

HYDROPHOBIC CLUSTER ANALYSIS (HCA) REVELA LA EXISTENCIA DE ISOFORMAS DE BAJA IDENTIDAD DE LACASAS (EC 1.10.3.2) EN 7 PHYLA DE BACTERIA

HYDROPHOBIC CLUSTER ANALYSIS (HCA) REVEALS THE EXISTENCE OF LOW IDENTITY ISOFORMS OF LACCASES (EC 1.10.3.2) IN 7 PHYLA OF BACTERIA

Jorge Hernández-Torres^{1,2}, Jhon A. Rodríguez-Buitrago¹, Jacques Chomilier³

Resumen

Se implementó la metodología *Hydrophobic Cluster Analysis (HCA)* para evaluar la presencia y distribución de las lacasas (p-difenol:oxígeno-oxidoreductasas) en Bacteria. Por su alto nivel de resolución en entornos de baja identidad (< 30%), el análisis estructural mediante HCA fue capaz de validar secuencias huérfanas alojadas en las bases de datos Genbank y Swissprot. Se proponen consensos (**LOGO**) para los centros de cobre, útiles para la identificación de nuevas lacasas. De la misma manera que en *Coprinus cinereus*, en la lacasa CotA de *Bacillus subtilis* se encontraron evidencias de un evento de duplicación intragénica [aminoácidos 1 a 178 (dominio A) y 303 a 503 (50 residuos del dominio B y todo el dominio C)]. La identidad entre los duplicados se calculó en 9%. Estos resultados permiten concluir que las lacasas de Bacteria y Eucarya tuvieron un ancestro común.

Palabras clave: análisis de agregados hidrofóbicos, duplicación intragénica, EC 1.10.3.2, HCA, lacasa, p-difenol:oxígeno-oxidoreductasa

Abstract

Hydrophobic Cluster Analysis (**HCA**) was implemented to evaluate the presence and distribution of laccases (p-diphenol:oxygen-oxidoreductases) in Bacteria. By reason of its high resolution level on low identity environments (< 30%), the structural analysis was able to validate orphan sequences registered in Genbank and Swissprot databases. Consensuses (**LOGO**) are proposed for copper centers, useful to identify new laccases. Like in *Coprinus cinereus*, we found evidences of an intragenic duplication event in the *Bacillus subtilis* CotA laccase [aminoacids 1 to 178 (A domain) and 303 to 503 (50 residues of B-domain and all C domain)]. An identity of 9% was calculated between the duplicates. These results allow concluding that laccases from Bacteria and Eukarya had a common ancestor.

Key words: EC 1.10.3.2, HCA, Hydrophobic Cluster Analysis, intragenic duplication, laccase, p-diphenol:oxygen-oxidoreductase

INTRODUCCIÓN

Las oxidasas multicobre son proteínas involucradas en numerosas reacciones del metabolismo celular

como la fotosíntesis, la fosforilación oxidativa, la homeostasis de iones metálicos y el catabolismo de nutrientes y componentes químicos tóxicos. Las lacasas (p-difenol:oxígeno-oxidoreductasas, EC

Recibido: agosto de 2006; aceptado: diciembre de 2006.

¹ Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN), Universidad Industrial de Santander. Guatiguará-Piedecuesta (Santander), Colombia. Correos electrónicos: ² <hernanj@uis.edu.co>, <Jorge.Hernandez@impmc.jussieu.fr>.

³ Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie. Université Paris 6, Case 115, 75252 Paris cedex 05, France. Correo electrónico: <chomilie@lmcp.jussieu.fr>.

1.10.3.2) constituyen una subfamilia de enzimas que requieren O_2 , para oxidar fenoles, polifenoles, metoxi-fenoles, aminas aromáticas y diversos sustratos no fenólicos (Mayer y Staples, 2002). La coordinación de átomos de cobre permite a esta enzima realizar transferencia de electrones al O_2 debido a que los átomos de cobre varían su estado de oxidación entre CuI y CuII. Los productos son radicales orgánicos altamente reactivos. Las lacasas participan en procesos fisiológicos como el sistema enzimático de degradación de la lignina, característico de hongos ascomicetos y basidiomicetos (Heinzkill et al., 1998). También están involucradas en el desarrollo de la pigmentación de las esporas (Martins et al., 2002) y en patogénesis (Choi et al., 1992; Williamson, 1994). Las lacasas vegetales están asociadas a reacciones de polimerización de la lignina (Dean y Ericsson, 1994; Liu et al., 1994; Ranocha et al., 1999).

En la industria biotecnológica, las lacasas son usadas como biocatalizadores para diversas aplicaciones, tales como la degradación de lignina y el blanqueamiento de textiles (Elias et al., 2000; Mayer y Staples, 2002), la destoxificación de efluentes (Abadulla et al., 2000) y la transformación de antibióticos y esteroides (Breen y Singleton, 1999).

Las lacasas poseen tres dominios muy similares en tamaño, todos importantes para la actividad catalítica (Enguita et al., 2003). El sitio de ligación al sustrato está localizado en una hendidura entre los dominios B y C. Un centro mononuclear de cobre está ubicado en el dominio C y un centro trinuclear de cobre está enclavado en la interfase entre los dominios A y C. El centro T1 (dominio C) sirve como aceptor de electrones del sustrato, los cuales son transferidos al centro T2/T3 (dominio A), donde el O_2 es reducido. El T1 posee un ligando axial 10 aminoácidos después de una cisteína conservada, cuya naturaleza afecta el potencial redox de las lacasas. Así, las lacasas se clasifican en clase 1 cuando el ligando es metionina; clase 2 cuando el ligando es leucina y clase 3 cuando el ligando es fenilalanina (Eggert et al., 1998).

En vista de su utilidad biotecnológica, la búsqueda de nuevas variedades de lacasas puede tener un impacto importante en las tecnologías que se sirven de esta enzima. De allí la necesidad de aumentar el conocimiento sobre la distribución de las lacasas en Bacteria, campo aún insuficientemente explorado.

