



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS

“ESTUDIOS HACIA LA EXPRESIÓN DE CLOROPEROXIDASAS EN *ASPERGILLUS NIDULANS*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

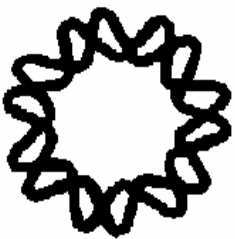
PRESENTA:

ROSALIA DE NECOCHEA CAMPION

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BRENDA VALDERRAMA BLANCO

CUERNAVACA, MORELOS

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Dra. Brenda Valderrama por toda su ayuda y paciencia durante el desarrollo de este proyecto de maestría. Al ser parte de su equipo tuve la oportunidad de aprender mucho. ¡gracias!

Por todo el apoyo económico que recibí. Este proyecto fue financiado por DGAPA-UNAM 202407-3 y por la International Foundation for Science F/3562-2F.

Por todo el apoyo técnico otorgado. En particular quiero agradecerle a Rosa Román por su gran ayuda lo cual fue indispensable para llevar a cabo varios experimentos. También a René Hernández por toda su ayuda en la secuenciación y análisis de varias construcciones genéticas.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio que fueron una fuente importante de inspiración y motivación.

Y a mi familia que quiero mucho y aunque no me entienden siempre me han brindado todo su apoyo.

¡No lo hubiera logrado sin todos ustedes, gracias!

INDICE

Sección	Página
1.0 Introducción	1
1.1 <i>Aspergillus nidulans</i> como sistema de expresión heteróloga	1
1.2 Cloroperoxidasa	4
1.2.1 Sitio activo	5
1.2.2 Actividades catalíticas	5
1.2.3 Mecanismo de reacción	6
1.2.4 Mutagénesis de residuos que afectan a la actividad de la CPO	6
1.2.5 Aplicaciones biotecnológicas	8
2.0 Justificación	10
3.0 Hipótesis	11
4.0 Objetivo General	11
5.0 Materiales y Métodos	12
5.1 Electroforesis	12
5.2 Cepas y medios de cultivo	12
5.3 Identificación de otras enzimas que comparten una similitud importante con la cloroperoxidasa	13
5.4 Reacciones de amplificación	14
5.5 Construcción de los vectores de expresión	17
5.6 Protocolo para la purificación de ADN genómico de <i>A. nidulans</i>	21
5.7 Aislamiento de protoplastos de <i>Aspergillus nidulans</i>	21
5.8 Transformación de protoplastos de <i>A. nidulans</i>	22
5.9 Medición de actividad en cultivos de <i>Aspergillus</i>	23
5.10 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	23
5.11 Transformación de <i>E. coli</i>	24
5.12 Purificación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	24
6.0 Resultados	25
6.1 ¿Otras cloroperoxidasas?	25
6.1.1 La cloroperoxidasa como enzima única	25
6.1.2 Identificación de otras secuencias con similitud con la cloroperoxidasa	25
6.1.3. Análisis del alineamiento múltiple	31
6.2 Obtención de los componentes para construir los vectores de expresión	35
6.2.1 El marcador de selección <i>argB</i>	35
6.2.2 El promotor <i>gpdA</i>	36
6.2.3 El terminador <i>trpC</i>	37

6.3 Construcción de los vectores de expresión	38
6.3.1 Construcción pAGCT	38
6.3.2 Construcción pAGST	41
6.3.3 Construcción pAGMY19T	43
6.3.4 Construcción pAGMY25T	46
6.4 <i>Aspergillus nidulans</i> (PW-1)	46
6.5 Transformación de <i>Aspergillus nidulans</i> (PW-1)	48
6.5.1 Experimentos de transformación	48
6.5.2 Optimización de condiciones para el análisis de posibles transformantes de <i>Aspergillus nidulans</i>	49
6.6 Análisis de las 42 transformantes de <i>Aspergillus nidulans</i>	58
6.6.1 Detección de una actividad oxidante extracelular en varios transformantes de <i>Aspergillus nidulans</i>	58
6.6.2 Cuantificación de la actividad extracelular	60
6.6.3 Diálisis del sobrenadante	61
6.6.4 Cinética de actividad	62
6.6.5 Amplificaciones	65
6.6.6 Conclusiones	66
7.0 Discusión	67
8.0 Referencias	73

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras	Página
Figura 1.1 Mecanismo catalítico de la cloroperoxidasa	6
Figura 5.1 El vector pBCSK	19
Figura 5.2 El vector pAN7-1	19
Figura 5.3 El vector pDC1	20
Figura 6.1.1 Conformación de los ligandos axiales de la CPO	26
Figura 6.1.2 Otras regiones importantes del sitio activo	27
Figura 6.1.3 Un alineamiento múltiple	30
Figura 6.2.1 El vector pARG	36
Figura 6.2.2 El vector pGPD	37
Figura 6.2.3 El vector pTRP	38
Figura 6.3.1 Estrategia de clonación de pAGCT	39
Figura 6.3.2 El vector de expresión pAGCT	39
Figura 6.3.3 Los vectores pAGCT5 y pAGCT6	40
Figura 6.3.4 El vector pGT	41
Figura 6.3.5 La estrategia de clonación de pGST	42
Figura 6.3.6 El vector pAGST	42
Figura 6.3.7 El gen <i>my19</i>	44
Figura 6.3.8 Modificación de <i>my19</i>	45
Figura 6.3.9 El vector pAGMY19T	45
Figura 6.3.10 El vector pAGMY25T	46
Figura 6.5.1 Muestras de ADN genómico	50
Figura 6.5.2 ADN genómico extraído con nitrógeno líquido	51
Figura 6.5.3 ADN genómico amplificado por PCR	52
Figura 6.5.4 Amplificación de la CPO	54
Figura 6.5.5 Una repetición del PCR	54
Figura 6.5.6 El ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i>	56
Figura 6.6.1 Se detecta una actividad oxidante en el sobrenadante	59
Figura 6.6.2 Actividad de una muestra dializada	62
Figura 6.6.3 Cinética que actividad de la cloroperoxidasa	63
Figura 6.6.4 Cinética de actividad en el sobrenadante	63
Figura 6.6.5 Actividad en presencia y ausencia de peróxido	64
Tablas	
Tabla 6.1.1 Secuencias con similitud a la CPO	28
Tabla 6.1.2 Porcentaje de identidad	31
Tabla 6.1.3 Comparación de sitio activo	34
Tabla 6.5.1 Número de protoplastos regenerados	49
Tabla 6.6.1 Actividad detectada en el sobrenadante	60
Tabla 6.6.2 Actividad	61
Tabla 6.6.1 Datos relevantes	65

RESUMEN

La cloroperoxidasa (CPO) es una enzima con enorme potencial biotecnológico por su capacidad para realizar una diversidad de actividades enzimáticas y es reconocida como la más versátil de las peroxidases. Su única fuente natural es el hongo *Caldariomyces fumago*. Desafortunadamente, por razones que no se han entendido completamente, el cultivo de este hongo es extremadamente difícil, eso, aunado a que no ha sido posible obtener sistemas de expresión eficientes ha ocasionado que no existan sistemas de producción de mutantes. Por estas razones se ha dificultado la caracterización y comprensión de las propiedades únicas de la CPO. Si se desea producir y caracterizar variantes de esta enzima sería necesario desarrollar un sistema de producción alterna. En la literatura sólo se reporta un ejemplo de esto, en la cual utilizando *Aspergillus niger* como hospedero se logró la producción heteróloga de la CPO en forma activa.

En este proyecto se exploró la utilización de *Aspergillus nidulans* como sistema de expresión heterólogo para la CPO. Para lograr esto se obtuvo el gen que codifica para la CPO de *C. fumago* y se realizó el diseño y construcción de un vector con todos los componentes necesarios para la expresión de cpo en *A. nidulans*. Se transformaron protoplastos que complementaban el marcador de auxotrofia utilizado. Desafortunadamente los aislados que se analizaron no mostraban evidencias consistentes de integración genética del vector de expresión ni actividad de cloroperoxidasa. Es posible que el sistema de expresión de la cloroperoxidasa sea genéticamente inestable porque la expresión de la CPO no es favorable para el hongo. Sin embargo, en el transcurso del proyecto se enfrentaron algunos problemas técnicos por lo cual es necesario hacer otros estudios antes de concluir si *A. nidulans* pueda ser un buen hospedero para la producción de la cloroperoxidasa.

Hasta la fecha la cloroperoxidasa se ha considerado como una enzima única, tanto por su rango amplio de actividades enzimáticas como sus características estructurales. Uno de los hallazgos importantes de este proyecto fue la identificación de otras secuencias, reportadas en el Genbank, con una similitud importante a la cloroperoxidasa. La caracterización de los productos de estas secuencias será muy interesante porque podría resultar en enzimas igual o más activas que la cloroperoxidasa. Se pudo obtener o aislar tres de estas secuencias que se identificaron y se completó la construcción de vectores de expresión para expresarlas en *Aspergillus*.

1.0 Introducción

1.1 *Aspergillus nidulans* como sistema de expresión heteróloga

El ascomiceto *Aspergillus nidulans* ha sido un modelo importante para la investigación genética de eucariontes, ya que tiene varias características que facilitan su uso en la manipulación genética. Entre ellas, puede detectarse que se ha aislado un gran número de mutantes auxótrofas, su genoma ha sido secuenciado y es relativamente fácil de transformar. Los primeros protocolos de transformación de *Aspergillus* se establecieron hace aproximadamente 20 años (Tilburn *et al.*, 1983; Yelton *et al.*, 1984) indicando la forma por la cual se deben preparar los protoplastos para transformar. Sin embargo, hasta la fecha se sigue publicando información para mejorar esta técnica. Por ejemplo, Koukaki *et al.* (2003) reportaron que la fase de crecimiento a partir de la cual se aíslan los protoplastos afecta la eficiencia de transformación, siendo de 2 a 8 veces mejor en protoplastos aislados de conidiosporas germinadas que en los aislados a partir del micelio.

Otra ventaja importante del uso de *Aspergillus* es la posibilidad de elegir el sitio de integración cromosomal del ADN exógeno. Esto puede conseguirse utilizando un marcador de selección del mismo genoma que aumente la probabilidad de que el ADN se integre por recombinación homóloga en un sitio específico. Bird y Bradshaw (1997) estudiaron algunos de los factores que pudieran afectar a este proceso y encontraron que bajando la temperatura a la cual se regeneran los protoplastos y utilizando un vector linearizado se incrementaba el porcentaje de integración homóloga. Sin embargo, reportaron que el factor que más influía es el marcador utilizado. Es probable que algunas porciones del cromosoma sean más accesibles que otras a la transformación

ya que encontraron que la integración es al menos 5 veces mayor en el locus *niaD* que en el *amdS* cuando compararon estos marcadores (Bird y Bradshaw, 1997). Otro locus donde se ha reportado un alto porcentaje de integración homóloga, comparable con el obtenido en *niaD*, es *argB* (van Gorcom *et al.*, 1986). Este hallazgo es importante, porque al analizar un sistema heterólogo en *Aspergillus*, la integración de un vector en un sitio específico del cromosoma minimiza las diferencias que la influencia del ambiente cromosomal pueda tener sobre la expresión de un gen y permite una comparación más precisa entre distintos genes o promotores utilizados en la expresión heteróloga.

Se han desarrollado sistemas de expresión para *A. nidulans* regulados por distintos promotores. Entre los mejor caracterizados y más utilizados son los promotores *gpdA* y *galA*. El promotor *gpdA* es un promotor fuerte y constitutivo que bajo condiciones naturales regula la expresión del gen *gpd*. La enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) codificada por este gen es clave en el metabolismo de *A. nidulans*, con un papel en la glucólisis y la gluconeogénesis, y puede representar hasta el 5% de la proteína soluble intracelular (Redkar *et al.*, 1998). El promotor *galA* es un promotor fuerte e inducible que regula la expresión de un gen que codifica para una α -amilasa, una enzima que hidroliza enlaces glucosídicos α 1-4 (Juge *et al.*, 1998). La expresión de *galA* se induce con moléculas como la maltosa o maltodextrina, que contienen este tipo de enlace.

El uso de *Aspergillus* en la producción de proteínas recombinantes tiene algunas ventajas sobre el uso de otros organismos eucarióticos, como *Saccharomyces cerevisiae*. La principal es que se obtienen muy altos niveles

de proteínas secretadas de manera regular (Punt *et al.*, 1991). Sin embargo, no se entiende por completo cómo funciona la vía de secreción en hongos filamentosos y hay mucha investigación pendiente para clarificar los detalles de este mecanismo. Conesa *et al.* (2002) presentó una compilación de la información mas relevante desde un aspecto biotecnológico. Para que una proteína entre a la vía secretora requiere de un péptido señal. En hongos se desconoce si éste tiene algún efecto sobre los niveles de secreción, aunque el nivel extracelular de restrictocina que se produjo en *A. nidulans* y *A. niger* fue mucho mas alto cuando se utilizó su propio péptido señal en lugar del de la glucoamilasa (Brandhorst y Kenealy, 1995). En *A. nidulans* también se logró una buena producción de una α -amilasa de trigo utilizando su propio péptido señal (Juge *et al.*, 1998).

Se han reportado varias estrategias para mejorar la secreción de proteínas heterólogas en *Aspergillus*. Por ejemplo, la producción de la interleucina-6 humana activa en cultivos de *A. niger* se incrementó fusionándola con la glucoamilasa, una enzima que se secreta eficientemente (Broekhuijsen *et al.*, 1993). Se introdujo un sitio de corte proteolítico KEX2 entre las 2 proteínas, para después poder separar y purificar la interleucina-6 humana. En otro ejemplo, se logró mejorar la producción de una lacasa de *T. versicolor* en *Aspergillus* induciendo la respuesta de proteínas no plegadas del retículo endoplásmico (Valkonen *et al.*, 2003). Este fenómeno es una respuesta general que se activa al acumularse proteínas no plegadas en el retículo endoplásmico. Su función es estimular la producción de varias chaperonas mediante el factor de regulación transcripcional *hacA*. También se ha mejorado la producción de proteínas heterólogas modificando el promotor para incrementar el nivel de

transcripción. Liu *et al* (2003) reportaron que después de introducir varias copias del elemento activador CCAAT en el promotor *glaA*, se mejora la expresión de un gen estructural para una hemoglobina bacteriana, *vhb*.

El ejemplo con mayor relevancia para este proyecto es la producción de una cloroperoxidasa activa del hongo *Caldariomyces fumago* en *A. níger* (Conesa *et al.*, 2001), la cuál se logró usando el promotor *glaA* y una versión larga del gen que incluye su propio péptido señal y 54 aminoácidos del extremo carboxilo terminal. Esto se había intentado anteriormente en otros organismos, incluyendo *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, pero sin lograr obtener la enzima en su forma activa, probablemente debido a la complejidad de sus modificaciones post-traduccionales.

1.2 Cloroperoxidasa

La cloroperoxidasa (CPO) de *C. fumago* es una hemoproteína de 299 residuos en su forma madura, cuyo peso molecular (42 kDa) refleja un alto nivel de glicosilación (25-30%). Se ha visto que la glicosilación de las peroxidases fúngicas no es esencial para la actividad de estas enzimas; sin embargo, contribuyen a su estabilidad (Conesa *et al.*, 2002). El patrón de glicosilación de la CPO determina la existencia de tres distintas isoenzimas, aunque ésta es sólo una de las modificaciones post-traduccionales de la proteína. La CPO madura también presenta un puente disulfuro, una molécula de protoporfirina (el grupo hemo férrico) y sufre 2 procesamientos proteolíticos con los cuales se eliminan 20 aminoácidos del extremo amino y 54 del extremo carboxilo (la apoproteína tiene un tamaño de 373 aminoácidos).

La estructura secundaria consiste de 8 hélices α , 3 hélices 3_{10} , y un par de hojas β antiparalelas. Su estructura tridimensional, obtenida por

cristalografía de rayos-X, es única (Sundaramoorthy *et al.*, 1995). Sólo dentro del sitio activo se ha reportado que comparte algunas similitudes con otras peroxidasas y con el citocromo P₄₅₀.

1.2.1 Sitio Activo

El grupo hemo de la CPO se mantiene en su lugar por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Al igual que ocurre en el citocromo P450, el grupo hemo de la CPO tiene un ligando proximal de cisteína (Cys²⁹). El ambiente distal de la CPO es polar, al igual que en la mayoría de las peroxidasas, pero a diferencia de estas enzimas, en lugar de tener un ligando distal de histidina, la CPO utiliza un residuo de ácido glutámico (Sundaramoorthy *et al.*, 1995). La posición de Glu¹⁸³ dentro del sitio activo se encuentra coordinada con un residuo de histidina (His¹⁰⁵) (Wang *et al.*, 2003). Estos residuos se mueven poco durante la reacción de catálisis de la cloroperoxidasa (Sundaramoorthy *et al.*, 1998). Esta rigidez ayuda a explicar una discriminación de la cloroperoxidasa hacia ciertos sustratos que no pueden ser acomodados dentro del sitio activo.

El sitio activo se encuentra en el interior de la molécula, por lo que el acceso al grupo hemo está limitado a sustratos de cierto tamaño, que puedan pasar por un canal que conecta la superficie de la proteína al hueco donde se encuentra el hemo. Este canal es principalmente hidrofóbico cerca del hemo y más polar cerca de la entrada (Sundaramoorthy *et al.*, 1995).

