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7:539. doi: 10.1038/msb.2011.75
- Sohini, B., and Srikanta, S. (2009). Turning a mesophilic protein into a thermophilic one: a computational approach based on 3D structural features. *J. Chem. Inf. Model.* 49, 1741–1750. doi: 10.1021/ci900183m
- Suhre, K., and Sanejouand, Y. H. (2004). ElNemo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. *Nucleic Acids Res.* 32, W610–W614. doi: 10.1093/nar/gkh368
- Tama, F., and Sanejouand, Y. H. (2001). Conformational change of proteins arising from normal mode calculations. *Protein Eng.* 14, 1–6. doi: 10.1093/protein/14.1.1
- Télez-Télez, M., Fernández, F. J., Montiel-González, A. M., Sánchez, C., and Díaz-Godínez, G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biot.* 81, 675–679. doi: 10.1007/s00253-008-1628-6
- Ungar, L. W., Scherer, N. F., and Voth, G. A. (1997). Classical molecular dynamics simulation of the photoinduced electron transfer dynamics of plastocyanin. *Biophys. J.* 72, 5–17. doi: 10.1016/S0006-3495(97)78642-9
- UniProt Consortium. (2012). Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 40, D71–D75. doi: 10.1093/nar/gkr981
- Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benitez, J. A., and Hernandez-Santiago, C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renew. Sust. Energy Rev.* 14, 2147–2153. doi: 10.1016/j.rser.2010.03.034
- Venkataramani, S., Truntzer, J., and Coleman, D. (2013). Thermal stability of high concentration lysozyme across varying pH: a fourier Transform Infrared study. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 5, 148–153. doi: 10.4103/0975-7406.111821
- Wang, H. X., and Ng, T. B. (2004). A novel laccase with fair thermostability from the edible wild mushroom (*Albatrella dispansus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 381–385. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.05.011
- Webb, B., and Sali, A. (2016). Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 54:05:Unit-5.6. doi: 10.1002/cpbi.3
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., and Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22, 161–187. doi: 10.1016/j.biotechadv.2003.08.011
- Xu, F. (2005). Applications of oxidoreductases: recent progress. *Indust. Biotechnol.* 1, 38–50. doi: 10.1089/ind.2005.1.38
- Yachdav, G., Kloppmann, E., Kajan, L., Hecht, M., Goldberg, T., Hamp, T., et al. (2014). PredictProtein—an open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acids Res.* 42, W337–W343. doi: 10.1093/nar/gku366
- Yakimov, A. P., Afanaseva, A. S., Khodorkovskiy, M. A., and Petukhov, M. G. (2016). Design of Stable α -Helical Peptides and Thermostable Proteins in Biotechnology and Biomedicine. *Acta Nat.* 8, 70–81.
- Zhou, X. X., Wang, Y. B., Pan, Y. J., and Li, W. F. (2008). Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. *Amino Acids* 34, 25–33. doi: 10.1007/s00726-007-0589-x
- Zou, J., Song, B., Simmerling, C., and Raleigh, D. (2016). Experimental and computational analysis of protein stabilization by Gly-to-d-Ala substitution: a convolution of native state and unfolded state effects. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 15682–15689. doi: 10.1021/jacs.6b09511

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Díaz, Díaz-Godínez, Anducho-Reyes, Mercado-Flores and Herrera-Zúñiga. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

APÉNDICES

Apéndice Mecanismo de Actividad

Apéndice COLVARS

Apéndice Min

Apéndice Run

Apéndice Distancia

Apéndice PB-DF

Apéndice MM/PBSA

Apéndice PCA

Apéndice Secuencia

Apéndice Topo-2D

Apéndice Mecanismo de Actividad

Aunque el mecanismo de la reacción no se conoce con exactitud, se acepta que la Lacasa actúa como una batería, acumulando los electrones de la oxidación secuencial de cuatro moléculas de sustrato y transfiriéndolos de dos en dos al oxígeno molecular, antes de liberar sus dos moléculas de agua como subproducto.