Aunque la distribución de las lacasas se ha investigado principalmente en plantas, hongos e insectos (Dittmer et al., 2004; Kumar et al., 2003), incluso en crustáceos (Cardenas y Dankert, 2000), por identidad de secuencia con lacasas eucariotas modelo, e.g., *Coprinus cinereus*, se ha propuesto su presencia en Bacteria (Alexandre y Zhulin, 2000). No obstante, solamente en *Bacillus subtilis* y otras pocas especies bacterianas, se ha podido demostrar actividad lacasa sobre sustratos sintéticos de lacasas eucariotas (Martins et al., 2002; Suzuki et al., 2003). En un trabajo reciente (Hoegger et al., 2006), se llevó a cabo un análisis filogenético de las lacasas y oxidasas multicobre tipo lacasa. Las secuencias bacterianas, a las cuales se les atribuyen variadas funciones biológicas, conformaron un clado aislado de los hongos (lacasas *sensu stricto*), plantas, insectos, etc.

En este estudio, demostramos la existencia de isoformas de baja identidad de lacasas en 7 *phyla* de Bacteria, mediante el análisis de los agregados hidrofóbicos (*Hydrophobic Cluster Analysis* o **HCA**). Del conjunto de secuencias no redundantes proponemos un consenso 1D para los centros de cobre de las lacasas bacterianas (**LOGO**) tal como existen para hongos y plantas. Por otra parte, mostramos evidencia a nivel 2D de un evento de duplicación de dominios del mismo tipo que ocurrió en las lacasas eucariotas. Tomados en conjunto, los resultados conducen a plantear un ancestro común para todas las lacasas.

El análisis de la estructura molecular de las lacasas bacterianas servirá de plataforma para adelantar futuras investigaciones, ya que una amplia gama de nuevas enzimas permitirá la

selección de mejores centros redox con aplicaciones biotecnológicas específicas, además de facilitar el entendimiento de sus relaciones evolutivas con las eucariotas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura de secuencias. Las secuencias de lacasas bacterianas fueron obtenidas de las bases de datos Genbank, Swissprot y PDB mediante búsquedas con la aplicación Psi_Blast (Altschul et al., 1997). Se buscaron homólogos de los tres dominios de lacasas modelos de *Bacillus subtilis* (PDB 1GSK), *Coprinus cinereus* (SwissProt Q9Y780) y *Zea mays* (Genbank AAX83113) y se seleccionaron las secuencias bacterianas que presentaron los valores más bajos de identidad global, en lo posible < 30%. Para los alineamientos locales y globales, así como para la determinación de las secuencias consenso, se utilizó la versión en línea de ClustalW (Thompson et al., 1994) del *Pole Bioinformatique Lyonnais* con los parámetros por defecto (matriz Gonnet 250, *gap opening* = 10 y *gap extension* = 0,1).

Secuencias LOGO y consensos. La posición de los centros L1-L4 se estableció con base en la secuencia de CotA (*B. subtilis*). Las secuencias consenso se basaron en el LOGO de cada centro de cobre y se seleccionaron los aminoácidos con una frecuencia relativa mayor o igual a 1,5 bits. Las secuencias LOGO para cada uno de los centros de cobre se construyeron con la aplicación WebLogo (Crooks et al., 2004), con base en un alineamiento múltiple global de 59 secuencias no redundantes, generado con ClustalW.

Análisis de los agregados hidrofóbicos (HCA). Los trazados en 2D se representaron mediante la aplicación en línea <http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/RPBS/cgi-bin/Ressource.cgi?chzn_lg=fr&chzn_rsrc=HCA>. El análisis estructural mediante HCA se realizó según las indicaciones de Callebaut et al. (1997), entre representantes de los *phyla* con secuencias tipo

lacasa. En los alineamientos HCA, la identidad se calculó con base en el número de residuos hidrofóbicos y no hidrofóbicos rigurosamente conservados, sobre la longitud de la secuencia más larga. Se consideran hidrofóbicos los aminoácidos VILFMYW (Callebaut et al., 1997).

RESULTADOS

Captura de secuencias bacterianas tipo lacasa. Con el fin de detectar la presencia de lacasas en la diversidad de *phyla* bacterianos, se hizo una búsqueda exhaustiva de secuencias en las bases de datos más actualizadas. Se utilizaron como modelos eucariotas las lacasas de *C. cinereus* y *Z. mays*, y CotA de *B. subtilis* como lacasa procariota. De 190 potenciales lacasas con identidades globales inferiores a 30% (para evitar redundancia, e.g., secuencias de otras especies de Firmicutes), se seleccionaron 15 representativas de 7 *phyla* bacterianos (tabla 1). A excepción de la lacasa de *Streptomyces lavendulae* (Suzuki et al., 2003) de ninguna otra proteína de la tabla 1 se ha demostrado experimentalmente la actividad lacasa. Sin embargo, varias de ellas han sido clasificadas de manera preliminar como oxidasa multicobre u oxidorreductasa, probablemente por la presencia de los centros de cobre, muy conservados en este tipo de enzimas (Solomon et al., 1996). La mayoría de secuencias provienen de proyectos de secuenciación de genomas completos o de reportes directos a las bases de datos sin pruebas enzimáticas. No se detectaron secuencias tipo lacasa en los demás *phyla*.

A excepción de *Oceanobacillus iheyensis*, las demás secuencias están por debajo del umbral de identidad aceptable para relacionarlas por su estructura primaria, pero sí mediante HCA, e.g., < 30%. Las identidades globales con las lacasas eucariotas (*C. cinereus* y *Z. mays*) estuvieron siempre por debajo de las obtenidas con *B. subtilis* (datos no mostrados). La secuencia de más baja identidad global con la lacasa CotA (tabla 1) fue la

de *Bacillus cereus* (17%), mientras que la de más alta fue la de *O. iheyensis* (60%), ambas especies pertenecientes al mismo *phylum* que *B. subtilis* (Firmicutes). A pesar de la baja identidad, la secuencia de *B. cereus* reúne las características de

las demás lacasas bacterianas (datos no mostrados, sin embargo, una copia del alineamiento mediante HCA entre las secuencias de *B. subtilis* y *B. cereus* está disponible en la *WEB* vía correo electrónico <hernanj@uis.edu.co>).