1.2.2 Actividades catalíticas

Las características estructurales del sitio activo que la cloroperoxidasa comparte con otras peroxidasas y con el citocromo P₄₅₀ ayudan a explicar la diversidad de reacciones catalíticas que esta enzima puede llevar a cabo. La CPO es la peroxidasa más versátil que se conoce; tiene la capacidad de

catalizar reacciones de halogenasa, deshidrogenasa, oxidasa y catalasa. Lo que distingue a la cloroperoxidasa de otras peroxidasa es su capacidad para catalizar epoxidaciones estereoselectivas de alquenos y oxidar compuestos orgánicos azufrados (Sundaramoorthy *et al.*, 1995).

1.2.3 Mecanismo de reacción

El mecanismo de reacción de la cloroperoxidasa se muestra en la figura 1.1

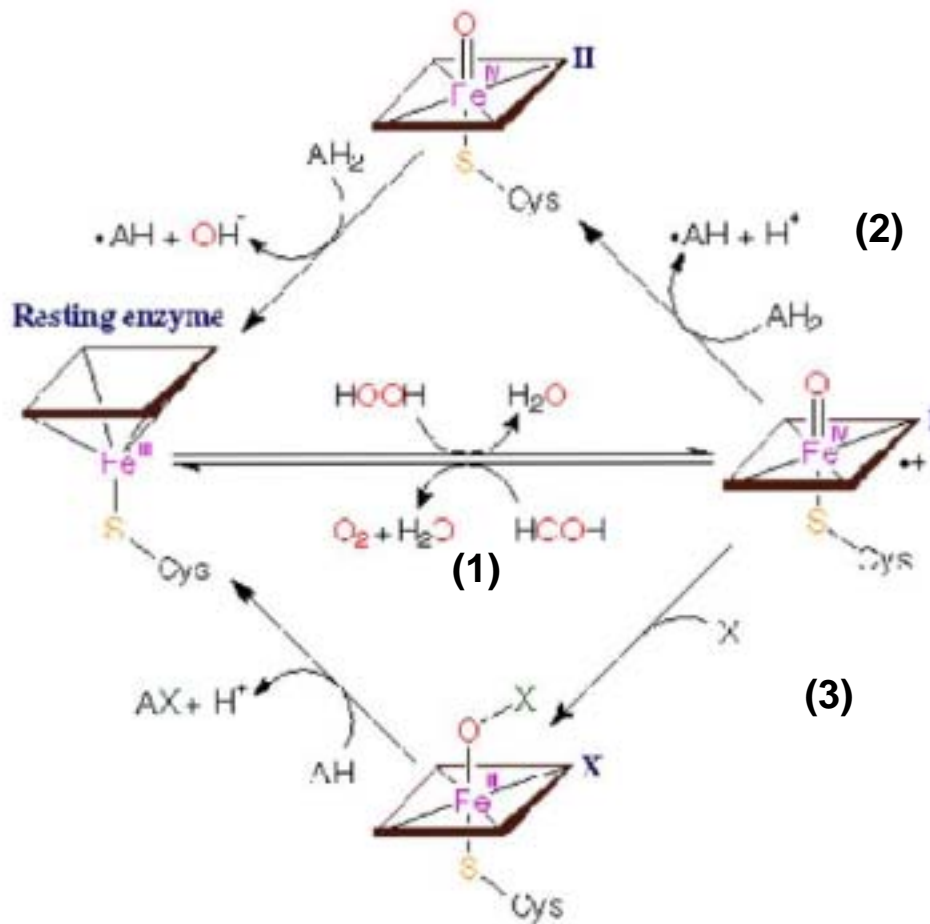


Figura 1.1 Mecanismo catalítico de la cloroperoxidasa donde se muestran tres de sus actividades: (1) Catalasa, (2) Peroxidasa, (3) Halogenasa. (<http://metalloscripps.edu/PROMISE/HAEMCPO.html>)

En el primer paso, el peróxido extrae un electrón del hierro del grupo hemo y otro de la molécula de porfirina formando un intermediario catalítico, el Compuesto I. Este compuesto es relativamente inestable y contiene un centro férrico (Fe^{4+}) que es capaz de llevar a cabo diversas reacciones catalíticas. Por una parte, puede funcionar como catalasa, reaccionado con otra molécula de

peróxido para formar agua y oxígeno. La CPO también cataliza la oxidación de pequeños sustratos orgánicos, una reacción característica de las peroxidasa. Los radicales que se producen en este tipo de reacción generalmente reaccionan entre sí para formar aductos por un mecanismo no enzimático (Colonna *et al.*, 1999). Una tercera actividad catalítica son las reacciones de halogenación con iones como el cloro.

1.2.4 Mutagénesis de residuos que afectan a la actividad de la CPO

Con el fin de evaluar con mayor detalle el papel de los residuos que participan en la catálisis de la cloroperoxidasa, se han hecho algunos estudios de mutagénesis sobre los residuos importantes del sitio activo. En 1999, Yi *et al.* reportaron la producción de una variante de la cloroperoxidasa en la cual habían sustituido el ligando proximal del grupo hemo (Cys²⁹) por un residuo de histidina. Los autores expresaron esta variante de cloroperoxidasa dentro del mismo hongo, *Caldariomyces fumago*, utilizando una técnica de reemplazo alélico. Este cambio causó una ligera disminución (entre 20-40%) en todas las actividades de la enzima. El efecto sobre la actividad de la cloroperoxidasa fue en este caso menor a lo que se esperaba y los autores concluyeron que el ambiente distal podría jugar el papel más importante para mantener las interacciones enzima-sustrato y el amplio rango de actividades catalíticas que lleva a cabo la cloroperoxidasa (Yi *et al.*, 1999).

En 2003, Yi *et al.* reportaron la producción de una variante de la cloroperoxidasa en la cual habían reemplazado el residuo de glutámico (Glu¹⁸³) por una histidina. Expresaron esta variante de la CPO en *Aspergillus niger* y caracterizaron la enzima producida, observando que la sustitución disminuye la actividad de halogenasa en un 85% y la de catalasa en un 50%.

Inesperadamente, la actividad de epoxidación se incrementó 2.5 veces (Yi *et al.*, 2003). Estos resultados indican que el residuo catalítico Glu¹⁸³ es importante, más no indispensable para las actividades de la enzima.

Otro trabajo importante sobre variaciones en la cloroperoxidasa es el de Rai *et al.* (2001) en el cual se mutagenizó al azar el gen *cpo*, seleccionándose variantes con mejor actividad de halogenasa en un ambiente no polar. Al analizar tres variantes con este fenotipo, los autores encontraron que todos contenían la sustitución de un solo residuo, el ligando proximal (Cys²⁹). En dos de ellos la Cys²⁹ se reemplazó con tirosina y en el tercero con histidina. Al ser que la histidina y tirosina tienen cargas diferentes en un medio ácido, es más probable que sea su tamaño que influye sobre la actividad; Debido a que ambos residuos son más grandes que la cisteína, se supone que proporcionan mayor flexibilidad sobre la estructura proteica, en solventes orgánicos, resultando en un incremento de la actividad (Rai *et al.*, 2001). En otro estudio se caracterizaron las actividades de la variante Cys²⁹-His²⁹ en un medio acuoso y se encontró que esta enzima tenía las mismas características que la cloroperoxidasa nativa aunque mostraba una disminución en la actividad del 15% al 40% dependiendo del sustrato utilizado (Yi *et al.*, 1999). Los autores concluyen que el ligando proximal de la cloroperoxidasa no es indispensable para las diferentes actividades.

1.2.5 Aplicaciones biotecnológicas

El interés en mejorar las propiedades catalíticas de la CPO por técnicas como la mutagénesis dirigida radica en que la CPO es una enzima con mucho potencial como biocatalizador industrial y su uso se puede aplicar a varias áreas de la biotecnología. Su capacidad de catalizar epoxidaciones

enantioselectivas lo cual genera productos de alta pureza enantiomérica tiene aplicaciones importantes en la industria farmacéutica (Rai *et al.*, 2001). Su capacidad para oxidar compuestos organoazufrados del diesel hace mas facil disminuir el contenido de azufre en este combustible y puede ser una herramienta importante en la industria petrolera (Ayala *et al.*, 1998). Tambien se ha encontrado que tiene la capacidad de oxidar contaminantes que se encuentran en efluentes industriales lo cual puede ser una opcion conveniente para el tratamiento de ciertos desechos industriales (Rotta y Bon, 2002).

2.0 Justificación

El uso de la mutagénesis dirigida como herramienta para cambiar ciertas propiedades de la cloroperoxidasa se ha dificultado por problemas en el desarrollo de un sistema para la producción de esta enzima. El uso de un sistema homólogo para caracterizar variantes de la cloroperoxidasa se complicó por el hecho de que las mutaciones “knock-out” para inactivar la expresión de la cloroperoxidasa nativa resultaron letales para *Caldariomyces fumago*. Durante muchos años se buscó un sistema heterólogo para la producción de cloroperoxidasa, pero sólo se sintetizaba la enzima en su forma inactiva, dada la complejidad de su procesamiento post-traducciona. Sólo hace pocos años se reportó el hallazgo de un sistema heterólogo, utilizando *Aspergillus niger*, que permite la producción de la cloroperoxidasa en su forma activa (Conesa *et al.*, 2001). En este proyecto se pretende evaluar otro sistema para la expresión heteróloga de la cloroperoxidasa, utilizando *Aspergillus nidulans* para la producción de la enzima. Se espera que los resultados de este proyecto permitan el desarrollo de un sistema de producción alternativa de la cloroperoxidasa, y la oportunidad de generar variantes con propiedades distintas. También se espera que este sistema nos proporcione una herramienta para caracterizar otras enzimas similares a la cloroperoxidasa.

3.0 Hipótesis

Aspergillus nidulans podría ser un buen hospedero para la expresión de cloroperoxidasas recombinantes porque ya se ha logrado de manera exitosa en otra especie del genero *Aspergillus*..

4.0 Objetivo General

- Generar un sistema de expresión heteróloga de la CPO en *Aspergillus nidulans*.

5.0 Materiales y Métodos

5.1 Electroforesis

<p>ADN Los geles se prepararon en su mismo buffer de corrida (TAE1X) y 2% de agarosa para ver fragmentos de ADN < 800 pares de bases o 1% para ver fragmentos 800 pb.</p>	<p>TAE 50X 242 g Tris base 57.1 mL ácido acético glacial 100 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0) Se afora a un litro con agua destilada y esterilizar a 121°C durante 30 min.</p>																
<p>Proteína Estos geles se prepararon con poliacrilamida al 10%</p>	<p>Gel de poliacrilamida 10% (10 mL)</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 60%;"></td> <td style="text-align: right;">PRE-GEL (2 mL)</td> </tr> <tr> <td>4 mL H₂O</td> <td style="text-align: right;">1.4 mL</td> </tr> <tr> <td>3.3 mL Acrilamida 30%</td> <td style="text-align: right;">0.33 mL</td> </tr> <tr> <td>2.5 mL Tris pH 8.8</td> <td style="text-align: right;">0.25 mL</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: right;">(Tris pH 6.8)</td> </tr> <tr> <td>0.1 mL SDS 10%</td> <td style="text-align: right;">0.02 mL</td> </tr> <tr> <td>0.1 mL APS 10%</td> <td style="text-align: right;">0.02 mL</td> </tr> <tr> <td>0.004 mL TEMED</td> <td style="text-align: right;">0.002 mL</td> </tr> </table> <p>Buffer de corrida Tris pH 8.3 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 10%</p>		PRE-GEL (2 mL)	4 mL H ₂ O	1.4 mL	3.3 mL Acrilamida 30%	0.33 mL	2.5 mL Tris pH 8.8	0.25 mL		(Tris pH 6.8)	0.1 mL SDS 10%	0.02 mL	0.1 mL APS 10%	0.02 mL	0.004 mL TEMED	0.002 mL
	PRE-GEL (2 mL)																
4 mL H ₂ O	1.4 mL																
3.3 mL Acrilamida 30%	0.33 mL																
2.5 mL Tris pH 8.8	0.25 mL																
	(Tris pH 6.8)																
0.1 mL SDS 10%	0.02 mL																
0.1 mL APS 10%	0.02 mL																
0.004 mL TEMED	0.002 mL																

5.2 Cepas y medios de cultivo

CEPA	MEDIOS DE CULTIVO
<p><i>E. coli</i> (DH5α)</p>	<p>Medio LB (Sambrook y Russel, 2001) NaCl 171 mM, triptona peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, bactoagar (medio solido) 1.5%. Esta mezcla se esteriliza durante 20 min a 121°C.</p>
<p><i>A. nidulans</i> (PW-1) Esta cepa tiene mutaciones que la hacen auxótrofa para arginina, metionina, y biotina.</p>	<p>Medio Mínimo (Barratt <i>et al.</i>, 1965) Solución de sales 1X, elementos traza 0.1%, glucosa 1%, bactoagar (medio sólido) 1.25%. El pH se ajusta a 6.5 y se esteriliza durante 15 min a 121°C.</p> <p>Solución de Sales 20X (1 L) 120 g NaNO₃ 10.4 g KCl 10.4 g MgSO₄·7H₂O 30.4 g KH₂PO₄</p> <p>Después de disolver los reactivos en 600 ml de agua, la solución se afora a un litro y se esteriliza a 121°C durante 20 min.</p>

	<p>Elementos Traza 100X (100 mL)</p> <p>2.2 g ZnSO₄·7H₂O 1.1 g H₃BO₃ 0.5 g MnCl₂·4H₂O 0.5 g FeSO₄·7H₂O 0.16 g CoCl₂·5H₂O 0.16 g CuSO₄·5H₂O 0.11 g (NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O 5.0 g Na₄EDTA</p> <p>En 80 mL de agua destilada se disuelven los reactivos en el orden que aparecen. Después la solución se aforra a 100 mL y se esteriliza a 121°C durante 20 min. Al final, la solución queda de un color morado y si se observa un precipitado no afecta el crecimiento fúngico.</p>
--	--

5.3 Identificación de otras enzimas que comparten una similitud importante con la cloroperoxidasa

Para identificar otras enzimas que compartan una similitud importante con la cloroperoxidasa se realizó una búsqueda en la base de datos de NCBI (www.ncbi.nih.gov). El péptido maduro de la cloroperoxidasa (299 a.a.) se utilizó para realizar un alineamiento utilizando el protocolo BLAST en el cual se buscaban otras secuencias que al menos en segmentos pequeños compartan una gran identidad a nivel de aminoácidos. Se eligieron siete secuencias, consideradas de mayor relevancia ya que compartían una alta identidad (50-80%) en las tres regiones más importantes para el sitio activo. Estas secuencias se compararon con la cloroperoxidasa en un alineamiento múltiple observándose poca similitud a lo largo de las mismas a pesar de que se encontraban conservados los residuos más relevantes del sitio activo. Debido a que se conocía la estructura tridimensional de la cloroperoxidasa, pero no la de las otras secuencias, se eligió la predicción de estructuras secundarias como otro parámetro de comparación entre ellas. Para ello, se utilizó el método de

SOPMA (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) para analizar cada una de las secuencias de manera independiente. Dentro del alineamiento múltiple se identificaron cada uno de los sitios donde se predecía la estructura de una hélice y éste se comparó con la información estructural conocida de la cloroperoxidasa.

5.4 Reacciones de amplificación

Para la amplificación de distintos fragmentos por medio de PCR, el programa mas utilizado consistió de 40 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 55°C, y un minuto y medio a 72°C. En el caso de utilizar ADN genómico como molde, se incubó primero a 94°C durante 5 minutos para ayudar a separar las cadenas de ADN. Para la secuenciación de la cloroperoxidasa en los vectores de expresión pAGCT5 y pAGCT6 se utilizaron tres oligonucleótidos distintos, correspondientes a diferentes segmentos del gen: CPO5' que corresponde al extremo 5' del gen *cpo*, CPO3' que corresponde al extremo 3' del gen *cpo*, y un oligonucleótido interno CPOINT1 para secuenciar la parte interna del gen (5'-3').

CPO5'(5'-3')

CTATAAAATGTTCTCCAAGGTCC

CPO3'(5'-3')

GGATCCTCGTAGATGCGCTTAAAGG

CPOINT1(5'-3')

CACCAACGAGTCCTTCCC

Para secuenciar los otros componentes de los vectores de expresión que se construyeron, se utilizaron un total de 5 oligonucleótidos: dos (ARGBINT1 y ARGBINT2) corresponden a segmentos internos del marcador de selección *argB*, uno (GPDINT1) a un segmento interno del promotor *gpd*, y finalmente los

oligonucleótidos T3 y T7 para secuenciar los extremos del cassette de expresión.

ARGBINT1(5'-3')

CGAAGCACGAGGACAAGG

ARGBINT2(5'-3')

GCTCATCAAGTCTGCTGG

GPDINT1(5'-3')

GATGCGTAAGGAGAAAATACCG

T3(5'-3')

AATTAACCCTCACTAAAGGG

T7(5'-3')

GTAATACGACTCACTATAGGGC

En la construcción del vector de expresión pAGST, se utilizaron dos oligonucleótidos para amplificar y aislar el gen *stcC* del genoma de *Aspergillus nidulans*, añadiendo sitios *Bam*HI (subrayados) en los extremos, en la manera requerida para la estrategia de clonación en la construcción de este vector.

StcC5'(5'-3')

GGATCCATGTTGCTCAAGAGCATCCAGAAC

StcC3'(5'-3')

GGATCCTCAGAAAGATAGATGTCTATC

Se utilizaron dos oligonucleótidos para amplificar un gen (gi#23394456) identificado en *Phytophthora infestans* y aislado en la clona de *E. coli* MY-25-D-12. Se le añadieron los sitios *Bam*HI (subrayado) a los extremos, también en este caso.