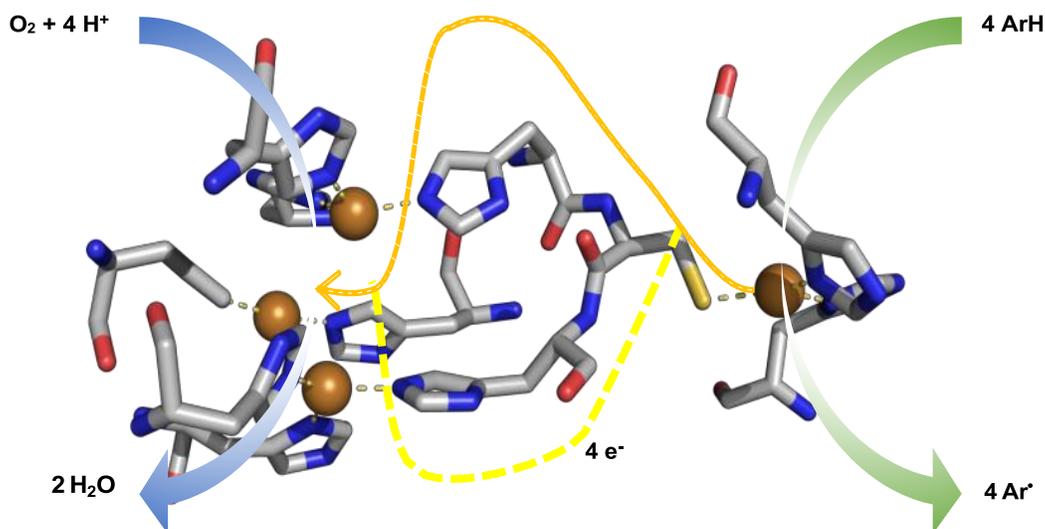


Figura 1a. Mecanismo catalítico de la enzima lacasa. Se puede apreciar los cobres y residuos que coordinan a éstos, La línea en color amarillo pretende describir la ruta de transferencia de electrones que se da desde el cobre Cu-T₁ al centro trinuclear.

Después de ser sustraídos los cuatro electrones de cuatro moléculas de sustrato, éstos son transferidos al centro trinuclear. El modelo del ciclo catalítico de reducción del oxígeno molecular a agua se esquematiza en la **Figura 1a**. Sobre la **Figura 2a**, en estado de reposo los cuatro átomos de cobre están oxidados, con un grupo hidroxilo uniendo ambos Cu-T₃. La oxidación secuencial de cuatro moléculas de sustrato da paso a la forma reducida de la enzima, que reacciona con el oxígeno molecular y da lugar al intermediario peróxido, en el que dos átomos de cobre del centro trinuclear pasan a estar oxidados.

Acto seguido, tiene lugar la rotura del enlace O–O mediada por la transferencia de dos electrones generados por un par de átomos cobres anteriormente reducidos. Una vez generada la ruptura del oxígeno molecular se obtiene un intermediario, denominado “nativo” con el cual se interconecta al centro trinuclear. Una vez terminada la oxidación, el intermediario puede volver rápidamente a la forma reducida a través de la oxidación de otras cuatro moléculas de sustrato con lo cual se liberan dos moléculas de agua. En caso de la ausencia del sustrato reductor el intermediario nativo decae lentamente a su forma oxidada.

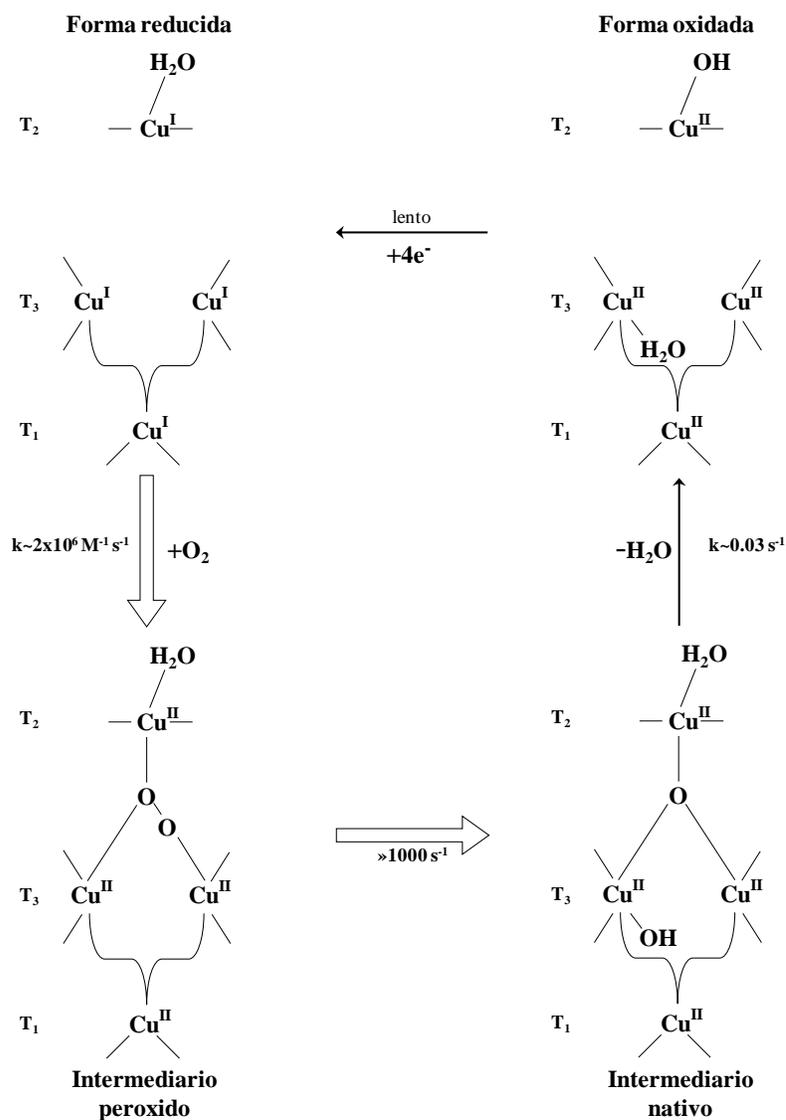


Figura 2a. Mecanismo de reducción del O₂ catalizado por la lacasa. Jones et al, 2015 [16].