Tabla 1. Identidad global entre la lacasa CotA de *B. subtilis* y 15 potenciales lacasas bacterianas (**ClustalW**) (¹Proteobacteria, ²Chloroflexi, ³Firmicutes, ⁴Actinobacteria, ⁵Cyanobacteria, ⁶Aquificae, ⁷Deinococcus-Thermus. **Genbank**, número de acceso en la base de datos del NCBI o del equivalente de Swissprot)

Genbank	Clasificación	Especies	ID	Genbank	Clasificación	Especies	ID
AAK04022	desconocida	<i>Pasteurella multocida</i> ¹	19	NP_692267	CotA	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> ³	60
ZP_00277642	oxidasa multicobre	<i>Burkholderia fungorum</i> ¹	27	JC8030	lacasa	<i>Streptomyces lavendulae</i> ⁴	28
ZP_00508750	oxidasa multicobre	<i>Polaromonas</i> sp. ¹	23	ZP_00328244	oxidasa multicobre	<i>Trichodesmium erythraeum</i> ⁵	21
ZP_00348151	oxidasa multicobre	<i>Haemophilus somnus</i> ¹	21	AAC07157	periplásmica de división celular	<i>Aquifex aeolicus</i> ⁶	23
ZP_00398946	oxidasa multicobre	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> ¹	24	NP_982219	resistencia al cobre	<i>Bacillus cereus</i> ³	17
NP_953702	CotA	<i>Geobacter sulfurreducens</i> ¹	24	YP_179670	oxidorreductasa	<i>Camylobacter jejuni</i> ¹	19
ZP_00356126	oxidasa multicobre	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> ²	25	YP_005339	lacasa	<i>Thermus thermophilus</i> ⁷	23
NP_104662	oxidorreductasa	<i>Mesorhizobium</i>	24				

Relación estructural mediante *Hydrophobic Cluster Analysis* (HCA). La lacasa CotA de *B. subtilis* (PDB 1GSK), como sus homólogos eucariotas, se compone de tres dominios (A, B y C), los cuales se alinean con potenciales lacasas de 4 *phyla* bacterianos en la figura 1. Una visión global revela una estrecha asociación entre los agregados hidrofóbicos con las estructuras secundarias, en su mayoría hojas β. Las identidades locales obtenidas mediante alineamientos con ClustalW y HCA se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Identidades locales obtenidas con alineamientos (**ClustalW** y **HCA**), de los dominios **A**, **B** y **C** de las lacasas de la figura 1 con los de la lacasa CotA de *B. subtilis*

Especies	ClustalW			HCA		
	A	B	C	A	B	C
<i>A. aeolicus</i>	18	30	23	22	33	25
<i>T. erythraeum</i>	20	22	21	21	26	22
<i>T. thermophilus</i>	19	20	22	23	25	25
<i>G. sulfurreducens</i>	20	22	28	20	23	38