Pinf5'(5'-3')

CGGGATCCATGCTTTCTGTCGTTGCTG

Pinf3'(5'-3')

CGGGATCCCTTAAGCGAACTTTAGCAG

Un segundo gen, identificado en *P. infestans* (gi#23394446) y aislado en la clona MY-19-G-08, también fue amplificado como parte de este proyecto. Se utilizaron un total de 6 en la amplificación de este gen: dos corresponden a los extremos de este gen y añaden un sitio *Bam*HI a cada extremo y los otros cuatro se utilizaron para eliminar dos sitios internos de *Bam*HI encontrados en el gen.

MY195'(5'-3')

CGCGGATCCATGGTTTCATGCGCCTCTATC

MY 193'(5'-3')

CGCGGATCCCTACATCGCCTCGGC

INT15'(5'-3')

GAGCAGCAGCCGCATCCTCGACCCC

INT13'(5'-3')

GGGGTCGAGGATGCGGCTGCTGCTC

INT25'(5'-3')

CATCGACGAGAGCATCCCGCAGGG

INT23'(5'-3')

CCCTGCGGGATGCTCTCGTCGATG

5.5 Construcción de los vectores de expresión

Se realizó la construcción de los vectores de expresión clonando todos los elementos requeridos para los sistemas de expresión en el plasmido pBCSK

(figura 5.1). Aunque los componentes obtenidos para la construcción de estos vectores provienen de distintas fuentes, todos comparten tres elementos comunes:

- A) **El promotor constitutivo *gpdA* de *A. nidulans*** (Punt *et al.*, 1990)-Se obtuvo del vector pAN7-1 (figura 5.2) digiriéndolo con *EcoRI* y *Scal* (romo), purificando el fragmento *gpd* y posteriormente clonándolo en los sitios *EcoRI* y *SmaI* (romo) del plasmido pBCSK.
- B) **El terminador *trpC* de *A. nidulans*** (Mullaney *et al.*, 1985)-Contiene una señal de poliadenilación y también se obtuvo del vector pAN7-1. Este fragmento se aisló digiriendo el pAN7-1 con *BamHI* y *XbaI* y posteriormente clonándolo en estos sitios en el vector pBCSK.
- C) **El marcador de selección *argB*** (Punt *et al.*, 1987)-Se obtuvo del vector pDC1 (figura 5.3) después de digerirlo con *KpnI*, enzima que hace un corte en ambos extremos del marcador. Después *argB* se clonó en el sitio *KpnI* del vector pBCSK.

La estrategia de clonación para la construcción de los vectores de expresión se diseñó de tal forma que el gen que se desea expresar en el cassette de expresión, puede ser clonado entre el promotor (*gpd*) y el terminador (*trpC*) en un sitio único *BamHI*. En total se realizó la construcción de 4 vectores distintos (pAGCT, pAGST, pAGMY19T y pAGMY25T) para expresar 4 genes importantes para este proyecto. Los 4 genes que se obtuvieron son:

1. **El gen de la cloroperoxidasa** (*cpo*)- En un proyecto anterior de laboratorio, una versión larga del gen de la CPO (con su propia secuencia líder y 54 aminoácidos carboxilo terminales que son cortados

en la enzima madura) fue clonado en el plasmido pMOS-Blue (Sánchez, A. 2001). Este gen está clonado de tal forma que se encuentran sitios *Bam*HI en sus extremos. Después de una digestión con *Bam*HI, el fragmento aislado de *cpo* se clonó en el cassette de expresión, dando lugar a la construcción del vector de expresión pAGCT.

2. **El gen *stcC* de *A. nidulans*** (Brown *et al.*, 1996)– Este gen que comparte similitudes importantes a la cloroperoxidasa (*cpo*) fue identificado en *A. nidulans*. Para aislarlo se purificó ADN genómico de este organismo y el gen *stcC* fue amplificado por PCR utilizando oligonucleótidos (*StcC*5' y *StcC*3') que añaden los sitios *Bam*HI a los extremos. Posteriormente fue clonado en el cassette de expresión, dando al vector de expresión pAGST.
3. **El gen *my19* de *Phytophthora infestans*** (Kamoun *et al.*, 1999; Torto *et al.*, 2003). La clona MY-19-G-08 de *E. coli* que contiene el vector en la cual se encuentra aislado este gen fue amablemente donada a nuestro laboratorio por la Dra. Sophien Kamoun (Department of Plant Pathology, Ohio State University). Posteriormente fue necesario realizar una serie de PCRs para amplificar el gen, de tal forma que fuese posible añadir sitios *Bam*HI a los extremos y eliminar dos sitios *Bam*HI internos del mismo fragmento. Finalmente fue utilizado en la construcción del vector de expresión pGMY19T.
4. **El gen *my25* de *Phytophthora infestans*** (Kamoun *et al.*, 1999; Torto *et al.*, 2003) La clona de *E. coli* MY-25-D-12 también fue amablemente donada a nuestro laboratorio por la Dra. Sophien Kamoun. Por PCR fue posible amplificar el gen *my25* y añadir sitios del corte *Bam*HI a sus

extremos. Finalmente fue utilizado en la construcción del vector de expresión pAGMY25T.

Vectores Iniciales

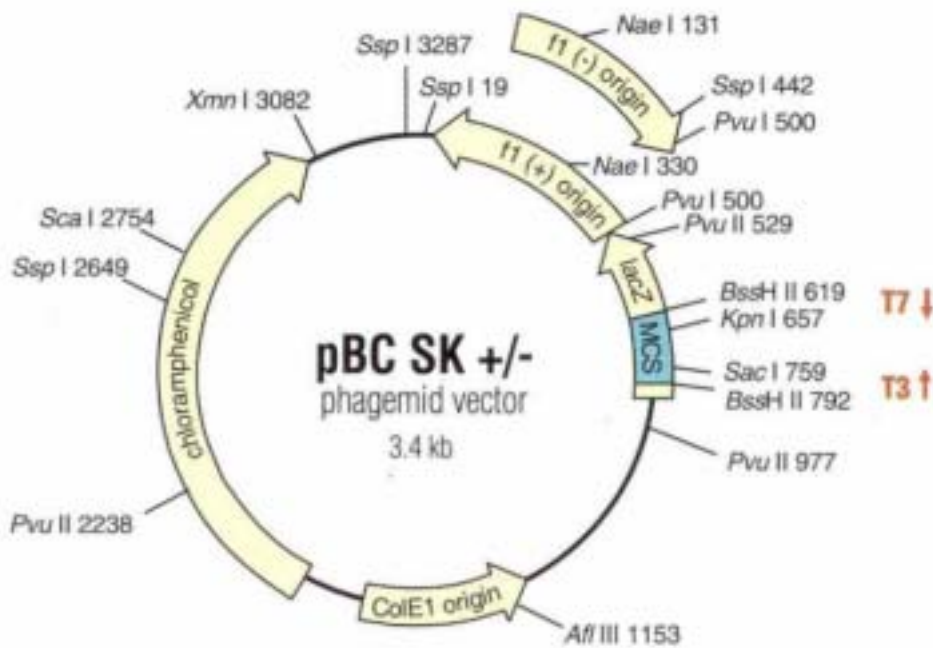


Figura 5.1 El vector pBCSK utilizado para realizar la construcción de los vectores de expresión.

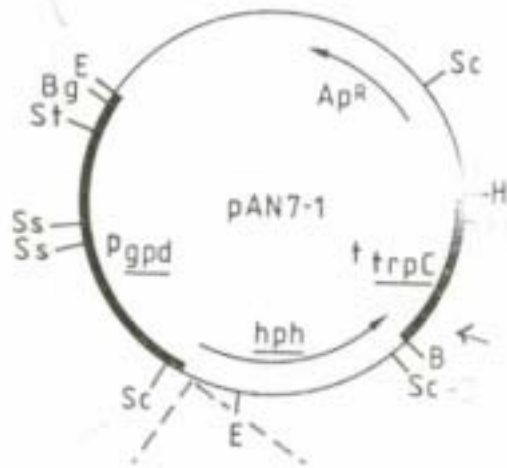


Figura 5.2 El vector pAN7-1 donde se obtuvo el promotor *gpd* y el terminador *trpC*.

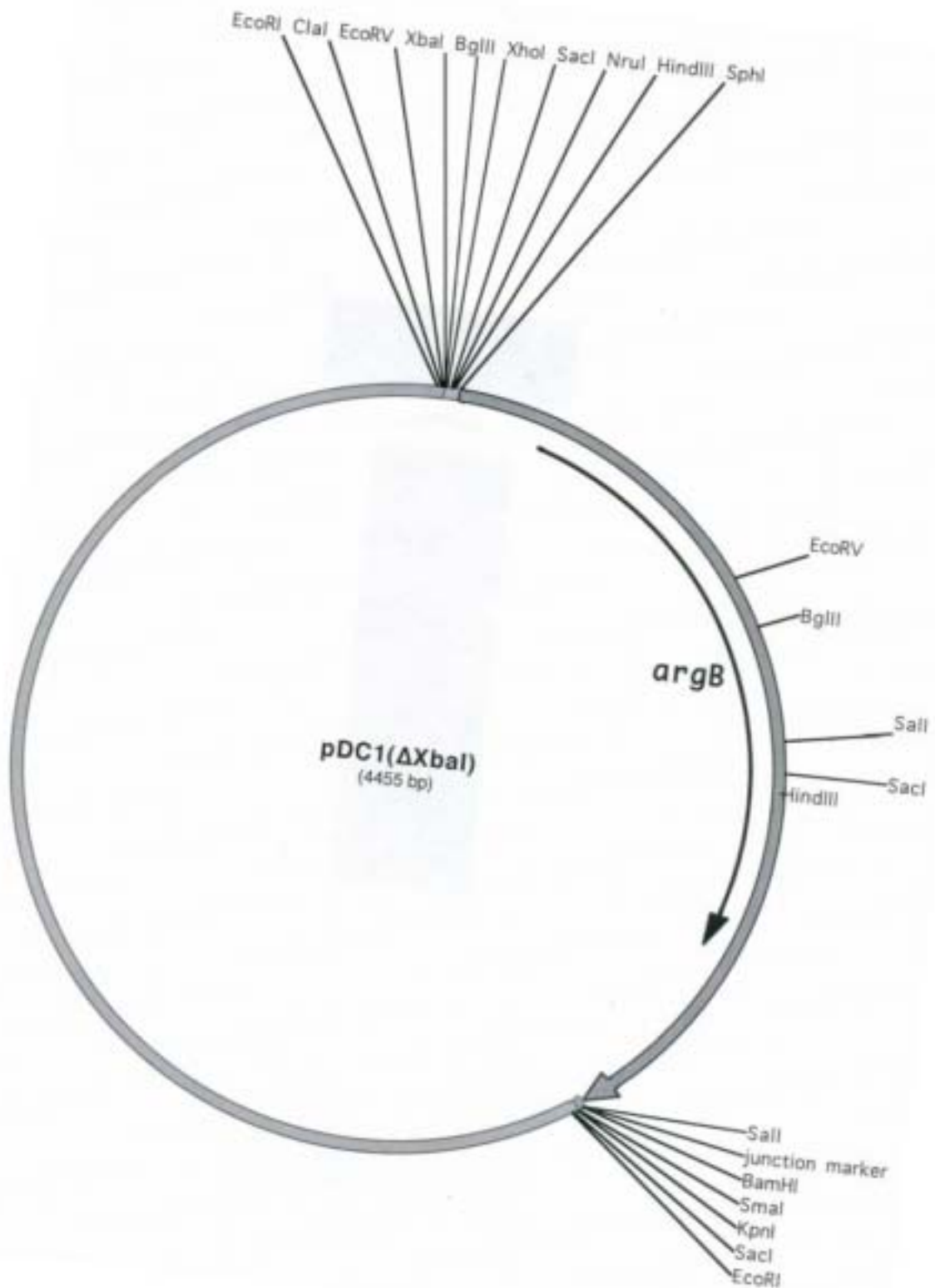


Figura 5.3 El vector pDC1 de donde proviene el marcador de selección *ArgB*.

5.6 Protocolo para la purificación de ADN genómico de *A. nidulans*

Primero se inoculan 3 mL de medio mínimo con las esporas de *A. nidulans*. Los cultivos se incuban a 37°C y 300 rpm durante 3 días hasta que se observe el crecimiento de 1-2 g de micelio. Se lava este micelio con agua estéril y la pastilla se mezcla con 500 µl de buffer de extracción (100 mM Tris, pH 8, 10 mM EDTA, 2% SDS, 100 µg/mL proteinasa K). Esta mezcla se muele con un homogenizador de vidrio estéril. Alternativamente, y con mejores resultados, la pastilla de micelio se muele en un mortero estéril con nitrógeno líquido y luego se mezcla con el buffer de extracción. Este homogenado se incuba durante una hora a 60°C. Luego se agrega un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1, se emulsifica cuidadosamente con la punta de una pipeta y se incuba a 4°C durante 30 min. Se centrifuga 10 min a 13,000 rpm y a 4°C. Se toma la fase superior, se le agrega medio volumen de acetato de amonio 5M y se incuba a 4°C durante una hora. Luego se centrifuga a 13,000 rpm en una centrifuga Eppendorf 5415 durante 10 minutos. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y se le agrega RNAsa hasta una concentración de 0.02 µg/mL. Se incuba cinco minutos a temperatura ambiente, luego se precipita el ADN por la adición de 0.55 volúmenes de isopropanol. Centrifuga inmediatamente a 13,000 rpm, temperatura ambiente, durante 10 minutos. La pastilla de ADN se lava dos veces con etanol al 70% y después se seca y se resuspende en 50 µl de agua estéril.

5.7 Aislamiento de protoplastos de *Aspergillus nidulans*

Se realiza básicamente como se describe por Yelton *et al.* (1984). Se inoculan 400 ml de medio con esporas frescas de *Aspergillus nidulans*. Este cultivo se deja en agitación lenta (80 rpm) durante 12 hrs a 30°C, hasta que se observa

que las esporas inician la germinación. El cultivo se pasa por un filtro de Miracloth estéril, y la biomasa se lava con una solución de lavado de micelio (MgSO_4 0.6 M). Se resuspende medio gramo de micelio en 5 ml de una solución OM (MgSO_4 1.2 M, NaH_2PO_4 10 mM) y se adiciona enzima lítica de *Trichoderma* (Sigma) a una concentración de 1-2 mg de enzima por mL. Esta mezcla se incuba en hielo durante 5 minutos y se adicionan 6 mg de bovine serum albumin (BSA). Se agita a 80 rpm en un matraz de 250 ml a 30°C durante 45 minutos. Con la punta de una pipeta se separan cuidadosamente los protoplastos del resto de la masa celular. A esta solución se adiciona 10 mL de buffer TB frío (Sorbitol 0.6 M, Tris-HCl (pH 7) 0.1 M) y la mezcla se centrifuga en un tubo de 50 mL durante 15 min a 5500 rpm a 4°C. Se toma la interfase donde se encuentran los protoplastos y se mezcla con un volumen igual de STC (Sorbitol 1.2 M, CaCl_2 10 mM, Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM). Una vez que los protoplastos se hayan mezclado con el STC, se centrifugan 10 minutos a 6000 rpm y a 4°C. El sobrenadante se desecha y queda una pastilla de protoplastos. La pastilla se resuspende en 2 ml de STC y se vuelve a centrifugar con las mismas condiciones. Este paso se repite 3 veces para asegurar que los protoplastos quedan totalmente libres de las enzimas líticas utilizadas. Al final, la pastilla se resuspende en 1 mL de STC y se mantiene en hielo. Todas las soluciones que utilizados en este experimento se esterilizan en el autoclave y se almacenan a 4°C.

5.8 Transformación de protoplastos de *A. nidulans*

Para transformar los protoplastos se toma 1 μg de ADN plasmidico disuelto en 100 μl de buffer STC y se combina con 100 μl de los protoplastos preparados en el paso anterior. Esta mezcla se incuba 25 minutos a temperatura

ambiente. Luego la mezcla se incuba 2 minutos a 42°C y se transfiere a hielo durante 4 minutos. Se le añade 350 µl de solución PEG (CaCl₂ 10 mM, 60% PEG 4000) mezclándose suavemente, y después se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se le añaden otros 350 µl de PEG y se incuba otros 5 minutos, y finalmente se añaden otros 350 µl de PEG y se incuba 10 minutos. A toda esta mezcla se agrega 1 ml de STC y luego se distribuye en 3 cajas de Petri con el medio adecuado para la selección de los transformantes. Adicionalmente, este medio lleva 1.2 M sorbitol que actúa como buffer osmótico. Las cajas se incuban 1-2 días a 37°C hasta ver la regeneración de protoplastos (como estrellitas) en el medio. Los protoplastos prometedores se separan para esporular de forma aislada, y luego se separan las esporas para obtener cultivos aislados de *Aspergillus nidulans* que provienen de una sola spora. La solución PEG utilizada en este experimento se almacena a temperatura ambiente.

5.9 Medición de actividad en cultivos de *Aspergillus*

Los componentes utilizados para medir la actividad en el sobrenadante de los cultivos de *Aspergillus*, incluyen guayacol como sustrato. La oxidación de este sustrato se mide a 470 nm, y una reacción típica, incluye 50 µl de sobrenadante en 450 µl buffer de acetatos 200 mM pH 4, 20 mM guayacol, 20 mM KCl, 1 mM H₂O₂.