Apéndice COLVARS

```
colvar {
  name          cuA1
  distance {
    group1 {      atomnumbers { 7496 }
    group2 {      atomnumbers { 1001 }
    }
  }
}

colvar {
  name          cuA2
  distance {
    group1 {      atomnumbers { 7496 }
    group2 {      atomnumbers { 1639 }
    }
  }
}

colvar {
  name          cuA3
  distance {
    group1 {      atomnumbers { 7496 }
    group2 {      atomnumbers { 6830 }
    }
  }
}

colvar {
  name          cuB1
  distance {
    group1 {      atomnumbers { 7497 }
    group2 {      atomnumbers { 1667 }
    }
  }
}

colvar {
  name          cuB2
  distance {
    group1 {      atomnumbers { 7497 }
    group2 {      atomnumbers { 6802 }
    }
  }
}

colvar {
  name          cuB3
  distance {
    group1 {      atomnumbers { 7497 }
    group2 {      atomnumbers { 6029 }
    }
  }
}

colvar {
  name          cuC1
  distance {
    group1 {      atomnumbers { 7498 }
    group2 {      atomnumbers { 965 }
    }
  }
}

colvar {
  name          cuC2
  distance {
    group1 {      atomnumbers { 7498 }
    group2 {      atomnumbers { 5993 }
    }
  }
}

colvar {
```

```

        name                cuDA
        distance {
            group1 {          atomnumbers { 7499 }
            group2 {          atomnumbers { 6814 }
            }
        }

colvar {
    name                cuDB
    distance {
        group1 {          atomnumbers { 7499 }
        group2 {          atomnumbers { 6893 }
        }
    }
}

colvar {
    name                cuDC
    distance {
        group1 {          atomnumbers { 7499 }
        group2 {          atomnumbers { 5937 }
        }
    }
}

colvar {
    name                cuAB
    distance {
        group1 {          atomnumbers { 7496 }
        group2 {          atomnumbers { 7497 }
        }
    }
}

colvar {
    name                cuAC
    distance {
        group1 {          atomnumbers { 7496 }
        group2 {          atomnumbers { 7498 }
        }
    }
}

colvar {
    name                cuBC
    distance {
        group1 {          atomnumbers { 7497 }
        group2 {          atomnumbers { 7498 }
        }
    }
}

harmonic {
    colvars cuDA cuDB cuDC
    centers { 0.0 0.0 0.0 }
    forceConstant 320.0
}

harmonic {
    colvars cuA1 cuA2 cuA3 cuB1 cuB2 cuB3 cuC1 cuC2
    centers { 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 }
    forceConstant 110.0
}

harmonic {
    colvars cuAB cuAC cuBC
    centers { 2.0 2.0 2.0 }
    forceConstant 55.0
}