Dominio A

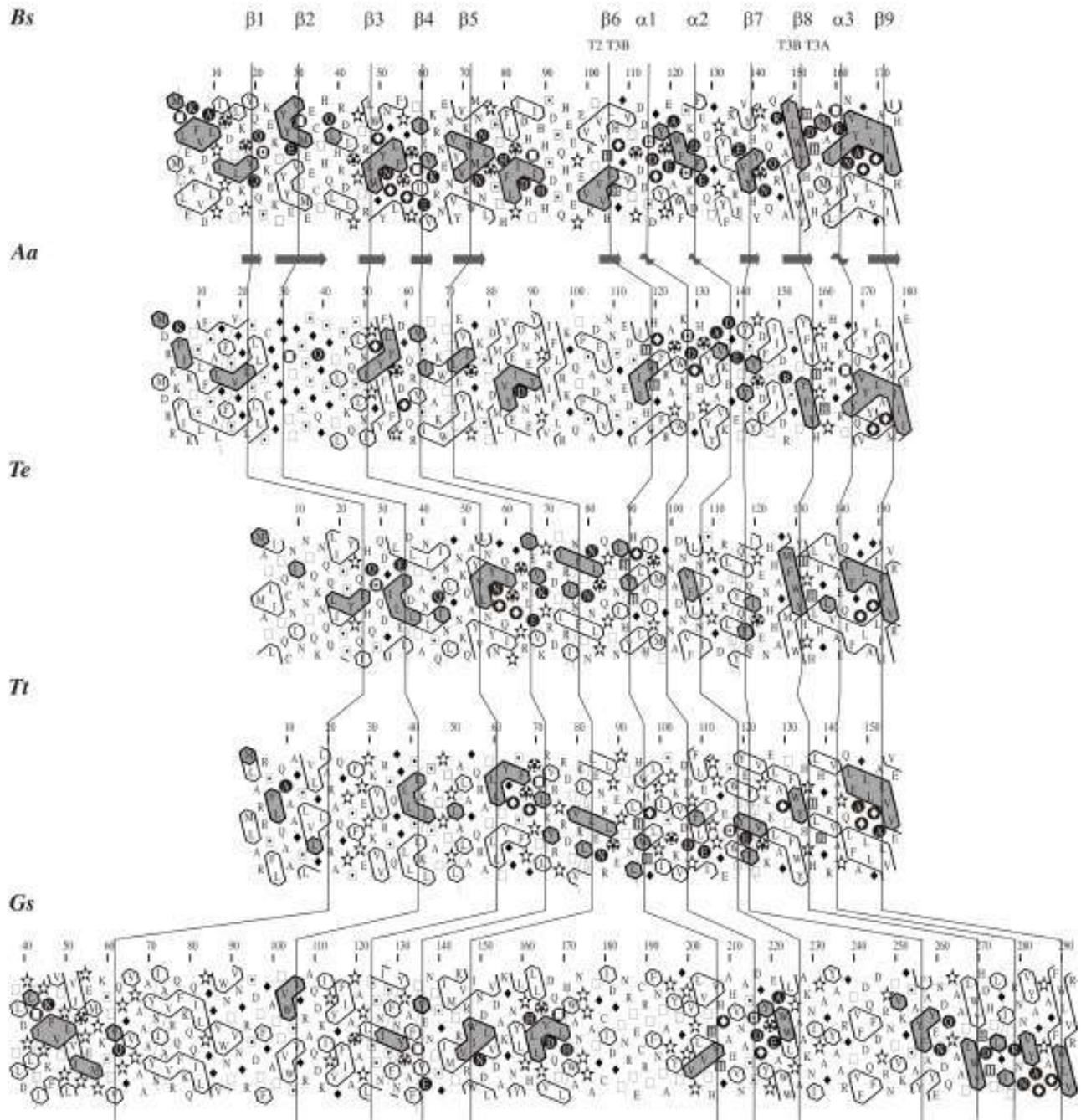


Figura 1A. Alineamiento HCA entre el dominio A de la lacasa CotA de *B. subtilis* (**Bs**) y los de lacasas potenciales de *A. aeolicum* (**Aa**), *T. erythraeum* (**Te**), *T. thermophilus* (**Tt**) y *G. sulfurreducens* (**Gs**). Las líneas verticales que cruzan las hélices (espirales) y las hojas β (flechas) de CotA (PDB 1A65) demarcan regiones equivalentes en las otras secuencias. Los aminoácidos sombreados en gris y los caracteres en blanco sobre círculos negros, representan los residuos hidrofóbicos y no hidrofóbicos conservados en cada posición, respectivamente. **T1**, **T2**, **T3A** y **T3B**: centros de cobre tipo 1, 2 y 3 (aminoácidos H o C en caracteres blancos sobre cuadros grises)

Dominio B

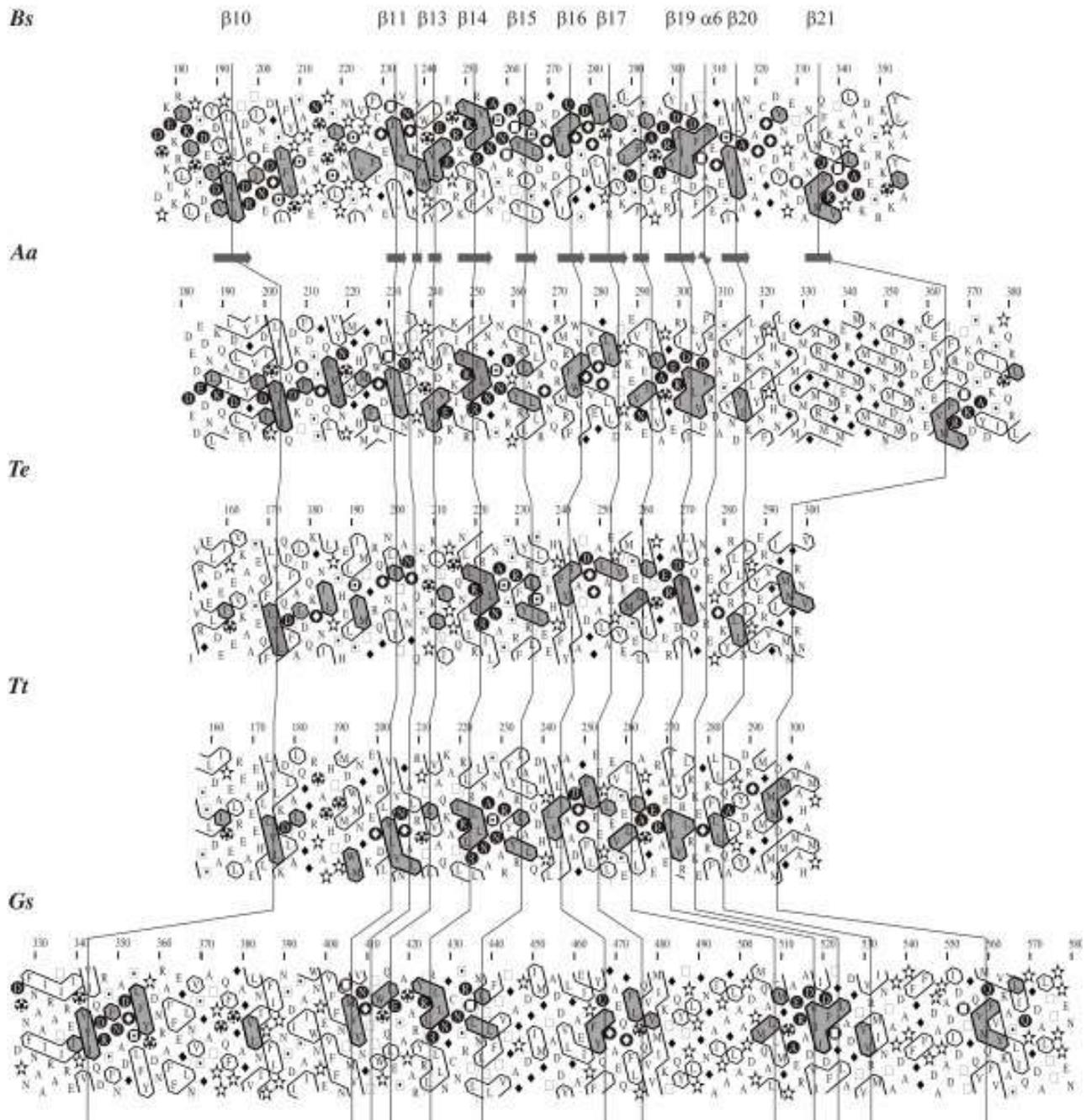


Figura 1B. Alineamiento HCA entre el dominio B de CotA y los de las lacasas potenciales. Las abreviaturas y los símbolos gráficos son los mismos de la leyenda de la figura 1A

Por una parte, las hojas $\beta 3$, $\beta 4$ y $\beta 9$ aparecen como las más conservadas del dominio A, el más divergente de los tres (figura 1, dominio A, tabla 2). Un segmento variable en longitud sin estructura secundaria asociada en CotA, se destaca en la región comprendida entre las hojas $\beta 5$ y $\beta 6$. Una especial conservación de la estructura en hoja \hat{a} y la forma vertical de los agregados se observa en las hojas $\beta 6$ y $\beta 8$ (Woodcock et al., 1992), las cuales alojan los dos primeros centros de cobre. El dominio A de *Aquifex aeolicus* emerge como el más distante, con una identidad de 18% (ClustalW), la cual se incrementa a 22% con el HCA. Paradójicamente, a pesar de las inserciones entre $\beta 1$ - $\beta 2$, $\beta 5$ - $\beta 6$ y $\beta 2$ - $\beta 7$, *Geobacter sulfurreducens* mantiene una identidad de 20% gracias a la excepcional conservación de aminoácidos hidrofóbicos idénticos.

