

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



**EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE LA PEROXIDASA
VERSÁTIL DE *PLEUROTUS ERYNGII* EN *SACCAROMYCES
CEREVISIAE***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Eva García Ruiz

Bajo la dirección de los doctores

Miguel Alcalde Galeote
Ángel Tomás. Martínez Ferrer

Madrid, 2013

**EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE LA
PEROXIDASA VERSÁTIL DE *Pleurotus eryngii*
EN *Saccharomyces cerevisiae***

MEMORIA

para optar al grado de Doctora por la Universidad Complutense de Madrid
presentada por:

EVA GARCÍA RUIZ

DIRECTORES:

Dr. Miguel Alcalde Galeote y Dr. Ángel T. Martínez Ferrer

Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP)

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB)

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid



TUTORA:

Dra. Covadonga Vázquez Estévez

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología III
Universidad Complutense de Madrid



MADRID, 2012



**MIGUEL ALCALDE GALEOTE, DR. EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, CIENTÍFICO
TITULAR DEL CSIC Y ÁNGEL T. MARTÍNEZ FERRER, DR. EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS, PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL CSIC,**

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo "*Evolución molecular dirigida de la peroxidasa versátil de Pleurotus eryngii en Saccharomyces cerevisiae*", constituye la Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Alcalá, Eva García Ruiz para optar al grado de Doctora y ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Biocatálisis del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica y en el Departamento de Biología Medioambiental del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC.

Y para que conste, firman el presente certificado en Madrid, a 16 de Julio de 2012.

Miguel Alcalde Galeote

Ángel T. Martínez Ferrer

A mis padres

A mi hermana

*“Ningún descubrimiento se haría ya
si nos contentáramos con lo que sabemos”*

Lucio Anneo Seneca

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el Instituto de Catálisis y Petroleoquímica y en el Centro de Investigaciones Biológicas ambos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Este trabajo ha sido cofinanciado por los proyectos europeos: “*White biotechnology for added value products from renewable plant polymers: Design of taylor-made biocalysis and new industrial bioprocesses*” (Ref. BIORENEW, NMP2-CT-2006-026456), “*Three-dimensional nanobiostructure-based self-contained devices for biomedical applications*” (Ref. 3D-NANOBIODEVICE, NMP4-SL-2009-229255), “*Robust and novel biocatalysts for industrial applications*” (Ref. PEROXICATS, FP7-KBBE-2010-4); por la Red Europea COST (“*Cascade chemo-enzymatic processes: new synergies between chemistry and biochemistry*” (Ref. CASCAT, CM0701); y por el proyecto del Plan Nacional “*Evolución molecular dirigida de factorías celulares ligninolíticas en Saccharomyces cerevisiae. Aplicaciones medioambientales, industriales y energéticas*” (EVOFACEL, Ref: BIO2010-19697).

La realización de esta Tesis ha sido una experiencia enriquecedora que me ha permitido crecer personal y profesionalmente. Son muchas las personas que, de una forma u otra, han intervenido en este proceso sin las que no podría haber llegado al final y a las que me gustaría mostrar mi agradecimiento:

A mis directores de Tesis, los Dres. Miguel Alcalde y Ángel T. Martínez, por darme la oportunidad de formar parte de sus grupos de investigación y confiar en mí, por su dedicación, paciencia y esfuerzo, sobretodo en la fase de escritura.

A la Dra. Covadonga Vázquez, tutora de esta Tesis y a los Dres. Belén Patiño y Juan Carlos Gutiérrez, del Dpto. de Microbiología III de la Universidad Complutense de Madrid, por ayudarme con los trámites burocráticos de la Tesis.

Al Dr. F. Javier Ruiz por las muestras de VP cedidas y por compartir sus conocimientos y consejos sobre la VP. Por su buen humor y amabilidad.

A la Dra. M^a Jesús Martínez por sus consejos, amabilidad y cercanía.

A los Drs. Antonio Ballesteros y Francisco Plou, por su orientación y consejos, por su amabilidad y porque siempre están dispuestos a ayudar.

A la Dra. Susana Camarero, por sus consejos y su amistad. Por los buenos momentos compartidos durante los primeros ciclos de evolución.

A los Dr. Roland Ludwig y Dietmar Haltrich, de la *University of Natural Resources and Applied Life Sciences*, de Viena (Austria) por aceptarme y acogerme, durante una estancia predoctoral, en su grupo de investigación.

Al Dr. Manolo Ferrer, del ICP, por los análisis de la secuencia N-terminal. A la Dra. Vivian de los Ríos, del CIB, por los análisis de espectrometría de masas. Al Dr. Francisco García Tabares, del CIB, por los análisis de geles bidimensionales. Al servicio de Química de Proteínas del CIB por la síntesis de oligonucleótidos.

A mis compañeros del ICP con los que he pasado tan buenos momentos y que siempre están dispuestos a ayudarme. A Miguel Alcalde que ha confiado en mí, por su apoyo, su amistad y por contagiarme su optimismo y buen humor. A Diana, David y Patricia, mis compis de evolución, por sus bromas y chistes, buen humor, optimismo, por animarme continuamente y por ayudarme siempre que lo he necesitado aún cuando no se lo había pedido ☺, por ser tan buenos compañeros de laboratorio y hacer que las interminables tardes en el laboratorio sean divertidas y agradables. A Lucía y Bárbara por los ratos de risas y bromas tanto dentro como fuera del laboratorio, por su optimismo. A Pamela por su ayuda durante mi estancia en Viena, pero sobretodo por su amistad y alegría y por los buenos momentos pasados dentro y fuera del laboratorio. A Gina y Guillermo por dar siempre otro punto de vista y acercarnos su cultura (en especial la culinaria). A Javier y Bernardo que aunque acaban de llegar al grupo se están adaptando perfectamente. A toda la gente que durante este tiempo ha pasado por el laboratorio y con los que he compartido buenos momentos: Paloma, Rafa, Alina, Julia, Laura, Mohammad, Mike, Belén, Adi, Elisa, Berta, Carlos, Ivanna, Paulina, Paula y Cecilia. A los compañeros del Dpto. de Biocatálisis: Antonio, Víctor, Marcos, Cristina, Oscar, Mercedes, Nieves, Manolo, Mónica, Rafa, María, Álvaro, Ana Bahamonde, Fernando, etc. por darme ánimos y por los buenos momentos compartidos. A todo el personal del centro: biblioteca, almacén, secretaría, mantenimiento, unidad de apoyo, las chicas de la limpieza, etc. que han facilitado mi trabajo durante estos años.

A mis compañeros del CIB con los que he compartido los primeros años de Tesis y con los que he pasado tan buenos momentos. A Ana Cañas por su ayuda en mis comienzos y por su amistad. A María y Elvira, porque siempre estaban dispuestas a ayudar. A Aitor, Miguel y Davinia por los ratos de risas. A M^a José y Bea por su simpatía y sus ánimos. A los demás con los que he compartido buenos momentos: Isa, Vero, Elena, Marta, Alicia, Víctor, Lola, Yuta, Isabel Vicente, Mariu, Úrsula, Craig, Deborah, Cecilia, Bea, Gisela, Mario, Rosario, Rober, Houde, Ángeles, Patricia y Mariela. A todo el personal de los servicios generales del CIB: biblioteca, almacén, compras, secretaría, química de proteínas, secuenciación de DNA, proteómica y genómica, informática, esterilización, las chicas de la limpieza, etc. que han facilitado mi trabajo durante estos años.

A todos mis compañeros de laboratorio de Viena: Christoph, Roman, Vanja, Cindy, Victoria, Kawa,...por su ayuda. También darles las gracias a Teri, Anna, Joan, Stefan y Laura por los buenos momentos compartidos y hacer que mi estancia fuera inolvidable.

También quería darles las gracias a todos los *partners* de los proyectos europeos en los que he estado involucrada por las reuniones y conversaciones de las que tanto he aprendido.

A mis amigas de la carrera: Cristina, Maribel, Vero y Laura, por su amistad y apoyo, por animarme continuamente y por ofrecerme otro punto de vista.

A Ruth, Ana, Leti, Nere, Isa y Juli por su amistad, por todos los buenos momentos de cañitas, tapas, viajes, conciertos, etc. por escuchar mis penas y alegrías y en definitiva por estar siempre ahí.

A mis padres, porque han dedicado todo su tiempo y esfuerzo para que mi hermana y yo tengamos la oportunidad de elegir y alcanzar nuestros objetivos. Por su amor y cariño incondicional. Por su paciencia. A mi hermana, por su apoyo y comprensión, por estar siempre dispuesta a escucharme y ayudarme, por sus ánimos, por los buenos momentos compartidos y esos grandes viajes que tan bien me sientan ☺.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	VII
ABREVIATURAS	XV
SUMMARY.....	1
1 INTRODUCCIÓN	5
1.1 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS	7
1.2 PEROXIDASAS LIGNINOLÍTICAS	10
1.2.1 CLASIFICACIÓN DE LAS PEROXIDASAS LIGNINOLÍTICAS	10
1.2.2 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES GENERALES DE LAS PEROXIDASAS LIGNINOLÍTICAS	11
1.2.3 CICLO CATALÍTICO	15
1.2.4 PEROXIDASA VERSÁTIL	18
1.3 APLICACIONES DE LAS PEROXIDASAS	25
1.4 EXPRESIÓN DE PEROXIDASAS LIGNINOLÍTICAS	27
1.4.1 EXPRESIÓN DE LA VP	31
1.5 EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA	32
1.5.1 <i>S. cerevisiae</i> COMO HOSPEDADOR Y HERRAMIENTA MOLECULAR PARA LA EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE OXIDORREDUCTASAS LIGNINOLÍTICAS	34
1.5.2 GENERACIÓN DE DIVERSIDAD	37
1.5.3 MÉTODOS DE CRIBADO	39
1.5.4 EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS HACIA EXPRESIÓN FUNCIONAL	40
1.5.5 EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE PEROXIDASAS	42
2 OBJETIVOS	45
3 MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1 REACTIVOS, COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO, ENZIMAS COMERCIALES Y KITS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	51
3.2 GEN PARENTAL DE LA VP DE <i>P. eryngii</i>	54
3.3 MICROORGANISMOS	54
3.3.1 LEVADURAS.....	54
3.3.2 BACTERIAS.....	54
3.4 VECTORES PLASMÍDICOS	55

3.4.1	pFLAG1- <i>vpl2</i> (IBI).....	55
3.4.2	pGAPZ α A (Invitrogen).....	55
3.4.3	pJRoC30 (Novozymes).....	55
3.5	MEDIOS DE CULTIVOS Y SOLUCIONES	56
3.5.1	MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>E. coli</i>	56
3.5.2	MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>S. cerevisiae</i>	57
3.5.3	SOLUCIONES Y TAMPONES.....	60
3.6	MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE ORGANISMOS.....	61
3.6.1	MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE LEVADURAS	61
3.6.2	MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE BACTERIAS.....	61
3.7	OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	62
3.7.1	AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO DE BACTERIAS	62
3.7.2	AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO DE LEVADURAS.....	62
3.7.3	ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	62
3.7.4	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA	63
3.7.5	OLIGONUCLEÓTIDOS	64
3.7.6	SECUENCIACIÓN DE DNA Y ANÁLISIS DE SECUENCIA.....	64
3.7.7	CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pJ α <i>vpl2</i>	66
3.7.8	LINEARIZACIÓN DEL PLÁSMIDO pJ α <i>vpl2</i> PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LAS GENOTECAS DE MUTANTES	69
3.8	PREPARACIÓN DE CÉLULAS ULTRACOMPETENTES DE DH5α DE <i>E.coli</i>..	69
3.9	TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS	70
3.9.1	TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS.....	70
3.9.2	TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS	70
3.10	EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN LEVADURAS.....	71
3.10.1	EXPRESIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PARENTAL α <i>vpl2</i> EN <i>S. cerevisiae</i>	71
3.10.2	EXPRESIÓN DE LA VP EN <i>S. cerevisiae</i>	74
3.11	EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE PEROXIDASAS.....	75
3.11.1	HERRAMIENTAS DE GENERACIÓN DE DIVERSIDAD.....	75
3.11.2	PRIMERA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA CON <i>Taq</i> POLIMERASA/MnCl ₂	79
3.11.3	SEGUNDA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA CON <i>Taq</i> POLIMERASA/MnCl ₂ E <i>in vivo</i> DNA SHUFFLING	80
3.11.4	TERCERA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA CON <i>Taq</i> POLIMERASA/MnCl ₂ E <i>in vivo</i> DNA SHUFFLING	80

3.11.5	CUARTA GENERACIÓN: <i>StEP</i> MUTAGÉNICO COMBINADO CON <i>in vivo</i> DNA SHUFFLING	80
3.11.6	QUINTA GENERACIÓN: ENSAMBLAJE <i>in vivo</i> DE GENOTECAS MUTAGÉNICAS CON DISTINTO ESPECTRO MUTACIONAL (IvAM).....	81
3.11.7	SEXTA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA CON <i>Taq</i> POLIMERASA/ MnCl ₂ E <i>in vivo</i> DNA SHUFFLING	82
3.12	ELIMINACIÓN DE LA EXTENSION EXTRA DEL EXTREMO N-TERMINAL..	82
3.12.1	SOE (<i>SPLICING BY OVERLAP EXTENSION</i>)	82
3.12.2	IVOE (<i>In Vivo OVERLAP EXTENSION</i>).....	85
3.13	PROTOCOLO DE HIGH-THROUGHPUT (HTP) SCREENING.....	86
3.13.1	OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DEL HTP-SCREENING.....	86
3.13.2	ENSAYOS DE HTP-SCREENING PARA ACTIVIDAD Y TERMOESTABILIDAD	87
3.13.3	RE-SCREENING	90
3.14	PURIFICACIÓN DE VP	92
3.15	CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS VP PURIFICADAS	93
3.15.1	VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	93
3.15.2	CÁLCULO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE ESTADO ESTACIONARIO	96
3.16	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS VP PURIFICADAS.....	97
3.16.1	ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES	97
3.16.2	DESGLICOSILACIÓN	98
3.16.3	DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR POR MALDI-TOF	98
3.16.4	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	99
3.16.5	ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	99
3.16.6	DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO	99
3.16.7	TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANA (WESTERN-BLOT)...	100
3.16.8	DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO DE ACTIVIDAD.....	100
3.16.9	DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD FRENTE AL pH.....	100
3.16.10	ESTABILIDAD FRENTE A TEMPERATURA	101
3.17	MODELADO MOLECULAR	102
4	RESULTADOS	103
4.1	CONSTRUCCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PARENTAL <i>αvpl2</i>	105
4.2	EXPRESIÓN FUNCIONAL HETERÓLOGA DE LA VP EN <i>S. cerevisiae</i>	106

4.2.1	TEST DE EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA VP.....	106
4.2.2	AJUSTE DE LAS CONDICIONES DE MICROFERMENTACION EN FORMATO PLACA DE 96 POCILLOS.....	107
4.2.3	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPRESIÓN DE VP EN MATRAZ.....	109
4.3	OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE HTP-SCREENING.....	111
4.3.1	SELECCIÓN DEL SUSTRATO PARA EL SCREENING DE ACTIVIDAD	111
4.3.2	VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE HTP-SCREENING.....	112
4.4	EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE VP	112
4.4.1	PRIMERA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA	113
4.4.2	SEGUNDA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA COMBINADA CON <i>in vivo</i> DNA SHUFFLING.....	115
4.4.3	TERCERA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA COMBINADA CON <i>in vivo</i> DNA SHUFFLING.....	118
4.4.4	CUARTA GENERACIÓN: <i>StEP</i> MUTAGÉNICO COMBINADO CON <i>in vivo</i> DNA SHUFFLING.....	121
4.4.5	QUINTA GENERACIÓN: ENSAMBLAJE <i>in vivo</i> DE GENOTECAS MUTAGÉNICAS CON DISTINTO ESPECTRO MUTACIONAL (IvAM)	125
4.4.6	SEXTA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA COMBINADA CON <i>in vivo</i> DNA SHUFFLING.....	129
4.5	ELIMINACIÓN DE LA SECUENCIA EXTRA DEL EXTREMO N-TERMINAL	133
4.6	PURIFICACIÓN DE LA VP	133
4.7	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS VP PURIFICADAS	136
4.7.1	MASA MOLECULAR Y DESGLICOSILACIÓN.....	136
4.7.2	ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO	138
4.7.3	DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO	138
4.7.4	DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DEL EXTREMO N-TERMINAL EN LA VP MADURA.....	139
4.8	DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE SECRECIÓN DE LA VP EN <i>S. cerevisiae</i>	140
4.9	CARACTERIZACIÓN CINÉTICA	140
4.10	DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO DE ACTIVIDAD	143
4.11	DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD FRENTE AL pH.....	144
4.12	ESTABILIDAD FRENTE A TEMPERATURA	146
4.12.1	DETERMINACIÓN DE LA T_{50}	146
4.12.2	DETERMINACIÓN DE LA VIDA MEDIA ($t_{1/2}$)	148

4.12.3	DETERMINACIÓN DE LA TERMOACTIVIDAD (T _a).....	148
5	DISCUSIÓN	149
5.1	EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA VP DE <i>P. eryngii</i> EN <i>S. cerevisiae</i>	151
5.1.1	CONSTRUCCIÓN DE <i>αvpl2</i>	151
5.1.2	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPRESIÓN DE LA VP	151
5.1.3	DISEÑO DEL ENSAYO DE <i>screening</i> de ACTIVIDAD Y TERMOESTABILIDAD	154
5.2	EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE LA VP	155
5.2.1	EVOLUCIÓN DIRIGIDA HACIA EXPRESIÓN FUNCIONAL	158
5.2.2	EVOLUCIÓN DIRIGIDA HACIA TERMOESTABILIDAD	159
5.3	ANÁLISIS DE LA EXTENSIÓN N-TERMINAL	160
5.4	CARACTERIZACIÓN DE LAS VP EXPRESADAS EN <i>S. cerevisiae</i>	164
5.5	ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS MUTACIONES	166
5.5.1	MUTACIONES INTRODUCIDAS DURANTE LA EVOLUCIÓN HACIA SECRECIÓN	167
5.5.2	MUTACIONES INTRODUCIDAS DURANTE LA EVOLUCIÓN HACIA TERMOESTABILIDAD	170
6	CONCLUSIONES	175
7	BIBLIOGRAFÍA	181
8	ANEXOS	201
8.1	ANEXO I.....	203
8.2	ANEXO II	207

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.1. Disposición relativa y estructura molecular de la lignina, hemicelulosa y celulosa en la pared celular de plantas vasculares.....	8
Figura 1.2. Estructura del grupo hemo tipo b (ferriprotoporfirina IX).....	12
Figura 1.3. Entorno del hemo.....	13
Figura 1.4. Entorno de los Ca ²⁺ estructurales.....	15
Figura 1.5. Ciclo catalítico resumido de las peroxidasas.....	16
Figura 1.6. Detalle de la ruptura heterolítica del H ₂ O ₂	17
Figura 1.7. Estructura de la VP de <i>P. eryngii</i>	20
Figura 1.8. Sitio de oxidación del Mn ²⁺ en la VP.	22
Figura 1.9. Representación del sitio de oxidación en el Trp164 superficial de la VP.	23
Figura 1.10. Ciclo catalítico de la VP.	24
Figura 1.11. Esquema de un ciclo típico de evolución molecular dirigida empleando <i>S. cerevisiae</i>	33
Figura 1.12. Técnicas de recombinación <i>in vivo</i> en <i>S. cerevisiae</i>	36
Figura 1.13. Ruta evolutiva artificial de la lacasa PM1 de alto potencial redox.....	41
Figura 3.1. PCR propensa a error.....	75
Figura 3.2. Esquema del <i>in vivo</i> DNA <i>shuffling</i> realizado en el 1 ^{er} , 2 ^o , 3 ^o y 6 ^o ciclo de evolución.....	77
Figura 3.3. Esquema de la técnica del <i>StEP</i> mutagénico combinada con <i>in vivo</i> DNA <i>shuffling</i> empleada en la 4 ^a generación.	78
Figura 3.4. Esquema de la técnica de IvAM empleada en la 5 ^a generación.	79
Figura 3.5. Esquema de los genes parentales utilizados para realizar el experimento de delección de la extensión N-terminal.	84
Figura 3.6. Esquema de la técnica de SOE empleada para la eliminación de la extensión N-terminal.	84
Figura 3.7. Esquema de la técnica de IVOE empleada para la eliminación de la extensión N-terminal.	85
Figura 3.8. Organización de una placa maestra de un experimento de evolución.	87

Figura 3.9. Esquema del protocolo de <i>screening</i> de actividad para los tres primeros ciclos de evolución dirigida.....	88
Figura 3.10. Esquema del protocolo de <i>screening</i> de estabilidad para los ciclos 4, 5 y 6 de evolución dirigida.....	89
Figura 3.11. Esquema del protocolo del 1 ^{er} re- <i>screening</i>	90
Figura 3.12. Esquema del protocolo del 2 ^o re- <i>screening</i>	91
Figura 3.13. Oxidación de ABTS por la VP.....	94
Figura 3.14. Oxidación de AV por la VP.....	94
Figura 3.15. Oxidación de RB5 por la VP.	95
Figura 3.16. Oxidación de DMP por la VP.	95
Figura 4.1. Protocolo seguido para la construcción de los plásmidos pGAPZ <i>avpl2</i> y pJR <i>avpl2</i>	105
Figura 4.2. Resultado del test de expresión en medio líquido.	107
Figura 4.3. Optimización del medio de expresión en microplaca.	109
Figura 4.4. Efecto de la concentración de hemoglobina bovina y la temperatura de incubación en el crecimiento y expresión de VP en matraz.....	110
Figura 4.5. Validación del método colorimétrico de <i>screening</i>	112
Figura 4.6. Paisaje del ensayo de <i>screening</i> de la primera generación.	113
Figura 4.7. Representación esquemática del primer ciclo de evolución dirigida.	114
Figura 4.8. Perfil evolutivo de la segunda generación.	115
Figura 4.9. Representación esquemática del segundo ciclo de evolución dirigida.	116
Figura 4.10. Perfil evolutivo de la tercera generación.....	118
Figura 4.11. Representación esquemática del tercer ciclo de evolución dirigida.	119
Figura 4.12. Paisajes evolutivos de la cuarta generación.	122
Figura 4.13. Determinación del valor T ₅₀ de los mutantes de la 4 ^a G.....	122
Figura 4.14. Representación esquemática del cuarto ciclo de evolución dirigida.	123
Figura 4.15. Paisajes evolutivos de la quinta generación.....	126
Figura 4.16. Determinación del valor de T ₅₀ de los mutantes de la 5 ^a G.	126
Figura 4.17. Representación esquemática del quinto ciclo de evolución.	127

Figura 4.18. Paisajes evolutivos de la sexta generación.....	129
Figura 4.19. Determinación del valor de T_{50} de los mutantes de la 6 ^a G.....	130
Figura 4.20. Representación esquemática del sexto ciclo de evolución.	130
Figura 4.21. Representación esquemática del proceso de evolución de la VP.	132
Figura 4.22. Cromatografía de intercambio aniónico fuerte de baja resolución (QFF).....	134
Figura 4.23. Cromatografía de intercambio aniónico fuerte de alta resolución (Q-Waters) 135	
Figura 4.24. Electroforesis SDS-PAGE de los pasos de purificación de la variante R4 (glicofoma II).	135
Figura 4.25. Análisis de desglicosilación mediante electroforesis SDS-PAGE.	136
Figura 4.26. Espectros de MALDI-TOF.	137
Figura 4.27. Características físico-químicas.	138
Figura 4.28. Gel bidimensional para la determinación del pI del mutante R4.	139
Figura 4.29. Cinéticas para el H ₂ O ₂	143
Figura 4.30. Perfil de actividad frente al pH.....	144
Figura 4.31. Estabilidad frente al pH.....	145
Figura 4.32. Determinación de los valores de T_{50} para las variantes con y sin la extensión N-terminal.	147
Figura 4.33. Determinación de los valores de T_{50} para los parentales de la evolución hacia termoestabilidad y de las variantes intermedias de la 1 ^a G y 2 ^a G.	147
Figura 4.34. Análisis de $t_{1/2}$ frente a temperatura y termoactividad.....	148
Figura 5.1. Estructura y procesamiento del prepro-líder del factor α	161
Figura 5.2. Tránsito y maduración del factor α en <i>S. cerevisiae</i>	162
Figura 5.3. Representación del procesamiento del extremo N-terminal en las VP secretadas por <i>S. cerevisiae</i>	163
Figura 5.4. Estructura molecular de la VP nativa y el mutante 2-1B.....	167
Figura 5.5. Análisis estructural de la mutación T184M.	168
Figura 5.6. Análisis estructural de la mutación Q202L.....	168
Figura 5.7. Análisis estructural de la mutación E37K.....	169
Figura 5.8. Análisis estructural de la mutación V160A.	170

Figura 5.9. Análisis estructural de la mutación G330R.....	170
Figura 5.10. Análisis estructural de la mutación D213A.....	171
Figura 5.11. Análisis estructural de la mutación H39R.....	172
Figura 5.12. Representación de los iones Ca ²⁺ proximal y distal en la VP.....	173
Tabla 1.1. Residuos conservados en las peroxidasas ligninolíticas de la clase II en el lado proximal y distal del entorno del hemo.....	14
Tabla 1.2. Expresión de peroxidasas ligninolíticas.	29
Tabla 3.1. Reactivos químicos	51
Tabla 3.2. Componentes de los medios de cultivo	52
Tabla 3.3. Kits de biología molecular	53
Tabla 3.4. Enzimas comerciales.....	54
Tabla 3.5. Oligonucleótidos empleados	65
Tabla 3.6. Condiciones de la reacción de amplificación de <i>vpl2</i>	66
Tabla 3.7. Condiciones de la reacción de digestión del plásmido pGAPZαA y del producto de PCR que contenía el cDNA <i>vpl2</i>	66
Tabla 3.8. Ligación de pGAPZαA y <i>vpl2</i>	67
Tabla 3.9. Condiciones de la reacción de amplificación de <i>αvpl2</i>	67
Tabla 3.10. Condiciones de la reacción de digestión con <i>Bam</i> HI y <i>Not</i> I del plásmido pJRoC30 y el fragmento <i>αvpl2</i>	68
Tabla 3.11. Ligación de pJRoC30 y <i>αvpl2</i>	68
Tabla 3.12. Condiciones de la reacción de digestión del plásmido pJRα <i>vpl2</i>	69
Tabla 3.13. Concentraciones de hemina, hemoglobina y δ-ALA ensayadas para la optimización preliminar del medio de expresión de VP.....	72
Tabla 3.14. Concentraciones de hemina ensayadas para la optimización en microplaca del medio de expresión de VP.	72
Tabla 3.15. Concentraciones de hemoglobina bovina y suplementos añadidos para la optimización en microplaca del medio de expresión de VP.....	73
Tabla 3.16. Concentraciones de δ-ALA y suplementos añadidos para la optimización en microplaca del medio de expresión de VP.	73

Tabla 3.17. Concentraciones de hemoglobina bovina ensayadas para la optimización en matraz del medio de expresión de VP.....	74
Tabla 3.18. Concentraciones de etanol ensayadas para la optimización en matraz del medio de expresión de VP.....	74
Tabla 3.19. Condiciones de la reacción de PCR mutagénica con <i>Taq</i> polimerasa y MnCl ₂	76
Tabla 3.20. Condiciones de la reacción de PCR mutagénica con <i>Mutazyme</i> de la 5 ^a generación de evolución.	76
Tabla 3.21. Condiciones del <i>StEP</i> mutagénico de la 4 ^a generación de evolución.	78
Tabla 3.22. Condiciones de la PCR de confirmación de extremos del <i>StEP</i>	81
Tabla 3.23. Condiciones de las reacciones de PCR 1 y 2 del SOE y del IVOE.....	83
Tabla 3.24. Condiciones de la PCR 3 del SOE.	83
Tabla 3.25. Condiciones del gel de concentración para SDS-PAGE.....	97
Tabla 3.26. Condiciones del gel de separación para SDS-PAGE	97
Tabla 3.27. Tampón de carga para las muestras de SDS-PAGE	98
Tabla 4.1. Mutantes de la 1 ^a generación.....	114
Tabla 4.2. Mutantes de la 2 ^a generación.....	117
Tabla 4.3. Mutantes de la 3 ^a generación.....	120
Tabla 4.4. Variantes de la 4 ^a generación.	124
Tabla 4.5. Variantes de la 5 ^a generación.	128
Tabla 4.6. Variantes de la 6 ^a generación.	131
Tabla 4.7. Purificación de R4.....	134
Tabla 4.8. Características bioquímicas y espectroscópicas.....	137
Tabla 4.9. Análisis de las mejoras en secreción y actividad específica.	140
Tabla 4.10. Constantes cinéticas de estado estacionario para el parental VPL2 y los mutantes R4, 2-1B y R4DEL.....	142
Tabla 4.11. Análisis de actividad en condiciones óptimas de las variantes evolucionadas y nativa.	143
Tabla 5.1. Mutaciones del proceso de evolución dirigida de la VP.....	157
Tabla 5.2. Mutaciones de las VP evolucionadas.....	166

ABREVIATURAS

AAO	Aril alcohol oxidasa
ABTS	2,2' Azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato)
AV	Alcohol veratrílico
BSA	Albumina de suero bovino
CcP	Citocromo c peroxidasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (<i>complementary desoxiribonucleic acid</i>)
CiP	Peroxidasa de <i>Coprinopsis cinerea</i>
CLERY	<i>Combinatorial Libraries Enhanced by Recombination in Yeast</i>
CPO	Cloroperoxidasa
DMP	2,6-dimetoxifenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>desoxiribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DOGS	<i>Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling</i>
DyP	Peroxidasa decolorante de tintes (<i>dye-decolorizing peroxidase</i>)
E ⁰	Potencial redox
epPCR	PCR propensa a error (<i>Error prone PCR</i>)
EPR	Resonancia paramagnética electrónica (<i>Electronic paramagnetic resonance</i>)
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas (<i>Fast protein liquid chromatography</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano picante (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HTP	<i>High-ThroughPut</i> (de alto rendimiento o capacidad)
IPTG	Isopropil-β-D-tio-galactopiranosido
ISM	<i>Iterative Saturation Mutagenesis</i>
ISOR	<i>Incorporating Synthetic Oligonucleotides via gene Reassembly</i>
ITCHY	<i>Incremental Truncation for the Creation of Hybrid enzymes</i>
IvAM	<i>In Vivo Assembly of Mutant libraries</i>
IVOE	<i>In Vivo Overlap Extension</i>
k _{cat}	Constante catalítica

k_{cat} / K_m	Eficiencia catalítica
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LiP	Lignina peroxidasa
LRTE	Ruta de transporte electrónico de largo recorrido
MALDI-TOF	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz con un analizador de tiempo de vuelo (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight</i>)
MAT	Mejora de actividad total
MnP	Manganeso peroxidasa
OPW-PCR	<i>Overlap-Primer-Walk Polymerase Chain Reaction</i>
OSCARR	<i>One-pot Simple methodology for Cassette Randomization and Recombination</i>
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PAH	Hidrocarburo aromático policíclico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDB	Protein data bank
pI	Punto isoeléctrico
RACHITT	<i>Random Chimeragenesis on Transient Templates</i>
RB5	<i>Reactive black 5</i>
RE	Retículo endoplasmático
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SHIPREC	<i>Sequence Homology-Independent Protein Recombination</i>
SOE	<i>Splicing by Overlap Extension</i>
StEP	<i>Staggered Extensión Process</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina
UV-vis	Ultravioleta-visible
V	Voltio
VP	Peroxidasa versátil
δ -ALA	Ácido δ -aminolevulínico
ϵ_λ	Coefficiente de extinción molar a la longitud de onda λ

SUMMARY

VP (versatile peroxidases, EC 1.11.1.16) secreted by white-rot fungi are involved in natural decay of lignin. VP combine the general catalytic features of other haem-containing enzymes (in terms of substrate specificity and reaction mechanisms), such as the high-redox-potential ligninolytic peroxidases, LiP (lignin peroxidase) and MnP (manganese peroxidase), with those of peroxidases with a lower redox potential, such as HRP (horseradish peroxidase) and CiP (*Coprinopsis cinerea* peroxidase). Thus VP behaves as a generalist biocatalyst, readily oxidizing a variety of compounds. Unfortunately, VP has not been successfully functional expressed in any heterologous host, which limits its potential development.

In this context, directed molecular evolution represents an elegant shortcut to tailor enzymes with improved features. By mimicking the Darwinist algorithm of natural selection through iterative steps of random mutagenesis and/or DNA recombination, the temporal scale of evolution can be collapsed from millions of years into months rather than weeks of bench work.

We have engineered the VP from *Pleurotus eryngii* to be functionally expressed in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. Firstly, the optimization of culture conditions for functional expression and the engineering of a reliable high-throughput screening assay were performed. Afterwards, a fusion gene containing the VP from *P. eryngii* and the α factor prepro-leader from *S. cerevisiae* was constructed and subjected to four rounds of directed evolution, achieving a level of secretion in *S. cerevisiae* of 21 mg/L. The evolved variant for expression (R4) harbored four mutations and increased its total VP activity 129-fold over parent type along with a noticeable improvement of the catalytic efficiency at the haem channel oxidation site. Whilst the catalytic Trp was unaltered after evolution, the Mn²⁺ oxidation site was negatively affected by the mutations. The signal leader processing by the STE13 protease at the Golgi compartment changed as consequence of VP expression, retaining the additional N-terminal sequence EAEA (Glu-Ala-Glu-Ala) that enhanced secretion. The engineered N-terminally truncated variants displayed similar biochemical properties to those of the non-truncated counterpart in terms of kinetics, stability and spectroscopic features.

Finally, we took advantage of the laboratory evolution platform set here to improve the thermostability of VP. Three additional cycles of evolution led to a more thermostable variant (2-1B), harboring 3 stabilizing mutations. 2-1B mutant showed a T₅₀ 8°C higher than parental type and the thermoactivity range was widened (from 30-45°C for parent type to 30-50°C for 2-1B). Moreover, as a consequence of laboratory evolution, some unexpected side-effects were detected. The enzyme's stability at alkaline pHs was significantly increased retaining ~60 % of its residual activity at pH 9.0. In addition, the K_m for H₂O₂ was enhanced up to 15-fold while the catalytic efficiency was maintained. Mutations introduced in the course of evolution seemed to affect secretion, stability and activities by establishing new interactions with surrounding residues.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

La lignina es uno de los principales componentes de la pared celular de plantas y el segundo compuesto, después de la celulosa, en contribuir a la biomasa terrestre (Schimmel, DS *et al.*, 1994). En concreto la lignina puede suponer hasta el 25 % de la biomasa de una planta.

La lignina desempeña una importante función estructural en los vegetales. Se deposita principalmente en la pared celular secundaria rodeando y compactando las fibras de celulosa y hemicelulosa aportando sostén y rigidez a los tejidos leñosos, creando un entramado tridimensional muy denso que deja espacios de tan solo 5 nm de diámetro, por lo que las moléculas con un peso molecular superior a 20 kDa no pueden difundir (Paniagua, R *et al.*, 1998). También constituye el principal componente de la lámina media contribuyendo a la unión entre las células adyacentes. Debido a su naturaleza recalcitrante, la lignina ejerce un importante papel evitando la hidrólisis de los polisacáridos de la pared celular (celulosa y hemicelulosa) y por ende previene a la planta del ataque enzimático microbiano.

Desde un punto de vista estructural, la lignina es un biopolímero aromático heterogéneo tridimensional muy complejo constituido a partir de la polimerización deshidrogenativa de tres precursores fenólicos (los alcoholes *p*-hidroxicinámicos: *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico), en una reacción mediada por peroxidasas y lacasas vegetales (el denominado proceso de lignificación) (**Figura 1.1**). Estas unidades monoméricas son oxidadas a los correspondientes radicales que pueden reaccionar entre ellos formando dímeros, los cuales pueden ser a su vez oxidados dando lugar a diversas reacciones que van generando distintos tipos de lignina, con diferente complejidad química (Higuchi, T, 1990). Predominan principalmente los enlaces éter β -O-4 (para su formación participa el oxígeno fenólico de los alcoholes cinámicos por lo que el contenido en estructuras fenólicas no supera el 10 % (Camarero, S *et al.*, 1994)) y también diferentes tipos de enlace carbono-carbono. Todo ello hace de la lignina uno de los compuestos orgánicos naturales más persistentes y difíciles de descomponer (Hammel, KE, 1997).

La degradación de la lignina (debido a su abundancia y naturaleza recalcitrante) se puede considerar un paso clave en el reciclado del carbono en la biosfera, así como en diferentes aprovechamientos de la biomasa vegetal como por ejemplo la fabricación de papel, producción de biocombustible, alimentación animal o síntesis química a partir de materias primas renovables.

Existen diferentes organismos capaces de degradar en algún grado el material lignocelulósico, entre ellos podemos encontrar Actinomicetes del género *Streptomyces*, bacterias como *Pseudomonas* y *Xantomonas*, u hongos de la clase Ascomicetes como *Fusarium* y *Aspergillus*. Pero son los hongos de la clase Basidiomicetes los principales responsables de la mineralización de la lignina en la naturaleza (Buswell, JA *et al.*, 1987; Crawford, DL, 1981; Eriksson, K-EL *et al.*, 1990; Kirk, TK, 1983). Éstos producen dos clases diferentes de degradación en función del ataque que realicen: i) la podredumbre parda, que se caracteriza por la capacidad de los hongos para modificar la lignina con el fin de acceder y utilizar la celulosa y hemicelulosa, de manera que el producto resultante es de color pardo (de ahí su nombre); y ii) la podredumbre blanca, en la que los hongos degradan totalmente la lignina dando un producto de color blanquecino debido a la exposición de la celulosa y la hemicelulosa.

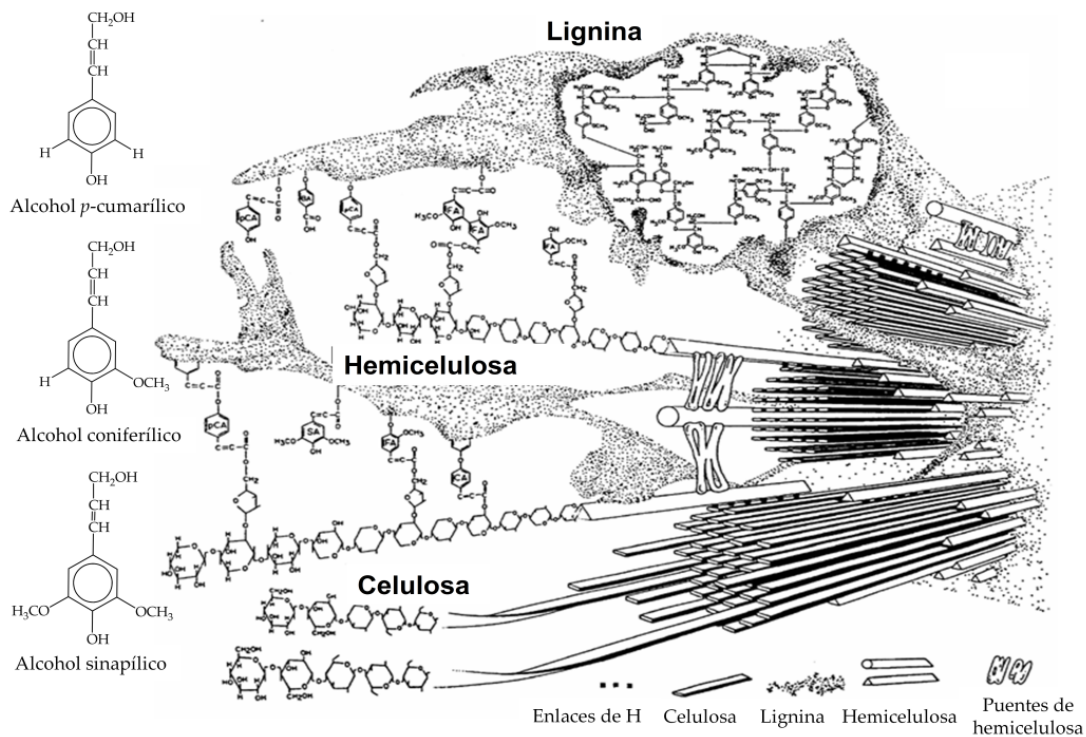


Figura 1.1. Disposición relativa y estructura molecular de la lignina, hemicelulosa y celulosa en la pared celular de plantas vasculares. A la izquierda se muestran las estructuras de los tres alcoholes *p*-hidroxicinámicos precursores fenólicos de la lignina. Modelo para la pared secundaria de angiospermas herbáceas adaptado de Bidlack, J *et al.*, 1992.

La mayoría de los hongos de podredumbre blanca poseen un complejo sistema extracelular de naturaleza oxidativa para poder degradar la lignina. Este sistema incluye un consorcio de enzimas principalmente formado por oxidorreductasas: i) lacasas; ii) peroxidasas; iii) oxidasas productoras de H₂O₂; así como metabolitos de bajo peso molecular que actúan como transportadores electrónicos difusibles (Ruiz Dueñas, FJ *et al.*, 2009). La existencia de estos últimos intermediarios (mediadores redox) resulta imprescindible en las primeras fases de la mineralización de la lignina, ya que el pequeño tamaño de los espacios moleculares de la matriz lignocelulósica (entorno a 5 nm) impide la penetración de las enzimas.

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son oxidorreductasas multicobre que catalizan la oxidación de las unidades fenólicas de la lignina empleando como aceptor final de electrones el O₂ (Thurston, CF, 1994) y liberando H₂O como único subproducto. Estas enzimas se descubrieron por primera vez en el árbol japonés de la laca *Toxicodendron vernicifluum* o *Rhus vernicifera* (Yoshida, H, 1883). Posteriormente se han encontrado en otras plantas, hongos, bacterias e incluso en cutículas de insectos (Gianfreda, L *et al.*, 1999). Las lacasas son secretadas por la mayoría de hongos de la podredumbre blanca, lo que pone de manifiesto su importancia en el proceso de formación y mineralización de la lignina. Las lacasas presentan un potencial redox (E°) en el intervalo 0.4-0.8 V (Alcalde, M *et al.*, 2007) lo que limita en cierta medida su actuación, especialmente si se comparan con las peroxidasas ligninolíticas con E° ≥ 1 V. Sin embargo, su capacidad oxidativa se ve ampliada de manera indirecta a través de la oxidación de mediadores redox lo que permite actuar sobre otros compuestos con mayor E° que la propia lacasa (incluyendo compuestos no fenólicos) a través del denominado sistema lacasa-mediador (Bourbonnais, R *et al.*, 1990; Camarero, S *et al.*, 2005).

Los Basidiomicetes de podredumbre blanca secretan tres tipos de peroxidasas ligninolíticas de alto E° denominadas lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y peroxidasa versátil (VP). De manera general, estas enzimas oxidan compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos de alto E°.

Por último, las oxidasas productoras de H₂O₂ son las encargadas de proporcionar el H₂O₂ a las peroxidasas extracelulares. La primera oxidasa productora de H₂O₂ extracelular descrita fue la glioxal oxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* (Kersten, PJ *et al.*, 1987) que era capaz de oxidar aldehídos alifáticos producidos por el hongo y generar H₂O₂. Posteriormente se ha descrito otra oxidasa extracelular en hongos del género *Pleurotus* y *Bjerkandera* denominada aril-alcohol oxidasa (AAO, EC 1.1.3.7) (Guillén, F *et al.*, 1990; Varela, E *et al.*, 1999). La AAO es una flavoenzima con amplia especificidad de sustrato pudiendo oxidar diferentes compuestos aromáticos durante la biodegradación de la lignina o metabolitos fúngicos. Se ha visto que la AAO produce H₂O₂ de manera continua debido a

la existencia de un ciclo de oxidorreducción de aldehídos aromáticos generados por el hongo en el que intervienen aril-alcohol deshidrogenasas intracelulares, esenciales para la regeneración del FADH₂ requerido por la AAO (Guillén, F *et al.*, 1994a; Guillén, F *et al.*, 1994b; Hage, A *et al.*, 1999; Ruiz Dueñas, FJ *et al.*, 2009).

En la despolimerización de la lignina también participan metabolitos de bajo peso molecular, iones metálicos (Mn³⁺), radicales aromáticos (productos de la oxidación de la lignina o metabolitos secretados por el hongo) y especies reactivas de oxígeno que actúan como mediadores redox propagando la oxidación de la lignina a las zonas más internas de la pared secundaria donde las enzimas no pueden difundir y por tanto actuar eficientemente.

1.2 PEROXIDASAS LIGNINOLÍTICAS

1.2.1 CLASIFICACIÓN DE LAS PEROXIDASAS LIGNINOLÍTICAS

Las peroxidasas ligninolíticas son hemoproteínas que se encuentran clasificadas en función de sus características estructurales y relaciones filogenéticas dentro de la clase II de la superfamilia de peroxidasas bacterianas, fúngicas y de plantas. Se dividen en tres tipos:

i) Lignina peroxidasas, LiP (EC 1.11.1.13). Fueron descubiertas por primera vez en cultivos de *P. chrysosporium* (Glenn, JK *et al.*, 1983; Tien, M *et al.*, 1983). Se caracterizan por su capacidad para oxidar dímeros de lignina de tipo no fenólico y otros compuestos aromáticos de alto E°, y despolimerizar la lignina sintética en presencia de alcohol veratrílico (AV). El AV es un metabolito aromático secretado por los hongos que degradan la lignina (siendo el sustrato habitualmente utilizado para identificar actividades LiP) que puede actuar como mediador redox de corto recorrido -debido a la baja estabilidad de su radical catiónico (Khindaria, A *et al.*, 1996)- durante la despolimerización de la lignina. Las LiP presentan un triptófano catalítico superficial implicado en la oxidación de los sustratos a través de una ruta de transferencia electrónica de largo recorrido (LRTE). Este triptófano se encuentra conservado en todos los miembros de este grupo a excepción de la LiP de *Trametes cervina* que presenta una tirosina superficial, localizada en una posición distinta al triptófano catalítico, también implicada en la catálisis (Miki, Y *et al.*, 2006; Miki, Y *et al.*, 2009; Miki, Y *et al.*, 2011).

ii) Manganeso peroxidasas, MnP (EC 1.11.1.14). Fueron descubiertas un año después que la LiP en cultivos de *P. chrysosporium* (Kuwahara, M *et al.*, 1984). Requieren Mn²⁺ para cerrar el ciclo catalítico y lo oxidan a Mn³⁺. Éste, al quelarse con ácidos orgánicos sintetizados por los hongos (como el oxálico, Takao, S, 1965), actúa como oxidante difusible (quelatos estables con E°= 0.9-1.2 V). A través de este mecanismo mediado, la MnP es capaz

de degradar diversos elementos fenólicos en el proceso de descomposición de la lignina de la pared vegetal, aunque no es capaz de oxidar directamente las unidades no fenólicas de ésta. El Mn^{3+} generado por la MnP (y la VP que se describe a continuación) puede también iniciar la peroxidación de lípidos insaturados generando radicales libres capaces de degradar dímeros no fenólicos (Jensen, KA *et al.*, 1996). Las MnP presentan un pequeño canal de entrada al hemo formado por tres residuos ácidos altamente conservados, por donde el Mn^{2+} accede al propionato interno del hemo.

iii) Peroxidasas versátil, VP (EC 1.11.1.16). Las VP combinan las propiedades catalíticas de las LiP y las MnP, lo que les confiere una gran versatilidad y potencial biotecnológico (Martínez, AT, 2007; Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009a). De esta forma, las VP pueden oxidar sustratos típicos de la LiP (como el AV, los metoxibencenos y dímeros modelo de lignina de tipo no fenólico), así como el Mn^{2+} , sustrato característico de la MnP. En concreto, la VP presenta en su estructura un sitio de unión al manganeso, responsable de la oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} (al igual que la MnP) y un triptófano catalítico superficial, responsable de la oxidación de compuestos aromáticos de alto potencial redox (al igual que la LiP). Además, la VP por sí misma (en ausencia de oxidaciones mediadas) es capaz de oxidar directamente compuestos fenólicos y colorantes tipo azo de bajo E° , así como compuestos de alto E° , como el *Reactive Black 5* (RB5) o hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), que la LiP solamente puede oxidar en presencia de AV y la MnP no puede oxidar ni siquiera en presencia de Mn^{2+} . La oxidación de los anteriores sustratos de bajo E° por la VP puede tener lugar tanto en el Trp catalítico como en el canal principal de acceso al hemo (como en la peroxidasa de *Coprinopsis cinerea*, CiP, y la peroxidasa de rábano picante, HRP). El pH óptimo para la oxidación de estos sustratos varía desde 5.0 para la oxidación del Mn^{2+} a 3.0 para el AV, valores similares a los óptimos para la oxidación de estos mismos sustratos por la MnP y la LiP, respectivamente.

1.2.2 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES GENERALES DE LAS PEROXIDASAS LIGNINOLÍTICAS

En la actualidad existe una gran cantidad de información estructural y mecanística acerca de las hemoperoxidasas gracias a los numerosos estudios estructura-función sustentados por un elevado número de estructuras moleculares resueltas y publicadas (~250 estructuras disponibles en la base de datos: <http://www.rcsb.org>). Las peroxidasas ligninolíticas son proteínas globulares de 30-40 kDa y alrededor de 300 aminoácidos, constituidas por 10-12 α -hélices y 4-5 estructuras β de longitud variable, distribuidas en dos dominios bien diferenciados, el dominio proximal y el distal. Las peroxidasas ligninolíticas presentan estructuras muy conservadas a pesar de que el grado de similitud de sus secuencias aminoacídicas no supere en muchos casos el 50 %. Además, todas incluyen un

péptido señal en su extremo N-terminal que dirige la secreción a través del retículo endoplasmático (RE). Las proteínas maduras poseen de 40 a 60 residuos extra en el extremo C-terminal en comparación con otros miembros de la superfamilia de peroxidasa bacterianas, fúngicas y de plantas. Como en todas las hemoperoxidasas, su grupo prostético hemo está constituido por cuatro anillos pirrólicos unidos por puentes metileno que albergan un ion Fe^{3+} en el estado de reposo basal de la enzima. La estructura de las peroxidasa ligninolíticas se encuentra reforzada por 4 puentes disulfuro (localizados en distinta posición a los de las peroxidasa de plantas, clase III) e incluyen dos Ca^{2+} estructurales que les confieren estabilidad (también presentes en otras peroxidasa de clase II). Su grado de glicosilación es entorno al 5 %. El aminoácido tirosina está ausente en la secuencia a excepción de una LiP de *P. chrysosporium* y de *T. cervina* (Welinder, KG, 1992).

1.2.2.1 Entorno del hemo

Las peroxidasa ligninolíticas poseen un grupo hemo de tipo b (ferritoporfirina IX, **Figura 1.2**) característico de las diferentes superfamilias de hemoperoxidasas localizado en una cavidad interna de la proteína que se conecta con el solvente a través de uno o dos canales. El átomo de hierro se encuentra pentacoordinado por los cuatro nitrógenos del macrociclo tetrapirrólico con la quinta posición ocupada por el Nε del anillo imidazólico de una histidina axial que recibe el nombre de histidina proximal, conservada en este grupo. Esto hace que la reacción catalítica ocurra al otro lado del plano del hemo, donde se localiza otra histidina conservada, la histidina distal (por extensión la región localizada en el lado de la histidina proximal recibe el nombre de dominio proximal y la región del lado de la histidina distal recibe el nombre de dominio distal). Existe una serie de residuos en el entorno del hemo altamente conservados en las peroxidasa ligninolíticas (**Tabla 1.1**) que se comentan a continuación.

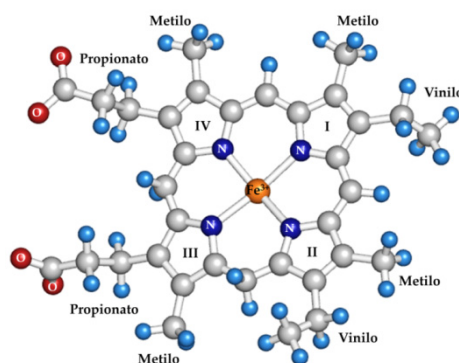


Figura 1.2. Estructura del grupo hemo tipo b (ferritoporfirina IX). El grupo hemo se encuentra formado por un átomo de hierro III (naranja) coordinado por cuatro anillos pirrólicos (I, II, III y IV) unidos por puentes metileno. Posee 8 cadenas laterales: 4 grupos metilo, 2 grupos vinilo y 2 grupos propionato.

Como se ha mencionado, en el lado proximal se encuentra la histidina proximal unida a través del N ϵ del anillo imidazol con el hierro del hemo. Se ha sugerido que la fuerza de este enlace modula el E° (Banci, L et al., 1991), por tanto cuanto mayor sea la distancia entre la histidina proximal y el hierro mayor es la deficiencia electrónica de éste y mayor será el E°. En el lado proximal también hay un aspártico unido a la histidina proximal por un puente de hidrógeno entre el N δ del imidazol y la cadena lateral del aspártico. Como se explicará más adelante en el **Apartado 1.2.3, pag 15** esta unión aumenta la densidad electrónica de la histidina promoviendo la ruptura heterolítica del H₂O₂ para dar lugar al compuesto I. El tercer residuo conservado es una fenilalanina aunque no parece tener un efecto sobre la catálisis. La sustitución de la fenilalanina proximal en la MnP de *P. chrysosporium* no afectó a las propiedades catalíticas de la enzima aunque modificó su estabilidad (Kishi, K et al., 1997) (**Figura 1.3**).

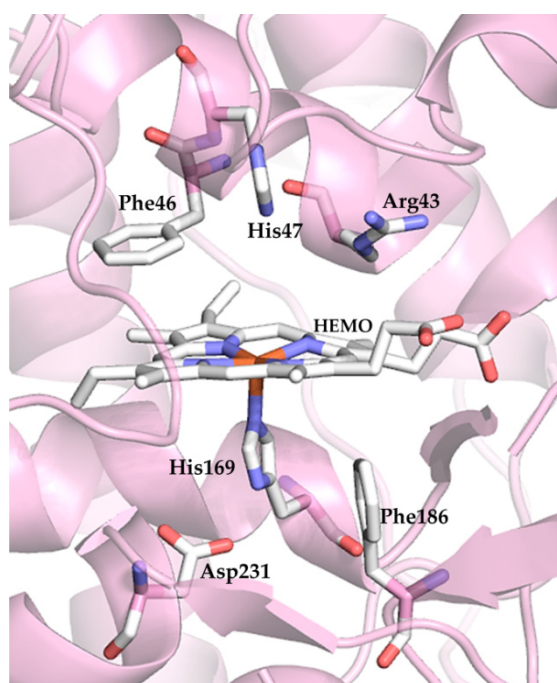


Figura 1.3. Entorno del hemo. Se muestran los aminoácidos del entorno del grupo hemo que se encuentran conservados en las peroxidases de hongos. Modelo basado en la estructura cristalográfica de la VP de *Pleurotus eryngii* (PDB: 3FJW).

En el lado distal aparece la histidina distal y una arginina que están involucradas en la ruptura heterolítica del H₂O₂ para dar lugar al compuesto I, así como en la estabilización de los estados oxidados de la enzima. También se ubica aquí una fenilalanina conservada cuya función no se ha determinado con claridad al igual que para la del lado proximal (**Figura 1.3**).

Tabla 1.1. Residuos conservados en las peroxidases ligninolíticas de la clase II en el lado proximal y distal del entorno del hemo.

Peroxidasa	Lado proximal			Lado distal		
LiP	H176	F193	D238	H47	R43	F46
MnP	H173	F190	D242	H46	R42	F45
VP	H169	F186	D231	H47	R43	F46

1.2.2.2 Calcios estructurales

Los iones Ca^{2+} de las peroxidases ligninolíticas se encuentran localizados uno en el dominio proximal y otro en el distal. El Ca^{2+} proximal está fuertemente unido con 8 átomos de oxígeno del esqueleto proteico y de las cadenas laterales de varios aminoácidos, en concreto interacciona con 5 aminoácidos muy conservados que en el caso de la VP de *P. eryngii* se corresponden con Ser170, Asp187, Thr189, Val192 y Asp194 (**Figura 1.4A**). Este ion no es accesible al solvente ya que se encuentra en una cavidad cercana pero no expuesta a la superficie.

El Ca^{2+} distal es más accesible al solvente apareciendo parcialmente expuesto. Éste interacciona con 7 átomos de oxígeno tanto del esqueleto proteico como de cadenas laterales. En su coordinación intervienen 2 moléculas de agua y 4 aminoácidos que en el caso de la VP de *P. eryngii* se corresponden con Asp48, Gly60, Asp62 y Ser64 (**Figura 1.4B**).

Es importante destacar que en la coordinación tanto del Ca^{2+} proximal como del distal, uno de los ligandos (Ser170 en el caso del Ca^{2+} proximal y Asp48 en el caso del Ca^{2+} distal) es contiguo a la histidina proximal y distal, respectivamente, la primera involucrada en la coordinación del Fe^{3+} del grupo hemo. Por este motivo, los Ca^{2+} estructurales son responsables directos del mantenimiento de la morfología del centro activo y de la posición relativa de las histidinas respecto al hemo, lo que afecta directamente al E° , a la activación ácido-base del H_2O_2 y por ende a la actividad catalítica general. Se ha descrito que los pH alcalinos provocan la liberación de los Ca^{2+} estructurales (Banci, L *et al.*, 1999; George, SJ *et al.*, 1999; Lu-Chau, TA *et al.*, 2004) con la consiguiente pérdida de actividad. Estudios más detallados explican como la pérdida de los Ca^{2+} promueve el acercamiento de la histidina distal al hemo que termina ocupando el sexto lugar de coordinación del Fe^{3+} formando un complejo bis(histidil)-hierro hémico que impide el acoplamiento del H_2O_2 al Fe^{3+} y deriva, por tanto, en la inactivación de la enzima. Sin embargo, la adición de Ca^{2+} permite la recuperación del estado pentacoordinado y por tanto de la actividad (Youngs, HL *et al.*, 2000). Se ha descrito un efecto similar para la inactivación térmica de las enzimas donde también se produce la pérdida de los iones Ca^{2+} . A elevadas temperaturas, se forma el

complejo bis(histidil)-hierro hémico, pero al igual que en el caso anterior, la adición de calcio exógeno permite la recuperación del estado pentacoordinado del Fe^{3+} de la enzima (Nie, G *et al.*, 1997; Sutherland, GRJ *et al.*, 1996; Sutherland, GRJ *et al.*, 1997; Timofeevski, SL *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha reportado que en presencia de agentes quelantes de Ca^{2+} el E° de la peroxidasa disminuye (Verdín, J *et al.*, 2006).

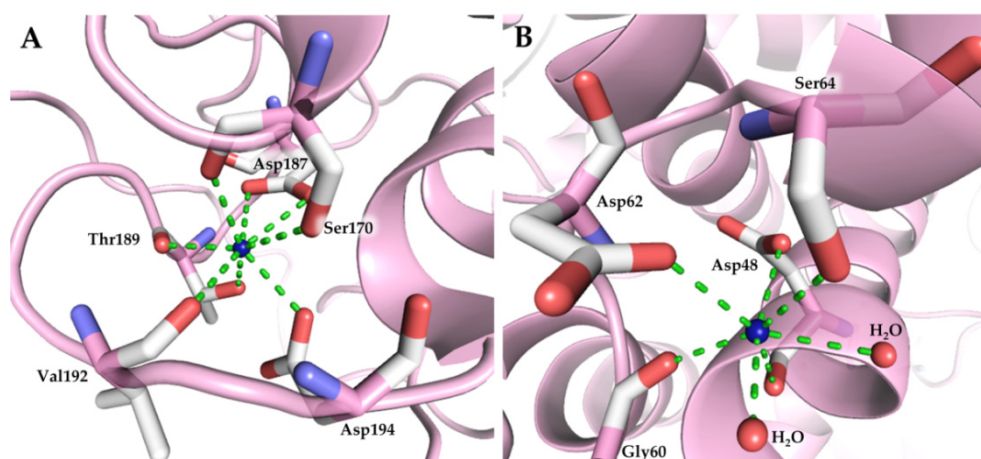


Figura 1.4. Entorno de los Ca^{2+} estructurales en la VP de *P. eryngii*. A) Se muestra el Ca^{2+} proximal y los 5 aminoácidos que se encuentran coordinándolo; B) se muestra el Ca^{2+} distal y los 4 aminoácidos y dos moléculas de agua implicados en su coordinación. Las esferas azules representan los Ca^{2+} y las rojas los átomos de oxígeno de las moléculas de agua.

1.2.3 CICLO CATALÍTICO

Todas las peroxididasas descritas comparten prácticamente el mismo ciclo catalítico que comienza con la oxidación de la peroxidasa por parte de hidroperóxidos, activando la enzima para que pueda llevar a cabo dos oxidaciones monovalentes sucesivas de una gran variedad de compuestos. El proceso general conlleva tres pasos consecutivos en los que se forman las dos especies catalíticas del ciclo, denominadas compuesto I y compuesto II (**Figura 1.5**). En el mecanismo de acción de las hemoperoxidasas están implicadas dos moléculas de sustrato reductor, por lo que se puede establecer cierta similitud con los mecanismos *ping-pong* (es decir, la unión de los sustratos reductores a la enzima es secuencial de manera que tras la unión de la primera molécula de sustrato y liberación del producto oxidado, la enzima modificada acepta una segunda molécula de sustrato para dar lugar a una nueva oxidación recuperando finalmente su estado basal). En concreto, es un mecanismo *ping-pong* irreversible en el que una de las dos moléculas de agua (primer producto) se libera inmediatamente tras la oxidación de la enzima, y la segunda, durante la oxidación de la segunda molécula de sustrato reductor.

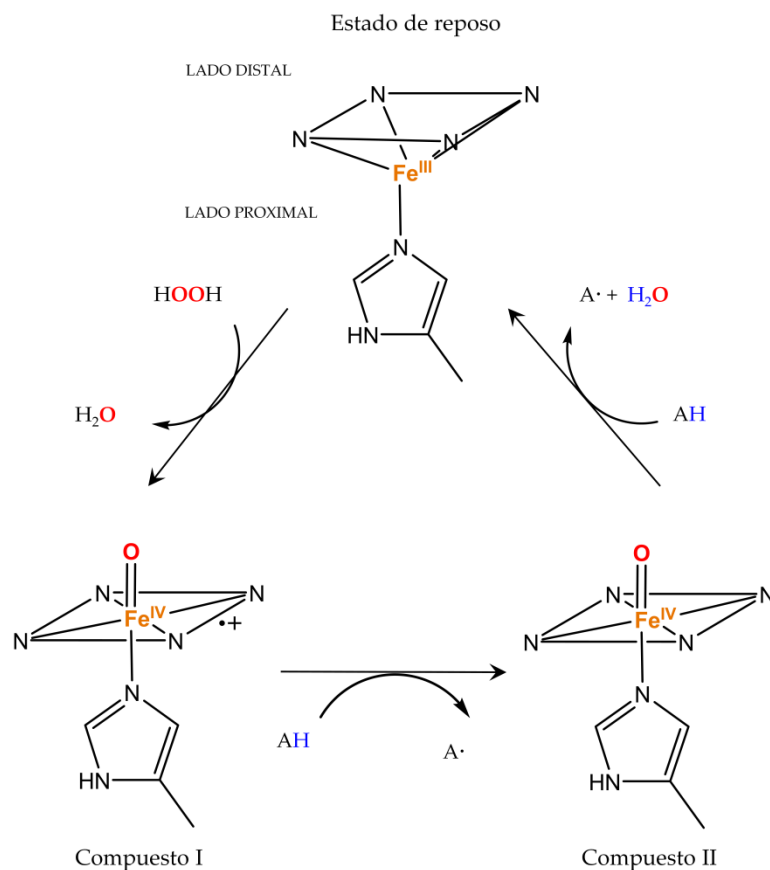


Figura 1.5. Ciclo catalítico resumido de las peroxidasas.

En el ciclo catalítico de las hemoperoxidasas (Figura 1.5) se distinguen tres pasos fundamentales:

i) Inicialmente, la hemoperoxidasa en estado de reposo reacciona con un equivalente de H₂O₂. El H₂O₂ se reduce a H₂O y la enzima es oxidada mediante la sustracción de dos electrones, de manera que recibe dos equivalentes de oxidación generándose el compuesto I. Un equivalente de oxidación reside en el hierro en forma de intermediario oxoferrilo (Fe⁴⁺=O); el otro equivalente se encuentra, en la mayoría de hemoperoxidasas, en forma de radical cationico π de la porfirina. En algunos casos, este equivalente se puede centrar en un aminoácido como en el caso de la citocromo c peroxidasa de levadura (CcP) (donde se encuentra en el Trp191). En lo referente a la ruptura heterolítica del enlace O-O del H₂O₂, se encuentra promovida por el entorno proteico del hemo a través de un mecanismo “push-pull”. En el lado distal del hemo se localizan la histidina y la arginina distales, que juegan un papel fundamental en el mecanismo de acción de manera que la histidina tira (*pull*) del protón del hidropéroxido

unido al hierro mientras que la arginina tira (*pull*) del enlace O-O, de forma que ambas fuerzas contribuyen a la ruptura del enlace. Por otro lado, un puente de hidrógeno entre la histidina proximal (ligando axial) y un grupo carboxílico de un residuo aminoácido cercano (generalmente un aspártico) aumenta la densidad electrónica del imidazol de la histidina proximal creando un “empuje” (*push*) electrónico que favorece la ruptura final del enlace O-O (Figura 1.6).

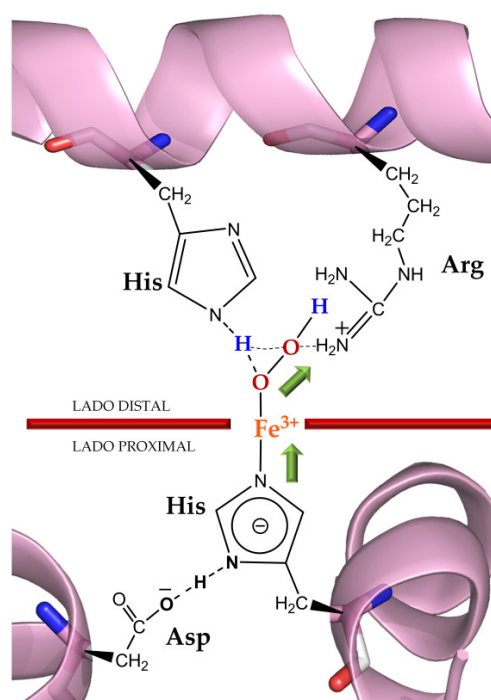


Figura 1.6. Detalle de la ruptura heterolítica del H₂O₂. Se muestran la His y la Arg distales (en la parte superior) así como la His y Asp proximales (en la parte inferior) que intervienen en la ruptura del enlace O-O del H₂O₂ para formar el compuesto I. Las flechas verdes indican la dirección de las fuerzas. Las barras rojas indican el plano del hemo.