```

Apéndice Min

```
#####
#CRIPCIÓN DEL TRABAJO                                ##
#####

# paso 1 minimización del h2o

#####
## ADJUSTABLE PARAMETERS                            ##
#####

#ENTRADA
structure                /charmm-gui/step2_solvator.psf
coordinates              /charmm-gui/step2_solvator.pdb
paraTypeCharmm          on;

#definition
parameters               ../charmm-gui/toppar/par_all36_prot.prm
parameters               ../charmm-gui/toppar/par_all36_na.prm
parameters               ../charmm-gui/toppar/par_all36_carb.prm
parameters               ../charmm-gui/toppar/par_all36_lipid.prm
parameters               ../charmm-gui/toppar/par_all36_cgenff.prm
parameters               ../charmm-gui/toppar/toppar_water_ions.str
parameters               ../charmm-gui/toppar/toppar_all36_na_nad_ppi.str
parameters               ../charmm-gui/toppar/toppar_all36_carb_glycolipid.str
parameters               ../charmm-gui/toppar/toppar_all36_carb_imalab.str
parameters               ../charmm-gui/cu/cu.prm

#continuing a job from restrart files
if {1} {
set inputname            minaha-h2oclbb.g188r.rest
binCoordinates           $inputname.coor
binVelocities            $inputname.vel
extendedSystem           $inputname.xsc
}

#SALIDA
set output               minfap298-h2oclbb.g188r
outputname               $output

DCDfile                  ${output}.cdc
xstfile                  ${output}.xst
DCDfreq                 1000
xstfreq                 1000
restartname              ${output}.rest
restartfreq              1000    # 500 step = cada 1ps
outputEnergies           1000    # 100 step = cada 0.2ps
outputPressure           1000
DCDUnitcell             yes
outputtiming              1000    # muestra el tiempo x step y el tiempo para completar 1000

#####
## SIMULATION PARAMETERS                            ##
#####

#PARAMETROS F-F
exclude                  scaleDA-4
switching                on
1-4scaling               1.0
switchdist               10.0
cutoff                   12.0
pairlistdist             12.5
```

```

#PARAMETROS INTEGRADORES
firsttimestep      0
timestep           1.0 # 2fs/step
stepspercycle      8
nonbondedfreq      2
fullElectFrequency 4
rigidBonds         all # necesario para 2fs/step

#CONDICIONES DE PBC
#NOTE: Do not set the periodic cell basis if you have also
#specified an .xsc restart file!
if {0} {
cellBasisVector1   88.03900146484375    0    0
cellBasisVector2   0    87.76399993896484    0
cellBasisVector3   0    0    88.05500030517578
cellOrigin          0.08094625920057297 0.043875791132450104 0.03236735612154007
}

wrapAll            on
wrapNearest        on    # (SOLO CON PBC)

#PME (PARA CALCULO ELECTROSTATICO COMPLETO)
if {1} {
PME                yes
PMEGridSizeX       100
PMEGridSizeY       100
PMEGridSizeZ       100
}

#CONTROL DE LA TEMPERATURA (T = CTE)
set temperature     298
#temperature        $temperature

langevin            on    # Para hacer una dinámica de Langevin, off con Minimización
langevinDamping     5    # coeficiente de Langevin (gamma) de 5/ps
langevinTemp        $temperature
langevinHydrogen    no    # no acopla los hidrógenos al baño de lagevin

#CONTROL DE LA PRESION (P = CTE, V = NO CTE)
if {1} {
useGroupPressure    yes    # necesario para 2fs steps
useFlexibleCell     no    # no para caja de agua, yes para membrana
useConstantArea     no    # no para caja de agua, yes para membrana

langevinPiston      on
langevinPistonTarget 1.01325 # un bar -> 1 atm
langevinPistonPeriod 100
langevinPistonDecay 50
LangevinPistonTemp  $temperature
}

#####
## EXTRA PARAMETERS ##
#####

FixedAtoms          on
FixedAtomsFile      g188r.sa.ref
FixedAtomsCol       0
FixedAtomsForces    off # si p = cte

#####
## ##
#####
#MINIMIZACION
minimize            100000

```

Apéndice Run

```
#####
## DESCRIPTION DEL TRABAJO ##
#####

# paso 1 minsteps para todo el sistema

#####
## ADJUSTABLE PARAMETERS ##
#####

#ENTRADA
structure /LUSTRE/home/quimica/aha/trametes-10A/wttv/charmm-
gui/wttv.aha.namd.psf
coordinates /LUSTRE/home/quimica/aha/trametes-10A/wttv/charmm-gui/wttv.aha.pdb
parameters /LUSTRE/home/quimica/aha/trametes-10A/par_all27_prot_na_cu.prm
paraTypeCharmm on

#continuing a job from restart files
if {1} {
set inputname aharun_f_323.wttv
binCoordinates $inputname.rest.coor
binVelocities $inputname.rest.vel
extendedSystem $inputname.rest.xsc
}

#SALIDA
set output aharun_g_323.wttv
outputname $output

DCDfile ${output}.cdc
xstfile ${output}.xst
DCDfreq 1000
xstfreq 1000
restartname ${output}.rest
restartfreq 1000 # 500 step = cada 1ps
outputEnergies 1000 # 100 step = cada 0.2ps
outputPressure 1000
DCDUnitcell yes
outputtiming 1000 # muestra el tiempo x step y el tiempo para completar 1000

#####
## SIMULATION PARAMETERS ##
#####

#PARAMETROS F-F
exclude scaledA-4
switching on
1-4scaling 1.0
switchdist 10.0
cutoff 12.0
pairlistdist 12.5

#PARAMETROS INTEGRADORES
firsttimestep 0
timestep 1.0 # 2fs/step
stepspercycle 8
nonbondedfreq 2
fullElectFrequency 4
rigidBonds all # necesario para 2fs/step
margin 1
```

```

#CONDICIONES DE PBC
#NOTE: Do not set the periodic cell basis if you have also
#specified an .xsc restart file!
if {0} {
cellBasisVector1
cellBasisVector2
cellBasisVector3
cellOrigin
}
wrapAll                on
wrapNearest            on      # (SOLO CON PBC)

#PME (PARA CALCULO ELECTROSTATICO COMPLETO)
if {1} {
PME                    yes
PMEGridSizeX          100
PMEGridSizeY          100
PMEGridSizeZ          100
}

#CONTROL DE LA TEMPERATURA (T = CTE)
set temperature        323.15

langevin               on      # Para hacer un dinamica de Langevin, off con Mimimization
langevinDamping        5      # coeficiente de Langevin (gamma) de 5/ps
langevinTemp           $temperature
langevinHydrogen       no      # no acopla los hidrógenos al baño de lagevin

#CONTROL DE LA PRESION (P = CTE, V = NO CTE)
if {1} {
useGroupPressure       yes     # necesario para 2fs steps
useFlexibleCell        no      # no para caja de agua, yes para membrana
useConstantArea        no      # no para caja de agua, yes para membrana

langevinPiston         on
langevinPistonTarget   1.01325 # un bar -> 1 atm
langevinPistonPeriod   100
langevinPistonDecay    50
LangevinPistonTemp     $temperature
}

#####
## EXTRA PARAMETERS ##
#####

colvars                on
colvarsConfig          /LUSTRE/home/quimica/aha/trametes-10A/wttv/dm/colvars.tcl

#####
## EXECUTION SCRIPT ##
#####

#Dinamica Molecular
run                    1000000      ;#5000ps -> 5ns