Por otra parte, aunque el dominio B de las lacasas no contiene centros de cobre, sí conserva abundantes agregados hidrofóbicos en los 5 *phyla* (figura 1, dominio B). Se destacan las hojas $\beta 14$ y $\beta 19$ asociadas con residuos no hidrofóbicos. La especie *A. aeolicus* exhibe una excepcional inserción entre las hojas $\beta 20$ y $\beta 21$, caracterizada por hidrofóbicos, lo cual no afec-

ta la superioridad en identidad con CotA (tabla 2). Aunque visiblemente conservados, los agregados de *G. sulfurreducens* están distantes entre sí como en el dominio A, por cortas secuencias enriquecidas en hidrofóbicos, lo cual involucra probablemente la existencia de estructuras secundarias adicionales.

Finalmente, en el dominio C se observan inserciones no homólogas de hidrofóbicos entre las hojas $\beta 22$ - $\beta 23$ - $\beta 24$. Los agregados mayormente conservados se asocian a los centros de cobre, i.e., hojas $\beta 25$ y $\beta 29$ (figura 1, dominio C). De nuevo, *G. sulfurreducens* presenta los mayores valores de identidad local para este dominio con respecto a CotA (tabla 2). En las lacasas eucariotas, el cobre tipo 1 (Blue Cu^{2+}) se enclava en una coordinación trigonal con dos histidinas y una cisteína como ligandos ecuatoriales y un ligando axial hidrofóbico (dominio C). En hongos, esta última posición la ocupa un residuo de fenilalanina y en plantas, leucina (Claus, 2003). En Bacteria, en la gran mayoría de los casos está presente el aminoácido metionina; es decir, las lacasas bacterianas pertenecen preferiblemente a la clase 1 (figuras 1 y 3, tabla 3).

Tabla 3. Consensos de los centros de cobre de Bacteria y Eucarya* (plantas y hongos). [L = centros de cobre. +1 = primera posición con base en la lacasa CotA de *B. subtilis*. Los residuos de histidina de los centros catalíticos se subrayan. Los aminoácidos hidrofóbicos se destacan en caracteres superiores y aquellos en cursiva (**L4**) constituyen el ligando axial. *El consenso de plantas y hongos fue modificado de Kumar et al. (2003)]

L	+1	Bacteria	Eucarya
L1	102	TX ₂ <u>H</u> WHGX ₄ (VLI)PX ₄ DG	<u>H</u> WHGX ₉ DGX ₃ QCPI
L2	148	GT(YFL)WX <u>H</u> (PS) <u>H</u> X ₇ QX ₃ GLXG	GTXWY <u>H</u> SHX ₃ QYCXDGLXGX(F LIM)
L3	419	HP(IFM) <u>H</u> (LIV) <u>H</u> GX ₂ F	HPX <u>H</u> L <u>H</u> GH
L4	482	GX ₆ (FYWL) <u>H</u> CHXLX <u>H</u> X ₃ <i>GMM</i>	G(PA)WX(LFV) <u>H</u> CHIDAEX <u>H</u> X ₃ G(<i>LFM</i>)X ₃ (LFM)

Se destaca el hecho de que en la mayoría de los alineamientos, los valores de identidad obtenidos mediante HCA aumentaron en algunos puntos con respecto a ClustalW (tabla 2). El incremento más notable se observó para el dominio C de *G. sulfurreducens* que remontó de 28% (ClustalW) a 38% (HCA). Este incremento no solo es común en alineamientos por este método, sino constituye un valor de identidad más fidedigno (Callebaut et al., 1997).

Mediante superposición de dominios, Kumar et al. (2003) sugirieron un evento de duplicación intragénica en *C. cinereus* (RMSD = 1.15Å). Nuestro análisis HCA presenta evidencia de que esta duplicación in-

terna del gen también ocurrió en Bacteria (*B. subtilis*) mediante la conservación posicional de casi todos los agregados de residuos hidrofóbicos y algunos no hidrofóbicos y las estructuras secundarias asociadas. Se correlacionan, al menos parcialmente, en el alineamiento de la figura 2 las hojas $\beta 2$ - $\beta 21$, $\beta 3$ - $\beta 23$, $\beta 5$ - $\beta 24$, $\beta 6$ - $\beta 25$ (centros de cobre L1 y L3), $\beta 7$ - $\beta 28$, $\beta 8$ - $\beta 29$ (centros de cobre L2 y L4) y $\beta 9$ - $\beta 30$. Además, se puede observar en la figura 2 que en CotA la duplicación se extiende desde los aminoácidos 1 a 178 (dominio A) y desde 303 a 503 (50 residuos del dominio B y todo el dominio C). La identidad entre los duplicados se calculó en 9%.