En el caso de la cloroperoxidasa de *Leptoxiphium fumago* (CPO), las P450, y las DyP (*dye-decolorizing peroxidases*) (pertenecientes a otras superfamilias de peroxidases) se ha visto que los aminoácidos del entorno del hemo varían respecto de lo comentado anteriormente y por tanto el mecanismo de formación del compuesto I sería ligeramente distinto. De esta manera, en la CPO y las P450 el ligando axial (una cisteína) crea un fuerte efecto de empuje (*push*) que contribuye a la ruptura del enlace O-O. Además, en las DyP y la CPO, la histidina distal, altamente conservada en la mayoría de peroxidases, está sustituida por un residuo ácido (aspártico en el caso de las DyP y glutámico en el caso de la CPO) que también interviene en la ruptura del enlace O-O (Cirino, PC *et al.*, 2002).

ii) A continuación, el compuesto I puede oxidar una molécula de sustrato reductor (AH) mediante una reacción de transferencia de un electrón de manera que el radical catiónico de la porfirina es reducido y un protón es transferido a la histidina distal a la vez que se genera el radical del sustrato correspondiente (A•). La enzima queda como compuesto II con el centro $Fe^{4+}=O$ coordinado con la porfirina que ha recuperado un electrón.

iii) Finalmente, el compuesto II es reducido por una segunda molécula de sustrato que cede un electrón generándose el radical del sustrato correspondiente y recuperándose el estado de reposo basal de la enzima, con el hierro como Fe^{3+} y la liberación simultánea de una molécula de agua.

La reacción del compuesto II con el sustrato para recuperar el estado de reposo de la enzima suele ser uno a dos órdenes de magnitud más lenta que la reacción del compuesto I por lo que se considera este paso como la etapa limitante del mecanismo (Cirino, PC *et al.*, 2002; Dunford, HB, 1999; Morales Esteban, M, 2009; Ortiz de Montellano, PR, 2010)

En ausencia de sustratos reductores, y ante un exceso de H_2O_2 , el compuesto II reacciona con el H_2O_2 y se forma un nuevo compuesto, el compuesto III. El compuesto III es un intermedio de resonancia entre $Fe^{3+} - O_2^{\cdot-}$, $Fe^{2+} - O_2$ y $Fe^{4+} - O_2^{2-}$ que puede derivar en la liberación del Fe^{3+} y por tanto la inactivación irreversible de la enzima (Valderrama, B *et al.*, 2002; Valderrama, B, 2010).

1.2.4 PEROXIDASA VERSÁTIL

La VP fue descrita por primera vez en *Pleurotus eryngii* (conocida como “seta de cardo”, un hongo modelo para los estudios de degradación selectiva de la lignina) como una MnP con propiedades catalíticas extendidas, debido a su capacidad de oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+} al igual que las MnP y compuestos aromáticos no fenólicos como las LiP (Martínez, MJ *et al.*, 1996). Poco después se definió como un tipo independiente de peroxidasa (Camarero, S *et al.*, 1999; Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 1999a). Posteriormente, se encontraron nuevas VP principalmente en otras especies tanto de *Pleurotus* como de *Bjerkandera* (Camarero, S *et al.*, 1996; Heinfling, A *et al.*, 1998b; Martínez, AT *et al.*, 2002; Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009a), y más recientemente en *Cerrena unicolor* (Rainio, A *et al.*, 2008). Pero las VP también pueden ser producidas por otros Basidiomicetes del género *Panus* (Lisov, AV *et al.*, 2007), *Trametes* y *Spongipellis* (Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009a).

Se han descrito tres alelos para la VP en *P. eryngii* (*vpl1*, *vpl2*, *vpl3*) cuando crece en cultivos líquidos, dando lugar a proteínas de 361 aminoácidos con una identidad de secuencia de un 99 % (Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 1999a). También se ha visto la existencia de otro gen, *vps1*, que se expresa en fermentaciones en estado sólido sobre paja de trigo

produciendo proteínas de 370 aminoácidos (Camarero, S *et al.*, 1999) con una identidad de secuencia del 74 % con la isoenzima VPL.

1.2.4.1 Características generales de la VP

La variante alélica *vpl2*, objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, se expresa cuando el hongo crece en cultivos líquidos dando lugar a una proteína madura de 331 residuos tras el procesado de una secuencia señal de 30 aminoácidos. La VP madura presenta un contenido medio de carbohidratos del 7 %, una masa molecular de 43 kDa glicosilada, y 34.5 kDa desglucosilada, y un pI de 3.75 (Martínez, MJ *et al.*, 1996).

Se ha determinado la estructura cristalográfica de la VP de *P. eryngii* (variante alélica *vpl2*) con una resolución de 2.8 Å (PDB id: 3FJW) siendo similar a la del resto de miembros del grupo de las peroxidases ligninolíticas. Es una estructura globular dividida en dos dominios (distal y proximal) formada por 11 hélices predominantemente α y 8 estructuras β de pequeño tamaño (**Figura 1.7**). Las hélices se nombran con la nomenclatura convencional para las hemoperoxidasas de la A a la J con una hélice extra entre la B y la C que recibe el nombre de B'. El dominio distal está formado por las hélices A, B, B', C y D. El dominio proximal está formado por las hélices F, G, H e I, mientras que las hélices E y J conectan ambos dominios. Las hélices B y F se encuentran delimitando el bolsillo del hemo (paralelas a éste) y en ellas se puede encontrar la histidina distal (His47) y proximal (His169) así como una arginina (Arg43) altamente conservada en el grupo y que interviene en la reducción del H₂O₂.

La VP presenta 4 puentes disulfuro formados por los 8 residuos de cisteína que aparecen en la secuencia (C3-C15, C14-C278, C34-C114 y C242-C307) estabilizando su estructura. También tiene dos sitios de unión a calcio, uno en cada dominio, coordinados por 4 aminoácidos en el lado distal y 5 en el proximal, como se ha indicado anteriormente (ver **Figura 1.4**).

El hemo está encerrado en la proteína conectado con la superficie por dos pequeños canales de acceso. El mayor de ellos es por donde penetra el H₂O₂ para reaccionar con el Fe³⁺ formando el compuesto I. El segundo canal se extiende directamente hasta el propionato interno del hemo, siendo el sitio donde se oxida el Mn²⁺ a Mn³⁺. También existen tres residuos ácidos implicados en la oxidación del Mn²⁺ y un triptófano superficial (Trp164) que es el inicio de una ruta de transporte electrónico de largo recorrido para la oxidación de compuestos de alto E° (como el AV o el RB5) (Pérez-Boada, M *et al.*, 2005). Además, el canal principal de acceso al hemo de la VP es el sitio para la oxidación de compuestos de bajo E° (0.6-0.8 V), como diferentes fenoles y el 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) (Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009a).

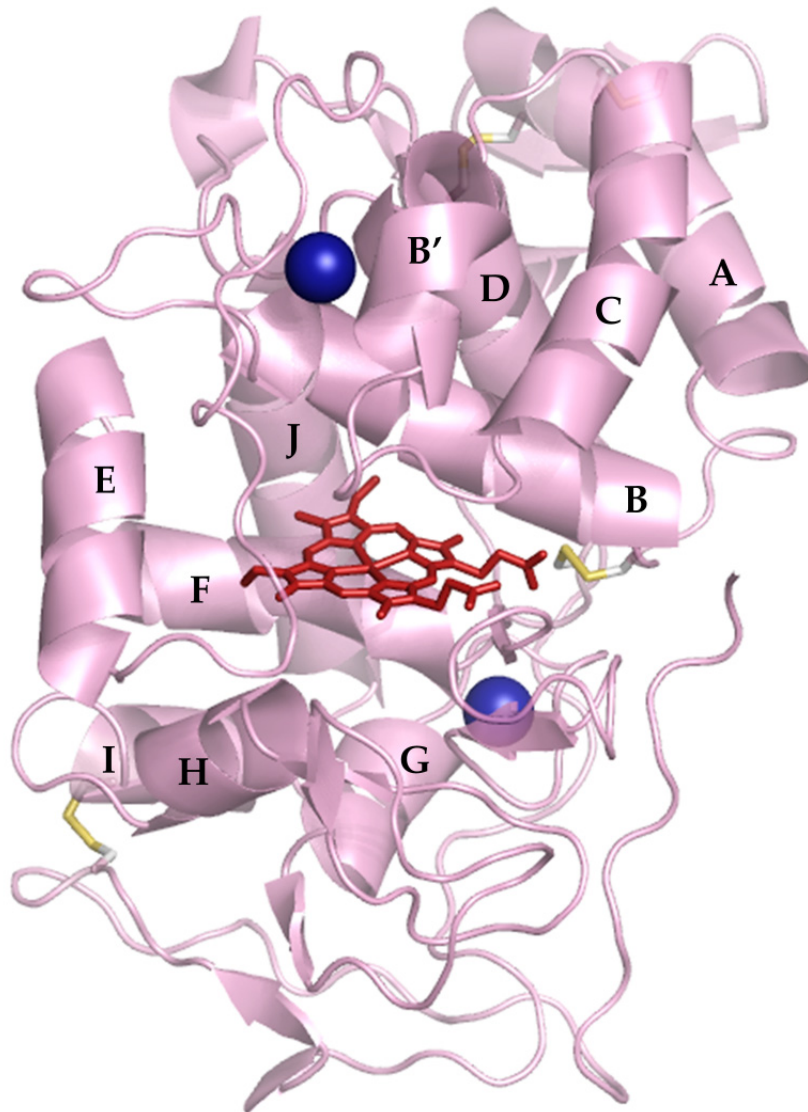


Figura 1.7. Estructura de la VP de *P. eryngii* (PDB: 3FJW). Se indican sus 11 hélices (de la A a la J). También se muestran los 4 puentes disulfuro en amarillo. Las esferas azules representan los Ca²⁺. El grupo hemo se resalta en rojo.

Finalmente, mencionar que las características espectroscópicas de la VP son semejantes a las de otras hemoperoxidasas. Exhiben un máximo en la región Soret a 407 nm y dos máximos a 502 y 640 nm conocidos como bandas de transferencia de carga (CT2 y CT1, respectivamente), que son características del Fe³⁺ en estado de alto spin. El hierro en su estado de reposo está pentacoordinado con la sexta posición de coordinación libre, o unida a una molécula de agua, que es cuando la enzima es activa.

1.2.4.2 Sitios de oxidación de la VP

Como se ha comentado con anterioridad, la VP es capaz de oxidar Mn^{2+} de manera eficiente al igual que lo hace la MnP. También oxida compuestos aromáticos no fenólicos como lo hace la LiP y compuestos fenólicos como la CiP y las peroxidasas de plantas, así como otros compuestos de alto E° como colorantes tipo azo (RB5) que ni la MnP ni la LiP pueden oxidar directamente.

Se han realizado múltiples estudios para desvelar los diferentes sitios de oxidación de la VP tal como resumen Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009a.

1.2.4.2.1 Sitio de oxidación del Mn^{2+}

En los primeros estudios de la VP, se observó que era capaz de oxidar Mn^{2+} y que además la reacción se daba a pH 5.0 al igual que en las MnP (Martínez, MJ *et al.*, 1996). En la estructura cristalográfica de la VP se apreció un pequeño canal con tres aminoácidos ácidos coordinando un ion de Mn^{2+} que se asemejaba mucho al de otras MnP. Mediante diferentes estudios racionales y exhaustivas caracterizaciones de las cinéticas del estado transitorio y estacionario se determinó el sitio de oxidación del Mn^{2+} . Se encuentra formado por la cadena lateral de los tres aminoácidos ácidos (Glu36, Glu40 y Asp175) constituyendo un pequeño canal de acceso, que conecta el solvente con el propionato interno del hemo. Estos tres aminoácidos participan en la coordinación del ion metálico mientras se produce la transferencia de un electrón directamente al propionato del hemo (Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2007) (**Figura 1.8**).

Se han descrito variaciones en la conformación de este sitio según se encuentre o no unido el Mn^{2+} . En la estructura cristalográfica de la VP de *P. eryngii* se pudo observar la presencia del Mn^{2+} unido, pero no fue posible obtener la estructura sin Mn^{2+} debido a que durante el cultivo del hongo la VP siempre está en presencia de Mn^{2+} . Sin embargo, cuando la VP fue expresada heterológicamente en *E.coli* y replegada *in vitro*, se consiguió un cristal de la enzima sin Mn^{2+} unido a su sitio de oxidación. En estos cristales se observó un desplazamiento de las cadenas laterales del Glu36 y Glu40 mientras el Asp175 no variaba (**Figura 1.8**) (Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009a). En el cristal sin Mn^{2+} la conformación adquirida era abierta de manera que el Mn^{2+} puede acceder al canal, mientras que en el cristal con el Mn^{2+} unido se veía que el canal está cerrado con el Mn^{2+} en su interior (Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009a).

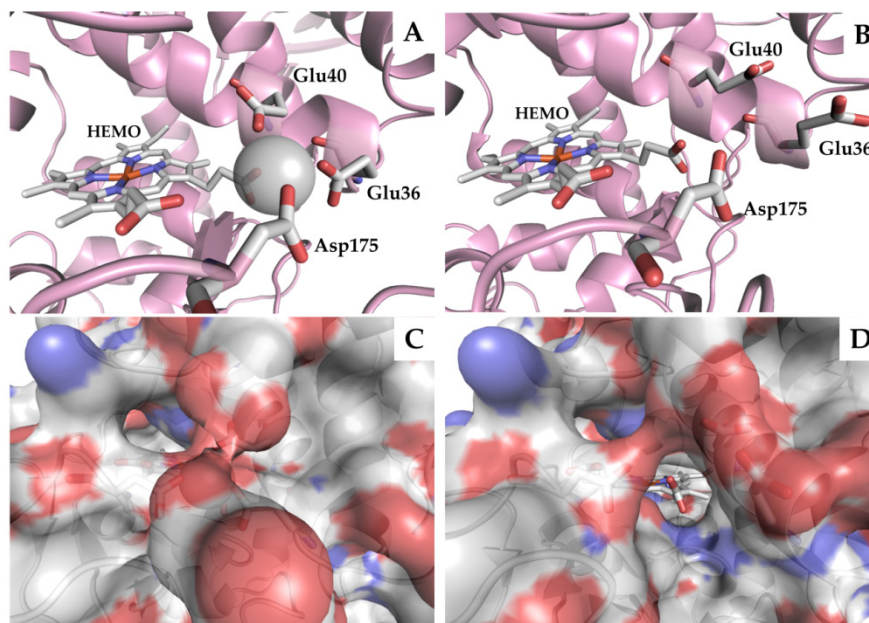


Figura 1.8. Sitio de oxidación del Mn^{2+} en la VP. Se muestra la disposición de los aminoácidos que intervienen en la coordinación del Mn^{2+} en presencia (A) y ausencia (B) de Mn^{2+} . La esfera gris representa el Mn^{2+} . También se muestra el detalle de la superficie con (C) y sin (D) Mn^{2+} unido. Las figuras (A) y (C) pertenecen a la estructura cristalográfica de la VP de *P. eryngii* referencia PDB: 3FJW (resolución 2.8 Å), y las figuras (B) y (D) a la estructura de la VP recombinante expresada en *E. coli* referencia PDB: 3FKG (resolución 1.81 Å).

1.2.4.2.2 Sitio de oxidación de sustratos de alto E° : Trp164

Se ha visto que la VP puede oxidar el polímero de lignina, además de otros compuestos de alto E° y elevado peso molecular como el RB5. Sin embargo, el tamaño del canal principal de acceso al hemo es demasiado pequeño como para que estos compuestos puedan acceder a él y ser oxidados. Este hecho, junto con que en la estructura cristalográfica de la VP se ha detectado un Trp superficial (Trp164) homólogo al Trp superficial de la LiP (Trp171) sugirió que el mecanismo de oxidación para los compuestos de elevado peso molecular y alto E° era a través de una ruta de transporte electrónico de largo recorrido desde el Trp164 hacia el hemo (Pérez-Boada, M *et al.*, 2005; Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009b) (**Figura 1.9**). Se ha realizado un exhaustivo estudio de esta región mediante estudios cinéticos, cristalográficos, de mutagénesis dirigida y resonancia paramagnética electrónica (EPR), que han caracterizado el entorno y el mecanismo de oxidación a través del Trp164 (Pérez-Boada, M *et al.*, 2005; Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2008; Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009b). En particular, se ha comprobado la existencia de un radical triptofanilo durante la formación del compuesto I y II que es el encargado de la oxidación de los mencionados sustratos en superficie (Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009b).

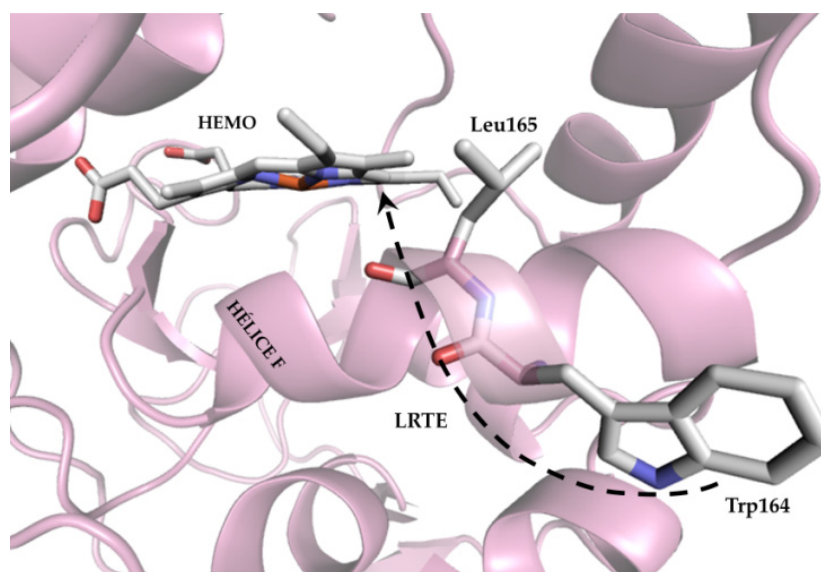


Figura 1.9. Representación del sitio de oxidación en el Trp164 superficial de la VP. Se indica la ruta de transporte electrónico de largo recorrido (LRTE) desde el Trp164 hasta el grupo hemo en la que parece también intervenir la Leu165.

1.2.4.2.3 Sitio de oxidación de sustratos de bajo potencial redox: canal del hemo

La VP presenta dos sitios (de alta y baja especificidad) para la oxidación de compuestos fenólicos y ABTS, como demuestran las cinéticas dobles obtenidas para la oxidación de estos sustratos (Heinfling, A *et al.*, 1998a; Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2001). Estudios racionales sobre el Trp164 desvelaron su papel adicional como centro de oxidación de alta especificidad (Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009a). Respecto al sitio de baja especificidad, éste se determinó mediante mutagénesis dirigida en los residuos del canal principal del hemo, atribuyendo a esta región la oxidación de compuestos fenólicos con baja eficiencia. Este sitio de oxidación es semejante al sitio de oxidación de otras peroxidasas de bajo E° como la CiP y la HRP (Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009a).

1.2.4.3 Ciclo catalítico de la VP

Teniendo en cuenta la plasticidad catalítica de la VP, y en base al descubrimiento y caracterización de sus diferentes sitios activos, se ha sugerido una segunda ruta para la reducción de los compuestos I y II en su ciclo catalítico. Así se definen dos nuevas especies químicas, compuesto IB y compuesto IIB para designar a la fracción de la enzima en la que existe un radical en el Trp164, que son las encargadas de oxidar los compuestos de alto E° y están en equilibrio con los compuesto I y II tradicionales, que ahora pasan a llamarse IA y IIA.

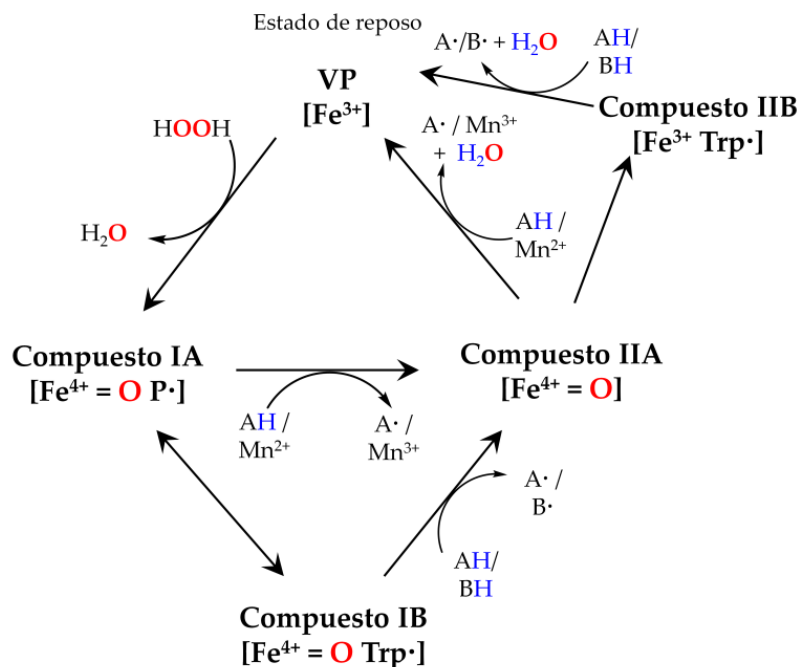


Figura 1.10. Ciclo catalítico de la VP. El compuesto IB presenta uno de los dos equivalentes de oxidación en forma de radical oxoferrilo ($\text{Fe}^{4+} = \text{O}$) y el otro localizado en el Trp 164 (radical triptofanilo, Trp·). El compuesto IIB presenta un equivalente de oxidación en forma de radical triptofanilo, mientras el hierro se encuentra en forma de Fe^{3+} . Los compuestos IB y IIB están involucrados en la oxidación de sustratos de alto E° (BH) como el AV y RB5 así como de compuestos de bajo E° (AH) como el ABTS o el 2,6-dimetoxifenol (DMP) (que también pueden ser oxidados por IA y IIA). Los compuestos IA y IIA están involucrados en la oxidación del Mn^{2+} y de otros compuestos de bajo E° (AH) (Adaptado de Pérez-Boada, M *et al.*, 2005).

Según este ciclo catalítico para la VP, los compuestos IA y IIA oxidan tanto el Mn^{2+} como compuestos de bajo E° . Asimismo, algunos sustratos fenólicos y de bajo E° serían oxidados, además de por los compuestos IA y IIA, por los compuestos IB y IIB. Finalmente, los sustratos de alto E° se oxidarían exclusivamente por IB y IIB (Pérez-Boada, M *et al.*, 2005; Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009a) (**Figura 1.10**).

1.3 APLICACIONES DE LAS PEROXIDASAS

Las peroxidasas se pueden emplear en un gran número de aplicaciones como la construcción de biosensores, en inmunoensayos, en kits de diagnóstico clínico, en síntesis de polímeros y otros compuestos de interés, en la degradación de tintes sintéticos, en biorremediación (de fenoles, pesticidas, colorantes) y en la industria papelera.

APLICACIONES ANALÍTICAS

Los biosensores son cada vez más importantes en distintos campos como la medicina, control de calidad, alimentación, monitorización medioambiental e investigación. Los biosensores basados en peroxidasas se emplean para monitorizar H_2O_2 y peróxidos orgánicos en industrias farmacéuticas, en el proceso de blanqueo de telas y pasta de papel, en procesos de ozonización de aire y agua y en productos alimentarios. También se pueden utilizar para controlar la concentración de sustratos incluyendo compuestos fenólicos. Si la peroxidasa es co-inmovilizada con una oxidasa productora de H_2O_2 (*ej.* glucosa oxidasa) entonces el sistema podrá detectar el sustrato de la oxidasa permitiendo la identificación de un gran número de compuestos como la glucosa, galactosa, etanol, colesterol, lactosa, oxalato, piruvato, ácido úrico, aminoácidos, etc (Azevedo, AM *et al.*, 2003; May, SW, 1999; Regalado, C *et al.*, 2004; Ruzgas, T *et al.*, 1996). También las peroxidasas han sido usadas como marcadores en el diagnóstico clínico y en investigación. Unidas covalentemente a proteínas, anticuerpos y otras moléculas se utilizan como herramientas altamente sensibles en inmunoensayos, detección de ácidos nucleicos y en histo- y citoquímica (Azevedo, AM *et al.*, 2003).

SÍNTESIS QUÍMICA

Otra aplicación con gran relevancia es el empleo de peroxidasas para la síntesis de nuevos polímeros funcionales y resinas fenólicas a partir de la polimerización oxidativa de compuestos aromáticos iniciada por la formación de radicales y posterior polimerización espontánea. Por ejemplo, las peroxidasas encuentran aplicación en la síntesis de resinas fenólicas, cardanol (un polímero que se utiliza para la producción de resinas y revestimientos de fricción (Hwan Kim, Y *et al.*, 2003)), acrilamida (Iwahara, K *et al.*, 2000), poliestireno (Singh, A *et al.*, 2000) o en la producción de polímeros conductores como la polianilina (Alva, KS *et al.*, 1997). También pueden utilizarse en la modificación de ligninas para la obtención de polímeros de interés (por ejemplo dispersantes, materiales de construcción, etc). Finalmente, se ha visto que las peroxidasas podrían utilizarse en la síntesis de medicamentos (*ej.* en la síntesis de anticancerígenos como la vinblastina y vincristina (Sottomayor, M *et al.*, 1997)).

INDUSTRIA PAPELERA

Las peroxididasas y en especial las peroxididasas ligninolíticas se muestran como una de las opciones más prometedoras y respetuosas con el medio ambiente para la producción de pasta de papel. Tradicionalmente, la eliminación de la lignina residual presente en las fibras de celulosa tras la cocción se realizaba mediante el uso de reactivos químicos clorados que generaban residuos muy tóxicos (organoclorados). Hay estudios que demuestran que las peroxididasas pueden emplearse en el proceso de deslignificación y blanqueo de las pastas de papel (Kondo, R *et al.*, 1994; Marques, G *et al.*, 2010; Moreira, M *et al.*, 2003).

INDUSTRIA TEXTIL

Se ha visto que la oxidación mediada por peroxididasas de algunos compuestos fenólicos da lugar a productos coloreados. En concreto el tratamiento de la lana con compuestos como hidroquinona, dopamina, guayacol, catecol y ácido felúrico junto con peroxididasas (HRP) dio lugar a fibras con diferentes tonos de color (Shin, H *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que las peroxididasas se pueden emplear para la producción de detergentes enzimáticos (por ejemplo, para eliminar el colorante que se libera de la ropa durante el lavado) (Damhus, T *et al.*, 1991).

DESCONTAMINACIÓN

Las peroxididasas también encuentran aplicación en procesos de biorremediación, en especial las peroxididasas ligninolíticas debido a su baja especificidad de sustrato y elevado E°. La actividad humana crea un gran número de compuestos altamente tóxicos (xenobióticos) que son vertidos al medio ambiente accidentalmente o en ocasiones sin ningún tipo de control. Por ejemplo los fenoles, los fenoles halogenados (utilizados como pesticidas, herbicidas, fungicidas, insecticidas), los PAHs, las dioxinas o los colorantes sintéticos, por nombrar algunos. Se ha visto que las peroxididasas son capaces de modificar xenobióticos dando lugar a compuestos de baja o ninguna toxicidad promoviendo incluso la mineralización parcial de algunos de ellos.

Todas las aplicaciones citadas han sido estudiadas con distintas peroxididasas desde la HRP y otras peroxididasas de plantas (como la peroxidasa de cacahuete, de soja o incluso de hoja de palma) a peroxididasas ligninolíticas y cloroperoxidasas.

1.4 EXPRESIÓN DE PEROXIDASAS LIGNINOLÍTICAS

A pesar de las potenciales ventajas biotecnológicas que ofrecen las peroxidasas de alto E°, y en particular las VP, no se han podido aún aplicar a nivel industrial debido a los obstáculos encontrados a la hora de expresarlas funcionalmente con niveles elevados en hospedadores apropiados (**Tabla 1.2**). Esto en parte puede ser debido a que están glicosiladas lo que, unido a su complejidad estructural (contienen cuatro puentes disulfuro, dos calcio estructurales y un grupo hemo) dificulta su correcto plegamiento y expresión funcional; además, su fuerte carácter oxidante puede también resultar dañino para los hospedadores heterólogos.

En lo referente a la expresión homóloga, aunque la manipulación genética asociada no es adecuada o dificulta los estudios estructura-función o de diseño evolutivo, puede ser una herramienta válida para la sobre-producción general de enzimas. Con esta estrategia, se han obtenido niveles de secreción de 3 mg/L para la MnP de *P. chrysosporium* o de 2 mg/L para la LiP de *P. chrysosporium* (Ma, B *et al.*, 2003; Sollewijn Gelpke, MD *et al.*, 1999). Recientemente se ha reportado la expresión homóloga de la CPO de *L. fumago* en niveles muy elevados (1.12 g/L) mediante la inserción de múltiples copias del gen de la CPO en la región no transcrita del DNA ribosómico del genoma del hongo (Buchhaupt, M *et al.*, 2011).

De manera general, los sistemas de expresión más apropiados para su implantación industrial son los heterólogos, ya que posibilitan la producción de las peroxidasas de alto E° de diferentes procedencias, así como de nuevas variantes mutantes con propiedades mejoradas con respecto a la enzima salvaje obtenidas mediante diferentes estrategias de biología molecular.

Escherichia coli es uno de los hospedadores procariotas más frecuentemente usados en expresión heteróloga de proteínas debido a su elevada tasa de crecimiento, su eficiencia de transformación, la estabilidad del DNA plasmídico y la amplia disponibilidad de herramientas moleculares para su manipulación. Sin embargo, de manera general no se ha conseguido la expresión funcional heteróloga de peroxidasas ligninolíticas en dicho microorganismo. El diferente uso de codones y la imposibilidad de realizar las modificaciones post-traduccionales necesarias para la correcta secreción de la proteína madura (como el procesamiento proteolítico, la formación de puentes disulfuro o las glicosilaciones) pueden impedir el plegamiento de la proteína, que es acumulada en cuerpos de inclusión en forma no funcional. Los cuerpos de inclusión pueden ser sometidos a protocolos de replegado *in vitro*, como se ha descrito para la LiP de *P. chrysosporium* y de *T. cervina*, la MnP de *P. chrysosporium* o la VP de *P. eryngii* (Doyle, WA *et al.*, 1996; Miki, Y *et al.*, 2009; Pérez-Boada, M *et al.*, 2002; Whitwam, RE *et al.*, 1995). Aunque el replegado *in vitro* es un potente método para estudios estructura-función, como queda patente en la literatura,

desafortunadamente no es útil para la producción de enzimas a escala industrial o para el diseño mediante herramientas de evolución molecular dirigida, donde la expresión funcional es un requisito indispensable.

Las peroxididasas ligninolíticas también se han intentado expresar funcionalmente en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. La expresión en un organismo eucariota con un sistema de secreción semejante al de hongos filamentosos parece una opción más factible, aunque los resultados encontrados han sido dispares. En algunos casos, no ha sido posible detectar expresión como es el caso de la LiP y la MnP de *P. chrysosporium* en *S. cerevisiae* o se han conseguido niveles bastante bajos (Conesa, A *et al.*, 2002); por el contrario, con la CiP se alcanzaron niveles de secreción de hasta 39 mg/L en *P. pastoris* (Kim, SJ *et al.*, 2009).

También se ha profundizado en el empleo de otros hospedadores eucariotas, como los hongos filamentosos, debido al conocimiento de su fisiología y a la similitud existente entre el sistema de secreción del hospedador y el organismo nativo productor (la mayoría de las peroxididasas ligninolíticas proceden de hongos filamentosos). En este sentido, el microorganismo preferido es *Aspergillus*, debido a su rapidez de crecimiento respecto a otros hongos filamentosos además de su notable rendimiento en la expresión heteróloga de otro tipo de proteínas y su escalado exitoso en bio-reactores (Hondel, CAMJ *et al.*, 1992; Punt, PJ *et al.*, 2002). Así, la expresión de la MnP de *P. chrysosporium* en *Aspergillus niger* alcanzó niveles de hasta 100 mg/L; con la CiP (sinónimo ARP) de *Arthromyces ramosus** en *Aspergillus awamori* se consiguieron niveles de expresión de hasta 800 mg/L (Lokman, BC *et al.*, 2003). Sin embargo, aparte de estos dos casos, en la mayoría de las ocasiones los niveles de expresión en *Aspergillus* han sido bastante más modestos: por ejemplo, la expresión de la MnP de *P. chrysosporium* en *Aspergillus oryzae* no alcanzó niveles superiores a 5 mg/L y la expresión de la LiP de *P. chrysosporium* en *A. niger* no generó niveles detectables de peroxidasa en los sobrenadantes de los cultivos (Conesa, A *et al.*, 2000).

* *Arthromyces ramosus* es un nombre no válido probablemente aplicado a una especie del género *Coprinopsis*.

Tabla 1.2. Expresión de peroxidasa ligninolíticas.

Peroxidasa	Microorganismo nativo	Hospedador	Rendimiento	Comentarios	Referencia
CPO	<i>L. fumago</i>	<i>L. fumago</i>	1120 mg/L	Integración en el genoma con el promotor original de la CPO. Fermentación en bio-reactor.	(Buchhaupt, M <i>et al.</i> , 2011)
LiP	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. chrysosporium</i>	2 mg/L	Integración en el genoma con el promotor <i>gdp</i> .	(Sollewijn Gelpke, MD <i>et al.</i> , 1999)
MnP	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. chrysosporium</i>	3 mg/L	Integración en el genoma con el promotor <i>tef</i> .	(Ma, B <i>et al.</i> , 2003)
MnP2 (VP)	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. ostreatus</i>	21 mg/L	Integración en el genoma con el promotor constitutivo <i>sdi1</i> (proteína de la cadena respiratoria).	(Tsukihara, T <i>et al.</i> , 2006)
CPO	<i>Pseudomonas pyrocinia</i>	<i>E. coli</i>	11 mg/g célula	Plásmido pUC19 con promotor <i>lac</i> inducido con IPTG.	(Wolfframm, C <i>et al.</i> , 1988)
CPO	<i>L. fumago</i>	<i>E. coli</i>	Insoluble en cuerpos de inclusión	Promotor T7 inducido con IPTG.	(Zong, Q <i>et al.</i> , 1995)
LiP	<i>P. chrysosporium</i>	<i>E. coli</i>	Insoluble en cuerpos de inclusión	Plásmido pFLAG1 con promotor <i>tac</i> inducido con IPTG.	(Doyle, WA <i>et al.</i> , 1996)
LiP	<i>T. cervina</i>	<i>E. coli</i>	Insoluble en cuerpos de inclusión	Plásmido pET23a con promotor T7 inducido con IPTG.	(Miki, Y <i>et al.</i> , 2009)
MnP	<i>P. chrysosporium</i>	<i>E. coli</i>	Insoluble en cuerpos de inclusión	Plásmido pET21a con promotor T7 inducido con IPTG.	(Whitwam, RE <i>et al.</i> , 1995)
VP	<i>B. adusta</i>	<i>E. coli</i>	12 mg/L	pET-32b(+).	(Mohorcic, M <i>et al.</i> , 2009)
VP	<i>P. eryngii</i>	<i>E. coli</i>	Insoluble en cuerpos de inclusión	pFLAG1 con promotor <i>tac</i> inducido con IPTG.	(Pérez-Boada, M <i>et al.</i> , 2002)
CiP (=ARP)	<i>A. ramosus</i> ¹	<i>P. pastoris</i>	21 mg/L	Integración en el genoma con el promotor <i>aox1</i> (alcohol oxidasa) inducido con metanol.	(Cereghino, JL <i>et al.</i> , 2000)

Peroxidasa	Microorganismo nativo	Hospedador	Rendimiento	Comentarios	Referencia
CiP	<i>C. cinerea</i>	<i>P. pastoris</i>	39 mg/L	Plásmido pPICZ α , integración en el genoma con el promotor <i>aox1</i> .	(Kim, S-J <i>et al.</i> , 2009)
MnP	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. pastoris</i>	2.85 mg/L	Plásmido pGAPZ α , integración en el genoma con el promotor constitutivo <i>gap</i> (gliceraldehido 3P deshidrogenasa).	(Gu, L <i>et al.</i> , 2003)
LiP	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. methalonica</i>	100 mg/L	Plásmido pMET α A, integración en el genoma con el promotor <i>aug1</i> inducido con metanol.	(Wang, H <i>et al.</i> , 2004)
CiP (=ARP)	<i>A. ramosus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	0.5 mg/L	Integración en el genoma con el promotor <i>gal7</i> inducido con galactosa.	(Lokman, BC <i>et al.</i> , 2003)
LiP	<i>P. chrysosporium</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Sin expresión extracelular	-	(Conesa, A <i>et al.</i> , 2002)
MnP	<i>P. chrysosporium</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Sin expresión extracelular	-	(Conesa, A <i>et al.</i> , 2002)
CiP (=ARP)	<i>A. ramosus</i>	<i>A. awamori</i>	800 mg/L	Integración en el genoma con el promotor de endoxilanasas.	(Lokman, BC <i>et al.</i> , 2003)
CPO	<i>L. fumago</i>	<i>A. niger</i>	10 mg/L	Integración en el genoma con el promotor constitutivo <i>gla</i> (glucoamilasa).	(Conesa, A <i>et al.</i> , 2001)
LiP	<i>P. chrysosporium</i>	<i>A. niger</i>	Secreción no funcional	Integración en el genoma con el promotor <i>gla</i> .	(Conesa, A <i>et al.</i> , 2000)
MnP	<i>P. chrysosporium</i>	<i>A. niger</i>	100 mg/L	Integración en el genoma con el promotor <i>gla</i> .	(Conesa, A <i>et al.</i> , 2000)
MnP	<i>P. chrysosporium</i>	<i>A. oryzae</i>	5 mg/L	Integración en el genoma con el promotor TAKA amilasa.	(Stewart, P <i>et al.</i> , 1996)
VP	<i>P. eryngii</i>	<i>A. nidulans</i>	5.8 mg/L	Integración en el genoma con el promotor <i>alcA</i> (alcohol deshidrogenasa). Fermentación en bio-reactor.	(Eibes, GM <i>et al.</i> , 2009)
VP	<i>P. eryngii</i>	<i>A. niger</i>	5 mg/L	Integración en el genoma con el promotor <i>alcA</i> . Fermentación en bio-reactor.	(Eibes, GM <i>et al.</i> , 2009)

ARP: peroxidasa de *Arthromyces ramosus* (que es equivalente a la CiP de *C. cinerea*); CiP: peroxidasa de *C. cinerea*; CPO: cloroperoxidasa; LiP: lignina peroxidasa; MnP: manganeso peroxidasa; VP: peroxidasa versátil. ¹ *A. ramosus* es probablemente una especie de *Coprinopsis*.

1.4.1 EXPRESIÓN DE LA VP

En el caso particular de la VP de *P. eryngii* se han realizado numerosos estudios para conseguir su expresión funcional debido a su indudable interés industrial (**Tabla 1.2**). La variante alélica VPL2 se produce en *P. eryngii* con unos niveles aproximados de 4 mg/L (Martínez, MJ *et al.*, 1996). Cuando se intentó expresar la VP heterológamente en *Aspergillus nidulans*, los niveles en fermentados en matraz fueron algo más bajos que los obtenidos para su expresión por *P. eryngii* (1 mg/L) (Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 1999b). En un intento de aumentar los niveles de expresión en *A. nidulans* se optimizaron las condiciones de fermentación en bio-reactor donde se consiguieron unos niveles superiores a los obtenidos en matraz (2 mg/L) aunque inferiores a los producidos por *P. eryngii* (Lu-Chau, TA *et al.*, 2004). Recientemente, se ha optimizado la temperatura de fermentación en bio-reactor disminuyéndola a 19°C con lo que se ha conseguido aumentar los niveles de expresión de VP en *A. nidulans* hasta ~5.8 mg/L. También se intentó su expresión en *A. niger* utilizando las mismas condiciones de fermentación en bio-reactor que las utilizadas para la expresión en *A. nidulans* sin alcanzar mejoras sobre los valores conseguidos en los sistemas anteriores (~5 mg/L) (Eibes, GM *et al.*, 2009). Unos niveles más elevados (21 mg/L) fueron reportados para la expresión homóloga de la peroxidasa versátil (descrita como MnP2) de *Pleurotus ostreatus* (Tsukihara, T *et al.*, 2006). También se ha descrito la expresión de la VP de *P. eryngii* en *E. coli* y su posterior replegado *in vitro* a partir de cuerpos de inclusión con rendimientos próximos al 7% (5 mg/L) de la proteína en la mezcla de replegado (Pérez-Boada, M *et al.*, 2002). Recientemente, se ha publicado la expresión funcional de la VP de *Bjerkandera adusta* en *E. coli* con unos niveles de 12 mg/L, aunque la enzima producida mostró unos valores de actividad específica extremadamente bajos (en el orden de mU/mg), probablemente debido a un plegamiento inadecuado en el hospedador (Mohorcic, M *et al.*, 2009).

Como se puede observar, a pesar de los múltiples trabajos realizados para la expresión heteróloga y funcional de VP no se han obtenido resultados del todo satisfactorios, lo que dificulta su aplicación en diferentes procesos. En este sentido, la ingeniería de proteínas mediante evolución dirigida se muestra como una opción atractiva para superar estas limitaciones.

1.5 EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA

Las enzimas, como biocatalizadores, presentan un gran número de ventajas sobre los sistemas químicos tradicionales como una elevada eficiencia (pueden llegar a acelerar las reacciones químicas del orden de 10^{19} veces), una gran regio-, quimio- y enantio-selectividad y unas condiciones de reacción respetuosas con el medio ambiente (trabajan a temperatura ambiente, presión atmosférica, en solución acuosa y generando muy pocos subproductos) (Cherry, JR *et al.*, 2003). Sin embargo, las enzimas tal y como las encontramos en la naturaleza no se pueden emplear en ciertos procesos biotecnológicos debido principalmente a las diferencias entre el entorno celular y las estrictas condiciones industriales. En este sentido, el diseño de biocatalizadores compatibles con los procesos industriales mediante técnicas de ingeniería de proteínas es la estrategia más utilizada.

Tradicionalmente, la mejora de enzimas se ha realizado mediante el diseño racional (utilizando mutagénesis dirigida) que consiste básicamente en someter a mutación posiciones concretas de la secuencia de aminoácidos del biocatalizador, en base a los conocimientos recabados de modelos y estructuras cristalográficas y propiedades cinéticas de la enzima nativa y mutada. Desafortunadamente, el diseño racional se ve frenado en la práctica por la complejidad de la función proteica. Las enzimas son moléculas dinámicas que al interactuar con los sustratos y con su entorno sufren múltiples modificaciones que no quedan recogidas en las estructuras cristalográficas obtenidas en unas condiciones concretas en un momento determinado de la cinética enzimática. A pesar del enorme progreso en los últimos años en los estudios estructura-función, los avances en simulaciones y dinámica molecular y el cada vez mayor número y calidad de las estructuras cristalográficas, aún es difícil predecir determinados aspectos de la función enzimática o las interacciones que determinan la estabilidad (térmica, oxidativa, en solventes orgánicos,...) y la estructura proteica (Arnold, FH *et al.*, 1999).

En la última década la Evolución Molecular Dirigida se ha consolidado como la estrategia más adecuada para la ingeniería de biocatalizadores industriales donde no es necesario poseer información estructural para poder diseñar enzimas mejoradas o incluso crear nuevas funciones nunca antes requeridas en ambientes naturales.

La Evolución Molecular Dirigida es una metodología que recrea en el laboratorio los procesos claves de la evolución natural (mutación, recombinación y selección) comprimiendo la escala de tiempo de la evolución de millones de años a meses e incluso semanas (Arnold, FH *et al.*, 2001; Bloom, JD *et al.*, 2009; Romero, PA *et al.*, 2009). Mediante mutagénesis aleatoria y/o recombinaciones en el material genético que codifica para una o varias proteínas, se crea una diversidad genética que posteriormente se expresa y explora bajo las condiciones en las que se quiere mejorar la enzima (altas temperaturas, medios no

convencionales, pH extremos, mejor eficiencia, nuevas actividades catalíticas, etc) (Arnold, FH *et al.*, 2001; Bloom, JD *et al.*, 2009; Romero, PA *et al.*, 2009).

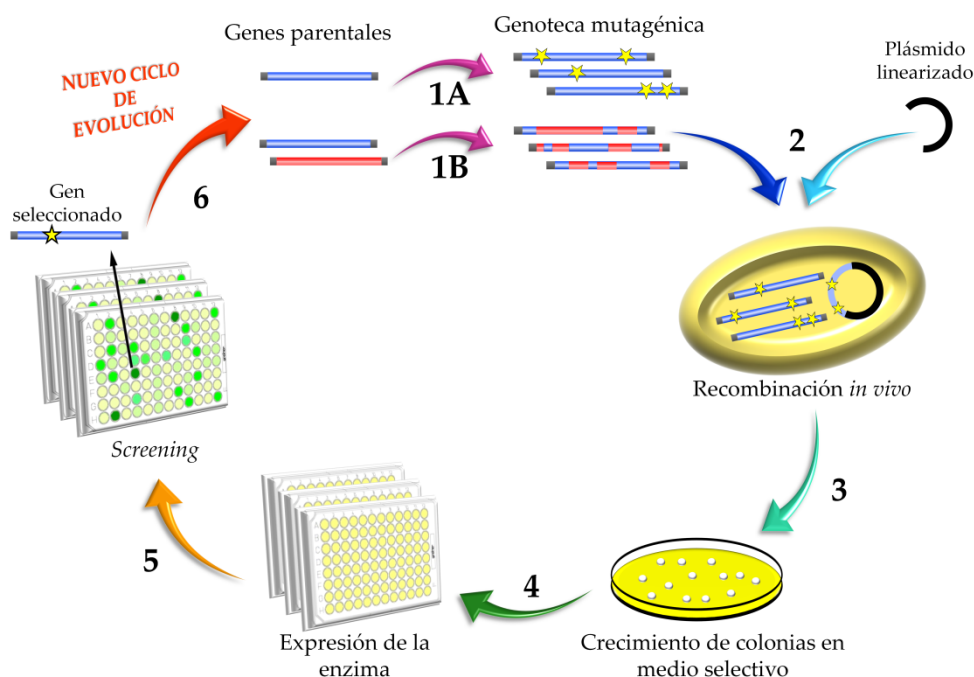


Figura 1.11. Esquema de un ciclo típico de evolución molecular dirigida empleando *S. cerevisiae*. El ciclo comienza con la introducción de diversidad mediante mutagénesis aleatoria (1A) o recombinación de los genes parentales (1B), o ambos. Posteriormente, las células de *S. cerevisiae* son transformadas con la librería generada en el paso 1A y/o 1B junto con el plásmido linealizado (2). Las células transformadas son seleccionadas en placas de medio selectivo (3). Los clones individuales se pasan a placas de 96 pocillos donde se induce la expresión de los mutantes de la proteína de interés (4). Tras la secreción, los sobrenadantes son sometidos a un *screening* HTP para detectar las mejores variantes (5). Generalmente, se realizan varios re-*screenings* consecutivos para descartar la presencia de falsos positivos. Finalmente, la mejor variante es recuperada, secuenciada y caracterizada, para emplearla como parental en un nuevo ciclo de evolución (6). Las mutaciones se representan con estrellas.

En todo experimento de evolución molecular dirigida son necesarias tres herramientas fundamentales: i) un sistema de expresión funcional apropiado (de ordinario *E. coli* o *S. cerevisiae*), ii) el desarrollo de métodos de generación de diversidad genética (principalmente basados en mutagénesis aleatorias, mutagénesis (combinatorial) saturada, y diversos procesos de recombinación de DNA tanto *in vitro* como *in vivo*), iii) un método de *screening* o cribado fiable y reproducible con el que discriminar entre las diferentes variantes obtenidas en cada generación. Haciendo un uso inteligente de estos instrumentos y con el diseño evolutivo adecuado, la mayoría de las características enzimáticas (expresión

heteróloga funcional, regio-, quimio- y enantio-especificidad, termoestabilidad, estabilidad en disolventes orgánicos, incluso la búsqueda de actividades de *novo*) pueden ser abordadas (Tao, H *et al.*, 2002; Wang, M *et al.*, 2012). De esta manera, exponiendo los genes seleccionados a ciclos sucesivos de evolución molecular dirigida, las diferentes mutaciones puntuales beneficiosas se irán acumulando y combinando hasta que la enzima adquiere la propiedad deseada, que se ve mejorada de manera notoria, generación tras generación (Figura 1.11).

1.5.1 *S. cerevisiae* COMO HOSPEDADOR Y HERRAMIENTA MOLECULAR PARA LA EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE OXIDORREDUCTASAS LIGNINOLÍTICAS

En los ensayos de evolución molecular dirigida uno de los microorganismos más utilizados es *E. coli* (en especial para el diseño de proteínas procariotas), pero cuando la proteína de interés tiene origen eucariota surgen ciertas dificultades como se ha mencionado anteriormente en el **Apartado 1.4**. Algunos de los problemas encontrados para la expresión funcional de genes ligninolíticos en *E. coli* pueden evitarse si se expresan en hospedadores eucarióticos cuya maquinaria celular sea más próxima a la nativa, como es el caso de las levaduras. En especial, el uso de *S. cerevisiae* es de gran interés ya que es capaz de realizar modificaciones post-traduccionales (glicosilación, procesamiento de los extremos N y C terminales) además de disponer de la maquinaria celular necesaria para secretar las proteínas al medio extracelular (lo cual evita pasos intermedios de lisis celular).

Otra característica destacable de *S. cerevisiae* es que tiene una elevada eficiencia de transformación ($10^6 - 10^8$ transformantes/ μg de DNA), algo que es muy importante en experimentos de evolución dirigida donde es necesario disponer de genotecas con un gran número de clones para poder explorar la propiedad deseada. Adicionalmente, haciendo uso de un vector episómico adecuado no integra el gen dentro de su genoma, facilitando así su posterior manipulación, al contrario de lo que ocurre de manera general en otras levaduras empleadas en producción heteróloga como *P. pastoris* (González-Pérez, D *et al.*, 2012).

Un atractivo adicional de *S. cerevisiae*, desde un punto de vista de generación de diversidad (*i.e.* introducción de mutaciones aleatorias y recombinaciones del DNA), para experimentos de evolución dirigida es la elevada frecuencia de recombinación homóloga de DNA que posee, la cual, a diferencia de *E. coli*, permite la construcción de genotecas *in vivo* con una gran eficiencia a través de la recombinación de diferentes genes (*in vivo DNA shuffling*).

Por otro lado, la ligación de los genes mutados en vectores de expresión es, en muchos casos, un paso laborioso que requiere un ajuste fino. En levaduras, el mecanismo reparador de huecos (*in vivo gap repair*) puede sustituir la ligación *in vitro* de una manera rápida y precisa (Bulter, T *et al.*, 2003a). Así, la transformación de los genes mutados junto con el plásmido linealizado (diseñando secuencias homólogas solapantes en sus extremos) permite su recombinación *in vivo* por la maquinaria celular de *S. cerevisiae* para dar lugar a un plásmido circular de replicación autónoma.

De esta forma, las herramientas moleculares que ofrece la fisiología de *S. cerevisiae* han permitido en los últimos años el desarrollo de herramientas de generación de diversidad como el IVOE (*In Vivo Overlap Extension*), el IvAM (*In Vivo Assembly of Mutant libraries*), el DNA assembler, o el CLERY (*Combinatorial Libraries Enhanced by Recombination in Yeast*), facilitando la exploración del espacio de secuencia proteica (**Figura 1.12**) (Abecassis, V *et al.*, 2000; Alcalde, M *et al.*, 2006; Shao, Z *et al.*, 2009; Zumárraga, M *et al.*, 2008, González Pérez, D *et al.*, 2012). Por tanto, no resulta extraño que el potencial de esta levadura se esté explotando para la construcción de rutas metabólicas complejas y circuitos genéticos en el entorno de la biología sintética (Du, J *et al.*, 2011).

Por todos estos motivos *S. cerevisiae* se considera de manera general el hospedador más apropiado para afrontar experimentos de evolución dirigida de enzimas ligninolíticas. Sin embargo, como se ha visto anteriormente, la expresión funcional en este hospedador no es un asunto trivial. Se ha visto que el re-emplazamiento de la secuencia señal nativa de la proteína a expresar por otras secuencias líder (péptido señal de la invertasa o de la fosfatasa ácida o el prepro-líder del factor α) que son reconocidas por la maquinaria celular eucariótica, facilita la correcta translocación del polipéptido en formación al RE, lo que favorece el proceso de secreción de proteínas heterólogas en *S. cerevisiae*. Esta metodología se ha empleado con éxito en la expresión de una gran variedad de proteínas como el interferón- α , el factor de crecimiento epidérmico, la calcitonina o la interleuquina 2, por citar algunos ejemplos (Brake, AJ, 1990). Recientemente, nuestro grupo ha reportado en *S. cerevisiae* la expresión funcional y evolución dirigida de lacasas ligninolíticas fusionadas a los prepro-líderes del factor α (Camarero, S *et al.*, 2012; Maté, D *et al.*, 2010).

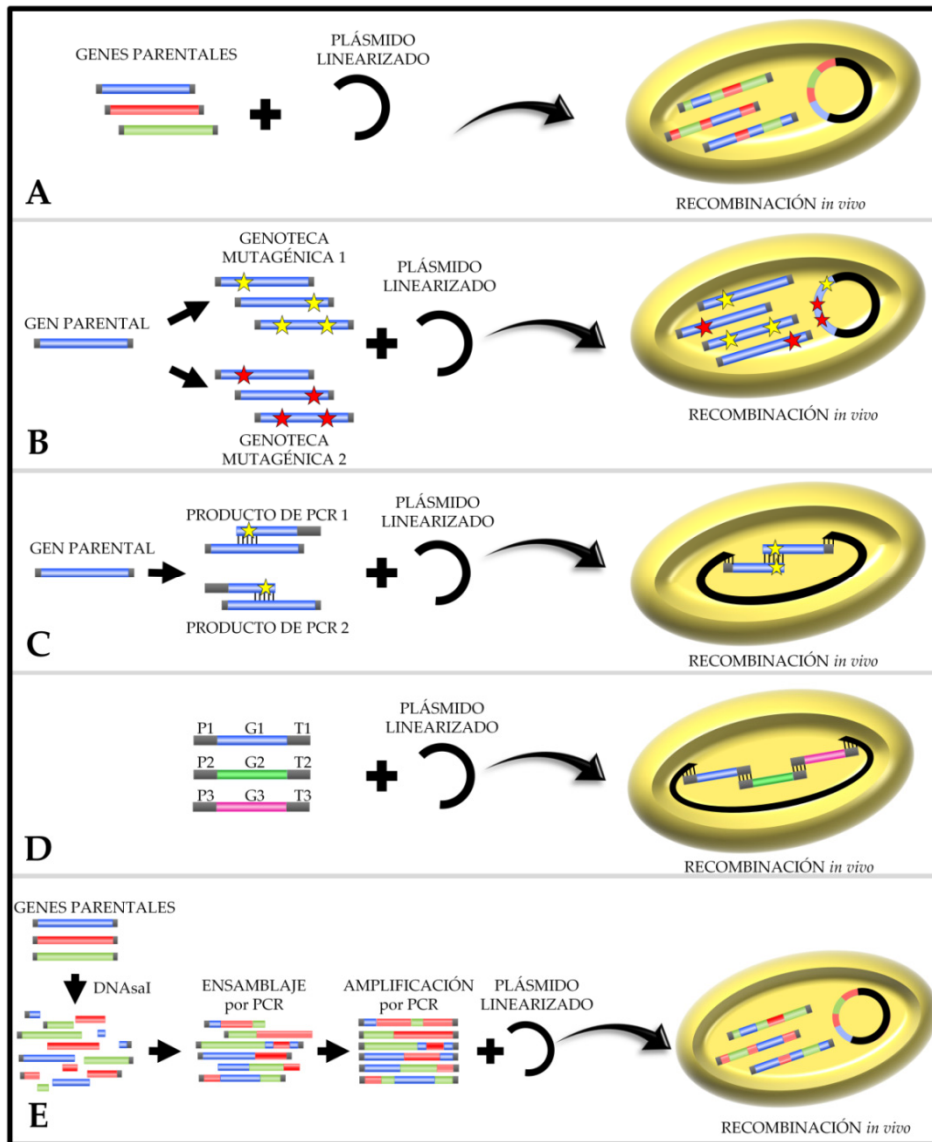


Figura 1.12. Algunas técnicas de recombinación *in vivo* en *S. cerevisiae*. A) Barajado *in vivo* (*in vivo* DNA shuffling). *S. cerevisiae* es transformado con varios genes parentales junto con el plásmido linealizado favoreciendo la recombinación de los genes al tiempo que se regenera el plásmido circular. B) IvAM. Dos o más genotecas mutantes son generadas mediante PCR mutagénica con polimerasas con distinta tendencia mutacional. *S. cerevisiae* es transformada con las genotecas junto con el plásmido linealizado. C) IVOE para mutagénesis saturada combinatorial, mutagénesis dirigida, mutagénesis de delección o inserción. El gen es amplificado en dos reacciones de PCR independientes empleando primers degenerados/mutados. Los productos de PCR son clonados junto con el plásmido linealizado en *S. cerevisiae*. D) DNA assembler. Mediante un único paso de transformación varios genes (G) con sus respectivos promotores (P) y terminadores (T) (cassettes) se ensamblan *in vivo* para construir rutas metabólicas en *S. cerevisiae*. E) CLERY. Combinación de *in vitro* e *in vivo* DNA shuffling para la construcción de librerías.

1.5.2 GENERACIÓN DE DIVERSIDAD

La mejora de una enzima por evolución dirigida depende principalmente de dos factores: el tamaño de la genoteca (determinado por la capacidad del método de *screening*) y la calidad de la genoteca, entendiéndose ésta como la frecuencia y el tipo de mutaciones y/o recombinaciones introducidas. En este sentido es importante destacar que las mutaciones beneficiosas son poco frecuentes (la mayoría son neutras o deletéreas) y por tanto la combinación de éstas es aún menos frecuente, lo que implica que la estrategia de generación de diversidad debe ser ajustada cuidadosamente de manera que se produzca la mutación de unos pocos aminoácidos por generación (Williams, GJ *et al.*, 2004). Así, las mutaciones beneficiosas irán acumulándose y recombinándose generación tras generación hasta adquirir la propiedad deseada. También es posible abrir nuevas rutas evolutivas mediante la introducción y acumulación de mutaciones neutras que permitan establecer una plataforma para el descubrimiento posterior de mutaciones beneficiosas, como sucede en los procesos de evolución natural (esto es especialmente cierto teniendo en cuenta que las herramientas de PCR mutagénica que se comentarán a continuación tienen restringido el acceso a tan sólo unos pocos aminoácidos de los 20 posibles a partir de un único cambio nucleotídico).

En general se emplean dos estrategias para la generación de diversidad: i) técnicas no-recombinantes, y ii) técnicas de recombinación de DNA.

1.5.2.1 Métodos no-recombinantes

Mediante esta estrategia la diversidad se promueve con mutaciones puntuales, ya sea a través de la sustitución al azar de un aminoácido o su inserción/delección. Así, un gran número de técnicas están disponibles en función de nuestro objetivo.

El método por excelencia para la introducción de mutaciones puntuales al azar en la secuencia de un gen es la PCR propensa a error (PCR mutagénica o mutagénesis aleatoria). Es una técnica sencilla, robusta y eficiente. La generación de mutaciones se produce mediante el empleo de una DNA polimerasa que carece de actividad correctora o se inducen errores bajo unas determinadas condiciones de reacción como por ejemplo aumentando la concentración de Mg^{2+} , desequilibrando la proporción de un dNTP respecto del resto o añadiendo Mn^{2+} (Cadwell, RC *et al.*, 1994).

Aparentemente, lo más deseable para relacionar un cambio en la secuencia con un cambio en la estructura o función de la proteína de interés, es que la frecuencia de mutación sea de un cambio aminoacídico por gen. Sin embargo, los estudios de evolución dirigida pueden utilizar frecuencias mayores, induciendo de 1 a 3/4 cambios de aminoácidos por proteína, y en algunos casos hasta 20 (Williams, GJ *et al.*, 2004). Típicamente, la tasa de error

debe ser ajustada para cada gen de manera que el 30-40% de los mutantes de la genoteca presenten menos del 10% de la actividad de la enzima parental (Cirino, PC *et al.*, 2003).

Pero la diversidad obtenida mediante mutagénesis aleatoria es limitada. Hay que tener en cuenta que la degeneración del código genético le hace tolerante a la mutación, es decir, el cambio de un nucleótido no siempre se traduce en un cambio de aminoácido (mutaciones silenciosas). Es más, únicamente se puede acceder a aproximadamente 5.6 aminoácidos de los 20 posibles a través del cambio de un único nucleótido, como se ha mencionado anteriormente (Williams, GJ *et al.*, 2004). Esto, unido con la predisposición mutacional de las polimerasas, hace que se reduzca la diversidad de los aminoácidos mutados y, por lo tanto, una amplia fracción del espacio proteico queda inexplorada.

Algunas de las alternativas mutagénicas a la mutagénesis aleatoria son: i) el empleo de agentes mutagénicos físicos/químicos (radiación UV, agentes desaminantes o alquilantes) (Zhao, H *et al.*, 2004); ii) cepas mutadoras (Jaeger, KE *et al.*, 2004); iii) técnicas de delección e inserción de un número de bases consecutivas en posiciones al azar (Murakami, H *et al.*, 2002); iv) permutación circular (Qian, Z *et al.*, 2005); y v) técnicas mutagénicas donde se tiene cierto conocimiento de la estructura como la mutagénesis saturada, mutagénesis saturada combinatorial, ISM (*Iterative Saturation Mutagenesis*) (Reetz, MT *et al.*, 2007), ISOR (*Incorporating Synthetic Oligonucleotides via gene Reassembly*) (Herman, A *et al.*, 2007), OSCARR (*One-pot Simple methodology for Cassette Randomization and Recombination*) (Hidalgo, A *et al.*, 2008) o OPW-PCR (*Overlap-Primer-Walk Polymerase Chain Reaction*) (Kumar, R *et al.*, 2008), por nombrar algunos de los protocolos disponibles.

1.5.2.2 Métodos de recombinación

Una de las principales limitaciones de la mutagénesis aleatoria es que sólo las mutaciones del gen seleccionado son transmitidas a la siguiente generación, desechando otras variantes posiblemente útiles, por lo que sus mutaciones beneficiosas tendrán que ser redescubiertas en siguientes ciclos de evolución (Arnold, FH, 1998). En este sentido, la recombinación del material genético es una poderosa herramienta que permite ampliar la diversidad obtenida mediante mutagénesis aleatoria. La recombinación del DNA de distintas secuencias permite la eliminación de mutaciones deletéreas y la acumulación de las mutaciones beneficiosas en un único gen, acelerando sobremanera el proceso evolutivo.

El primer método de recombinación descrito fue el *in vitro DNA shuffling* (Stemmer, WPC, 1994) basado en la fragmentación aleatoria del gen mediante una DNAsa. Los fragmentos de un determinado tamaño se someten a una PCR sin oligonucleótidos cebadores dando lugar a secuencias recombinantes completas que se someten a un nuevo ciclo de PCR para su amplificación.

Se han desarrollado un gran número de técnicas de recombinación de DNA *in vitro* como el StEP (*Staggered Extension Process*) (Zhao, H *et al.*, 1998) o el RACHITT (*Random Chimeragenesis on Transient Templates*) (Coco, WM *et al.*, 2001) basados en la recombinación homóloga del DNA. También se han descrito métodos de recombinación para secuencias con una homología superior al 60 % como el DOGS (*Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling*) (Gibbs, MD *et al.*, 2001) o con homologías inferiores al 60 % como el ITCHY (*Incremental Truncation for the Creation of Hybrid enzymes*) (Ostermeier, M *et al.*, 1999), el SCRATCHY (combina ITCHY y DNA *shuffling*) (Lutz, S *et al.*, 2001), el SHIPREC (*Sequence Homology-Independent Protein Recombination*) (Sieber, V *et al.*, 2001) o el *in vivo Exon Shuffling* (Kolkman, JA, 2001).

Sin embargo, las técnicas de recombinación *in vitro* son laboriosas y costosas, además de llevar asociadas la generación de mutaciones no deseadas durante los procesos de amplificación del DNA (Bulter, T *et al.*, 2003b; Cherry, JR *et al.*, 1999). Una alternativa que carece de estos problemas es la recombinación *in vivo* en *S. cerevisiae* (siendo el *in vivo DNA shuffling* el principal exponente de su uso, **Figura 1.12A**). Como se ha comentado anteriormente la recombinación *in vivo* es una herramienta fácil, rápida y no mutagénica donde el único requisito es la existencia de unas secuencias solapantes de unos 40 pares de bases entre los fragmentos a recombinar. Aparte del *in vivo DNA shuffling*, se han desarrollado un gran número de técnicas basadas en la elevada frecuencia de recombinación homóloga de *S. cerevisiae* como el IVOE, el IvAM o el CLERY (**Figura 1.12**, González-Pérez, D *et al.*, 2012).

1.5.3 MÉTODOS DE CRIBADO

El diseño del método de cribado para detectar variantes con las propiedades deseadas en la genoteca es un paso crítico en los experimentos de evolución dirigida.

Existen dos posibilidades: la selección biológica y la exploración o *screening*.

Para poder desarrollar la **selección biológica** es necesario que la proteína de interés esté asociada a la supervivencia del organismo hospedador, de manera que las mejoras en dicha proteína impliquen una mejora en el crecimiento o supervivencia en unas condiciones determinadas (Arnold, FH, 1998). Estos sistemas suelen ser muy específicos y difíciles de implementar. La principal desventaja es que la proteína de interés no puede desvincularse de la función biológica, por otro lado la actividad enzimática no debe interferir con el metabolismo celular. Por ello, es prácticamente imposible emplear este sistema de selección en situaciones donde se pretende explorar la actividad o estabilidad en ambientes no naturales (*ej.* presencia de disolventes orgánicos, altas temperaturas, pHs extremos) (Williams, GJ *et al.*, 2004).

La metodología más extendida es la **exploración** o *screening* en donde la proteína de interés no está relacionada con la supervivencia celular. El *screening* es un método más versátil y flexible donde cada uno de los componentes de la librería es analizado individualmente para la presencia de la proteína o de la propiedad catalítica a estudiar (Zhao, H *et al.*, 1999).

En un *screening* típico en fase líquida, los mutantes de la genoteca suelen crecer en placas multipocillo donde se induce la expresión de la proteína y posteriormente se detecta la presencia de dicha proteína mediante métodos de detección de actividad enzimática (colorimétricos o fluorimétricos) en el sobrenadante de los cultivos (Salazar, O *et al.*, 2003). En el caso de que la proteína no se secrete habrá que incluir un paso de lisis celular. También se puede realizar el *screening* en fase sólida detectando la actividad enzimática en la propia placa donde está creciendo el microorganismo.

En la última década se ha producido un gran desarrollo de las técnicas de alto rendimiento o *High-throughput*, HTP, que permiten realizar un gran número de experimentos de una forma rápida, fiable y reproducible además de con un coste moderado. En este sentido, el uso de robots manipuladores de líquidos aumenta la reproducibilidad y reduce la dispersión de los datos además de facilitar enormemente el trabajo del investigador. Un sistema *HTP-screening* debe ajustarse para permitir detectar las mejoras en cada generación (de 1.5 a 4 veces, por norma general) y lo suficientemente sensible para detectar los bajos niveles de actividad catalítica en los primeros ciclos.