```

Apéndice Distancia

```
distance "resid 188 and protein and name NH1 NH2" "resid 14 and protein and  
name ODA ODB" 10 e188r-asp14-298_r.dat e188r-asp14-298_d.dat
```

distance.tcl

```
proc distance {seltext1 seltext2 N_d f_r_out f_d_out} {  
  set sel1 [atomselect top "$seltext1"]  
  set sel2 [atomselect top "$seltext2"]  
  set nf [molinfo top get numframes]  
  
  #####  
  # Loop over all frames. #  
  #####  
  set outfile [open $f_r_out w]  
  for {set i 0} {$i < $nf} {incr i} {  
    puts "frame $i of $nf"  
    $sel1 frame $i  
    $sel2 frame $i  
    set com1 [measure center $sel1 weight mass]  
    set com2 [measure center $sel2 weight mass]  
    set simdata($i.r) [veclength [vecsub $com1 $com2]]  
    puts $outfile "$i $simdata($i.r)"  
  }  
  
  close $outfile  
  #####  
  # Obtain the distribution. #  
  #####  
  set r_min $simdata(0.r)  
  set r_max $simdata(0.r)  
  for {set i 0} {$i < $nf} {incr i} {  
    set r_tmp $simdata($i.r)  
    if {$r_tmp < $r_min} {set r_min $r_tmp}  
    if {$r_tmp > $r_max} {set r_max $r_tmp}  
  }  
  set dr [expr ($r_max - $r_min) / ($N_d - 1)]  
  for {set k 0} {$k < $N_d} {incr k} {  
    set distribution($k) 0  
  }  
  for {set i 0} {$i < $nf} {incr i} {  
    set k [expr int(($simdata($i.r) - $r_min) / $dr)]  
    incr distribution($k)  
  }  
  set outfile [open $f_d_out w]  
  for {set k 0} {$k < $N_d} {incr k} {  
    puts $outfile "[expr $r_min + $k * $dr] $distribution($k)"  
  }  
  
  close $outfile  
  #####  
}
```

Apéndice PB-DF

La aproximación de Poisson Boltzman (**PB**) describe las interacciones electrostáticas de un soluto en un disolvente continuo. El soluto se representa como un modelo atómico usando un campo de fuerzas de mecánica molecular, mientras que el disolvente se trata como un continuo sin estructura. El tratamiento continuo representa el soluto como un cuerpo dieléctrico cuya forma está definida por las coordenadas atómicas y los radios de las cavidades atómicas. El soluto, por algunas cargas puntuales, produce un campo electrostático en la región del disolvente. Este campo electrostático puede ser calculado resolviendo la ecuación LPB, mostrada en la **ecuación 16**.

Para biomoléculas de forma arbitraria, la solución de la ecuación 18 puede ser obtenida solamente de manera numérica, típicamente a través de diferencias finitas, discretizando la ecuación LPB. En este método se transforma una porción del espacio continuo en una matriz discreta, compuesta de puntos que están espaciados por una determinada cantidad h entre primeros vecinos como sigue

$$\begin{aligned} h^3 q(i, j, k) = & -h^{-2} \varepsilon_i(i-1, j, k) [\phi(i-1, j, k) - \phi(i, j, k)] \\ & -h^{-2} \varepsilon_i(i, j, k) [\phi(i+1, j, k) - \phi(i, j, k)] \\ & -h^{-2} \varepsilon_j(i, j-1, k) [\phi(i, j-1, k) - \phi(i, j, k)] \\ & -h^{-2} \varepsilon_j(i, j, k) [\phi(i, j+1, k) - \phi(i, j, k)] \\ & -h^{-2} \varepsilon_k(i, j, k-1) [\phi(i, j, k-1) - \phi(i, j, k)] \\ & -h^{-2} \varepsilon_k(i, j, k) [\phi(i, j, k+1) - \phi(i, j, k)] \\ & + \kappa'^2 \phi(i, j, k) \end{aligned}$$