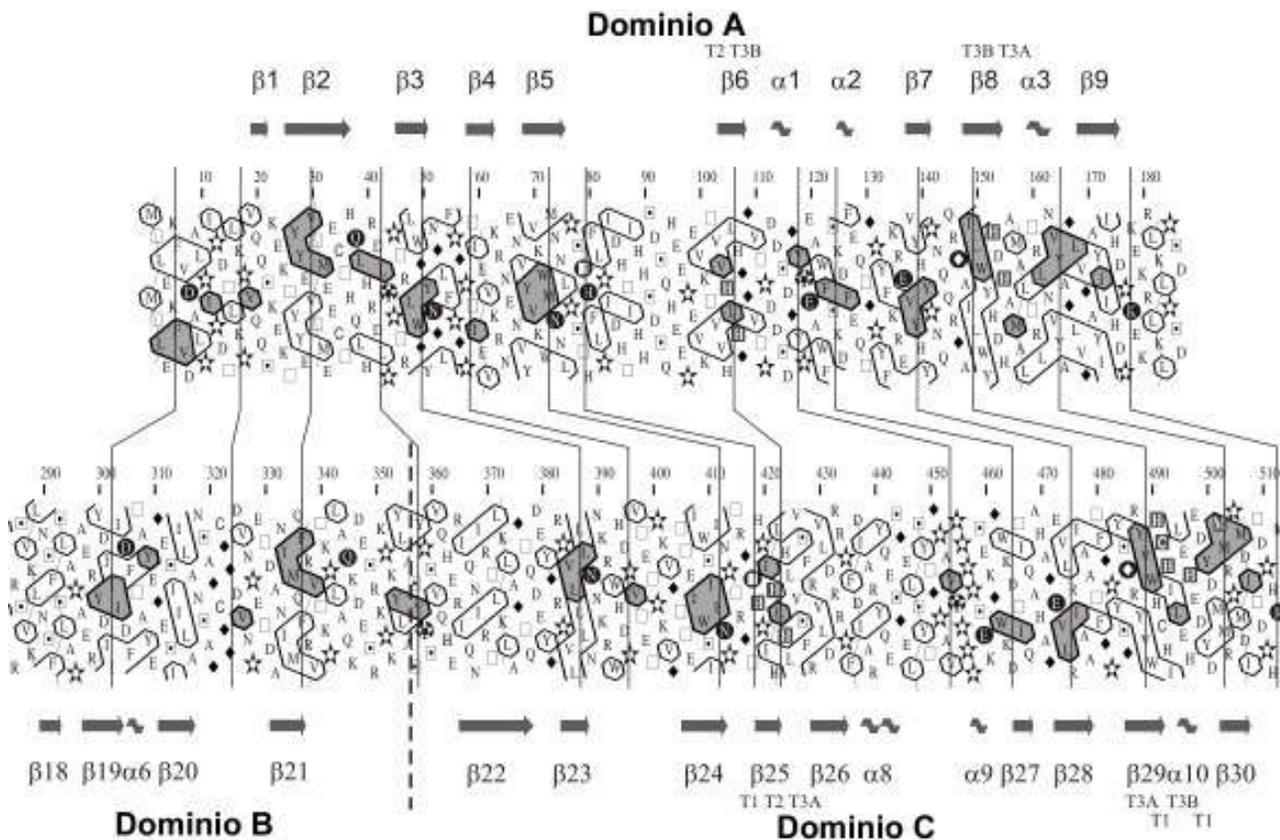


Figura 2. Representación bidimensional de la duplicación intramolecular en la lacasa CotA de *B. subtilis*. Los símbolos gráficos son los mismos de la figura 1, a excepción de que las líneas verticales establecen correspondencia entre agregados hidrofóbicos equivalentes sin relación alguna con las estructuras secundarias α o β

Consensos para los centros de cobre. Un LOGO para cada centro de cobre (L1-L4) se constituyó con alineamientos locales de 59 secuencias no redundantes (figura 3). La frecuencia relativa de cada residuo revela una organización aminoacídica similar a la de las lacasas de Eucarya (Kumar et al., 2003), especialmente en los residuos de unión al cobre histidina y cisteína. No obstante, en los aminoácidos colindantes se observan diferencias exclusivas de las lacasas bacterianas (tabla 3). El centro L1 coincide en 32% con su contraparte en Eucarya y el L2 en

35%. Estos dos centros se ubican en el dominio A, el más variable entre las lacasas bacterianas (figura 1). El valor de identidad más alto entre consensos se obtuvo en el centro L3 (50%) y el más bajo en L4 (26%). Al igual que en las lacasas de Eucarya, un hidrofóbico (triptófano) separa las histidinas funcionales en el centro L1 (HWH). En L3 ocurre algo similar: en Eucarya esta posición la ocupa una leucina (HLH) y en Bacteria cualquiera entre leucina, isoleucina y valina (H-LIV-H). Ningún hidrofóbico se encuentra entre las histidinas en los centros L2 y L4, en los dos grupos de organismos.

