

INDICE DE CONTENIDO

	Pág
PORTADA	1
DIRECTOR Y COMISIÓN EVALUADORA	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE GENERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	13
1.1- Problema identificado y desarrollo científico/tecnológico alcanzado	14
1.2- Estado del arte de LiPH8 de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	17
1.3- Novedad, relevancia e impacto de la tesis	22
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
2.1- Hipótesis	25
2.2- Objetivos	25
2.2.1- Objetivo general	25
2.2.2- Objetivos específicos	25
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1- Materiales y métodos para el objetivo N° 1.....	27
3.1.1- Descripción de los parámetros iniciales del sistema.....	27
3.1.2- Estudios de simulación por dinámica molecular (SDM).....	28
3.1.3- Análisis de las simulaciones de dinámica molecular	29
3.2- Materiales y Métodos para el objetivo N° 2.....	29
3.2.1- Clonamiento del gen de LiPH8	30
3.2.2- Generación de los mutantes por PCR	30
3.2.3- Producción enzimática	31
3.2.4- Activación <i>in vitro</i> de LiPH8 y sus variantes	32
3.2.5- Purificación y caracterización de LiPH8 y sus variantes	33
3.2.6- Evaluación de los parámetros cinéticos de LiPH8 y sus variantes	34
3.3- Materiales y Métodos para el objetivo N° 3.....	34
3.3.1- Generación de los mutantes por PCR, producción enzimática, activación <i>in vitro</i> , purificación, caracterización y evaluación de los parámetros cinéticos	34
3.3.2- Cálculos de energía de interacción a nivel cuántico semiempírico	35

3.3.3- Cálculos QM/MM de densidad de espín	38
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1- Resultados y discusión del objetivo N° 1.....	40
4.1.1- Parámetros de descripción del sistema	40
4.1.2- Análisis del mecanismo de unión de AV y AV ⁺ a LiPH8 a través de simulaciones de dinámica molecular.....	42
4.2- Resultados y discusión del objetivo N° 2.....	48
4.2.1- Generación de los mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 por PCR	48
4.2.2- Producción enzimática de los mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 por PCR	49
4.2.3- Purificación de LiPH8 y las enzimas mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171 por PCR	50
4.2.4- Evaluación de los parámetros cinéticos de LiPH8 y las variantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171.....	52
4.3- Resultados y discusión del objetivo N° 3.....	54
4.3.1- Generación de los mutante del entorno ácido de Trp171 por PCR, producción enzimática, activación in vitro, purificación, caracterización y evaluación de los parámetros cinéticos.....	54
4.3.2- Cálculos de energía de interacción a nivel semiempírico de mecánica cuántica.....	63
4.3.3- Cálculos QM/MM de densidad de espín	68
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXOS	81
Anexo 1. Publicación científica 2019.....	81
Anexo 2. Capítulo de Libro 2017.....	82
Anexo 3. Póster congreso nacional 2017.....	83
Anexo 4. Partidores mutagénicos empleados para generar los variantes de LiPH8 y VP.....	84
Anexo 5. Análisis de RMSD para LiPH8 y los mutantes del entorno ácido....	85
Anexo 6. Diagramas de interacción para las replicas de las DM del sistema LiP-AV ⁺	86
Anexo 7. Diagramas de interacción para las replicas de las DM del sistema LiP-AV(ESP).....	89
Anexo 8. Diagramas de interacción para las replicas de las DM del sistema LiP-AV(OPLS).....	92
Anexo 9. Alineamiento múltiple del DNA plasmidial de LiPH8 y los plásmidos mutagénicos de los mutantes del entorno ácido del Trp171.....	95

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.1 Estructura de la biomasa lignocelulósica con una representación esquemática y estructural de la celulosa, hemicelulosa y lignina	15
Figura 1.2.1. Estructura de LiPH8 y detalle del entorno del grupo Hemo.....	18
Figura 1.2.2. Ciclo catalítico de LiP.....	20
Figura 3.1.2.1 Script usado para el calculo del SASA.....	29
Figure 3.2.2.1. Workflow para calcular las ΔE de los complejos de molécula1-molécula2.....	36
Figura 4.1.1.1 Cargas parciales atómicas de cada átomo del AV en los sistemas AV(OPLS), AV(ESP) y AV ⁺⁺	41
Figura 4.1.1.2. Superficies del potencial electrostático para el AV en los sistemas AV(OPLS), AV(ESP) y AV ⁺⁺	42
Figura 4.1.2.1. Perfiles de interacción de residuos para las DM de 1 μ s de los sistemas combinados: LiP-AV ⁺⁺ ,LiP-AV(ESP) y LiP-AV(OPLS).....	44
Figura 4.1.2.2. Componentes de las energías de interacción para la DM de 1 μ s en los sistemas LiP-AV ⁺⁺ y LiP-AV (OPLS).....	47
Figura 4.2.1.1. Alineamiento múltiple de la secuencia de LiPH8 con los mutantes del sitio accesorio F129A, P164A, I268A, Q274A y P279A.....	49
Figura 4.2.2.1. Análisis de expresión para LiPH8 y mutante F129A por SDS-PAGE.....	49
Figura 4.2.3.1. Cromatograma del perfil de elución de LiPH8 en una columna Resource Q a 280nm y 410nm y un gradiente de NaCl.....	50
Figura 4.2.3.2. SDS-PAGE de las enzimas mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171.....	50
Figura 4.2.3.3. Espectros UV-Visible de LiPH8 y las 4 variantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171.....	51
Figura 4.2.4.1. Cinéticas enzimáticas para la oxidación de AV y HQ por LiPH8 y mutantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171.	53
Figura 4.2.4.2. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de peroxidasaas fúngicas LiP, MnP, VP, CIP y otras peroxidasaas.....	53
Figura 4.3.1.1. SDS-PAGE de las enzimas mutantes del entorno ácido del Trp171...	55
Figura 4.3.1.2. Espectros UV-Visible variantes del entorno ácido alrededor del Trp171 de LiPH8.	56
Figura 4.3.1.3. Cinéticas enzimáticas para la oxidación de AV, DMP y ABTS por LiPH8 y mutantes del entorno ácido alrededor de Trp171.	60