5.10 preparación de células competentes de *E. coli* DH5α

Se utilizó un protocolo estándar (Sambrook y Russel, 2001). Se parte de un precultivo de 5 mL en LB de *E. coli* DH5α. Se inoculan 100 mL de LB con 2 mL del precultivo en un matraz de 250 mL. Se cultiva en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 0.6 a 600 nm (aproximadamente 2 h). Al

llegar a la densidad óptica el cultivo se enfría en hielo durante 15 min y se centrifuga 10 min a 10,000 rpm 4°C. Se descarta el sobrenadante y las células se resuspenden en 50 mL de una solución fría de CaCl₂ 0.1 M. Se incuba en hielo al menos 2 horas, máximo 4 horas. Las células se centrifugan otra vez y se resuspenden en 5 mL de CaCl₂ 0.1 M y se le agrega 850 µl de glicerol estéril 100%. Se hacen alicuotas de 200 µl y se congelan a -80°C

5.11 Transformación de *E. coli*

100 µl de células competentes se descongelan en hielo y luego se les adiciona 1-5 µl de la reacción de ligación. El tubo se coloca en hielo durante 40 minutos, después de los cuales se pone 2 minutos a 42°C y luego se vuelve a enfriar en hielo. Se le adiciona 1 mL de medio LB (sin antibióticos) y se agita a 37°C, por 50 a 60 minutos. Al final se plaquean 100 µl del cultivo en caja de Petri con medio de LB sólido y el antibiótico selectivo. Las cajas se mantienen en incubación a 37°C durante 12 horas hasta que aparezcan colonias.

5.12 Purificación de ADN plasmídico de *E. coli*

Para la purificación de ADN plasmídico de *E. coli* se utilizó el QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN. Después de la purificación, la pastilla de ADN se resuspende en 50 µl de H₂O estéril y se almacena a -20°C.

6.0 Resultados

6.1 ¿Otras cloroperoxidasas?

6.1.1 La cloroperoxidasa como enzima única

La estructura tridimensional de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* presenta un patrón de plegamiento distinto a todas las otras proteínas conocidas hasta la fecha (Sundaramoorthy *et al.*, 1995) siendo el único miembro de la categoría Peroxidasas_2 cuya estructura se ha observado (Pfam # 01328). El sitio activo de esta enzima se considera híbrido, ya que comparte características estructurales tanto con el citocromo p450 como con otras peroxidasas. Sin embargo, una comparación a lo largo de su secuencia revela poca identidad entre la cloroperoxidasa y otras enzimas (NCBI-BLAST).

6.1.2 Identificación de otras secuencias con similitud con la cloroperoxidasa

En los últimos 10 años, los numerosos proyectos de secuenciación genómica han incrementado de manera sustancial el número de secuencias nucleotídicas depositadas en las bases de datos y, por consecuencia, el número de las secuencias proteicas inferidas a partir de dichos genes (NCBI-GenBank). Uno de los hallazgos importantes de este proyecto fue encontrar otras enzimas que comparten una identidad significativa con la cloroperoxidasa en zonas clave. Estas zonas corresponden a la porción de la proteína que tiene una interacción directa o indirecta con el grupo hemo y, por lo tanto, determinan la actividad catalítica. En la estructura cristalográfica de la cloroperoxidasa se identifican tres regiones críticas: 1) El área del ligando axial, que comprende de Arg²⁶ a Asp³⁷ y que forman una plataforma rígida desde donde la Cys²⁹ coordina al átomo de hierro del grupo hemo, 2) La porción comprendida entre los residuos

Glu¹⁰⁴ y Ser¹¹⁰, la cual interacciona con los propionatos del grupo hemo, 3) El residuo catalítico Glu¹⁸³ y la His¹⁰⁵ cuyo papel parece el correcto posicionamiento del residuo catalítico dentro del sitio activo.

En una búsqueda tipo BLAST uno encuentra muchas secuencias de peroxidasa y otras oxidasas que comparten una alta identidad con la cloroperoxidasa en la región del ligando axial (cys²⁹). De hecho, ésta es la zona donde Sundaramoorthy *et al.* (1995) reportaron que la cloroperoxidasa comparte mayor similitud con el citocromo p450, ya que ambos utilizan un residuo de cisteína para formar este enlace. En los dos casos, la cisteína es flanqueada por residuos de prolina en el extremo de una hélice proximal y es estabilizada por puentes de hidrógeno formados por los residuos que la rodean. La diferencia entre estas dos enzimas es la orientación y localización de la hélice proximal: mientras que en la cloroperoxidasa se encuentra cerca del amino terminal y perpendicular al grupo hemo, en el citocromo p450 se encuentra cerca del carboxilo terminal y paralelo al grupo hemo (figura 6.1.1).



Figura 6.1.1 Conformación de los ligandos axiales de la cloroperoxidasa (CPO) y el citocromo p450 (adaptado de Sundaramoorthy *et al.* 1995)

La región comprendida entre los residuos 104 a 110, junto con uno de los propionatos del grupo hemo, coordinan un átomo de Mn^{2+} (Figura 6.1.2). Aunque toda interacción con los propionatos o el grupo hemo es importante, el residuo más relevante de este grupo es His¹⁰⁵ el cual orienta el residuo catalítico Glu¹⁸³ mediante un puente de hidrógeno (Figura 6.1.2).

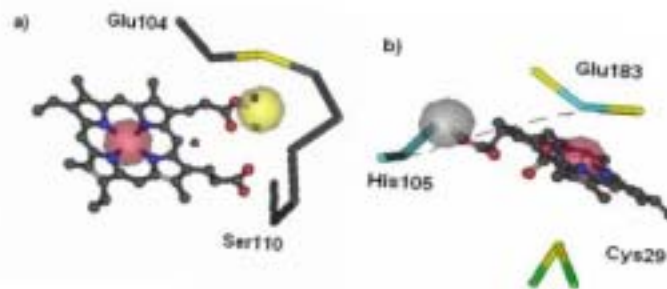


Figura 6.1.2 Otras regiones importantes del sitio activo. a) Residuos 104 a 110 b) El residuo catalítico Glu¹⁸³ se encuentra unido a His¹⁰⁵ por medio de un puente de hidrógeno. Se incluyó el ligando axial (Cys²⁹) porque así se puede observar mejor la posición de las tres regiones más importantes del sitio activo alrededor del grupo hemo

Las características únicas del sitio activo de la cloroperoxidasa deben explicar su gran rango de actividades y su versatilidad como hemo enzima. Excluyendo los primeros 50 residuos de la cloroperoxidasa, la mayor parte de esta enzima se parece poco a otras secuencias enzimáticas. Sin embargo, analizando cuidadosamente los resultados de nuestra búsqueda, se lograron identificar un total de siete secuencias, provenientes de proyectos de secuenciación en seis especies de hongos distintos, que comparten una similitud importante con la cloroperoxidasa en las 3 zonas importantes para el sitio activo (tabla 6.1.1).

Tabla 6.1.1 Secuencias que se identificaron con una similitud importante con la cloroperoxidasa. Se incluyen los números de identificación (gi) de la base de datos Genebank (NCBI).

Organismo	Secuencia	gi	Autores
<i>Magnaporthe Grises</i>	MG07	38107074	No publicado
<i>Neurospora crassa</i>	CAD7	28950378	No publicado
<i>Phytophthora infestans</i>	MY25	23394456	Torto <i>et al.</i> , 2003
<i>Phytophthora infestans</i>	MY19	23394446	Torto <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus oryzae</i>	BAE6	83771273	Machida <i>et al.</i> , 2005
<i>Chaetomium globosum</i>	EAQ8	88178817	No publicado
<i>Aspergillus nidulans</i>	StcC	2498968	Brown <i>et al.</i> , 1996

MG07 – Aislada en un proyecto de secuenciación de genoma del ascomiceto *Magnaporthe grisea*. Es la secuencia proteica que se predice de un probable gen identificado en el cromosoma III de este hongo. Hasta el momento se desconoce su función o siquiera que sea funcional, ya que no se ha confirmado su expresión. Su tamaño completo es de 257 aminoácidos en los cuales se predice un péptido señal de 17 residuos.

CAD7 – Aislada en un proyecto de secuenciación de genoma del ascomiceto *Neurospora crassa*. Se identificó su gen en el cromosoma II de este hongo, pero hasta el momento se desconoce si sea funcional. Su tamaño completo es de 272 aminoácidos entre los cuales se predice un péptido señal de 33 residuos.

MY19 y MY25 – Estas proteínas pertenecen al oomiceto *Phytophthora infestans* y provienen de un proyecto de identificación de genes expresados durante el proceso de infección del jitomate. Estos genes se inducen en presencia de la planta, y por lo tanto se asume que son funcionales. La proteína codificada por

MY19 es de 254 aminoácidos y parece tener un péptido señal de 23 residuos. El tamaño completo de la proteína codificada por MY25 es de 255 aminoácidos y parece tener un péptido señal de 17 residuos.

BAE6 – Esta proteína es el producto de un gen identificado en un proyecto de secuenciación del genoma del ascomiceto *Aspergillus oryzae*. Hasta el momento se desconoce su función. El péptido predicho parece tener un tamaño de 275 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 19 residuos.

EAQ8 – Esta secuencia fue identificada en un proyecto de secuenciación de genoma del ascomiceto *Chaetomium globosum*. Se infiere de la secuencia del gen pero hasta el momento no se ha observado su expresión. El tamaño del péptido completo es de 283 aminoácidos incluyendo un péptido señal de 18 residuos.

StcC – El transcrito de esta enzima, etiquetada como una oxidasa, fue identificado en una región de 60 kb del genoma de *Aspergillus nidulans* y parece estar involucrado en la producción del metabolito secundario esterigmatocistina. Es uno de los 25 transcritos expresados bajo las condiciones necesarias para la producción de este metabolito, cuya síntesis requiere de al menos 15 actividades enzimáticas. Su tamaño completo es de 311 aminoácidos y parece incluir un péptido señal de 25 residuos.

En el alineamiento múltiple de la cloroperoxidasa de *C. fumago* con estas enzimas se pueden apreciar las similitudes en las zonas importantes para el sitio activo (figura 6.1.3).

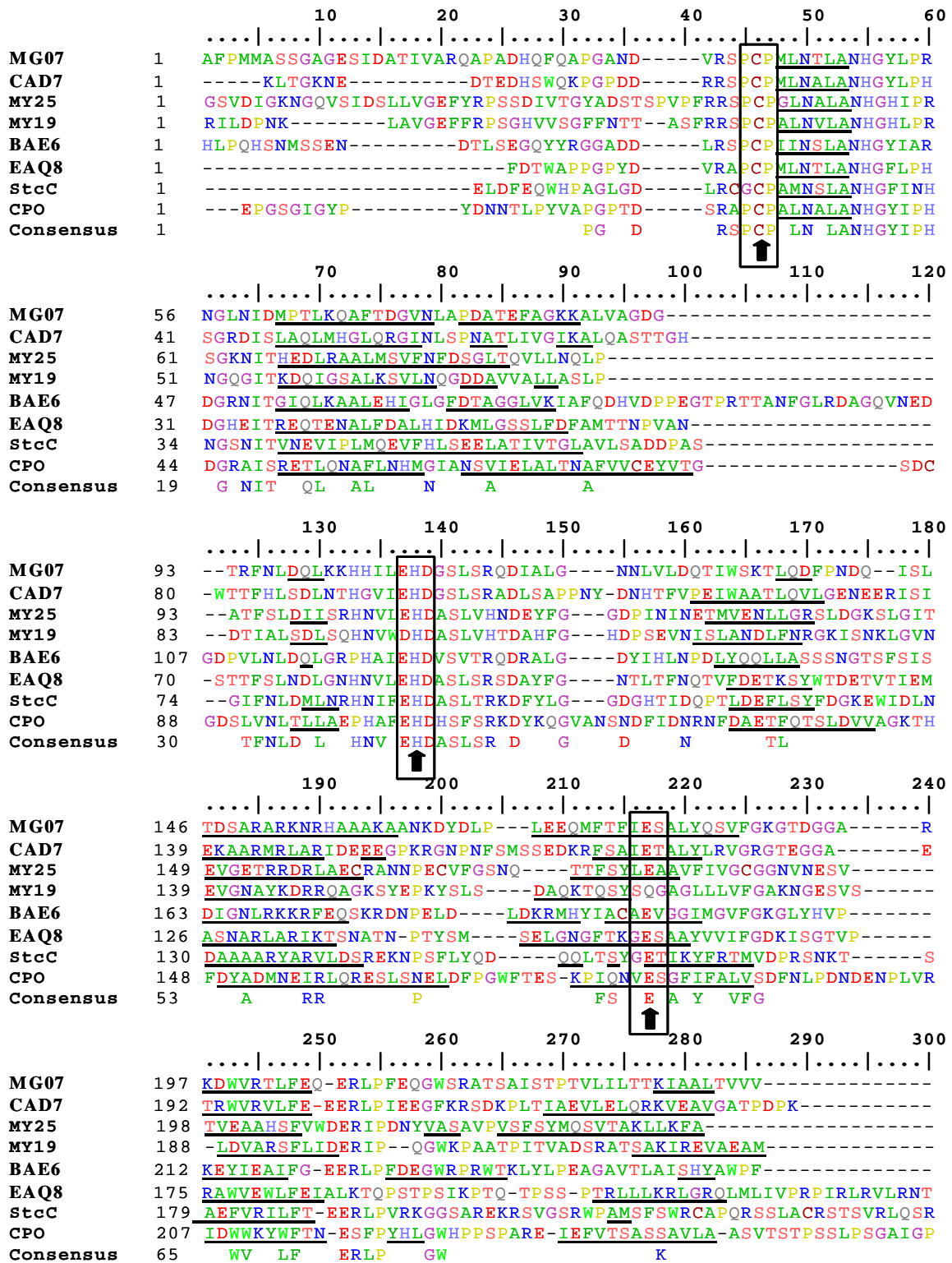


Figura 6.1.3 Un alineamiento múltiple que compara las secuencias halladas con la cloroperoxidasa (CPO). Las tres regiones mas importantes del sitio activo se indican con recuadros y una flecha que señala los residuos (Cys²⁹), (His¹⁰⁵), y (Glu¹⁸³) de la CPO, desde inicio a final. En todas las secuencias se elimino el péptido señal predicho mostrando el péptido maduro. Los residuos subrayados indican las regiones donde se predice que hay hélices en la estructura secundaria de cada proteína. Las prolinas se muestran en color amarillo.

6.1.3. Análisis del alineamiento múltiple.

Conservación e identidad - En general, la identidad global de las secuencias presentadas en la Fig. 6.1.3 es menor del 30% (Tabla 6.1.2). Sin embargo, ésta se incrementa significativamente si consideramos de manera conjunta las tres porciones involucradas en la estructura del sitio activo (Tabla 6.1.2)

Tabla 6.1.2 Porcentaje de identidad entre la cloroperoxidasa (CPO) y otras enzimas identificadas con una alta similitud en las áreas importantes para el sitio activo.

Enzima	% Identidad total	% Sitio Activo
StcC	27%	65%
My19	23%	65%
My25	28%	75%

Estructura secundaria - Cada una de las secuencias propuestas fue sometida de manera independiente a una predicción de estructura secundaria, tal como se describe en Materiales y Métodos. Basados en la estructura cristalográfica de la cloroperoxidasa de *C. fumago* se identificaron un total de 10 hélices, la mayoría helices- α , que se usaron como referencia. Al localizar las estructuras predichas en el alineamiento múltiple, se encontro que salvo el extremo carboxilo, la posición relativa es equivalente con la de *C. fumago*. Esta observación es especialmente relevante, pues indica una probable similitud a nivel de estructura tridimensional.

El ligando axial - La porción de la proteína que flanquea al aminoácido Cys²⁹ de la cloroperoxidasa de *C. fumago*, entre las posiciones 26 a 37, forma una plataforma rígida desde donde se proyecta el ligando axial. En todas las secuencias estudiadas se identifica una cisteína invariante en el extremo de una hélice equivalente a la proximal de *C. fumago*. Con una sola excepción, este aminoácido se encuentra flanqueado por dos aminoácidos de prolina. En

C. fumago, la rigidez de la plataforma está dada por un puente de hidrógeno formado entre los aminoácidos Arg²⁶ y Asp³⁷. La presencia de una estructura secundaria similar, además de la identidad de las posiciones Arg²⁶, Cys²⁹ y Asp³⁷ sugiere fuertemente que esta porción de la proteína, equivalente al piso del sitio activo de la cloroperoxidasa, está conservada funcionalmente.

Interacción con los propionatos del grupo hemo - De manera general, las hemoproteínas estabilizan la interacción con el grupo prostético mediante dos fuerzas complementarias: por un lado ejercen una interacción hidrofóbica con el extremo portador de los grupos vinilo, mientras que por otro participan en una interacción electrostática con el extremo polar, portador de los grupos propionato, los cuales se orientan hacia el solvente. En la cloroperoxidasa han sido identificados siete aminoácidos, entre Glu¹⁰⁴ y Ser¹¹⁰, los cuales interaccionan con los dos propionatos del grupo hemo (Sundaramoorthy *et al.*, 1995). Al comparar las secuencias enzimáticas se pueden hacer varias observaciones sobre esta región: (1) La conservación de la histidina (His¹⁰⁵ en la cloroperoxidasa), cuyo papel es el posicionamiento, mediante un enlace de coordinación, del aminoácido catalítico (Glu¹⁸³ en la cloroperoxidasa), (2) las tres secuencias parecen compartir una mayor identidad en los primeros 5 aminoácidos de esta región. En la cloroperoxidasa, estos 5 aminoácidos interaccionan en conjunto con uno de los dos propionatos para formar un sitio de unión para el cation Mn²⁺ (Wang *et al.*, 2003). Las secuencias comparten una similitud casi perfecta con la proteína de *C. fumago* en la región equivalente a las posiciones Glu¹⁰⁴ a Ser¹¹⁰, incluyendo al aminoácido His¹⁰⁵.