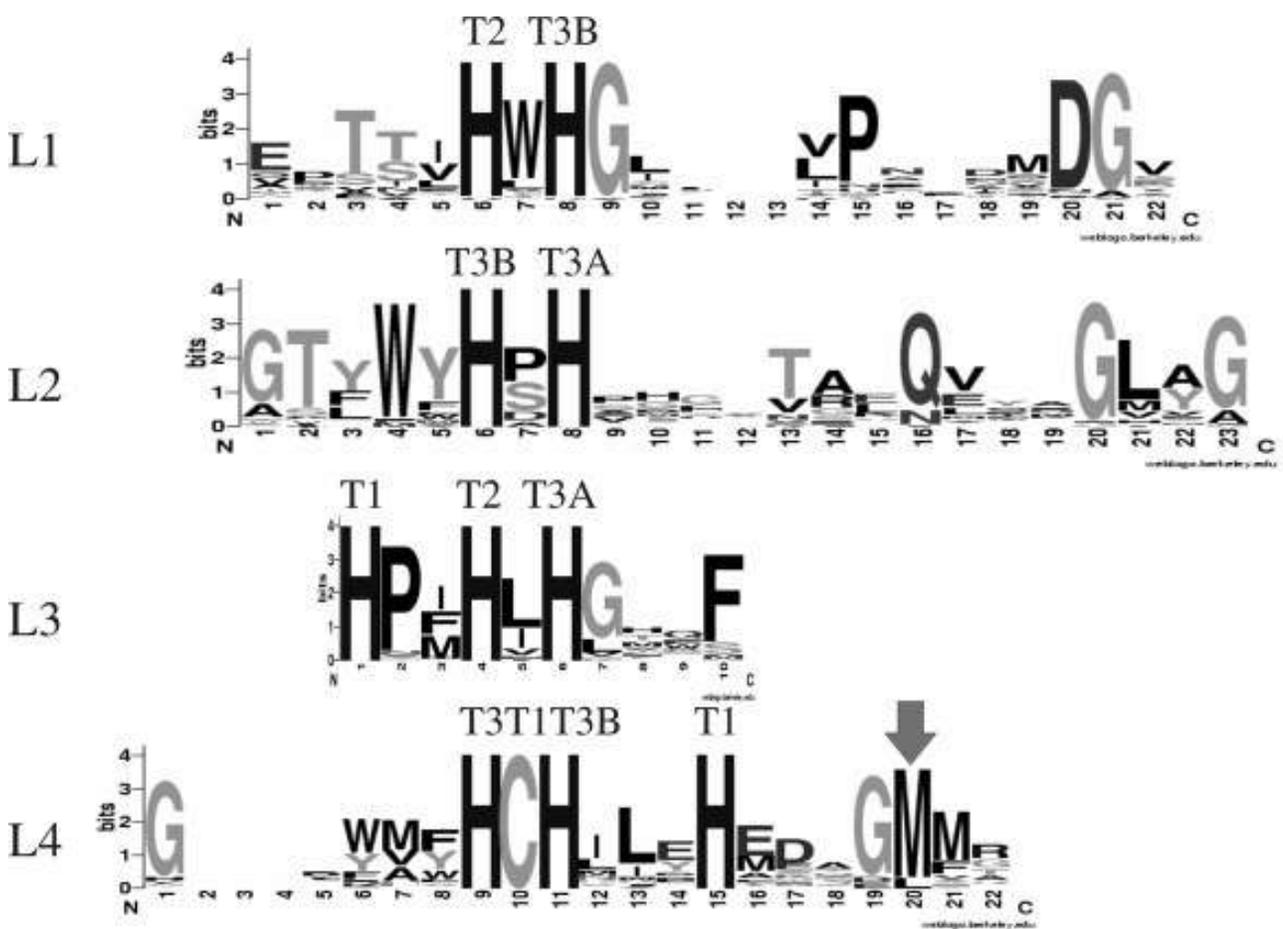


Figura 3. LOGO según centro de cobre en eubacteria. L1, L2, L3 y L4, secuencias LOGO de los centros de cobre 1, 2, 3 y 4, respectivamente. El tamaño de las letras es proporcional a la frecuencia de cada aminoácido en una posición particular. T1, T2, T3A y T3B, aminoácidos (H o C) corresponden a los centros de cobre tipo 1, 2 y 3. La flecha señala el ligando axial (metionina)

DISCUSIÓN

La existencia de lacasas en Bacteria es incuestionable; sin embargo, la amplitud de su distribución en los diferentes *phyla* aun no ha sido demostrada de manera definitiva. Alexandre y Zhulin (2000) realizaron un primer reporte basado exclusivamente en la captura de secuencias con la herramienta BLAST. Aunque los valores de E ($> 3e^{-36}$) fueron suficientemente bajos como para atribuir las secuencias a potenciales lacasas, hay que tener en cuenta que BLAST arroja valores de identidad local mas no global. Además, no se relaciona en tal publicación, la extensión de la identidad a lo largo de las secuencias. Podría tratarse de homologías restringidas a unos pocos aminoácidos. Otros autores abordan el problema desde la misma perspectiva (e.g., Claus, 2003). En todos los casos, estos resultados son insuficientes para sustentar la abundancia de lacasas en los procariontes.

En este reporte, mostramos evidencia visible de tal abundancia mediante el análisis de los agregados hidrofóbicos (HCA). La coincidencia de dominios homólogos, el conjunto y ordenamiento equivalente de los agregados hidrofóbicos y la estrecha asociación de estructuras secundarias con la conservación de agregados, surgen como elementos apropiados para demostrar la existencia de las lacasas en por lo menos 7 *phyla* de Bacteria.

Asimismo, la homología con la lacasa modelo (CotA) en términos de identidad global (tabla 1) y la identidad local calculada por dos métodos diferentes (tabla 2) constituyen valores aceptables para sustentar nuestra hipótesis. Incluso en el caso de *G. sulfurreducens*, en el cual los valores de identidad global arrojados por ClustalW (tabla 2) son menores a los obtenidos con el análisis HCA, bien a pesar de la excepcionalidad de sus inserciones con respecto a *B. subtilis*. *B. cereus* podría aparecer como una rara excepción por su baja identidad, en particular por pertenecer al *phylum* Firmicutes (tabla 1). No obstante, los análisis filogenéticos

muestran que para otros *loci*, *B. cereus* y *B. subtilis* tienden a agruparse en clados diferentes (Xu y Cote, 2003). En vista de que *B. cereus* se agrupa con *B. mycooides* en un clado distante con relación a *B. subtilis*, el evento de separación de los grupos es muy antiguo. Es probable, que en el curso de la evolución, las secuencias hayan sufrido drásticos cambios, en particular dada la variedad de sustratos de las lacasas, lo cual se refleja en las diferencias de identidad.

El análisis bidimensional de la secuencia de aminoácidos ha sido de utilidad para el descubrimiento de duplicados internos en las proteínas (Gaboriaud et al., 1990; Geremia et al., 1996; Van Damme et al., 2000). La conservación del ordenamiento de los agregados hidrofóbicos y de residuos no hidrofóbicos, asociados a estructuras secundarias igualmente conservadas, con perfiles de hidropatía o propensidad conformacional similares, permite concluir la existencia de eventos ancestrales de duplicación intragénica. Una nueva característica de las lacasas bacterianas y que las relaciona con las eucariotas es la existencia de una duplicación intramolecular. Kumar et al. (2003) habían reportado este fenómeno en *C. cinereus*, mediante la superposición parcial de dominios; sin embargo, la extensión precisa de la duplicación a nivel de la estructura primaria no fue establecida. Mediante HCA, demostramos que este fenómeno de recombinación también ocurrió en Bacteria y establecimos que en el duplicado se alinean el dominio A con la segunda mitad del dominio B y la totalidad del dominio C (figura 2). La baja identidad entre los duplicados (9%) no habría permitido relacionarlos mediante una aproximación a nivel 1D. Este resultado conduce a afirmar que la duplicación ocurrió antes del proceso de especiación a partir de una única lacasa ancestral única para procariontes y eucariotas. Es interesante destacar la forma en que posteriormente a la duplicación, las antiguas estructuras secundarias se reorganizaron espacialmente, no así en los centros catalíticos, los cuales conservan las hojas β y hélices α originales, i.e., $\beta 6$ - $\beta 25$ y $\beta 8\alpha$ 3- $\beta 29\alpha$ 10 (figura 2).