1.5.4 EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS HACIA EXPRESIÓN FUNCIONAL

Como se ha mencionado anteriormente, disponer de un sistema de expresión funcional (como *E. coli* o *S. cerevisiae*) es básico para poder realizar evolución molecular dirigida de una enzima. Sin embargo, conseguir la expresión funcional de la enzima de interés en estos microorganismos no siempre es fácil, siendo numerosos los sistemas en los que se obtienen cantidades enzimáticas apenas detectables. En estos casos, se puede hacer uso primero de la evolución dirigida para aumentar el nivel de expresión funcional, y posteriormente usar el sistema de expresión diseñado para mejorar otras propiedades de la enzima.

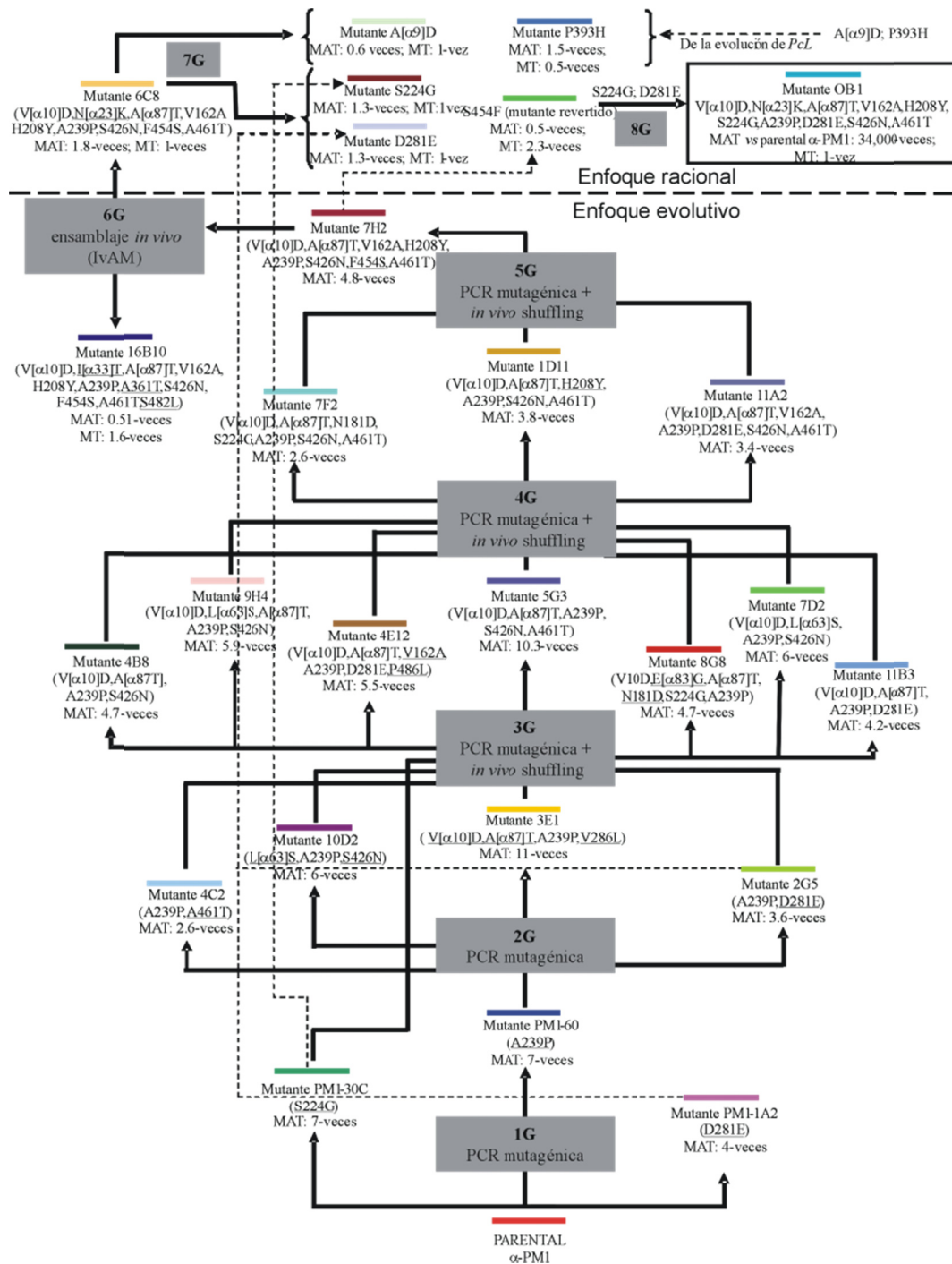


Figura 1.13. Ruta evolutiva artificial de la lacasa PM1 de alto Eº. Adaptado de Maté, D *et al.*, 2010.

En este sentido, nuestro laboratorio ya ha descrito varias rutas evolutivas complejas, todas ellas sustentadas en *S. cerevisiae*, para mejorar primero la secreción, y posteriormente, la actividad y la estabilidad frente a la temperatura o la presencia de disolventes orgánicos de varias lacasas de medio y alto E° (Bulter, T *et al.*, 2003a; Camarero, S *et al.*, 2012; Maté, D *et al.*, 2010; Maté, D *et al.*, 2011; Zumárraga, M *et al.*, 2007). En primer lugar, la lacasa de *Myceliophthora thermophila* (MtL) se sometió a 10 ciclos de evolución dirigida para obtener unos niveles de secreción de ~18 mg/L (Bulter, T *et al.*, 2003a). Posteriormente el mejor mutante de este experimento se evolucionó para conferirle resistencia a la presencia de altas concentraciones de disolventes orgánicos. En el caso de la lacasa de alto E° del basidiomiceto PM1, se llevaron a cabo 8 ciclos de evolución dirigida combinados con técnicas racionales generando el mutante OB-1 que se expresó en unos niveles en torno a 8 mg/L (Maté, D *et al.*, 2010) (**Figura 1.13**). OB-1 ha sido recientemente evolucionado para hacerlo tolerante a la sangre de humanos con el fin de aplicarlo en bionanodispositivos (implantes con fines biomédicos). Asimismo, la lacasa de alto E° de *Pycnoporus cinnabarinus* fue evolucionada alcanzando niveles de secreción de 2 mg/L y actividades mejoradas frente a mediadores redox naturales y sintéticos (Camarero, S *et al.*, 2012).

1.5.5 EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE PEROXIDASAS

A pesar de las numerosas aplicaciones industriales de las peroxidases, hay pocos estudios de evolución molecular dirigida de peroxidases con el fin de modificarlas y adaptarlas a los procesos industriales, probablemente debido a la falta de sistemas de expresión funcional adecuados.

i) Evolución de peroxidases no ligninolíticas

La evolución dirigida de la CiP de *C. cinerea* ha sido uno de los trabajos más destacables en este campo, considerándose pionero en el empleo de *S. cerevisiae* como hospedador evolutivo. La finalidad de este estudio fue obtener una enzima más estable que se pudiera añadir a los detergentes como un inhibidor de la transferencia de color. Para ello, la variante debía ser más estable a altas temperaturas (50°C), presencia de H₂O₂ (5-10 mM) y pH alcalino (10.5), condiciones que se dan en la lavadora. Tras varios ciclos de evolución dirigida en combinación con diseño racional, se diseñó un mutante con estabilidades mejoradas y una actividad similar a la del parental. Durante los experimentos de evolución se empleó *S. cerevisiae* usando su maquinaria celular para recombinar los diferentes mutantes. La variante final se sobre-expresó en *A. oryzae* (Cherry, JR *et al.*, 1999).

El grupo de F. Arnold evolucionó la HRP para su expresión funcional en *S. cerevisiae*. Una vez mejorada la expresión se realizaron varios ciclos de evolución adicionales para mejorar la actividad y estabilidad de la enzima. Para sobre-expresar la

variante mejorada se utilizó *P. pastoris* (Morawski, B *et al.*, 2000). En un trabajo posterior, emplearon el mismo sistema para incrementar su estabilidad térmica y resistencia al H₂O₂ (Morawski, B *et al.*, 2001). Recientemente, Agresti y col. (Agresti, JJ *et al.*, 2010) han reportado la evolución de la HRP, consiguiendo un mutante con propiedades catalíticas 10 veces mejores que el parental. Como sistema de expresión se empleó *S. cerevisiae* a través de un “*yeast surface display*” en el que la proteína secretada quedaba anclada a la pared celular de la levadura.

Otra peroxidasa de bajo E° que ha sido sometida a experimentos de evolución, empleando *E. coli* como hospedador, fue la CcP, consiguiendo aumentar su especificidad de sustrato para guaiacol y ABTS (Iffland, A *et al.*, 2000; Iffland, A *et al.*, 2001).

También se ha evolucionado la CPO de *L. fumago* en el propio organismo. Se consiguió mejorar su actividad de epoxidación y clorinación (Rai, GP, 2000; Rai, G *et al.*, 2001).

ii) Evolución de peroxidasas ligninolíticas

Con respecto a peroxidasas ligninolíticas, hay pocos estudios. Se ha descrito un experimento de mutagénesis saturada combinatorial en la MnP de *P. chrysosporium* en tres aminoácidos del entorno donde se produce la ruptura del H₂O₂ para mejorar su estabilidad frente al H₂O₂. Como sistema de expresión se hizo uso de un método de síntesis *in vitro* de proteínas “libre de células” basado en *E. coli* añadiendo disulfito isomerasa para favorecer la formación de los puentes disulfuro (Miyazaki-Imamura, C *et al.*, 2003). Tras analizar 10⁴ clones se obtuvo un mutante con una estabilidad al H₂O₂ 9 veces mejorada.

Más recientemente, se evolucionó la LiP de *P. chrysosporium* hacia una mayor eficiencia catalítica para la oxidación de 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) y resistencia frente al H₂O₂ empleando PCR mutagénica y DNA *shuffling*. Se emplearon dos sistemas de expresión en *S. cerevisiae*: uno a través de un “*yeast surface display*” con el que se obtuvieron mejoras de aproximadamente 1.6 veces en la degradación de 2,4-DCF y estabilidad hacia H₂O₂ (Ryu, K *et al.*, 2008b); y otro mediante secreción al medio de cultivo (Ryu, K *et al.*, 2008a) con el que se obtuvieron mejoras de 4 y 89 veces en la degradación de 2,4-DCF y estabilidad hacia H₂O₂, respectivamente.

Hasta el momento, no se ha descrito la mejora de la VP por evolución dirigida, debido a las dificultades encontradas en su expresión funcional.

2 OBJETIVOS

La VP es una enzima con un indudable interés biotecnológico debido a su capacidad para oxidar diversos sustratos y al conocimiento acumulado sobre su estructura y función en base a exhaustivos estudios racionales previos. La oportunidad de llevar a cabo la evolución dirigida de este sistema hacia nuevas metas biotecnológicas se ve frenada por la falta de un sistema de expresión heterólogo funcional adecuado.

El principal objetivo de la presente Tesis Doctoral fue el diseño de una plataforma para la evolución molecular dirigida de la VP de *P. eryngii*. Con este objeto, se plantearon las siguientes tareas:

1. Obtención de niveles de expresión funcional en *S. cerevisiae* suficientes para abordar un proceso de evolución *in vitro*. Para ello, se planteó el diseño de un gen de fusión a través de la sustitución del péptido señal nativo de la VP por el prepro-líder del factor α de *S. cerevisiae*.
2. Puesta a punto de un método colorimétrico versátil y robusto para acoplarlo a un protocolo de *HTP-screening* con el que explorar librerías de mutantes de VP.
3. Potenciar los niveles de secreción y actividad de la VP en *S. cerevisiae* mediante ciclos sucesivos de evolución dirigida.
4. Una vez alcanzados niveles de secreción adecuados, validar la plasticidad de la plataforma evolutiva mediante la mejora de otra propiedad de interés biotecnológico: se escogió mejorar la termoestabilidad cinética de la VP a través de nuevos ciclos evolutivos acoplados a un protocolo de *HTP-screening* diseñado para la ocasión.
5. Finalmente, se procedió a la caracterización bioquímica de las mejores variantes del proceso evolutivo para secreción, actividad y termoestabilidad.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 REACTIVOS, COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO, ENZIMAS COMERCIALES Y KITS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Tabla 3.1. Reactivos químicos

Reactivos	Referencia	Casa comercial	Nº C.A.S.
2,6-Dimetoxifenol	38772	Fluka	91-10-1
2-Propanol	AL0315	Scharlau	67-63-0
30% Acrilamida/Bis <i>Solution</i> 37,5:1	161,0158	BioRad	79-06-1
2,2'-Azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato) ABTS	A1888-5G	Sigma	30931-67-0
Ácido acético	131008,1611	Panreac	64-19-7
Ácido clorhídrico	141020,1611	Panreac	7647-01-0
Ácido etilen-diaminotetraacético (EDTA)	E5134-250G	Sigma	6381-92-6
Ácido ortobórico	131015,1211	Panreac	10043-35-3
Ácido ortofosfórico	AC 11001000	Scharlau	7664-38-2
Ácido piperacín-N,N'-bis(2-etanosulfónico) (PIPES)	P8203	Sigma	5625-37-6
Ácido tartárico	1,00804,1000	Merck	87-69-4
Agarosa	161-3101	BioRad	9012-36-6
Agarosa de bajo punto de fusión	161-3112	BioRad	9012-36-6
Alcohol veratrílico	D133000	Sigma	93-03-8
Azul de bromofenol	B8026-5G	Sigma	34725-61-6
BisTris (bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano)	14880-500G-F	Fluka	6976-37-0
Cloruro de calcio 2-hidrato	131232	Panreac	10035-04-8
Cloruro de manganeso II tetrahidrato	105927	Merck	13446-34-9
Cloruro de potasio	141494.1210	Panreac	7447-40-7
Dimetilsulfóxido (DMSO)	8,02912,1000	Merck	67-68-5
Dodecil sulfato sódico (SDS)	L4390-100G	Sigma	151-21-3
Etanol	141086,1212	Panreac	64-17-5

Evolución Dirigida de la Peroxidasa Versátil de *Pleurotus eryngii*

Reactivos	Referencia	Casa comercial	Nº C.A.S.
Glicerol	141339,1211	Panreac	56-81-5
Glicina	G8898-1KG	Sigma	56-40-6
Hidróxido potásico	211514	Panreac	1310-58-3
Hidróxido sódico	131687	Panreac	1310-73-2
Metanol	ME0315	Scharlau	67-56-1
N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina (TEMED)	T9281	Sigma	110-18-9
Peróxido de hidrógeno 30%	107209,025	Merck	7722-84-1
Persulfato amónico	161-0700	BioRad	7727-54-0
Piperazina hexahidrato	P7003-1KG	Fluka	81546-15-8
Polietilenglicol 6000 (PEG)	81253	Fluka	25322-68-3
<i>Reactive Black 5</i>	306452-100G	Sigma	17095-24-8
Sulfato de manganeso II monohidrato	M7634	Sigma	10034-96-5
Trizma Base	T6066	Sigma	77-86-1
β -Mercaptoetanol	M6250	Sigma	60-24-2

Tabla 3.2. Componentes de los medios de cultivo

Componente	Referencia	Casa comercial
Ácido 5-aminolevulínico	08340-1G	Sigma
Agar <i>Bacto</i> TM	214010	BD
Ampicilina	A0166-5G	Sigma
Cloranfenicol	C-0378	Sigma
D-(+)-Galactosa	G0750-500G	Sigma
D-(+)-Glucosa	G5767-500G	Sigma
D-(+)-Rafinosa pentahidrato	R-0250-100G	Sigma
Extracto de levadura <i>Bacto</i> TM	212750	BD
Fosfato potásico monobásico	P5379-1KG	Sigma
Hemina	H9030-100G	Sigma

Componente	Referencia	Casa comercial
Hemoglobina de sangre bovina	H2625-25G	Sigma
Peptona <i>Bacto</i> TM	211677	BD
Suplemento de aminoácidos sin uracilo	Y1501-20G	Sigma
Uracilo	6630-10GM	Merck
<i>Yeast nitrogen base w/o amino acids</i> (YNB)	291940-100g	Difco (BD)
Zeocina	Ant-zn-1	Invivogen

Tabla 3.3. Kits de biología molecular

Kit	Referencia	Casa comercial
Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP)	D7295-2ML	Sigma
<i>DNA Clean & Concentrator</i> TM -25	D4003	Zymoresearch
<i>Gel Loading Solution</i>	G7654 Type 1	Sigma
<i>Gel Red DNA stain</i>	BT-41003	Biotium
<i>Genemorph II random mutagenesis Kit</i>	200550	Stratagene
<i>GeneRuler 1Kb DNA Ladder</i>	SM0311	Fermentas
<i>NucleoSpin plasmid</i> [®] Kit	740588250	Macherey Nagel
<i>Perfect Protein Markers, 15-150 kDa</i>	69149-3	Novagen
<i>Protein assay dye reagent Kit II</i> (Bradford)	500-0002	BioRad
<i>ProtoBlue Safe</i>	EC-722	NationalDiagnostics
<i>Transblot turbo transfer pack</i>	170-4156	BioRad
<i>Yeast Transformation Kit</i>	YEAST1-1KT	Sigma
<i>Zymoclean Gel DNA recovery Kit</i>	D4001	Zymoresearch
<i>Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep Kit</i>	D2001	Zymoresearch

Tabla 3.4. Enzimas comerciales

Enzima	Referencia	Casa comercial
Enzima de restricción <i>Bam</i> HI	R0136S	New England Biolabs
Enzima de restricción <i>Eco</i> RI	R0101S	New England Biolabs
Enzima de restricción <i>Not</i> I	R0189S	New England Biolabs
Enzima de restricción <i>Xho</i> I	R0146S	New England Biolabs
<i>Pfu-ultra High Fidelity DNA Polymerase</i>	600382	Stratagene
<i>PNGase F</i>	P7367-50UN	Sigma
<i>T4 DNA Ligase</i>	M0202T	New England Biolabs
<i>Taq DNA Polymerase</i>	D4545-250UN	Sigma

3.2 GEN PARENTAL DE LA VP DE *P. eryngii*

El gen parental utilizado en esta Tesis Doctoral pertenece al cDNA de la variante alélica *vpl2* de la isoenzima VPL de *P. eryngii* (ATCC 90787). Esta secuencia de 996 pb (*Gen Bank accession* N° AF007222) codifica para una proteína madura de 331 aminoácidos.

3.3 MICROORGANISMOS

3.3.1 LEVADURAS

La cepa de *S. cerevisiae*, BJ5465 (ATCC 208289, LGC Promochem, España) se utilizó para la expresión de genes nativos y evolucionados artificialmente de la VP de *P. eryngii* clonados en el plásmido pJR0C30. Esta cepa presenta auxotrofia para uracilo, leucina, triptófano e histidina, siendo además deficiente en proteasas (CH1) lo que la hace adecuada para la expresión y secreción de proteínas heterólogas (Parekh, R *et al.*, 1995). Su genotipo completo es: MATa *ura3-52 trp1 leu2-delta1 his3-delta200 pep4::HIS3 prb1-delta1.6R can1 GAL*.

3.3.2 BACTERIAS

3.3.2.1 *E. coli* DH5 α

La cepa de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) se empleó para construir el gen de fusión *α vpl2* (empleando los vectores plamídicos pGAPZ α A y pJR0C30). Para ello, se reemplazó el péptido señal nativo del gen de la VP de *P. eryngii* por la secuencia prepro-líder del factor α

tal y como se describe en el **Apartado 3.7.7**, pag 66. El genotipo de esta cepa es: *supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*.

3.3.2.2 *E. coli* XL2-Blue

La cepa de *E. coli* XL2-Blue (Stratagene) se utilizó para purificar y producir con un elevado rendimiento los plásmidos que contenían los genes de las VP obtenidos durante el proceso de evolución artificial. Son células ultracompetentes con una eficiencia de transformación superior a 5×10^9 transformantes por μg de DNA. Su genotipo es: *endA1 supE44 thi-1 hsdR17 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]*.

3.4 VECTORES PLASMÍDICOS

3.4.1 pFLAG1-*vpl2* (IBI)

Este vector comprende el cDNA original de *vpl2*. pFLAG1-*vpl2* es un vector de expresión para *E. coli*, portador del promotor *tac* y del gen de resistencia a ampicilina empleado como marcador de selección. El promotor *tac* es un híbrido entre los promotores *trp* y *lac* inducible por isopropil- β -D-tio-galactopiranosido (IPTG), un análogo no hidrolizable de la lactosa.

3.4.2 pGAPZ α A (INVITROGEN)

Este vector (3147 pb) incluye la secuencia prepro-líder del factor α de *S. cerevisiae* y hace uso del promotor *gap* para expresar constitutivamente proteínas recombinantes en *P. pastoris*. El marcador de selección es el factor de resistencia a zeocina, que es funcional tanto en *P. pastoris* como en *E. coli*. pGAPZ α A se usó para remplazar la secuencia señal nativa de *vpl2* por el prepro-líder del factor α .

3.4.3 pJRoC30 (NOVOZYMES)

Este vector fue cedido por la Profesora Frances H. Arnold del *California Institute of Technology* (CALTECH). pJRoC30 se empleó para clonar y expresar en *S. cerevisiae* los genes de las VP obtenidos durante el proceso de evolución dirigida. Se trata de un vector episómico bifuncional de 10477 pb (11730 pb incluyendo el gen de fusión *α vpl2*, ver **Apartado 4.1**, pag 105) que utiliza el promotor *gal1* (inducible por galactosa) para expresar proteínas recombinantes. El marcador de selección en *E. coli* es el factor de resistencia a ampicilina y en *S. cerevisiae* es el gen *ura3* que complementa la auxotrofia para uracilo en cepas *ura3⁻* de *S. cerevisiae*.

3.5 MEDIOS DE CULTIVOS Y SOLUCIONES

3.5.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA *E. coli*

3.5.1.1 Medio Luria Bertani (LB)/ampicilina/zeocina

Medio para crecimiento selectivo de transformantes de *E. coli* resistentes a ampicilina (conteniendo el vector pJRoC30 en el caso de LB/amp) o resistentes a zeocina (conteniendo el vector pGAPZ α en el caso de LB/zeocina) (Sambrook, J *et al.*, 1989).

Bacto Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Ampicilina estéril (100 mg/mL) ¹	1 mL
Zeocina estéril (100 mg/mL) ¹	0.5 mL
Completar con agua destilada hasta	1 L

¹ Esterilizar por filtración

Ajustar a pH 7.0 con NaOH. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C. Añadir la ampicilina o zeocina cuando el medio se encuentre a ~ 50°C. Para preparar medio sólido, añadir agar 20 g/L antes de la esterilización.

3.5.1.2 Medio *Super Optimal Broth* (SOB)

Solución stock para transformación de células competentes de *E. coli* (Sambrook, J *et al.*, 1989).

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

Ajustar a pH 7.0 con NaOH. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C. Puede prepararse y almacenarse a 4°C durante largos períodos de tiempo.

3.5.1.3 Medio *Super Optimal broth with Catabolite repression* (SOC¹)

Solución de trabajo para transformación de células competentes de *E. coli* (Sambrook, J *et al.*, 1989).

Medio SOB	5 mL
MgCl ₂ (2 M) ²	25 µL
Glucosa (20% p/v) ²	100 µL

¹ Preparar nuevo para cada transformación

² Esterilizar por filtración

3.5.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA *S. cerevisiae*

3.5.2.1 Medio YP (1.55x)

Solución stock para expresión de peroxidasa versátil.

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

Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C. Una vez preparado, mantener el medio en oscuridad (sensible a la luz) a 4°C.

3.5.2.2 Medio YPD

Crecimiento general de levaduras.

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

¹ Esterilizar por filtración

Esterilizar la peptona y el extracto de levadura disueltos en agua en autoclave durante 15 min a 121°C. Añadir la glucosa y el antibiótico cuando el medio se encuentre a ~ 50°C. Para preparar medio sólido, añadir agar 20 g/L antes de la esterilización. Una vez preparado, mantener el medio en oscuridad a 4°C.

3.5.2.3 Medio Mínimo líquido SC

Medio selectivo sin uracilo para el crecimiento de transformantes que contienen el vector pJRoC30. Para el crecimiento de la cepa salvaje sin transformar (control negativo) que no contiene el vector pJRoC30 se utiliza el mismo medio añadiendo como suplemento uracilo en una concentración final de 76 mg/L.

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

¹ YNB: *Yeast Nitrogen Base*

² Mantener a temperatura ambiente (precipita en frío)

³ Esterilizar por filtración

Una vez preparado, mantener el medio en oscuridad a 4°C. Esterilizar el uracilo disuelto en agua en autoclave durante 15 min a 121°C. Añadir el resto de los ingredientes cuando el medio se encuentre a ~ 50°C.

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

Medio selectivo sin uracilo para el crecimiento de transformantes que contienen el vector pJRoC30. Para el crecimiento de la cepa salvaje sin transformar (control negativo) que no contiene el vector pJRoC30 se utiliza el mismo medio añadiendo como suplemento uracilo en una concentración final de 76 mg/L.

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

¹ Esterilizar por filtración

Esterilizar el agar (y el uracilo en su caso) disuelto en agua en autoclave durante 15 min a 121°C. Añadir el resto de los ingredientes cuando el medio se encuentre a ~ 50°C.

3.5.2.5 Medio de expresión líquido

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

Medio YP (1.55x)	720 mL
Tampón KH ₂ PO ₄ (1 M, pH 6.0) ¹	67 mL
Hemoglobina bovina (5 g/L) ¹	22.2 mL
Galactosa (20% p/v) ¹	111 mL
Cloranfenicol (25 mg/mL) en etanol ¹	1.1 mL
Completar con agua destilada estéril hasta	1 L

¹ Esterilizar por filtración

Para la producción de la VP nativa y sus variantes evolucionadas en grandes cantidades en matraz este medio fue optimizado (ver **Apartado 3.10.1.3**, pag 73) empleando una concentración final de hemoglobina bovina de 500 mg/L, CaCl₂ y etanol en una concentración final de 1 mM y 25 g/L, respectivamente.

3.5.2.6 Medio de expresión sólido

Medio para la expresión de VP en *S. cerevisiae* en fase sólida (placas Petri) utilizadas en el test de expresión (ver **Apartado 3.10.1.1**, pag 71).

Extracto de levadura	5 g
Bacto Peptona	10 g
Tampón KH ₂ PO ₄ (1 M, pH 6.0) ¹	60 mL
Hemina (50 mg/mL) ^{1,2}	5 mL
Galactosa (20% p/v) ¹	100 mL
Cloranfenicol (25 mg/mL) en etanol ¹	1 mL
Bacto Agar	20 g
Completar con agua destilada estéril hasta	1 L

¹ Esterilizar por filtración

² Su adición dependió del experimento según se indica en **Apartado 3.10.1.1**

Esterilizar la peptona, el extracto de levadura y el agar disueltos en agua en autoclave durante 15 min a 121°C. Añadir el resto de componentes cuando el medio se encuentre a ~ 50°C. Una vez preparado, mantener el medio en oscuridad a 4°C.

3.5.3 SOLUCIONES Y TAMPONES

3.5.3.1 TAE 50X

Tampón utilizado en electroforesis de DNA, se usó en concentración 1X.

Tris-base	242.3 g
Ácido acético	57.2 mL
EDTA 0.5 M pH 8.0	100 mL
Completar con agua milli-Q hasta	1L

3.5.3.2 Tampón de transformación Inoue

Tampón utilizado para crear competencia en células DH5 α de *E. coli*.

MnCl ₂ ·4H ₂ O	10.88 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.2 g
KCl	18.65 g
PIPES 0.5 M pH 6.7	20 mL
Completar con agua milli-Q hasta	1L

Se añade PIPES después de disolver los demás compuestos. Se esteriliza por filtración.

3.5.3.3 Tampón tris-glicina

Tampón de carrera para electroforesis en geles de acrilamida/bis con SDS (SDS-PAGE).

Tris-base	3 g
Glicina	14.4 g
Completar con agua milli-Q hasta	1L

Ajustar a pH 8.3-8.6. Para conferir condiciones desnaturalizantes se añade 0.1 % de SDS.

3.5.3.4 Tampón Britton y Robinson (B&R) 500 mM

Tampón utilizado para los ensayos de actividad VP frente al pH.

Ácido bórico	30.9 g
Ácido acético	28.5 mL
Ácido ortofosfórico 85 %	34 mL
Completar con agua milli-Q hasta	1L

Ajustar al pH deseado con ácido acético o NaOH.

3.6 MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE ORGANISMOS

3.6.1 MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE LEVADURAS

3.6.1.1 Mantenimiento y cultivo de la cepa silvestre de *S.cerevisiae*

La cepa silvestre de *S. cerevisiae* se sembró en placas YPD incubándolas durante 48 h a 30°C. Se transfirieron colonias aisladas a matraces de 100 mL con 10 mL de YPD. Los matraces se incubaron a 30°C y 210 rpm (Minitron Infors, Suiza) durante 6-8 h hasta alcanzar densidades ópticas (DO₆₀₀) entre 1 y 2. Se prepararon suspensiones celulares en glicerol estéril al 20 % (v/v) (para ello se mezcló 1 mL de cultivo con 0.5 mL de una solución de glicerol estéril al 60 %) y los gliceroles se almacenaron a -80°C.

3.6.1.2 Mantenimiento y cultivo de células competentes de *S. cerevisiae*

Las células competentes de *S. cerevisiae* se prepararon en matraces de 1 L conteniendo 100 mL de YPD. Se incubaron a 30°C y 210 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 1-1.2. Se siguió el protocolo descrito en *Yeast Transformation Kit* de Sigma. Las células competentes pueden almacenarse a 4°C durante 1 semana o congeladas a -80°C, mostrando una pérdida de eficiencia progresiva. Por este motivo, para la creación de las librerías mutagénicas (donde es fundamental obtener un elevado rendimiento de transformación) se emplearon células competentes recién preparadas. En cada generación, para llevar a cabo el 2^º re-screening se usaron células competentes almacenadas a -80°C en glicerol estéril al 20 % (v/v) (únicamente se requirieron 5 colonias por mutante analizado).

3.6.1.3 Mantenimiento y cultivo de las células de *S. cerevisiae* transformadas

Las células de *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido pJR α vp12 y sus variantes obtenidas en el proceso de evolución dirigida se incubaron en placas SC durante 3 días a 30°C. Se transfirieron colonias aisladas a matraces de 100 mL con 10 mL de medio mínimo líquido. Los matraces se incubaron a 30°C y 210 rpm durante 6-8 h hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ entre 1 y 2. Se prepararon suspensiones celulares en glicerol estéril al 20 % (v/v) y se almacenaron a -80°C.

3.6.2 MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE BACTERIAS

3.6.2.1 Mantenimiento y cultivo de *E. coli*

Las células de *E. coli* transformadas con el plásmido pJR α vp12 y sus variantes obtenidas durante el proceso de evolución dirigida se incubaron en placas LB/amp a 37°C durante 12-14 h. Se transfirieron colonias aisladas a tubos de 15 mL con 5 mL de LB/amp y

se incubaron a 37°C y 100 rpm durante 12 h. Se prepararon suspensiones celulares en glicerol estéril al 20 % (v/v) y se almacenaron a -80°C. Las células de *E. coli* transformadas con el plásmido pGAPZ α vp12 se sometieron al mismo proceso descrito para los transformantes con pJR α vp12 pero usando como marcador de selección zeocina en lugar de ampicilina.

3.6.2.2 Mantenimiento y cultivo de células competentes de DH5 α de *E. coli*

Las células DH5 α de *E. coli* se hicieron competentes siguiendo el método de Inoue (**Apartado 3.8**, pag 69) a partir de cultivos en SOB crecidos a 18°C que habían alcanzado una DO₆₀₀ de 0.55. Las células competentes se conservaron en tampón Inoue y DMSO (según protocolo descrito en el **Apartado 3.8**, pag 69) a -80°C.

3.7 OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.7.1 AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO DE BACTERIAS

Para extraer los plásmidos de cultivos de *E. coli* en LB/amp/zeocina se empleó el kit *Nucleospin plasmid* siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Este kit se basa en el método de lisis alcalina seguido de la purificación del DNA por medio de una resina de sílice. El plásmido se eluyó en agua milli-Q estéril.

3.7.2 AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO DE LEVADURAS

Para extraer los plásmidos de cultivos de *S. cerevisiae* en medio mínimo se empleó el kit *Zymoprep yeast plasmid miniprep* siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El método de extracción está basado en la lisis enzimática de la pared de la levadura empleando la enzima *Zymolyase*TM. La purificación del DNA se lleva a cabo mediante precipitación con isopropanol. El plásmido se recuperó en tampón tris-HCl 10 mM pH 8.5.

3.7.3 ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para cuantificar y analizar la pureza de los plásmidos y los productos de amplificación obtenidos por PCR se emplearon dos metodologías.

3.7.3.1 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV/vis)

Se midió la absorbancia de la solución de DNA a 260 nm (Sambrook, J *et al.*, 1989). La concentración se calculó teniendo en cuenta que una DO₂₆₀ = 1 corresponde a una concentración de 50 μ g/mL de DNA de doble cadena. El grado de pureza de la solución de

DNA se valoró mediante la relación A_{260}/A_{280} , que debe ser 1.8-2.0, si es inferior indica contaminación con proteínas y si es superior indica presencia de cloroformo o fenol. Estas medidas se realizaron en agua milli-Q en un espectrofotómetro *Shimadzu UV-1800* (Japón) con cubetas de cuarzo de 0.1 mL.

3.7.3.2 Electroforesis en gel de agarosa

Este método permite cuantificar el DNA de forma aproximada, de manera que se utilizó principalmente para confirmar la concentración calculada mediante espectroscopía.

Se prepararon geles de agarosa al 0.75 % (p/v) en tampón TAE. Las electroforesis se realizaron a un voltaje de 120 V en cubetas horizontales (Mini-Sub Cell GT, BioRad, EEUU) donde las muestras se habían mezclado previamente con el tampón de carga comercial *Gel Loading Solution I* de Sigma que contiene azul de bromofenol 0,25 % (p/v), azul de xilencianol 0,25 (p/v) y sacarosa. Estos geles se tiñeron mediante incubación durante 15-20 min en solución de *GelRed DNA Stain* en tampón TAE. Los geles teñidos se analizaron con el software *Quantiti one 1-D analysis* (BioRad, EEUU) acoplado al transiluminador *Gel Doc TM XR* (BioRad). La concentración del DNA se calculó comparando su intensidad con la de las bandas de marcadores de masa molecular, de tamaño y concentración conocidos (*DNA molecular weight marker: VI, VII y GeneRuler 1Kb DNA Ladder*).

3.7.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Para aislar y purificar fragmentos de DNA procedentes tanto de digestiones enzimáticas como de amplificaciones por PCR, se llevaron a cabo electroforesis semipreparativas en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 0.75 % (p/v). Las carreras se realizaron a 4°C y 60 V (5 V/cm, considerando la distancia entre los electrodos). Los geles se tiñeron y visualizaron como se indica en el **Apartado 3.7.3.2**. Tras la tinción, los geles se lavaron con agua milli-Q para eliminar el colorante no unido al DNA. Las bandas de interés se cortaron con un bisturí y se purificaron con el kit *Zymoclean gel DNA recovery* siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Este kit incluye columnas con una resina de sílice donde el DNA de interés en presencia de sales (NaI) queda retenido por interacciones electrostáticas. El DNA se recupera en agua milli-Q estéril.

Para aislar y purificar el plásmido linearizado pJ*Rαvpl2* empleado en la clonación de las genotecas de mutantes, se realizaron electroforesis semipreparativas como se ha descrito anteriormente, con la salvedad de que la porción de gel que contenía el vector linearizado no se tiñó ni se expuso a luz ultravioleta. Es importante que el plásmido linearizado no sea expuesto a luz ultravioleta ni agentes intercalantes que puedan afectar a su estabilidad ya

que esto podría disminuir la eficiencia durante el *in vivo cloning* en el proceso de construcción de genotecas (ver **Apartado 3.11.1**, pag 75).

Para identificar la banda a purificar, en el mismo gel de electroforesis se cargó un carril con una pequeña muestra de plásmido linearizado que sí se tiñó y expuso a luz ultravioleta con la finalidad de usarlo como referencia para determinar la posición exacta de la banda en la porción de gel que no se había teñido. La purificación se realizó con el kit *Zymoclean gel DNA recovery*.

3.7.5 OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos fueron diseñados con el software *Fast-PCR v3.5.30* (*University of Helsinki*, Finlandia) y sintetizados por el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC (Madrid) (**Tabla 3.5**).

3.7.6 SECUENCIACIÓN DE DNA Y ANÁLISIS DE SECUENCIA

Las secuencias de las distintas construcciones plasmídicas y variantes evolucionadas se resolvieron en un Secuenciador Automático con un sistema de electroforesis capilar *ABI 3730 DNA Analyzer* (*Applied Biosystems*) del Servicio de Secuenciación Secugen S.L. (CIB, Madrid). Las muestras se prepararon a una concentración de 1.5 µg/15 µL de DNA. Los oligonucleótidos (0.5 µM) empleados fueron: RMLN directo, 3R directo, RMLC reverso y 5F reverso. El análisis de secuencias se llevó a cabo con los programas *Vector NTI v10.3.0* (Invitrogen), *BioEdit v7.0* y *Chromas v1.4* para manipulación, alineamiento y visualización de secuencias.

Tabla 3.5. Oligonucleótidos empleados

Oligonucleótido	Secuencia	pb	Sitio de unión en plásmido
NcoRI directo	5' CGGAATTC GCAACTTGCGACGACGGACGC 3'	29	5' 104-124 3' (1)
CtNotI reverso	5' AAGGAAAAA GCGGCCG CTTACGATCCAGGGACGGGAGG 3'	39	5' 1078-1099 3' (1) 5' 1741-1761 3' (2)
NtpJRBamHI directo	5' CGC GGATCC ATGAGATTTCTTCAATTTTACTGC 3'	35	5' 493-518 3' (2)
RMLN directo	5' CCTCTATACTTTAACGTCAAGG 3'	22	5' 160-1813' (3)
RMLC reverso	5' GGGAGGGCGTGAATGTAAGC 3'	20	5' 1532-1551 3' (3)
3R directo	5' GTTCCATCATCGCGTTCG 3'	18	5' 669-686 3' (3)
5F reverso	5' CCAAGAAGAAAGGAATCC 3'	18	5' 837-854 3' (3)
ITDSTE13 reverso	5' <i>gcaagttgctcttttctc</i> GAGAGATACCC 3'	29	5' 444-463 3' (4)
ITDEcoRI directo	5' <i>gagaaaagagcaacttgc</i> GACGACGGACGC 3'	30	5' 482-502 3' (3)
IVDSTE13 reverso	5' <i>gcagcatttgcggtggtgcgtccgctcgc</i> caagttgcTCTTTTCTCGAGAGATACCCCTTC 3'	62	5' 440-463 3' (4)
IVDEcoRI directo	5' <i>gcaacttgcgacgacggacgc</i> 3'	21	5' 480-505 3' (3)

(1) pFLAG1-*vpl2*; (2) pGAPZ α *vpl2*; (3) pJR *vpl2*; (4) pJRP1. Subrayado y en negrita las dianas de restricción introducidas. Las secuencias solapantes se destacan en minúscula y cursiva.

3.7.7 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pJR α vpl2

Para la construcción del plásmido pJR α vpl2 fue necesario fusionar la secuencia prepro-líder del factor α de *S. cerevisiae* con la secuencia que codifica para la proteína VP madura.

El cDNA *vpl2* de *P. eryngii* (clonado en el vector pFLAG1-*vpl2*) fue amplificado por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (PerkinElmer, EEUU) utilizando los oligonucleótidos cebadores NcoRI-directo y CNotI-reverso (Tablas 3.5 y 3.6) que incluían dianas de restricción para *EcoRI* y *NotI*, generando el molde de la VP madura sin el péptido señal nativo. El producto amplificado fue purificado como se ha descrito en el Apartado 3.7.4, pag 63.

Tabla 3.6. Condiciones de la reacción de amplificación de *vpl2*.

Oligonucleótido NcoRI-directo	400 nM
Oligonucleótido CNotI-reverso	400 nM
cDNA <i>vpl2</i> (pFLAG1- <i>vpl2</i>)	50 ng
dNTPs	1 mM
MgCl ₂	2 mM
Tampón <i>Taq</i> polimerasa (10X)	10 μ L
<i>Taq</i> polimerasa	5 U
Completar con agua milli-Q estéril hasta	100 μ L

El programa de PCR empleado fue: 94°C durante 5 min, 55°C durante 5 min, 72°C durante 5 min (1 ciclo), 94°C durante 35 s, 50°C durante 2 min, 72°C durante 4 min (25 ciclos) y 72°C durante 10 min (1 ciclo).

Tabla 3.7. Condiciones de la reacción de digestión del plásmido pGAPZ α A y del producto de PCR que contenía el cDNA *vpl2*.

Tampón de digestión H 10X	2 μ L
Plásmido pGAPZ α A/producto de PCR (cDNA <i>vpl2</i>)	1 μ g
<i>EcoRI</i>	10 U
<i>NotI</i>	10 U
Completar con agua milli-Q estéril hasta	20 μ L

La reacción se incubó durante 3 h a 37°C. Las enzimas fueron inactivadas a 80°C durante 20 min.

Por otro lado, el vector de *Invitro*gene pGAPZ α A se empleó como molde para obtener el prepro-líder del factor α . Para ello, fue necesario digerirlo con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI*, al igual que el producto amplificado *vpl2* (Tabla 3.7). Posteriormente, se realizó la ligación de ambos productos mediante la formación de enlaces fosfodiéster a través de la DNA ligasa T4 en una relación 1:3 (plásmido:inserto) (Tabla 3.8) generando la construcción pGAPZ α vpl2 (ver Figura 4.1, pag 105).

Tabla 3.8. Ligación de pGAPZ α A y *vpl2*. Construcción pGAPZ α vpl2.

Plásmido linearizado pGAPZ α A digerido con <i>EcoRI</i> y <i>NotI</i>	65 ng
cDNA <i>vpl2</i> digerido con <i>EcoRI</i> y <i>NotI</i>	200 ng
Tampón T4 DNA ligase (10X)	1 μ L
T4 DNA ligase	10 U
Completar con agua milli-Q estéril hasta	10 μ L

La reacción de ligación se incubó toda la noche a 16°C.

El plásmido pGAPZ α vpl2 se transformó en células competentes DH5 α *E. coli* por choque térmico (Sambrook, J *et al.*, 1989) para sobre-producirlo y purificarlo con el kit *Nucleospin Plasmid* siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, se amplificó el fragmento formado por la secuencia del prepro-líder del factor α fusionada con *vpl2* empleando como molde la construcción pGAPZ α vpl2. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos NtpJRBamHI-directo y CtNotI-reverso (Tablas 3.5 y 3.9), los cuales incluyeron dianas de restricción para *BamHI* y *NotI*, generando el producto α vpl2 que fue purificado tal como se describe en el Apartado 3.7.4, pag 63.

Tabla 3.9. Condiciones de la reacción de amplificación de α vpl2.

Oligonucleótido NtpJRBamHI-directo	400 nM
Oligonucleótido CNotI-reverso	400 nM
pGAPZ α vpl2	40 ng
dNTPs	1 mM
MgCl ₂	2 mM
Tampón <i>Taq</i> polimerasa (10X)	10 μ L
<i>Taq</i> polimerasa	5 U
Completar con agua milli-Q estéril hasta	100 μ L

El programa de PCR empleado fue: 94°C durante 5 min, 55°C durante 5 min, 72°C durante 5 min (1 ciclo), 94°C durante 35 s, 50°C durante 2 min, 72°C durante 4 min (25 ciclos) y 72°C durante 10 min (1 ciclo).

Finalmente, se llevó a cabo la digestión tanto del plásmido pJRoC30 como de *avpl2* con las enzimas *Bam*HI y *Not*I (Tabla 3.10). Los productos digeridos de *avpl2* y del vector pJRoC30 linearizado fueron ligados (Tabla 3.11) dando lugar a la construcción pJR*avpl2* (ver Figura 4.1, pag 105). Este plásmido se transformó en células competentes DH5 α de *E. coli* por choque térmico para sobre-producirlo y posteriormente purificarlo con el kit *Nucleospin Plasmid* siguiendo las indicaciones del fabricante. Todas las construcciones se verificaron por secuenciación.

Tabla 3.10. Condiciones de la reacción de digestión con *Bam*HI y *Not*I del plásmido pJRoC30 y el fragmento *avpl2*.

Tampón de digestión B 10X	2 μ L
Plásmido pJRoC30/producto de PCR <i>avpl2</i>	1 μ g /150 ng
<i>Bam</i> HI	10 U
<i>Not</i> I	10 U
Completar con agua milli-Q estéril hasta	20 μ L

La reacción se incubó durante 3 h a 37°C. Las enzimas fueron inactivadas a 80°C durante 20 min.

Tabla 3.11. Ligación de pJRoC30 y *avpl2*.

Plásmido linearizado pJRoC30 digerido con <i>Bam</i> HI y <i>Not</i> I	80 ng
<i>avpl2</i> digerido con <i>Bam</i> HI y <i>Not</i> I	240 ng
Tampón <i>T4 DNA ligase</i> (10X)	1 μ L
<i>T4 DNA ligase</i>	10 U
Completar con agua milli-Q estéril hasta	10 μ L

La reacción de ligación se incubó toda la noche a 16°C.

Debido a la estrategia de clonación utilizada, el extremo amino terminal de la proteína madura incluyó dos aminoácidos extras (Glu-Phe). Estos dos aminoácidos fueron consecuencia de la introducción de una diana de restricción para *Eco*RI necesaria para fusionar *vpl2* con el prepro-líder del factor α . Las mutaciones introducidas en la proteína madura durante el proceso evolutivo mantienen la numeración descrita para la VP madura de *P. eryngii*.

3.7.8 LINEARIZACIÓN DEL PLÁSMIDO pJR α vpl2 PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LAS GENOTECAS DE MUTANTES

El vector pJR α vpl2 fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I con el fin de sustituir el gen parental α vpl2 por los correspondientes genes mutados (procedentes de la mutagénesis aleatoria) (Tabla 3.12).

Tabla 3.12. Condiciones de la reacción de digestión del plásmido pJR α vpl2.

Tampón de digestión NE <i>Bam</i> HI 10X	2 μ L
Plásmido pJR α vpl2	2 μ g
BSA	20 μ g
<i>Bam</i> HI	7.5 U
<i>Xho</i> I	7.5 U
Completar con agua milli-Q estéril hasta	20 μ L

La reacción se incubó a 37°C durante 2 h y 36 min. Posteriormente, las enzimas fueron inactivadas mediante incubación a 80°C durante 20 min.

Una vez digerido, pJRoC30 fue purificado como se ha descrito en el **Apartado 3.7.4**.

3.8 PREPARACIÓN DE CÉLULAS ULTRACOMPETENTES DE DH5 α DE *E.coli*

Para la preparación del gen de fusión α vpl2 se emplearon células competentes de *E. coli* DH5 α . Estas células se obtuvieron por el método de Inoue (Inoue, H *et al.*, 1990) que se describe a continuación: se cultivó en medio LB líquido una colonia aislada a 37°C y 120 rpm durante 12-14 h. Se inocularon 3 matraces de 1 L con 250 mL de medio SOB utilizando un volumen de preinóculo distinto en cada matraz (10, 4 y 2 mL) y se incubaron a 18°C y 100 rpm durante varias horas hasta que alguno de los cultivos alcanzó una DO₆₀₀ de 0.55. Este cultivo se incubó en hielo 10 min y posteriormente se centrifugó a 2500 g (10 min a 4°C). Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 80 mL de tampón de transformación Inoue enfriado previamente a 4°C. Se centrifugó a 2500 g (10 min a 4°C). Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 20 mL de tampón de transformación Inoue (enfriado a 4°C). Se añadieron 1.5 mL de DMSO y se incubó 10 min en hielo. Posteriormente, se alicuotaron 50 μ L de mezcla celular por tubo y se congelaron en N₂ líquido almacenándose a -80°C.

3.9 TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS

3.9.1 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

Las células competentes DH5 α y XL2-*Blue* de *E.coli* fueron transformadas por choque térmico (Sambrook, J *et al.*, 1989) como se explica a continuación.

Las células competentes DH5 α (50 μ L) se descongelaron e incubaron en hielo con la solución de DNA (producto de ligación o plásmido circular, 10 μ L o 100 ng, respectivamente) durante 30 min. Posteriormente, la mezcla se sometió a un choque térmico (42°C durante 90 s). Inmediatamente después, se incubaron en hielo durante 2 min. Se añadieron 800 μ L de medio LB y se incubaron a 37°C durante 1 hora con agitación suave. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar LB/amp/zeocina.

Las células competentes XL2-*Blue* (10 μ L) se descongelaron e incubaron en hielo durante 10 min con β -mercaptoetanol a una concentración final de 25 mM para aumentar la eficiencia de la transformación. A continuación, se añadió la solución de DNA (producto de la Zymoprep) (5 μ L) y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, la mezcla se sometió a un choque térmico (42°C durante 30 s); e inmediatamente se incubó en hielo durante 2 min. Se añadieron 90 μ L de medio SOC precalentado a 42°C y se incubaron a 37°C durante 1 hora con agitación suave. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar LB/amp. Este protocolo se utilizó en el 2º re-*screening* realizado en los ciclos de evolución.

3.9.2 TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS

Las células competentes de *S. cerevisiae* se transformaron con el kit *Yeast Transformation* siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en el método de transformación con acetato de litio. La solución de DNA (entre 0.1 y 1 μ g) se incubó con 10 μ L de una solución de DNA de esperma de salmón 10 mg/mL durante 5 min. Se añadieron 100 μ L de células competentes de *S. cerevisiae* recién preparadas. Se agitaron y se mezclaron con 600 μ L del tampón de transformación del kit (*Plate Buffer*). A continuación las células se incubaron durante 30 min a 30°C con agitación suave. Para aumentar el rendimiento de transformación, inmediatamente antes del choque térmico (45°C durante 15 min) se añadió DMSO a la mezcla de transformación con una concentración final de 10 % (v/v). Tras el choque térmico la mezcla se incubó 2 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó mediante un pulso de 3 s y se eliminó el sobrenadante. Las células precipitadas se resuspendieron en 500 μ L agua milli-Q estéril. Los transformantes se seleccionaron en placas SC.

3.10 EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN LEVADURAS

3.10.1 EXPRESIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PARENTAL *αvpl2* EN *S. cerevisiae*

3.10.1.1 Test de expresión

Inicialmente, se realizaron diferentes pruebas para comprobar y valorar el nivel de expresión del gen de fusión *αvpl2* en células de *S. cerevisiae* transformadas con pJR*αvpl2*.

3.10.1.1.1 Expresión en medio sólido

Como primera aproximación, para detectar actividad peroxidasa se prepararon placas de agar de medio de expresión. Se realizaron dos ensayos, el primero empleando medio de expresión suplementado con una fuente exógena de grupo hemo (hemina, 250 mg/L) para facilitar la expresión de VP y el segundo ensayo sin dicho suplemento con el fin de comprobar si la maquinaria biosintética de la levadura era capaz de sintetizar suficiente grupo hemo para permitir la producción de VP. Una colonia de levadura transformada con pJR*αvpl2* se extendió en placas de agar con medio de expresión que se incubaron a 30°C durante 7 días. Posteriormente, sobre la colonia crecida se añadió la disolución de actividad peroxidasa (DAP). La solución DAP contenía DMP 0.1 mM, MnSO₄ 2 mM, H₂O₂ 0.1 mM en tampón tartrato sódico 100 mM pH 5.0. La VP en presencia de H₂O₂ es capaz de oxidar el Mn²⁺ a Mn³⁺, que a su vez oxida el DMP presente en el medio dando lugar a la formación de cerulignona, de un color naranja oscuro. Paralelamente, se realizaron los mismos ensayos con células no transformadas de levadura que se emplearon como control negativo.

3.10.1.1.2 Expresión en medio líquido

Se realizaron pruebas de expresión en matraces de 100 mL con 10 mL de medio de expresión líquido. Al igual que en el ensayo descrito en el apartado anterior, se crecieron células de levadura transformadas con pJR*αvpl2* en medio de expresión con y sin aporte exógeno de hemo (hemina 500 mg/L). Se valoró la actividad peroxidasa en el sobrenadante de dichos cultivos mediante el ensayo de oxidación de DMP dependiente de manganeso (ver **Apartado 3.15.1.6**, pag 96). Como control negativo se realizaron los mismos ensayos con células no transformadas de levadura.

3.10.1.2 Optimización del medio de expresión de VP en microplaca

Las condiciones de fermentación de los clones de *S. cerevisiae* transformados con pJR*αvpl2* (albergando el gen de fusión parental) fueron optimizadas con el fin de aumentar los niveles iniciales de expresión de VP. Puesto que los experimentos de evolución molecular dirigida se desarrollaron en formato de placa de 96 pocillos, se optimizó el medio

de expresión en dicho formato para obtener niveles detectables y cuantificables en el sobrenadante celular. Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado y cada medio de cultivo evaluado acopló un control negativo constituido por células de *S. cerevisiae* sin transformar.

Para favorecer la producción de VP por la levadura se estudiaron varias fuentes exógenas de grupo hemo: hemina, hemoglobina bovina y un precursor de la ruta biosintética de porfirinas, el ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA). Se estudió el efecto de las diferentes concentraciones de hemo exógeno sobre la secreción de VP. Así mismo, se valoró la adición de calcio y/o etanol en diferentes concentraciones y las distintas combinaciones entre ellos (Tablas 3.13, 3.14, 3.15 y 3.16). La presencia de VP en el sobrenadante se determinó valorando la actividad mediante la oxidación de ABTS 2 mM en tampón tartrato sódico 100 mM tras añadir H_2O_2 0.1 mM.

Se acotaron las concentraciones de hemina, hemoglobina y δ -ALA a ensayar, a través de la evaluación de fermentados de 10 mL de volumen final siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 3.10.2, pag 74.

Tabla 3.13. Concentraciones de hemina, hemoglobina y δ -ALA ensayadas para la optimización preliminar del medio de expresión de VP.

HEMINA (mg/L)	500	400	300	200	100	50
HEMOGLOBINA BOVINA (mg/L)	300	200	100	50	25	
δ -ALA (mM)	0.5	0.3	0.1			

Una vez delimitado el intervalo de concentraciones de la fuente exógena de hemo a estudiar, los experimentos de optimización se realizaron en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) en un volumen final de 210 μ L (según el protocolo descrito en el Apartado 3.13.2, pag 87) (Tablas 3.14, 3.15 y 3.16).

Tabla 3.14. Concentraciones de hemina ensayadas para la optimización en microplaca del medio de expresión de VP.

HEMINA (mg/L)	100	50	40	30	20	10	5
---------------	-----	----	----	----	----	----	---

Tabla 3.15. Concentraciones de hemoglobina bovina y suplementos añadidos para la optimización en microplaca del medio de expresión de VP.

HEMOGLOBINA BOVINA (mg/L)	100						50						25					
CaCl ₂ (mM)	-	5	2.5	1	1	-	-	5	2.5	1	1	-	-	5	2.5	1	1	-
Etanol (g/L)	-	-	-	-	25	25	-	-	-	-	25	25	-	-	-	-	25	25

Tabla 3.16. Concentraciones de δ -ALA y suplementos añadidos para la optimización en microplaca del medio de expresión de VP.

δ -ALA (mM)	1						0.5						0.1					
CaCl ₂ (mM)	-	5	2.5	1	1	-	-	5	2.5	1	1	-	-	5	2.5	1	1	-
Etanol (g/L)	-	-	-	-	25	25	-	-	-	-	25	25	-	-	-	-	25	25

3.10.1.3 Optimización de las condiciones de expresión de VP en matraz

Como paso previo a la producción de VP y posterior purificación fue necesaria la optimización de las condiciones de expresión de VP en matraz analizando dos parámetros: el medio de expresión y la temperatura de incubación. Salvo que se diga lo contrario, todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado y cada condición evaluada acopló un control negativo constituido por células de *S. cerevisiae* sin transformar.

3.10.1.3.1 Optimización del medio de expresión

Para optimizar la producción de VP en matraz, y a partir de los datos del **Apartado 3.10.1.2**, pag 71, se volvieron a valorar distintas concentraciones de hemoglobina y etanol como se muestra en las **Tabla 3.17** y **3.18**. Se inocularon colonias de *S. cerevisiae* transformadas con el gen de fusión parental *avpl2* y sus variantes evolucionadas en 5 mL de medio mínimo y se incubaron a 30°C durante 48 h a 220 rpm. Se tomó una alícuota de este precultivo y se siguió el protocolo descrito en el **Apartado 3.10.2**, pag 74. Este ensayo se realizó en matraces de 100 mL con 10 mL de medio de expresión. Se hizo un seguimiento de la fermentación tomando lecturas de actividad y DO₆₀₀ hasta alcanzar la fase estacionaria. La actividad peroxidasa se valoró mediante el ensayo de oxidación de ABTS 2 mM en tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.5 tras añadir H₂O₂ 0.1 mM.

Tabla 3.17. Concentraciones de hemoglobina bovina ensayadas para la optimización en matraz del medio de expresión de VP con CaCl₂ 1 mM y etanol 25 g/L.

HEMOGLOBINA BOVINA (mg/L)	1000	500	300	200	100
---------------------------	------	-----	-----	-----	-----

Tabla 3.18. Concentraciones de etanol ensayadas para la optimización en matraz del medio de expresión de VP con CaCl₂ 1 mM y hemoglobina 100 mg/L.

Etanol (g/L)	50	25	10
--------------	----	----	----

3.10.1.3.2 Optimización de la temperatura de fermentación en matraz

Se estudiaron dos temperaturas de fermentación: 20 y 30°C. Se inocularon colonias de *S. cerevisiae* que producían el parental VPL2 y las variantes VPL2DEL, R4, R4DEL, 2-1B y 2-1BDEL en 5 mL de medio mínimo y se incubaron a 30°C durante 48 h en agitación. Se tomó una alícuota de este precultivo y se siguió el protocolo descrito en el **Apartado 3.10. 2**. Este ensayo se realizó en matraces de 100 mL con 10 mL de medio de expresión conteniendo 100 mg/L de hemoglobina bovina, 25 g/L de etanol y 1 mM de CaCl₂. Se empleó el mismo preinóculo para ambos ensayos. Los matraces se incubaron a 20 y 30°C con 220 rpm tomando lecturas de actividad y DO₆₀₀ hasta alcanzar la fase estacionaria. La actividad peroxidasa se valoró mediante el ensayo de oxidación con ABTS 2 mM en tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.5 tras añadir H₂O₂ 0.1 mM.

3.10.2 EXPRESIÓN DE LA VP EN *S. cerevisiae*

De manera genérica, para producir VP en matraz el protocolo fue el siguiente:

1. Se crecieron clones aislados de *S. cerevisiae* que contenían el gen de la VP tanto del tipo nativo como de las variantes evolucionadas en matraces con medio mínimo durante 48 h a 30°C y 220 rpm (Minitron, Infors, Suiza).
2. Una alícuota de este cultivo se inoculó en medio mínimo para alcanzar una DO₆₀₀ de 0.25 en un matraz que fue incubado durante 4-6 h a 30°C y 220 rpm.
3. Tras completar dos ciclos de crecimiento (DO₆₀₀ = 1.0) se añadió el medio de expresión de manera que a un volumen de inóculo en medio mínimo se añadieron 9 volúmenes de medio de expresión. El fermentado se incubó a 220 rpm y 20°C (para la expresión de la VP nativa) o 30°C (para la expresión de las variantes evolucionadas).
4. El cultivo se retiró cuando el crecimiento celular y la actividad peroxidasa se estacionaron (3-5 días).

3.11 EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE PEROXIDASAS

En el proceso de evolución se emplearon diferentes técnicas de mutagénesis aleatoria y recombinación. En cada generación, los correspondientes productos de PCR fueron purificados en un gel semipreparativo de agarosa de bajo punto de fusión con el kit *Zymoclean gel DNA recovery*. Posteriormente, se transformaron las células de *S. cerevisiae* con los productos de PCR junto con el plásmido pJRoC30 linearizado empleando una relación plásmido:producto PCR 1:4.

3.11.1 HERRAMIENTAS DE GENERACIÓN DE DIVERSIDAD

3.11.1.1 PCR propensa a error

Las reacciones de mutagénesis aleatoria se llevaron a cabo en un termociclador de gradiente (Thermocycler Mycycler, BioRad) bajo los siguientes parámetros de reacción: 95°C durante 2 min (1 ciclo); 94°C durante 45 s, 53°C durante 4 s, 74°C durante 3 min (28 ciclos) y 74°C durante 10 min (1 ciclo) (**Figura 3.1**). En este trabajo se han utilizado dos polimerasas con diferente espectro mutacional: *Taq* polimerasa y *Mutazyme* (*Genemorph II Random Mutagenesis Kit*).

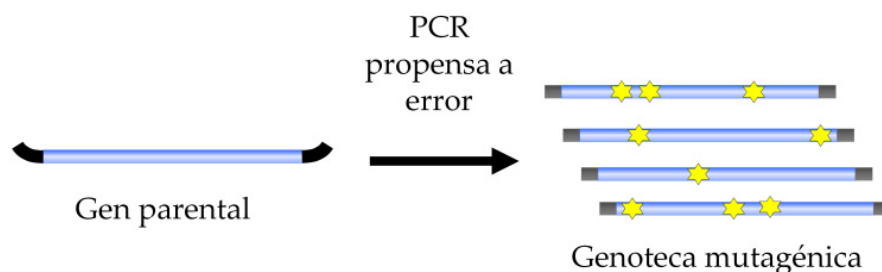


Figura 3.1. PCR propensa a error. Las estrellas representan mutaciones.

3.11.1.1.1 *Taq* polimerasa

En el caso de la PCR mutagénica con *Taq* polimerasa, la tasa de mutación se puso a punto haciendo uso de la concentración de DNA molde y la inclusión de $MnCl_2$. El índice de mutación se ajustó a 1-4 mutaciones por Kb. Las condiciones de la PCR se detallan en la **Tabla 3.19**.

Tabla 3.19. Condiciones de la reacción de PCR mutagénica con *Taq* polimerasa y $MnCl_2$.

Oligonucleótido RMLN-directo	90 nM
Oligonucleótido RMLC-reverso	90 nM
Plásmido parental	0.12 ng/ μ L
dNTPs	0.3 mM
$MgCl_2$	1.5 mg/mL
$MnCl_2$	0.01 mM
DMSO	3 % (v/v)
Tampón <i>Taq</i> polimerasa (10X)	5 μ L
<i>Taq</i> polimerasa	0.5 U/ μ L
Completar con agua milli-Q estéril hasta	50 μ L

3.11.1.1.2 *Mutazyme*

En el caso de la PCR con *Mutazyme*, la tasa de mutación se puso a punto en base a la concentración de DNA molde. El índice de mutación se ajustó a 4.5-9 mutaciones por Kb. Las condiciones de la PCR se detallan en la **Tabla 3.20**.

Tabla 3.20. Condiciones de la reacción de PCR mutagénica con *Mutazyme*.

Oligonucleótido RMLN-directo	125 ng
Oligonucleótido RMLC-reverso	125 ng
Plásmido parental	577 ng/ μ L
dNTPs	0.8 mM
Tampón <i>Mutazyme</i> (10X)	5 μ L
<i>Mutazyme</i>	0.05 U/ μ L
Completar con agua milli-Q estéril hasta	50 μ L

3.11.1.2 Técnicas de recombinación de DNA

Se pusieron a punto técnicas de recombinación *in vivo* (empleando la maquinaria celular de *S. cerevisiae*), *in vitro*, y combinando ambas alternativas en un único paso de evolución (ej. *StEP* + *in vivo* DNA shuffling).

3.11.1.2.1 *In vivo* DNA shuffling

La recombinación *in vivo* de los diferentes genes mutados se llevó a cabo mediante el llamado barajado *in vivo* (*in vivo* DNA shuffling) que facilitó la acumulación de mutaciones beneficiosas y la eliminación de las neutras o perjudiciales. Además, permitió la ligación *in vivo* de los productos de PCR con el plásmido linearizado, evitando así tediosos

pasos intermedios de ligación *in vitro*. Para promover la ligación *in vivo*, los productos de PCR se diseñaron conteniendo extensiones solapantes de 40 y 66 pb con los extremos digeridos del vector linearizado (**Figura 3.2**).

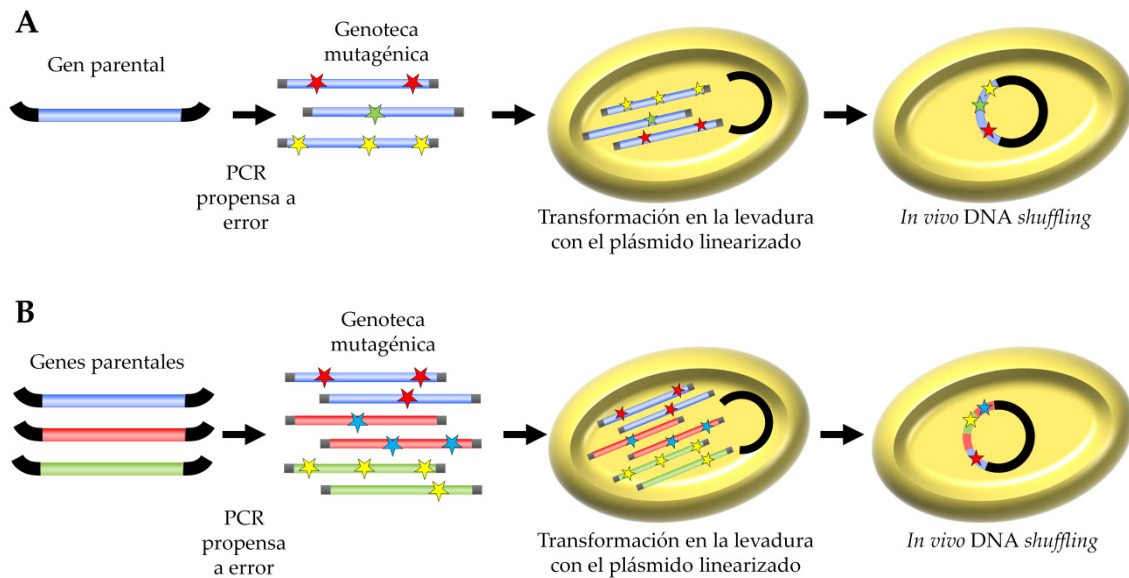


Figura 3.2. Esquema del *in vivo* DNA shuffling realizado en el 1^{er} ciclo (A) y en el 2^o, 3^o y 6^o ciclo (B) de evolución. Las estrellas indican nuevas mutaciones.

3.11.1.2.2 StEP (*Staggered Extension Process*)

El *StEP* es una técnica de recombinación *in vitro* habitualmente empleada en protocolos de evolución dirigida (Aguinaldo, AM *et al.*, 2003; Zhao, H *et al.*, 1998; Zhao, H *et al.*, 2006). Utilizando como molde varios genes parentales (con elevado grado de homología) y unos cebadores adecuados, se generan productos truncados de DNA obtenidos por ciclos breves de hibridación y extensión durante la reacción de amplificación. Tras la desnaturalización, los fragmentos cortos hibridan aleatoriamente con los genes molde vecinos continuando su extensión. Tras sucesivos ciclos de desnaturalización y extensión breve se consigue generar genes completos quimera, formados por fragmentos de los distintos parentales. Esta técnica suele hacer uso de polimerasas de alta fidelidad para evitar la introducción de mutaciones puntuales. Sin embargo, con el fin de promover mayor diversidad genética, en la presente Tesis Doctoral se emplearon polimerasas deficientes en actividad exonucleasa reparadora 3'-5' para favorecer la introducción de mutaciones aleatorias al tiempo que se recombinaban los diferentes fragmentos parentales (*StEP* mutagénico) (**Figura 3.3**). El *StEP* mutagénico se llevó a cabo en un termociclador de gradiente bajo los siguientes parámetros de reacción: 95°C durante 5 min (1 ciclo); 94°C

durante 30 s, 55°C durante 20 s (90 ciclos). Las condiciones de la PCR se detallan en la **Tabla 3.21**. Finalmente, los productos quimera del *StEP* mutagénico fueron recombinados adicionalmente mediante *in vivo* DNA shuffling con la intención de promover un mayor número de entrecruzamientos, tal y como se representa en la **Figura 3.3**.