Aminoácido Catalítico -- Con excepción de la secuencia MY19, todas las demás parecen compartir el aminoácido catalítico Glu183. A pesar de que la

identidad en esta región no es muy alta, en todos los casos observamos que esta posición se encuentra dentro de una hélice alfa, al igual que en la cloroperoxidasa. La presencia de un aminoácido de ácido glutámico en esta posición no es indispensable para la actividad enzimática de la cloroperoxidasa, que se conserva al sustituirlo por histidina (Yi *et al.*, 2003). En este caso, la función de las secuencias que se presentan podría conservarse a pesar del aminoácido que ocupe esta posición.

Aminoácidos con otras funciones -- Existen otros aminoácidos en la cloroperoxidasa que, a pesar de no participar en la conformación del sitio activo, son importantes en la interacción con sustratos. Por ejemplo, ciertos sustratos hidrofóbicos interactúan con las cadenas laterales de Phe¹⁰³, Leu⁷⁰, Phe¹⁸⁶ y Val¹⁸². No se pudo correlacionar las posiciones de estos aminoácidos de la cloroperoxidasa con sus equivalentes en las otras secuencias, por lo tanto es posible que éstas últimas muestren otras interacciones, resultando en capacidades diferentes con sustratos distintos a la cloroperoxidasa. Es algo que no se podrá definir hasta que no se hayan caracterizado los productos de estas otras secuencias.

Sitios de glicosilación -- La cloroperoxidasa es una enzima altamente glicosilada, con 14 sitios de unión de carbohidratos. Tres de estos sitios sostienen N-glicosilaciones; entre ellos se encuentra el aminoácido Asn⁹³, cuya posición se encuentra conservada en tres de las secuencias. Los sitios de O-glicosilación de la cloroperoxidasa se encuentran en el extremo carboxilo de la enzima que es rica en serinas y treoninas. Estos residuos también se encuentran en abundancia en los extremos carboxilo de las otras enzimas, a pesar de que no existe conservación en sus posiciones exactas. Todo esto

podría indicar que la posición relativa de las modificaciones post-traduccionales se encuentra conservada entre los diferentes miembros de esta familia.

En suma, las características anteriores indican que estas enzimas tienen importantes similitudes estructurales, no sólo en las zonas que conforman el sitio activo, sino también a nivel de la estructura secundaria, y probablemente también comparten la conformación tridimensional. Esto es muy importante porque hasta la fecha la cloroperoxidasa es la única proteína encontrada con su tipo de plegamiento.

Al encontrar otras secuencias enzimáticas que comparten una alta identidad con la cloroperoxidasa, particularmente en las zonas importantes para el sitio activo, se presenta una excelente oportunidad para caracterizar otras enzimas que podrían compartir algunas de las propiedades de la cloroperoxidasa. Las secuencias de mayor interés son las que vienen reportadas junto con alguna evidencia de su expresión, pues esto aumenta la probabilidad de que sean enzimas funcionales. De las siete secuencias antes mencionadas, se ha encontrado evidencia de expresión para tres de ellas: las que codifican para las enzimas My25 y My19 de *Phytophthora infestans* y StcC de *Aspergillus nidulans*.

Tabla 6.1.3 Comparación de las regiones importantes para el sitio activo en algunas secuencias.

Enzima	Ligando Axial (Cys²⁹)	Propionatos (Glu¹⁰⁴ a Ser¹¹⁰)	Amino- ácido Catalítico (Glu¹⁸³)
CPO	R A P C P A L N A L A N	E H D H S F S	E
StcC	R C G C P A M N S L A N	E H D A S L T	E
My19	R S P C P A L N V L A N	D H D A S L V	Q
My25	R S P C P G L N A L A N	E H D A S L V	E

Dado que se contaba con la secuencia nucleotídica que codifica para todas y cada una de ellas, se amplió el enfoque original del proyecto para incluir la construcción de vectores de expresión para estas secuencias, de manera paralela a los esfuerzos realizados con el gen de la cloroperoxidasa. Se consideró que, de esta manera, se generaba una base sólida para futuros proyectos en los cuales se lleve a cabo la caracterización bioquímica de estas enzimas.

6.2 Obtención de los componentes para construir los vectores de expresión

Dado que la intención de este proyecto es obtener una expresión heteróloga de la cloroperoxidasa en *Aspergillus nidulans*, se reunieron los componentes necesarios para la construcción de vectores de expresión con los cuales se pudiera transformar este organismo. Todos los vectores de expresión que se construyeron en este proyecto comparten tres elementos comunes: el marcador de selección (*argB*), el promotor (*gpdA*) y el terminador (*trpC*).

6.2.1 El marcador de selección *argB* Este marcador de selección proviene de *Aspergillus nidulans* y fue elegido porque complementa una de las auxotrofías de la cepa utilizada en este proyecto, *Aspergillus nidulans* (PW-1). Adicionalmente, este marcador tiene la función de dirigir el sitio de integración genómica, ya que se ha reportado que en un alto porcentaje de las transformantes el vector de expresión se integra por recombinación homóloga en una sola copia (van Gorcom *et al.*, 1986). Se obtuvo una copia funcional del gen de *argB* (sin mutaciones) del vector pDC1 (vea Material y Métodos), digiriéndolo con *EcoRI* para liberar el fragmento completo de 1872 pb. Este fragmento se clonó directamente en el mismo sitio del vector pBCSK dando

lugar al vector pARG1 (figura 6.2.1). De este vector es posible liberar el fragmento *argB* digiriéndolo tanto con *EcoRI* como con *KpnI*.



Figura 6.2.1 Vector pARG en la cual se aisló el gen *argB* para uso en la construcción de vectores de expresión que puedan ser utilizados para la transformación de *Aspergillus nidulans*.

6.2.2 El promotor *gpdA* Este es un promotor fuerte y constitutivo que fue aislado de *A. nidulans*. En condiciones naturales, este promotor es responsable de la abundante producción de una enzima soluble intracelular, la GPD, que constituye hasta el 5% de la proteína intracelular soluble (Punt *et al.*, 1990). *In vitro*, al utilizar este promotor para dirigir una expresión heteróloga, se ha logrado obtener hasta 5 veces más del producto (Punt *et al.*, 1991). Se obtuvo este promotor del vector pAN7-1 (vea Material y Métodos), después de digerirlo con *EcoRI* y *Scal*. Por la baja eficiencia de corte de la enzima *Scal*, esta digestión produjo una multitud de bandas de las cuales se aisló la que correspondía al tamaño de *gpdA* (2170 pb). Este fragmento se clonó directamente en el vector pBCSK, en los sitios *EcoRI* y *SmaI* (romo), dando lugar al vector pGPD1 (Figura 6.2.2). Se confirmó la identidad y orientación del fragmento clonado en pGPD1 por secuenciación y digestión.

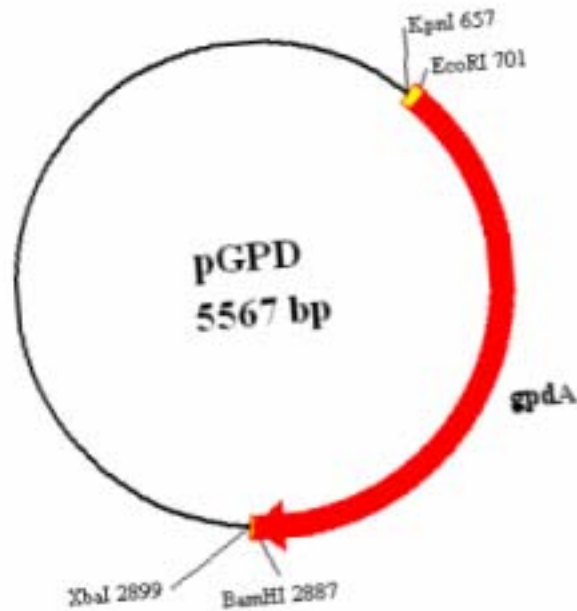


Figura 6.2.2. El vector pGPD en el cual se clonó el promotor *gpdA* de *Aspergillus nidulans*.

6.2.3 El terminador *trpC* El terminador *trpC* ha sido comúnmente utilizado en la construcción de vectores de expresión para *Aspergillus nidulans* (van Gorcom *et al.*, 1986; Punt *et al.*, 1987). Contiene una señal de poliadenilación que indica el sitio donde el transcrito recibe la cola de adenosinas (Mullaney *et al.*, 1985). El fragmento *trpC* utilizado en este proyecto fue aislado del vector PAN7-1 (Materiales y Métodos). Después de una doble digestión se aisló un fragmento de 720 pb que correspondía a *trpC* con *Bam*HI en su extremo 5' y *Xba*I en el extremo 3'. Posteriormente se clonó este fragmento en el vector pBCSK, para dar lugar al vector pTRP (figura 6.2.3).

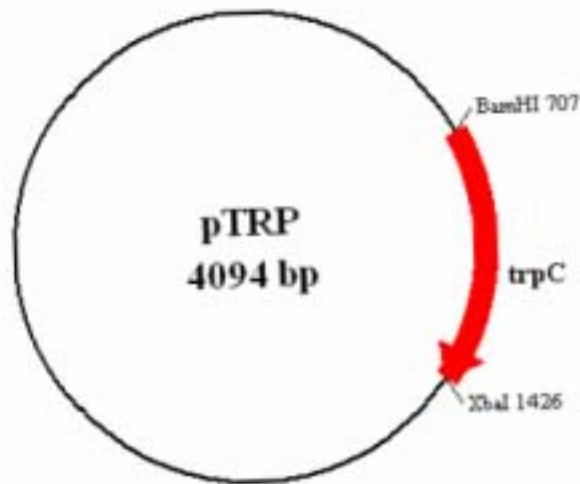


Figura 6.2.3. El vector pTRP en la cual se encuentra aislado el terminador *trpC*.

6.3 Construcción de los vectores de expresión

6.3.1 Construcción pAGCT

Los primeros vectores de expresión que se construyeron en este proyecto fueron los de pAGCT5 y pAGCT6 para la expresión de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* en *Aspergillus nidulans*. Se diseñó una estrategia de clonación para juntar todos los elementos requeridos para un sistema de expresión heteróloga. Esta estrategia se muestra en la figura 6.3.1. Se inició con el vector pGPD en el cual el promotor *gpd* se encuentra clonado en el sitio *EcoRI*. A continuación, se le unió el gen de la cloroperoxidasa, clonándolo en el sitio *BamHI* al lado del promotor y dando lugar al vector pGC. La orientación de los dos fragmentos se confirmó por digestión y secuenciación. Luego se completó el cassette de expresión digiriendo el vector con *XbaI* y parcialmente con *BamHI*, para insertar el terminador *trpC* y dar lugar al vector pGCT. Finalmente, para completar la construcción se insertó el marcador de selección

argB en el sitio *KpnI* formando el vector pAGCT (figura 6.3.1). Este vector contiene los 4 elementos necesarios para la transformación estable y expresión en *Aspergillus nidulans* (6.3.2). Es importante recordar que carece de origen de replicación de hongo ya que está diseñado para integrarse en el cromosoma del hongo por recombinación homóloga.

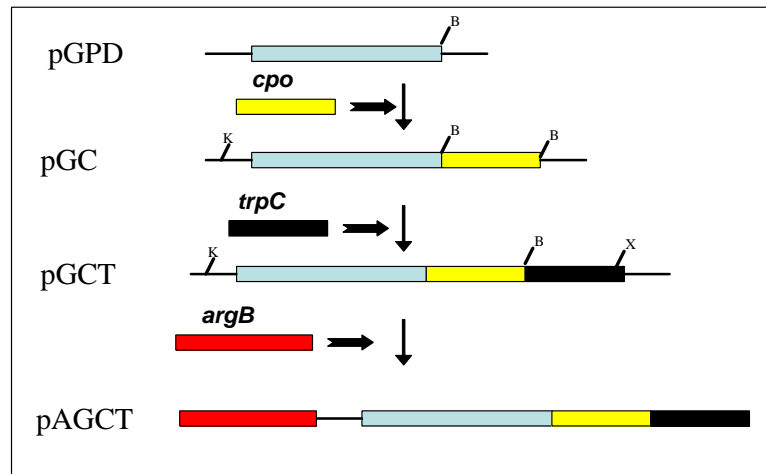


Figura 6.3.1. Estrategia de clonación utilizada para la construcción del vector pAGCT (K = *KpnI*, B = *BamHI*, X = *XbaI*).

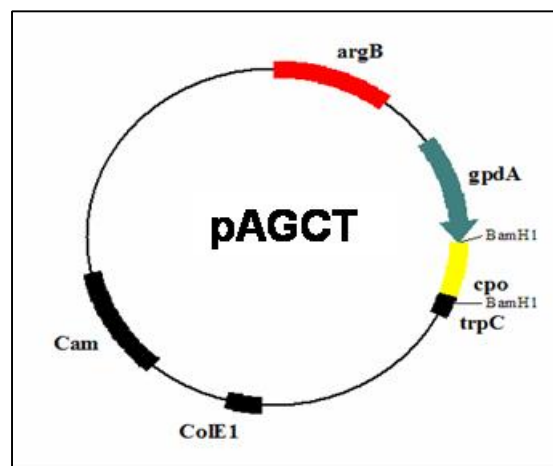


Figura 6.3.2. El vector de expresión pAGCT contiene los 4 elementos necesarios para la transformación de *Aspergillus nidulans*. El origen de replicación (ColE1) y el gen de resistencia a cloranfenicol son para su manipulación en sistemas bacterianos.

Analizando plásmido purificado de a partir clonas de *E. coli* DH5 α transformada con esta construcción, se encontraron 2 clonas que mostraban distintos

patrones de digestión con enzimas de restricción (figura 6.3.3). Estas clonas, pAGCT5 y pAGCT6, son distintas porque difieren en la orientación del marcador de selección *argB*, aunque no se espera que esta diferencia de orientación influya en la expresión heteróloga del gen *cpo* clonado en el cassette de expresión. En otros estudios se ha encontrado que la orientación de este marcador de selección respecto a un cassette de expresión heteróloga no influye significativamente el nivel de producto heterólogo que se obtiene en *A. nidulans* (van Gorcom *et al.*, 1986)

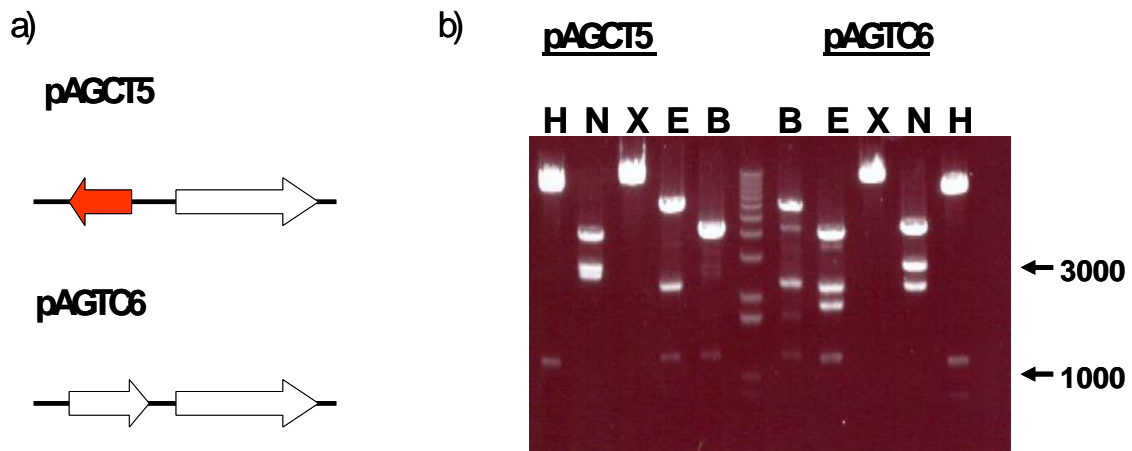


Figura 6.3.3. a) Los vectores pAGCT5 y pAGCT6 difieren solo en la orientación del marcador de selección (*argB*) respecto al cassette de expresión (*gpd-cpo-trp*). b) Un gel de agarosa 1% en la cual se muestran digestiones de los dos vectores con distintas enzimas de restricción (H = *HindIII*, N = *NcoI*, X = *XbaI*, E = *EcoRI*, B = *BamHI*). Se utiliza 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen como marcador de peso molecular.

Hay otro aspecto importante en el diseño del vector pAGCT y es que fue planeado de tal forma que puede ser utilizado de una forma relativamente sencilla para expresar cualquier otro gen en *Aspergillus nidulans* (u otro sistema fúngico compatible con sus elementos de expresión). Si se observa la figura 6.3.2, se ve que el fragmento clonado en el cassette de expresión (en este caso *cpo*) puede ser eliminado digiriéndolo con *BamHI*. Lo ideal sería

poder reemplazar este fragmento con cualquier otro gen de interés en un solo paso de digestión y clonación, pero esto es impedido por la presencia de dos sitios internos de *Bam*HI en el marcador de selección *argB*. Para poder aprovechar la presencia de este sitio en el cassette de expresión, es necesario regresar un paso en la clonación y primero construir el cassette de expresión con el gen de interés. Esto se hace en el vector pGT que contiene el promotor *gpd* y el terminador *trpC* y un sitio único de *Bam*HI entre ellos (figura 6.3.4). Después se añade el marcador de selección, en este caso *argB*, clonándolo en un sitio único de *Kpn*I que se encuentra hacia arriba del cassette de expresión.