Figura 4.3.1.4. SDS-PAGE y Espectro UV-Visible para la variante E243Q de VP.....	61
Figura 4.3.1.5. Cinéticas de la oxidación de AV, DMP ABTS y Mn ²⁺ por VP y mutante E243Q.....	63
Figura 4.3.2.1. Correlación entre (A) Valores experimentales de % de actividad residual vs ΔE de los sistemas Trp/AV ⁺⁺ y (B) valores experimentales de K_{cat} vs Valores promedio del SASA del Trp171.....	66
Figura 4.3.2.2. Análisis de SASA para Trp171 en los sistemas de la enzima silvestre y mutantes.....	67
Figura 4.3.2.3. Principales interacciones de Trp171-AV ⁺⁺ en los 100 complejos con menores valores de energía para LiPH8 nativa, mutante E250Q y mutante D264N.....	68
Figura 4.3.3.1. Representación QM/MM de la distribución de la densidad de espín sobre Trp171 y AV.....	70
Figura 4.3.3.2. Representación QM/MM de la distribución de la densidad de espín sobre Trp171 y Hemo.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.2.1. Parámetros cinéticos K_m (μM), V_{max} (s^{-1}) y V_{max}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$) para la oxidación de AV por LiPH8 y mutantes del entorno ácido de Trp171 reportado por Smith <i>et al.</i> ¹	21
Tabla 4.1.1.1. Cargas parciales atómicas para cada átomo del AV en los sistemas AV^{+} , AV(ESP) y AV(OPLS).....	40
Tabla 4.2.4.1. Parámetros cinéticos K_m (μM), K_{cat} (s^{-1}) y K_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$) para la oxidación de AV y HQ por LiPH8 y variantes de la cavidad hidrofóbica cercana a Trp171.....	52
Tabla 4.3.1.1. Valores R_z de las variantes del entorno ácido alrededor de Trp171 en LiPH8.....	56
Tabla 4.3.1.2. Parámetros cinéticos K_m (μM), K_{cat} (s^{-1}) y K_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$) para la oxidación de AV, DMP y ABTS por LiPH8 y variantes del entorno ácido alrededor de Trp171.....	58
Tabla 4.3.1.3. Parámetros cinéticos K_m (μM), K_{cat} (s^{-1}) y K_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$) para la oxidación de AV, DMP, ABTS y Mn^{2+} por VP y variante E243Q.....	62
Tabla 4.3.2.1. Valores promedio de ΔE ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) entre AV (neutro y radical catiónico) y los 9 aminoácidos (aa) localizados a menos de 5.5 Å alrededor de Trp171.....	64
Tabla 4.3.2.2. Valores promedio de ΔE ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) entre AV (radical catiónico) y cada uno de los aminoácidos mutados en el entorno ácido del Trp171(MAA).....	64
Tabla 4.3.2.3. Valores promedio del ΔE ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) entre AV (neutro y radical catiónico) y los segmentos de 5.5Å alrededor del Trp171 en la enzima silvestre (SEG) y mutantes (MSEG). El valor de SASA (Å^2) es también especificado.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔE	: Energía de interacción
ABTS	: 2,2-azino-bis[3-etilenbenzotiazoline-6-sulfonato]
AV	: Alcohol veratrílico
CcP	: Citocromo c peroxidasa
CiP	: <i>Coprinus cinereus</i> peroxidasa
DMP	: 2,6-dimetoxifenol
DTT	: 1,4-ditiotreitol
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
EPR	: Resonancia paramagnética
GSSG	: Glutación disulfuro
HMF	: 5-hidroximetilfurfural
HQ	: Hidroquinona
HRP	: Peroxidasa del rábano
IPTG	: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
LiP	: Lignino peroxidasa
LMS	: Sistema mediador de lacasa
LRET	: Ruta de transferencia electrónica de largo alcance
MnP	: Manganeso peroxidasa
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
QM/MM	: Mecánica cuántica / mecánica molecular
SASA	: Área de Superficie Accesible al Solvente
SDM	: Simulación de dinámica molecular
SEG	: Segmento molecular
SEGM	: Segmento molecular mutado
SID	: Simulation interaction diagram
SQM methods	: Semiempirical quantum mechanical methods
VAD	: Veratraldehído
VP	: Versátil peroxidasa