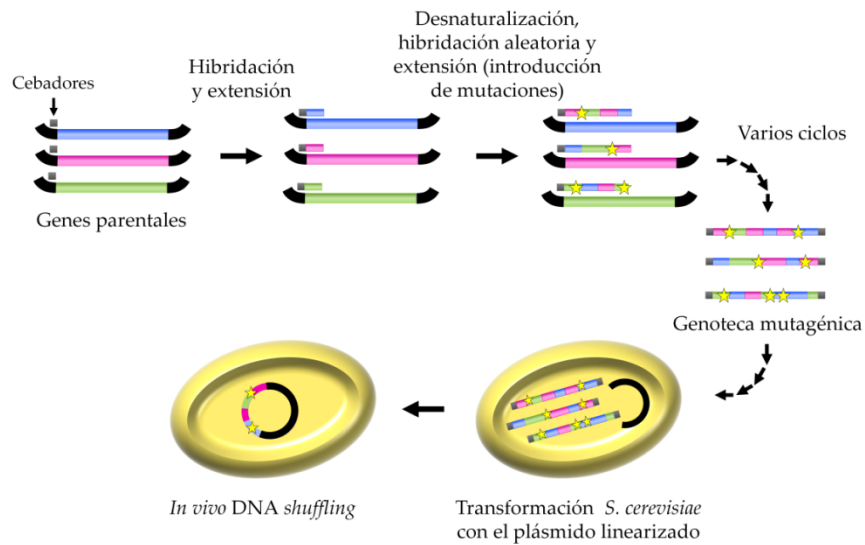


Figura 3.3. Esquema de la técnica del *StEP* mutagénico combinada con *in vivo* DNA shuffling empleada en la 4ª generación. Las estrellas representan nuevas mutaciones.

Tabla 3.21. Condiciones del *StEP* mutagénico de la 4ª generación de evolución.

Oligonucleótido RMLN-directo	90 nM
Oligonucleótido RMLC-reverso	90 nM
Mezcla de genes parentales*	0.12 ng/μL
dNTPs	0.3 mM
MgCl ₂	1.5 mg/mL
DMSO	3 % (v/v)
Tampón <i>Taq</i> polimerasa (10X)	5 μL
<i>Taq</i> polimerasa	0.5 U/μL
Completar con agua milli-Q estéril hasta	50 μL

*Los genes parentales se mezclaron en la misma proporción

3.11.1.2.3 IvAM (*In vivo Assembly of Mutant libraries*)

Esta técnica permite en un único paso la recombinación *in vivo* de genotecas mutagénicas con distinto espectro mutacional, enriqueciendo la diversidad de la librería sometida a exploración (Zumárraga, M *et al.*, 2008). Se diseñaron dos genotecas, una mediante PCR mutagénica con *Taq* polimerasa/ $MnCl_2$ y otra con *Mutazyme*, tal y como se ha descrito en el **Apartado 3.11.1.1**, pag 75. Ambas genotecas se mezclaron en la misma proporción y se transformaron junto con el plásmido linearizado en *S. cerevisiae* (relación plásmido:mezcla genotecas 1:4) favoreciendo su recombinación adicional mediante *in vivo* DNA *shuffling* (**Figura 3.4**).

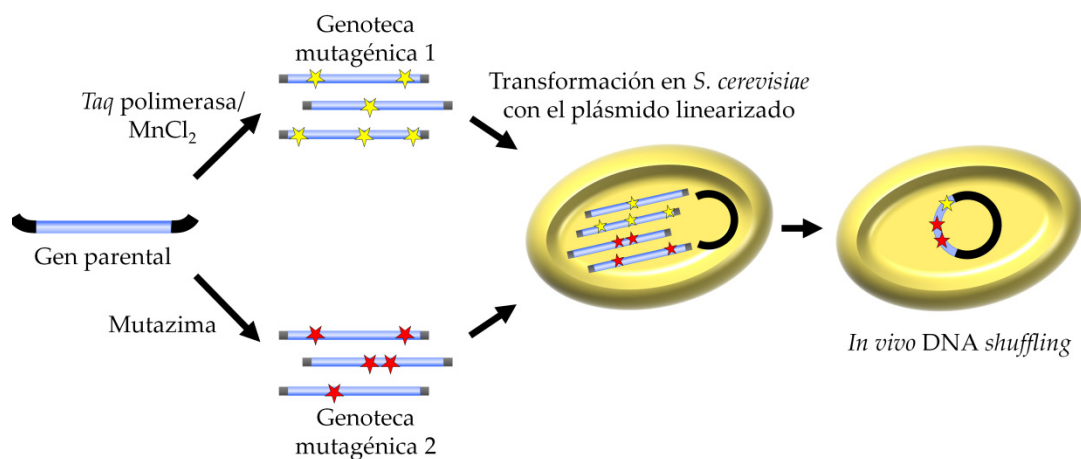


Figura 3.4. Esquema de la técnica de IvAM empleada en la 5ª generación. Las estrellas indican mutaciones.

3.11.2 PRIMERA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA CON *Taq* POLIMERASA/ $MnCl_2$

Se construyó una genoteca de 1408 clones, empleando como parental *avp12*. Éste fue amplificado mediante PCR propensa a error con *Taq* polimerasa/ $MnCl_2$ (**Tabla 3.19**). La mezcla de transformación en *S. cerevisiae* contenía 200 ng de plásmido linearizado y 800 ng de producto de PCR. Paralelamente, se transformó *S. cerevisiae* con *avp12* para emplearlo como referencia (estándar interno de cada placa). Cada placa incluyó un control negativo (pocillo H1) formado por células competentes de *S. cerevisiae* sin transformar. El *screening* de actividad se desarrolló como se describe en el **Apartado 3.13.2**, pag 87.

3.11.3 SEGUNDA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA CON *Taq* POLIMERASA/MnCl₂ E *in vivo* DNA SHUFFLING

Se construyó una genoteca de 1740 clones empleando como parentales las mejores variantes seleccionadas en la primera generación (mutantes 11H10, 15G9, 4B5 y 4B1). Cada parental fue amplificado mediante PCR mutagénica con *Taq* polimerasa/MnCl₂ siguiendo las condiciones de PCR detalladas en la **Tabla 3.19**. Los productos de cada PCR fueron mezclados en la misma proporción (200 ng de cada, 800 ng totales) junto con 200 ng de plásmido linearizado, transformándolos en *S. cerevisiae* para promover el clonaje y recombinación *in vivo*. Paralelamente, se transformó *S. cerevisiae* con el mejor mutante de la 1ª generación (11H10) para emplearlo como referencia (estándar interno de cada placa). Cada placa incluyó un control negativo (pocillo H1) formado por células competentes de *S. cerevisiae* sin transformar. El *screening* de actividad se desarrolló como se describe en el **Apartado 3.13.2**, pag 87.

3.11.4 TERCERA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA CON *Taq* POLIMERASA/MnCl₂ E *in vivo* DNA SHUFFLING

Se construyó una genoteca de 1131 clones empleando como parentales las mejores variantes seleccionadas en la segunda generación (mutantes 16E12, 19C2, 20D1 y 13G1). Se procedió como se describe para la segunda generación (**Apartado 3.11.3**) con la salvedad de que el estándar interno estuvo formado por el mutante 16E12.

3.11.5 CUARTA GENERACIÓN: *StEP* MUTAGÉNICO COMBINADO CON *in vivo* DNA SHUFFLING

Se construyó una genoteca de 2088 clones empleando como parentales las mejores variantes seleccionadas en la tercera generación (mutantes 10C3, 6B1, 13E4, 6E7 y 11F3). En esta generación se utilizó la técnica de *StEP* mutagénico combinada con *in vivo* DNA shuffling (**Figura 3.3**). Las condiciones del *StEP* mutagénico se detallan en la **Tabla 3.21**. Para verificar que el producto de *StEP* comprendía la secuencia completa entre RMLN y RMLC se realizó una PCR cuyas condiciones se detallan en la **Tabla 3.22** bajo los siguientes parámetros de reacción: 95°C durante 2 min (1 ciclo); 94°C durante 27 s, 55°C durante 27 s, 74°C durante 2 min (28 ciclos) y 74°C durante 10 min (1 ciclo).

Tabla 3.22. Condiciones de la PCR de confirmación de extremos del *StEP*.

Oligonucleótido RMLN-directo	0.25 μ M
Oligonucleótido RMLC-reverso	0.25 μ M
Producto del <i>StEP</i>	2 ng/ μ L
dNTPs	1 mM
DMSO	3 % (v/v)
Tampón <i>Pfu Ultra</i> (10X)	5 μ L
<i>Pfu Ultra</i> polimerasa	0.05 U/ μ L
Completar con agua milli-Q estéril hasta	50 μ L

Se transformaron células de *S.cerevisiae* con el producto del *StEP* (800 ng) junto con el plásmido linealizado (200 ng). Paralelamente, se transformó *S. cerevisiae* con el mejor mutante de la 3ª generación (10C3) para emplearlo como referencia (estándar interno de cada placa). Cada placa incluyó un control negativo (pocillo H1) formado por células competentes de *S. cerevisiae* sin transformar. El *screening* de actividad se desarrolló como se describe en el **Apartado 3.13.2.1**, pag 88. Para este ciclo y los sucesivos se incorporó un *screening* de termoestabilidad que se llevó a cabo como se describe en el **Apartado 3.13.2.2**, pag 89. La temperatura fijada para el *screening* fue 60°C, siendo aumentada a 70°C en el 1^{er} y 2^o re-*screening*. En esta generación se añadió un 3^{er} re-*screening* consistente en la determinación de la T₅₀ de las variantes seleccionadas del 2^o re-*screening*.

3.11.6 QUINTA GENERACIÓN: ENSAMBLAJE *in vivo* DE GENOTECAS MUTAGÉNICAS CON DISTINTO ESPECTRO MUTACIONAL (IvAM)

Se construyó una genoteca de 1392 clones empleando como parental la mejor variante seleccionada en el *screening* de termostabilidad de la cuarta generación (mutante 24E10). En esta generación se utilizó la técnica IvAM tal y como se explica en el **Apartado 3.11.1.2.3**, pag 79. Se mezclaron 400 ng de cada genoteca junto con 200 ng de plásmido linealizado y se transformó *S. cerevisiae*. El *screening* de termoestabilidad se desarrolló como se describe en el **Apartado 3.13.2.2**, pag 89, aumentando la presión selectiva (temperatura de incubación 80°C). Como estándar interno de cada placa se utilizó la mejor variante de termoestabilidad de la 4ª generación, el mutante 24E10. Se emplearon células competentes de *S. cerevisiae* sin transformar como control negativo (pocillo H1).

3.11.7 SEXTA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA CON *Taq* POLIMERASA/ MnCl₂ E *in vivo* DNA SHUFFLING

Se construyó una genoteca de 1305 clones empleando como parentales las mejores variantes seleccionadas de la quinta generación (mutantes 3H9 y 15B4). Se procedió como se describe para la segunda generación (**Apartado 3.11.3**, pag 80). El *screening* de termoestabilidad se desarrolló como se describe en el **Apartado 3.13.2.2**, pag 89, aumentando la presión selectiva a 90°C. Como estándar interno de cada placa se utilizó la mejor variante de termoestabilidad de la 5ª generación, el mutante 3H9. Se emplearon células competentes de *S. cerevisiae* sin transformar como control negativo (pocillo H1).

3.12 ELIMINACIÓN DE LA EXTENSION EXTRA DEL EXTREMO N-TERMINAL

El extremo N-terminal de la proteína expresada por *S. cerevisiae* presentó 6 aminoácidos adicionales (EAEAEF) respecto a la proteína nativa expresada por *P. eryngii* como se explicará más adelante (**Apartado 4.7.4**, pag 139). Para estudiar el efecto de esta extensión N-terminal sobre la expresión, actividad y estabilidad de los mutantes obtenidos por evolución se crearon variantes del tipo parental VPL2 y los mutantes R4 y 2-1B en las que se suprimió la secuencia de dicha extensión extra. La eliminación de la extensión N-terminal se planteó mediante el uso de dos métodos diferentes: SOE e IVOE. Las variantes obtenidas de SOE e IVOE, sin la extensión N-terminal, se denominaron VPL2DEL, R4DEL y 2-1BDEL.

Se construyeron genotecas (100-200 clones) para cada mutante de delección obtenido por SOE o IVOE. Los clones obtenidos se sometieron a procesos de *screening* (**Apartado 3.13.2**, pag 87). Sus plásmidos se aislaron y se secuenciaron para verificar las construcciones. Se llevó a cabo un estudio detallado de actividad y estabilidad frente a la temperatura. Finalmente se secuenciaron los extremos N-terminales de las proteínas secretadas para verificar el procesado de las variantes por *S. cerevisiae*.

3.12.1 SOE (SPLICING BY OVERLAP EXTENSION)

Esta técnica permite la recombinación *in vitro* de dos o más fragmentos de DNA sin la necesidad de sitios de restricción (Horton, R *et al.*, 1990; Horton, RM *et al.*, 1989). Para eliminar la extensión extra N-terminal se realizó SOE mediante dos reacciones de PCR en la que los oligonucleótidos utilizados comprendieron la secuencia N-terminal sin los 6 aminoácidos extra (EAEAEF).

Se diseñaron cebadores que hibridaron en la región de la secuencia a suprimir (ITDSTE13 reverso e ITDEcoRI directo, **Tabla 3.5**, pag 65) y que carecían de la secuencia extra que codificaba para EAEAEF. Se llevaron a cabo dos reacciones de amplificación: i) en la PCR 1 se emplearon los oligonucleótidos RMLN directo e ITDSTE13 reverso (**Tabla 3.5**) para amplificar la secuencia del prepro-líder del factor α del plásmido pJR α PM1 (ver **Figura 3.5**); ii) en la PCR 2 se emplearon los oligonucleótidos ITDEcoRI directo y RMLC reverso (**Tabla 3.5**) para amplificar la secuencia madura de *vpl2* y sus variantes evolucionadas (R4 y 2-1B) (**Figura 3.5**). Las condiciones de las PCR se detallan en la **Tabla 3.23**.

Tabla 3.23. Condiciones de las reacciones de PCR 1 y 2 del SOE y del IVOE.

Oligonucleótidos (RMLN - ITDSTE13) ¹ o (RMLN - IVDSTE13) ²	0.25 μ M
Oligonucleótidos (RMLC - ITDEcoRI) ³ o (RMLC - IVEcoRI) ⁴	0.25 μ M
cDNA de <i>avpl2</i> , R4 , 2-1B o prepro-líder del factor α	2 ng/ μ L
dNTPs	1 mM
DMSO	3 % (v/v)
Tampón <i>Pfu Ultra</i> (10X)	5 μ L
<i>Pfu Ultra</i> polimerasa	0.05 U/ μ L
Completar con agua milli-Q estéril hasta	50 μ L

¹ Oligonucleótidos utilizados para la PCR 1 del SOE. ² Oligonucleótidos utilizados para la PCR 1 del IVOE.

³ Oligonucleótidos utilizados para la PCR 2 del SOE. ⁴ Oligonucleótidos utilizados para la PCR 2 del IVOE.

Tabla 3.24. Condiciones de la reacción de PCR 3 del SOE.

Oligonucleótido RMLN-directo	0.25 μ M
Oligonucleótido RMLC-reverso	0.25 μ M
Producto PCR 1	2 ng/ μ L
Producto PCR 2	2 ng/ μ L
dNTPs	1 mM
DMSO	3 % (v/v)
Tampón <i>Pfu Ultra</i> (10X)	5 μ L
<i>Pfu Ultra</i> polimerasa	0.05 U/ μ L
Completar con agua milli-Q estéril hasta	50 μ L

Los productos de las PCR 1 y 2 presentaron secuencias complementarias en sus extremos 3' con una zona de anillamiento de 18 pb. Se llevó a cabo una tercera PCR (PCR 3) (**Tabla 3.24**) con dichos productos para generar una hibridación en la que los propios

productos de PCR actuaron como cebadores internos y, con la ayuda de los oligos externos RMLN y RMLC (Tabla 3.5), se completó la formación del gen de fusión suprimiendo la secuencia EAEAEF (Figura 3.6). Los parámetros de reacción de las PCR 1, 2 y 3 fueron las siguientes: 95°C durante 2 min (1 ciclo); 94°C durante 27 s, 55°C durante 27 s, 74°C durante 2 min (28 ciclos) y 74°C durante 10 min (1 ciclo). Finalmente, el producto de la PCR 3 (400 ng) se transformó junto con el plásmido linearizado (100 ng) en *S. cerevisiae*.

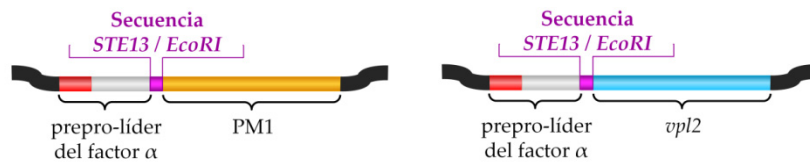


Figura 3.5. Esquema de los genes parentales utilizados para realizar el experimento de delección de la extensión N-terminal. Para amplificar el pre-líder del factor α sin la extensión EAEAEF se empleó el vector pJR α PM1 (Maté, D *et al.*, 2010). Dicha construcción contiene el gen de la lacasa PM1 fusionada al pre-líder del factor α y fue adecuada para evitar anillamientos de las secuencias solapantes homólogas a la secuencia de la VP madura.

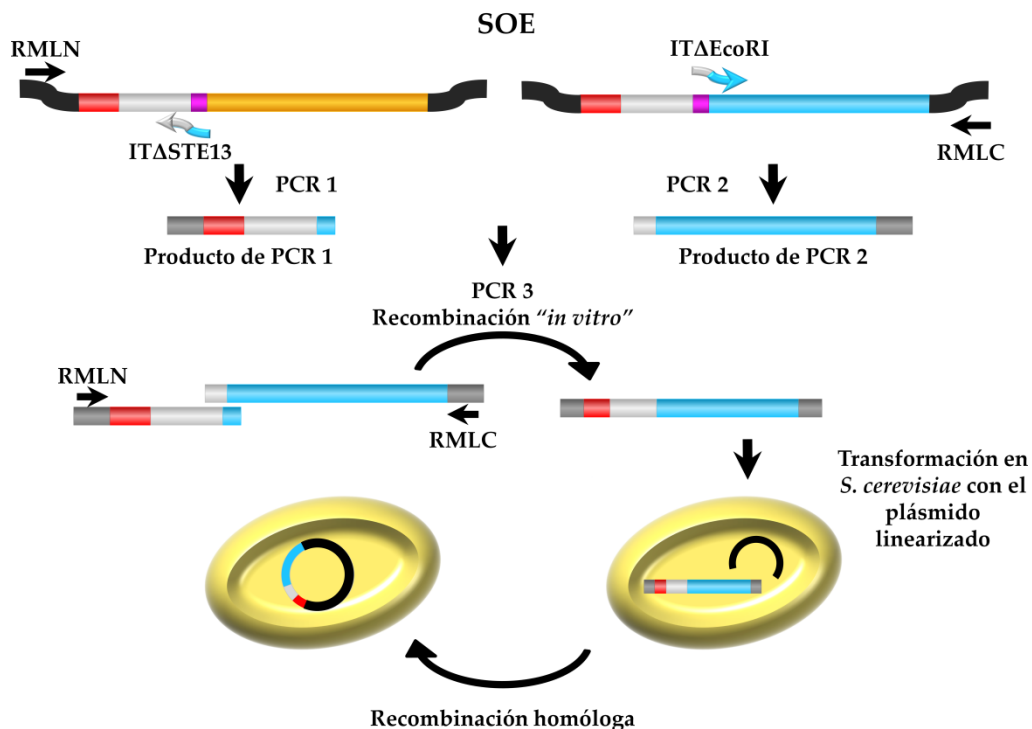


Figura 3.6. Esquema de la técnica de SOE empleada para la eliminación de la extensión N-terminal.

3.12.2 IVOE (*In Vivo* OVERLAP EXTENSION)

Esta técnica permite la recombinación *in vivo* de dos o más fragmentos de DNA haciendo uso de la maquinaria celular de *S. cerevisiae*. Para la eliminación de la extensión N-terminal se diseñaron oligonucleótidos que carecían de la secuencia EAEAEF y presentaban extremos solapantes de 38 pb para favorecer la recombinación homóloga en la levadura (cebadores IVDSTE13 reverso e IVDEcoRI directo, **Tabla 3.5**). Se realizaron dos reacciones de amplificación: i) en la PCR 1 se emplearon los oligonucleótidos RMLN directo e IVDSTE13 reverso (**Tabla 3.5**) para amplificar el prepro-líder del factor α (**Figura 3.5**); ii) en la PCR 2 se emplearon los oligonucleótidos IVDEcoRI directo y RMLC reverso (**Tabla 3.5**) para amplificar la secuencia madura *vpl2* y sus variantes evolucionadas (R4 y 2-1B). Las condiciones de las PCR se detallan en la **Tabla 3.23**. Los productos de las PCR 1 y 2 (200 ng de cada, 400 ng en total) se transformaron junto con el plásmido linearizado (100 ng) en *S. cerevisiae*. Como los productos contenían secuencias solapantes complementarias entre ellos y con el plásmido linearizado, la alta frecuencia de recombinación de *S. cerevisiae* permitió la reconstrucción de los plásmidos circulares con la secuencia de $\alpha vpl2$, R4 y 2-1B sin la extensión EAEAEF (**Figura 3.7**). Las variantes obtenidas de SOE e IVOE, sin la extensión N-terminal, se denominaron VPL2DEL, R4DEL y 2-1BDEL.

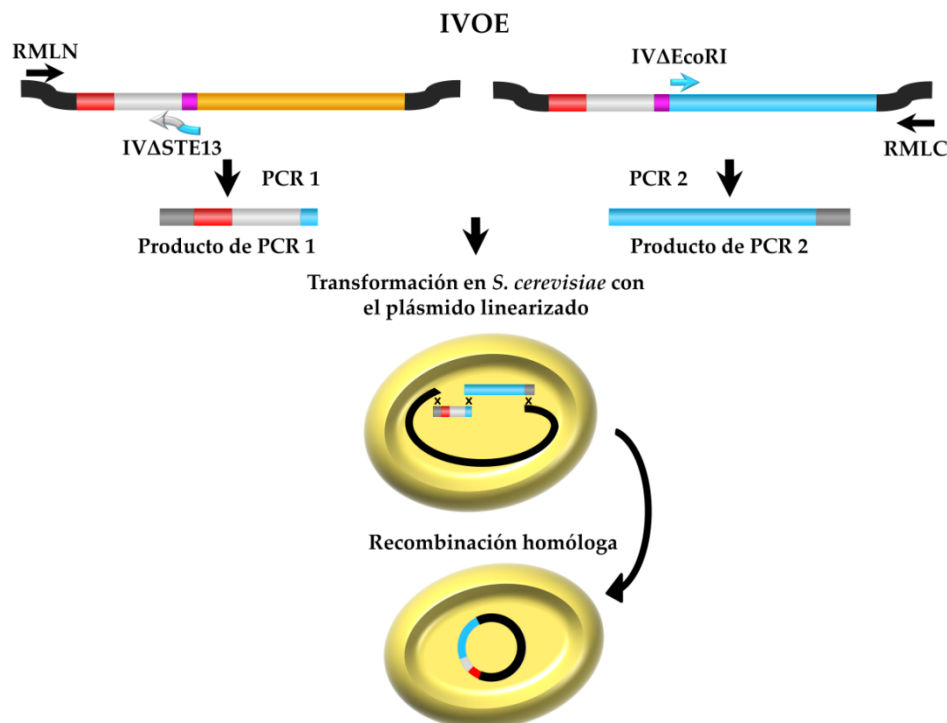


Figura 3.7. Esquema de la técnica de IVOE empleada para la eliminación de la extensión N-terminal. Las cruces indican zonas de recombinación.

3.13 PROTOCOLO DE *HIGH-THROUGHPUT* (HTP) SCREENING

3.13.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DEL HTP-SCREENING

Se diseñó un ensayo colorimétrico que fuera sensible y reproducible de manera que permitiera detectar actividad VP cuantificable durante el proceso de evolución dirigida. Para ello, se estudiaron diferentes sustratos y se evaluó la linealidad y fiabilidad en un protocolo de *HTP-screening*.

3.13.1.1 Selección del sustrato para el *screening* de actividad

La elevada promiscuidad catalítica de la VP permitió evaluar varios sustratos con diferentes características: ABTS (sustrato colorimétrico aromático no fenólico), DMP (sustrato colorimétrico aromático fenólico), Mn^{2+} (sustrato característico de la MnP), AV (sustrato aromático no fenólico de alto potencial redox característico de la LiP), RB5 (colorante tipo azo de alto potencial redox). Se realizó un análisis preliminar valorando de manera independiente la actividad enzimática hacia los cuatro sustratos en el sobrenadante de cultivos en matraz de *S. cerevisiae* transformados con el gen parental *αvpl2*. Las condiciones de reacción se describen en el **Apartado 3.15.1**, pag 93. Se escogieron los sustratos ABTS y DMP para analizar la actividad en sobrenadantes de cultivos de *S. cerevisiae* crecidos en formato microplaca. Se midió la actividad en un lector de placas *SPECTRAmax Plus 384* (Molecular Devices, EEUU) añadiendo 20 μ L de sobrenadante sobre 100 μ L de mezcla de reacción conteniendo las condiciones de reacción que se describen en el **Apartado 3.15.1** para cada sustrato.

3.13.1.2 Validación del método de *screening*

3.13.1.2.1 Linealidad del ensayo

Se evaluó la linealidad del ensayo colorimétrico (de oxidación de ABTS) en función de la cantidad de VP secretada. Para ello, en una placa de 96 pocillos se alicuotaron diferentes volúmenes de sobrenadante (procedente de microfermentaciones de *αvpl2*): 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 y 20 μ L. Se completó con sobrenadante (procedente de microfermentaciones de levadura sin transformar) hasta 20 μ L. Se añadieron 180 μ L de mezcla de reacción compuesta por tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.5, ABTS 2 mM y H_2O_2 0.1 mM y se midió actividad en modo cinético. Cada experimento se realizó por triplicado.

3.13.1.2.2 Coeficiente de varianza

Se evaluó el coeficiente de varianza (C.V., es el cociente, expresado en %, entre la desviación estándar y el valor medio de los puntos sometidos a estudio) para el ensayo de oxidación de ABTS. Para ello, se preparó una placa conteniendo en todos los pocillos cultivos sincronizados de células transformadas con *avpl2* (todos ellos a partir de transformantes nuevos sometidos a las mismas condiciones de crecimiento y expresión). Se evaluó la actividad de 20 μL de sobrenadante de cada clon en 180 μL de mezcla de reacción compuesta por tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.5, ABTS 2 mM y H_2O_2 0.1 mM.

3.13.2 ENSAYOS DE HTP-SCREENING PARA ACTIVIDAD Y TERMOESTABILIDAD

Las células de *S. cerevisiae* transformadas con la correspondiente genoteca y el vector pJRoC30 linearizado fueron sembradas en placas SC. Tras 3 días de incubación a 30°C se transfirieron colonias individuales a placas de 96 pocillos que contenían 50 μL de medio mínimo por pocillo. La columna número 6 de cada placa se inoculó con el tipo parental (columna de referencia) y el pocillo H1 se inoculó con células de *S. cerevisiae* sin transformar (control negativo) (Figura 3.8).

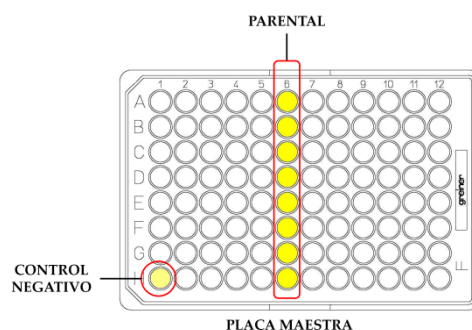


Figura 3.8. Organización de una placa maestra de un experimento de evolución. En la fila 6 se inoculan colonias del tipo parental empleado en el correspondiente ciclo evolutivo. En el pocillo H1 se inocula una colonia de *S. cerevisiae* sin transformar como control negativo.

Las placas se taparon, se sellaron con parafilm y se incubaron a 30°C, 210 rpm y 80 % de humedad relativa en un incubador con sistema de humidificación *Minitron* (Infors). Tras 48 h, se añadieron 160 μL de medio de expresión a cada pocillo y se volvieron a incubar a 30°C y 210 rpm con 80 % de humedad. Después de 72 h (en el primer ciclo evolutivo) o 24 h (del segundo ciclo de evolución en adelante), se centrifugaron las placas (placas maestras) (2200 g durante 10 min a 4°C) en una centrífuga *Eppendorf* 5810R (Alemania). Posteriormente, empleando un robot manipulador de líquidos *Quadra* 96-320

(Tomtec, EEUU) se transfirieron 20 μL de sobrenadante de cada pocillo de la placa maestra a una placa réplica (PR). En las 1^a, 2^a y 3^a generaciones las PR se emplearon para realizar el *screening* de actividad (**Figura 3.9**). En las generaciones 4^a, 5^a y 6^a las PR se emplearon para realizar el *screening* termoestabilidad (**Figura 3.10**).

3.13.2.1 Screening de actividad

Se añadieron a la correspondiente PR 100 μL de mezcla de reacción que contenía tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.5, ABTS 2 mM y H_2O_2 0.1 mM (concentraciones finales en pocillo). Las placas se agitaron brevemente y se midió la absorbancia a 418 nm en el lector de placas SPECTRAMax Plus 384. Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente. Cuando se desarrolló el color verde del radical catiónico $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ($\epsilon_{418} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se volvió a medir la absorbancia. Las actividades se calcularon a partir de la diferencia entre la absorbancia final y la inicial normalizada respecto a la actividad del tipo parental de la correspondiente placa (**Figura 3.9**).

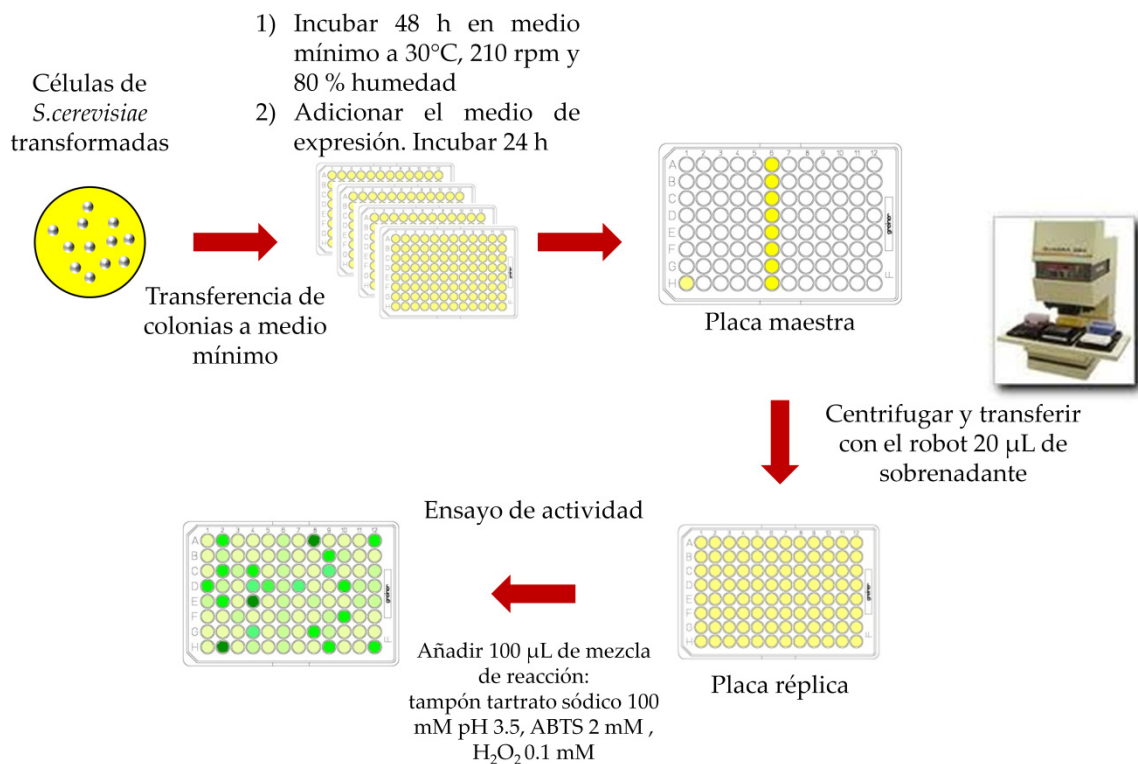


Figura 3.9. Esquema del protocolo de *screening* de actividad para los tres primeros ciclos de evolución dirigida.

3.13.2.2 Screening de termoestabilidad

En la 4ª y 5ª generación, se añadieron sobre la correspondiente PR 180 µL de tampón tartrato sódico 10 mM pH 5.0 (dilución final del sobrenadante 1/10, volumen final por pocillo 200 µL). La 6ª generación, se llevó a cabo de manera similar a los ciclos 4º y 5º, con la salvedad de que la dilución del sobrenadante fue 1/6 (volumen final por pocillo 120 µL), es decir, a cada PR se añadieron 100 µL de tampón tartrato sódico 10 mM pH 5.0. Las placas se agitaron y se transfirieron 50 µL a una placa de termociclador (*Multiply PCR plate*, Sarstedt, Alemania) y 20 µL a una nueva placa réplica (R1) (**Figura 3.10**).

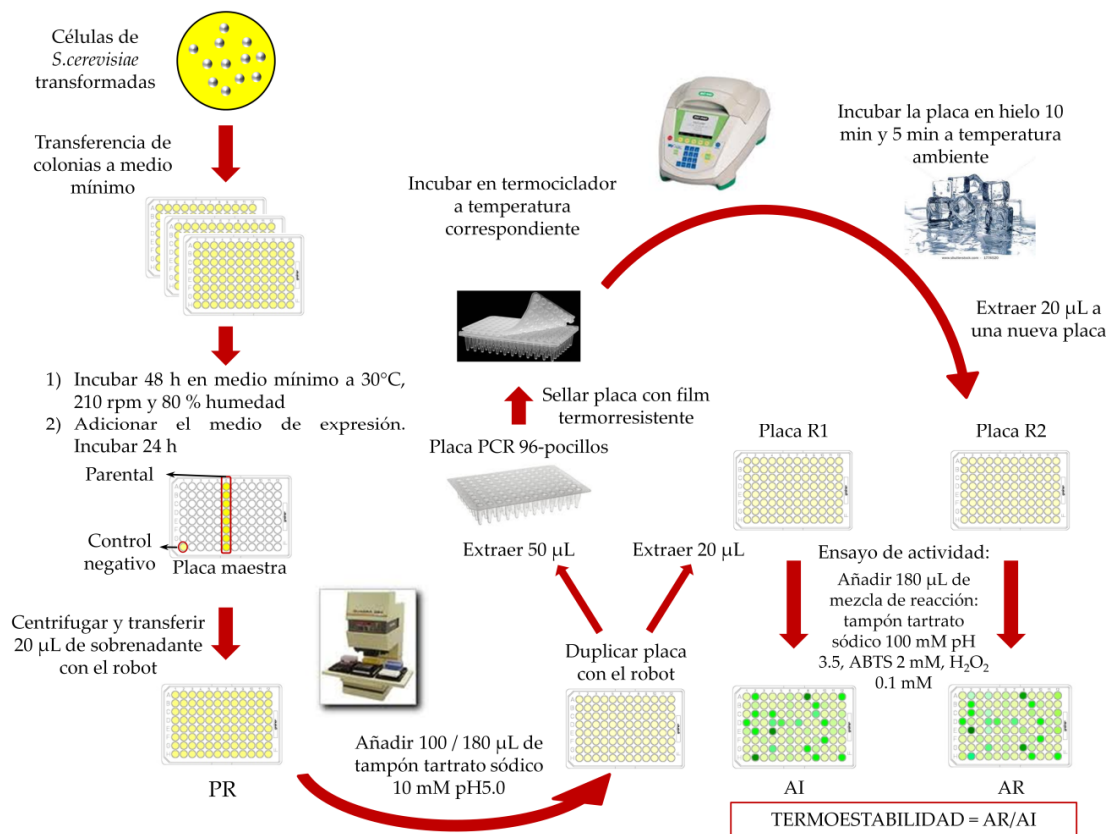


Figura 3.10. Esquema del protocolo de screening de estabilidad para los ciclos 4, 5 y 6 de evolución dirigida. PR, placa réplica; AI, valor de actividad relativa inicial; AR, valor de actividad relativa residual tras incubación a determinada temperatura.

Las placas para termociclador se sellaron con film termo resistente (Deltalab) y se incubaron a la temperatura correspondiente durante 10 min en un termociclador *MyCycler* (BioRad). Posteriormente, las placas se incubaron en hielo 10 min y se dejaron a temperatura ambiente 5 min más. Con ayuda del robot se transfirieron 20 µL a una placa

réplica nueva (R2). Las placas R1 y R2 se analizaron tras añadir 180 μL de mezcla de reacción que contenía tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.5, ABTS 2 mM y H_2O_2 0.1 mM (concentraciones finales en pocillo). Las placas R1 y R2 se agitaron brevemente y se midió la absorbancia a 418 nm en el lector de placas. Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente. Cuando se desarrolló el color verde se volvió a medir absorbancia. Las actividades se calcularon a partir de la diferencia entre la absorbancia final y la inicial y se normalizaron respecto a la actividad del tipo parental de la correspondiente placa. La termoestabilidad se calculó como el cociente entre la actividad residual (AR, actividad de la placa R2, tras el tratamiento térmico) y la actividad inicial (AI, actividad de la placa R1) (Figura 3.10).

3.13.3 RE-SCREENING

Con los mutantes seleccionados en el *screening* se realizaron tres re-*screening* consecutivos, para descartar falsos positivos.

3.13.3.1 1^{er} Re-screening

Se inocularon alícuotas de 5 μL de los clones seleccionados en placas multipocillo con 50 μL de medio mínimo. Las columnas y filas de los extremos de la placa (columnas 1 y 12, filas A y H) no se utilizaron. Tras 24 h de incubación a 30°C, 210 rpm y 80 % de humedad relativa, se transfirieron 5 μL a los pocillos adyacentes, tal y como se muestra en la Figura 3.11, incubándose durante 24 h más.

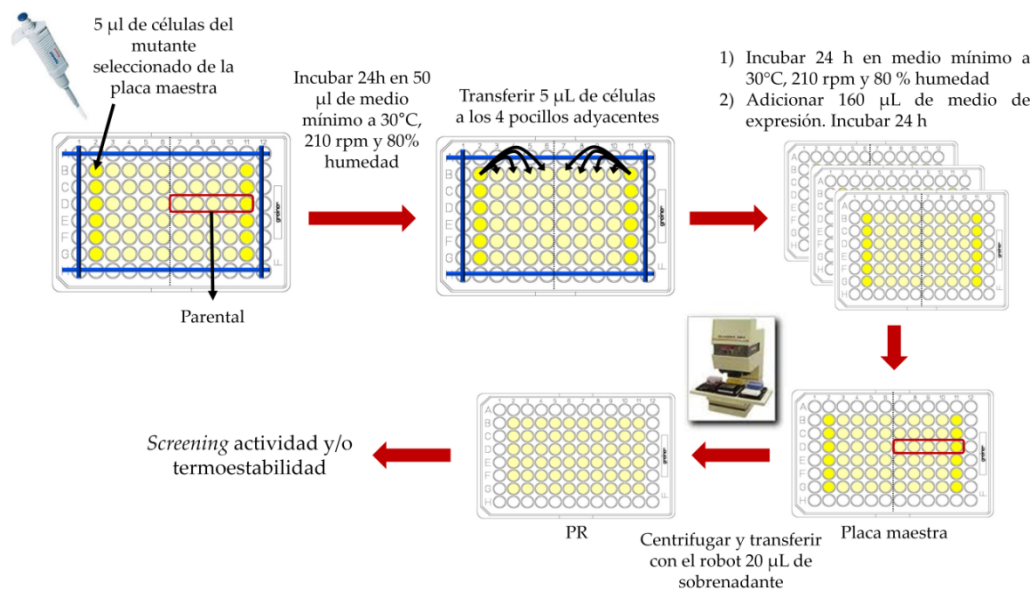


Figura 3.11. Esquema del protocolo del 1^{er} re-*screening*.

Finalmente, se adicionaron 160 μL de medio de expresión y se incubaron durante 24 h. De esta manera, cada clon tenía 4 réplicas y el parental (estándar interno) se trató del mismo modo (fila D, pocillos 7-11). Las placas se sometieron al mismo protocolo de *screening* de actividad y estabilidad, con la salvedad de que cada valor de actividad procedió de la media de 4 microcultivos por clon.

3.13.3.2 2º Re-screening

Se inocularon alícuotas de 100 μL de los clones más activos del primer re-*screening* en 3 mL de medio YPD a 30°C y 210 rpm durante 24 h. Se extrajeron los plásmidos de estos cultivos con el kit *Zymoprep yeast plasmid miniprep*. Como el producto de la *zymoprep* no era puro y la concentración del DNA extraído fue muy baja, se transformaron células de *E. coli* supercompetentes XL2-blue según el protocolo correspondiente (Stratagene™) con el fin de sobre-producir y purificar los plásmidos seleccionados. Se inocularon colonias aisladas en 10 mL de medio LB/amp y se crecieron durante toda la noche a 37°C. Se extrajeron los plásmidos (*NucleoSpin® Plasmid kit*). Las células competentes de *S. cerevisiae* (conservadas a -80°C) se transformaron con los plásmidos de los mejores mutantes así como con el correspondiente tipo parental. El re-*screening* de actividad y termoestabilidad se llevó a cabo de la misma manera que en el protocolo de *screening*, con la salvedad de que cada valor de actividad procedió de la media de 5 microcultivos por clon (**Figura 3.12**).

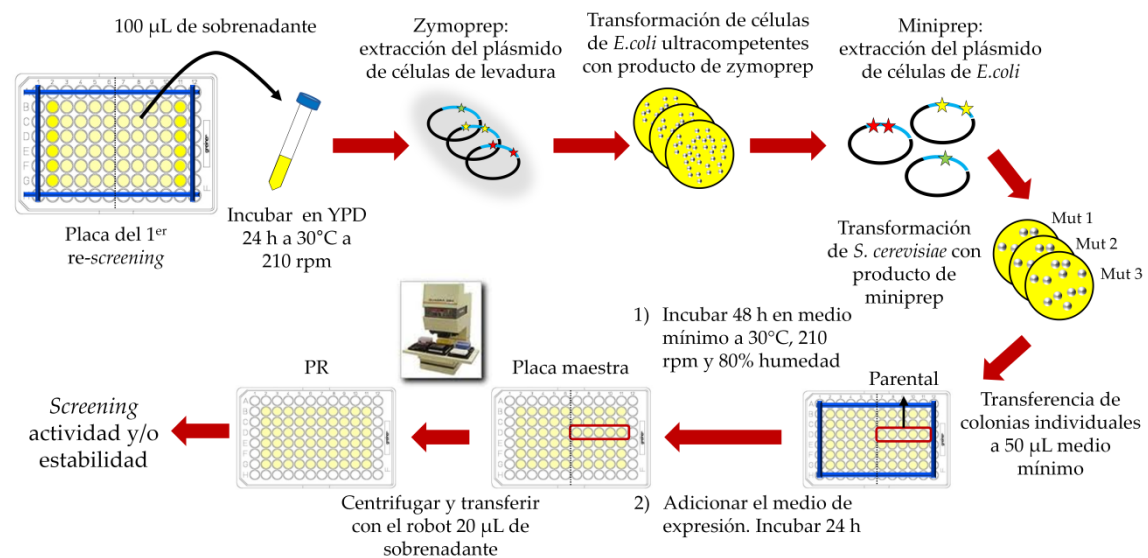


Figura 3.12. Esquema del protocolo del 2º re-*screening*.

3.13.3.3 3^{er} Re-screening

Este re-screening se incorporó en los ciclos hacia mejora de termoestabilidad (4^o, 5^o y 6^o). Consistió en la determinación de la T₅₀ de los mejores mutantes seleccionados tras el 2^o re-screening. Se inocularon colonias individuales de *S. cerevisiae* (albergando los genes de los mutantes seleccionados en el 2^o re-screening) en matraces de 100 mL y se procedió como se indica en el **Apartado 3.10.2**, pag 74. Los fermentados resultantes se centrifugaron (3000 g durante 15 min a 4°C). Los sobrenadantes se utilizaron para determinar la T₅₀ usando un termociclador con gradiente de temperatura como se explica en el **Apartado 3.16.10.1**, pag 101.

3.14 PURIFICACIÓN DE VP

Se crecieron clones de *S. cerevisiae* portadores del gen de fusión parental *αvpl2*, las variantes evolucionadas R4 y 2-1B así como las variantes de delección en matraces de 2 L con base de 20 cm siguiendo el protocolo descrito en el **Apartado 3.10.2**, pag 74. Una vez que la DO₆₀₀ y la actividad de los cultivos se estabilizaron (entraron en fase estacionaria) las células se separaron por centrifugación (6000 g a 4°C durante 15 min) en una centrífuga Beckman Coulter, Avanti J-E centrifuge (EEUU) y el sobrenadante con actividad peroxidasa se sometió a las siguientes etapas:

1. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de fibra de vidrio y posteriormente, a través de una de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0.45 μm. El filtrado se sometió a precipitación fraccionada (la VP se aisló entre el 50 y el 65 % (p/v) de (NH₄)₂SO₄). Para ello, en primer lugar el filtrado se trató con (NH₄)₂SO₄ al 50 % de saturación (p/v) a 0°C. Tras equilibrar la muestra durante 30 min se centrifugó (22000 g a 4°C durante 30 min). Se eliminó el precipitado y el sobrenadante se sometió a un segundo corte con (NH₄)₂SO₄ al 65 % (p/v). La muestra se equilibró durante 30 min y se centrifugó de nuevo. Se desechó el sobrenadante y el pellet, con actividad peroxidasa, se resuspendió y dializó en tampón piperazina 20 mM, pH 5.5 (tampón P). El dializado se concentró con la ayuda de una celda de ultrafiltración (Amicon, Merck Millipore, EEUU) con una membrana de corte molecular de 10000 Da.
2. La muestra concentrada se purificó en un equipo de cromatografía líquida de proteínas FPLC (LC-500 CI, Amersham Bioscience, EEUU) mediante una columna *Hi-Trap FFQ* (GeHealthcare) de intercambio aniónico fuerte de baja resolución equilibrada con tampón P. La elución de la proteína se llevó a cabo aplicando un gradiente lineal de 0-0.25 M de NaCl en 60 min a un flujo de 1 mL/min. En las fracciones se midió la absorbancia a 407 nm (máximo de absorción del grupo hemo) y a 280 nm (máximo de absorción de los aminoácidos de Trp y Tyr de las proteínas).

3. Las fracciones con actividad peroxidasa y alta absorbancia a 407 nm se concentraron y se dializaron en tampón P. La muestra resultante se inyectó en un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia HPLC (Waters 600E System con un detector de fotodiodo-PDA Varian, EEUU) con una columna *BioSuite Q* (Waters, EEUU) de intercambio aniónico fuerte de alta resolución equilibrada con tampón P. La elución de la VP se llevó a cabo aplicando un gradiente lineal de 0-0.06 M de NaCl en 65 min a un flujo de 1 mL/min. En el caso de la variante R4DEL, en este paso, la actividad peroxidasa se encontró en la fracción no retenida. Esta fracción fue dializada en tampón Bis-Tris 20 mM, pH 6.5 (tampón BT) y se inyectó nuevamente en el HPLC con una columna *BioSuite Q* equilibrada con tampón BT. La elución de R4DEL se llevó a cabo aplicando un gradiente lineal de 0.07-0.09 M de NaCl en 65 min a un flujo de 0.8 ml/min. Las fracciones con actividad peroxidasa se juntaron, dializaron con tampón BT y se purificaron en HPLC en las mismas condiciones antes descritas hasta conseguir un valor de Reinheitszahl, R_z (relación de absorbancia A_{407}/A_{280}) en torno a 4 (Martínez, MJ *et al.*, 1996).
4. Las fracciones con actividad peroxidasa y $R_z = 4$, se concentraron y dializaron en tampón tartrato sódico 10 mM pH 5.0 en concentradores Amicon Ultra (Merck Millipore, EEUU) con un corte molecular de 3000 Da. Las proteínas puras se almacenaron a -20°C .

3.15 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS VP PURIFICADAS

3.15.1 VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La valoración de la actividad peroxidasa sobre diferentes sustratos se llevó a cabo a temperatura ambiente en un espectrofotómetro *Shimadzu UV-1500* (Japón). Una Unidad (U) de actividad peroxidasa se definió como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones descritas. Las actividades se midieron como velocidades iniciales tomando incrementos lineales (descensos en el caso del RB5). Para cada sustrato, se ensayaron distintas diluciones enzimáticas con el fin de trabajar en el intervalo de linealidad del ensayo. Cada medida se realizó al menos por triplicado.

3.15.1.1 Oxidación de Mn^{2+}

La oxidación de Mn^{2+} (como sulfato de manganeso II) a Mn^{3+} se determinó en tampón tartrato sódico 100 mM pH 5.0, siguiendo la formación del complejo Mn^{3+} -tartrato a 238 nm ($\epsilon_{238} = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras la adición de H_2O_2 a una concentración final de 0.1 mM.

3.15.1.2 Oxidación de ABTS

La oxidación de ABTS se determinó en tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.5, siguiendo la formación del radical catiónico (ABTS^{•+}) a 418 nm ($\epsilon_{418} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras la adición de H₂O₂ a una concentración final de 0.1 mM.

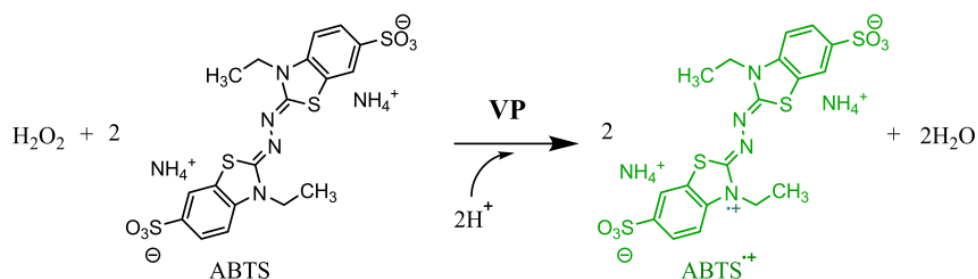


Figura 3.13. Oxidación de ABTS por la VP.

3.15.1.3 Oxidación de alcohol veratrílico (AV)

La oxidación de AV se determinó en tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.0, siguiendo la formación de veratraldehído a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras la adición de H₂O₂ a una concentración final de 0.1 mM.

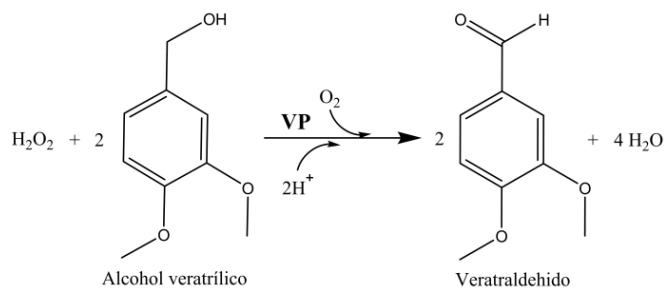


Figura 3.14. Oxidación de AV por la VP.

3.15.1.4 Oxidación de *Reactive Black 5* (RB5)

La oxidación de RB5 se determinó en tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.5, siguiendo el descenso de absorbancia a 598 nm, según se transforma en su radical catiónico ($\epsilon_{598} = 50000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras la adición de H_2O_2 a una concentración final de 0.1 mM.

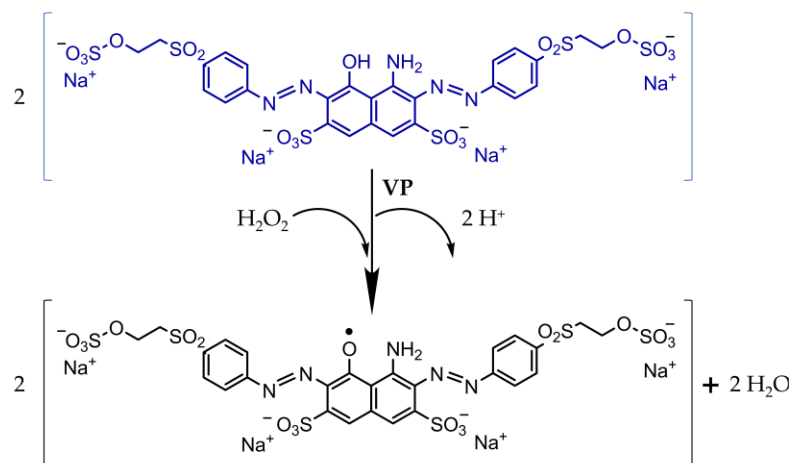


Figura 3.15. Oxidación de RB5 por la VP.

3.15.1.5 Oxidación de 2,6 dimetoxifenol (DMP)

La oxidación de DMP se determinó en tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.5, siguiendo la formación de 3,3',5,5' tetrametoxidifenoquinona (cerulignona) a 469 nm ($\epsilon_{469} = 27500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ referido a concentración de sustrato) tras la adición de H_2O_2 a una concentración final de 0.1 mM.

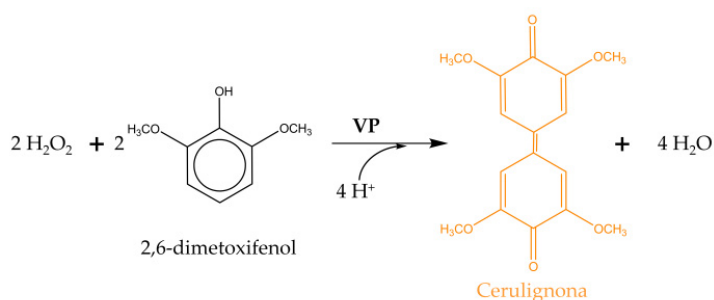


Figura 3.16. Oxidación de DMP por la VP. Dos moléculas de DMP oxidadas forman el dímero de cerulignona.

3.15.1.6 Oxidación de 2,6 dimetoxifenol dependiente de Mn^{2+}

Se midió la oxidación indirecta de DMP a cerulignona llevada a cabo por el Mn^{3+} , producto de la oxidación del Mn^{2+} por la VP. La VP oxida el Mn^{2+} a Mn^{3+} y este a su vez oxida el DMP. La reacción se llevó a cabo en tampón tartrato sódico 100 mM pH 5.0, con $MnSO_4$ 0.1 mM. Se siguió la formación de cerulignona a 469 nm ($\epsilon_{469} = 27500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras la adición de H_2O_2 a una concentración final de 0.1 mM.

3.15.2 CÁLCULO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE ESTADO ESTACIONARIO

Se calcularon las constantes cinéticas del estado estacionario tanto del parental VPL2 como de las variantes R4, R4DEL y 2-1B en un lector de placas SPECTRAMax Plus 384 para la oxidación de ABTS, DMP, manganeso y RB5.

En todos los casos, se emplearon concentraciones crecientes de sustrato, hasta saturación de la enzima, utilizando las condiciones descritas en el **Apartado 3.15.1** para cada sustrato y añadiendo H_2O_2 0.1 mM a la mezcla de reacción. El cálculo de las constantes de Michaelis-Menten (K_m), constantes catalíticas (k_{cat}) y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m), así como sus errores estándar se obtuvieron mediante un ajuste no lineal a ecuaciones hiperbólicas (1) y (2) (de Michaelis-Menten) utilizando el programa informático SigmaPlot versión 10.0:

$$(1) \quad v = \frac{k_{cat} S}{K_m + S}$$

$$(2) \quad v = \frac{(k_{cat}/K_m) S}{1 + (k_{cat}/K_m) S/K_m}$$

donde v es la velocidad inicial y S es la concentración de sustrato.

De manera paralela, se calcularon la K_m , y k_{cat}/K_m para el H_2O_2 durante la oxidación de ABTS. Dicho protocolo se aplicó para determinar los valores cinéticos frente a H_2O_2 del parental VPL2, los mutantes R4 y 2-1B, así como la VPL2 expresada en *E. coli* y replegada *in vitro* a partir de cuerpos de inclusión (amablemente cedida por de Dr. F. J. Ruiz-Dueñas, CIB). Se emplearon concentraciones crecientes de H_2O_2 hasta saturación de la enzima, en tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.5 añadiendo la correspondiente concentración de saturación de ABTS (5.5 mM para VPL2 y VPL2 expresada en *E. coli*, 0.6 mM para R4 y 0.5 mM para 2-1B). Se valoró la formación del radical catiónico del ABTS a 418 nm. Los datos obtenidos se ajustaron a las ecuaciones (1) y (2) para calcular las constantes cinéticas. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos en un volumen final de reacción de 0.2 mL con 0.01 mL de enzima pura.

La concentración final de enzima en el pocillo fue de 0.0015 μM para el ABTS, 0.01 μM para el RB5, 0.015 μM para el DMP, 0.02 μM para el Mn^{2+} y de 0.0005 μM para el H_2O_2 . En todos los casos, cada dato experimental se obtuvo a partir de la media de tres experimentos independientes.

3.16 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS VP PURIFICADAS

3.16.1 ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Para estimar las masas moleculares y el grado de glicosilación, así como para monitorizar el proceso de purificación del parental VPL2 y las variantes evolucionadas R4, R4DEL y 2-1B se analizaron en geles de electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, UK, 1970). Los geles se prepararon al 4% (p/v) de acrilamida/bis (**Tabla 3.25**) en la parte superior (gel de concentración) y al 12 % (p/v) de acrilamida/bis (gel de separación, **Tabla 3.26**) en la parte inferior. Se aplicó un potencial de 50 V mientras las muestras atravesaron el gel de concentración y de 150 V durante el resto de la electroforesis. El tampón de carrera fue tris-glicina con SDS al 0.1 % (p/v). Las muestras se desnaturizaron hirviéndolas durante 5 min en tampón de carga (**Tabla 3.27**) en una relación 4:1 (muestra: tampón de carga). Las electroforesis se realizaron en un equipo MiniProtean IV (BioRad).

Tabla 3.25. Condiciones del gel de concentración para SDS-PAGE

Acrilamida/bis 30:1	0.66 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.25 mL
SDS 10 % (p/v)	0.05 mL
Persulfato de amonio 10 %	0.025 mL
TEMED	0.01 mL
Agua milli-Q	2.9 mL

Tabla 3.26. Condiciones del gel de separación para SDS-PAGE

Acrilamida/bis 30:1	4 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 mL
SDS 10 % (p/v)	0.1 mL
Persulfato de amonio 10 %	0.05 mL
TEMED	0.01 mL
Agua milli-Q	3.3 mL

Tabla 3.27. Tampón de carga para las muestras de SDS-PAGE

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10 % (p/v)	1.6 mL
Azul de bromofenol 0.4 %	0.4 mL
β -mercaptoetanol	0.4 mL
Agua milli-Q	3.8 mL

Tras la electroforesis, los geles fueron teñidos con una solución de *Coomassie* coloidal (*ProtoBlue Safe*, National Diagnostics, con un límite de detección de 5 ng). Para ello, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con agua destilada. Posteriormente, los geles se sumergieron de 1 a 4 h en la solución de *Coomassie* coloidal con agitación suave. Finalmente, se lavó con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante no unido a las bandas de proteína. En la estimación de las masas moleculares se comparó la banda de proteína cargada con los marcadores de masa molecular correspondientes (*Perfect Protein Markers*, 15-150KDa).

3.16.2 DESGLICOSILACIÓN

Las VP purificadas se trataron con la enzima péptido-N-desglicosilasa-F (PNGasa F) para eliminar la glicosilación. Esta enzima hidroliza los oligosacáridos unidos al grupo amino de la cadena lateral de los residuos de asparagina. Se desnaturalizaron 16 μ g de VP pura en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.5 incubándola con agentes desnaturalizantes (SDS al 0.02 % (p/v) y β -mercaptoetanol 10 mM concentraciones finales) a 100°C durante 10 min. Posteriormente, se añadieron 2.5 U de PNGasa F a la mezcla y se incubó a 37°C durante 2 h. La reacción se detuvo tras incubación a 100°C durante 5 min.

La estimación aproximada del grado de glicosilación se llevó a cabo mediante SDS-PAGE comparando la movilidad electroforética de las enzimas desglicosiladas con las originales.

3.16.3 DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR POR MALDI-TOF

La estimación exacta de la masa molecular del parental VPL2 y las variantes evolucionadas R4, R4DEL y 2-1B se determinó mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo tras desorción e ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF) en el servicio de proteómica del CIB. Dichos valores de masa molecular se emplearon para calcular los grados de glicosilación y fueron utilizados en todos los cálculos cinéticos. Se usó como matriz 2,5-dihidroxiacetofenona (2,5-DHAP) disolviendo 7.6 mg (50 μ mol) en 375

μL de etanol y 125 μL de una solución acuosa citrato de diamonio hidrógeno 80 mM. La muestra se preparó mezclando 2.0 μL de proteína pura (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en H_2O) con 2.0 μL de ácido trifluoroacético al 2% en agua y 2.0 μL de matriz. 1 μL de esta mezcla se depositó en una placa *MALDI MTP 384 polished Steel (Bruker)* dejándola secar a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron en un equipo *Autoflex III MALDI-TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania)*, operado en el modo positivo y calibrado externamente con seroalbumina bovina (BSA) de *Bruker* cubriendo el rango de 30000 - 70000 Da. Los espectros se registraron en modo lineal, sumando 1000 acumulaciones para cada experimento.

3.16.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

De manera rutinaria y para estimar los factores y el rendimiento de las purificaciones, la concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (1976) utilizando el kit *protein assay dye reagent (BioRad)*. El ensayo se basa en el cambio del máximo de absorbancia de 465 a 595 nm de una solución ácida del colorante azul brillante Coomassie G-250 al unirse a proteínas. Se mezclaron 160 μL de muestra con 40 μL de reactivo Bradford en una placa de 96 pocillos, se agitó y tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente se valoró su absorbancia a 595 nm. El dato se interpoló en una curva de calibrado (lineal en el intervalo 1-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) realizada con BSA.

3.16.5 ANALISIS ESPECTROSCÓPICO. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Los espectros UV-vis del parental VPL2 y las variantes evolucionadas R4, R4DEL y 2-1B purificadas, así como de la VPL2 de *E. coli*, se registraron en un espectrofotómetro *Shimadzu UV-1500* en cubetas de cuarzo de 100 μL y 1 cm de paso óptico. Los espectros se realizaron a temperatura ambiente entre 250 y 800 nm en tampón tartrato sódico 10 mM pH 5.0 (que se empleó también en la celda de referencia para ajustar la línea base). La concentración de enzima pura se determinó a partir del coeficiente de extinción molar calculado para la VP nativa producida por *P. eryngii* a 407 nm, máximo de absorbancia de la banda Soret ($\epsilon_{407} = 150000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Martínez, MJ *et al.*, 1996; Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 1999a).

3.16.6 DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO

El punto isoeléctrico del parental VPL2 y las variantes R4, R4DEL y 2-1B fue determinado por electroforesis bidimensional en el servicio de proteómica del CIB. Se analizaron 8 μg de proteína pura con un gradiente lineal de pH en el intervalo 3.0 a 10. Los geles fueron teñidos con una solución acuosa de azul *Coomassie*.

3.16.7 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANA (WESTERN-BLOT)

Para la determinación de la secuencia aminoacídica del extremo N-terminal de las distintas variantes secretadas por *S. cerevisiae*, fue necesario su transferencia a membrana mediante *Western-blot*. Las VP purificadas se cargaron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de polivinildenofluoruro (PVDF) de 0.2 μm (*Transfer pack* 170-4156, BioRad) con un equipo *Trans-BlotTurbo Transfer System* (BioRad). Una vez montado el sandwich con el gel en contacto con la membrana se aplicó un voltaje de 25 V con una intensidad 2.5 A durante 7 min. Las bandas de proteína fueron visualizadas tras incubar la membrana durante 15 min en una solución acuosa de azul brillante Coomassie R-250 que contenía metanol 40 % (v/v), ácido acético 10% (v/v) y 0.1 % de azul Coomassie R-250 (p/v). Se eliminó el colorante no fijado a las bandas de proteína con una solución acuosa que contenía 45 % de metanol (v/v) y 45 % de ácido acético (v/v).

Una vez visualizadas las bandas de la proteína de interés, se cortaron con una hoja de bisturí y sus extremos N-terminal fueron secuenciados en colaboración con el “Helmholtz Centre of Infection Research” (HZI: Braunschweig, Alemania).

3.16.8 DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO DE ACTIVIDAD

Los perfiles de pH de actividad en las diferentes variantes se evaluaron en tampón B&R 100 mM a distintos valores de pH (de 2.0-9.0 ajustados con ácido acético o NaOH). Se obtuvieron los perfiles para el parental VPL2 y las variantes evolucionadas R4, R4DEL, 2-1B, 2-1BDEL y VPL2DEL, en placas de 96 pocillos a partir del extracto crudo de fermentados en matraz. Se prepararon diluciones de las enzimas en tampón tartrato sódico 20 mM pH 5.0 para que alícuotas de 10 μL dieran una respuesta de actividad adecuada durante la medida en el lector de placas en modo cinético. La composición de la mezcla de ensayo fue: tampón B&R 100 mM (ajustado al pH en estudio) conteniendo ABTS 2 mM y H_2O_2 0.1 mM. Sobre pocillos con 190 μL de mezcla de ensayo se añadieron 10 μL de enzima. Las microplacas se agitaron brevemente y se midió la actividad peroxidasa. Cada condición de pH se realizó por triplicado. Las actividades fueron normalizadas con respecto al máximo de actividad mostrado en su caso por cada variante.

3.16.9 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD FRENTE AL pH

La estabilidad frente al pH para el parental VPL2 y las variantes evolucionadas R4, R4DEL, 2-1B, 2-1BDEL y VPL2DEL se determinó incubando la enzima en tampón B&R 190 mM en un intervalo de pH entre 2.0 y 9.0 y midiendo la actividad residual tras diferentes tiempos de incubación.