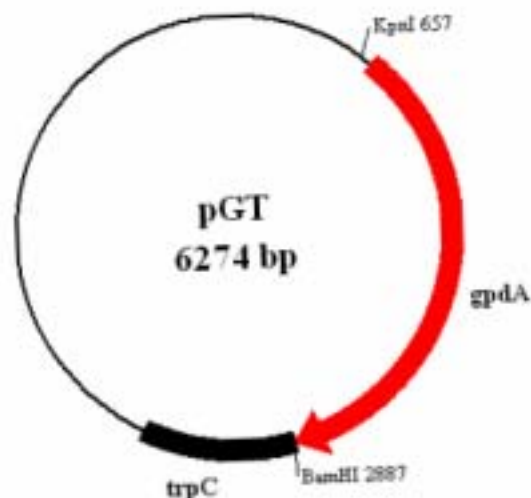


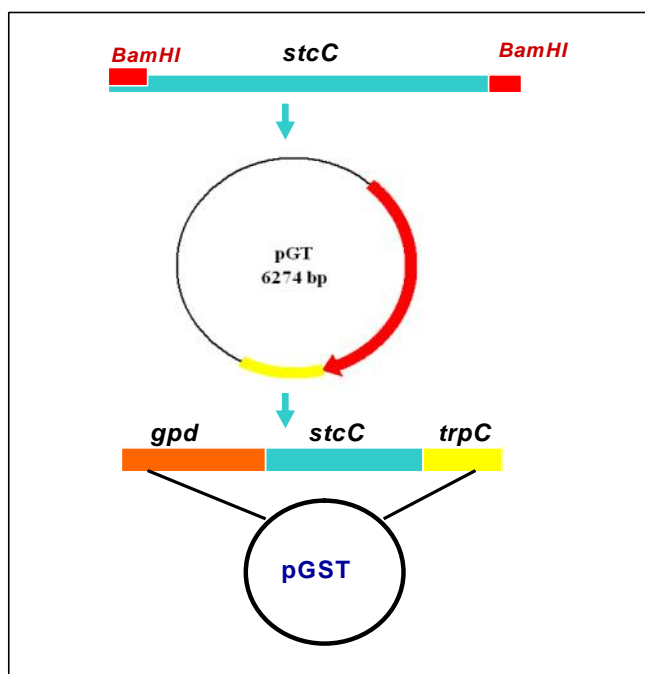
Figura 6.3.4. El vector pGT diseñado de tal forma que se puede completar un cassette de expresión clonando el gen de interés en el sitio único de *Bam*HI que se encuentra entre el promotor (*gpd*) y el terminador (*trpC*).

6.3.2 Construcción pAGST

Este vector se diseñó para la expresión del gen *stcC* de *Aspergillus nidulans*. Se contaba con una muestra de este organismo por su papel en este proyecto y se purificó ADN genómico del mismo para buscar la presencia de este gen. La estrategia con la cual se aisló el gen *stcC* y se clonó en el cassette de expresión se muestra en la figura 6.3.5. Con dos oligonucleótidos con

secuencias homólogas a los extremos del gen *stcC* (vea Materiales y Métodos), se logró amplificar este fragmento (no tiene intrones) de 940 pb, por medio de PCR, añadiendo un sitio *Bam*HI a cada extremo. Este fragmento se clonó en el vector pGT en el sitio único para *Bam*HI, para dar lugar al vector pGST (figura 6.3.5). Posteriormente se añadió el marcador de selección *argB*, para completar la construcción de pAGST (figura 6.3.6).

a)



b)

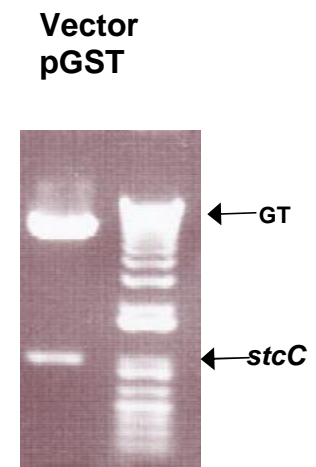


Figura 6.3.5. a) La estrategia de clonación para obtener el vector pGST. El fragmento *stcC* se clona en el sitio *Bam*HI del vector pGT para obtener pGST. b) Un gel de agarosa 1% en la cual se muestra una digestión de pGST con *Bam*HI para liberar el gen *stcC*. Se utiliza 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen como marcador de peso molecular.

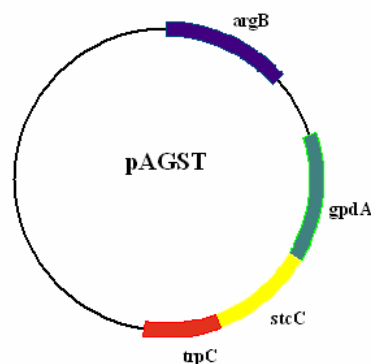


Figura 6.3.6. El vector pAGST completo con todos los componentes necesarios para transformar cepas de *Aspergillus nidulans*.

6.3.3 Construcción pAGMY19T

Este vector se diseñó para la expresión de un gen aislado de *Phytophthora infestans*, que en este proyecto se nombró *my19*. Se consiguió la clona MY-19-G-08 (gi 23394445) la cual lleva un gen cuyo producto enzimático es uno de los que comparte identidad con la cloroperoxidasa en regiones importantes para la actividad enzimática. La construcción del vector de expresión pAGMY19T se complicó por la presencia de dos sitios internos para *Bam*HI en el fragmento *my19*. Para poder aprovechar la misma estrategia utilizada para la construcción de pAGST fue necesario eliminar estos dos sitios del gen *my19*. Se consideró que la mejor forma de hacer esto sería mediante PCR y mutagénesis sitio-dirigida. Se diseñaron dos pares de oligos (vea Materiales y Métodos) con secuencias homólogas a la región alrededor del sitio *Bam*HI y que variaban en solo una posición dentro del sitio *Bam*HI. La intención era sustituir una base nucleotídica por otra y así eliminar el sitio *Bam*HI. Se analizaron las 6 bases dentro del sitio *Bam*HI (GGATCC) para ver cual era posible sustituir sin causar cambios estructurales en la enzima codificada por *my19*. En el caso del primer sitio *Bam*HI fue posible elegir una sustitución nucleotídica que no afecta la secuencia de aminoácidos codificados por los codones. En el caso del segundo sitio *Bam*HI, al alterar la secuencia nucleotídica (GGATCC → GCATCC) cambio un aminoácido codificado en esta secuencia. Arg²²³ (AGG) fue reemplazado con Ser²²³ (AGC).

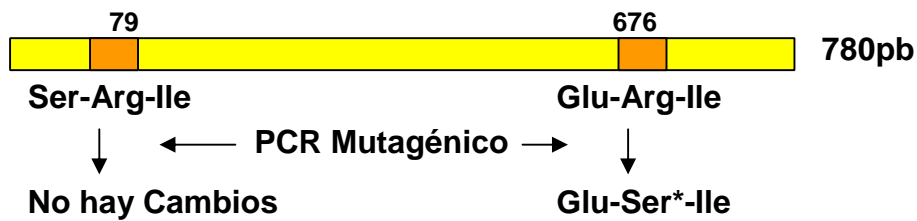


Figura 6.3.7. Se muestra el gen *my19* con dos sitios internos de *Bam*HI y los aminoácidos codificados alrededor de estos sitios. Se muestra el impacto de un PCR mutagénico, para remover *Bam*HI, sobre la secuencia enzimática codificada por este gen. Los números representan la secuencia nucleotídica.

No se esperaba que este cambio alterara significativamente la conformación de MY19 recombinante expresada por este vector. No se encuentra dentro de una región que afecte el sitio activo y evolutivamente la sustitución de arginina por serina se encuentra con más frecuencia de lo normal ya que parece ser un cambio estable que no impacta radicalmente a las estructuras protéicas (Henikoff y Henikoff, 1992). A la vez que se realizó la sustitución, se utilizaron dos oligonucleótidos con regiones homólogas a los extremos para añadir el sitio *Bam*HI a los extremos del gen *my19*. En este PCR se amplificaron primero 3 fragmentos con los sitios *Bam*HI en los lugares deseados y después se juntaron estos tres fragmentos en un PCR para amplificar el fragmento *my19* completo (figura 6.3.8). Posteriormente fue posible clonarlo en el sitio *Bam*HI del vector pGT con la estrategia descrita para la construcción de pAGST (figura 6.3.5) y dar lugar al vector pGMY19T. Por último, se insertó el marcador de selección *argB* para dar lugar al vector pAGMY19T (figura 6.3.9).

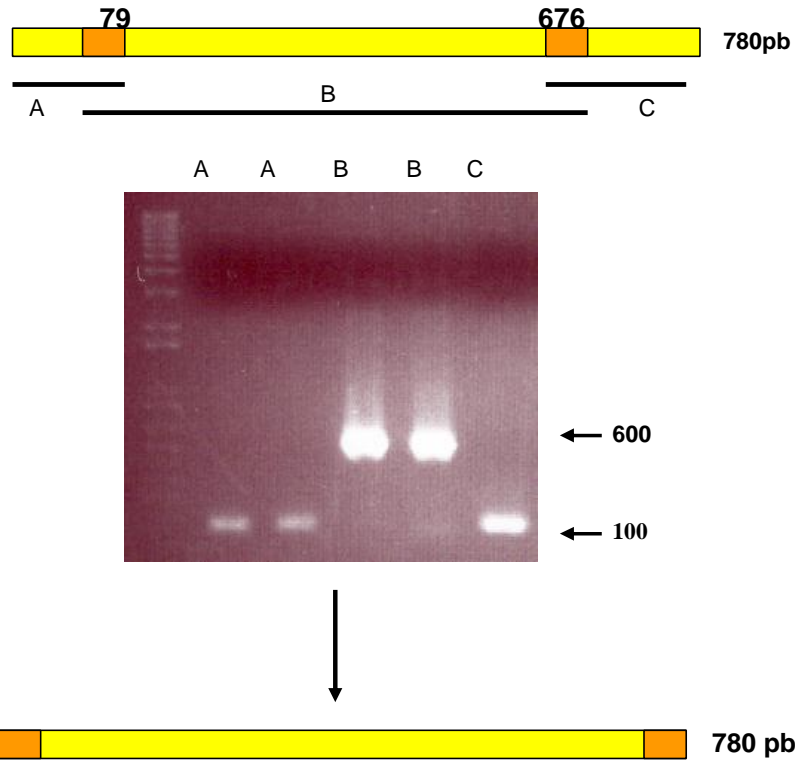


Figura 6.3.8. Esta figura muestra el proceso por el cual se modificó el gen *my19*. Este gen se amplificó en tres fragmentos para eliminar dos sitios internos de *Bam*HI y añadir estos mismos sitios a los extremos. Después de obtener los tres fragmentos (A, B, y C), se utilizaron en un solo PCR para obtener el segmento completo (780 pb) con *Bam*HI en los extremos. En la foto los fragmentos A y B se muestran por duplicado. Los cuadros color naranja muestran la localización de los sitios *Bam*HI. Se utiliza 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen como marcador de peso molecular.

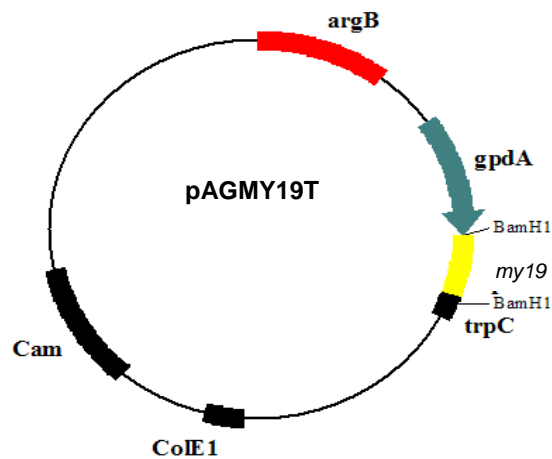


Figura 6.3.9. El vector pAGMY19T. Está diseñada para la expresión de *my19* en *Aspergillus nidulans*.

6.3.4 Construcción pAGMY25T

Este vector se diseñó para la expresión de otro gen aislado de *Phytophthora infestans*, el cual se encuentra en la clona MY-25-D-12 (gi 23394455). Este gen, *my25*, no tiene sitios internos de *Bam*HI o *Kpn*I, así que fue posible usar la estrategia de clonación previamente descrita (figura 6.3.4) sin complicaciones. Este gen (760 pb) se amplificó por medio de PCR añadiendo el sitio *Bam*HI a sus extremos. Posteriormente se clonó en el vector pGT para dar lugar al vector pGMY25T. Para completar el vector de expresión pAGMY25T (figura 6.3.10), se colocó el marcador de selección *argB* en el sitio *Kpn*I.

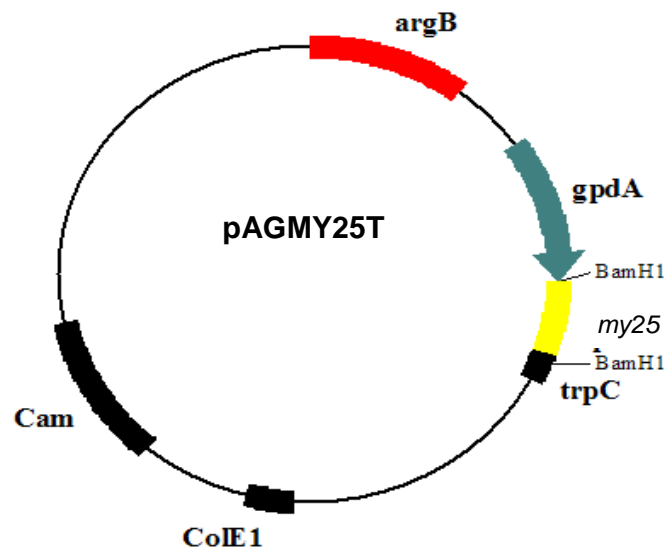


Figura 6.3.10. El vector pAGMY25T.

6.4 *Aspergillus nidulans* (PW-1)

Existe una gran cantidad de literatura sobre el uso de *Aspergillus* en la investigación genética, donde ha sido una herramienta importante en la producción de muchas enzimas de forma heteróloga. A diferencia de las bacterias, este organismo eucarionte tiene la maquinaria para realizar

complejas modificaciones post-traduccionales de las proteínas, dándoles la conformación precisa que requieren para que tengan actividad enzimática o cumplan su función. De todos los experimentos genéticos que se han hecho con este organismo, el más relevante para este proyecto fue el uso de *Aspergillus niger* para la expresión de la cloroperoxidasa (Conesa *et al.*, 2001). Hasta la fecha éste ha sido el único reporte sobre el desarrollo de un sistema heterólogo para la producción de esta enzima en su forma activa. A pesar de la enorme expectativa que despertó esta publicación, la falta de reportes posteriores usando este sistema de expresión hace sospechar que no fue estable.

En este proyecto se eligió trabajar con *Aspergillus nidulans* ya que es muy cercano evolutivamente con *Aspergillus niger*, lo cual nos hace pensar que también será capaz de sintetizar la cloroperoxidasa en su forma activa a pesar de que se usará una estrategia genética diferente. En este proyecto se utilizó la cepa PW-1 de *Aspergillus nidulans*, auxótrofa para arginina, biotina y metionina y que puede ser parcialmente complementada con el marcador de selección (*argB*). Antes de iniciar el trabajo principal del proyecto se caracterizó el crecimiento de la cepa PW-1 en distintos medios de cultivo, en presencia y ausencia de los suplementos requeridos. Se encontró que el crecimiento en ausencia de cualquier de los 3 nutrientes es muy lento y produce poca biomasa. En estos cultivos sólo se observa una pequeña extensión de micelio sobre la superficie del palillo inoculador y no llegan a esporular, ni siquiera después de dos semanas a 37°C, 200 rpm. En cambio, los cultivos de *Aspergillus nidulans* (PW-1) que cuentan con los tres suplementos esporulan después de 3 días de cultivo.

6.5 Transformación de *Aspergillus nidulans* (PW-1)

6.5.1 Experimentos de transformación

Una vez que se había completado la construcción de los vectores de expresión para la cloroperoxidasa (pAGCT5 y pAGCT6) se iniciaron los experimentos de transformación de los protoplastos de *Aspergillus nidulans* (PW-1). La transformación de los protoplastos es un experimento con una duración de aproximadamente semana y media para determinar su grado de éxito con base en el número de protoplastos regenerados que se observen. El protocolo de transformación se describe en detalle en la sección de Materiales y Métodos, pero hay que resaltar que para poder obtener la mejor información comparativa de los resultados es necesario tomar la precaución de igualar tanto las cantidades de protoplastos en todos los grupos, como la cantidad de ADN que se introduce en los grupos de interés y en el control positivo, lo cual se logra ajustando la concentración del ADN para igualar el número de moléculas de ADN en estos grupos. Por lo tanto, se tomó en cuenta que los vectores de pAGCT5 y pAGCT6 tienen un tamaño de 9318 pb y los del control positivo son más chicos. El control positivo es un vector que contiene el marcador de selección, el gen de *argB*, y en todos los experimentos de transformación se utilizaron uno de dos, o el pDC1 de un tamaño de 4455 pb o el pArg (5240 pb) donde se había subclonado *argB* (Sección 6.2).

En total se realizaron 7 transformaciones de protoplastos aislados pero hasta el quinto intento se vieron resultados que ameritaran análisis posteriores (Tabla 6.5.1).

Tabla 6.5.1 Número de protoplastos regenerados en cada evento de transformación

Grupo	1	2	3	4	5	6	7
pAGCT5	0	0	103	0	17	2	1
pAGCT6	0	0	89	0	18	8	0
Ctrl. +	0	0	94	0	26	5	1
Ctrl. -	0	0	88	0	5	1	0

Aparentemente, la razón por la cual no se obtuvieron transformantes en la primera, segunda y cuarta transformaciones fue la enzima lítica que se utiliza para digerir la pared celular de la espora germinada. Este paso requiere de una serie de lavados para eliminar completamente los protoplastos del resto del material biológico y la velocidad y eficiencia de estos lavados son esenciales para la viabilidad de los protoplastos. El problema que se observa en el caso de la tercera transformación probablemente fue causado por una contaminación del medio de cultivo (con arginina) en la cual se recuperan los protoplastos transformados. En este caso se esperaría un crecimiento de todos los protoplastos que hubiesen sobrevivido al proceso de transformación, lo cual es un poco agresivo ya que sufren un choque térmico a 42°C y luego son incubados en una solución con sal y PEG 4000 (Materiales y Métodos).