donde, h es el tamaño de malla en cada dimensión, i, j y k es la indexación de la malla a lo largo de los ejes x, y, z , $\varepsilon_{i,j,k}(i, j, k)$ es a la constante dieléctrica entre los puntos (i, j, k) y $(i+1, j, k)$ de la malla respectivamente. Todo lo relacionado a los coeficientes de Boltzmann se encuentran absorbidos en κ'^2 , y $q(i, j, k)$ es la carga centrada en un volumen cubico situada en (i, j, k) .

Apéndice MM/PBSA

```
* MM/PBSA80.inp
*
*

bomlev -2
set runs 1

! Read topology and parameter files
stream ../toppar.str

! Read PSF and Coordinates
open read unit 15 card name "../estructuras/a71k.psf"
read psf unit 15 card

open read unit 10 card name "../estructuras/a71k.crd"
read coor unit 10 card

!cons fix sele none end
update cutnb 70.0

energy
coor copy comp

set open 20
open read unit @open uniform name "aharun_298.a71k_noions.dcd"

! Get trajectory file parameters
set skip 1 ! = 5000 frames

! MM-PBSA Analysis
traj iread 20 nunits 1 skip 1

set a 1
set b 501

set dcel 0.40 ! Grid spacing variable for PB equation solution

! MM-PBSA equation
! G = + + - TdS
set emm 0 ! Solute internal energy
set inte 0 ! ENER - VDW - ELEC
set exte 0 ! VDW + ELEC
set dgpb 0 ! solvation free energy from finite difference PB eq
set dgasa 0 ! nonpolar contribution to solvation free energy
set n 0 ! snapshot counter
set temp 298.15 ! temperatura por sistema
set conc 0.15 ! concentración de sal

nbonds ! set up nonbond list (defaults from parameter set used)

system "touch ahat1.a71k.dat"
open append CARD UNIT 15 NAME ahat1.a71k.dat

label trajloop

traj read

! Emm
energy
calc emm = ?ener
calc exte = ?elec + ?vdw
calc inte = ( ?ener - ?elec - ?vdw )
```

```

! Gasa Gasa = 0.00542 * ASA + 0.92
coor surf rprobe 1.4
calc dgasa = ( 0.00542 * ?area + 0.92 )

! Gpb Finite difference PB eq
! Establish grimensions
coor stat

set x ?xmin
let x = abs @x
let x = maxi @x ?xmax
calc x = 2 * ( 5 + @x )

set y ?ymin
let y = abs @y
let y = maxi @y ?ymax
calc y = 2 * ( 5 + @y )

set z ?zmin
let z = abs @z
let z = maxi @z ?zmax
calc z = 2 * ( 5 + @z )

calc x = @x / @dcel
calc xcel = int( @x )
if @xcel lt @x incr xcel by 1
incr xcel by 1

calc y = @y / @dcel
calc ycel = int( @y )
if @ycel lt @y incr ycel by 1
incr ycel by 1

calc z = @z / @dcel
calc zcel = int( @z )
if @zcel lt @z incr zcel by 1
incr zcel by 1

pbeq
scalar wmain = radius

solve dcel @dcel nclx @xcel ncly @ycel nclz @zcel maxit 1000 -
epsw 78.54 epsp 2.0 conc @conc temp @temp watr 1.4 intbp
set ener78 = ?enpb

solve dcel @dcel nclx @xcel ncly @ycel nclz @zcel maxit 1000 -
epsw 1.0 epsp 2.0 temp @temp watr 1.4 intbp
set ener1 = ?enpb

calc dgpb = (@ener78 - @ener1)

end

open append card unit 15 name ahat1.a71k.dat
write title unit 15
* @a @emm @inte @exte @dgpb @dgasa

incr n by 1
incr a by 1
if a le @b goto trajloop

stop