Los extractos crudos de los fermentados de las diferentes variantes se concentraron 10 veces en concentradores Amicon Ultra con un corte molecular de 10000 Da y se dializaron con tampón tartrato sódico 10 mM pH 5.0. Se preparó una dilución 1/20 de estas muestras en tampón B&R 190 mM (al pH adecuado). Se incubaron las muestras a 4°C (durante 1, 4, 25 y 120 h). Se extrajeron alícuotas inmediatamente después de diluir la enzima en cada pH y tras los períodos de incubación establecidos para valorar actividad inicial y residual. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.5 conteniendo ABTS 2 mM y H₂O₂ 0.1 mM. Cada experimento se realizó por triplicado.

3.16.10 ESTABILIDAD FRENTE A TEMPERATURA

El estudio de la estabilidad frente a temperatura del parental VPL2 y las variantes obtenidas durante el proceso de evolución se abordó mediante la determinación de tres parámetros: T₅₀, t_{1/2} y T_a. En todos los casos, se prepararon diluciones de las enzimas en tampón tartrato sódico 20 mM pH 5.0 para que alícuotas de 20 µL dieran una respuesta de actividad adecuada durante la medida en el lector de placas en modo cinético. La mezcla de ensayo estuvo formada por tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.5 conteniendo ABTS 2 mM y H₂O₂ 0.1 mM. Cada valor representado procedió de tres medidas independientes.

3.16.10.1 Determinación de la T₅₀

Se definió T₅₀ como la temperatura a la que la enzima retiene el 50 % de su actividad tras un período de incubación de 10 min. El cálculo de la T₅₀ se realizó con el termociclador de gradiente. El gradiente de temperatura estudiado comprendió el intervalo 30-80°C con temperaturas intermedias de 30.0, 31.7, 34.8, 39.3, 45.3, 49.9, 53, 55, 56.8, 59.9, 64.3, 70.3, 75.0, 78.1 y 80.0°C. Se incubaron 50 µL de enzima en placas de PCR de 96 pocillos por cada temperatura del gradiente. Las placas se sellaron con film termo resistente (Deltalab) y se incubaron a la temperatura correspondiente durante 10 min. Posteriormente, las placas se incubaron en hielo durante 10 min y se atemperaron a temperatura ambiente durante 5 min más. La actividad residual se midió mezclando 20 µL de cada pocillo con 180 µL de mezcla de ensayo. Las actividades residuales se refirieron a la actividad inicial de las muestras incubadas a temperatura ambiente.

3.16.10.2 Determinación de la vida media frente a la temperatura (t_{1/2})

La vida media, t_{1/2}, se definió como el tiempo transcurrido para que la enzima pierda el 50 % de su actividad a una temperatura dada. La temperatura a la que se determinó t_{1/2} fue de 70°C. En tiras de tubos de PCR (BioRad) se incubaron 50 µL de muestra a 70°C en un termociclador *Mycycler* (BioRad) y se extrajeron 3 tubos

independientes a distintos tiempos de incubación, se incubaron en hielo durante 10 min y se atemperaron a temperatura ambiente durante 5 min. Se midió la actividad residual mezclando 20 μL de cada tubo con 180 μL de mezcla de ensayo. Las actividades residuales se refirieron a la actividad inicial de las muestras a temperatura ambiente.

3.16.10.3 Determinación de la Termoactividad (T_a)

La termoactividad, T_a , se definió como la temperatura óptima en la que la enzima mostró su máxima actividad. El intervalo de temperaturas ensayado fue 30-80°C, con temperaturas intermedias de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80°C. Se midió la actividad durante 60 s mezclando 20 μL de enzima con 180 μL de mezcla de ensayo atemperada para cada temperatura en estudio.

3.17 MODELADO MOLECULAR

El estudio *in silico* de las mutaciones introducidas en las variantes R4 y 2-1B durante el proceso de evolución dirigida se realizó sobre la estructura cristalográfica de la VP aislada de *P. eryngii* (isoforma *vpl2*) PDB id: 3FJW con una resolución de 2.8 Å. Se utilizaron los programas *DeepView/Swiss-Pdb Viewer v 4.0.2.* y *Pymol Viewer v 1.3* (DeLano Scientific LLC) para generar los modelos.

4 RESULTADOS

4.1 CONSTRUCCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PARENTAL $\alpha vp12$

Con la finalidad de obtener unos niveles de expresión funcional adecuados para evolucionar la VP en *S. cerevisiae*, se construyó el gen de fusión $\alpha vp12$ formado por la secuencia prepro-líder del factor α de *S. cerevisiae* y la secuencia de la VP madura de *P. eryngii*.

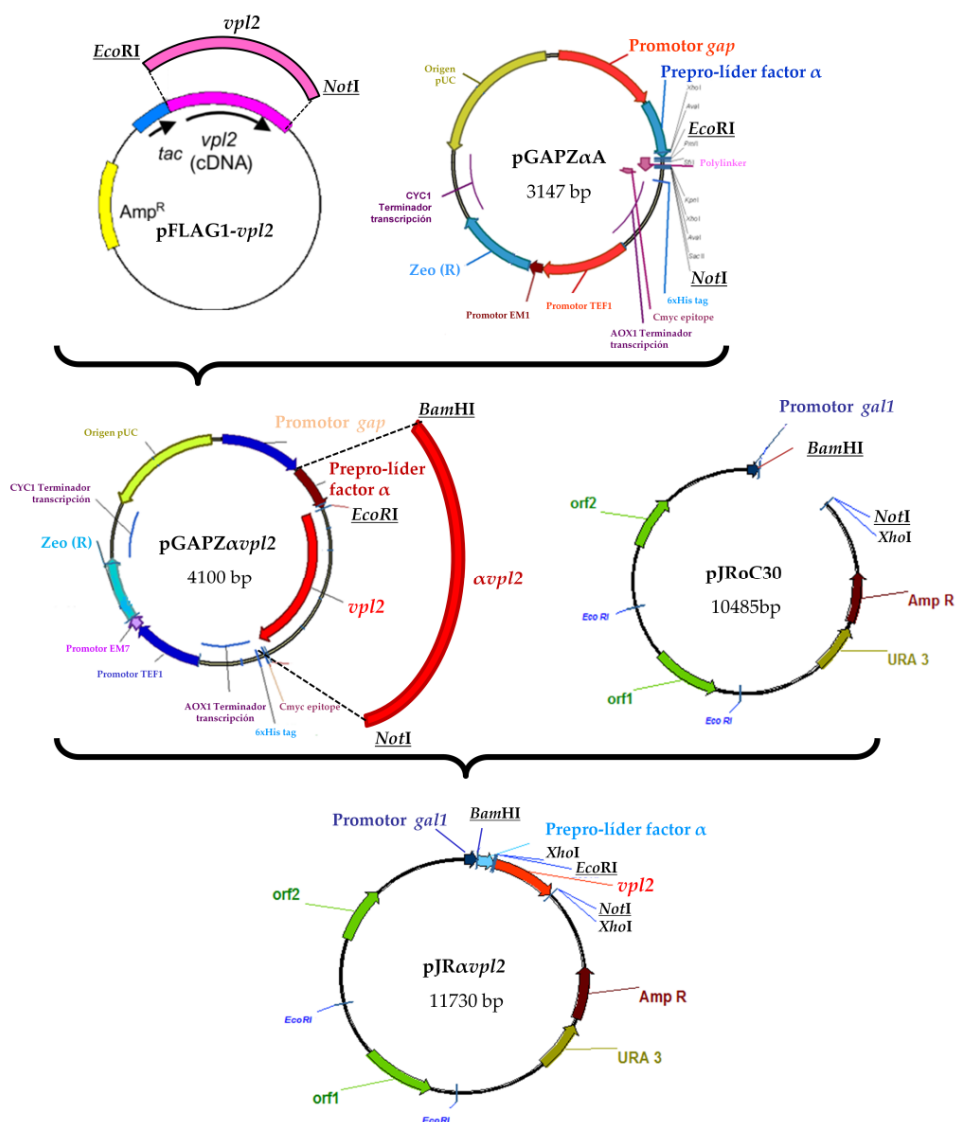


Figura 4.1. Protocolo seguido para la construcción de los plásmidos pGAPZ α vp12 y pJR α vp12. Para detalles adicionales ver Apartado 3.7.7, pag 66.

En el diseño de *avpl2* fue necesario: (1) fusionar el cDNA de *vpl2* de *P. eryngii* con la secuencia prepro-líder del factor α para obtener el plásmido pGAPZ*avpl2*; (2) clonar el gen de fusión parental *avpl2* en el vector episómico bifuncional pJRoC30 dando lugar a la construcción pJR*avpl2* (**Figura 4.1**).

4.2 EXPRESIÓN FUNCIONAL HETERÓLOGA DE LA VP EN *S. cerevisiae*

La expresión funcional heteróloga del gen parental *avpl2* se llevó a cabo en la cepa BJ5465 de *S. cerevisiae* deficiente en proteasas y especialmente indicada para la secreción de proteínas heterólogas. Inicialmente fue necesario determinar si la levadura transformada con pJR*avpl2* era capaz de secretar la VP y para ello se realizó un test de expresión funcional en base a la actividad VP. Una vez comprobada la capacidad de secreción de VP por la levadura, se optimizó la expresión en placa de 96 pocillos ya que era el formato en el que se iban a desarrollar los experimentos de evolución molecular dirigida. Finalmente, se pusieron a punto las condiciones de cultivo en matraz con el fin de producir suficiente enzima para su purificación y caracterización.

4.2.1 TEST DE EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA VP

Se realizó un test de secreción de la VP tanto en medio sólido como en medio líquido (en matraz) con y sin aporte exógeno de grupo hemo (hemina) con el fin de detectar actividad peroxidasa en cultivos de *S.cerevisiae* transformados con el plásmido pJR*avpl2* (**Apartado 3.10.1.1**, pag 71).

No se detectó actividad peroxidasa en los cultivos de levaduras crecidas en placas de medio de expresión sólido (con y sin hemina) tras una incubación a 30°C durante 7 días.

En medio líquido, se tomaron datos de DO₆₀₀ y actividad peroxidasa a lo largo de la fermentación. Se evaluó el efecto de la concentración de hemina utilizada sobre el crecimiento de la levadura. Se observó que los cultivos sin hemina mostraron valores mayores de DO₆₀₀, y por tanto mayor crecimiento, que los cultivos suplementados con hemina (**Figura 4.2A**). Por otro lado, los cultivos suplementados con hemina tuvieron valores de actividad peroxidasa de 1.2 U/L (**Figura 4.2B**) mientras que los cultivos sin hemina no presentaron actividad.

En estos ensayos se empleó como control negativo células de *S.cerevisiae* sin transformar con pJR*avpl2* para determinar posibles interferencias con el ensayo de actividad peroxidasa: (1) producidas por el propio crecimiento de la levadura en el medio de expresión y (2) generadas por la presencia de hemina en el medio de expresión. En

ningún caso, se detectó actividad peroxidasa en los sobrenadantes de los controles negativos (**Figura 4.2B**).

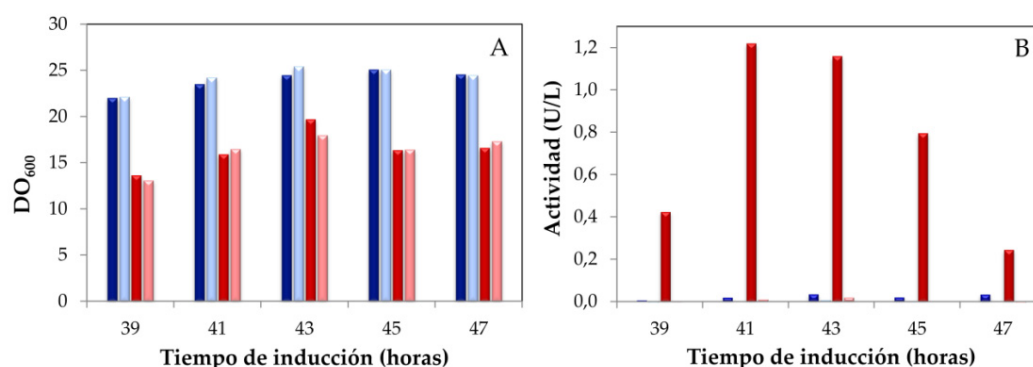


Figura 4.2. Resultado del test de expresión en medio líquido en matraz. A) Efecto de la hemina sobre el crecimiento (DO_{600}) de *S. cerevisiae*. B) Efecto de la hemina sobre la expresión de la VP por *S. cerevisiae*. Células transformadas con pJRavpl2 en medio de expresión sin hemina (■); control negativo en medio de expresión sin hemina (□); células transformadas con pJRavpl2 en medio de expresión con hemina (■); control negativo en medio de expresión con hemina (□). Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes. Como control negativo se emplearon células de *S. cerevisiae* sin transformar sometidas a las mismas condiciones que las células transformadas con pJRavpl2.

4.2.2 AJUSTE DE LAS CONDICIONES DE MICROFERMENTACIÓN EN FORMATO PLACA DE 96 POCILLOS

4.2.2.1 Optimización del medio de expresión

En el test de expresión se comprobó que la expresión de VP en *S. cerevisiae* es dependiente de la disponibilidad de una fuente exógena de grupo hemo. Por este motivo, se decidió evaluar diferentes fuentes de hemo: hemina, hemoglobina bovina y el ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA, precursor en la ruta de síntesis de porfirinas) (**Apartado 3.10.1.2**, pag 71).

Como se mostró en el apartado anterior, la hemina promovió la secreción de VP en niveles detectables, además no afectó al crecimiento de la levadura con concentraciones ≤ 50 mg/L. Sin embargo, finalmente se descartó como fuente exógena de hemo porque interfirió con el método de *screening* (**Apartado 4.3**) diseñado para los experimentos de evolución dirigida. Esto se debe a que la hemina precipita a valores de pH ácidos (en el ensayo de *screening*, la hemina remanente en el sobrenadante de las microfermentaciones en placa de 96 pocillos precipita en el tampón de actividad, pH 3.5).

El δ -ALA también fue descartado debido a que su inclusión supuso una ralentización en la secreción de la VP de más de 24 h en matraz, mientras que en microplaca no fue posible detectar secreción en los tiempos ensayados (24, 48, 72 y 96 h).

La hemoglobina bovina se seleccionó como fuente final de hemo ya que permitió la secreción de niveles detectables de VP en los tiempos de inducción ensayados (**Figura 4.3A**). Además, la concentración escogida (100 mg/L) no interfirió con el método de *screening*. Con concentraciones superiores a 100 mg/L, la hemoglobina remanente en el sobrenadante de las microfermentaciones en placa de 96 pocillos oxidó el ABTS del ensayo de *screening* generando un fondo que enmascaró los valores de actividad.

También se decidió estudiar el efecto de la adición al medio de expresión de CaCl_2 (la VP presenta dos Ca^{2+} estructurales) y etanol (para permeabilizar la membrana celular de la levadura y favorecer la secreción) y su combinación con distintas concentraciones de hemoglobina. La adición de etanol (25 g/L) al medio de expresión supuso un aumento de la secreción de VP de 1.2 veces (respecto del medio de expresión sin suplemento). El CaCl_2 suplementado a elevadas concentraciones reaccionó con el tampón fosfato potásico presente en el medio de expresión precipitando en fosfato cálcico. Sin embargo, no se apreció dicho efecto cuando la concentración de CaCl_2 fue 1 mM. La adición de CaCl_2 1 mM no incrementó la secreción de VP, pero su combinación con etanol 25 g/L supuso una mejora global de la expresión de VP de 1.4 veces (**Figura 4.3B**).

A pesar de esta mejora, finalmente se decidió utilizar como único aditivo exógeno al medio de expresión hemoglobina bovina 100 mg/L, ya que el crecimiento de la levadura se vio ralentizado por la presencia de etanol lo que podría conducir a problemas de estabilidad plasmídica tras la inducción.

4.2.2.2 Optimización del tiempo de incubación en microplaca

La producción de VP en placas de 96 pocillos requiere de un tiempo mínimo de incubación en medio de expresión para alcanzar unos niveles de actividad VP detectables. Se expresó la VP en placas de 96 pocillos y se midió la respuesta frente a ABTS de los sobrenadantes celulares tras diferentes tiempos de fermentación (24, 48, 72 y 96 h). Tras 72 h de incubación en medio de expresión con hemoglobina 100 mg/L se obtuvo una concentración de VP en el sobrenadante detectable y cuantificable (en torno a las 160 mU/L) con el método de *screening* diseñado (**Figura 4.3A**), siendo éste el tiempo seleccionado para la microfermentación previa al *screening*.

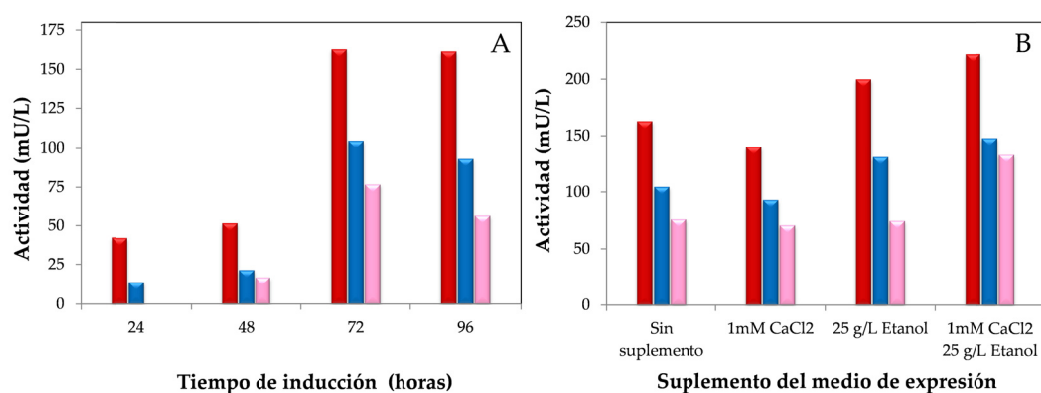


Figura 4.3. Optimización del medio de expresión en microplaca. Se muestra el efecto de tres concentraciones de hemoglobina bovina (100 mg/L (■), 50 mg/L (■), 25 mg/L (■)) sobre A) la expresión de VP por *S. cerevisiae* a distintos tiempos de inducción. B) Efecto de la adición de CaCl₂ y etanol sobre la expresión de VP a las 72 h de inducción. Los valores representados proceden de 3 experimentos independientes normalizados con los datos de los controles negativos. Como control negativo se emplearon células de *S. cerevisiae* sin transformar sometidas a las mismas condiciones que las células transformadas con pJR α vp12.

4.2.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPRESIÓN DE VP EN MATRAZ

El crecimiento de la levadura en microplacas se encuentra sumamente limitado por el área del pocillo y la disponibilidad de oxígeno. Fue necesario, por tanto, optimizar las condiciones de fermentación en matraz de los clones de *S. cerevisiae* portadores del gen parental α vp12 y de sus variantes evolucionadas (**Apartado 3.10.1.3**, pag 73) para facilitar su producción a mayor escala permitiendo su purificación y caracterización bioquímica.

4.2.3.1 Optimización del medio de expresión

En base a los resultados obtenidos para la optimización del medio en microplacas se analizaron medios de expresión suplementados con diferentes concentraciones de hemoglobina bovina. Se observó una relación directa entre el aumento de concentración de hemoglobina en el medio y la actividad peroxidasa (pasando de 6.5 U/mL con hemoglobina 100 mg/L a 10.2 U/mL con hemoglobina 1000 mg/L, tras 72 h de fermentación). En los controles negativos (células de levadura sin transformar con pJR α vp12) no se detectó actividad peroxidasa (**Figura 4.4A**).

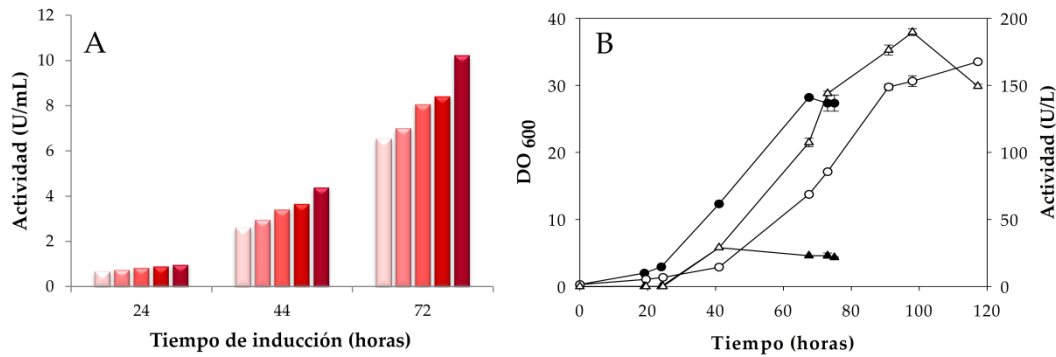


Figura 4.4. Efecto de la concentración de hemoglobina bovina y la temperatura de incubación en el crecimiento y expresión de VP en matraz. A) Análisis de distintas concentraciones de hemoglobina bovina en matraz (para el mutante R4). Las concentraciones analizadas fueron: 100 mg/L (■), 200 mg/L (■), 300 mg/L (■), 500 mg/L (■) y 1000 mg/L (■). B) Efecto de la temperatura de incubación en el crecimiento celular del tipo parental VPL2, a 20°C (○) y 30°C (●) y en la actividad peroxidasa, a 20°C (△) y 30°C (▲). Se muestran los valores medios y la desviación estándar.

También se valoraron distintas concentraciones de etanol. Con etanol 25 g/L se obtuvieron los mayores niveles de expresión sin comprometer la viabilidad del cultivo, ya que cuando la concentración fue de 50 g/L se observó que la DO₆₀₀ del cultivo no pasó de 0.5 tras 5 días de incubación.

4.2.3.2 Optimización de la temperatura de fermentación en matraz

Se estudió el efecto de la temperatura (20 y 30°C) sobre la secreción de VP en *S. cerevisiae* (Figura 4.4B).

Se observó que a 20°C la levadura tardó más tiempo en crecer que a 30°C produciéndose una ralentización de ~48 h. De manera genérica, la levadura alcanzó la fase estacionaria tras 120 h de incubación a 20°C en el medio de expresión mientras que a 30°C tardó entre 48 y 72 h. Es destacable el hecho de que los cultivos que expresaron la variante evolucionada R4 mostraron una ralentización en el crecimiento de unas 48 h adicionales respecto de lo descrito anteriormente tanto a 20 como a 30°C. Este efecto no se observó para los fermentados del parental VPL2 ni el mutante 2-1B.

Cuando se analizó la secreción de cada variante VP de manera individual, se apreció que una vez alcanzada la fase estacionaria la actividad peroxidasa detectada para el parental VPL2 fue mayor a 20°C que a 30°C. Los sobrenadantes de fermentados a 20°C mostraron una actividad de 270 ± 10 U/L frente a valores de actividad de 112 ± 2 U/L para los fermentados a 30°C.

Sin embargo, los fermentados de las variantes evolucionadas R4 y 2-1B se comportaron de manera distinta, mostrando actividades superiores a 30°C (15500 ± 200 U/L y 2200 ± 100 U/L, respectivamente) que a 20°C (1400 ± 50 U/L y 480 ± 20 U/L, respectivamente).

4.3 OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE *HTP-SCREENING*

La evolución molecular dirigida de enzimas requiere de un método de exploración o *screening* que sea sensible y reproducible. Se realizó un estudio preliminar de diferentes sustratos colorimétricos evaluando sus respuestas frente a fermentados de la VP en matraz, para posteriormente trasladarlo a formato *high-throughput* (HTP). Para ello, se empleó el gen de fusión parental *αvpl2* expresado en microcultivos de *S. cerevisiae*, optimizándose el ensayo de actividad peroxidasa a partir de los sobrenadantes celulares procedentes de micro-fermentaciones (**Apartado 3.13.1**, pag 86). Una vez ajustadas y validadas las condiciones óptimas del ensayo colorimétrico basado en la oxidación del sustrato ABTS, se diseñaron los diferentes protocolos de *screening* de actividad inicial y de termoestabilidad (**Apartado 3.13.2**, pag 87). Los mejores clones seleccionados en cada generación se sometieron posteriormente a tres re-*screenings* consecutivos para descartar la selección de falsos positivos.

4.3.1 SELECCIÓN DEL SUSTRATO PARA EL *SCREENING* DE ACTIVIDAD

De manera preliminar, se evaluó la actividad peroxidasa frente a 5 sustratos (RB5, AV, Mn²⁺, DMP y ABTS) en los sobrenadantes de fermentados de matraz de levadura transformada con el gen de fusión parental *αvpl2*. La finalidad de este experimento fue determinar el sustrato más adecuado para el ensayo de *HTP-screening* que se usaría durante el proceso de evolución dirigida.

En el caso de RB5 y AV, no se detectó actividad en el sobrenadante. Cuando se usó el Mn²⁺, la señal que se registró fue muy baja y poco reproducible. El DMP y el ABTS dieron niveles de actividad bajos pero cuantificables (1.2 U/L y 4.8 U/L, respectivamente), y por ello se escogieron para su optimización en microfermentaciones. La actividad frente a DMP detectada en los sobrenadantes a partir de cultivos en placas de 96 pocillos fue inferior a 70 mU/L. Con ABTS la respuesta fue 160 mU/L, con una señal lineal, estable y reproducible, por lo que fue el sustrato escogido para la validación del método de *screening* de los experimentos de evolución dirigida.

4.3.2 VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE *HTP-SCREENING*

Se validó el ensayo colorimétrico de *HTP-screening* basado en la oxidación de ABTS para la exploración de actividad en microplaca de genotecas obtenidas por evolución dirigida. Para ello, se analizó la linealidad y el coeficiente de varianza del ensayo a partir de sobrenadantes procedentes de microfermentaciones según se detalla en el **Apartado 3.13.1.2**, pag 86.

Se observó un incremento lineal de actividad proporcional al volumen de sobrenadante, determinándose la existencia de una relación lineal entre la cantidad de VP secretada y la respuesta del ensayo (**Figura 4.5A**).

La validación del ensayo concluyó mediante la evaluación del coeficiente de varianza para la oxidación del ABTS por la VP, que fue del 13 % (**Figura 4.5B**).

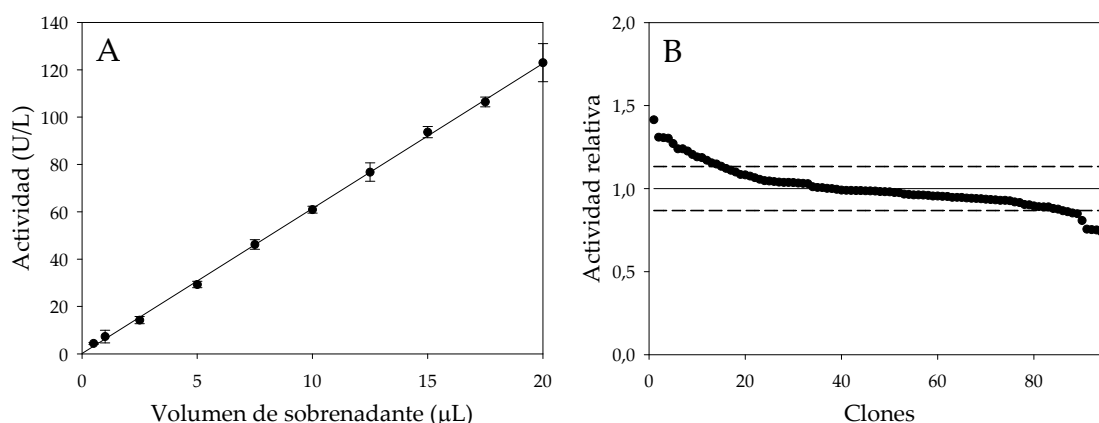


Figura 4.5. Validación del método colorimétrico de *screening*. A) Linealidad del ensayo con ABTS. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos (3 pocillos). Las barras de error indican el límite de confianza del 95 %. B) Determinación del CV para el ensayo de *screening* con ABTS. Las actividades están representadas en orden descendente.

4.4 EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE VP

Se llevaron a cabo 6 ciclos de evolución dirigida. Las generaciones 1^a, 2^a, 3^a y 4^a se dedicaron a la mejora de la actividad/secreción de la VP en *S. cerevisiae*. Las generaciones 4^a, 5^a y 6^a se emplearon para mejorar la estabilidad termal de la peroxidasa. La 4^a generación compartió la selección de mutantes con mejor actividad total y mejor termoestabilidad.

4.4.1 PRIMERA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA

Se construyó una genoteca sometiendo el gen de fusión parental *αvpl2* a PCR mutagénica, siguiendo el protocolo descrito en el **Apartado 3.11.2**, pag 79. Se exploró una librería de 1408 clones (**Figura 4.6**) con el ensayo de *HTP-screening* de actividad descrito en el **Apartado 3.13.2**, pag 87 y aplicando dos re-*screenings* consecutivos para descartar la presencia de falsos positivos. Como referencia (estándar interno de cada placa) se utilizó el tipo parental *αvpl2*.

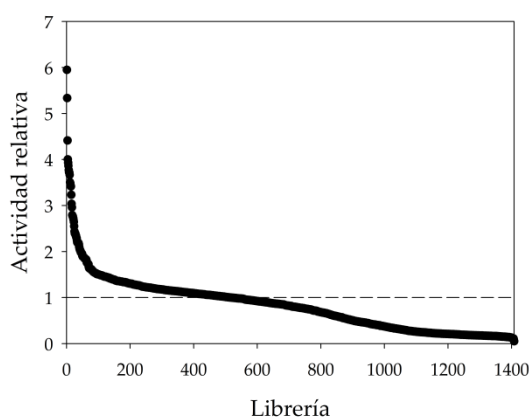


Figura 4.6. Paisaje del ensayo de *screening* de la primera generación. La actividad de los clones de la librería preparada por mutagénesis aleatoria está representada en orden descendente. Alrededor del 60 % de los clones mostraron una actividad total inferior a la del parental VPL2 y entorno al 15% de los clones se inactivaron por la mutagénesis. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental (= 1).

Desde este momento, se define MAT (mejora de actividad total) como el producto de la actividad específica (con ABTS) y la secreción frente al correspondiente parental empleado en el ciclo evolutivo. En este primer ciclo, se seleccionaron 4 mutantes que mostraron valores MAT entre 9 y 3.6 veces superiores al parental VPL2. El mejor mutante de esta generación fue 11H10. Esta variante presentó una única mutación en la secuencia de la proteína madura, T184M, responsable de un valor MAT de ~9 veces frente al parental VPL2. Adicionalmente, esta mejora supuso una reducción del tiempo de incubación en el medio de expresión de 72 a 24 h para poder detectar actividad VP, lo que permitió que en el siguiente ciclo de evolución pudiera realizarse el ensayo de *screening* tras 24 h de inducción. El mutante 15G9 mostró valores MAT de ~7 veces respecto al parental VPL2. Esta variante incorporó una única mutación en la secuencia de la proteína madura, E37K (**Tabla 4.1**). El mutante 4B5 presentó valores MAT de ~6 veces respecto al parental VPL2, conteniendo tres mutaciones: una en el pro-líder del factor α (V[α 50]A) y dos en la proteína madura, (H39R e I278I, mutación silenciosa). El último mutante seleccionado, 4B1, tuvo valores MAT de 3.5

veces respecto al parental VPL2 e incorporó tres mutaciones: una mutación silenciosa en el pre-líder del factor α (A[α 19]A) y dos en la proteína madura, V160A y S324T. La **Tabla 4.1** y la **Figura 4.7** resumen el primer ciclo de evolución dirigida.

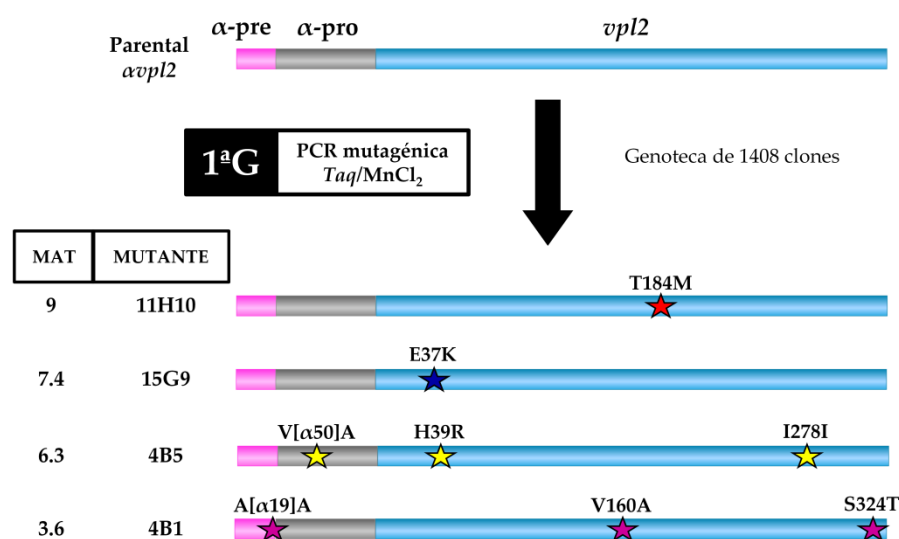


Figura 4.7. Representación esquemática del primer ciclo de evolución dirigida. Con estrellas se muestran las mutaciones introducidas en la secuencia del parental *avpl2* mediante PCR mutagénica. Se incluyen las mejoras de actividad total (valores MAT en veces) obtenidas en el segundo re-screening respecto VPL2. En azul se representa la secuencia de la proteína madura; en rosa y en gris se representan las secuencias del pre-líder y del pro-líder del factor α , respectivamente.

Tabla 4.1. Mutantes de la 1ª generación.

Mutante	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	MAT ¹
11H10	C551T (ACG/ATG)	T184M	9.07
15G9	G109A (GAG/AAG)	E37K	7.37
4B5	T[α 149]C (GTT/GCT) ²	V[α 50]A ³	6.29
	A116G (CAC/CGC)	H39R	
	T834C (ATT/ATC)	I278I ⁴	
4B1	T[α 57]C (GCT/GCC) ²	A[α 19]A ^{2,4}	3.56
	T479C (GTC/GCC)	V160A	
	T970A (TCC/ACC)	S324T	

¹ MAT: Mejora de actividad total (en veces) respecto al parental VPL2 en el 2º re-screening. ² Mutación en el pre-líder del factor α . ³ Mutación en el pro-líder del factor α . ⁴ Mutación silenciosa.

4.4.2 SEGUNDA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA COMBINADA CON *in vivo* DNA SHUFFLING

En la segunda generación se emplearon como parentales los mutantes 11H10, 15G9, 4B5 y 4B1. La genoteca se creó mediante PCR mutagénica y recombinación a través de *in vivo* DNA shuffling, tal y como se describe en el **Apartado 3.11.3**, pag 80. Se exploró una librería de 1740 clones (**Figura 4.8**) con el ensayo de *HTP-screening* de actividad empleado en la generación anterior, con la salvedad que las placas se sometieron al *screening* tras 24 h de incubación en medio de expresión. Como parental referencia (estándar interno de cada placa) se utilizó el mejor mutante de la generación anterior (11H10).

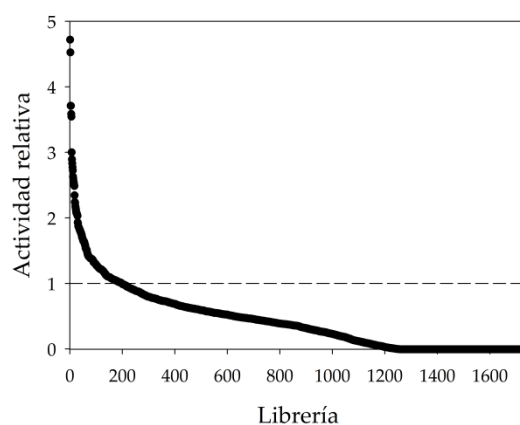


Figura 4.8. Perfil evolutivo de la segunda generación. La actividad de los clones de la librería preparada por mutagénesis aleatoria y recombinación *in vivo* está representada en orden descendente. Alrededor del 80 % de los clones mostraron una actividad total inferior a la del parental y entorno al 30% de los clones se inactivaron por mutagénesis/recombinación. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental, el mutante 11H10 de la 1ª generación (=1).

Se seleccionaron 7 mutantes que mostraron valores MAT entre 4.6 y 2.9 veces superiores al parental referencia 11H10. El mejor mutante de esta generación fue 16E12. Esta variante presentó dos mutaciones en la secuencia de la proteína madura, T184M (procedente del parental 11H10) y Q202L (nueva mutación introducida en este ciclo), además de una mutación nueva en el pro-líder del factor α , E[α 27]G (**Tabla 4.2**). Es significativo reseñar que todos los mutantes seleccionados incluyeron la mutación T184M del parental 11H10, consecuencia lógica de su importancia en la actividad total detectada.

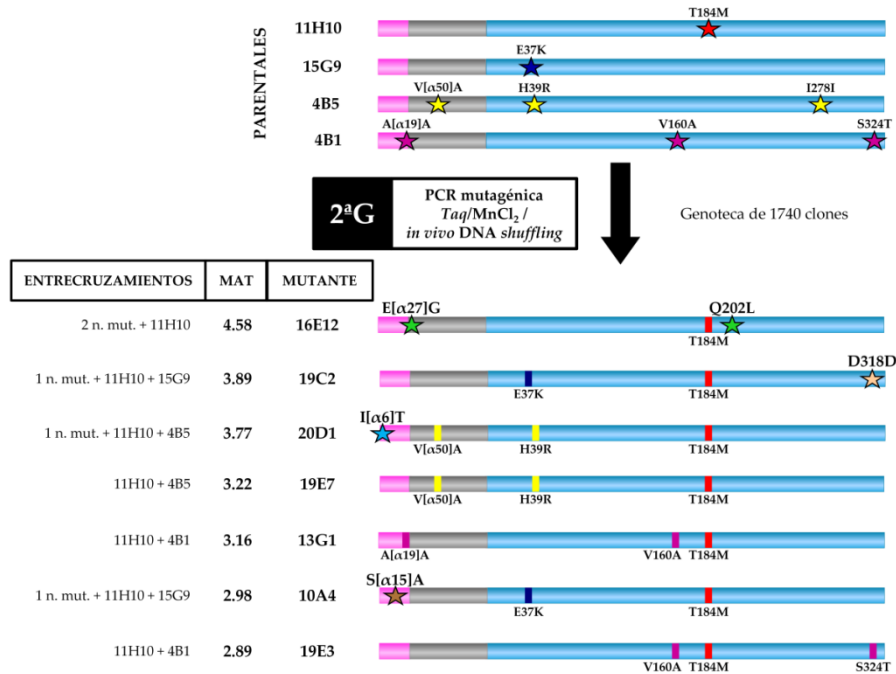


Figura 4.9. Representación esquemática del segundo ciclo de evolución dirigida. Con estrellas se muestran las mutaciones introducidas mediante PCR mutagénica y recombinación *in vivo* durante el 2º ciclo. Los rectángulos indican las mutaciones acumuladas procedentes de los parentales, siguiendo un código de colores en función del parental. Se sugieren los diferentes entrecruzamientos generados por el proceso de *in vivo* DNA shuffling. Se incluyen las mejoras de actividad total (valores MAT en veces) obtenidas en el segundo re-screening respecto del parental referencia 11H10. En azul se representa la secuencia de la proteína madura; en rosa y en gris se representan las secuencias del pre-líder y del pro-líder del factor α , respectivamente. N.mut indica nueva mutación introducida.

Se hizo un análisis detallado de los mutantes seleccionados para escoger los correspondientes parentales para el 3er ciclo de evolución. En particular, los mutantes 19E7, 10A4 y 19E3 fueron descartados como parentales por presentar menor actividad con secuencias equivalentes al resto de mutantes seleccionados (**Figura 4.9**):

- El mutante 19E7 mostró la misma secuencia que 20D1 pero con una mutación menos (I[α 6]T) y menor actividad que este último (valores MAT de 3.2 y 3.8 para 19E7 y 20D1, respectivamente), por lo que no se seleccionó como parental al contar ya con 20D1 para el siguiente ciclo.
- El mutante 10A4, con un valor MAT ~3, presentó las mutaciones E37K y T184M heredadas por recombinación de los parentales 15G9 y 11H10, e incorporó una mutación nueva en el pre-líder del factor α , (S[α 15]G). Las mismas mutaciones heredadas aparecieron en el mutante 19C2, con un valor MAT de ~4, incluyendo una mutación silenciosa en la proteína madura (D318D). Por lo tanto se dedujo que

la mutación en el pre-líder de 10A4 no era beneficiosa para la secreción, siendo descartado este mutante como parental para el siguiente ciclo.

- El mutante 19E3, con un valor MAT de 2.9, heredó las mutaciones V160A, T184M y S324T tras recombinación de los parentales 4B1 y 11H10. Las dos primeras mutaciones aparecieron en el mutante 13G1, con un valor MAT ~3.2, incluyendo una mutación silenciosa en el pre-líder del factor α (A[α 19]A). Por lo tanto, en este caso también se pudo deducir que la mutación S324T de 19E3 no era beneficiosa para la actividad total, y se procedió a descartar este mutante como parental para el tercer ciclo de evolución.

Tabla 4.2. Mutantes de la 2ª generación.

Mutante	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	MAT ¹
16E12	<u>A[α80]G (GAA/GGA)³</u>	<u>E[α27]G³</u>	4.58
	C551T (ACG/ATG)	T184M	
	<u>A605T (CAA/CTA)</u>	<u>Q202L</u>	
19C2	G109A (GAG/AAG)	E37K	3.98
	C551T (ACG/ATG)	T184M	
	<u>C954T (GAC/GAT)</u>	<u>D318D⁴</u>	
20D1	<u>T[α17]C (ATT/ACT)²</u>	<u>I[α6]T²</u>	3.77
	T[α 149]C (GTT/GCT) ³	V[α 50]A ³	
	A116G (CAC/CGC)	H39R	
	C551T (ACG/ATG)	T184M	
19E7	T[α 149]C (GTT/GCT) ³	V[α 50]A ³	3.22
	A116G (CAC/CGC)	H39R	
	C551T (ACG/ATG)	T184M	
13G1	T[α 57]C (GCT/GCC) ²	A[α 19]A ^{2,4}	3.16
	T479C (GTC/GCC)	V160A	
	C551T (ACG/ATG)	T184M	
10A4	<u>T[α43]G (TCC/GCC)²</u>	<u>S[α15]A²</u>	2.98
	G109A (GAG/AAG)	E37K	
	C551T (ACG/ATG)	T184M	
19E3	T479C (GTC/GCC)	V160A	2.89
	C551T (ACG/ATG)	T184M	
	T970A (TCC/ACC)	S324T	

¹ MAT: Mejora de actividad total (en veces) respecto al parental (11H10) en el 2º re-screening. ² Mutación en el pre-líder del factor α . ³ Mutación en el pro-líder del factor α . ⁴ Mutación silenciosa. Las nuevas mutaciones se muestran subrayadas. MAT: mejora de actividad total.

4.4.3 TERCERA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA COMBINADA CON *in vivo* DNA SHUFFLING

En la tercera generación se utilizaron como parentales los mutantes 16E12, 19C2, 20D1 y 13G1. La genoteca se diseñó mediante PCR mutagénica y recombinación a través de *in vivo* DNA shuffling siguiendo las condiciones descritas para el ciclo anterior. Se exploró una librería de 1131 clones (**Figura 4.10**) con el ensayo de HTP-screening de actividad empleado en la generación anterior. Como parental referencia (estándar interno de cada placa) se utilizó el mejor mutante de la generación anterior (16E12).

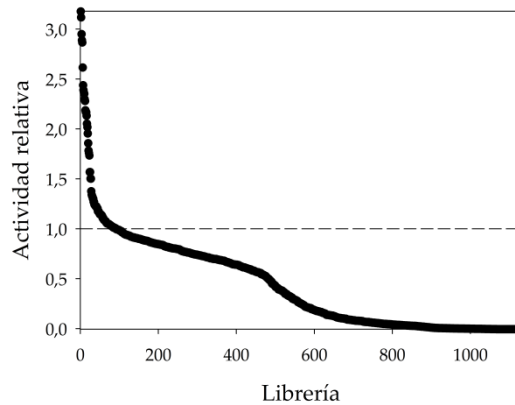


Figura 4.10. Perfil evolutivo de la tercera generación. La actividad de los clones de la librería preparada por mutagénesis aleatoria y recombinación *in vivo* está representada en orden descendente. Alrededor del 90 % de los clones mostraron una actividad total inferior a la del tipo parental y entorno al 13 % de los clones se inactivaron por mutagénesis/recombinación. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental, el mutante 16E12 de la 2ª generación (=1).

Se seleccionaron 8 mutantes que mostraron valores MAT entre 3.1 y 1.8 veces superiores al parental referencia 16E12. El mejor mutante de esta generación fue 10C3. Esta variante presentó tres mutaciones (E37K, T184M, Q202L) procedentes del proceso de *in vivo* DNA shuffling y una nueva mutación silenciosa, P185P (**Tabla 4.3**). Es notable destacar que de los 8 mutantes seleccionados, 6 incorporaron la mutación E37K y 5 la mutación Q202L, indicando su influencia sobre la mejora de actividad total.

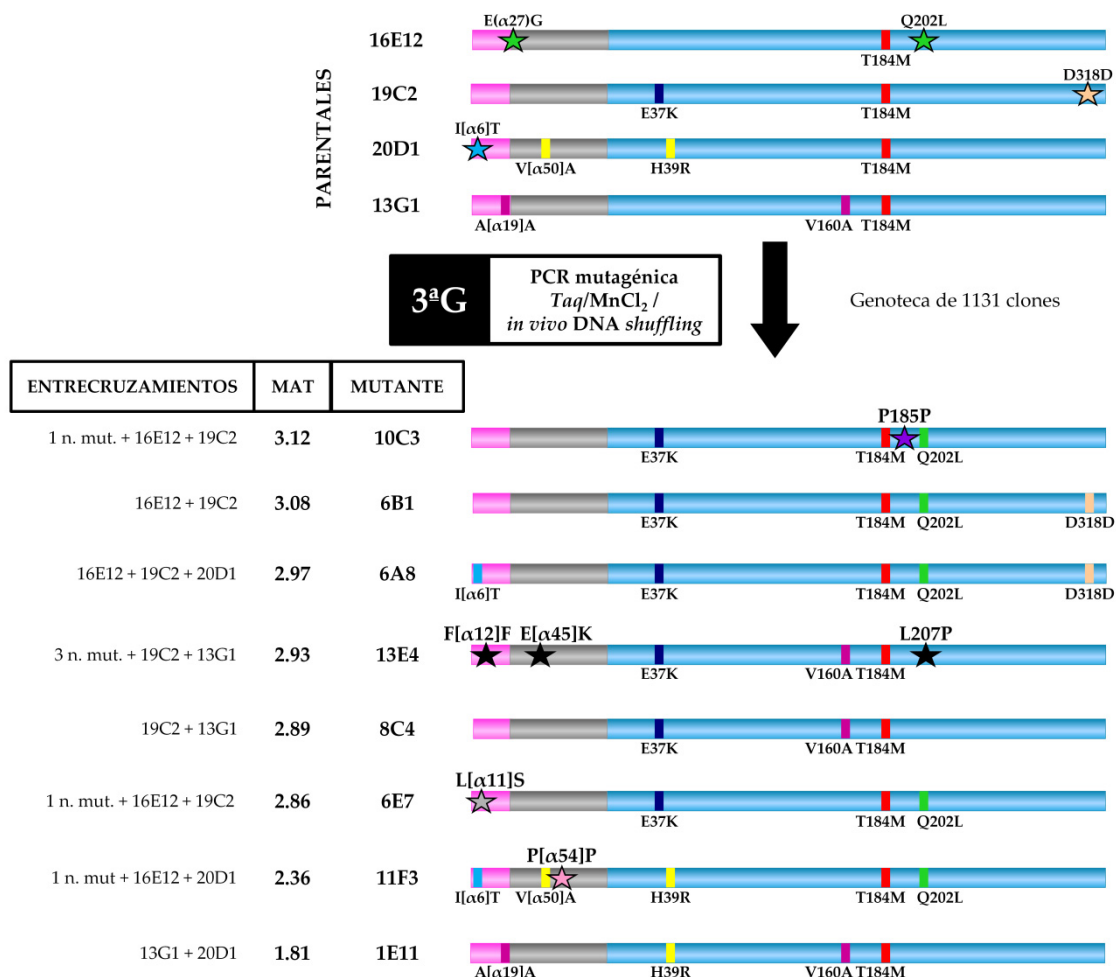


Figura 4.11. Representación esquemática del tercer ciclo de evolución dirigida. Con estrellas se muestran las mutaciones introducidas mediante PCR mutagénica y recombinación *in vivo* durante el 3^{er} ciclo. Los rectángulos indican las mutaciones acumuladas procedentes de los parentales, siguiendo un código de colores en función del parental. Se sugieren los diferentes entrecruzamientos generados por el proceso de *in vivo* DNA shuffling. Se incluyen las mejoras de actividad total (valores MAT en veces) obtenidas en el segundo re-screening respecto del parental referencia 16E12. En azul se representa la secuencia de la proteína madura; en rosa y en gris se representan las secuencias del pre-líder y del pro-líder del factor α , respectivamente. N.mut indica nueva mutación introducida.

Tabla 4.3. Mutantes de la 3ª generación.

Mutante	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	MAT ¹
10C3	G109A (GAG/AAG)	E37K	3.12
	C551T (ACG/ATG)	T184M	
	<u>A555G (CCA/CCG)</u>	<u>P185P</u> ⁴	
	A605T (CAA/CTA)	Q202L	
6B1	G109A (GAG/AAG)	E37K	3.08
	C551T (ACG/ATG)	T184M	
	A605T (CAA/CTA)	Q202L	
	C954T (GAC/GAT)	D318D ⁴	
6A8	T[α17]C (ATT/ACT) ²	I[α6]T ²	2.97
	G109A (GAG/AAG)	E37K	
	C551T (ACG/ATG)	T184M	
	A605T (CAA/CTA)	Q202L	
13E4	<u>C[α36]T (TTC/TTT)</u> ²	<u>F[α12]F</u> ^{2,4}	2.93
	<u>G[α133]A (GAA/AAA)</u> ³	<u>E[α45]K</u> ³	
	G109A (GAG/AAG)	E37K	
	T479C (GTC/GCC)	V160A	
	C551T (ACG/ATG)	T184M	
8C4	<u>T620C (CTC/CCC)</u>	<u>L207P</u>	2.89
	G109A (GAG/AAG)	E37K	
	T479C (GTC/GCC)	V160A	
6E7	C551T (ACG/ATG)	T184M	2.86
	A605T (CAA/CTA)	Q202L	
	T[α33]C (TTA/TCA) ²	L[α11]S ²	
	G109A (GAG/AAG)	E37K	
11F3	T[α17]C (ATT/ACT) ²	I[α6]T ²	2.36
	T[α149]C (GTT/GCT) ³	V[α50]A ³	
	<u>A[α162]T (CCA/CCCT)</u> ³	<u>P[α54]P</u> ³	
	A116G (CAC/CGC)	H39R	
	C551T (ACG/ATG)	T184M	
1E11	A605T (CAA/CTA)	Q202L	1.81
	T[α57]C (GCT/GCC) ²	A[α19]A ^{2,4}	
	A116G (CAC/CGC)	H39R	
	T479C (GTC/GCC)	V160A	
	C551T (ACG/ATG)	T184M	

¹ MAT: Mejora de actividad total (en veces) respecto al parental (16E12) en el 2^o re-*screening*. ² Mutación en el pre-líder del factor α . ³ Mutación en el pro-líder del factor α . ⁴ Mutación silenciosa. Las nuevas mutaciones se muestran subrayadas.

Tras el análisis comparativo de las secuencias y los valores MAT, se descartaron los mutantes 6A8, 8C4 y 1E11 como parentales para el siguiente ciclo de evolución:

- El mutante 6A8 presentó la misma secuencia que 6B1 pero con una mutación más (I[α 6]T) y una actividad ligeramente inferior a 6B1 (valores MAT de 3.08 y 2.97 para 6B1 y 6A8, respectivamente). Por ello, se descartó como parental, al tener 6B1 prestaciones superiores con menos mutaciones.
- El mutante 8C4, con un valor MAT de 2.89, heredó las mismas mutaciones que el mutante 13E4 (E37K, V160A y T184M). Sin embargo, este último incorporó dos mutaciones nuevas en el prepro-líder del factor α (una de ellas silenciosa), y una nueva mutación en la proteína madura (L207P). El valor MAT de 13E4 fue ligeramente superior al de 8C4, por lo que se decidió desechar este último como parental para el siguiente ciclo.
- El mutante 1E11 fue descartado al presentar el valor MAT más bajo de los mutantes seleccionados y sus mutaciones estar presentes en los parentales escogidos para el cuarto ciclo evolutivo (a excepción de una mutación silenciosa en el pre-líder del factor α).

4.4.4 CUARTA GENERACIÓN: *StEP* MUTAGÉNICO COMBINADO CON *in vivo* DNA SHUFFLING

En la cuarta generación se utilizaron como parentales 5 de los 8 mutantes de la generación anterior (10C3, 6B1, 13E4, 6E7 y 11F3). La genoteca se diseñó mediante una combinación de *StEP* mutagénico e *in vivo* DNA *shuffling* con el fin de promover un mayor número de entrecruzamientos entre los genes parentales (**Apartado 3.11.5**, pag 80). Se exploró una librería de 2088 clones mediante un ensayo *HTP-screening* que permitió valorar actividad inicial y termoestabilidad, tal y como se describe en el **Apartado 3.13.2.2**, pag 89). Como parental referencia (estándar interno de cada placa) se utilizó el mejor mutante de la generación anterior (10C3).

Por lo tanto, paralelamente al *screening* de actividad se llevó a cabo un *screening* de termoestabilidad seleccionando mutantes con actividad total mejorada y mutantes con mayor termoestabilidad. La temperatura fijada para el *screening* de termoestabilidad fue de 60°C. Como se puede apreciar en la **Figura 4.12**, la selección de los clones se llevó a cabo en función de dos parámetros, AI (actividad inicial) y AR (actividad residual tras la incubación a altas temperaturas). El valor AI equivale al valor MAT definido en los *screenings* de

generaciones anteriores. Las mejoras en termoestabilidad se calcularon en base al cociente AR/AI.

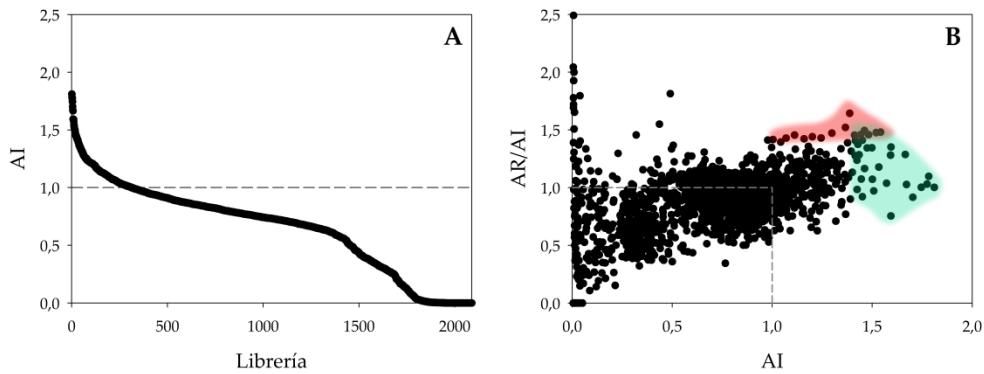


Figura 4.12. Paisajes evolutivos de la cuarta generación. A) Perfil de actividad inicial (AI). La actividad de los clones de la librería se representa en orden descendente. Alrededor del 85 % de los clones mostraron una actividad total inferior a la del tipo parental y entorno al 6 % de los clones se inactivaron por mutagénesis/recombinación. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental, el mutante 10C3 de la 3ª generación (=1). B) Representación de la termoestabilidad (AR/AI) frente a la actividad inicial (AI). AR: actividad residual tras incubación a 60°C. El área roja indica los clones seleccionados para los re-*screenings* de termoestabilidad. El área verde indica los clones seleccionados para los re-*screenings* de actividad. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental, el mutante 10C3 de la 3ª generación (=1).

Se incorporó un tercer re-*screening* basado en la determinación de la T_{50} para medir la termoestabilidad cinética de los mutantes escogidos (Figura 4.13).

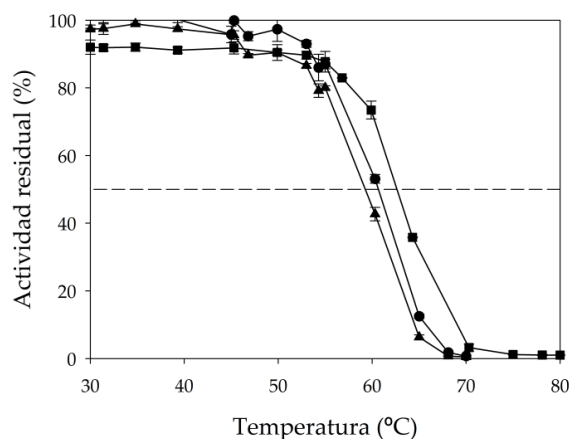


Figura 4.13. Determinación del valor T_{50} de los mutantes de la 4ªG. Perfil de T_{50} del parental 10C3 (●), R4 (▲) y 24E10 (■). Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes e incluye las desviaciones estándar.

Finalmente se seleccionaron cuatro variantes, dos mutantes de actividad (R4 y 13E7) y dos mutantes de termoestabilidad (24E10 y 21E9) (Tabla 4.4 y Figura 4.14).

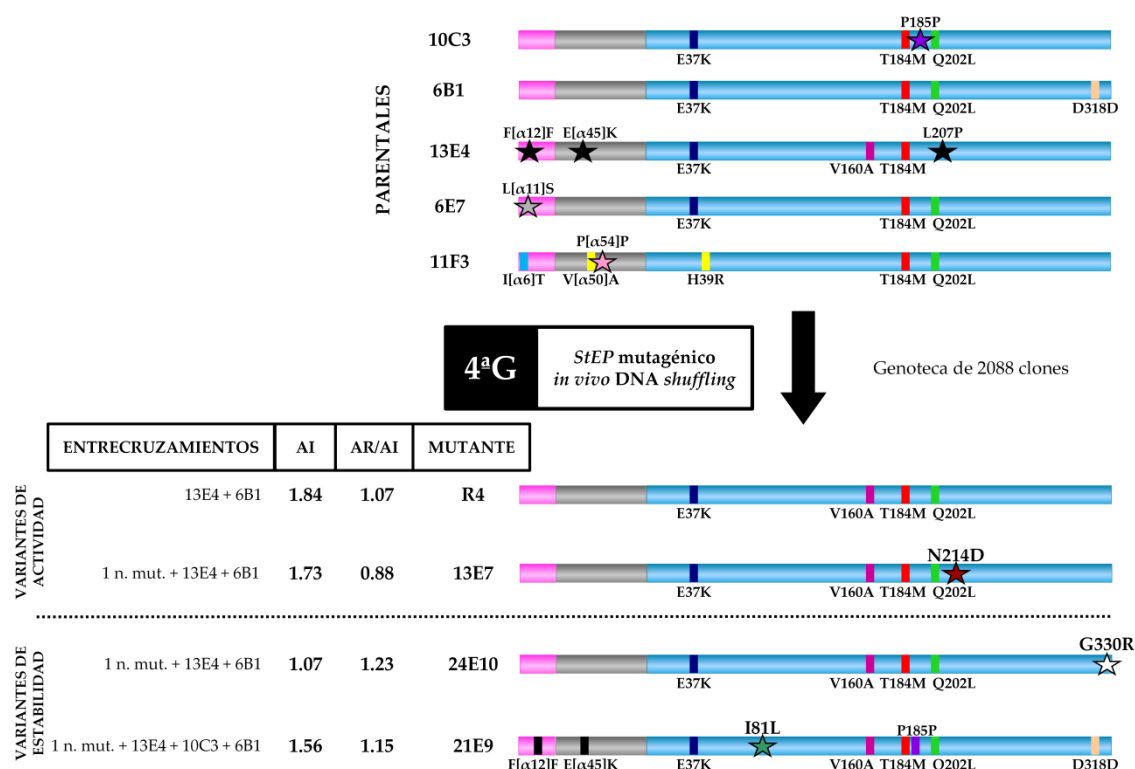


Figura 4.14. Representación esquemática del cuarto ciclo de evolución dirigida. Con estrellas se muestran las mutaciones introducidas mediante *StEP* mutagénico durante el 4º ciclo. Los rectángulos indican las mutaciones acumuladas procedentes de los parentales, siguiendo un código de colores en función del parental. Se sugieren los diferentes entrecruzamientos generados por los procesos de *STEP* mutagénico e *in vivo DNA shuffling*. Se incluyen los valores AI (Actividad inicial, en veces) y de termoestabilidad (AR/AI, en veces) obtenidas en el segundo re-screening respecto del parental referencia 10C3. En azul se representa la secuencia de la proteína madura; en rosa y en gris se representan las secuencias del pre-líder y del pro-líder del factor α , respectivamente. N.mut indica nueva mutación introducida.

R4 fue el mejor mutante de actividad con un valor MAT de 1.84. Este mutante no mostró ninguna nueva mutación sino una recombinación de cuatro mutaciones que fueron introducidas durante las generaciones 1 y 2 de la evolución molecular (E37K, V160A, T184M y Q202L). Además, R4 conservó una estabilidad equivalente a la del parental referencia 10C3. El mutante R4 fue escogido como el mejor mutante de actividad total del proceso de evolución dirigida de la VP llevado a cabo en esta Tesis Doctoral. El otro mutante de actividad, 13E7, presentó las mismas mutaciones que R4 más una nueva

mutación (N214D). Dicha mutación no fue beneficiosa para la actividad total ya que su valor MAT fue inferior al de R4; además su termoestabilidad fue negativamente afectada por dicha mutación, por lo que 13E7 fue descartado.

Tabla 4.4. Variantes de la 4ª generación.

Mutante	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	AI ¹	AR/AI ²
R4	G109A (GAG/AAG)	E37K	1.84	1.07
	T479C (GTC/GCC)	V160A		
	C551T (ACG/ATG)	T184M		
	A605T (CAA/CTA)	Q202L		
13E7	G109A (GAG/AAG)	E37K	1.73	0.88
	T479C (GTC/GCC)	V160A		
	C551T (ACG/ATG)	T184M		
	A605T (CAA/CTA)	Q202L		
	<u>A640G (AAC/GAC)</u>	<u>N214D</u>		
24E10	G109A (GAG/AAG)	E37K	1.07	1.23
	T479C (GTC/GCC)	V160A		
	C551T (ACG/ATG)	T184M		
	A605T (CAA/CTA)	Q202L		
	<u>G988A (GGA/AGA)</u>	<u>G330R</u>		
21E9	C[α36]T (TTC/TTT) ³	F[α12]F ^{3,5}	1.56	1.15
	G[α133]A (GAA/AAA) ⁴	E[α45]K ⁴		
	G109A (GAG/AAG)	E37K		
	<u>A241C (ATC/CTC)</u>	<u>I81L</u>		
	T479C (GTC/GCC)	V160A		
	C551T (ACG/ATG)	T184M		
	A555G (CCA/CCG)	P185P ⁵		
	A605T (CAA/CTA)	Q202L		
C954T (GAC/GAT) ⁴	D318D ⁵			

¹ Mejora de actividad total (en veces) respecto al parental (10C3) en el 2º re-screening. ² Mejora de termoestabilidad (en veces) respecto al parental (10C3) en el 2º re-screening. ³ Mutación en el pre-líder del factor α. ⁴ Mutación en el pro-líder del factor α. ⁵ Mutación silenciosa. Las nuevas mutaciones se muestran subrayadas. AI: actividad inicial; AR: actividad residual tras incubación a 70°C.

El mejor mutante de termoestabilidad, 24E10, mostró una termoestabilidad 1.23 veces superior a la del parental referencia 10C3 (lo cual supuso un incremento en su T₅₀ de 2.2°C). 24E10 presentó la misma combinación de mutaciones que el mutante de actividad R4 e incorporó una nueva mutación (G330R) responsable de la mejora de estabilidad. La

combinación de las cuatro mutaciones comunes a R4 y 24E10 favorecieron que este último mutante mostrara una termoestabilidad mejorada y conservara la actividad total del tipo parental 10C3. El mutante 21E9, mostró una termoestabilidad 1.15 veces superior a la del parental referencia 10C3. 21E9 presentó ocho mutaciones procedentes de la recombinación de los parentales 10C3, 6B1 y 13E4. Dos de las mutaciones se localizaron en el prepro-líder del factor α y las seis mutaciones restantes en la secuencia *vpl2*: dos de ellas silenciosas y las otras cuatro comunes al mutante R4 (E37K, V160A, T184M y Q202L). Además, 21E9 incorporó una nueva mutación (I81L), posiblemente responsable de la mejora de termoestabilidad. En último término se decidió escoger 24E10 como único parental para el siguiente ciclo, con el objetivo exclusivo de mejorar la termoestabilidad de la VP.

4.4.5 QUINTA GENERACIÓN: ENSAMBLAJE *in vivo* DE GENOTECAS MUTAGÉNICAS CON DISTINTO ESPECTRO MUTACIONAL (IvAM)

La 5ª y 6ª generación se enfocaron exclusivamente a la mejora de la termoestabilidad de la enzima. En la generación 5 se utilizó como parental el mutante 24E10 (mejor mutante de termoestabilidad de la generación anterior). La genoteca se diseñó mediante IvAM a través de 2 PCR mutagénicas con diferentes polimerasas (*Taq* y *Mutazyme II*) recombinando *in vivo* los productos amplificados (**Apartado 3.11.6**, pag 81). Se exploró una librería de 1392 clones mediante el ensayo *HTP-screening* descrito en la generación anterior, con la salvedad de que se escogieron únicamente mutantes con mejoras hacia termoestabilidad. La presión selectiva pudo ser incrementada en este ciclo llevando a cabo el *screening* a 80°C, debido a la mayor termoestabilidad del tipo parental 24E10 (que se empleó como parental referencia -estándar interno de cada placa-), **Figura 4.15**.

Se escogieron dos mutantes (3H9 y 15B4) con mejoras en termoestabilidad de 1.35 y 1.21 veces respecto el tipo parental 24E10. Cuando se analizaron sus valores de T_{50} , únicamente 3H9 presentó una mejora significativa (1.2°C frente al parental 24E10), mientras que 15B4 mostró una T_{50} similar a la del parental (62.4°C frente a 62.7°C de 24E10). Por otro lado, 3H9 disminuyó ligeramente su actividad (MAT de 0.79) mientras que 15B4 aumentó su actividad (MAT de 1.2). Con la finalidad de mantener en la medida de lo posible la actividad total durante la evolución hacia termoestabilidad, ambos mutantes se escogieron como parentales para el sexto ciclo de evolución (**Figura 4.17**).