6.5.2 Optimización de condiciones para el análisis de posibles transformantes de *Aspergillus nidulans*

Los primeros análisis de los posibles transformantes de *Aspergillus nidulans* se realizaron con los protoplastos regenerados del quinto intento de transformación (Tabla 6.5.1). Se seleccionaron doce de los brotes de cada caja de pAGCT5 y pAGCT6 y se aislaron en tubos de 5 mL con tapa de rosca y

medio mínimo sólido selectivo (sin arginina). Además, para poder comparar los ADN genómicos, se seleccionaron cuatro de los brotes del control positivo, transformados con el vector pDC1, y cuatro de los que se observaron creciendo del control negativo (sin transformación). Los brotes aislados del control negativo se pusieron en tubos que contenían medio suplementado con arginina para facilitar su crecimiento y esporulación. Luego todos los tubos, 32 en total, se dejaron a 37°C con las tapas un poco sueltas hasta que se observó que los cultivos esporulaban (aproximadamente 3 días). Estas esporas se utilizaron para inocular 4 mL de medio mínimo líquido, y se dejaron en agitación a 37°C y 250 rpm, durante 5 días, observando que la biomasa se acumulaba cerca de la superficie y empezaba a esporular. Se recolectó la biomasa de cada tubo con la intención de extraer el ADN genómico y demostrar la integración del gen de la cloroperoxidasa en el genoma mediante una amplificación del mismo por PCR. Inicialmente, la falta de resultados demostró la necesidad de primero optimizar las condiciones de extracción de ADN genómico y después la amplificación.

a) ADN genómico— Las primeras muestras de ADN genómico se encontraban en una condición degradada o completamente ausentes (Figura 6.5.1).

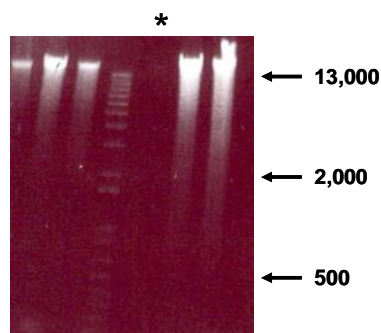


Figura 6.5.1 Unos ejemplos de las muestras de ADN genómico extraídas con un homogenizador de vidrio. (*) Indica donde se encuentra completamente ausente la muestra de ADN. Se utiliza 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen como marcador de peso molecular.

Se concluyó que esto se debía al primer protocolo de extracción de ADN genómico, que involucraba moler las muestras de *Aspergillus* en un homogenizador de vidrio. Esto es un proceso tardado lo cual favorece la actividad de las nucleasas que se liberan con el resto del contenido celular. A pesar de que las muestras molidas se resuspendían en un buffer con proteasas, cuando había muchas muestras que examinar, se observaba que el ADN de las primeras muestras molidas se encontraba completamente degradado o ausente al final del largo proceso de extracción. Este problema se solucionó cuando se le varió el proceso de extracción, moliendo las muestras de biomasa con nitrógeno líquido en un mortero, en lugar de un homogenizador de vidrio. Aparentemente las temperaturas del nitrógeno líquido son suficientemente frías para detener la actividad de las nucleasas y el ADN genómico se puede extraer de una forma íntegra (figura 6.5.2). Además, el molido es más eficiente y se recorta el tiempo que se requiere para tratar cada muestra de tal forma que se emparejan los tiempos de sus incubaciones posteriores.

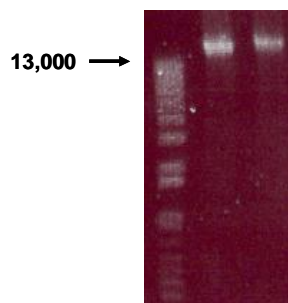


Figura 6.5.2 Dos muestras de ADN genómico extraídas con nitrógeno líquido. Se utiliza 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen como marcador de peso molecular.

b) Amplificación por PCR

1. Temperatura de alineamiento—Con base en el valor de T_m para los oligonucleótidos que se eligieron, los primeros intentos por amplificar el gen de la cloroperoxidasa se realizaron con una temperatura de alineamiento de 55°C.

Sin embargo, pronto se pudo observar que ésta no era la temperatura adecuada. Después de varios intentos sin obtener resultados, ni del control positivo (el vector pAGCT6), la temperatura de alineamiento se bajó a 48°C con la esperanza de obtener una banda del tamaño correspondiente a la cloroperoxidasa en el ADN de algún transformante. En lugar de eso, lo que se observó en varias muestras fue un barrido semejante a un ADN genómico degradado pero de menor tamaño (figura 6.5.3).

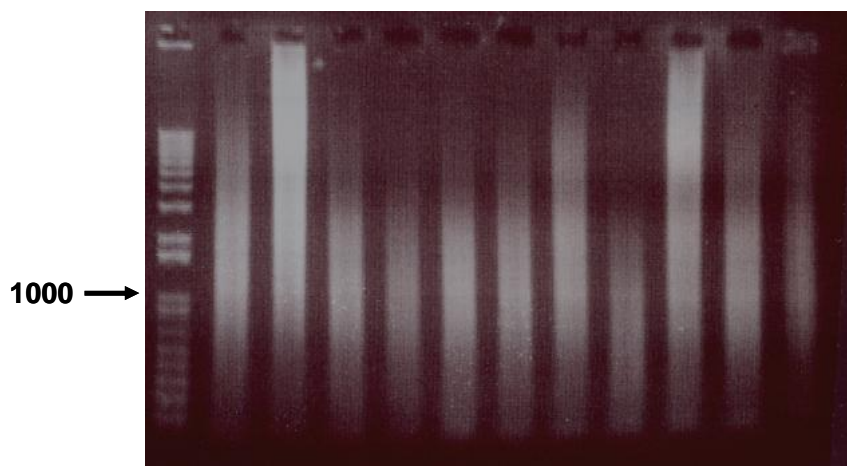


Figura 6.5.3 Muestras de ADN genómico amplificadas por PCR con los oligonucleótidos CPO5' y CPO3' a una temperatura de alineamiento de 48°C. No se observa una banda del tamaño correspondiente a la cloroperoxidasa (1140 pb). Se utiliza 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen como marcador de peso molecular.

Aparentemente, se observaba el resultado de una amplificación inespecífica tan amplia que no se lograba distinguir una banda en particular. Esto llevó a la conclusión de que era necesario definir una temperatura de alineamiento más alta que se pudiera utilizar para la amplificación de nuestro producto. Para lograr esto se llevó a cabo una prueba en un termociclador que permite utilizar distintas temperaturas de alineamiento en un solo PCR. Se eligieron temperaturas escaladas de 48° a 58 con el vector pAGCT6 como molde y permitiendo 30 segundos para el reconocimiento de sus secuencias

complementarias. La prueba se realizó para dos juegos diferentes de oligonucleótidos que varían en el extremo 5' CPO5' ($T_m = 63^\circ\text{C}$) o CPOINT1 ($T_m = 66^\circ\text{C}$), y con CPO3' ($T_m = 69^\circ\text{C}$) en el extremo 3'. Estos oligonucleótidos anclan en lugares ajenos al genoma de *Aspergillus nidulans* pero dentro de la construcción del vector (pAGCT5 o pAGCT6) utilizado para transformar este organismo. Con base en los resultados obtenidos, se concluyó que la temperatura mas alta que se podía utilizar para el alineamiento de los oligos CPO5' y CPO3' era de 51.6°C , y del par CPOINT1(5') y CPO3' era de 52°C . Para aplicar estos resultados a las pruebas de ADN genómico, se eligió una temperatura un poco menor, de 50°C , porque aunque se consideraba que la temperatura mas alta era la mejor, se tenía que tomar en cuenta que esta funcionaba bajo condiciones ideales. Con ADN genómico como templado era más probable una amplificación en falso debido a la enorme cantidad de ADN adicional. Al efectuar esta adecuaciones se observó que la mayor parte del barrido desaparecía, indicando especificidad de la amplificación.

2. Inconsistencia en la amplificación

Otro problema que se observó en las amplificaciones fue una inconsistencia en la amplificación del producto en distintos aislados de transformantes. A continuación se explica la manera en la cual surgió este problema y los pasos que se tomaron para resolverlo. Se realizó una amplificación con casi todos los ADN genómicos de los protoplastos recuperados de la quinta y sexta transformación y se observó que 5 de ellos mostraban una amplificación de tamaño esperado para la cloroperoxidasa (figura 6.5.4).

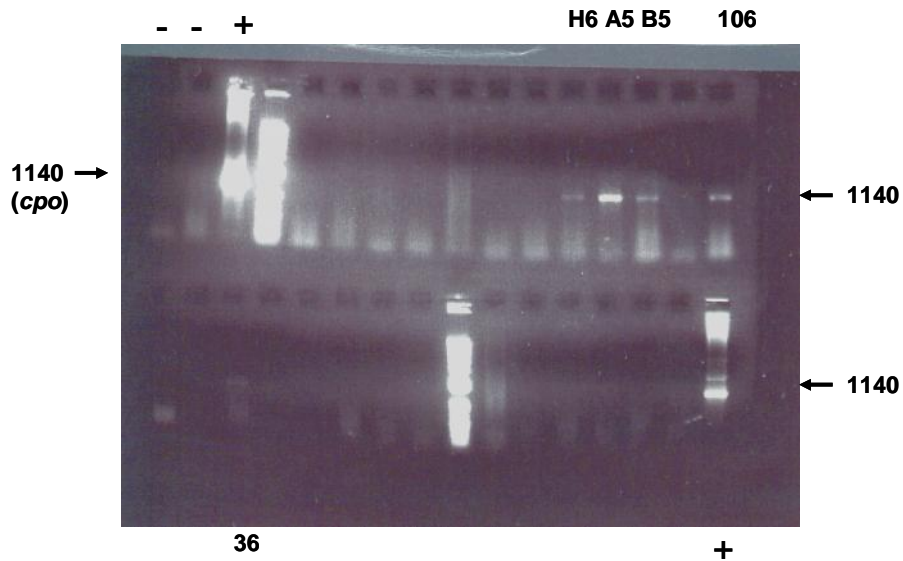


Figura 6.5.4. Amplificación de la cloroperoxidasa en varios ADN genómicos aislados de protoplastos recuperados en la quinta y sexta transformación. En la fila superior se observa la amplificación deseada en el control positivo (+) junto al ladder pero no en los dos (-) controles negativos (cepa PW-1 y tubo sin templado). Se observa la amplificación de la cloroperoxidasa en los transformantes nombrados H6, A5, B5, 106. En la fila inferior se observa la amplificación tenue en un transformante 36 y otro control positivo. Se utiliza 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen como marcador de peso molecular.

Se prepararon nuevos cultivos de estas cinco transformantes, presuntamente positivas, con la intención de repetir el experimento de amplificación. Desgraciadamente, en la repetición con las mismas condiciones de PCR se observó que sólo tres de las cinco muestras mostraban una amplificación del tamaño esperado (figura 6.5.5).

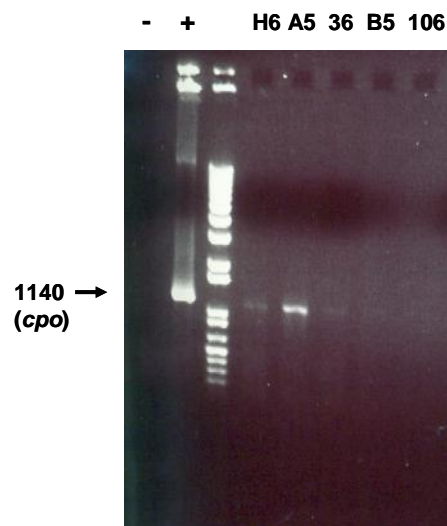


Figura 6.5.5 Una repetición del PCR de los 5 transformantes previamente identificados. Se observa de izquierda a derecha: Control negativo (cepa PW-1), Control positivo (vector pAGCT6), marcador ADN (ladder), H6, A5, 36, B5, 106. Se utiliza 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen como marcador de peso molecular.

Sin saber exactamente cómo interpretar estos resultados, se volvió a repetir todo el proceso desde preparar nuevos cultivos de estos transformantes, extraer el ADN genómico, y repetir el PCR con los oligonucleótidos que amplifican la cloroperoxidasa. En esta tercera ocasión, sólo se obtuvo amplificación de la cloroperoxidasa en una de las muestras (A5).

Era aparente que aún habiendo solucionado todos los otros problemas en la amplificación, ahora teníamos inconsistencia en la amplificación de la cloroperoxidasa en distintas muestras. Inicialmente no había una explicación o interpretación clara de estos resultados, y por esa razón se recurrió al Dr. Jesús Aguirre (IFC, UNAM), aprovechando de su experiencia y años de trabajo con *Aspergillus*, para ver si alguna vez había encontrado un problema similar. Interesantemente, él tuvo una explicación muy lógica de los resultados inconsistentes que se habían obtenido. El primer problema era una falla técnica en la metodología por la cual se estaba analizando un ADN genómico heterogéneo, aunque para entender lo que estaba sucediendo es importante primero conocer un poco acerca del ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. Este organismo tiene 3 distintos ciclos de reproducción: uno sexual, uno asexual, y uno parasexual (figura 6.5.6). El primer ciclo produce esporas haploides de 8 cromosomas, sea por una vía de meiosis (sexual) o mitosis (asexual) y de las cuales inicia nuevamente el crecimiento del micelio (Adams *et al.*, 1998). La vía parasexual parece tener la función de generar mas variación genética por una vía de mitosis, pero ocurre solo en el 0.1% de las células de *Aspergillus nidulans* que se vuelven diploides por una fusión espontánea de dos núcleos en el micelio e igual pueden resultar en la producción de esporas diploides (Casselton y Zolan. 2002).

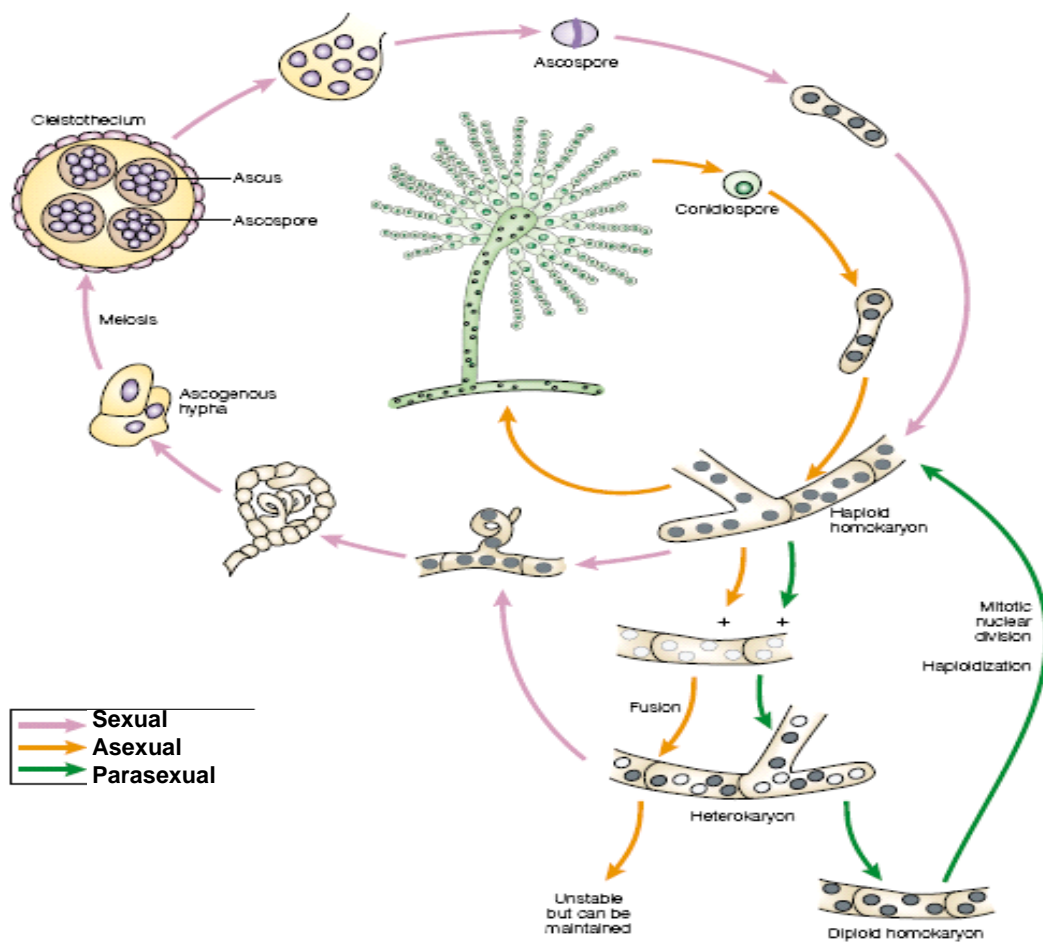


Figura 6.5.6 El ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*.