```

Apéndice PCA

```
Carma.run -v -w -fit -atmid HEAVY -first 20000 -segid PROA
../1308e/dm/faprun_all_323.1308e_dry.dcd ../1308e.aha323-dry.charmm.psf
mv carma.fitted.dcd HEAVY.dcd
mv carma.selected_atoms.psf 1308e.heavy.psf
Carma.run -v -w -col -cov -eigen -proj 5 3 323 HEAVY.dcd 1308e.heavy.psf

#####
awk '{if ($2==1) print $1,$3,$4,$5}' carma.clusters.dat > C_01.dat
Carma.run -v -atmid HEAVY -sort C_01.dat HEAVY.dcd
Carma.run -v -w -fit -atmid HEAVY -segid PROA carma.reordered.dcd 1308e.heavy.psf
#carma.run carma.fitted.dcd /home/leonardo/Desktop/Lacasa/wttv.heavy.psf
mv carma.fitted.dcd cluster_01.dcd
Carma.run -v -w -col -cov -dot -atmid HEAVY -super cluster_01.dcd 1308e.heavy.psf
Carma.run -v -w -col -cov -dot -atmid HEAVY -norm cluster_01.dcd 1308e.heavy.psf
mv carma.average.pdb carma.average-cluster_01.pdb
mv carma.superposition.pdb carma.superposition-cluster_01.pdb

#####
awk '{if ($2==2) print $1,$3,$4,$5}' carma.clusters.dat > C_02.dat
Carma.run -v -atmid HEAVY -sort C_02.dat HEAVY.dcd
Carma.run -v -w -fit -atmid HEAVY -segid PROA carma.reordered.dcd 1308e.heavy.psf
#Carma.run carma.fitted.dcd 1308e.heavy.psf
mv carma.fitted.dcd cluster_02.dcd
Carma.run -v -w -col -cov -dot -atmid HEAVY -super cluster_02.dcd 1308e.heavy.psf
Carma.run -v -w -col -cov -dot -atmid HEAVY -norm cluster_02.dcd 1308e.heavy.psf
mv carma.average.pdb carma.average-cluster_02.pdb
mv carma.superposition.pdb carma.superposition-cluster_02.pdb

#####
awk '{print $2}' carma.PCA.fluctuations.dat | sort -n | tail -1
awk '{print $2}' carma.PCA.fluctuations.dat | sort -n | head -1
Carma.run -verb -write -col -cov -eigen -play 1 cluster_01.dcd 1308e.heavy.psf
Carma.run -v -w -pdb -step 29 carma.play.dcd 1308e.CA.psf
cat carma.play.dcd.*.pdb > carma.eigen-cluster_01.pdb
rm -rf carma.play.dcd.*.pdb

#####
awk '{print $3}' carma.PCA.fluctuations.dat | sort -n | tail -1
awk '{print $3}' carma.PCA.fluctuations.dat | sort -n | head -1
Carma.run -verb -write -col -cov -eigen -play 2 cluster_02.dcd 1308e.heavy.psf
Carma.run -v -w -pdb -step 10 carma.play.dcd 1308e.CA.psf
cat carma.play.dcd.*.pdb > carma.eigen-cluster_02.pdb
rm -rf carma.play.dcd.*.pdb
```

Apéndice Secuencia

> Y049725.1

AIGPVASFVVANAPVSPDGFLRDAIVVNGVVPSPLIRAKKGRFQLNVVDTLTNHSMLKSTSI
HWHGFFQAGTNWADGPAFVNQCPIASGHSFLYDFHVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFFV
YDPKDPHASRYDVDNESTVITLTDWYHTAARLGPRFPLGADATVINGLGRSASTPTAALAVIN
VQH GKRYRFRLVSI SCDPNYTFSIDGHNLTVIEVDGINSQPLLVDSIQIFAAQRYSFVLNANQ
TVGNYWVRANPNFGTVGFAGGINSAILRYQGAPVAEPTTTQTPSVIPLIETNLHPLARMPVPG
TRTPGGVDKALKLAFNFNGTNFFINNASFTPPTVPVLLQILSGAQTAEQLLPAGSVYPLPAHS
TIEITLPATALAPGAPHPFHLHGHAFAVRSAGSTTYNYNDPIFRDVVSTGTPAAGDNVTIRF
QTDNLGPWFLHCHIDFHLEAGFAIVFAEDVADVKAANPVPKAWSDLCPIYDGLSEADQ