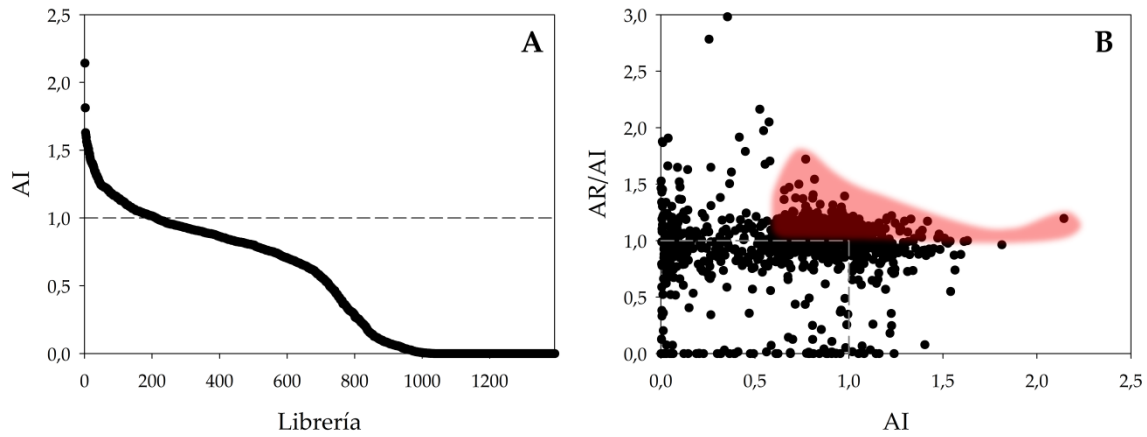


Figura 4.15. Paisajes evolutivos de la quinta generación. A) Perfil de actividad inicial (AI). La actividad de los clones de la librería se representa en orden descendente. Alrededor del 85 % de los clones mostraron una actividad total inferior a la del tipo parental y entorno al 26 % de los clones se inactivaron por mutagénesis/recombinación. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental, el mutante 24E10 de la 4ª generación (=1). B) Representación de la termoestabilidad (AR/AI) frente a la actividad inicial (AI). AR: actividad residual tras incubación a 80°C. El área roja indica los clones seleccionados para los re-screenings. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental, el mutante 24E10 de la 4ª generación (=1).

En el tercer re-screening se determinó la T_{50} de los mutantes procedentes del segundo re-screening (Figura 4.16).

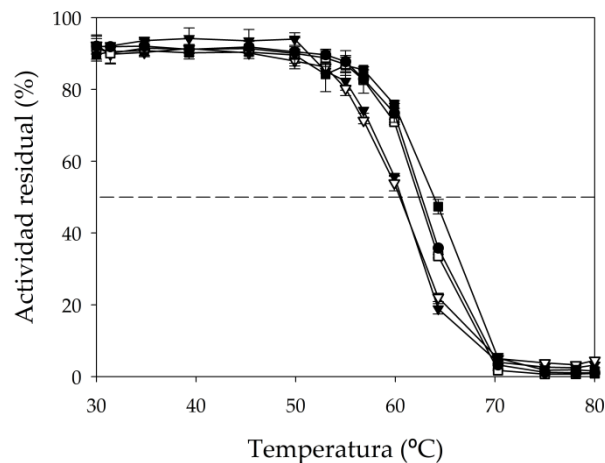


Figura 4.16. Determinación del valor de T_{50} de los mutantes de la 5ªG. Perfil de T_{50} del parental 24E10 (●), 3H9 (■), 15B4 (□), 3G2 (▼) y 12A8 (▽). Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes e incluye las desviaciones estándar.

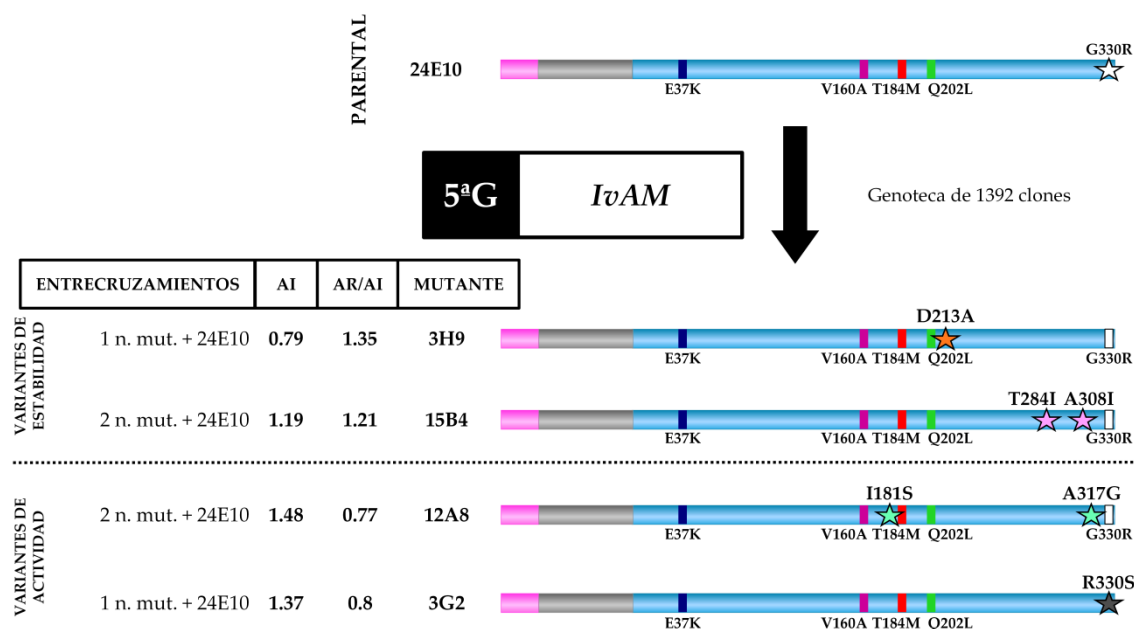


Figura 4.17. Representación esquemática del quinto ciclo de evolución. Con estrellas se muestran las mutaciones introducidas mediante IvAM durante el 5º ciclo. Los rectángulos indican las mutaciones acumuladas procedentes de los parentales, siguiendo un código de colores en función del parental. Se incluyen los valores AI (en veces) y de termoestabilidad (AR/AI, en veces) obtenidas en el segundo re-*screening* respecto del parental referencia 24E10. En azul se representa la secuencia de la proteína madura; en rosa y en gris se representan las secuencias del pre-líder y del pro-líder del factor α , respectivamente. N.mut indica nueva mutación introducida.

La **Figura 4.17** también recoge dos mutantes de actividad seleccionados (12A8 y 3G2), con valores MAT~1.5 veces superiores al parental 24E10. Estos dos mutantes de actividad fueron secuenciados con el fin de incluirlos en los siguientes ciclos para paliar la pérdida de actividad detectada a costa de la mejora en la estabilidad. La inclusión de mutaciones de actividad en los procesos de recombinación podría mejorar la actividad total en las variantes termoestables. Sin embargo, ambos mutantes de actividad fueron finalmente descartados como parentales al presentar un considerable descenso en su estabilidad cinética.

Tabla 4.5. Variantes de la 5ª generación.

Mutante	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	AI ¹	AR/AI ²
3H9	G109A (GAG/AAG)	E37K	0.79	1.35
	T479C (GTC/GCC)	V160A		
	C551T (ACG/ATG)	T184M		
	A605T (CAA/CTA)	Q202L		
	<u>A638C (GAC/GCC)</u>	<u>D213A</u>		
	G988A (GGA/AGA)	G330R		
15B4	G109A (GAG/AAG)	E37K	1.19	1.21
	T479C (GTC/GCC)	V160A		
	C551T (ACG/ATG)	T184M		
	A605T (CAA/CTA)	Q202L		
	<u>C851T (ACC/ATC)</u>	<u>T284I</u>		
	<u>G922A (GCC/ACC)</u>	<u>A308T</u>		
G988A (GGA/AGA)	G330R			
12A8	G109A (GAG/AAG)	E37K	1.48	0.77
	T479C (GTC/GCC)	V160A		
	<u>T548G (ATT/AGT)</u>	<u>I181S</u>		
	C551T (ACG/ATG)	T184M		
	A605T (CAA/CTA)	Q202L		
	<u>C956G (GCT/GGT)</u>	<u>A317G</u>		
G988A (GGA/AGA)	G330R			
3G2	G109A (GAG/AAG)	E37K	1.37	0.8
	T479C (GTC/GCC)	V160A		
	C551T (ACG/ATG)	T184M		
	A605T (CAA/CTA)	Q202L		
	<u>A990T (AGA/AGT)</u>	<u>R330S</u>		

¹ Mejora de actividad total (en veces) respecto al parental (24E10) en el 2º re-screening. ² Mejoras de termoestabilidad (en veces) respecto al parental (24E10) en el 2º re-screening. Las nuevas mutaciones se muestran subrayadas. AI: actividad inicial; AR: actividad residual tras incubación a 80°C.

4.4.6 SEXTA GENERACIÓN: PCR MUTAGÉNICA COMBINADA CON *in vivo* DNA SHUFFLING

En la sexta y última generación se utilizaron como parentales los 2 mutantes de termoestabilidad de la generación anterior (3H9 y 15B4). La genoteca se diseñó mediante PCR mutagénica y recombinación a través de *in vivo* DNA *shuffling*, siguiendo las condiciones descritas para los ciclos 2 y 3. Se exploró una librería de 1305 clones mediante el ensayo *HTP-screening* descrito en la generación anterior e incrementando la presión selectiva a 90°C. Como parental referencia (estándar interno de cada placa) se utilizó el mejor mutante de termoestabilidad de la generación anterior (3H9) (Figura 4.18).

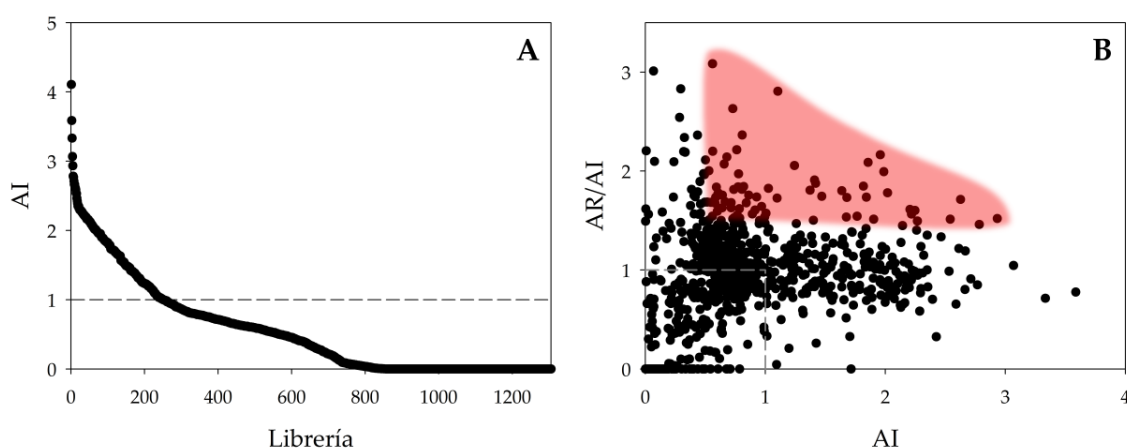


Figura 4.18. Paisajes evolutivos de la sexta generación. A) Perfil de actividad inicial (AI). La actividad de los clones de la librería se representa en orden descendente. Alrededor del 80 % de los clones mostraron una actividad total inferior a la del tipo parental y entorno al 32 % de los clones se inactivaron por mutagénesis/recombinación. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental, el mutante 3H9 de la 5ª generación (=1). B) Representación de la termoestabilidad (AR/AI) frente a la actividad inicial (AI). El área roja indica los clones seleccionados para los re-screenings. La línea discontinua indica la actividad del tipo parental, el mutante 3H9 de la 5ª generación (=1).

En el tercer re-screening se determinó la T_{50} de los mutantes escogidos en el segundo re-screening (Figura 4.19).

Se seleccionó el mutante 2-1B como la variante final de termoestabilidad del proceso de evolución dirigida descrito en la presente Tesis Doctoral. 2-1B mostró una mejora de estabilidad de 1.36 veces y un valor MAT de 0.77 veces respecto al parental 3H9 (Tabla 4.6). El mutante 2-1B no adquirió por recombinación ninguna de las mutaciones del parental 15B4 (Figura 4.20). Su secuencia fue idéntica a la del mejor parental de termoestabilidad (3H9) incorporando una nueva mutación (H39R) que le confirió una mejora en la T_{50} de 2°C.

La mutación H39R fue incorporada por primera vez en la ruta evolutiva en la primera generación (en el mutante 4B5), sin embargo se perdió a lo largo de los procesos de recombinación sucesivos (Figura 4.21).

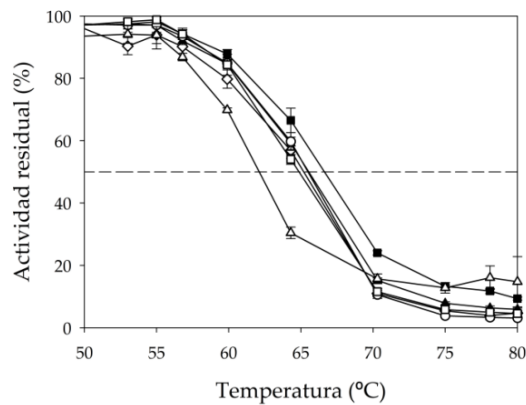


Figura 4.19. Determinación del valor de T_{50} de los mutantes de la 6ªG. Perfil de T_{50} del parental 3H9 (◇), 2-1B (■), 3H3 (○), 4F2 (▲), 14B5 (△) y 16A10 (□). Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes e incluye las desviaciones estándar.

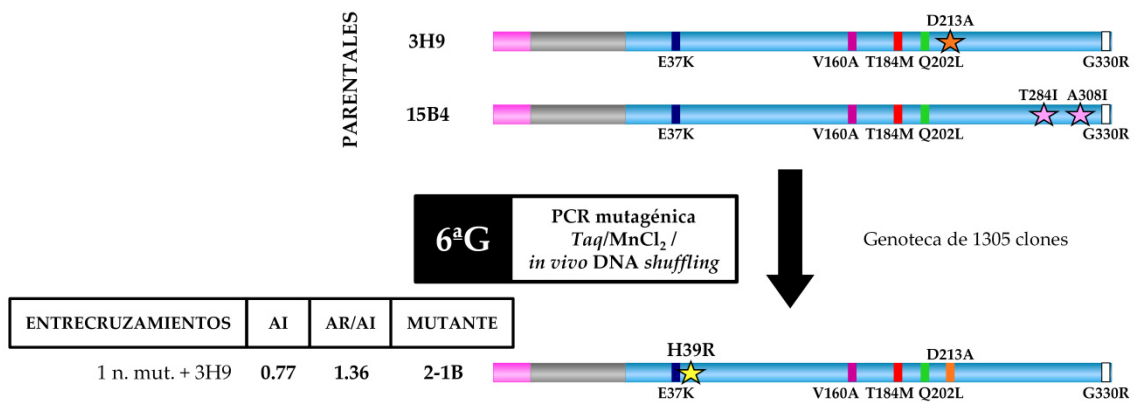


Figura 4.20. Representación esquemática del sexto ciclo de evolución. Con estrellas se muestran las mutaciones introducidas mediante PCR mutagénica durante el 6º ciclo. Los rectángulos indican las mutaciones acumuladas procedentes de los parentales, siguiendo un código de colores en función del parental original. Se incluyen los valores AI (en veces) y de termoestabilidad (AR/AI, en veces) obtenidas en el segundo re-screening respecto del parental referencia 3H9. AR: actividad residual tras incubación a 90°C. En azul se representa la secuencia de la proteína madura; en rosa y en gris se representan las secuencias del pre-líder y del pro-líder del factor α , respectivamente. N.mut indica nueva mutación introducida.

Tabla 4.6. Variantes de la 6ª generación.

Mutante	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	AI ¹	AR/AI ²
2-1B	G109A (<u>GAG/AAG</u>)	E37K	0.77	1.36
	A116G (<u>CAC/CGC</u>)	H39R		
	T479C (<u>GTC/GCC</u>)	V160A		
	C551T (<u>ACG/ATG</u>)	T184M		
	A605T (<u>CAA/CTA</u>)	Q202L		
	A638C (<u>GAC/GCC</u>)	D213A		
	G988A (<u>GGA/AGA</u>)	G330R		

¹ Mejora de actividad total (en veces) respecto al parental (3H9) en el 2º re-screening. ² Mejoras de termoestabilidad (en veces) respecto al parental (3H9) en el 2º re-screening. Las nuevas mutaciones se muestran subrayadas. AI: actividad inicial; AR: actividad residual tras incubación a 90°C.

La **Figura 4.21** resume el proceso completo de evolución artificial de la VP.

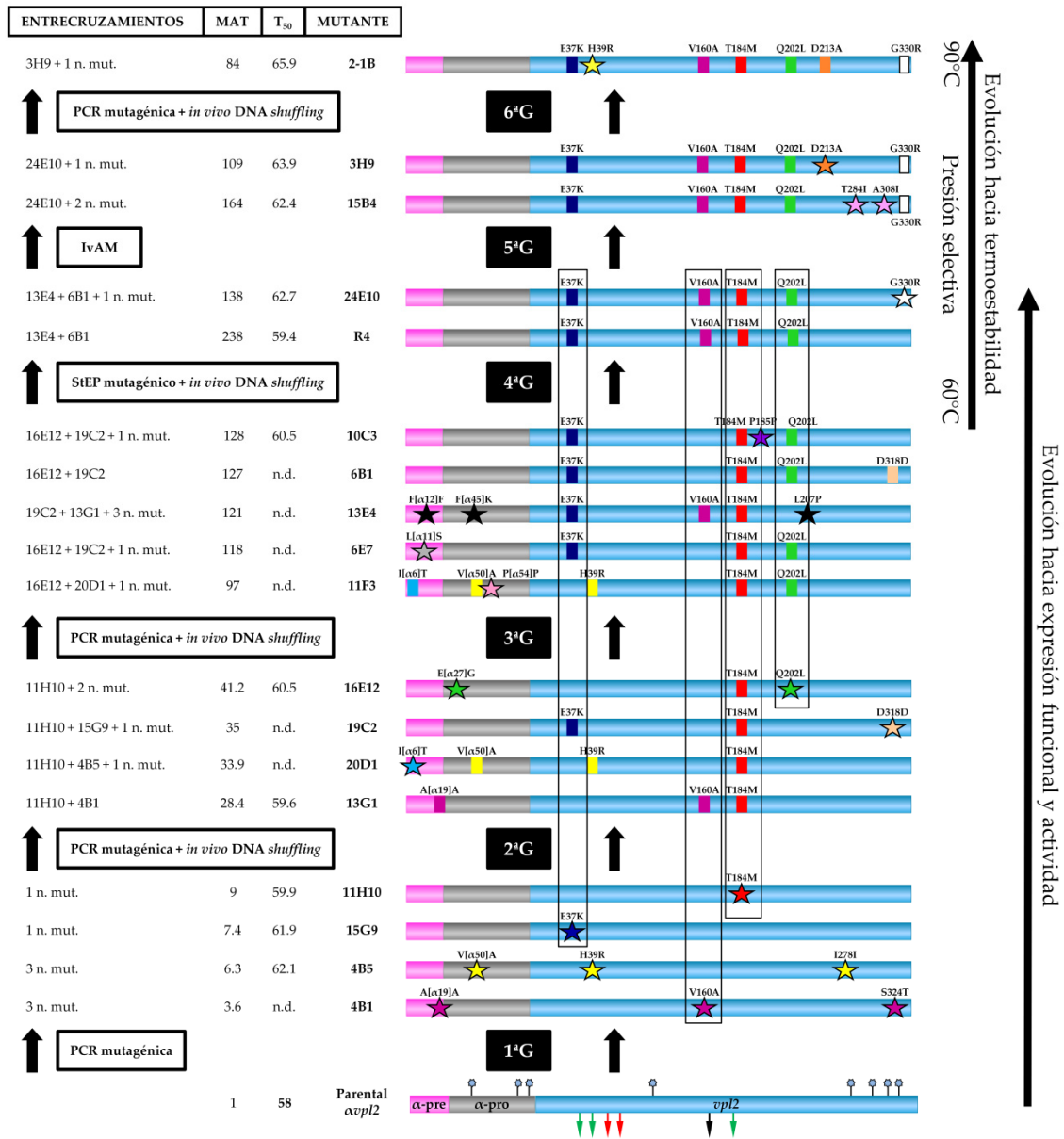


Figura 4.21. Representación esquemática del proceso de evolución de la VP. Con estrellas se muestran las mutaciones nuevas. Los rectángulos indican las mutaciones acumuladas, siguiendo un código de colores en función del parental de procedencia. Se incluyen los valores MAT (mejoras de actividad total, en veces) respecto del parental VPL2. También se incluyen los valores de T₅₀ en °C. En azul se representa la secuencia de la proteína madura; en rosa y en gris se representan las secuencias del pre-líder y del pro-líder del factor α, respectivamente. En el parental *avpl2* se muestran los sitios de glicosilación como estrellas azules, el sitio de oxidación del Mn²⁺ (Glu36, Glu40 y Asp175) como flechas verdes, el Trp164 como una flecha negra y el sitio de unión del H₂O₂ (Arg43 y His47) como flechas rojas. N.mut indica nueva mutación introducida. N.d.: no determinado.

4.5 ELIMINACIÓN DE LA SECUENCIA EXTRA DEL EXTREMO N-TERMINAL

Las VP expresadas por *S. cerevisiae* (el parental VPL2 y los mutantes R4 y 2-1B) presentaron en el extremo N-terminal seis aminoácidos adicionales (EAEAEF) respecto de la VP expresada por el hongo *P. eryngii* (ver **Apartado 4.7.4**, pag 139). Se decidió llevar a cabo la eliminación de esta extensión y la posterior caracterización de las variantes truncadas. Para suprimir la extensión extra N-terminal se plantearon dos estrategias moleculares diferentes: SOE e IVOE (**Apartado 3.12**, pag 82). Ambas técnicas funcionaron con un rendimiento similar aunque el SOE requirió de una reacción extra de PCR para el ensamblaje del producto completo mientras que el IVOE prescindió de este paso a través de la recombinación homóloga en *S. cerevisiae* (**Figura 3.6 y 3.7**, pag 84 y 85). Las genotecas construidas para la obtención de las variantes truncadas VPL2DEL, R4DEL y 2-1BDEL fueron exploradas con el correspondiente ensayo de *HTP-screening* (**Apartado 3.13**, pag 86) y los clones mostraron valores de actividad y estabilidad similares a los correspondientes parentales (VPL2, R4 y 2-1B). Se secuenciaron los genes de varios clones verificando en todos los casos la eliminación de la extensión EAEAEF sin la alteración del marco de lectura abierto. Las distintas variantes purificadas fueron transferidas a membranas y sus extremos N-terminal secuenciados para analizar el procesado del péptido señal (ver **Apartado 4.7.4**, pag 139).

4.6 PURIFICACIÓN DE LA VP

La purificación del tipo parental VPL2 y sus variantes evolucionadas R4, R4DEL y 2-1B se realizó siguiendo el protocolo descrito en el **Apartado 3.14**, pag 92.

El sobrenadante procedente de fermentados de células de *S. cerevisiae* transformadas con las distintas VP fue sometido a una precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La fracción precipitada entre el 50 y el 65 % de sulfato de amonio se dializó y concentró por ultrafiltración. El concentrado fue sometido a cromatografía de intercambio aniónico fuerte de baja resolución (**Figura 4.22**). Las fracciones con mayor actividad peroxidasa y elevada absorbancia a 407 nm (presencia de grupo hemo) se dializaron y concentraron, sometiéndolas a cromatografía de intercambio aniónico fuerte de alta resolución (**Figura 4.23**). Tras este paso de purificación, la R_z (relación de absorbancia A_{407}/A_{280}) fue aproximadamente 4. El rendimiento final de la purificación fue de un 22 % (**Figura 4.24**, **Tabla 4.7**) con un factor de purificación ~22. Se detectaron dos glicofomas en la purificación de R4 y 2-1B con % de glicosilación del 10.2 % (glicofoma I) y 9.75 % (glicofoma II), estimados por MALDI-TOF (**Figura 4.26**). Mientras que la glicofoma I de

R4 fue minoritaria, la glicoforma I de 2-1B representó ~ 45 %. El parental y mutantes caracterizados en la presente Tesis Doctoral se refieren a la glicoforma II. La glicoforma I no se estudió en mayor detalle por ser minoritaria (especialmente en el caso de R4) y presentar propiedades bioquímicas similares a la glicoforma II.

Tabla 4.7. Purificación de R4.

Paso de purificación	Proteína total (mg/mL)	Actividad (U/mL) ¹	Actividad específica (U/mg) ¹	Factor de purificación
Extracto crudo	0.33	10.64	32.28	1.00
50-65% (NH ₄) ₂ SO ₄	10.6	1031.7	97.4	3.02
Intercambio anionico fuerte QFF	3.3	833.9	253	7.8
Intercambio anionico fuerte Biosuite Q	13.5	9663.1	716.8	22.2

¹ La actividad se valoró como oxidación de ABTS 2 mM en tampón tartrato sódico 100 mM, pH 3.5 tras la adición de H₂O₂ 0.1 mM.

Para la purificación de la variante R4DEL hubo que modificar el protocolo incluyendo nuevos pasos cromatográficos, así como aumentar el pH de los tampones utilizados en las cromatografías debido al incremento del pI de esta variante tras la delección de la extensión EAEAEF (ver **Apartado 4.7.3**, pag 138).

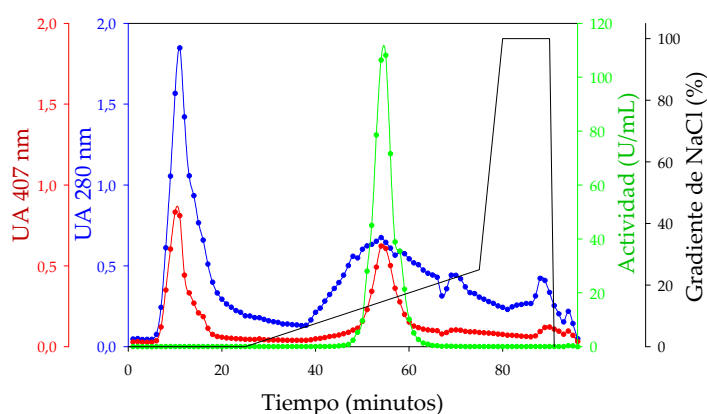


Figura 4.22. Cromatografía de intercambio aniónico fuerte de baja resolución (QFF). Se muestra la actividad (U/mL) de las fracciones recogidas a lo largo de la carrera (—), proteína total (Abs 280 nm, —), grupo hemo (Abs 407 nm, —) y gradiente de NaCl (%). UA: unidades de absorbancia.

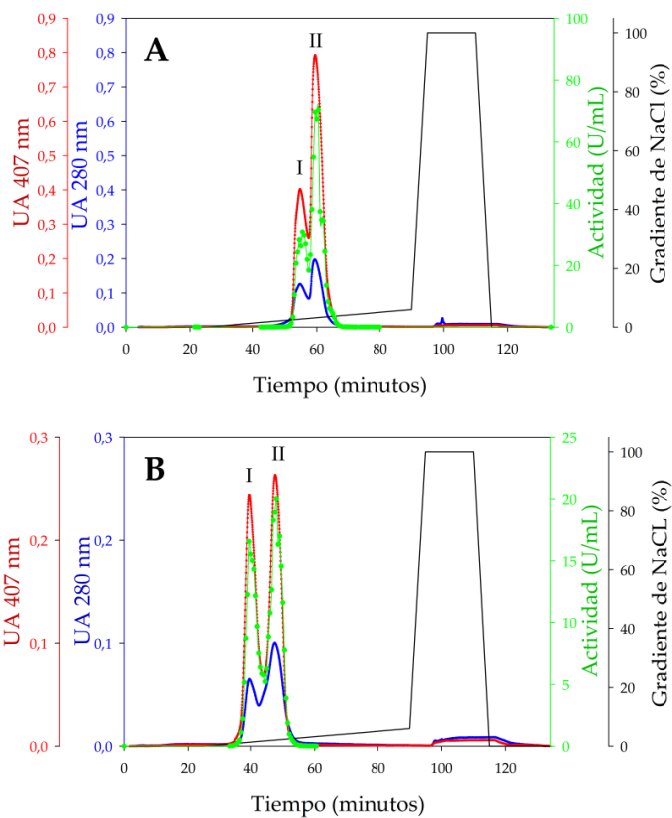


Figura 4.23. Cromatografía de intercambio aniónico fuerte de alta resolución (Q-Waters). Se muestra la actividad (U/mL) de las fracciones recogidas a lo largo de la carrera (—), proteína total (Abs 280 nm, —), grupo hemo (Abs 407 nm, —) y gradiente de NaCl (%) (—) en la purificación de R4 (A) y 2-1B (B). Se señalan las glicoformas I y II.

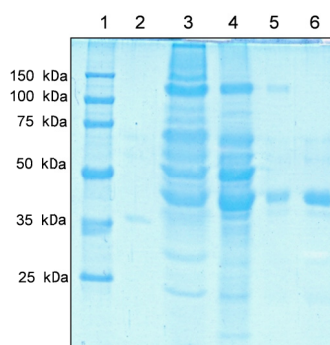


Figura 4.24. Electroforesis SDS-PAGE de los pasos de purificación de la variante R4 (glicoforma II). Carril 1, marcadores de masa molecular; 2, VPL2 expresada en *E. coli*; 3, extracto crudo filtrado; 4, fracción precipitada entre el 50-65 % de $(NH_4)_2SO_4$; 5, cromatografía de intercambio aniónico fuerte de baja resolución (*Hi-Trap-FFQ*); 6, cromatografía de intercambio aniónico fuerte de alta resolución (*Biosuite Q*).

4.7 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS VP PURIFICADAS

4.7.1 MASA MOLECULAR Y DESGLICOSILACIÓN

Las VP expresadas por *S. cerevisiae* mostraron una movilidad electroforética menor que la VPL2 expresada en *E. coli* siendo su masa molecular de ~40 kDa y ~35 kDa, respectivamente (**Figura 4.24**, pag 135). Tras realizar una N-desglicosilación la masa molecular de las variantes expresadas en *S. cerevisiae* se redujo a ~35 kDa (**Figura 4.25**).

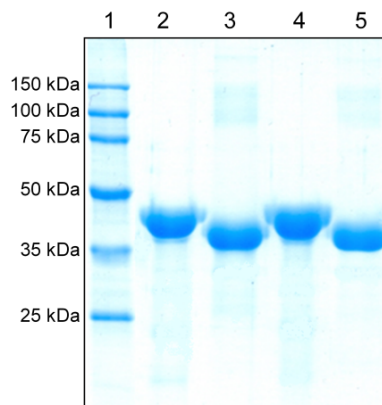


Figura 4.25. Análisis de desglicosilación mediante electroforesis SDS-PAGE. Carril 1, marcador de masa molecular; 2, mutante R4; 3, mutante R4 desglicosilado con PNGasa-F; 4, mutante 2-1B; 5, mutante 2-1B desglicosilado con PNGasa-F. Gel teñido con solución coloidal de azul Coomassie. La cantidad de VP en cada carril fue de 16 µg.

La masa molecular fue determinada por MALDI-TOF (con valores de 38618, 38600, 38761 y 38100 Da para el parental VPL2, y sus variantes evolucionadas R4, 2-1B y R4DEL, respectivamente **Figura 4.26, Tabla 4.8**). El valor calculado a partir de la composición de aminoácidos fue de 35258, 35244, 35318 y 34567 Da para el parental VPL2 y los mutantes R4, 2-1B y R4DEL, respectivamente. De estos datos se pudo deducir que las VP secretadas por *S. cerevisiae* mostraron unos grados de glicosilación ~ 9-10 % (**Tabla 4.8**).

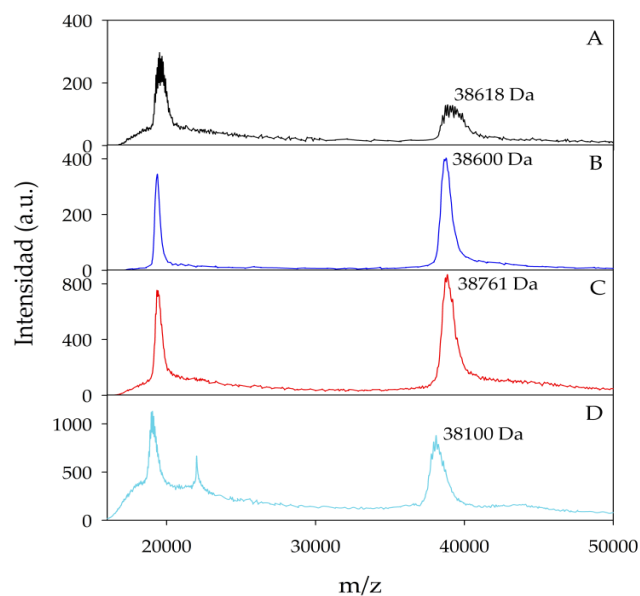


Figura 4.26. Espectros de MALDI-TOF. Se indican los valores de masa molecular de A) VPL2; B) R4; C) 2-1B; D) R4DEL.

Tabla 4.8. Características bioquímicas y espectroscópicas.

Características bioquímicas y espectroscópicas	Parental VPL2	R4	2-1B	R4 DEL
Masa molecular (Da) ¹	35258	35244	35318	34567
Masa molecular (Da) ²	38618	38600	38761	38100
Grado de glicosilación (%)	9.5	9.5	9.8	10.2
T ₅₀ (°C)	58	59.4	65.9	60
pI	4.6	4.6	4.6	4.9
pH óptimo ³	3.0	3.5	4.0	3.5
Máx. región Soret (nm)	407	407	407	407
CT2 (nm) ⁴	n.d	504	503	504
CT1 (nm) ⁵	631	638	638	643

¹ Masa molecular teórica estimada de la composición de aminoácidos. ² Masa molecular estimada por MALDI-TOF. ³ pH óptimo de oxidación de ABTS. ⁴ Banda de transferencia de carga 2. ⁵ Banda de transferencia de carga 1. N. d., no determinado.

4.7.2 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO

Los espectros de absorción del parental VPL2 y los mutantes R4, 2-1B y R4DEL presentaron un perfil característico de hemoproteína, con un máximo en la región Soret a 407 nm y dos máximos (CT1 y CT2) característicos del Fe³⁺ en estado de alto spin como se muestra en la **Tabla 4.8** y en la **Figura 4.27**.

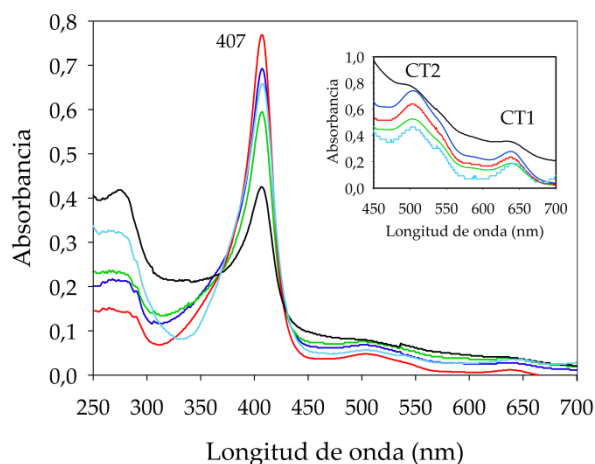


Figura 4.27. Características físico-químicas. Espectros de absorción del parental VPL2 (—), R4 (—); 2-1B (—); R4DEL (—) y VPL2 expresada en *E. coli* (—). El recuadro muestra el detalle de las dos bandas de transferencia de carga CT1 y CT2.

El grado de pureza de la enzima viene determinado por la índice $R_z (A_{407}/A_{280})$, de manera que valores cercanos a 4 indican un alto nivel de pureza mientras que valores inferiores apuntan la presencia de otras proteínas. La relación A_{407}/A_{280} fue en torno a 4 para todas las VP purificadas excepto para el parental VPL2 y R4DEL que fue 2, indicando niveles de pureza inferiores, posiblemente debido a la presencia de productos de desnaturalización de la VP que hayan perdido el grupo hemo (Smith, AT *et al.*, 1990).

4.7.3 DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO

El punto isoeléctrico (pI) se determinó mediante electroforesis bidimensional. El parental VPL2 y los mutantes R4 (**Figura 4.28**) y 2-1B mostraron un pI = 4.6. El mutante truncado R4DEL tras la delección de la extensión ácida EAEAEF incrementó su pI 0.3 unidades (de 4.6 a 4.9, **Tabla 4.8**).

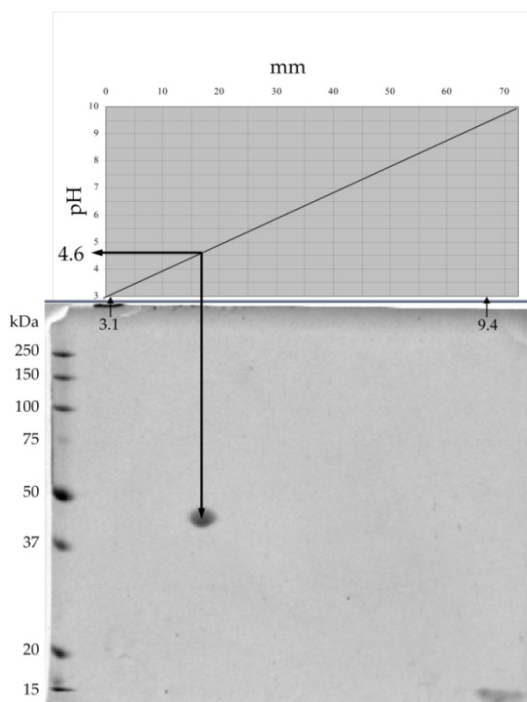


Figura 4.28. Gel bidimensional para la determinación del pI del mutante R4.

4.7.4 DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DEL EXTREMO N-TERMINAL EN LA VP MADURA

La secuencia del extremo N-terminal del parental VPL2 y los mutantes R4 y 2-1B fue **EAEAEFATCDDGRTT**. La proteína madura expresada por el hongo presenta la secuencia amino terminal **ATCDDGRTT**. Por tanto, las VP expresadas en *S. cerevisiae* incluyeron 6 aminoácidos (EAEAEF) adicionales en su extremo N-terminal. Los dos últimos residuos (EF) se introdujeron durante la construcción del plásmido pJR α vpl2 al insertar una diana de restricción para la enzima *EcoRI* (**Apartado 3.7.7**, pag 66). Los otros cuatro aminoácidos (EAEA) pertenecen a la parte final del pro-líder del factor α (constituyendo la diana de reconocimiento de la endopeptidasa *STE13* del aparato de Golgi), que no fue procesado correctamente en los estadios post-traduccionales.

La secuencia del extremo N-terminal para los truncados VPL2DEL, R4DEL y 2-1BDEL fue **ATCDDGRTT**, demostrando que la eliminación de la secuencia diana para *STE13* permitió un procesamiento correcto de la VP.

4.8 DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE SECRECIÓN DE LA VP EN *S. cerevisiae*

El nivel de secreción del tipo parental VPL2 y sus variantes evolucionadas R4, 2-1B y R4DEL se estimó como el cociente entre la actividad total y la actividad específica estimada con ABTS (Tabla 4.9). El mutante R4 presentó un valor MAT de ~129 veces sobre el del tipo parental VPL2. El desglose del valor MAT de R4 reflejó una mejora de 51.6 veces en expresión funcional y de 2.5 veces en la actividad específica para la oxidación de ABTS con respecto al tipo parental. Así, el nivel de secreción alcanzado en R4 fue de 21.6 mg/L, suponiendo el nivel de expresión funcional más elevado descrito hasta el momento para peroxidasa versátiles. La delección de la extensión N-terminal en R4DEL no afectó significativamente a su actividad específica, pero sí a su expresión funcional que disminuyó en torno al 60 % cuando se comparó con el mutante R4. Del mismo modo, el mutante de termoestabilidad 2-1B presentó valores de actividad específica mejorados para ABTS mientras sus niveles de secreción se redujeron un 80 % frente al mutante de secreción R4.

Tabla 4.9. Análisis de las mejoras en secreción y actividad específica. Las actividades fueron valoradas en tampón tartrato sódico 100 mM pH 3.5 conteniendo ABTS 2 mM y H₂O₂ 0.1 mM. ¹⁾Actividad total valorada en sobrenadantes de fermentados en matraz. El nivel de secreción se dedujo del cociente entre la actividad total y la actividad específica.

Variante	Actividad total (U/L) ¹	MAT (veces) ¹	Actividad específica (U/mg)	Niveles de secreción (mg/L)	Análisis de mejoras	
					Actividad específica (veces)	Secreción (veces)
VPL2	120 ± 6	1	283	0.42	1	1
R4	15500 ± 150	129	717	21.6	2.5	51.6
2-1B	2120 ± 20	18	562	3.77	2	9
R4DEL	4670 ± 320	39	528	8.84	1.9	20.5

4.9 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

Los parámetros cinéticos del estado estacionario fueron valorados para la oxidación de ABTS, DMP, Mn²⁺ y RB5 (Tabla 4.10). El mutante R4 aumentó ~10 veces su afinidad por el ABTS en el sitio de oxidación de baja eficiencia (el canal de acceso al hemo), a la vez que mejoró su k_{cat} 1.6 veces, lo que se tradujo en una eficiencia catalítica para este sustrato reductor 16 veces superior a la del parental VPL2. Se observaron resultados similares para

el DMP en el sitio de oxidación de baja eficiencia: la K_m disminuyó 5 veces lo que compensó la ligera caída de la k_{cat} (1.7 veces) generando una eficiencia catalítica ~3 veces superior a la del tipo parental VPL2. Para ambos sustratos, ABTS y DMP, las constantes cinéticas para el sitio de oxidación de alta eficiencia (en el triptófano catalítico 164) no se pudieron determinar debido a que la oxidación mejorada de estos sustratos en el sitio de baja eficiencia enmascaró la oxidación en el sitio de alta eficiencia. Por otro lado, no se apreciaron cambios significativos en los parámetros cinéticos para la oxidación del RB5 en el Trp164. Sin embargo, si se observó una disminución de la afinidad por el Mn^{2+} . Aunque su k_{cat} aumentó ligeramente, la eficiencia catalítica para el Mn^{2+} disminuyó ~2.6 veces respecto a la del parental VPL2 (**Tabla 4.10**). Las constantes cinéticas de la variante R4DEL sólo se determinaron para la oxidación de ABTS en el sitio de baja eficiencia y la oxidación de RB5, mostrando valores ligeramente superiores a los del mutante R4 (con eficiencias catalíticas ~1.5 veces superiores a R4, **Tabla 4.10**).

El mutante 2-1B, mostró un comportamiento similar a R4 viéndose incrementada la afinidad por el ABTS y el DMP en el sitio de oxidación de baja eficiencia unas 16 y 13 veces, respectivamente, respecto al parental VPL2. Esto supuso un aumento de la eficiencia catalítica de ~61 y 12 veces para cada compuesto respecto al tipo parental. Las constantes de oxidación para RB5 se mantuvieron similares a las de VPL2. Finalmente, el sitio de oxidación de Mn^{2+} se vio negativamente afectado por el proceso evolutivo, con una disminución en la afinidad de 95 veces. Al igual que en el caso del mutante R4 la k_{cat} aumentó ligeramente (1.8 veces), pero no impidió un descenso de la eficiencia catalítica de ~52 veces respecto al parental VPL2.

Respecto a las cinéticas frente a H_2O_2 , los mutantes R4 y 2-1B presentaron un notable descenso en su afinidad (4 y 16 veces respecto al parental VPL2, **Tabla 4.10, Figura 4.29**). Sin embargo sus valores k_{cat} mejorados compensaron la caída de afinidad mostrando eficiencias catalíticas similares a la del tipo parental. Este efecto implicó que los mutantes evolucionados pudieran operar a concentraciones de H_2O_2 más elevadas con velocidades mejoradas (con k_{cat} expresadas como moléculas de peróxido reducido por molécula de VP por segundo) de $135\ s^{-1}$ para el parental VPL2 a $1720\ s^{-1}$ para 2-1B. De esta forma, R4 y 2-1B funcionaron eficientemente en presencia de elevadas concentraciones de H_2O_2 , mostrando actividades específicas para el ABTS de 3530 y 11300 U/mg, respectivamente, cuando se usaron condiciones saturantes de H_2O_2 (con concentraciones de 2.0 y 7.6 mM de H_2O_2 para R4 y 2-1B, respectivamente). Bajo estas condiciones, la actividad total de oxidación de ABTS del sobrenadante de R4 fue ~74000 U/L, lo que supone el valor más alto descrito en la literatura para cualquier peroxidasa (**Tabla 4.11**).

Tabla 4.10. Constantes cinéticas de estado estacionario para el parental VPL2 y los mutantes R4, 2-1B y R4DEL. K_m (mM), k_{cat} (s^{-1}), k_{cat}/K_m ($mM^{-1} s^{-1}$). Las constantes cinéticas para el H_2O_2 se estimaron empleando ABTS como sustrato reductor bajo condiciones de saturación y teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción (una molécula de H_2O_2 es reducida por la oxidación de dos moléculas de ABTS). N.m.: no medible. N.d.: no determinado.

Compuesto		Parental VPL2	Mutante R4	Mutante 2-1B	Mutante R4DEL
ABTS (Alta eficiencia)	K_m	0.0046 ± 0.0002	n.m.	n.m.	n.m.
	k_{cat}	25.3 ± 0.3	n.m.	n.m.	n.m.
	k_{cat}/K_m	5470 ± 190	n.m.	n.m.	n.m.
ABTS (Baja eficiencia)	K_m	0.54 ± 0.05	0.056 ± 0.003	0.034 ± 0.004	0.05 ± 0.005
	k_{cat}	220 ± 30	365 ± 6	850 ± 40	520 ± 20
	k_{cat}/K_m	410 ± 30	6480 ± 280	25000 ± 2100	9880 ± 620
DMP (Alta eficiencia)	K_m	0.015 ± 0.001	n.m.	n.m.	n.d.
	k_{cat}	12.1 ± 0.2	n.m.	n.m.	n.d.
	k_{cat}/K_m	790 ± 50	n.m.	n.m.	n.d.
DMP (Baja eficiencia)	K_m	32 ± 6	6.5 ± 0.5	2.5 ± 0.2	n.d.
	k_{cat}	98 ± 7	58 ± 1	97 ± 1	n.d.
	k_{cat}/K_m	3.1 ± 0.4	9.1 ± 0.5	39 ± 2	n.d.
RB5	K_m	0.007 ± 0.0007	0.0066 ± 0.0004	0.0055 ± 0.0006	0.0043 ± 0.0004
	k_{cat}	11.8 ± 0.5	10.6 ± 0.2	9.4 ± 0.4	10.5 ± 0.3
	k_{cat}/K_m	1670 ± 100	1600 ± 65	1700 ± 140	2440 ± 170
Mn²⁺	K_m	0.045 ± 0.007	0.12 ± 0.01	4.3 ± 0.3	n.d.
	k_{cat}	54 ± 1	75 ± 1	98 ± 2	n.d.
	k_{cat}/K_m	1190 ± 180	630 ± 50	23 ± 1	n.d.
H₂O₂	K_m	0.051 ± 0.009	0.20 ± 0.02	0.8 ± 0.1	n.d.
	k_{cat}	135 ± 5	490 ± 15	1720 ± 70	n.d.
	k_{cat}/K_m	2650 ± 370	2400 ± 160	2260 ± 305	n.d.

Tabla 4.11. Análisis de actividad en condiciones óptimas de las variantes evolucionadas y nativa.

Variante	Condiciones de reacción		Actividad total (U/L) ¹	Actividad específica (U/mg)
	[ABTS] (mM)	[H ₂ O ₂] (mM)		
VPL2	5.5	0.5	247 ± 5	536
R4	0.6	2	74150 ± 760	3531
2-1B	0.5	7.6	41070 ± 490	11316
R4DEL	0.6	6	22760 ± 150	2555

¹ Actividad total valorada como oxidación de ABTS en el sobrenadante de cultivos en matraz.

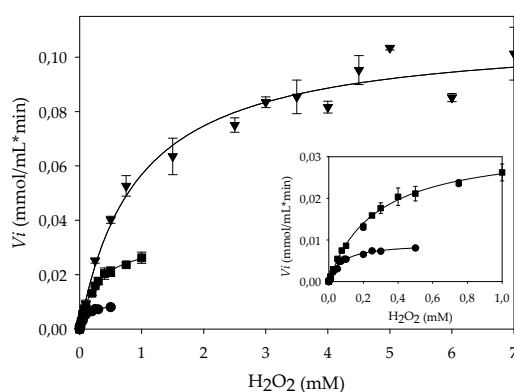


Figura 4.29. Cinéticas para el H₂O₂. Parental VPL2 (●), R4 (■) y 2-1B (▼). Se muestra la media y la desviación estándar de tres medidas independientes. El recuadrado muestra el detalle de las cinéticas a bajas concentraciones de H₂O₂ para el parental VPL2 y el mutante R4.

4.10 DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO DE ACTIVIDAD

Se determinó el pH óptimo para la oxidación de ABTS del parental VPL2 y las variantes finales de evolución R4 y 2-1B, así como de las distintas variantes de deleción VPL2DEL, R4DEL y 2-1BDEL.

El pH óptimo de oxidación de ABTS se vio desplazado en el proceso de evolución artificial. Así, el pH óptimo para el parental VPL2 se desplazó desde 3.0, a 3.5 y 4.0 para los mutantes R4 (4^aG) y 2-1B (6^aG), respectivamente (**Figura 4.30A**). Cuando se analizaron las variantes de deleción se comprobó que la eliminación de la extensión N-terminal no produjo ninguna modificación en los perfiles de pH, mostrando comportamientos similares a los de los productos no truncados correspondientes (**Figura 4.30B**). Se observó que el

mutante 2-1B con o sin extensión N-terminal retuvo aproximadamente un 30 % de su actividad a pH 5.0 mientras que las otras variantes apenas conservaron un 5 % de actividad relativa.

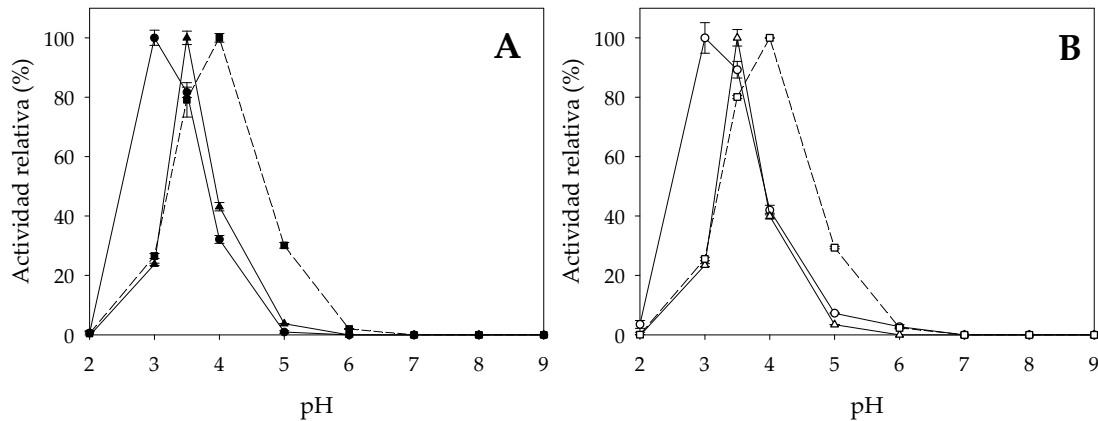


Figura 4.30. Perfil de actividad frente al pH. Perfiles de pH para: A) el parental VPL2 (●) y los mutantes R4 (▲) y 2-1B (■), y B) las variantes de delección VPL2DEL (○), R4DEL (△) y 2-1BDEL (□). La actividad peroxidasa medida con ABTS se relativizó al valor óptimo de actividad presentado por cada variante. Cada punto procede del valor medio de tres experimentos independientes e incluye las desviaciones estándar.

4.11 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD FRENTE AL pH

La estabilidad frente al pH se vio modificada en el proceso de evolución dirigida. Mientras el parental VPL2 retuvo aproximadamente un 80 % de su actividad residual en un intervalo de pH entre 3.5 y 5.0 tras 120 h de incubación, el mutante de secreción R4 conservó el 100 % de su actividad residual en el intervalo de pH 4.0-7.0 (Figura 4.31).

En el caso del mutante de estabilidad 2-1B este efecto se acentuó conservando el 100 % de su actividad residual en el intervalo de pH 4.0-8.0 tras 120 h de incubación. 2-1B conservó hasta un 60 % de su actividad residual tras 120 h de incubación a pH 9.0, donde las actividades residuales del tipo parental o del mutante R4 fueron nulas (Figura 4.31).

Al evaluar las variantes truncadas (VPL2DEL, R4DEL y 2-1BDEL) no se observó que la eliminación de la extensión N-terminal llevara asociada alguna diferencia en la estabilidad frente al pH respecto a las correspondientes variantes no truncadas VPL2, R4 y 2-1B.

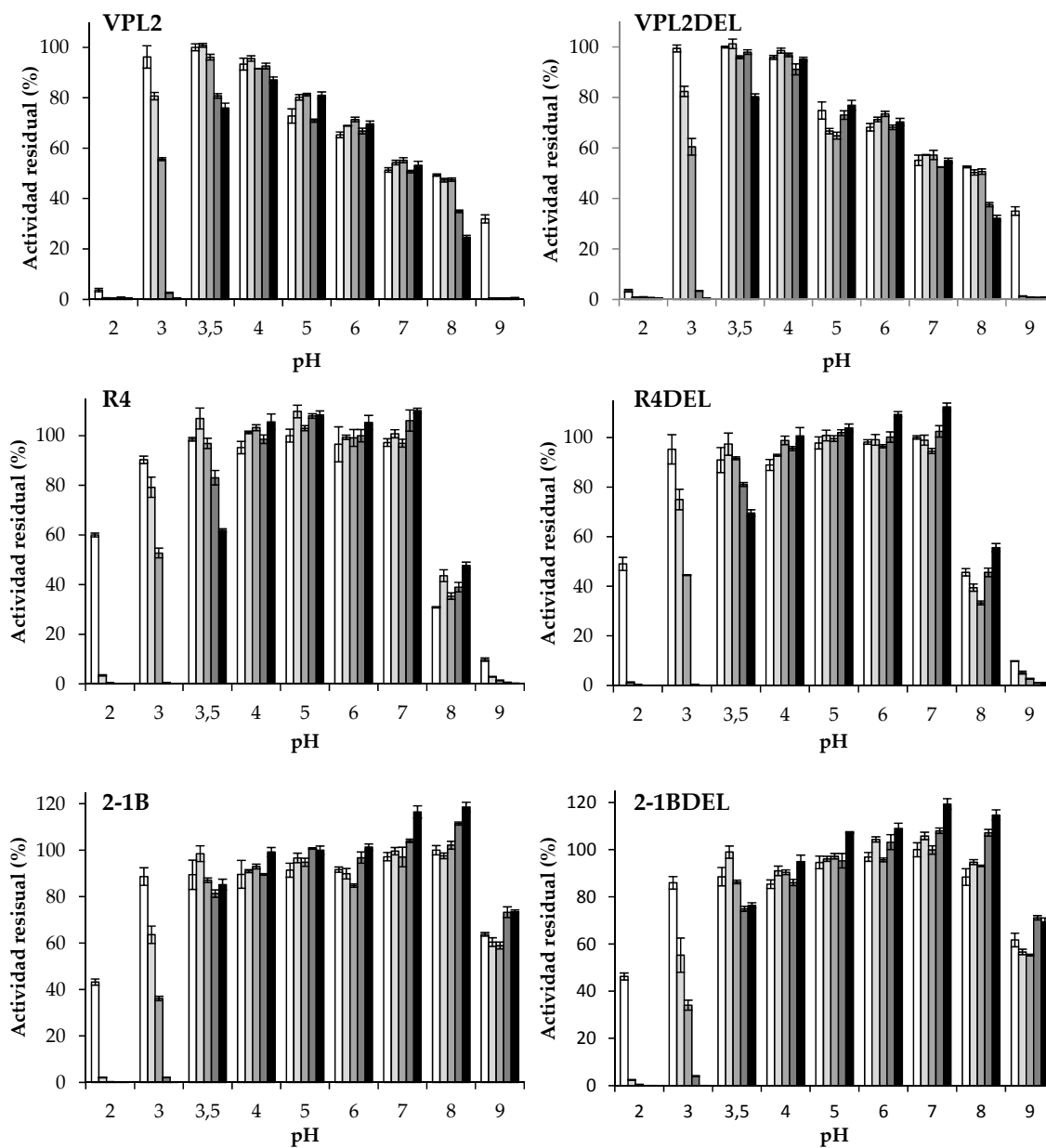


Figura 4.31. Estabilidad frente al pH. Tiempo de incubación 1 min (□), 1 h (▒), 4 h (▓), 25 h (■) y 120 h (■). Para cada variante, las actividades residuales se normalizaron con el valor más alto de actividad detectado frente a los pHs en estudio tras 1 min de incubación. Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes e incluye las desviaciones estándar.

4.12 ESTABILIDAD FRENTE A TEMPERATURA

El estudio de la termoestabilidad cinética del parental VPL2 y sus mutantes evolucionados se abordó mediante el análisis de tres parámetros.

4.12.1 DETERMINACIÓN DE LA T₅₀

Tras 6 ciclos de evolución dirigida, la T₅₀ se incrementó 8°C (con valores de 58.0, 59.4 y 65.9°C para el parental VPL2 y los mutantes R4 y 2-1B, respectivamente (**Figura 4.32A**). Con el fin de determinar si la extensión extra N-terminal tenía algún efecto en la estabilidad térmica, se analizó la T₅₀ en las variantes delecionadas VPL2DEL, R4DEL y 2-1BDEL. Los valores de T₅₀ fueron semejantes a los de las variantes no truncadas (58.0, 59.6, y 65.4°C, para VPL2DEL, R4DEL y 2-1BDEL, respectivamente, **Figura 4.32B**), por lo que se excluyó cualquier posible efecto de la extensión EAEAEF sobre la termoestabilidad de la VP madura.

Es importante destacar que aunque el mutante de secreción R4 se obtuvo a partir de 4 ciclos orientados exclusivamente al incremento de la actividad total de la VP, su T₅₀ fue 1.4°C superior a la del tipo parental VPL2, (**Figura 4.21**, pag 132). Del mismo modo, el mutante 10C3 (mejor variante de la 3ª G y parental empleado en la obtención de R4) ya presentó un incremento de ~2°C (con una T₅₀ de 60.5°C, **Figuras 4.21 y 4.33A**). Se intentó analizar qué mutaciones introducidas para mejorar la secreción/actividad de la VP confirieron mayor termoestabilidad en el mutante de secreción R4. Para ello, se ensayaron las T₅₀ de cuatro variantes intermedias de las generaciones 1 y 2 en las que se pudo evaluar de manera individual las mutaciones que aparecieron combinadas en 10C3 y R4. Las T₅₀ del mutante 11H10 (1ªG, con la mutación T184M) y del mutante 15G9 (1ªG, con la mutación E37K) fueron 2-4°C mayores a la del parental VPL2, lo cual corroboró el efecto estabilizante de las mutaciones T184M y E37K. Asimismo, el valor de T₅₀ del mutante 16E12 (2ªG, con las mutaciones T184M y Q202L) fue 0.6°C superior al de 11H10 demostrando que la mutación Q202L contribuyó a la estabilidad térmica de la VP. Por otro lado, el valor de T₅₀ fue similar entre los mutantes 13G1 (2ªG, con las mutaciones T184M y V160A) y el mutante 11H10 lo cual indicó que la mutación V160A no estuvo involucrada en la estabilidad termal de la VP (**Figura 4.33B**). Cuando se comparó el valor de T₅₀ del mutante 10C3 (3ªG, con las mutaciones E37K, T184M, Q202L y la mutación silenciosa P185P) (60.5°C) con el del mutante R4 (4ªG, con las mutaciones E37K, V160A, T184M, Q202) (59.4°C) se observó una diferencia de 1°C debida a la inclusión de V160A en el mutante R4, mostrando un claro efecto desestabilizante.

Es importante destacar que la mutación H39R (introducida por primera vez en el mutante 4B5, 1ªG) se perdió durante los eventos de recombinación que tuvieron lugar en la

cuarta generación, aunque fue finalmente redescubierta en el ciclo final de estabilidad térmica (apareciendo en el mutante final de termoestabilidad, 2-1B). El valor de T_{50} del mutante 4B5 fue 4°C superior al del parental VPL2, lo que confirmó el importante papel de la mutación H39R en la estabilidad proteica durante el proceso de secreción.

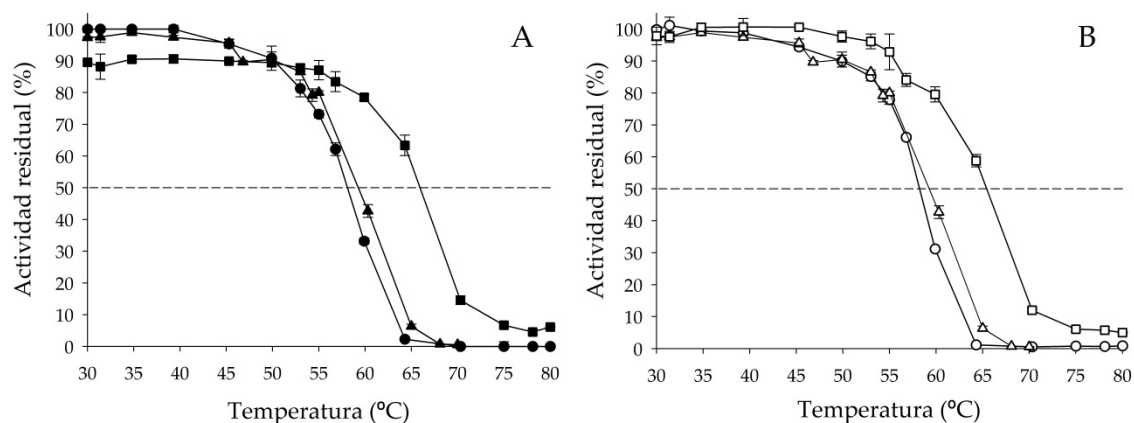


Figura 4.32. Determinación de los valores de T_{50} para las variantes con y sin la extensión N-terminal. A) Perfiles de T_{50} del parental VPL2 (●), R4 (▲) y 2-1B (■). B) Perfiles de T_{50} de VPL2DEL (○), R4DEL (△) y 2-1BDEL (□). Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes e incluye las desviaciones estándar.

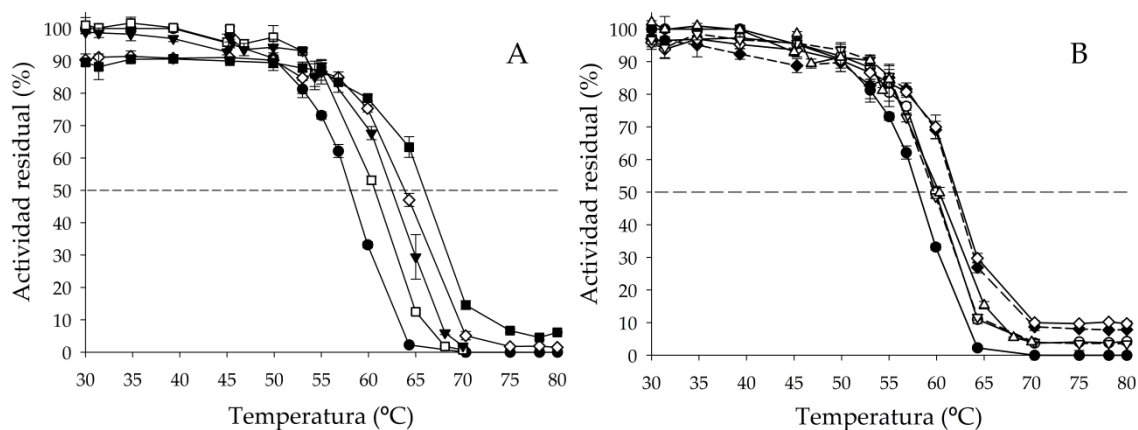


Figura 4.33. Determinación de los valores de T_{50} para los parentales de la evolución hacia termoestabilidad y de las variantes intermedias de la 1ª G y 2ª G. A) Perfiles de T_{50} del parental VPL2 (●) y los parentales de los 3 ciclos de evolución hacia mejora de termoestabilidad: 10C3 (□) (3ªG, parental del primer ciclo hacia mejora de termoestabilidad), 24E10 (4ªG) (▼), 3H9 (5ªG) (◇) y 2-1B (■). B) Perfiles de T_{50} del parental VPL2 (●) y las variantes intermedias 11H10 (1ªG) (○), 15G9 (1ªG) (◆), 4B5 (1ªG) (◇), 16E12 (2ªG) (▽) y 13G1 (2ªG) (△). Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes e incluye las desviaciones estándar.

4.12.2 DETERMINACIÓN DE LA VIDA MEDIA ($t_{1/2}$)

Se valoró la $t_{1/2}$ del parental VPL2 y los mutantes R4 y 2-1B a 70°C. Se observó que mientras que la $t_{1/2}$ del parental fue de 1 min, la mejor variante de termoestabilidad 2-1B mostró una $t_{1/2}$ de ~ 6 minutos. 2-1B retuvo en torno a un 20 % de actividad residual tras 15 min a 70°C mientras que el parental se inactivó tras 3 min de incubación. R4 también resultó ligeramente más estable que VPL2, con una $t_{1/2}$ de 2.5 min (**Figura 4.34A**).

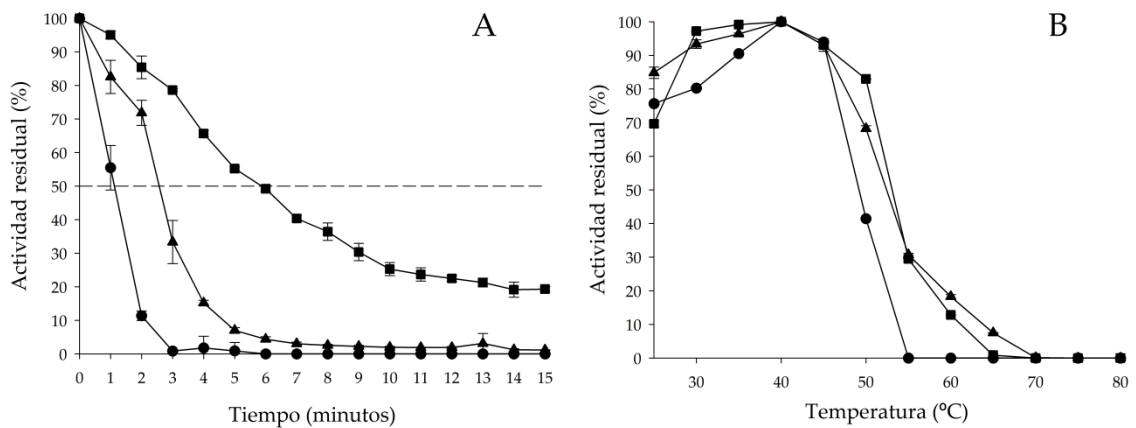


Figura 4.34. Análisis de $t_{1/2}$ frente a temperatura y termoactividad. A) Determinación de $t_{1/2}$. Se muestra la actividad residual del parental VPL2 (●), R4 (▲) y 2-1B (■) a distintos tiempos de incubación a 70°C. B) Termoactividad de VPL2 (●), R4 (▲) y 2-1B (■). Cada punto representa el valor medio de tres experimentos independientes e incluye las desviaciones estándar.