Finalmente, otro rasgo que favorece la identificación de las lacasas bacterianas es la alta conservación alrededor de los centros catalíticos (figura 3). Junto con las secuencias LOGO de Eucarya, es posible confirmar el registro de nuevas lacasas procariotas, basados en la correspondencia con los residuos claves de los centros de cobre. Particularmente, por la discriminación del ligando axial, siempre hidrofóbico pero de tipo variable según se trate de plantas (leucina, clase 2), hongos (fenilalanina, clase 3) o bacterias (metionina, clase 1).

En conclusión, todos nuestros resultados apuntan hacia la conclusión de que las proteínas estudiadas comparten aparatos catalíticos similares tipo lacasa, cuyas secuencias pueden servir de base para la búsqueda de nuevas formas de la enzima en los *phyla* donde aún son desconocidas.

CONCLUSIONES

Mediante un sensible método bioinformático, se demostró la existencia de una amplia variedad de lacasas con identidades < 30%, en 7 *phyla* de Bacteria. La organización de los dominios es la misma que en los eucariotas, con especial conservación de las estructuras secundarias asocia-

das a los centros de cobre. Si bien la organización de los centros L1-L4 es semejante a la de plantas y hongos, las bacterias ostentan consensos distintivos para cada centro. Se observó una especial frecuencia del aminoácido metionina en las lacasas bacterianas, característica que permite agruparlas en la clase 1. La comparación mediante HCA reveló la existencia de la misma duplicación intragénica que ocurrió en eucariotas, lo cual soporta la hipótesis de un origen común para todas las lacasas. Basados en estas predicciones, se facilitará el diseño de experimentos para la caracterización bioquímica de estas enzimas, en particular la especificidad por los sustratos de las lacasas *sensu stricto*.

AGRADECIMIENTOS

Manifestamos nuestros agradecimientos a Mónica Alexandra Arias Maldonado, Johanna Alexandra Tejada Moreno y Adrián José Jaimes Becerra por su valiosa colaboración en los análisis estructurales de las secuencias mediante HCA. Este trabajo fue financiado por el programa ECOS/ICFES/COLCIENCIAS/ICETEX, la VIE de la Universidad Industrial de Santander y por el CNRS de Francia.

REFERENCIAS

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gubitz GM.** 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8):3357-3362.
- Alexandre G, Zhulin IB.** 2000. Laccases are widespread in bacteria. *Trends in Biotechnology*, 18(2):41-42.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** 1997. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3):403-410.
- Breen A, Singleton FL.** 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(3):252-258.
- Callebaut I, Labesse G, Durand P, Poupon A, Canard L, Chomilier J, Henrissat B, Mornon JP.** 1997. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis. Current status and perspectives.

Cellular and Molecular Life Sciences, 53:621-645.

- Cardenas W, Dankert JR.** 2000. Cresolase, catecholase and laccase activities in haemocytes of the red swamp crayfish. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(1):33-46.
- Choi GH, Larson TG, Nuss DL.** 1992. Molecular analysis of the laccase gene from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in an isogenic hypovirulent strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5(2):119-128.
- Claus H.** 2003. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35(1-2):93-96.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE.** 2004. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*, 14(6):1188-1190.
- Dean JFD, Eriksson K-EL.** 1994. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung*, 48:21-33.
- Dittmer NT, Suderman RJ, Jiang H, Zhu YC, Gorman MJ, Kramer KJ, Kanost MR.** 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(1): 29-41.
- Eggert C, LaFayette PR, Temp U, Eriksson, KL, Jeffrey FDD.** 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environment Microbiology*, 64(5):1766-1772.
- Elias A, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM.** 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. *Applied and Environment Microbiology*, 66(8): 3357-3362.
- Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, Carrondo MA.** 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21):19416-19425.
- Gaboriaud C, Uz G, Lutfalla G, Mogensen K.** 1990. Hydrophobic cluster analysis reveals duplication in the external structure of human α -interferon receptor and homology with γ -interferon receptor external domain. *FEBS Letters*, 269(1):1-3.
- Geremia RA, Petroni EA, Ielpi L, Henrissat B.** 1996. Towards a classification of glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities: prokaryotic α -mannosyltransferases. *Biochemistry Journal*, 318(1):133-138.
- Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T.** 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5):1601-1606.
- Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR, Kues U.** 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *The FEBS Journal*, 273(10):2308-2326.
- Kumar SV, Phale PS, Durani S, Wangikar PP.** 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family.

Biotechnology and Bioengineering, 83(4):386-394.

- Liu L, Dean JFD, Friedman WE, Eriksson KEL.** 1994. A laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. *Plant Journal*, 6:213-224.
- Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH, Henriques AO.** 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21):18849-18859.
- Mayer AM, Staples RC.** 2002. Laccases: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60(6):551-565.
- Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Cabanes-Macheteau M, Boudet AM, Goffner D.** 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases —a divergent gene family— in poplar. *European Journal of Biochemistry*, 259(1-2):485-495.
- Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE.** 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96(7):2563-2606.
- Suzuki T, Endo K, Ito M, Tsujibo H, Miyamoto K, Inamori Y.** 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(10):2167-2175.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson, TJ.** 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22):4673-4680.
- Van Damme EJ, Astoul CH, Barre A, Rouge P, Peumans WJ.** 2000. Cloning and characterization of a monocot mannose-binding lectin from *Crocus vernus* (family Iridaceae). *European Journal of Biochemistry*, 267(16):5067-5077
- Williamson PR.** 1994. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *Journal of Bacteriology*, 176(3):656-664.
- Woodcock S, Mornon JP, Henrissat B.** 1992. Detection of secondary structure elements in proteins by hydrophobic cluster analysis. *Protein Engineering*, 5(7):629-635.
- Xu D, Cote JC.** 2003. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(Pt 3):695-704.