Apéndice Topo-2D

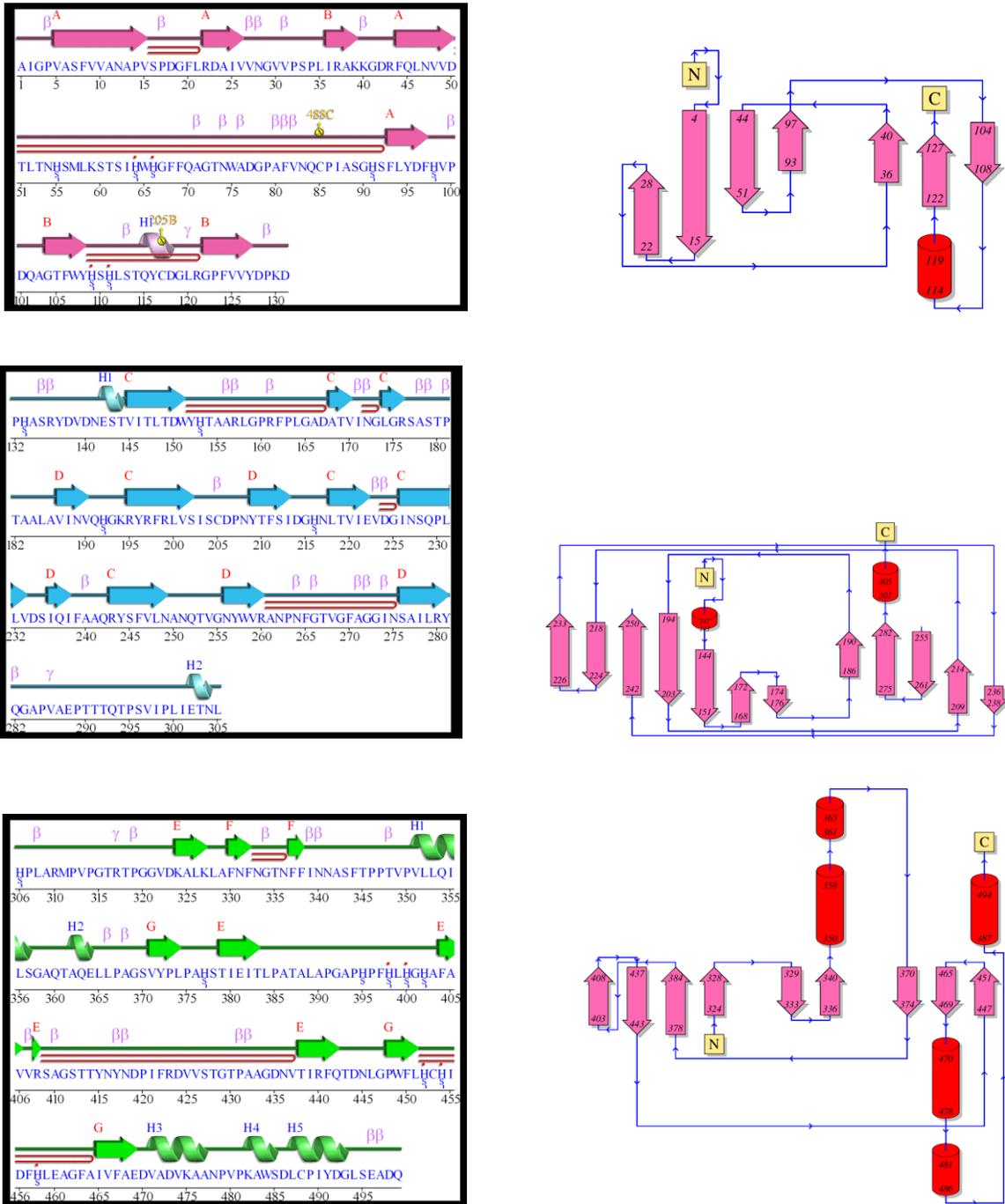


Figura 3a. Esquematación del ordenamiento topológico para la enzima la lacasa wtTv. En color Rosa Dominio A. En Azul Dominio B, y en Azul Dominio C. Paneles derechos arreglo topológico, paneles izquierdos organización de la estructura secundaria.

Acta y Constancia de Examen



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00154

Matrícula: 206180410

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD INDUCIDA A TRAVÉS DE PUENTES SALINOS INTERDOMINIO: UN ESTUDIO DE LA ENZIMA LACASA DE *Trametes versicolor*.

19 DIC 2018
COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES



LEONARDO DAVID HERRERA ZUÑIGA
ALUMNO

REVISÓ

DR. JOSÉ ANTONIO DE LOS REYES HEREDIA
SECRETARIO GENERAL

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA

VOCAL

DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ CARDOZA

VOCAL

DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ

VOCAL

CANCELADO
DRA. NINA PASTOR COLON

SECRETARIO

DR. RAFAEL ARTURO ZUBILAGA LUNA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 17 del mes de diciembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA
DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ CARDOZA
DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ
DRA. NINA PASTOR COLON
DR. RAFAEL ARTURO ZUBILAGA LUNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: LEONARDO DAVID HERRERA ZUÑIGA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTOR EN CIENCIAS (QUIMICA) del alumno LEONARDO DAVID HERRERA ZUÑIGA, matrícula 206180410, quien cumplió con los 312 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha diecisiete de diciembre del 2018 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD INDUCIDA A TRAVÉS DE PUENTES SALINOS INTERDOMINIO: UN ESTUDIO DE LA ENZIMA LACASA DE *Trametes versicolor*.

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 180 créditos y el programa consta de 483 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

JURADO

Presidente

Secretario

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA

DR. RAFAEL ARTURO ZUBILAGA LUNA

Vocal

Vocal

DR. ARTURO ROVO DOMINGUEZ

DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ
 CARDOZA

Vocal

DRA. NINA PASTOR COLON