4.12.3 DETERMINACIÓN DE LA TERMOACTIVIDAD (T_a)

La T_a no se vio desplazada durante el proceso de evolución artificial siendo 40°C para el parental VPL2 y las variantes evolucionadas R4 y 2-1B. Sin embargo, sí se apreció una ampliación en el intervalo de temperaturas en el que la VP presentó mayor actividad. Este efecto fue especialmente notable para la variante de termoestabilidad 2-1B, la cual retuvo por encima del 80 % de su actividad en el intervalo de 30 a 50°C mientras que el parental VPL2 lo mostró en el intervalo de 30 a 45°C (**Figura 4.34B**).

5 DISCUSIÓN

5.1 EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA VP DE *P. eryngii* EN *S. cerevisiae*

5.1.1 CONSTRUCCIÓN DE $\alpha vpl2$

De manera general, la expresión funcional de genes en sistemas heterólogos es un requisito esencial para llevar a cabo experimentos de evolución dirigida.

Aunque han sido muchos los esfuerzos realizados para conseguir la expresión funcional de peroxidasas ligninolíticas en hospedadores heterólogos, los resultados han sido bastante modestos. En algunos casos no se ha logrado detectar niveles mínimos de expresión funcional y cuando se han obtenido las actividades detectadas han sido muy bajas (de Weert, S *et al.*, 2010). En vista de la dificultad que supone la expresión funcional heteróloga de peroxidasas y en concreto de la VP de *P. eryngii* (Eibes, GM *et al.*, 2009; Lu-Chau, TA *et al.*, 2004; Pérez-Boada, M *et al.*, 2002; Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 1999a), en la presente Tesis Doctoral se planteó su expresión funcional en *S. cerevisiae* (hospedador apropiado para evolucionar enzimas de origen eucariota) mediante el remplazamiento de la secuencia señal nativa de la VP por una secuencia señal que favoreciera los procesos de translocación al RE y el posterior procesamiento correcto en el aparato de Golgi. En este sentido, la secuencia del prepro-líder del factor α de *S. cerevisiae* ha sido utilizada con éxito en las últimas décadas para la expresión heteróloga de diferentes proteínas en levaduras (Abdelmoula-Souissi, S *et al.*, 2007; Brake, AJ *et al.*, 1984; Brake, AJ, 1989; Bulter, T *et al.*, 2003a; Maté, D *et al.*, 2010). En base a esta información, se diseñó el gen de fusión $\alpha vpl2$ formado por la secuencia de la VP madura (isoforma *vpl2*) y la secuencia señal (prepro-líder) del factor α de *S. cerevisiae*. Esta construcción favoreció la secreción de la VP al medio extracelular. Los niveles iniciales de secreción de VP en matraz aunque detectables y cuantificables, fueron bajos (~1.2 U/L) por lo que requirieron de una optimización previa al comienzo del protocolo evolutivo.

5.1.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPRESIÓN DE LA VP

Como se ha mencionado, la construcción $\alpha vpl2$ permitió la secreción de VP al medio extracelular en cultivos en matraz. Sin embargo, se observó una notable disminución de la actividad VP cuando se trasladó la fermentación a formato *HTP* (placas de 96 pocillos, necesarias para llevar a cabo las microfermentaciones de los experimentos de evolución dirigida). Este efecto se debió a una disminución del crecimiento de la levadura debido a las limitaciones derivadas de este formato (falta de aireación y agitación limitada).

Con el fin de conseguir niveles aceptables de actividad peroxidasa en el sobrenadante de los microcultivos, se optimizaron las condiciones de expresión de VP en placas de 96 pocillos.

Se conoce que el grupo hemo desempeña un papel muy importante en el metabolismo de la levadura ya que está presente como cofactor en múltiples proteínas de su metabolismo. La levadura, en ausencia de hierro o hemo es capaz de priorizar sus necesidades de manera que, bajo condiciones limitantes de hierro, únicamente serán sintetizadas las hemoproteínas esenciales, como las P450 monooxigenasas de la cadena de transporte electrónico (Kaplan, J *et al.*, 2006). Por este motivo, la levadura no favorece la síntesis de hemoproteínas expresadas heterológamente en grandes cantidades que no sean básicas para su supervivencia. Sin embargo, la incorporación del grupo hemo es fundamental para la producción heteróloga y funcional de peroxidosas en levaduras. Para evitar los problemas derivados de la baja eficiencia de la maquinaria biosintética de porfirinas (incapaz de sintetizar suficiente grupo hemo como para secretar peroxidosas en cantidades detectables) o por la escasez de hierro o hemo en el medio (Conesa, A *et al.*, 2000; de Weert, S *et al.*, 2010; Punt, PJ *et al.*, 2002), se decidió suplementar el medio de inducción con una fuente exógena de grupo hemo.

Se ha descrito que la sobreexpresión de las dos primeras enzimas de la ruta de síntesis de porfirinas aumenta 4 veces la producción de la peroxidasa de *C. cinera* en *A. oryzae* (Elrod, SL *et al.*, 1997). Además, la síntesis de δ -ALA, precursor en la ruta de síntesis de porfirinas, es un paso limitante (Fernández-Cuartero, B, 1994; Gardner, LC *et al.*, 1991). Así pues, se decidió emplear el δ -ALA como suplemento al medio de inducción ya que además había sido anteriormente utilizado con éxito en experimentos de evolución dirigida de la citocromo P450 monooxigenasa BM-3 de *Bacillus megaterium* y otras hemoproteínas (Farinas, ET *et al.*, 2001). Sin embargo, en nuestro caso, su inclusión no supuso un aumento de la secreción, es más, en matraz se observó una ralentización de la expresión y en microplaca no se consiguió observar actividad peroxidasa en los tiempos ensayados.

Por otro lado, se ha estudiado en hongos la existencia de un complejo sistema de captación de hierro en ambientes con bajas concentraciones de éste, siendo capaces de obtener hierro de distintas fuentes como transferrina y hemoglobina. En concreto, se han descrito en *Candida albicans* receptores de superficie para la hemoglobina que ayudan a interiorizar el hemo como molécula intacta (Philpott, CC, 2006). Por este motivo se decidió probar la hemina y la hemoglobina como fuente exógena de hemo. La hemina se había empleado con éxito anteriormente para la expresión heteróloga de peroxidosas fúngicas en *Aspergillus* sp. (Conesa, A *et al.*, 2000; Lu-Chau, TA *et al.*, 2004), así como la hemoglobina (Conesa, A *et al.*, 2000). Tanto la hemina como la hemoglobina favorecieron la secreción de VP activa al medio extracelular. Sin embargo, la hemina se descartó para realizar los

experimentos de evolución porque interfería con el protocolo *HTP* diseñado ya que la que no era consumida por la levadura precipitaba al pH del tampón empleado en el ensayo de actividad. Finalmente, se eligió hemoglobina (100 mg/L) como fuente exógena de grupo hemo ya que no interfería con el ensayo de *screening* y permitía la secreción de VP en microcultivos con valores de actividad detectables.

La adición de etanol (2.5 % v/v) al medio de inducción provocó un aumento de la secreción de 1.2 veces, posiblemente debido a que el etanol aumenta la fluidez de la membrana citoplasmática incrementando su permeabilidad (Marza, E *et al.*, 2002). También se ha descrito que el etanol genera una respuesta a estrés semejante a la producida por la temperatura (Piper, PW, 1995) promoviendo un cambio en el balance redox de la célula que es especialmente importante en el proceso de plegamiento de proteínas en el RE. En concreto, se ha sugerido que la eficiencia de plegamiento en el RE dependiente del balance redox puede verse aumentada en cultivos suplementados con etanol (van de Laar, T *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando la concentración de etanol es superior al 4-6 % (v/v) disminuye la velocidad de crecimiento y la viabilidad celular, se inhibe el transporte de nutrientes, se reduce la actividad metabólica e incluso puede conducir a la muerte celular (Canetta, E *et al.*, 2006). Esto explicaría el estacionamiento del crecimiento de la levadura observado en nuestro caso cuando se añadió un 5 % de etanol al medio de inducción.

Por otro lado, se probó a añadir Ca^{2+} (en forma de cloruro cálcico) al medio de inducción ya que la VP contiene 2 iones calcio en su estructura que son indispensables para el correcto plegamiento y funcionamiento de la enzima. En principio, la adición de Ca^{2+} no supuso un aumento de secreción, aunque cuando se añadió conjuntamente con el etanol se produjo un aumento de la expresión de 1.4 veces, rendimiento ligeramente superior al obtenido añadiendo únicamente etanol (1.2 veces). En *S. cerevisiae* el flujo de Ca^{2+} al interior celular está controlado por el sistema HACS (*High-Affinity Ca^{2+} influx System*, compuesto por tres proteínas que forman un canal en la membrana celular). Dicho sistema favorece la entrada de Ca^{2+} como respuesta al stress en el RE permitiendo la supervivencia celular durante largos períodos (Bonilla, M *et al.*, 2001; Bonilla, M *et al.*, 2003; Cunningham, KW, 2011; Ton, VK *et al.*, 2004). Posiblemente, una mayor concentración de Ca^{2+} en el medio de expresión beneficie el funcionamiento del sistema HACS compensando los efectos estresantes del etanol de manera que la secreción final de la VP se vea incrementada.

Aunque la máxima secreción de VP al medio extracelular se consiguió añadiendo hemoglobina, Ca^{2+} y etanol, finalmente durante los experimentos de evolución dirigida el medio de inducción se suplementó únicamente con hemoglobina 100 mg/L porque permitía la secreción de VP en cantidades cuantificables en formato *HTP* al tiempo que se disminuía la complejidad del medio, evitando así posibles interferencias durante el ensayo de *screening*. Además, se observó que la adición de etanol ralentizaba el crecimiento de la

levadura, lo que podía conllevar la pérdida de plásmido tras la inducción en medio no selectivo.

Por último, se determinó que 20°C era la temperatura óptima de incubación para la producción del parental VPL2, donde se detectaron mayores niveles de expresión. Se había descrito anteriormente un aumento de la expresión de la VP en *Aspergillus* sp. al disminuir la temperatura de incubación por debajo de 30°C (Eibes, GM *et al.*, 2009). No obstante, para la expresión de las variantes evolucionadas la temperatura óptima de expresión fue de 30°C. Esto puede deberse a que durante los experimentos de evolución dirigida la temperatura de incubación fue de 30°C y se fueron seleccionando aquellas variantes que se secretaban y fueran más estables a dicha temperatura.

5.1.3 DISEÑO DEL ENSAYO DE SCREENING DE ACTIVIDAD Y TERMOESTABILIDAD

Además de disponer de un sistema de expresión funcional, el segundo requisito necesario para llevar a cabo experimentos de evolución dirigida es diseñar un sistema de exploración sensible y reproducible que permita detectar pequeñas variaciones en la función o propiedad deseada. En este sentido, se decidió valorar la presencia extracelular de VP midiendo su actividad mediante un ensayo colorimétrico que no interfiriera con el contenido del sobrenadante celular. Para ello, se evaluaron varios sustratos típicos de la VP. El ABTS fue el compuesto seleccionado para desarrollar el protocolo *HTPS* debido a: i) su sensibilidad, que se ha estimado en torno a ~ 5 nU/mL; ii) el radical catiónico formado de color verde es estable durante varias horas (Bulter, T *et al.*, 2003b); iii) la baja interferencia mostrada con los componentes del sobrenadante celular bajo las condiciones estipuladas, y iv) el ABTS es oxidado en dos de los tres sitios de oxidación que presenta la VP, lo que *a priori* garantizaría la conservación o mejora de varios de los centros activos de la enzima durante el proceso evolutivo. El protocolo fue ajustado para que fuera reproducible y fiable de manera que la respuesta del ensayo mostró una relación lineal con la cantidad de sobrenadante de microcultivo y el CV fue de 13 %, lo que se considera aceptable para evaluar librerías mutagénicas en experimentos de evolución dirigida (Arnold, FH *et al.*, 2003a).

Por otro lado, se sabe que la falta de estabilidad de un biocatalizador es uno de los principales obstáculos para su implantación en distintos procesos industriales (Eijsink, VGH *et al.*, 2005; Gumulya, Y *et al.*, 2011; Polizzi, KM *et al.*, 2007). Por este motivo, una vez mejorados los niveles de secreción mediante ciclos iterativos de evolución molecular, se decidió aumentar la termoestabilidad de la VP mediante nuevos ciclos de evolución artificial. Para ello fue necesario diseñar un protocolo de *screening* que permitiera detectar mejoras en la termoestabilidad cinética de los mutantes de cada ciclo. La presión selectiva

(definida en este caso como la temperatura a la que se incubaron los sobrenadantes de las librerías de mutantes) fue incrementada generación tras generación con la finalidad de impulsar el proceso evolutivo hacia la obtención de variantes más termorresistentes. El aumentar la presión selectiva representa una vía adecuada para diseñar enzimas en el laboratorio. En particular, enfoques parecidos han sido llevados a cabo en nuestro laboratorio y por otros grupos para evolucionar enzimas resistentes a diversos factores (como la presencia de disolventes orgánicos, aumentando la concentración de estos generación tras generación) (Chen, KQ *et al.*, 1993; Zumárraga, M *et al.*, 2007). Finalmente, la incorporación de varios *re-screenings* permitió confirmar y descartar la presencia de falsos positivos, añadiendo mayor fiabilidad al protocolo evolutivo.

5.2 EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE LA VP

En el proceso de evolución dirigida de la VP se exploraron alrededor de 9000 clones en seis generaciones con el fin de mejorar la expresión funcional y la termoestabilidad (Tabla 5.1). De manera general, la secuencia *αvpl2* fue sometida a distintas técnicas evolutivas de creación de diversidad genética de forma que la aparición de mutaciones y/o recombinaciones pudiera producirse tanto en la secuencia de la VP madura como en el prepro-líder del factor α . Las mutaciones introducidas en la secuencia del prepro-líder del factor α facilitarían el tránsito del polipéptido en formación a través de los compartimentos celulares (RE y Golgi) y su procesado favoreciendo la secreción de VP madura y funcional al medio extracelular. De la misma manera, las mutaciones en la secuencia de la VP madura podrían modificar los distintos bolsillos y regiones catalíticas y aumentar su actividad o influir en el plegamiento y por ende en la secreción.

La generación de diversidad genética se llevó a cabo mediante el empleo de técnicas de mutagénesis aleatoria y recombinación de DNA tanto *in vitro* como *in vivo*. Alternar y combinar estas estrategias permitió aumentar considerablemente la velocidad del proceso de evolución promoviendo la acumulación de mutaciones beneficiosas que fueron apareciendo en cada ciclo de manera independiente, a la vez que se eliminaban aquellas mutaciones neutras o deletéreas. Es importante señalar que la tasa mutacional en estrecha sinergia con las estrategias de recombinación de DNA empleadas fueron meticulosamente ajustadas para generar aproximadamente la selección de una mutación beneficiosa por ciclo evolutivo (por ejemplo, el mutante de secreción R4 acumuló 4 mutaciones tras 4 generaciones de evolución). En este sentido, la recombinación *in vivo* tuvo un importante papel en el proceso de evolución de la VP, ya que la elevada tasa de recombinación (con un grado de homología de al menos el 70 %) junto con el mecanismo de reparación de huecos (*in vivo gap-repair*) de *S. cerevisiae* facilitó la selección y recombinación de las mejores

mutaciones de los diferentes parentales en cada ciclo. Adicionalmente, esta técnica se empleó de manera rutinaria para regenerar el plásmido circular de replicación autónoma, para lo que se diseñaron unas extensiones de unas 40-50 pb en los extremos de la secuencia *αvpl2* mutada (sin alterar su marco de lectura abierto) que solaparan con los extremos del plásmido linearizado.

En cuanto a las técnicas de mutagénesis aleatoria, las condiciones de PCR mutagénica fueron ajustadas para introducir de forma general de 1 a 4 mutaciones por gen. Por otro lado, a lo largo de la evolución se emplearon dos polimerasas (*Taq* polimerasa y *MutazymeII*) con distinto espectro mutacional para compensar la tendencia nucleotídica de cada una de ellas permitiendo el acceso a una mayor porción del espacio proteico.

En el primer ciclo de evolución se empleó la *Taq* polimerasa para introducir mutaciones induciéndola a cometer error mediante la adición de $MnCl_2$ y utilizando muy bajas concentraciones de DNA molde. Las variantes analizadas presentaron entre 1 y 3 cambios aminoacídicos por proteína de fusión.

En el segundo y tercer ciclo, las mejores variantes de cada generación se amplificaron y mutaron con la misma técnica empleada en la 1ªG y se recombinaron en la levadura (*in vivo* DNA shuffling) para, como se ha comentado anteriormente, promover la acumulación de mutaciones beneficiosas. Las variantes analizadas además de mostrar una combinación de mutaciones de varios parentales también presentaron nuevas mutaciones (1 a 2 cambios aminoacídicos).

En el cuarto ciclo se decidió cambiar la estrategia de recombinación: las mejores variantes de la tercera generación se recombinaron *in vitro* mediante la técnica de *StEP* mutagénico (Zhao, H *et al.*, 1998) haciendo uso de polimerasas deficientes en actividad exonucleasa reparadora 3'→5' para favorecer la introducción de mutaciones aleatorias al tiempo que se completaba la recombinación de los diferentes parentales (Arnold, FH *et al.*, 2003b). Adicionalmente, esta técnica se combinó con la recombinación *in vivo* en la levadura de los productos amplificados por *StEP* para aumentar la complejidad de la genoteca y, por tanto, la riqueza en los posibles eventos de entrecruzamiento. Las variantes analizadas mostraron una combinación óptima de las mutaciones de los parentales además de aparecer nuevas mutaciones. Concretamente, en este ciclo se obtuvo la mejor variante de expresión funcional (R4) que presentó 4 mutaciones (E37K, V160A, T184M, Q202L) procedentes de la recombinación de los correspondientes parentales. Paralelamente, se descubrió una variante de estabilidad térmica (24E10) que mostró las mismas mutaciones que la variante de secreción más una nueva mutación (G330R), introducida gracias al *StEP* mutagénico, que le aportó termoestabilidad (su T_{50} aumentó ~2°C). El empleo del *StEP* mutagénico junto con *in vivo* DNA shuffling en un único paso evolutivo permitió al mutante 24E10 aumentar su termoestabilidad cinética sin que su actividad total se viera mermada, **Figura 4.14**, pag 123.

Ciclo evolutivo		1G				2G				3G					4G		5G		6G
Mutación		11 H 10	15 G 9	4 B 5	4 B 1	16 E 12	19 C 2	20 D 1	13 G 1	10 C 3	6 B 1	13 E 4	6 E 7	11 F 3	R 4	24 E 10	3 H 9	15 B 4	2-1 B
Aminoácido	Codón																		
I(α6)T	ATT/ACT							*						○					
L(α11)S	TTA/TCA												*						
<u>F(α12)F</u>	TTC ₁₈ /TTT ₂₆											*							
<u>A(α19)A</u>	GCT ₂₁ /GCC ₁₂				*				○										
E(α27)G	GAA/GGA					*													
E(α45)K	GAA/AAA											*							
V(α50)A	GTT/GCT			*				○						○					
<u>P(α54)P</u>	CCA ₁₈ /CCT ₁₃													*					
E37K	GAG/AAG		*				○			○	○	○	○		○	○	○	○	○
H39R	CAC/CGC			*				○						○					*
V160A	GTC/GCC				*				○			○			○	○	○	○	○
T184M	ACG/ATG	*				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<u>P185P</u>	CCA ₁₈ /CCG ₅									*									
Q202L	CAA/CTA					*				○	○		○	○	○	○	○	○	○
L207P	CTC/CCC											*							
D213A	GAC/GCC																*		○
<u>I278I</u>	ATT ₃₀ /ATC ₁₇			*															
T284I	ACC/ATC																		*
A308T	GCC/ACC																		*
<u>D318D</u>	GAC ₂₀ /GAT ₃₈						*				○								
S324T	TCC/ACC				*														
G330R	GGA/AGA															*	○	○	○
MAT (veces) ¹		9	7.4	6.3	3.6	41.2	35	33.9	28.4	129	127	121	118	97	238	138	109	164	84
T ₅₀ (°C)		59.9	61.9	62.1	nd	60.5	Nd	nd	59.6	60.5	nd	nd	nd	nd	59.4	62.7	63.9	62.4	65.9

Tabla 5.1. Mutaciones del proceso de evolución dirigida de la VP. ¹ MAT, mejoras de actividad total (en veces) respecto del parental VPL2. *, mutación nueva; ○, mutación acumulada; subrayadas las mutaciones silenciosas; en subíndice el uso de codones de *S. cerevisiae*.

En la quinta generación se hizo uso de la técnica IvAM para combinar *in vivo* dos genotecas obtenidas con dos polimerasas con distinta tendencia mutagénica, *Taq/MnCl₂* y *Mutazyme II*. Finalmente, para el sexto ciclo se recurrió a la mutagénesis aleatoria a través de *Taq/MnCl₂* e *in vivo* DNA *shuffling*. En este caso, se obtuvo la variante final de termoestabilidad (mutante 2-1B) que presentó una mutación nueva (H39R) que se había perdido durante los eventos de recombinación de la cuarta generación y que fue re-descubierta en este último ciclo. La **Tabla 5.1** resume y complementa la **Figura 4.21**, pag 132, recogiendo el proceso evolutivo completo y detallando los cambios aminoacídicos y nucleotídicos así como el uso de codones para las mutaciones silenciosas.

5.2.1 EVOLUCIÓN DIRIGIDA HACIA EXPRESIÓN FUNCIONAL

Los cuatro primeros ciclos de evolución molecular fueron orientados a aumentar la expresión funcional de VP en *S. cerevisiae*. Finalmente, se obtuvo la variante R4, que mostró una mejora en actividad total (en fermentados en matraz), respecto del parental original VPL2, de 129 veces (**Tabla 4.9**). Un análisis en detalle determinó que la actividad específica para el ABTS se incrementó en 2.5 veces respecto de la nativa mientras que la expresión funcional aumentó unas 52 veces alcanzando niveles de secreción de 21.6 mg/L, los más altos descritos hasta la fecha para la expresión heteróloga de una peroxidasa versátil (**Tabla 4.9**, pag 140). Unos niveles similares (21 mg/mL) fueron reportados para la expresión homóloga de la peroxidasa versátil MnP2 de *P. ostreatus* (Tsukihara, T *et al.*, 2006). También se han descrito niveles de hasta 100 mg/L para la expresión heteróloga de otras enzimas ligninolíticas (MnP de *P. chrysosporium*) en *Aspergillus* sp. (Conesa, A *et al.*, 2000). Los niveles obtenidos para R4 fueron suficientemente elevados para poder desarrollar cómodamente nuevos estudios de evolución dirigida hacia mejora de otras propiedades y constituyen de manera general una plataforma evolutiva idónea para el diseño de VP mejoradas. Es importante resaltar que ni las expresiones homólogas o las expresiones heterólogas en hongos filamentosos son adecuadas para afrontar experimentos de evolución molecular dirigida debido a la dificultad que supone la manipulación genética de estos hospedadores (ausencia de vectores episómicos que permitan la recuperación del gen mejorado, integración de varias copias del gen en el genoma, etc.) y el desarrollo de *screenings* de alto rendimiento (HTP).

Cabría esperar que las mejoras de expresión se debieran a mutaciones introducidas en el prepro-líder del factor α , de hecho, en esta fase del estudio aparecieron mutaciones tanto en la secuencia del péptido señal (hasta nueve mutaciones, cinco en el pre-líder y cuatro en el pro-líder) como en la de la VP madura. Sin embargo, las mutaciones en el péptido señal no se conservaron por lo que no se incluyeron en la variante final de secreción (mutante R4). A pesar de ello, el prepro-líder del factor α nativo (sin mutaciones)

permitió la secreción en altas concentraciones de R4. En cualquier caso, no se debe descartar que la inclusión de estas u otras mutaciones en el prepro-líder del mutante R4 a través de técnicas de mutagénesis dirigida convencional pudieran conferir mayores niveles de secreción. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio y en otros grupos de investigación indican que la evolución dirigida del prepro-líder del factor α puede conferir mejoras de hasta 10 veces en los niveles de secreción de otras enzimas ligninolíticas (lacasas de alto potencial redox) así como en anticuerpos y otras proteínas (Camarero, S *et al.*, 2012; Maté, D *et al.*, 2010; Rakestraw, JA *et al.*, 2009).

Merece la pena enfatizar que las estrategias de generación de diversidad genética empleadas durante esta primera etapa del proceso evolutivo, al generar una media de un cambio aminoacídico por ciclo, permitieron identificar el papel de cada mutación en las propiedades de la enzima. La variante de expresión R4 presentó únicamente cuatro mutaciones, E37K, V160A, T184M y Q202L. Estas mutaciones aparecieron de forma individual en la primera generación (E37K, V160A, T184M) y en la segunda (Q202L) y mediante la estrategia adoptada en esta fase se fueron recombinaron hasta generar la variante R4 (**Figura 4.21**, pag 132 y **Tabla 5.1**, pag 157). Estas cuatro mutaciones fueron las responsables del incremento en la expresión funcional y actividad específica frente a ABTS proporcionando una plataforma adecuada sobre la que sustentar la evolución hacia termoestabilidad.

5.2.2 EVOLUCIÓN DIRIGIDA HACIA TERMOESTABILIDAD

Una vez se obtuvo una variante que exhibiese niveles elevados de expresión funcional se decidió mejorar la enzima para que fuese más estable a elevadas temperaturas. Para ello, se llevaron a cabo tres ciclos de evolución, para los que se diseñaron protocolos específicos de detección de termoestabilidad que permitieron el aumento de la presión selectiva en cada ciclo de 60°C en la 4ª G a 80°C y 90°C en la 5ª y 6ª G, respectivamente.

En esta etapa no se observaron nuevas mutaciones en el péptido señal en las variantes secuenciadas posiblemente porque solo se valoraron aumentos en estabilidad térmica lo cual indica que el protocolo de *screening* estaba adecuadamente diseñado y ayudó a evitar la presencia de falsos positivos debido a aumentos de secreción de VP en el medio.

El análisis de los parámetros T_{50} , $t_{1/2}$ y T_a confirmó la estabilidad mejorada de la variante definitiva (mutante 2-1B), seleccionada en el sexto ciclo de evolución. Tras la determinación de las termoestabilidades de varios mutantes intermedios, se apreció que la T_{50} aumentó hasta 6°C durante los tres ciclos de evolución hacia estabilidad, una media de 2°C por ciclo. Asimismo, se detectó un aumento en la T_{50} de hasta 2°C durante los 4

primeros ciclos de evolución (orientados a mejorar la secreción y actividad), lo cual supone una mejora neta de 8°C en la termoestabilidad cinética del mutante 2-1B frente al parental VPL2. El encontrar mutaciones de estabilidad (T184M, E37K, H39R) durante las generaciones orientadas a la secreción nos lleva a pensar que *a priori* dichos cambios aminoacídicos pudieran influir positivamente en la exocitosis así como en estabilidad de las VP secretadas.

Un dato que valida dicha hipótesis es la pérdida y recuperación de la mutación H39R. Dicha mutación fue introducida en la 1ªG destinada a detectar mejoras en secreción (el mutante 4B5, presentó además un aumento de T_{50} de 4°C). Desafortunadamente, la mutación H39R se perdió durante los eventos de recombinación de la 4ªG. Sin embargo, cuando se evolucionó hacia termoestabilidad con mayores presiones selectivas fue finalmente re-descubierta (sexto ciclo) proporcionando un incremento de 2°C en la T_{50} para el mutante final 2-1B (**Figura 4.21**, pag 132).

Nuestros resultados contrastan con el hecho de que las mutaciones que favorecen la actividad suelen conferir cierta flexibilidad a la estructura proteica lo que conlleva una pérdida de estabilidad, de la misma manera que las mutaciones que otorgan estabilidad suelen tener un efecto negativo sobre la actividad al incrementar la rigidez estructural de la enzima (Bloom, JD *et al.*, 2009; Romero, PA *et al.*, 2009). En este caso no sucede así, ya que R4 y 2-1B, siendo claramente más activas que el parental (su eficiencia catalítica frente a la mayoría de sustratos probados es mayor o igual que la de VPL2, **Tabla 4.10**, pag 142), demuestran ser más estables que ésta. Sin embargo, el proceso de evolución hacia estabilidad no ha sido gratuito, si bien no ha causado efectos negativos en la actividad si lo ha hecho en la secreción que de manera global se vio drásticamente disminuida pasando de 21.6 mg/L en R4 a 3.77 mg/L en 2-1B, aunque todavía mostrando niveles de secreción notablemente superiores a los de la enzima parental VPL2 (0.42 mg/L).

5.3 ANÁLISIS DE LA EXTENSIÓN N-TERMINAL

El factor α es una feromona de 13 aminoácidos secretada por células haploides de *S. cerevisiae* durante la reproducción sexual para favorecer la formación de diploides. El factor α es producido como un precursor inmaduro de 165 aminoácidos que contiene una secuencia señal (prepro-líder) de 83 aminoácidos seguido de cuatro copias de la feromona factor α madura, estas copias están flanqueadas por unas secuencias espaciadoras de 6-8 aminoácidos (Lys-Arg-[Glu/Asp-Ala]₂₋₃) (Brake, AJ *et al.*, 1984; Zsebo, KM *et al.*, 1986). El prepro-líder del factor α ha sido habitualmente utilizado para facilitar la secreción de proteínas heterólogas en diferentes organismos como *S. cerevisiae*, *P. pastoris* y *Schizosaccharomyces pombe* (Rakestraw, JA *et al.*, 2009; Shuster, JR, 1991). Este prepro-líder

contiene una pre-región de 19 aminoácidos seguido de una pro-región de 64 aminoácidos con tres sitios de N-glicosilación. El pre-líder interviene en la translocación del polipéptido en formación al RE donde es escindido (entre los aminoácidos 19 y 20) por la acción de una endopeptidasa (peptidasa señal) localizada en la membrana del RE. Es en el RE cuando se añade un pequeño oligosacárido (núcleo, Man₅GlcNac₂ (Mañas Nuñez, PI, 1997)) a los residuos de Asn tras lo que el polipéptido es dirigido al aparato de Golgi donde se adicionan residuos de manosa al núcleo constituyendo la cadena externa del oligosacárido. Al pro-líder del factor α se le han atribuido distintas funciones como su papel en el direccionamiento del polipéptido hacia vacuolas (para ser degradado por proteasas) o hacia vesículas secretoras (para ser secretado al espacio periplásmico o al medio extracelular) (Rakestraw, JA et al., 2009). Además, se piensa que puede tener actividad chaperona interviniendo en el correcto plegamiento del polipéptido. En el Golgi tardío el pro-líder es procesado por la acción de tres proteasas: KEX2, STE13 y KEX1. KEX2 es una aminopeptidasa dibásica de membrana que reconoce la secuencia (Lys-Arg) y corta en su extremo carboxilo. Posteriormente, actúa la dipeptidil aminopeptidasa de membrana STE13 que procesa los pares (Glu/Asp-Ala) del extremo N-terminal del polipéptido. Finalmente, la serin proteasa KEX1 escinde las Lys y Arg del extremo C-terminal, paso esencial para la maduración adecuada de los tándems de factor α , aunque no es necesario en los casos de expresión heteróloga de proteínas fusionadas al prepro-líder del factor α (Brake, AJ et al., 1984; Cooper, A et al., 1989; Daly, R et al., 2005; Rakestraw, JA et al., 2009; Shuster, JR, 1991) (Figura 5.1 y 5.2).

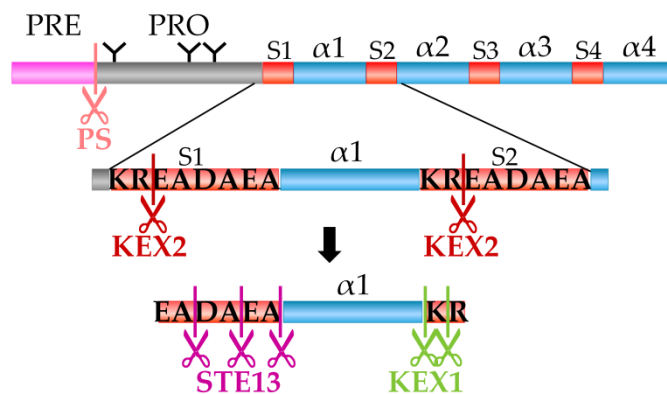


Figura 5.1. Estructura y procesamiento del prepro-líder del factor α . Esquema del factor α inmaduro constituido por el prepro-líder y 4 copias de la secuencia del factor α maduro con sus secuencias espaciadoras correspondientes. Se muestra los sitios de procesamiento proteolítico (PS, peptidasa señal; KEX2; STE13 y KEX1) y los tres sitios de N-glicosilación del pro-líder. PRE, pre-líder en rosa; PRO, pro-líder en gris; en azul se muestran las 4 copias del factor α maduro ($\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha3$ y $\alpha4$); en rojo se muestran las secuencias espaciadoras (S1, S2, S3 y S4).

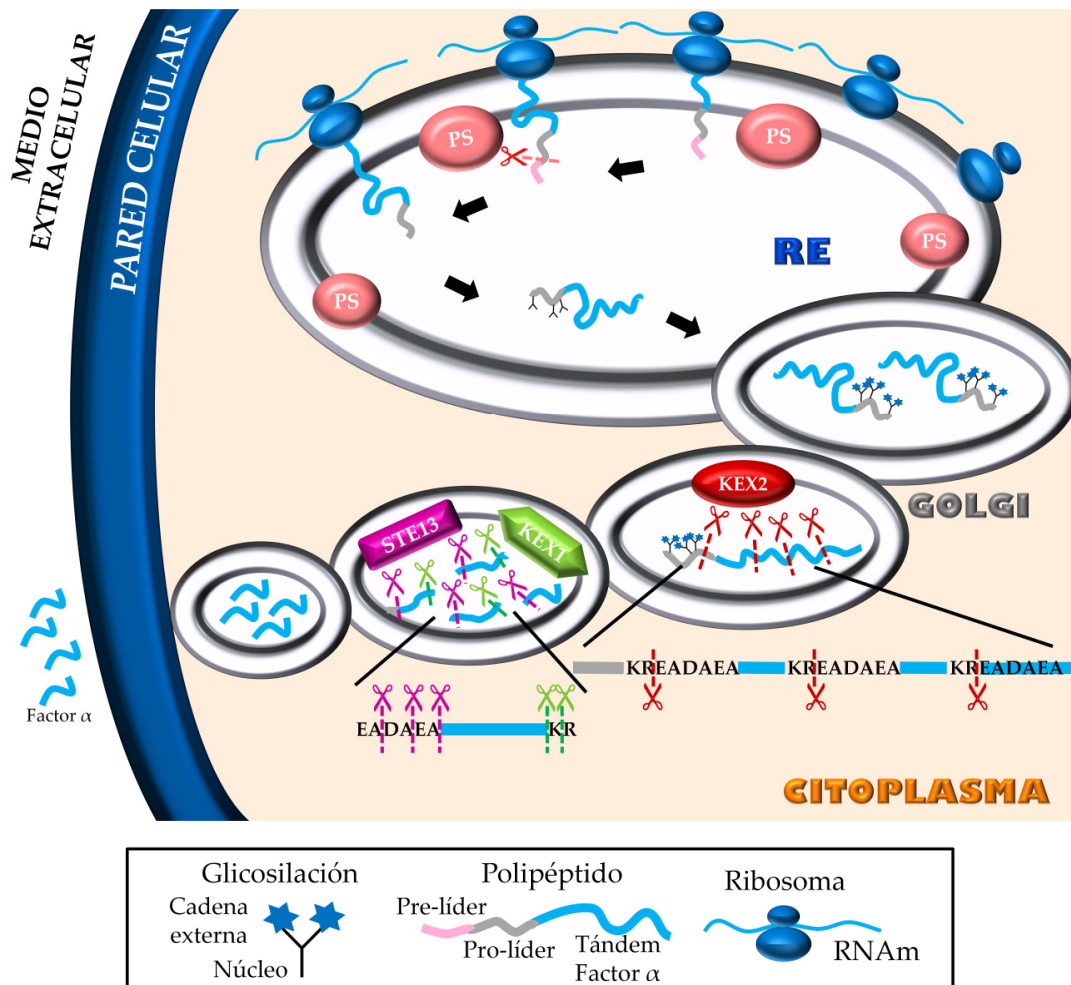


Figura 5.2. Tránsito y maduración del factor α en *S. cerevisiae*. Se muestran los distintos pasos de maduración del factor α desde su síntesis como un polipéptido inmaduro, pasando por el RE y Golgi hasta ser secretado al exterior de la célula. RE, retículo endoplasmático; PS, peptidasa señal.

Sin embargo, el procesamiento del prepro-líder del factor α no siempre sigue estas pautas. Algunos estudios han descrito un procesamiento incorrecto debido a la secreción de altos niveles de proteínas foráneas (que habían sido fusionadas a la secuencia prepro-líder del factor α para favorecer su producción heteróloga) cuyo extremo N-terminal mostraba una serie de aminoácidos adicionales procedentes de la secuencia de corte de la peptidasa STE13 (EAEA, Glu-Ala-Glu-Ala) indicando un procesamiento incompleto del pro-líder. Este fenómeno ha sido atribuido a unos bajos niveles de peptidasa STE13 en el Golgi, insuficientes para procesar las elevadas cantidades de proteína recombinante (ej. hEGF, IFN- α 1) que se estaban secretando (Brake, AJ *et al.*, 1984; Zsebo, KM *et al.*, 1986).

En la **Figura 5.3.A1** se representa el procesamiento correcto hipotético del prepro-líder del factor α de las variantes de VP. En este caso, la secuencia del extremo N-terminal sería EFATCDDGR, siendo EF la secuencia correspondiente a la diana de restricción de *EcoRI* introducida durante la construcción del plásmido pJR α VPL2. No obstante, la secuenciación del extremo N-terminal tanto del parental VPL2 como de los mutantes de evolución R4 y 2-1B, confirmó la presencia de una extensión de 6 aminoácidos (EAEAEF) correspondientes a la secuencia de corte de la peptidasa STE13 (EAEA) y la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *EcoRI* (EF) (**Figura 5.3.A2**), confirmando el procesamiento incorrecto del pro-líder del factor α . Se decidió eliminar dicha extensión con el fin de valorar su contribución a las mejoras observadas en las VP secretadas por *S. cerevisiae*. La secuenciación del extremo N-terminal de las variantes de delección purificadas confirmó la correcta eliminación de dicha extensión (**Figura 5.3.B**) demostrando que en ausencia de las repeticiones (Glu-Ala) se conseguía un procesamiento correcto del pro-líder por parte únicamente de la endopeptidasa KEX2.

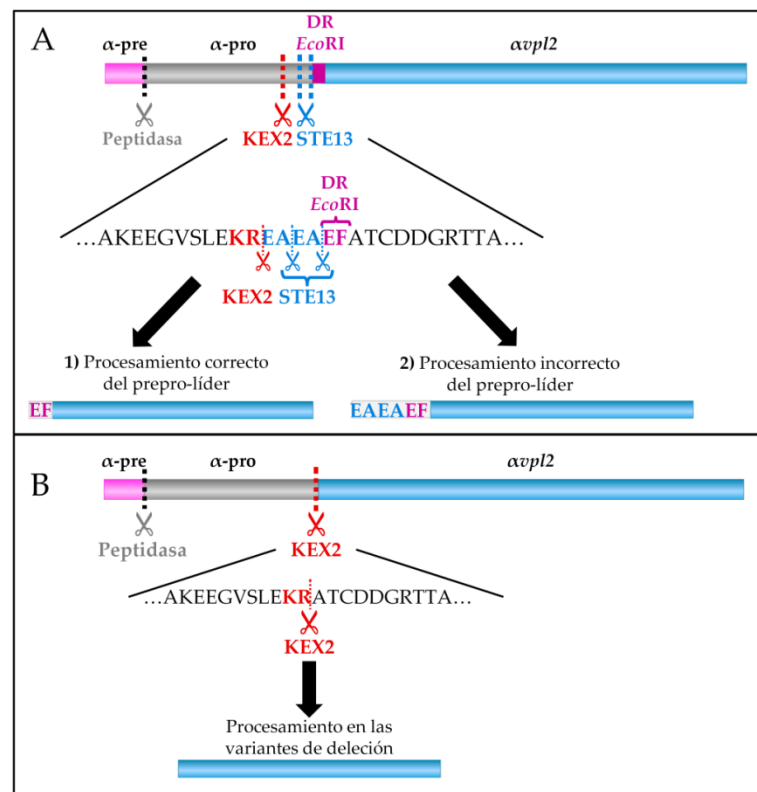


Figura 5.3. Representación del procesamiento del extremo N-terminal en las VP secretadas por *S. cerevisiae*. A) 1. Procesamiento hipotético correcto del prepro-líder del factor α ; 2. Procesamiento real del prepro-líder del factor α en las VP secretadas por *S. cerevisiae*. B) Procesamiento real del prepro-líder del factor α en las variantes de delección. En rosa y gris el prepro-líder del factor α , en azul la secuencia de la VP. En rosa oscuro la diana de restricción *EcoRI* (DRE α RI).

Las variantes truncadas VPL2DEL, R4DEL y 2-1BDEL se comportaron de manera similar a las variantes con la extensión extra, mostrando perfiles de estabilidad a pH y temperatura, así como perfiles de actividad frente al pH semejantes. La caracterización en profundidad de R4DEL reveló que las propiedades espectroscópicas y las constantes cinéticas apenas variaban respecto del mutante R4. Sin embargo, los niveles de secreción de R4DEL disminuyeron un 60 % respecto de R4. Se ha descrito que un ambiente ácido, provocado por las repeticiones (Glu-Ala), en el entorno del par (Lys-Arg) podría aumentar la eficiencia catalítica de KEX2 (Zsebo, KM *et al.*, 1986). Por esta razón, la eliminación de las repeticiones (Glu-Ala) posiblemente disminuya la eficiencia de KEX2 lo que podría derivar en un descenso en la secreción.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS VP EXPRESADAS EN *S. cerevisiae*

Tanto el parental VPL2 como los mutantes evolucionados R4, R4DEL y 2-1B fueron purificados y caracterizados. Los mutantes evolucionados mostraron características similares al parental VPL2 (con parecidas masas moleculares, grados de glicosilación y pIs). A diferencia de otras proteínas expresadas heterológicamente en *S. cerevisiae* que son hiperglicosiladas, el bajo grado de glicosilación de las VP secretadas por *S. cerevisiae* (9-10%) se deba probablemente a tiempos cortos de residencia en el compartimento de Golgi lo que derivaría en una mayor facilidad durante la exocitosis.

Las características espectroscópicas de las VP expresadas por *S. cerevisiae* fueron semejantes a las de la VP de *P. eryngii* e incluso a las de la VP expresada en *E. coli*. Así, se observó un máximo en la región Soret a 407 nm y dos bandas de transferencia de carga (CT1 y CT2) correspondientes al hierro en estado de alto spin, característico de hemoproteínas.

Por otro lado, además de las mejoras en secreción y termoestabilidad mencionadas anteriormente, las variantes evolucionadas mostraron una alteración de las constantes cinéticas para algunos de los sustratos típicos de la VP. Como se ha comentado en el apartado de **Introducción**, en la VP se han identificado tres sitios diferentes para la oxidación de sustratos de distinta naturaleza: el canal del hemo (sitio de oxidación de baja eficiencia para el ABTS y el DMP), un Trp catalítico superficial en la posición 164 (sitio de oxidación de alta eficiencia para el ABTS y el DMP, donde además se puede oxidar el RB5 y el AV) y el bolsillo de oxidación del Mn²⁺ (donde se oxida exclusivamente el Mn²⁺) (Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2007; Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2008; Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009a; Ruiz-Dueñas, FJ *et al.*, 2009b). Tras el análisis de las constantes cinéticas se determinó que, en el proceso de evolución, el canal del hemo se vio afectado de tal manera que aumentó la

afinidad por los sustratos ensayados (las K_m para el ABTS y DMP disminuyeron considerablemente) al tiempo que sus valores de k_{cat} aumentaron permitiendo alcanzar notables mejoras en las eficiencias catalíticas (con k_{cat}/K_m para ABTS mejoradas en 16 y 61 veces para los mutantes R4 y 2-1B respecto al parental VPL2, **Tabla 4.10**, pag 142). Mientras que el Trp164 catalítico no varió sus constantes cinéticas para el RB5, sí lo hizo el sitio de oxidación del Mn^{2+} que resultó afectado de manera negativa en su afinidad por el Mn^{2+} con lo que la eficiencia catalítica se vio drásticamente mermada tras la evolución (pasando de $1190 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en el parental VPL2 a $23 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en el mutante 2-1B). Esta modificación de las constantes cinéticas encuentra explicación en el protocolo de *HTP-screening* diseñado. En el ensayo de *screening* se empleó como único sustrato el ABTS, ya que éste es oxidado en el canal del hemo así como en el Trp164 (sitios de oxidación de baja y alta eficiencia para el ABTS, respectivamente), con el fin de evitar la tendencia a perder actividad en los diferentes sitios catalíticos. De esta manera, los valores cinéticos en ambos sitios se conservaron o incluso mejoraron (como es el caso del canal del hemo). Sin embargo, el sitio de oxidación del Mn^{2+} no fue valorado durante la evolución lo que significó la introducción de mutaciones que posiblemente afectaron negativamente a dicho centro catalítico. Este fenómeno indica que las propiedades que no se valoran en el *screening* pueden perderse o verse afectadas durante el proceso de evolución dirigida. Para futuras aplicaciones en las que pudieran requerirse VP con actividades potenciadas para Mn^{2+} , se podría emplear alguna de las variantes evolucionadas e impulsar dicha actividad mediante evolución dirigida en combinación con enfoques semi-rationales a través de un protocolo de *screening* específico para Mn^{2+} .

Se calcularon las constantes cinéticas para el H_2O_2 empleando como sustrato reductor el ABTS (por cada molécula de H_2O_2 que es reducida se oxidan dos moléculas de ABTS). En el transcurso de la evolución se observó un importante descenso de la afinidad de la enzima por el H_2O_2 (la K_m de R4 y 2-1B aumentó 4 y 15 veces, respectivamente) sin que se viera afectada la eficiencia catalítica, **Tabla 4.10**, pag 142. Esto implicó que las VP evolucionadas pudieran trabajar a elevadas concentraciones de H_2O_2 además de mostrar una termoestabilidad mejorada. En consecuencia, los mutantes mostraron actividades específicas de 3530 y 11300 U/mg para R4 y 2-1B, respectivamente, para la oxidación de ABTS en condiciones saturantes de H_2O_2 , siendo un posible punto de partida para evolucionar VP resistentes al peróxido.

Además del descenso en la afinidad por el peróxido, la caracterización de las VP desveló cambios en otras propiedades de la enzima que en ningún momento fueron objeto de mejora durante la evolución dirigida. Así, se observó un aumento en el pH óptimo de oxidación de ABTS de hasta una unidad (de 3.0, 3.5 y 4.0 para el parental VPL2 y los mutantes R4 y 2-1B, respectivamente) tras seis ciclos de evolución. Otro dato inesperado fue

que mientras el parental VPL2 expresado en *S. cerevisiae* mostró estabilidades frente al pH similares a las de la VP nativa expresada por *P. eryngii*, así como las VP expresadas heterológamente en *A. nidulans* y *E.coli* (Lu-Chau, TA *et al.*, 2004; Morales Esteban, M, 2009; Pérez Boada, M, 2003) las variantes evolucionadas mostraron mayor estabilidad a pH alcalinos, en especial el mutante 2-1B. Mientras 2-1B conservó un 60 % de actividad tras 120 h de incubación, el parental VPL2 y R4 perdieron toda su actividad a pH 9.0 en menos de 1 h (**Figura 4.31**, pag 145). Es bien conocido que las peroxidasa fúngicas de Clase II son sensibles a pHs básicos (Verdín, J *et al.*, 2006). Existen estudios realizados sobre la LiP, MnP y VP que correlacionan la caída de actividad tras un tratamiento térmico o alcalino con la pérdida de los Ca²⁺ estructurales (George, SJ *et al.*, 1999; Lu-Chau, TA *et al.*, 2004; Nie, G *et al.*, 1997; Youngs, HL *et al.*, 2000). En base a este argumento, el aumento de la estabilidad a pH 9.0 mostrado por 2-1B, así como el aumento de su termoestabilidad, se podría atribuir a que las mutaciones introducidas durante la evolución estabilizaron los Ca²⁺ estructurales evitando así su pérdida.

5.5 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS MUTACIONES

Las mutaciones introducidas durante el proceso de evolución dirigida han sido analizadas en base al modelo de la estructura cristalográfica de la VP aislada de *P. eryngii* (isoenzima VPL2) PDB id: 3FJW con una resolución de 2.8 Å (**Figura 5.4**).

Tabla 5.2. Mutaciones de las VP evolucionadas.

Mut. ¹	Dom. ²	ES ³	Loc. ⁴	Distancia Fe ³⁺ (Å)	Distancia Mn ²⁺ (Å)	Distancia Trp164 (Å)	Interacciones	
							Antes	Después
E37K	Distal	Hélice B	Cercana al sitio de oxidación del Mn ²⁺	14.29	7.61	21.86	<u>E36</u> , 2x(S41)	D30 , 2x(S41)
H39R	Distal	Hélice B	Cercana al sitio de oxidación del Mn ²⁺	9.71	6.74	16.69	<u>C34</u> , G35, E36, L42, R43, <u>P190</u>	G35, E36, L42, R43, P190
V160A	Distal	Hélice F	Cercana al Trp164	15.87	25.52	6.52	-	V163 , W164
T184M	Proximal	Lámina β	Cercana al sitio de oxidación del Mn ²⁺	13.03	8.62	21.86	A174, <u>I181</u>	A174
Q202L	Proximal	Lámina β	Zona interna	17.14	22.9	15.85	I199, <u>A235</u> , 2x(<u>E304</u>)	I199, E304
D213A	Proximal	Sin estructura	Canal del hemo	20.25	20.31	29.46	-	-
G330R	C-Terminal	Sin estructura	Superficial	18.09	8.57	27.07	-	V328

¹ Mut., mutación; ² Dom., dominio; ³ ES, estructura secundaria; ⁴ Loc., localización relativa. Se muestran subrayados los residuos con los que se rompe la interacción tras la mutación. Se muestran en negrita los residuos con los que se crea una nueva interacción tras la mutación.

En la **Tabla 5.2** se resumen algunas características de las mutaciones obtenidas en el proceso de evolución dirigida como la localización, distancias a sitios catalíticos e interacciones con residuos circundantes.

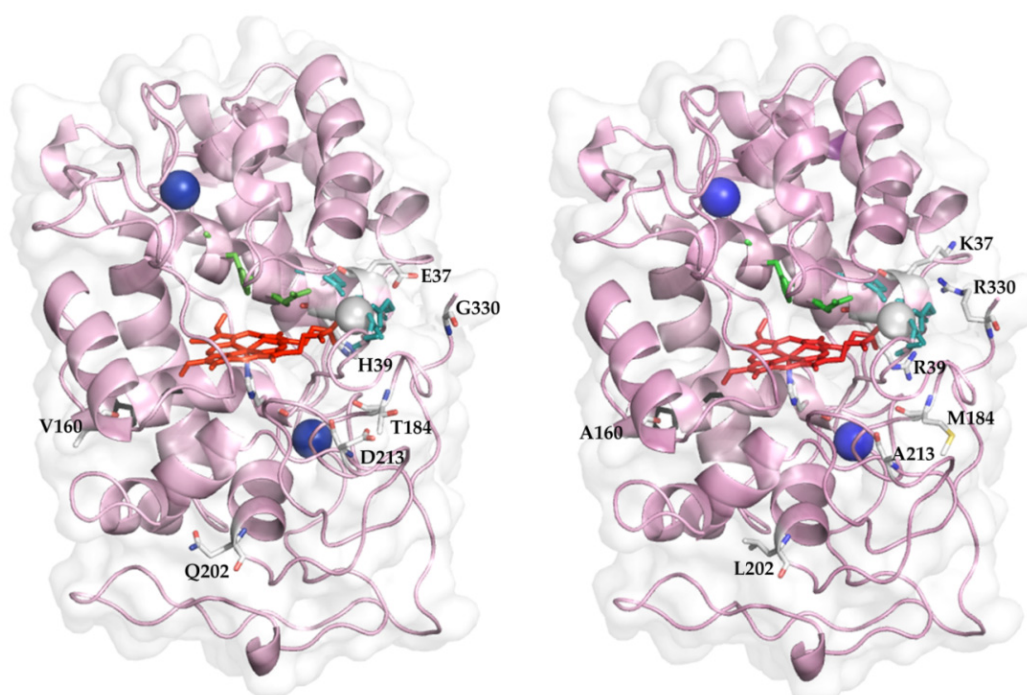


Figura 5.4. Estructura molecular de la VP nativa y el mutante 2-1B. A la izquierda se muestra la estructura cristalográfica de la VP de *P. eryngii* (PDB: 3FJW). A la derecha se muestra el modelo molecular propuesto para el mutante 2-1B. Se muestran los residuos mutados; el grupo hemo en rojo con la histidina proximal; los Ca^{2+} estructurales como esferas azules; el Mn^{2+} como esfera gris; los residuos ácidos del sitio de oxidación del Mn^{2+} en color verde-azulado; los residuos implicados en la reacción con el H_2O_2 en verde; el Trp164 en negro.

5.5.1 MUTACIONES INTRODUCIDAS DURANTE LA EVOLUCIÓN HACIA SECRECIÓN

El mutante de secreción R4 presentó 4 mutaciones (posteriormente conservadas en el mutante de termoestabilidad 2-1B): E37K, V160A, T184M, Q202L. En el modelo propuesto los residuos Thr184, Glu37 y Val160 están parcialmente expuestos al solvente y distribuidos en diferentes regiones de la proteína, mientras que la Gln202 ocupa una posición interna en la proteína.

Mutación T184M

La mutación T184M parece interrumpir un puente de hidrógeno con la Ile181 eliminando posibles tensiones estructurales en esta región (**Figura 5.5A y 5.5B**). Esta ruptura podría provocar la reorientación del aminoácido Ala174 (unido mediante un puente de hidrógeno al aminoácido 184) modificando la posición del Asp175 que es uno de los tres aminoácidos ácidos que interviene en la oxidación del Mn^{2+} . La hipotética modificación en la orientación de este residuo del bolsillo del Mn^{2+} podría explicar el aumento de la K_m para el Mn^{2+} en el mutante R4.

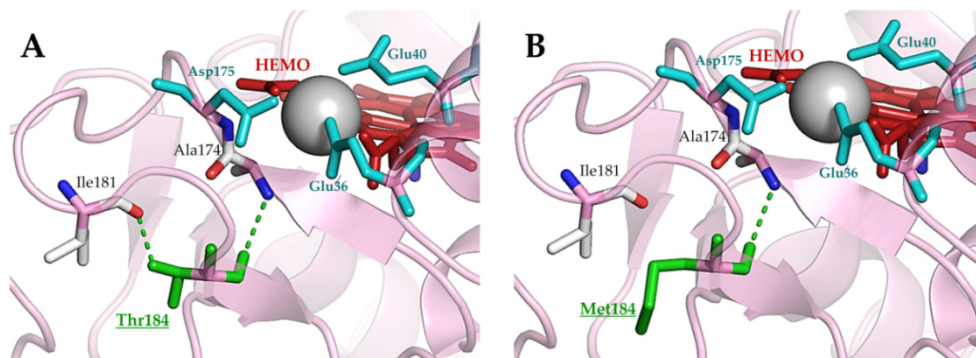


Figura 5.5. Análisis estructural de la mutación T184M. A y B muestran la mutación T184M (en verde y subrayada). El grupo hemo se representa en rojo, los aminoácidos implicados en la oxidación del Mn^{2+} se muestran en cian. La esfera gris representa el Mn^{2+} .

Mutación Q202L

La mutación Q202L parece interrumpir dos puentes de hidrógeno con la Ala235 y el Glu304. Este último residuo está situado al inicio de la cola C-terminal de la proteína. Es probable que los cambios producidos por la mutación Q202L puedan aumentar la flexibilidad estructural de la enzima mejorando su secreción (**Figura 5.6A y 5.6B**).

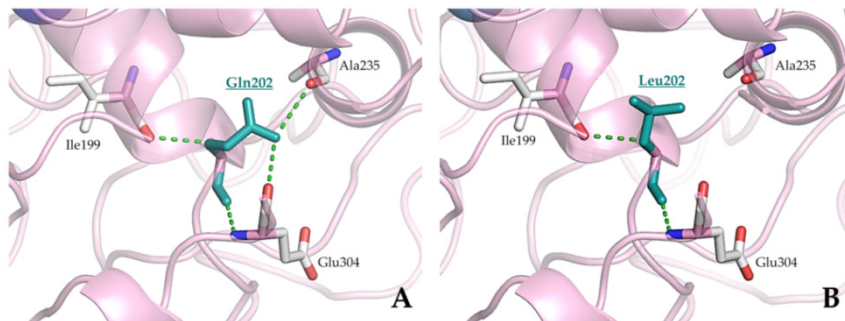


Figura 5.6. Análisis estructural de la mutación Q202L. A y B muestran la mutación Q202L (en cian y subrayada) y sus distintas interacciones.

Mutación E37K

El oxígeno carboxílico de la cadena lateral del Glu37 parece formar un puente de hidrógeno con el nitrógeno del enlace peptídico del Glu36 (ambos localizados en la hélice B, **Figura 5.7A**). Según el modelo, la mutación E37K podría romper esta interacción y establecer un puente salino con el residuo Asp30 localizado al final de la hélice A. Es probable que esta nueva interacción compacte las hélices A y B lo que podría mejorar la estabilidad, ya que la mutación E37K aumentó por sí sola la T_{50} 4°C. Por otro lado, el Glu36 es uno de los tres residuos ácidos implicados en la oxidación del Mn^{2+} y parece posible que el desplazamiento de la hélice B (donde se encuentra localizado) debido a la mutación E37K pudiera modificar su posición relativa respecto de los otros dos residuos ácidos. Este cambio podría afectar a la geometría de la esfera de coordinación del Mn^{2+} y por ende a su afinidad (**Figura 5.7A y 5.7B**).

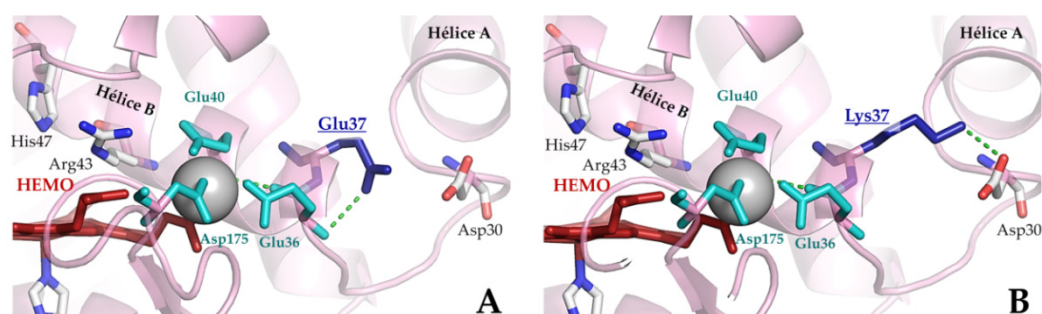


Figura 5.7. Análisis estructural de la mutación E37K. A y B muestran la mutación E37K (en azul oscuro y subrayada). El grupo hemo se representa en rojo, los aminoácidos implicados en la oxidación del Mn^{2+} se muestran en cian. La esfera gris representa el Mn^{2+} . También se muestran los aminoácidos implicados en la unión del H_2O_2 (Arg43 e His47)

Mutación V160A

Finalmente, la mutación V160A, de acuerdo con el modelo, parece crear dos nuevos puentes de hidrógeno con los residuos Trp164 y Val163, sin que se vea afectada la actividad del Trp164 catalítico (**Figura 5.8A y 5.8B**). Las mejoras debidas a esta mutación podrían estar relacionadas con una correcta maduración en la vía secretora en *S. cerevisiae*.

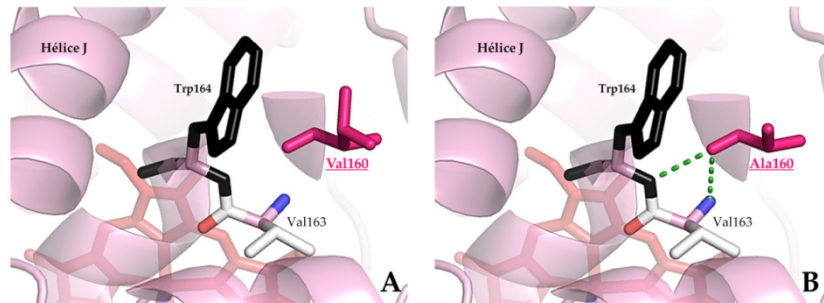


Figura 5.8. Análisis estructural de la mutación V160A. A y B muestran la mutación V160A (en rosa y subrayada). El grupo hemo se representa en rojo, el Trp164 catalítico se muestra en negro.

5.5.2 MUTACIONES INTRODUCIDAS DURANTE LA EVOLUCIÓN HACIA TERMOESTABILIDAD

Todas las mutaciones encontradas durante la evolución hacia termoestabilidad se localizaron en la superficie del mutante 2-1B (G330R, D213A y H39R) (**Figura 5.4**).

Mutación G330R

La mutación G330R está localizada en la cola C-terminal de la proteína, que es una región con elevada movilidad. Según el modelo, esta mutación parece generar un nuevo puente de hidrógeno con la Val328, que podría estabilizar y dar más rigidez a esta zona (la T_{50} se vio aumentada 2.2°C tras la aparición de esta mutación) (**Figura 5.9A y 5.9B**).

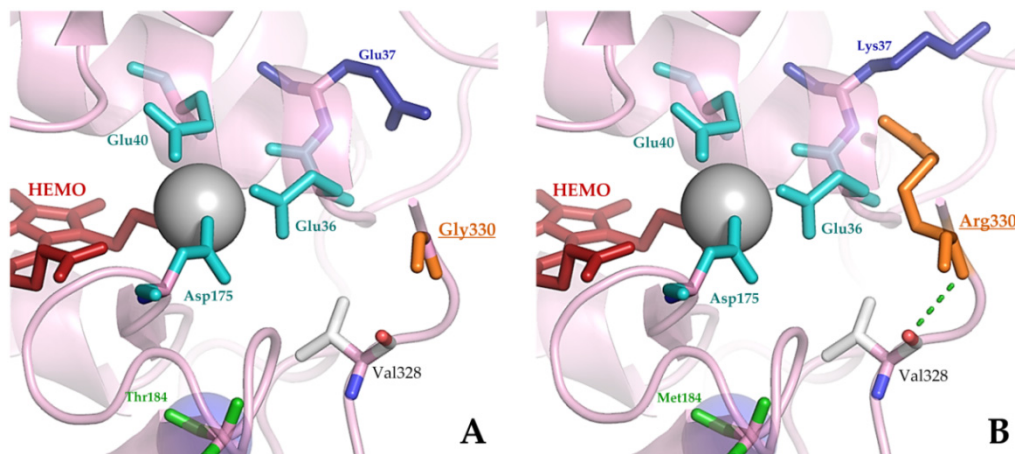


Figura 5.9. Análisis estructural de la mutación G330R. A y B muestran la mutación G330R (en naranja y subrayada). El grupo hemo se representa en rojo, los aminoácidos implicados en la oxidación del Mn^{2+} se muestran en cian. La esfera gris representa el Mn^{2+} . También se marcan los aminoácidos mutados presentes en el mutante R4 (E37K en azul oscuro y T184M en verde).

Mutación D213A

La mutación D213A está expuesta al solvente en la zona más externa del canal del hemo. El cambio de un residuo cargado negativamente por uno neutro podría contribuir a una mejor unión de sustratos cargados negativamente como el ABTS y por tanto, facilitar su oxidación en el bolsillo del hemo, lo que explicaría el gran descenso de la K_m para este sustrato (**Figura 5.10**). Por otro lado el cambio en la polaridad de esta región podría proteger en cierto modo a la enzima de la desnaturalización por temperatura. Esta explicación estaría apoyada por el hecho de que el mutante intermedio 13E7 de la cuarta generación (**Figura 4.14**, pag123) que presentaba la mutación N214D (única diferencia con R4) donde se produce un cambio de un aminoácido sin carga a uno cargado negativamente, mostró un descenso en la termoestabilidad ($AR/AI = 0.88$) con valores de actividad inferiores a R4 (valores TAI de 1.73 frente a 1.84 de R4). De esta manera, las cargas negativas en esta región de la proteína podrían afectar negativamente tanto a la unión del sustrato como a la estabilidad de la proteína a elevadas temperaturas.

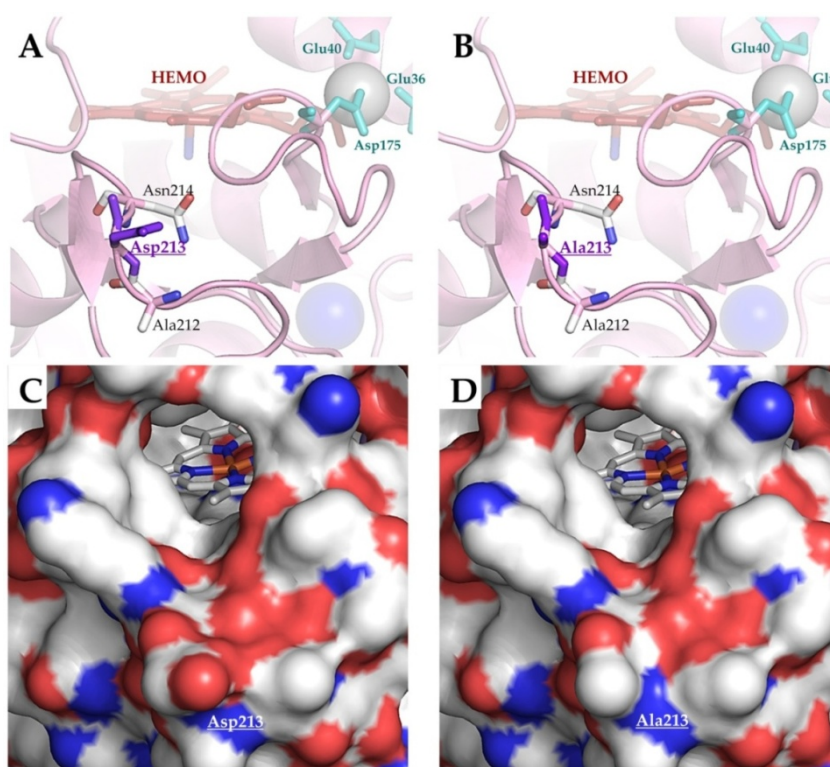


Figura 5.10. Análisis estructural de la mutación D213A. A y B muestran la mutación D213A (en azul y subrayada). El grupo hemo se representa en rojo, los aminoácidos implicados en la oxidación del Mn^{2+} se muestran en cian. La esfera gris representa el Mn^{2+} , la esfera azul representa el Ca^{2+} proximal. C y D muestran la superficie expuesta al solvente de la entrada del canal principal de acceso al hemo indicando la mutación D213A (en blanco y subrayada). El grupo hemo se muestra en colores CPK.

Mutación H39R

La mutación H39R apareció en distintos momentos de la evolución, en concreto el mutante 4B5 y el mutante 2-1B incorporaron esta mutación en el primer y último ciclo de la evolución, respectivamente. Como se ha comentado anteriormente, esta mutación en el mutante 4B5 supuso una notable mejora de termoestabilidad (aumentó la T_{50} 4°C). Analizando el modelo, parece que esta mutación tiene un efecto positivo sobre la estabilidad tanto a la temperatura como al pH debido a varias causas. Por un lado, la His39 parece establecer un enlace de hidrógeno con la Pro190 actuando como un puente entre la hélice B y el *loop* que rodea al Ca^{2+} proximal. Con la mutación H39R, el enlace de hidrógeno desaparece para dar lugar a uno nuevo con la misma Pro190. En el modelo, la distancia del puente de hidrógeno pasa de ser de 3.00 Å a 3.11 Å (His39 y Arg39, respectivamente), este distanciamiento podría favorecer la compactación del dominio proximal y distal promoviendo un aumento de la termoestabilidad (**Figura 5.11A, 5.11B y 5.12**).

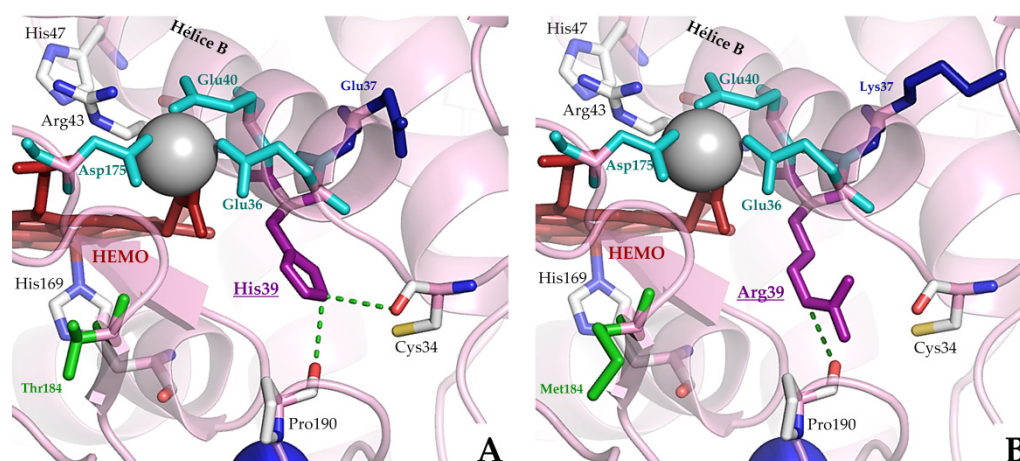


Figura 5.11. Análisis estructural de la mutación H39R. A y B muestran la mutación H39R (en violeta y subrayada). El grupo hemo se representa en rojo, los aminoácidos implicados en la oxidación del Mn^{2+} se muestran en cian. La esfera gris representa el Mn^{2+} . La esfera azul representa el Ca^{2+} proximal. También se marcan los aminoácidos mutados presentes en el mutante R4 (E37K en azul oscuro y T184M en verde) y los aminoácidos implicados en la reacción con el H_2O_2 (Arg43 e His47) en color CPK.

Por otro lado, la Pro190 es contigua a la Thr189, uno de los cinco aminoácidos que se encuentran coordinando al Ca^{2+} proximal (junto con los residuos Ser170, Asp187, Val192 y Asp194). Parece probable que esta mutación no afecte únicamente al Ca^{2+} proximal, sino que de una manera indirecta también pudiera influir sobre el Ca^{2+} distal. En la **Figura 5.12** se muestra la red de puentes de hidrógeno que conectaría el Ca^{2+} proximal con el distal a través del residuo 39. Como se ha comentado, por un lado, la mutación H39R permitiría

establecer un puente de hidrógeno (con diferente orientación y distancia) con la Pro190 contigua a la Thr189 que se encuentra coordinando el Ca^{2+} proximal, al tiempo que estaría conectándose con el Ca^{2+} distal a través de dos posibles vías: i) mediante una red de puentes de hidrógeno entre los residuos Arg43, His47 (ambos intervienen en la unión del H_2O_2) y Asp48 (uno de los cuatro residuos que se encuentra coordinando el Ca^{2+} distal junto con la Gly60, el Asp62 y la Ser64); ii) mediante una red de puentes de hidrógeno entre los residuos Arg43, Ala79, Asn78, Glu72 y Ser64 (este último coordinando el Ca^{2+} distal).

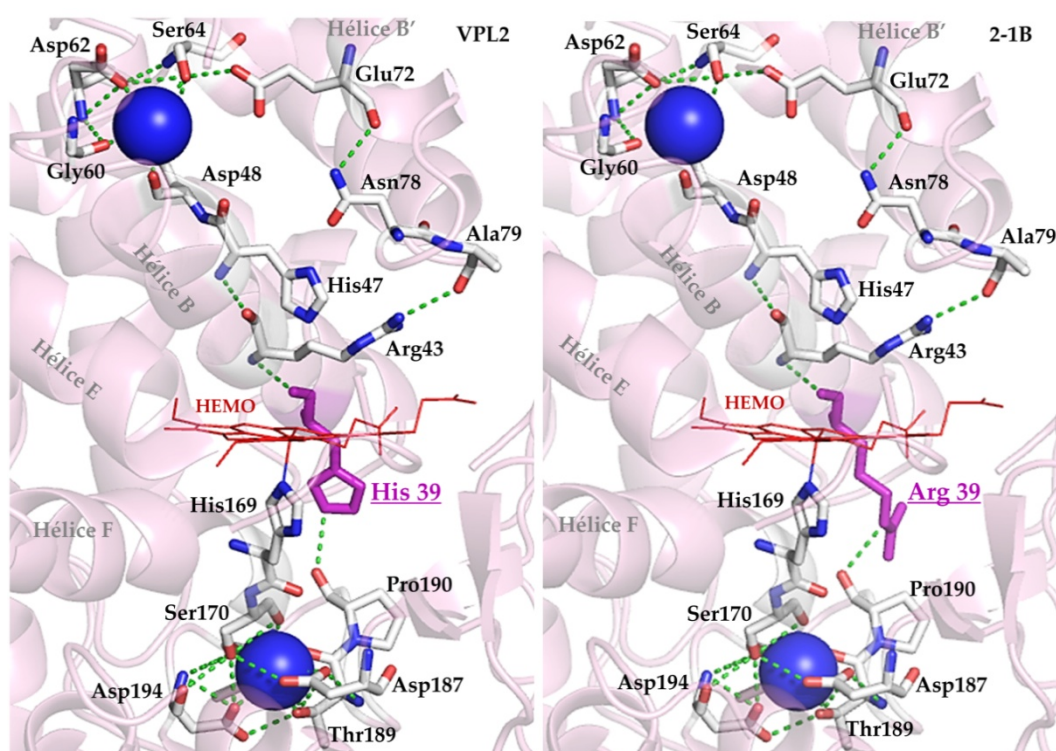


Figura 5.12. Representación de los iones Ca^{2+} proximal y distal en la VP. A y B muestran la red de puentes de hidrógeno que conectan el Ca^{2+} proximal con el distal para el parental VPL2 (izquierda) y el mutante 2-1B (derecha). Las esferas azules indican los Ca^{2+} estructurales; el grupo hemo está representado en rojo; la mutación H39R se muestra en violeta y subrayada; los residuos involucrados en la coordinación del Ca^{2+} proximal son Ser170, Asp187, Thr189, Asp194 y Val192; los residuos involucrados en la coordinación del Ca^{2+} distal son Asp48, Gly60, Asp62 y Ser64 y dos moléculas de agua que no se muestran en el modelo.

Es probable que la modificación de las interacciones de los distintos residuos con los Ca^{2+} estructurales puede aumentar la termoestabilidad e incluso la estabilidad a pH alcalinos. Esta hipótesis se apoya en estudios previos realizados en LiP, MnP y VP, en los que se demuestra el importante papel estructural de los iones Ca^{2+} . En estos trabajos se explica como la inactivación de la enzima tras una incubación a pH alcalinos así como tras

un tratamiento térmico se debe a la pérdida de uno o los dos Ca^{2+} estructurales (que se encuentran altamente conservados en las peroxidases de Clase II). Esta inactivación puede revertirse con la adición de Ca^{2+} exógeno (Banci, L *et al.*, 1999; George, SJ *et al.*, 1999; Lu-Chau, TA *et al.*, 2004; Nie, G *et al.*, 1997; Sutherland, GRJ *et al.*, 1996; Sutherland, GRJ *et al.*, 1997; Timofeevski, SL *et al.*, 1997; Verdín, J *et al.*, 2006; Youngs, HL *et al.*, 2000). Las posibles diferencias en la fuerza del puente de hidrógeno entre His39-Pro190 y Arg39-Pro190 del parental VPL2 y 2-1B, respectivamente, podrían modificar la estabilidad de los Ca^{2+} estructurales, evitando así su pérdida en condiciones alcalinas o a elevadas temperaturas.

Adicionalmente, la mutación H39R parece romper un puente de hidrógeno con la Cys34, lo que podría contribuir a variar la distancia entre la hélice B y el grupo hemo (**Figura 5.11**).

Por último, merece la pena comentar que esta mutación podría contribuir a la pérdida de afinidad hacia el Mn^{2+} (la K_m para el Mn^{2+} en el mutante 2-1B es 100 veces mayor a la del parental VPL2), potenciando el efecto perjudicial de la mutación E37K y T184M sobre la catálisis del Mn^{2+} , ya que se localiza contigua al Glu40, que junto al Glu36 y el Asp175 forman el sitio de oxidación del Mn^{2+} .

Aunque las mutaciones E37 y H39 podrían dar lugar a cambios en la posición relativa de la hélice B donde se localizan los residuos implicados en la reacción con el H_2O_2 , la modificación de la K_m para el peróxido en R4 y 2-1B estaría más bien relacionada con la mejora en la oxidación del ABTS (muestran unos incrementos en la k_{cat} de 1.7 y 3.9 veces respecto de VPL2) debido a una mejora del paso limitante en la reacción global de la VP.

6 CONCLUSIONES

1. Se ha logrado la expresión en *S. cerevisiae* de la VP nativa de *P. eryngii* en forma soluble, estable y funcional. Para ello se sustituyó la secuencia señal nativa de la VP por la del prepro-líder del factor α . Se optimizó el medio de cultivo y las condiciones de fermentación tanto para microcultivos en placas de 96 pocillos como para fermentaciones en matraz.
2. Se diseñó un protocolo de exploración en formato *high-throughput* basado en la oxidación del ABTS. Éste fue empleado en la evolución dirigida de la VP hacia secreción y actividad mostrando una elevada fiabilidad (CV inferiores al 13 %). Se validó un protocolo para evolucionar la VP hacia termoestabilidad incorporando un *re-screening* en el que se valoraron las T_{50} de las variantes seleccionadas.
3. El empleo de ABTS como sustrato reductor en los diferentes protocolos de *screening* se tradujo en una mejora considerable para la oxidación de sustratos en el canal del hemo y la conservación de actividad dependiente del triptófano catalítico 164. Sin embargo, se redujo la eficiencia catalítica en el sitio de oxidación de Mn^{2+} como consecuencia de la acumulación de varias mutaciones en este entorno.
4. Durante el proceso de evolución dirigida hacia secreción y termoestabilidad se detectaron efectos laterales inesperados en el comportamiento de las variantes. En particular, se desplazó el pH óptimo de actividad frente a ABTS de 3.0 a 4.0. Dicho cambio vino acompañado de una importante mejora de estabilidad de las VP mutantes a pHs alcalinos. Asimismo se produjo un considerable aumento en la K_m para el H_2O_2 aunque sin repercutir en su eficiencia catalítica.
5. El proceso completo de evolución dirigida comprendió seis generaciones: las tres primeras hacia actividad y secreción, las dos últimas hacia termoestabilidad. La cuarta generación fue mixta combinando *screenings* tanto para actividad total como para termoestabilidad.
6. Tras los cuatro primeros ciclos evolutivos se seleccionó la mejor variante de expresión funcional, el mutante R4, con unos niveles de secreción de 21 mg/L. R4 acumuló cuatro mutaciones en la secuencia de la VP madura (E37K, V160A, T184M, y Q202L). El meticuloso diseño de las estrategias de generación de diversidad, combinando mutagénesis aleatoria con procesos de recombinación de DNA, permitieron la incorporación de una mutación por ciclo evolutivo, lo que facilitó el estudio individual y colectivo de cada una de las posiciones mutadas.

7. Tras la sexta generación se seleccionó la mejor variante de termostabilidad, el mutante 2-1B, que conservó las mutaciones presentes en R4 e incorporó las mutaciones de estabilidad H39R, D213A y G330R. 2-1B mostró una T_{50} incrementada en 8°C frente al parental VPL2, junto con una $t_{1/2}$ mejorada y una ampliación en su intervalo de termoactividad.
8. Las VP secretadas por *S. cerevisiae*, VPL2, R4 y 2-1B, presentaron una extensión extra N-terminal como resultado de un procesamiento incorrecto en el Golgi por la peptidasa STE13. Se diseñaron mutantes truncados mediante diversas estrategias y se verificó que dicho extremo no influye en las propiedades bioquímicas de las VP pero sí es importante para su secreción en *S. cerevisiae*.
9. La plataforma evolutiva diseñada en esta Tesis Doctoral ha permitido crear VP expresadas funcionalmente, más activas y robustas. Estos mutantes, debido a sus niveles de secreción, actividad y estabilidad, son un punto de partida idóneo para su ingeniería hacia nuevos retos biotecnológicos.

1. The native VP from *P. eryngii* was functionally expressed by *S. cerevisiae* in soluble, active and stable form. To this end, the original signal leader was replaced by the α -factor prepro-leader and the media composition and fermentation conditions were optimized for cultures in microtiter plates and flask formats.
2. A high-throughput screening assay based on the oxidation of ABTS was designed. Highly reliable (CV below 13 %), the protocol was used in directing the evolution of VP towards secretion and activity. Additionally, the assay was adjusted to evolve the VP's thermostability. To rule out false positives, the analysis of T_{50} values during the re-screening of the best mutant hits was performed.
3. The use of ABTS as reducing substrate in the different screening protocols (for secretion, activity and thermostability) derived in a noticeable improvement at the haem channel site whilst the activity at the catalytic Trp164 was conserved. As side-effect of evolution, the catalytic efficiency at the Mn^{2+} site was reduced with several mutations located in its neighborhood.
4. During the directed evolution for secretion and stability, other unexpected changes were detected. The optimum pH for activity *vs* ABTS was shifted from 3.0 to 4.0. A significant improvement in the stability of the VP mutants at alkaline pH was produced. Along these lines, the K_m for H_2O_2 was enhanced 15-fold while the catalytic efficiency was kept.
5. The whole directed evolution experiment comprised 6 generations: the first three towards activity and secretion and the last two cycles for thermostability. The 4th generation combined screenings for secretion, activity and thermostability.
6. In generation 4, the best secretion mutant (R4 variant with expression levels of 21 mg/L) was selected. R4 harbored 4 mutations in the mature protein (an aminoacidic backbone formed by E37K, V160A, T184M and Q202L). The strategies for the generation of diversity (combining random mutagenesis with low mutational rates and DNA recombination) allowed us, on average, to introduce one substitution per round of evolution. This approach was very advantageous in terms of identifying the roles of specific mutations.
7. In generation 6, the best stability mutant (2-1B variant) was selected. This mutant kept the aminoacid backbone of R4 plus three new stabilizing mutations (H39R, D213A and G330R). 2-1B showed a T_{50} improvement of 8°C over parent type along with an enhanced $t_{1/2}$ and a widened range of thermoactivity.

8. The parent type, R4 and 2-1B mutants presented an extra N-terminal extension upon secretion by *S. cerevisiae*. An alternative processing by the STE13 protease of the Golgi compartment was confirmed. To study the influence of the extra tail on the VP properties, several truncate mutants were designed by *in vivo* and *in vitro* approaches. It was concluded that the N-terminal extension was beneficial for secretion without significantly altering the biochemical features of VP.
9. The laboratory evolution platform described here is useful to tailor VPs functionally expressed, highly robust and active, being a suitable point of departure for further engineering.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelmoula-Souissi, S, Rekik, L, Gargouri, A, y Mokdad-Gargouri, R. (2007) High-Level Expression of Human Tumour Suppressor P53 in the Methylotrophic Yeast: *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 54: 283-288.
2. Abecassis, V, Pompon, D, y Truan, G. (2000) High Efficiency Family Shuffling Based on Multi-Step PCR and *in vivo* DNA Recombination in Yeast: Statistical and Functional Analysis of a Combinatorial Library between Human Cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Nucleic Acids Research* 28: 88-97.
3. Agresti, JJ, Antipov, E, Abate, AR, Ahn, K, Rowat, AC, Baret, JC, Marquez, M, Klibanov, AM, Griffiths, AD, y Weitz, DA. (2010) Ultrahigh-Throughput Screening in Drop-Based Microfluidics for Directed Evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 4004-4009.
4. Aguinaldo, AM y Arnold, FH. (2003) Staggered Extension Process (StEP) *in vitro* Recombination. En *Directed Evolution Library Creation. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* 231. Eds. Arnold, FH y Georgiou, G. Humana Press, Totowa, New Jersey: 105-110.
5. Alcalde, M, Zumárraga, M, Polaina, J, Ballesteros, A, y Plou, FJ. (2006) Combinatorial Saturation Mutagenesis by *in vivo* Overlap Extension for the Engineering of Fungal Laccases. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 9: 719-727.
6. Alcalde, M, Ferrer, M, y Plou, FJ. (2007) Environmental Biocatalysis: From Remediation with Enzymes to Novel Green Processes. *Biocatalysis and Biotransformations* 25: 113-113.
7. Alva, KS, Kumar, J, Marx, KA, y Tripathy, SK. (1997) Enzymatic Synthesis and Characterization of a Novel Water-Soluble Polyaniline: Poly(2,5-Diaminobenzenesulfonate). *Macromolecules* 30: 4024-4029.
8. Arnold, FH. (1998) Design by Directed Evolution. *Accounts of Chemical Research* 31: 125-131.
9. Arnold, FH y Georgiou, G. (2003a) Directed Enzyme Evolution. Screening and Selection Methods. *Methods in Molecular Biology* 230. Humana Press, Totowa, New Jersey.
10. Arnold, FH y Georgiou, G. (2003b) Directed Evolution Library Creation. Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* 231. Humana Press, Totowa, New Jersey.
11. Arnold, FH y Volkov, AA. (1999) Directed Evolution of Biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 3: 54-59.

12. Arnold, FH, Wintrode, PL, Miyazaki, K, y Gershenson, A. (2001) How Enzymes Adapt: Lessons from Directed Evolution. *Trends in Biochemical Sciences* 26: 100-106.
13. Azevedo, AM, Martins, VC, Prazeres, DMF, Vojinovic, V, Cabral, JMS, y Fonseca, LP. (2003) Horseradish Peroxidase: a Valuable Tool in Biotechnology. En *Biotechnology Annual Review* 9. Elsevier: 199-247.
14. Banci, L, Bertini, I, Capannoli, C, del Conte, R, y Tien, M. (1999) Spectroscopic Characterization of Active Mutants of Manganese Peroxidase: Mutations on the Proximal Side Affect Calcium Binding of the Distal Side. *Biochemistry* 38: 9617-9625.
15. Banci, L, Bertini, I, Turano, P, Tien, M, y Kirk, TK. (1991) Proton NMR Investigation into the Basis for the Relatively High Redox Potential of Lignin Peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 6956-6960.
16. Bidlack, J, Malone, M, y Benson, R. (1992) Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* 72: 51-56.
17. Bloom, JD y Arnold, FH. (2009) In the Light of Directed Evolution: Pathways of Adaptive Protein Evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 9995-10000.
18. Bonilla, M y Cunningham, KW. (2001) Coupling between ER Stress and Ca²⁺ Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 12: 487A-487A.
19. Bonilla, M y Cunningham, KW. (2003) Mitogen-Activated Protein Kinase Stimulation of Ca²⁺ Signaling is Required for Survival of Endoplasmic Reticulum Stress in Yeast. *Molecular Biology of the Cell* 14: 4296-4305.
20. Bourbonnais, R y Paice, MG. (1990) Oxidation of Non-Phenolic Substrates. An Expanded Role for Laccase in Lignin Biodegradation. *FEBS Letters* 267: 99-102.
21. Brake, AJ. (1989) Secretion of Heterologous Proteins Directed by the Yeast Alpha-Factor Leader. *Biotechnology* 13:269-280.
22. Brake, AJ. (1990) α -Factor Leader-Directed Secretion of Heterologous Proteins from Yeast. *Methods in Enzymology* 185: 408-421.

23. Brake, AJ, Merryweather, JP, Coit, DG, Heberlein, UA, Masiarz, FR, Mullenbach, GT, Urdea, MS, Valenzuela, P, y Barr, PJ. (1984) α -Factor-Directed Synthesis and Secretion of Mature Foreign Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 81: 4642-4646.
24. Buchhaupt, M, Ehrich, K, Hüttmann, S, Guder, J, y Schrader, J. (2011) Over-Expression of Chloroperoxidase in *Caldariomyces fumago*. *Biotechnology Letters* 33: 2225-2231.
25. Bulter, T, Alcalde, M, Sieber, V, Meinhold, P, Schlachtbauer, C, y Arnold, FH. (2003a) Functional Expression of a Fungal Laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by Directed Evolution. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 987-995.
26. Bulter, T y Alcalde, M. (2003b) Preparing Libraries in *Saccharomyces cerevisiae*. En *Directed Evolution Library Creation. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* 231. Eds. Arnold, FH y Georgiou, G. Humana Press, Totowa, New Jersey: 17-22.
27. Buswell, JA y Odier, E. (1987) Lignin Biodegradation. *Critical Reviews in Biotechnology* 6: 1-60.
28. Cadwell, RC y Joyce, GF. (1994) Mutagenic PCR. *PCR-Methods and Applications* 3: S136-S140.
29. Camarero, S, Böckle, B, Martínez, MJ, y Martínez, AT. (1996) Manganese-Mediated Lignin Degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1070-1072.
30. Camarero, S, Galletti, GC, y Martínez, AT. (1994) Preferential Degradation of Phenolic Lignin Units by two White-Rot Fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4509-4516.
31. Camarero, S, Ibarra, D, Martínez, MJ, y Martínez, AT. (2005) Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1775-1784.
32. Camarero, S, Pardo, I, Cañas, AI, Molina, P, Record, E, Martínez, AT, Martínez, MJ, y Alcalde, M. (2012) Engineering Platforms for Directed Evolution of Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 1370-1384.

33. Camarero, S, Sarkar, S, Ruiz-Dueñas, FJ, Martínez, MJ, y Martínez, AT. (1999) Description of a Versatile Peroxidase Involved in the Natural Degradation of Lignin that has both Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase Substrate Interaction Sites. *Journal of Biological Chemistry* 274: 10324-10330.
34. Canetta, E, Adya, AK, y Walker, GM. (2006) Atomic Force Microscopic Study of the Effects of Ethanol on Yeast Cell Surface Morphology. *FEMS Microbiology Letters* 255: 308-315.
35. Cereghino, JL y Cregg, JM. (2000) Heterologous Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 45-66.
36. Chen, KQ y Arnold, FH. (1993) Tuning the Activity of an Enzyme for Unusual Environments: Sequential Random Mutagenesis of Subtilisin E for Catalysis in Dimethylformamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 5618-5622.
37. Cherry, JR y Fidantsef, AL. (2003) Directed Evolution of Industrial Enzymes: an Update. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 438-443.
38. Cherry, JR, Lamsa, MH, Schneider, P, Vind, J, Svendsen, A, Jones, A, y Pedersen, AH. (1999) Directed Evolution of a Fungal Peroxidase. *Nature Biotechnology* 17: 379-384.
39. Cirino, PC y Arnold, FH. (2002) Exploring the Diversity of Heme Enzymes Through Directed Evolution. En *Directed Molecular Evolution of Proteins*. Eds. Brakmann, S y Johnsson, K. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 215-243.
40. Cirino, PC, Mayer, KM, y Umeno, D (2003) Generating Mutant Libraries Using Error-Prone PCR. En *Directed Evolution Library Creation. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* 231. Eds. Arnold, FH y Georgiou, G. Humana Press, Totowa, New Jersey: 3-9.
41. Coco, WM, Levinson, WE, Crist, MJ, Hektor, HJ, Darzins, A, Pienkos, PT, Squires, CH, y Monticello, DJ. (2001) DNA Shuffling Method for Generating Highly Recombined Genes and Evolved Enzymes. *Nature Biotechnology* 19: 354-359.
42. Conesa, A, van den Hondel, CAMJ, y Punt, PJ. (2000) Studies on the Production of Fungal Peroxidases in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3016-3023.
43. Conesa, A, Punt, PJ, y van den Hondel, CAMJ. (2002) Fungal Peroxidases: Molecular Aspects and Applications. *Journal of Biotechnology* 93: 143-158.

44. Conesa, A, van de Velde, F, van Rantwijk, F, Sheldon, RA, van den Hondel, CAMJ, y Punt, PJ. (2001) Expression of the *Caldariomyces fumago* Chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and Characterization of the Recombinant Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 276: 17635-17640.
45. Cooper, A y Bussey, H. (1989) Characterization of the Yeast KEX1 Gene Product: a Carboxypeptidase Involved in Processing Secreted Precursor Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 9: 2706-2714.
46. Crawford, DL. (1981) Microbial Conversions of Lignin to Useful Chemicals Using Lignin-Degrading *Streptomyces*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 11: 275-291.
47. Cunningham, KW. (2011) Acidic Calcium Stores of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Calcium* 50: 129-138.
48. Daly, R y Hearn, MTW. (2005) Expression of Heterologous Proteins in *Pichia pastoris*: a Useful Experimental Tool in Protein Engineering and Production. *Journal of Molecular Recognition* 18: 119-138.
49. Damhus, T, Kirk, O, Pedersen, G, y García Venegas, M. (1991) Dye Transfer Inhibition. PCT/DK1990/000261.
50. de Weert, S y Lokman, BC. (2010) Heterologous Expression of Peroxidases. En *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts*. Eds. Torres, E y Ayala, M. Springer, Heidelberg, Alemania: 315-333.
51. Doyle, WA y Smith, AT. (1996) Expression of Lignin Peroxidase H8 in *Escherichia coli*: Folding and Activation of the Recombinant Enzyme with Ca²⁺ and Haem. *Biochemical Journal* 315: 15-19.
52. Du, J, Shao, Z, y Zhao, H. (2011) Engineering Microbial Factories for Synthesis of Value-Added Products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38: 873-890.
53. Dunford, HB. (1999) Heme Peroxidases, Wiley-VCH, New York.
54. Eibes, GM, Lu-Chau, TA, Ruiz-Dueñas, FJ, Feijoo, G, Martínez, MJ, Martínez, AT, y Lema, JM. (2009) Effect of Culture Temperature on the Heterologous Expression of *Pleurotus eryngii* Versatile Peroxidase in *Aspergillus* Hosts. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32: 129-134.
55. Eijsink, VGH, Gøseidnes, S, Borchert, TV, y van den Burg, B. (2005) Directed Evolution of Enzyme Stability. *Biomolecular Engineering* 22: 21-30.

56. Elrod, SL, Cherry, JR, y Aubrey, J. (1997) Method for Increasing Hemoprotein Production in Filamentous Fungi. PCT/US1997/010003.
57. Eriksson, K-EL, Blanchette, RA, y Ander, P. (1990) Microbial and Enzymatic Degradation of Wood Components, Springer-Verlag, Berlin.
58. Farinas, ET, Bulter, T, y Arnold, FH. (2001) Directed Enzyme Evolution. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 545-551.
59. Fernández-Cuartero, B. (1994) La Ruta Biosintética del Hemo en Diabetes Mellitus Humana y Experimental. Tesis. Universidad Complutense de Madrid.
60. Gardner, LC, Smith, SJ, y Cox, TM. (1991) Biosynthesis of δ -Aminolevulinic Acid and the Regulation of Heme Formation by Immature Erythroid Cells in Man. *Journal of Biological Chemistry* 266: 22010-22018.
61. George, SJ, Kvaratskhelia, M, Dilworth, MJ, y Thorneley, RNF. (1999) Reversible Alkaline Inactivation of Lignin Peroxidase Involves the Release of both the Distal and Proximal Site Calcium Ions and Bishistidine Co-Ordination of the Haem. *Biochemical Journal* 344: 237-244.
62. Gianfreda, L, Xu, F, y Bollag, JM. (1999) Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal* 3: 1-26.
63. Gibbs, MD, Nevalainen, KMH, y Bergquist, PL. (2001) Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling (DOGS): a Method for Enhancing the Frequency of Recombination with Family Shuffling. *Gene* 271: 13-20.
64. Glenn, JK, Morgan, MA, Mayfield, MB, Kuwahara, M, y Gold, MH. (1983) An Extracellular H_2O_2 -Requiring Enzyme Preparation Involved in Lignin Biodegradation by the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 114: 1077-1083.
65. González-Pérez, D, García-Ruiz, E, y Alcalde, M. (2012) *Saccharomyces cerevisiae* in Directed Evolution: An Efficient Tool to Improve Enzymes. *Bioengineered* 3: 172-177.
66. Gu, L, Lajoie, C, y Kelly, C. (2003) Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* Manganese Peroxidase Gene in the Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress* 19: 1403-1409.
67. Guillén, F y Evans, CS. (1994a) Anisaldehyde and Veratraldehyde Acting as Redox Cycling Agents for H_2O_2 Production by *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2811-2817.

68. Guillén, F, Martínez, AT, y Martínez, MJ. (1990) Production of Hydrogen Peroxide by Aryl-Alcohol Oxidase from the Ligninolytic Fungus *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32: 465-469.
69. Guillén, F, Martínez, AT, Martínez, MJ, y Evans, CS. (1994b) Hydrogen Peroxide-Producing System of *Pleurotus eryngii* Involving the Extracellular Enzyme Aryl-Alcohol Oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41: 465-470.
70. Gumulya, Y y Reetz, MT. (2011) Enhancing the Thermal Robustness of an Enzyme by Directed Evolution: Least Favorable Starting Points and Inferior Mutants can Map Superior Evolutionary Pathways. *Chembiochem* 12: 2502-2510.
71. Hage, A, Schoemaker, HE, y Field, JA. (1999) Reduction of Aryl Acids by White-Rot Fungi for the Biocatalytic Production of Aryl Aldehydes and Alcohols. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 834-838.
72. Hammel, KE. (1997) Fungal Degradation of Lignin. En *Plant Litter Quality and Decomposition*. Eds. Cadisch, G y Giller, KE. CAB International, London: 33-45.
73. Heinfling, A, Ruiz-Dueñas, FJ, Martínez, MJ, Bergbauer, M, Szewzyk, U, y Martínez, AT. (1998a) A Study on Reducing Substrates of Manganese-Oxidizing Peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Letters* 428: 141-146.
74. Heinfling, A, Martínez, MJ, Martínez, AT, Bergbauer, M, y Szewzyk, U. (1998b) Purification and Characterization of Peroxidases from the Dye-Decolorizing Fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiology Letters* 165: 43-50.
75. Herman, A y Tawfik, DS. (2007) Incorporating Synthetic Oligonucleotides via Gene Reassembly (ISOR): a Versatile Tool for Generating Targeted Libraries. *Protein Engineering* 20: 219-226.
76. Hidalgo, A, Schließmann, A, Molina, R, Hermoso, J, y Bornscheuer, UT. (2008) A One-Pot, Simple Methodology for Cassette Randomisation and Recombination for Focused Directed Evolution. *Protein Engineering* 21: 567-576.
77. Higuchi, T. (1990) Lignin Biochemistry: Biosynthesis and Biodegradation. *Wood Science Technology* 24: 23-63.
78. Hondel, CAMJ, Punt, PJ, y Gorcom, RFM. (1992) Production of Extracellular Proteins by the Filamentous Fungus *Aspergillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 61: 153-160.
79. Horton, R, Sai, Z, Ho, S, y Pease, L. (1990) Gene-Splicing by Overlap Extension Tailor-Made Gene Using the Polymerase Chain-Reaction. *BioTechniques* 8: 528-

80. Horton, RM, Hunt, HD, Ho, SN, Pullen, JK, y Pease, LR. (1989) Engineering Hybrid Genes without the use of Restriction Enzymes: Gene Splicing by Overlap Extension. *Gene* 77: 61-68.
81. Hwan Kim, Y, Suk An, E, Keun Song, B, Shik Kim, D, y Chelikani, R. (2003) Polymerization of Cardanol using Soybean Peroxidase and its Potential Application as Anti-Biofilm Coating Material. *Biotechnology Letters* 25: 1521-1524.
82. Iffland, A, Gendreizig, S, Tafelmeyer, P, y Johnsson, K. (2001) Changing the Substrate Specificity of Cytochrome c Peroxidase Using Directed Evolution. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286: 126-132.
83. Iffland, A, Tafelmeyer, P, Saudan, C, y Johnsson, K. (2000) Directed Molecular Evolution of Cytochrome c Peroxidase. *Biochemistry* 39: 10790-10798.
84. Inoue, H, Nojima, H, y Okayama, H. (1990) High Efficiency Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Gene* 96: 23-28.
85. Iwahara, K, Hirata, M, Honda, Y, Watanabe, T, y Kuwahara, M. (2000) Free-Radical Polymerization of Acrylamide by Manganese Peroxidase Produced by the White-Rot Basidiomycete *Bjerkandera adusta*. *Biotechnology Letters* 22: 1355-1361.
86. Jaeger, KE y Eggert, T. (2004) Enantioselective Biocatalysis Optimized by Directed Evolution. *Current Opinion in Biotechnology* 15: 305-313.
87. Jensen, KA, Bao, W, Kawai, S, Srebotnik, E, y Hammel, KE. (1996) Manganese-Dependent Cleavage of Nonphenolic Lignin Structures by *Ceriporiopsis subvermispota* in the Absence of Lignin Peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3679-3686.
88. Kaplan, J, McVey Ward, D, Crisp, RJ, y Philpott, CC. (2006) Iron-Dependent Metabolic Remodeling in *S. cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763: 646-651.
89. Kersten, PJ y Kirk, TK. (1987) Involvement of a New Enzyme, Glyoxal Oxidase, in Extracellular H₂O₂ Production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* 169: 2195-2201.
90. Khindaria, A, Yamazaki, I, y Aust, SD. (1996) Stabilization of the Veratryl Alcohol Cation Radical by Lignin Peroxidase. *Biochemistry* 35: 6418-6424.

91. Kim, SJ, Lee, JA, Kim, YH, y Song, BK. (2009) Optimization of the Functional Expression of *Coprinus cinereus* Peroxidase in *Pichia pastoris* by Varying the Host and Promoter. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 966-971.
92. Kirk, TK. (1983) Degradation and Conversion of Lignocelluloses. En *The Filamentous Fungi. Vol. 4. Fungal Technology*. Eds. Smith, JE, Berry, BR, y Kristiansen, B. Arnold, E. Londres: 266-294.
93. Kishi, K, Hildebrand, DP, Kusters-van Someren, M, Gettemy, J, Mauk, AG, y Gold, MH. (1997) Site-Directed Mutations at Phenylalanine-190 of Manganese Peroxidase: Effect on Stability, Functions and Coordination. *Biochemistry* 36: 4268-4277.
94. Kolkman, JA. (2001) Directed Evolution of Proteins by Exon Shuffling. *Nature Biotechnology* 19: 423-428.
95. Kondo, R, Harazono, K, y Sakai, K. (1994) Bleaching of Hardwood Kraft Pulp with Manganese Peroxidase Secreted from *Phanerochaete sordida* YK-624. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4359-4363.
96. Kumar, R y Rajagopal, K. (2008) Single-Step Overlap-Primer-Walk Polymerase Chain Reaction for Multiple Mutagenesis without Overlap Extension. *Analytical Biochemistry* 377: 105-107.
97. Kuwahara, M, Glenn, JK, Morgan, MA, y Gold, MH. (1984) Separation and Characterization of two Extracellular H₂O₂-Dependent Oxidases from Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 169: 247-250.
98. Laemmli, UK. (1970) Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
99. Lisov, AV, Leontievsky, AA, y Golovleva, LA. (2007) Hybrid Mn-Peroxidases from Basidiomycetes. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43: 536-543.
100. Lokman, BC, Joosten, V, Hovenkamp, J, Gouka, RJ, Verrips, CT, y van den Hondel, CAMJ. (2003) Efficient Production of *Arthromyces ramosus* Peroxidase by *Aspergillus awamori*. *Journal of Biotechnology* 103: 183-190.
101. Lu-Chau, TA, Ruiz-Dueñas, FJ, Camarero, S, Feijoo, G, Martínez, MJ, Lema, JM, y Martínez, AT. (2004) Effect of pH on the Stability of *Pleurotus eryngii* Versatile Peroxidase during Heterologous Production in *Emericella nidulans*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 26: 287-293.

102. Lutz, S, Ostermeier, M, Moore, GL, Maranas, CD, y Benkovic, SJ. (2001) Creating Multiple-Crossover DNA Libraries Independent of Sequence Identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 11248-11253.
103. Ma, B, Mayfield, MB, y Gold, MH. (2003) Homologous Expression of *Phanerochaete chrysosporium* Manganese Peroxidase, using Bialaphos Resistance as a Dominant Selectable Marker. *Current Genetics* 43: 407-414.
104. Mañas Nuñez, PI. (1997) Aportaciones al Conocimiento del Proceso de Glicosilación de Levaduras. Aislamiento y Caracterización de Mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* con Defectos en dicho Proceso. Tesis. Universidad de Extremadura.
105. Marques, G, Gamelas, JAF, Ruiz-Dueñas, FJ, del Río, JC, Evtuguin, DV, Martínez, AT, y Gutiérrez, A. (2010) Delignification of Eucalypt Kraft Pulp with Manganese-Substituted Polyoxometalate Assisted by Fungal Versatile Peroxidase. *Bioresource Technology* 101: 5935-5940.
106. Martínez, AT. (2007) High Redox Potential Peroxidases. En *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Eds. Polaina, J y MacCabe, AP. Springer, Berlin: 475-486.
107. Martínez, AT, Ruiz-Dueñas, FJ, Camarero, S, Pérez-Boada, M, Ferreira, P, Gómez-Toribio, V, Guillén, F, y Martínez, MJ. (2002) Enzyme Characterization and Biotechnical Potential of *Pleurotus* Oxidoreductases Involved in Lignin Degradation. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 223rd: Orlando, 7-11 April: 029.
108. Martínez, MJ, Ruiz-Dueñas, FJ, Guillén, F, y Martínez, AT. (1996) Purification and Catalytic Properties of two Manganese Peroxidase Isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* 237: 424-432.
109. Marza, E, Camougrand, N, y Manon, Sp. (2002) Bax Expression Protects Yeast Plasma Membrane against Ethanol-Induced Permeabilization. *FEBS Letters* 521: 47-52.
110. Maté, D, García-Burgos, C, García-Ruiz, E, Ballesteros, A, Camarero, S, y Alcalde, M. (2010) Laboratory Evolution of High-Redox Potential Laccases. *Chemistry & Biology* 17: 1030-1041.
111. Maté, D, García-Ruiz, E, Camarero, S, y Alcalde, M. (2011) Directed Evolution of Fungal Laccases. *Current Genomics* 12: 113-122.
112. May, SW. (1999) Applications of Oxidoreductases. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 370-375.

113. Miki, Y, Morales, M, Ruiz-Dueñas, FJ, Martínez, MJ, Wariishi, H, y Martínez, AT. (2009) *Escherichia coli* Expression and *in vitro* Activation of a Unique Ligninolytic Peroxidase that has a Catalytic Tyrosine Residue. *Protein Expression and Purification* 68: 208-214.
114. Miki, Y, Tanaka, H, Nakamura, M, y Wariishi, H. (2006) Isolation and Characterization of a Novel Lignin Peroxidase from the White-Rot Basidiomycete *Trametes cervina*. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University* 51: 99-104.
115. Miki, Y, Calviño, FR, Pogni, R, Giansanti, S, Ruiz-Dueñas, FJ, Martínez, MJ, Basosi, R, Romero, A, y Martínez, AT. (2011) Crystallographic, Kinetic, and Spectroscopic Study of the First Ligninolytic Peroxidase Presenting a Catalytic Tyrosine. *Journal of Biological Chemistry* 286: 15525-15534.
116. Miyazaki-Imamura, C, Oohira, K, Kitagawa, R, Nakano, H, Yamane, T, y Takahashi, H. (2003) Improvement of H₂O₂ Stability of Manganese Peroxidase by Combinatorial Mutagenesis and High-Throughput Screening Using *in vitro* Expression with Protein Disulfide Isomerase. *Protein Engineering* 16: 423-428.
117. Mohorcic, M, Bencina, M, Friedrich, J, y Jerala, R. (2009) Expression of Soluble Versatile Peroxidase of *Bjerkandera adusta* in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology* 100: 851-858.
118. Morales Esteban, M. (2009) Caracterización de Diferentes Sitios de Oxidación de Sustratos en la Peroxidasa Versátil de *Pleurotus eryngii*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
119. Morawski, B, Lin, Z, Cirino, P, Joo, H, Bandara, G, y Arnold, FH. (2000) Functional Expression of Horseradish Peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Protein Engineering* 13: 377-384.
120. Morawski, B, Quan, S, y Arnold, FH. (2001) Functional Expression and Stabilization of Horseradish Peroxidase by Directed Evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 76: 99-107.
121. Moreira, M, Feijoo, G, Canaval, J, y Lema, J. (2003) Semipilot-Scale Bleaching of Kraft Pulp with Manganese Peroxide. *Wood Science and Technology* 37: 117-123.
122. Murakami, H, Hohsaka, T, y Sisido, M. (2002) Random Insertion and Deletion of Arbitrary Number of Bases for Codon-Based Random Mutation of DNAs. *Nature Biotechnology* 20: 76-81.
123. Nie, G y Aust, SD. (1997) Effect of Calcium on the Reversible Thermal Inactivation of Lignin Peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 337: 225-231.

124. Ortiz de Montellano, PR. (2010) Catalytic Mechanisms of Heme Peroxidases. En *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts*. Eds. Torres, E y Ayala, M. Springer, Heidelberg, Alemania: 79-107.
125. Ostermeier, M, Shim, JH, y Benkovic, SJ. (1999) A Combinatorial Approach to Hybrid Enzymes Independent of DNA Homology. *Nature Biotechnology* 17: 1205-1209.
126. Paniagua, R, Nistal, M, Sesma, P, Álvarez-Uria, M, Fraile, B, Anadón, R, Sáez, FJ, y de Miguel, MP. (1998) Membrana Plasmática y Superficie Celular. En *Citología e Histología Vegetal y Animal*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid: 33-93.
127. Parekh, R, Forrester, K, y Wittrup, D. (1995) Multicopy Overexpression of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor Saturates the Protein Folding and Secretory Capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification* 6: 537-545.
128. Pérez Boada, M. (2003) Expresión Heteróloga y Estudios Estructura-Función de una Nueva Peroxidasa Versátil de *Pleurotus eryngii*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
129. Pérez-Boada, M, Doyle, WA, Ruiz-Dueñas, FJ, Martínez, MJ, Martínez, AT, y Smith, AT. (2002) Expression of *Pleurotus eryngii* Versatile Peroxidase in *Escherichia coli* and Optimisation of *in vitro* Folding. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 518-524.
130. Pérez-Boada, M, Ruiz-Dueñas, FJ, Pogni, R, Basosi, R, Choinowski, T, Martínez, MJ, Piontek, K, y Martínez, AT. (2005) Versatile Peroxidase Oxidation of High Redox Potential Aromatic Compounds: Site-Directed Mutagenesis, Spectroscopic and Crystallographic Investigation of three Long-Range Electron Transfer Pathways. *Journal of Molecular Biology* 354: 385-402.
131. Philpott, CC. (2006) Iron Uptake in Fungi: a System for Every Source. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763: 636-645.
132. Piper, PW. (1995) The Heat-Shock and Ethanol Stress Responses of Yeast Exhibit Extensive Similarity and Functional Overlap. *FEMS Microbiology Letters* 134: 121-127.
133. Polizzi, KM, Bommarius, AS, Broering, JM, y Chaparro-Riggers, JF. (2007) Stability of Biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 11: 220-225.
134. Punt, PJ, van Biezen, N, Conesa, A, Albers, A, Mangnus, J, y van den Hondel, C. (2002) Filamentous Fungi as Cell Factories for Heterologous Protein Production. *Trends in Biotechnology* 20: 200-206.

135. Qian, Z y Lutz, S. (2005) Improving the Catalytic Activity of *Candida antarctica* Lipase B by Circular Permutation. *Journal of the American Chemical Society* 127: 13466-13467.
136. Rai, GP. (2000) Isolation of Directed Evolution Mutants of Chloroperoxidase Resistant to Suicide Inactivation by Primary Olefins. *Israel Journal of Chemistry* 40: 63-70.
137. Rai, G, Sakai, S, Florez, A, y Mogollon, LL. (2001) Directed Evolution of Chloroperoxidase for Improved Epoxidation and Chlorination Catalysis. *Advanced Synthesis & Catalysis* 343: 638-645.
138. Rainio, A, Maijala, P, Hildén, K, y Hatakka, A. (2008) A Novel Peroxidase from the White-Rot Fungus *Cerrena unicolor*. *Proceedings of the 8th International Peroxidase Symposium, Tampere, 20-23 August*.
139. Rakestraw, JA, Sazinsky, SL, Piatasi, A, Antipov, E, y Wittrup, KD. (2009) Directed Evolution of a Secretary Leader for the Improved Expression of Heterologous Proteins and Full-Length Antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 103: 1192-1201.
140. Reetz, MT y Carballeira, JD. (2007) Iterative Saturation Mutagenesis (ISM) for Rapid Directed Evolution of Functional Enzymes. *Nature Protocols* 2: 891-903.
141. Regalado, C, García-Almendárez, BE, y Duarte-Vázquez, MA. (2004) Biotechnological Applications of Peroxidases. *Phytochemistry Reviews* 3: 243-256.
142. Romero, PA y Arnold, FH. (2009) Exploring Protein Fitness Landscapes by Directed Evolution. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 866-876.
143. Ruiz Dueñas, FJ y Martínez, AT. (2009) Microbial Degradation of Lignin: How a Bulky Recalcitrant Polymer is Efficiently Recycled in Nature and How we can Take Advantage of this. *Microbial Biotechnology* 2: 164-177.
144. Ruiz-Dueñas, FJ, Camarero, S, Pérez-Boada, M, Martínez, MJ, y Martínez, AT. (2001) A new Versatile Peroxidase from *Pleurotus*. *Biochemical Society Transactions* 29: 116-122.
145. Ruiz-Dueñas, FJ, Martínez, MJ, y Martínez, AT. (1999a) Molecular Characterization of a Novel Peroxidase Isolated from the Ligninolytic Fungus *Pleurotus eryngii*. *Molecular Microbiology* 31: 223-235.
146. Ruiz-Dueñas, FJ, Morales, M, García, E, Miki, Y, Martínez, MJ, y Martínez, AT. (2009a) Substrate Oxidation Sites in Versatile Peroxidase and other Basidiomycete Peroxidases. *Journal of Experimental Botany* 60: 441-452.

147. Ruiz-Dueñas, FJ, Morales, M, Mate, MJ, Romero, A, Martínez, MJ, Smith, AT, y Martínez, AT. (2008) Site-Directed Mutagenesis of the Catalytic Tryptophan Environment in *Pleurotus eryngii* Versatile Peroxidase. *Biochemistry* 47: 1685-1695.
148. Ruiz-Dueñas, FJ, Morales, M, Pérez-Boada, M, Choinowski, T, Martínez, MJ, Piontek, K, y Martínez, AT. (2007) Manganese Oxidation Site in *Pleurotus eryngii* Versatile Peroxidase: a Site-Directed Mutagenesis, Kinetic, and Crystallographic Study. *Biochemistry* 46: 66-77.
149. Ruiz-Dueñas, FJ, Pogni, R, Morales, M, Giansanti, S, Mate, MJ, Romero, A, Martínez, MJ, Basosi, R, y Martínez, AT. (2009b) Protein Radicals in Fungal Versatile Peroxidase Catalytic Tryptophan Radical in both Compound I and Compound II and Studies on W164Y, W164H, and W164S Variants. *Journal of Biological Chemistry* 284: 7986-7994.
150. Ruiz-Dueñas, FJ, Martínez, MJ, y Martínez, AT. (1999b) Heterologous Expression of *Pleurotus eryngii* Peroxidase Confirms its Ability to Oxidize Mn²⁺ and Different Aromatic Substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4705-4707.
151. Ruzgas, T, Csöregi, E, Katakis, I, Kenausis, G, y Gorton, L. (1996) Preliminary Investigations of an Amperometric Oligosaccharide Dehydrogenase-Based Electrode for the Detection of Glucose and some other Low Molecular Weight Saccharides. *Journal of Molecular Recognition* 9: 480-484.
152. Ryu, K, Hwang, SY, Kim, KH, Kang, JH, y Lee, EK. (2008a) Functionality Improvement of Fungal Lignin Peroxidase by DNA Shuffling for 2,4-Dichlorophenol Degradability and H₂O₂ Stability. *Journal of Biotechnology* 133: 110-115.
153. Ryu, K, Kang, JH, Wang, LS, y Lee, EK. (2008b) Expression in Yeast of Secreted Lignin Peroxidase with Improved 2,4-Dichlorophenol Degradability by DNA Shuffling. *Journal of Biotechnology* 135: 241-246.
154. Salazar, O, Cirino, PC, y Arnold, FH. (2003) Thermostabilization of a Cytochrome P450 Peroxygenase. *Chembiochem* 4: 891-893.
155. Sambrook, J, Fritsch, EF, y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.
156. Schimmel, DS, Enting, I, Heimann, M, Wigley, TM, Raynaud, D, Alves, D, y Siegenthaler, U. (1994) CO₂ and the Carbon Cycle. En *IPCC Report. Climate Change 1994. Radiative Forcing of Climate Change*. Eds. Houghton, JT, Filho, LGM, Bruce, J, Lee, H, Callander, BA, Haites, E, Harris, N, y Maskell, K. Cambridge University Press, Cambridge: 39-71.

157. Shao, Z, Zhao, H, y Zhao, H. (2009) DNA Assembler, an *in vivo* Genetic Method for Rapid Construction of Biochemical Pathways. *Nucleic Acids Research* 37: e16-e16.
158. Shin, H, Guebitz, G, y Cavaco-Paulo, A. (2001) "In situ" Enzymatically Prepared Polymers for Wool Coloration. *Macromolecular Materials and Engineering* 286: 691-694.
159. Shuster, JR. (1991) Gene Expression in Yeast: Protein Secretion. *Current Opinion in Biotechnology* 2: 685-690.
160. Sieber, V, Martinez, C, y Arnold, F. (2001) Libraries of Hybrid Proteins from Distantly Related Sequences. *Nature Biotechnology* 19: 456-460.
161. Singh, A, Ma, D, y Kaplan, DL. (2000) Enzyme-Mediated Free Radical Polymerization of Styrene. *Biomacromolecules* 1: 592-596.
162. Smith, AT, Santama, N, Dacey, S, Edwards, M, Bray, RC, Thorneley, RNF, y Burke, JF. (1990) Expression of a Synthetic Gene for Horseradish Peroxidase C in *Escherichia coli* and Folding and Activation of the Recombinant Enzyme with Ca²⁺ and Heme. *Journal of Biological Chemistry* 265: 13335-13343.
163. Sollewijn Gelpke, MD, Mayfield-Gambill, M, Lin Cereghino, GP, y Gold, MH. (1999) Homologous Expression of Recombinant Lignin Peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1670-1674.
164. Sottomayor, M, DiCosmo, F, y Ros Barceló, A. (1997) On the Fate of Catharanthine and Vindoline During the Peroxidase-Mediated Enzymatic Synthesis of α -3',4'-Anhydrovinblastine. *Enzyme and Microbial Technology* 21: 543-549.
165. Stemmer, WPC. (1994) Rapid Evolution of a Protein *in vitro* by DNA Shuffling. *Nature* 370: 389-391.
166. Stewart, P, Whitwam, RE, Kersten, PJ, Cullen, D, y Tien, M. (1996) Efficient Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* Manganese Peroxidase Gene in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 860-864.
167. Sutherland, GRJ y Aust, SD. (1996) The Effects of Calcium on the Thermal Stability and Activity of Manganese Peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 332: 128-134.
168. Sutherland, GRJ, Zapanta, LS, Tien, M, y Aust, SD. (1997) Role of Calcium in Maintaining the Heme Environment of Manganese Peroxidase. *Biochemistry* 36: 3654-3662.

169. Takao, S. (1965) Organic Acid Production by Basidiomycetes. *Archives of Microbiology* 13: 732-737.
170. Tao, H y Cornish, VW. (2002) Milestones in Directed Enzyme Evolution. *Current Opinion in Chemical Biology* 6: 858-864.
171. Thurston, CF. (1994) The Structure and Function of Fungal Laccases. *Microbiology* 140: 19-26.
172. Tien, M y Kirk, TK. (1983) Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221: 661-663.
173. Timofeevski, SL y Aust, SD. (1997) Kinetics of Calcium Release from Manganese Peroxidase during Thermal Inactivation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 342: 169-175.
174. Ton, VK y Rao, R. (2004) Functional Expression of Heterologous Proteins in Yeast: Insights into Ca²⁺ Signaling and Ca²⁺-Transporting ATPases. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 287: C580-C589.
175. Tsukihara, T, Honda, Y, Sakai, R, Watanabe, T, y Watanabe, T. (2006) Exclusive Overproduction of Recombinant Versatile Peroxidase MnP2 by Genetically Modified White-Rot Fungus, *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biotechnology* 126: 431-439.
176. Valderrama, B. (2010) Deactivation of Hemeperoxidases by Hydrogen Peroxide: Focus on Compound III. En *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts*. Eds. Torres, E y Ayala, M. Springer, Heidelberg: 291-314.
177. Valderrama, B, Ayala, M, y Vazquez-Duhalt, R. (2002) Suicide Inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering more Robust Enzymes. *Chemistry & Biology* 9: 555-565.
178. van de Laar, T, Visser, C, Holster, M, López, CGa, Kreuning, D, Sierkstra, L, Lindner, N, y Verrips, T. (2007) Increased Heterologous Protein Production by *Saccharomyces cerevisiae* Growing on Ethanol as Sole Carbon Source. *Biotechnology and Bioengineering* 96: 483-494.
179. Varela, E, Martínez, AT, y Martínez, MJ. (1999) Molecular Cloning of Aryl-Alcohol Oxidase from *Pleurotus eryngii*, an Enzyme Involved in Lignin Degradation. *Biochemical Journal* 341: 113-117.

180. Verdín, J, Pogni, R, Baeza, A, Baratto, MC, Basosi, R, y Vázquez-Duhalt, R. (2006) Mechanism of Versatile Peroxidase Inactivation by Ca²⁺ Depletion. *Biophysical Chemistry* 121: 163-170.
181. Wang, H, Lu, F, Sun, Y, y Du, L. (2004) Heterologous Expression of Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia methanolica*. *Biotechnology Letters* 26: 1569-1573.
182. Wang, M, Si, T, y Zhao, H. (2012) Biocatalyst Development by Directed Evolution. *Bioresource Technology* 115: 117-125.
183. Welinder, KG. (1992) Superfamily of Plant, Fungal and Bacterial Peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2: 388-393.
184. Whitwam, RE, Gazarian, IG, y Tien, M. (1995) Expression of Fungal Mn Peroxidase in *E. coli* and Refolding Yield Active Enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216: 1013-1017.
185. Williams, GJ, Nelson, AS, y Berry, A. (2004) Directed Evolution of Enzymes for Biocatalysis and the Life Sciences. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 3034-3046.
186. Wolframm, C, van Pée, KH, y Lingens, F. (1988) Cloning and High-Level Expression of a Chloroperoxidase Gene from *Pseudomonas pyrrocinia* in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 238: 325-328.
187. Yoshida, H. (1883) Chemistry of Lacquer (Urushi). *Journal of the Chemical Society, Transactions* 43: 472-486.
188. Youngs, HL, Moënné-Loccoz, P, Loehr, TM, y Gold, MH. (2000) Formation of a Bis(Histidyl) Heme Iron Complex in Manganese Peroxidase at High pH and Restoration of the Native Enzyme Structure by Calcium. *Biochemistry* 39: 9994-10000.
189. Zhao, H, Giver, L, Shao, Z, Affholter, JA, y Arnold, FH. (1998) Molecular Evolution by Staggered Extension Process (StEP) *in vitro* Recombination. *Nature Biotechnology* 16: 258-261.
190. Zhao, H, Moore, JC, Volkov, AA, y Arnold, FH. (1999) Method for Optimizing Industrial Enzymes by Directed Evolution. En *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Eds. Demain, AL y Davies, JE. ASM Press, Washington, EEUU: 597-604.

191. Zhao, H y Zha, W. (2004) Evolutionary Methods for Protein Engineering. En *Enzyme Functionality. Design, Engineering and Screening*. Eds. Svendsen, A. Marcel Dekker, Inc, New York: 353-373.
192. Zhao, H y Zha, W. (2006) *In vitro* 'Sexual' Evolution Through the PCR-Based Staggered Extension Process (StEP). *Nature Protocols* 1: 1865-1871.
193. Zong, Q, Osmulski, PA, y Hager, LP. (1995) High-Pressure-Assisted Reconstitution of Recombinant Chloroperoxidase. *Biochemistry* 34: 12420-12425.
194. Zsebo, KM, Lu, HS, Fieschko, JC, Goldstein, L, Davis, J, Duker, K, Suggs, SV, Lai, PH, y Bitter, GA. (1986) Protein Secretion from *Saccharomyces cerevisiae* Directed by the Prepro-Alpha-Factor Leader Region. *Journal of Biological Chemistry* 261: 5858-5865.
195. Zumárraga, M, Camarero, S, Shleev, S, Martínez-Arias, A, Ballesteros, A, Plou, FJ, y Alcalde, M. (2008) Altering the Laccase Functionality by *in vivo* Assembly of Mutant Libraries with Different Mutational Spectra. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 71: 250-260.
196. Zumárraga, M, Bulter, T, Shleev, S, Polaina, J, Martínez-Arias, A, Plou, FJ, Ballesteros, A, y Alcalde, M. (2007) *In vitro* Evolution of a Fungal Laccase in High Concentrations of Organic Cosolvents. *Chemistry & Biology* 14: 1052-1064.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO I

El presente trabajo de investigación ha dado lugar a las siguientes publicaciones, patentes y comunicaciones en congresos:

I) Publicaciones científicas relacionadas con esta tesis doctoral

1. González-Pérez, D., García-Ruiz, E. y Alcalde, M. (2012) *Saccharomyces cerevisiae* in directed evolution. An efficient tool to improve enzymes. *Bioengineered* 3: 1-6.
2. García-Ruiz, E., González-Pérez, D., Ruiz-Dueñas, FJ., Martínez, AT. y Alcalde, M. (2012) Directed evolution of a temperature-, peroxide- and alkaline pH-tolerant versatile peroxidase. *Biochemical Journal* 441: 487-98.
3. García-Ruiz, E., Ruiz-Dueñas, FJ., Martínez, AT. y Alcalde, M. (2010) Directed molecular evolution of a versatile peroxidase: Functional expression and thermostabilization. En: *Proceedings of "Oxidative enzymes as sustainable industrial biocatalysts*. Eds.: Feijoo, G. y Moreira, M.T. Santiago de Compostela. ISBN-13: 978-84-614-2824-3: 120-125.
4. García-Ruiz, E., Maté, D., Ballesteros, A., Martínez, AT. y Alcalde M. (2010) Evolving thermostability in mutant libraries of ligninolytic oxidoreductases expressed in yeast. *Microbial Cell Factories* 9: 17-30.
5. Ruiz-Dueñas, F. J., Morales, M., García E., Miki, Y., Martínez, MJ., y Martínez, AT. (2008) Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *Journal of Experimental Botany* 60: 441–452.

II) Publicaciones científicas no relacionadas con esta tesis doctoral

1. Maté, D., García-Ruiz, E., Camarero, S., Shubin, VV., Falk, M., Shleev, S. y Alcalde, M. (2012). Switching from blue to yellow: Altering the spectral properties of a high redox potential laccase by directed evolution. *Biocatalysis and Biotransformations*. Aceptado.
2. Maté, D., Camarero, S., García-Ruiz, E. y Alcalde, M. (2011) Directed evolution of fungal laccases. *Current Genomics* 12: 113-122.
3. Maté, D., García-Burgos, C., García-Ruiz, E., Ballesteros, A., Camarero, S. y Alcalde, M. (2010) Laboratory evolution of high redox potential laccases. *Chemistry & Biology* 17: 1030-1041.

III) Patentes

1. García Ruiz, E., Martínez, MJ., Ruiz-Dueñas, FJ., Martínez, AT. y Alcalde, M. High-redox potential peroxidases designed by directed evolution. WO/2010/130862.

IV) Trabajos presentados en congresos

1. García-Ruiz, E., González-Pérez, D., Ruiz-Dueñas, FJ., Martínez, AT. y Alcalde, M. A temperature, peroxide and alkaline pH tolerant peroxidase designed by directed evolution. *9th International Conference on Protein Stabilisation (ProStab 2012)*. Lisboa (Portugal). Mayo 2012.
2. García-Ruiz, E., González-Pérez, D., Ruiz-Dueñas, FJ., Martínez, AT. y Alcalde, M. Directed evolution of versatile peroxidases. *10th International Symposium on Biocatalysis (Biotrans 2011)*. Giardini Naxos (Italia). Octubre 2011.
3. García-Ruiz, E., Maté, D., González-Pérez, D., Roman, A., Molina, P., Torres, P., Zumárraga, M., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, FJ. y Alcalde, M. *Saccharomyces cerevisiae* in directed evolution: an efficient tool to improve enzymes. *10th International Symposium on Biocatalysis (Biotrans 2011)*. Giardini Naxos (Italia). Octubre 2011.
4. García-Ruiz, E., Ruiz-Dueñas, FJ., Martínez, AT. y Alcalde, M. Improvement of a Versatile Peroxidase by directed molecular evolution: Functional expression and thermostabilization. *III Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana (CMIBM)*. Alcalá de Henares (España). Noviembre 2010.
5. Maté, D., García-Ruiz, E., Moshtaghioum, M., Camarero, S. y Alcalde, M. Directed evolution of a high-redox potential laccase in *Saccharomyces cerevisiae*: improving functional expression, thermostability and kinetic properties. *III Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana (CMIBM)*. Alcalá de Henares (España). Noviembre 2010.
6. García-Ruiz, E., Ruiz-Dueñas, FJ., Martínez, AT. y Alcalde, M. Directed molecular evolution of a Versatile Peroxidase: Functional expression and Thermostabilization. *Oxidative Enzymes as Sustainable Industrial Biocatalysts (OESIB)*. Santiago de Compostela (España). Septiembre 2010.

7. García-Ruiz, E., Martínez, AT. y Alcalde, M. Functional expression of a high-redox potential peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Teach-SG Workshop on Advanced Strategies for the Expression of Proteins and Protein Complexes in Yeast*. Barcelona (España). Noviembre 2009.
8. García-Ruiz, E., Ruiz-Dueñas, FJ., Martínez, MJ., Martínez, AT. y Alcalde, M. Functional expression of a ligninolytic peroxidase. *8th International Conference on Protein Stabilisation (ProStab2009)* Graz (Austria). Abril 2009.

8.2 ANEXO II

Secuencia completa del gen de fusión *avpl2*. Se indican las mutaciones introducidas en el mutante R4 y en el mutante 2-1B.

pre-líder del factor α (57pb, 19 aminoácidos); pro-líder del factor α (192pb, 64 aminoácidos); diana de corte de KEX2; diana de corte de STE13; diana de corte de EcoRI; proteína madura (990pb, 330 aminoácidos); mutaciones de R4 (presentes también en 2-1B); mutaciones exclusivas de 2-1B.

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

Evolución Dirigida de la Peroxidasa Versátil de *Pleurotus eryngii*

631	ATT	CCT	TTC	TTC	TTG	GGT	CGC	CCG	GAT	GCC	GTG	GCC	GCC	TCC	CCG	675
211	I	P	F	F	L	G	R	P	D	A	V	A	A	S	P	225
676	GAC	CAC	CTC	GTG	CCA	GAG	CCT	TTT	GAT	TCT	GTT	GAC	TCC	ATT	CTT	720
226	D	H	L	V	P	E	P	F	D	S	V	D	S	I	L	240
721	GCC	AGA	ATG	GGT	GAC	GCA	GGC	TTC	AGT	CCC	GCC	GAG	GTT	GTT	TGG	765
241	A	R	M	G	D	A	G	F	S	P	A	E	V	V	W	255
766	CTC	CTG	GCT	TCG	CAC	TCC	ATT	GCC	GCT	GCC	GAC	AAG	GTT	GAC	CCA	810
256	L	L	A	S	H	S	I	A	A	A	D	K	V	D	P	270
811	TCG	ATT	CCT	GGA	ATG	CCA	TTC	GAT	TCA	ACC	CCC	GGA	GTT	TTT	GAT	855
271	S	I	P	G	M	P	F	D	S	T	P	G	V	F	D	285
856	TCT	CAA	TTC	TTC	ATC	GAA	ACG	CTA	CTT	AAA	GGC	AGA	CTC	TTC	CCA	900
286	S	Q	F	F	I	E	T	L	L	K	G	R	L	F	P	300
901	GGC	ACT	GCT	GCC	AAC	AAG	GGA	GAA	GCC	CAA	TCT	CCA	TTG	CAA	GGA	945
301	G	T	A	A	N	K	G	E	A	Q	S	P	L	Q	G	315
946	GAG	ATC	AGG	CTT	CAG	TCC	GAT	CAC	TTG	TTG	GCT	AGA	GAC	CCC	CAG	990
316	E	I	R	L	Q	S	D	H	L	L	A	R	D	P	Q	330
991	ACT	GCC	TGC	GAA	TGG	CAG	TCC	ATG	GTT	AAC	AAC	CAA	CCG	AAG	ATT	1035
331	T	A	C	E	W	Q	S	M	V	N	N	Q	P	K	I	345
1036	CAG	AAC	CGT	TTC	GCT	GCT	ACC	ATG	TCG	AAG	ATG	GCT	CTT	CTT	GGC	1080
346	Q	N	R	F	A	A	T	M	S	K	M	A	L	L	G	360
1081	CAA	GAC	AAG	ACC	AAA	TTG	ATT	GAC	TGT	TCC	GAT	GTT	ATC	CCC	ACC	1125
361	Q	D	K	T	K	L	I	D	C	S	D	V	I	P	T	375
1126	CCT	CCT	GCC	CTT	GTC	GGA	GCG	GCC	CAC	TTA	CCG	GCG	GGA	TTT	TCT	1170
376	P	P	A	L	V	G	A	A	H	L	P	A	G	F	S	390
1171	CTT	AGC	GAT	GTA	GAG	CAA	GCG	TGC	GCC	GCG	ACG	CCT	TTC	CCT	GCT	1215
391	L	S	D	V	E	Q	A	C	A	A	T	P	F	P	A	405
1216	CTT	ACT	GCT	GAC	CCA	GGC	CCA	GTA	ACC	TCC	GTC	CCT	CCC	GTC	CCT	1260
406	L	T	A	D	P	G	P	V	T	S	V	P	P	V	P	420
1261	AGA	TCG	TAA													1269
421	R	S	*													