Por lo tanto, los protoplastos aislados transformados en este proyecto tenían un 99.9% de probabilidad de provenir de esporas haploides, lo que no explica la heterogenidad genética que se propone. Más bien, esto ocurría por el hecho de que se trabaja con protoplastos aislados de esporas germinadas. Después de 12 horas de cultivo en un medio líquido cuando ya se observaba un pequeño brote de la espora, el protoplasto proveniente de esa espora germinada es una célula que contiene dos o más núcleos, y no hay forma de

saber cuál o cuántos de éstos hayan sido transformados con el vector que se introdujo. Para obtener cultivos que tengan un ADN homogéneo después de una transformación es necesario llevar los protoplastos regenerados a la esporulación y luego aislar estas esporas obteniendo nuevos cultivos con el marcador de selección que provengan de una sola espora haploide.

En este proyecto los mejores candidatos de la quinta y sexta transformación son los que demuestran la presencia de la cloroperoxidasa amplificada por PCR (figura 6.5.4). Se seleccionaron 4 de éstos nombrados en su estado de ADN heterogéneo como A5, B5, H6, 36 y el único protoplasto aislado de la séptima transformación (Z6) para los análisis posteriores. Este grupo representaba no sólo los resultados de tres transformaciones independientes sino también de los dos vectores utilizados (pAGCT5=5; pAGCT6=6). Nuestra intención era aislar 10 esporas de cada uno de los protoplastos, sin embargo, sólo una espora de 36 creció bien en medio sin arginina, mientras que las esporas aisladas de Z6 crecían tan profusamente que se seleccionaron 11 aislantes para análisis. Interesantemente, esta observación muestra una correlación con el tiempo desde la transformación, y a pesar de que el vector de expresión está diseñado para una integración geonómica de l gene *cpo* nos surgió la duda de si la inserción era inestable. En vista de los resultados que se discuten en el próximo capítulo esta duda vuelve a surgir, sin embargo, en ese momento nos preparábamos para hacer el análisis de 42 cultivos provenientes de esporas aisladas en un intento de confirmar la presencia de la cloroperoxidasa.

6.6 Análisis de las 42 transformantes de *Aspergillus nidulans*

Se realizó un pequeño ensayo para confirmar que los 42 cultivos provenientes de esporas aisladas provenían de la cepa PW-1 explotando su incapacidad para crecer en un medio en ausencia de biotina o metionina. Después de observar que crecían muy lentos, muy mal, y no esporulaban cuando faltaba alguno de estos suplementos, se prepararon cultivos para análisis posteriores. Desafortunadamente, todos los resultados que se obtuvieron de estos análisis nos llevaron a la conclusión de que los 42 aislados no estaban transformados con el gen de la cloroperoxidasa, al menos no de la manera que se había diseñado en el cassette de expresión pAGCT5 y pAGCT6. A continuación se hace un resumen breve de los experimentos que se realizaron con las 42 transformantes y los resultados que se obtuvieron.

6.6.1 Detección de una actividad oxidante extracelular en varios transformantes de *Aspergillus nidulans*.

En el artículo de Conesa *et al.* (2001) se detectan los transformantes de *Aspergillus niger* que expresan la cloroperoxidasa buscando una actividad extracelular de peroxidasa. Nosotros simulamos este experimento buscando actividad en el sobrenadante de los 42 cultivos con dos sustratos distintos: o-anisidina (igual que Conesa *et al.*, 2001) y guayacol (uno de los sustratos preferidos de las peroxidasas). Inicialmente los resultados parecían prometedores ya que dos de los sobrenadantes de los cultivos mostraron actividad extracelular con ambos sustratos (figura 6.6.1). Sin embargo, al repetir el experimento, esta vez con cultivos de mayor volumen, no se logró reproducir la detección. Quiriendo determinar si algún factor en las condiciones de cultivo era responsable de la producción de la actividad extracelular, se

diseñó un experimento para determinar el efecto de: a) la temperatura de cultivo y b) el tipo de inóculo (presencia del palillo utilizado para la inoculación). Se analizó el sobrenadante de estos dos transformantes cultivados a 30°C y 37°C, con y sin palillo de inoculación pero nuevamente no se logró detectar actividad en el sobrenadante.



Figura 6.6.1. Se detecta una actividad oxidante en el sobrenadante de dos de las muestras nombradas A7 y 36.

En ese momento, se regresó al análisis de todos los cultivos (los 42 transformantes) buscando actividad en el sobrenadante con guayacol. Se logró detectar actividad extracelular, de forma cualitativa, en 5 de los cultivos: A8, B8, H1, H7, y H10. Ninguno de estos 5 eran los primeros dos que originalmente se habían identificado con actividad extracelular, indicando un problema de inconsistencia en los resultados (A7 y 36).

Finalmente, se logró resolver este problema de inconsistencia cuando se determinó que inoculando nuevos cultivos con el sobrenadante de los cultivos que mostraban actividad resultaba, en la mayoría de los casos, en una reproducción de la actividad. Esto permitió la oportunidad de caracterizar la actividad con más detalle. Desafortunadamente, también proporciona la primera evidencia de que la actividad no estaba relacionado con el evento de transformación ya que al analizar el sobrenadante de varias réplicas de un sólo cultivo también se detectó la actividad en la cepa silvestre (PW-1). Sin

embargo, se consideraba la posibilidad de que en los transformantes, la actividad fuera una combinación de algún metabolito nativo junto con la producción de la cloroperoxidasa.

6.6.2 Cuantificación de la actividad extracelular

Una vez que se había logrado la reproducibilidad de actividad extracelular, se analizó de forma cuantitativa en espectrofotómetro para determinar cuánto guayacol se oxidaba en las distintas muestras. En este ensayo surgió una segunda evidencia de que la actividad no era causada por la cloroperoxidasa, ya que no dependía ni de peróxido, ni de cloruro, a pesar de que ambos son requisitos del mecanismo de reacción de esta enzima. En la tabla 6.6.1 se presenta la actividad que se midió en algunas réplicas de las muestras con y sin peróxido añadido.

Tabla 6.6.1. La actividad detectada en la muestras de sobrenadante en nmoles de producto (tetraguayacol)/ min · mL de cultivo.		
Cepa_{#tubo}	Sin H₂O₂	Con H₂O₂
PW-1 (silvestre)₂	4.34 +/- 0.94	3.19 +/- 0.56
36₁	1.07 +/- 0.38	0.85 +/- 0.04
36₃	11.47 +/- 1.88	7.31 +/- 1.88
A7₁	0.48 +/- 0.09	0.17 +/- 0.02
H10₄	6.71 +/- 0.19	4.17 +/- 0.56

6.6.3 Diálisis del sobrenadante

Las réplicas que mostraron mejor actividad en la tabla 6.6.1, se utilizaron para inocular 50 ml de cultivo con la intención de producir una gran cantidad de sobrenadante para concentrar y caracterizar la fracción proteica. Después de unos días de crecimiento, se detectó actividad en el sobrenadante la cual fue estimada con y sin la presencia de peróxido añadido (tabla 6.6.2)

Tabla 6.6.2 Actividad que se midió en cada muestra antes de concentrar la fracción proteica. Se reporta en nmoles de producto (tetraguayacol)/min-ml. de cultivo.		
Cepa	Sin H ₂ O ₂	Con H ₂ O ₂
PW-1	7.99 +/- 0.38	6.63 +/- 1.31
36	6.52 +/- 1.5	7.78 +/- 0.94
H10	3.0 +/- 0.56	2.91 +/- 0.75

A pesar de ya no observarse una diferencia significativa por la presencia de peróxido, la fracción proteica se precipitó con sulfato de amonio al 100% y luego se dializó contra 1 litro de buffer de acetatos 10 mM pH 6.0 durante toda la noche a 4°C. Interesantemente, la prueba de la fracción precipitada reveló que todas las muestras habían perdido la actividad. Después de repetir este experimento varias veces, se descubrió que la actividad se perdía con el simple hecho de dializar las muestras ya que el componente activo se escapaba por los poros en la bolsa de diálisis (Figura 6.6.2). El hecho de que el componente activo pudiera perderse con una diálisis indicaba que la actividad no tenía un origen enzimático. Una búsqueda en la literatura no reveló información sobre oxidasas extracelulares en *Aspergillus nidulans*. Además se ha reportado que

el tamaño típico de enzimas como las peroxidases que oxidan guayacol es de entre 30 y 75 kDa y que entre las más pequeñas se encuentran unas que se han aislado de organismos marinos, con un tamaño de aproximadamente 16 kDa (Roach *et al.*, 1997). En teoría, cualquier de estas enzimas sería retenida por una bolsa de diálisis con un tamaño de 12 Kda.

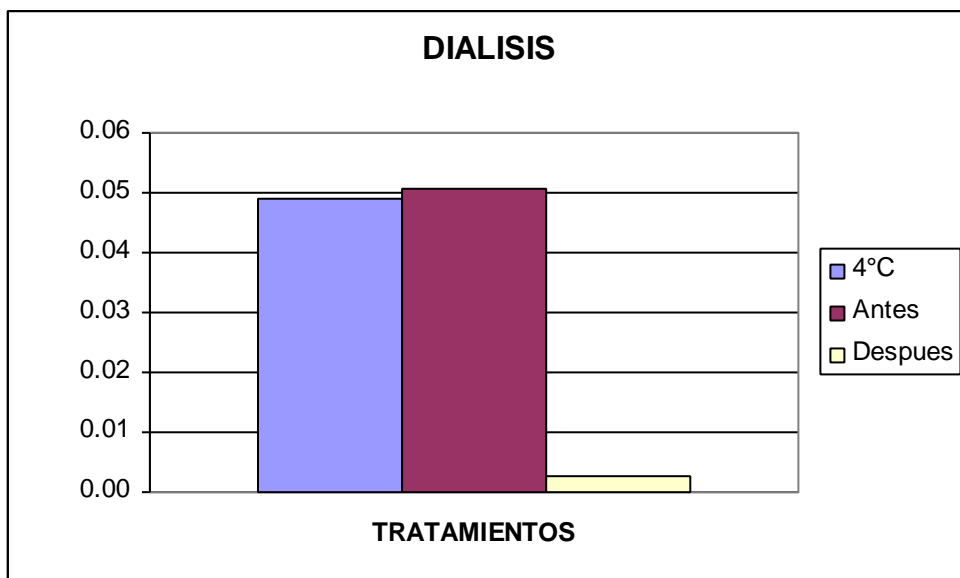


Figura 6.6.2 Se observa que se pierde la actividad en una muestra de sobrenadante después de una diálisis (Amarillo), mientras que una muestra refrigerada a 4°C sin dializar conserva su actividad aun después de 24 horas (Azul). La actividad inicial de la muestra se muestra en color rojo.

6.6.4 Cinética de actividad

Con el fin de caracterizar el comportamiento cinético de la actividad identificada en el sobrenadante de los cultivos de *Aspergillus nidulans* se realizó una cinética de actividad con distintas concentraciones de guayacol. Típicamente, las enzimas que oxidan guayacol tienen una K_M de alrededor de 10-20 mM. En un experimento control usando la cloroperoxidasa nativa de *C. fumago*, se observa que la actividad se satura después de una concentración de 20 mM de guayacol, obteniéndose una K_m de alrededor de 8 mM (figura

6.6.3). En nuestros experimentos con las muestras de sobrenadante utilizamos concentraciones de guayacol de hasta 200 mM sin lograr saturar al componente activo (figura 6.6.4). Estos resultados son una evidencia más de que el componente activo en las transformantes no es de origen enzimático.

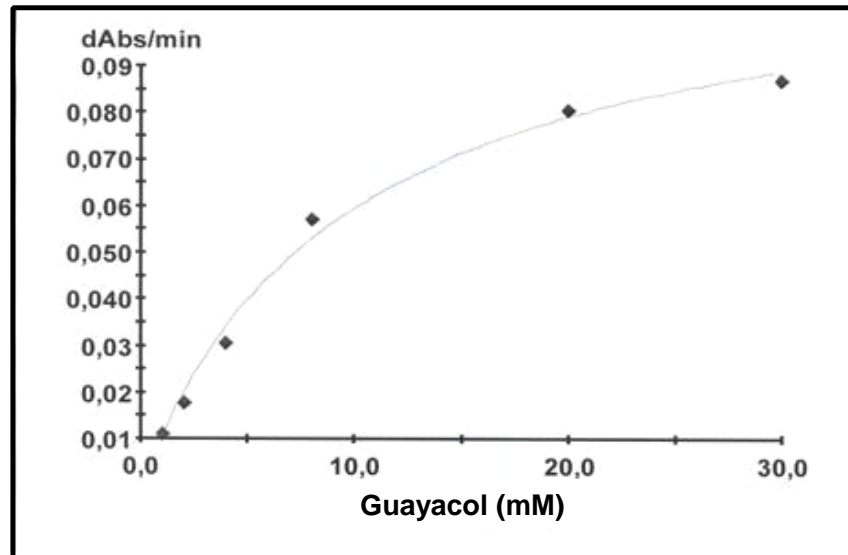


Figura 6.6.3 Cinética de actividad de la cloroperoxidasa. Se observa que esta enzima se satura con la adición de 20 mM de guayacol.

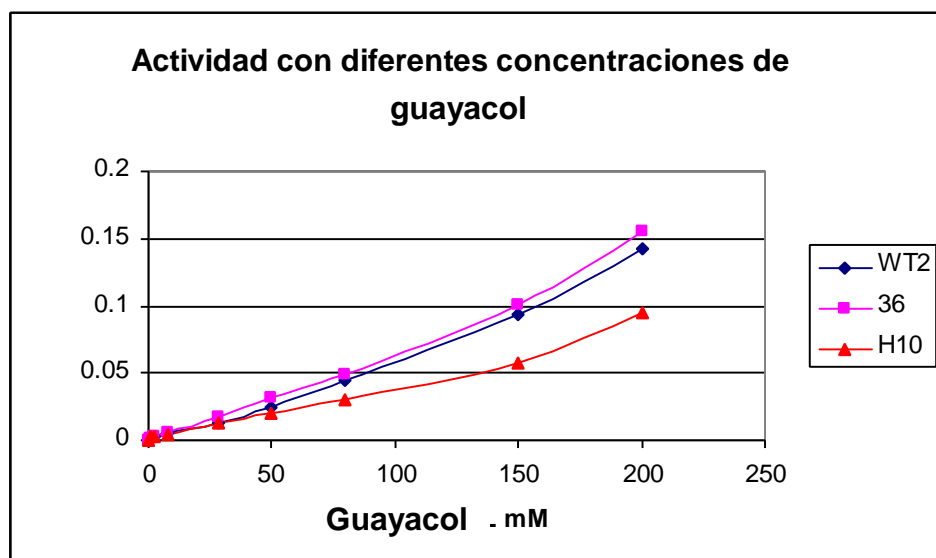


Figura 6.6.4 Cinética de actividad en el sobrenadante de *Aspergillus nidulans* en dos transformantes (36 y H10) y una cepa silvestre PW-1 (WT2). Se observa que el componente activo no se satura aun con una concentración de guayacol 200 mM.

Es aparente, al comparar las figuras 6.6.3 y 6.6.4, que el comportamiento cinético de la actividad identificada en el sobrenadante de los cultivos de *Aspergillus nidulans* es totalmente distinto al de la cloroperoxidasa. De hecho, la actividad identificada en el sobrenadante de los cultivos no parece ser enzimática ya que no se conoce ninguna enzima que no se sature con la adición de 100 mM de guayacol. Otra diferencia notoria al preparar los experimentos para medir la actividad del sobrenadante es que no requiere de peróxido en la mezcla de reacción. La cloroperoxidasa, como cualquier peroxidasa, requiere de H_2O_2 para llevar a cabo sus reacciones enzimáticas. Esta diferencia se demuestra en la figura 6.6.5 donde se observa que la actividad en el sobrenadante varía muy poco con la adición de peróxido, mientras que la cloroperoxidasa no muestra actividad sin la adición de peróxido.

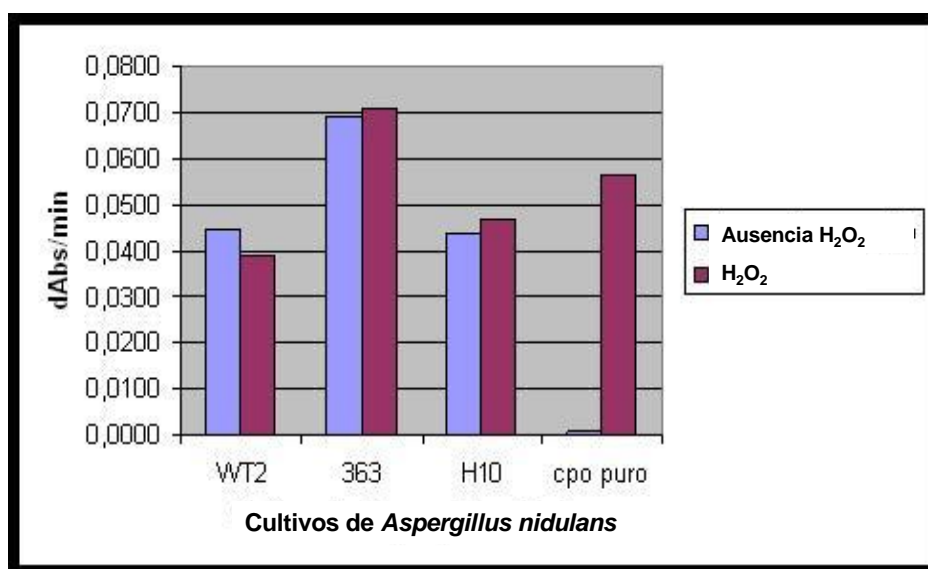


Figura 6.6.5. Los resultados de un experimento en el cual se midió la actividad identificada en el sobrenadante con y sin peróxido y se comparó con la actividad de la cloroperoxidasa pura.

6.6.5 Amplificaciones

La razón por la que hasta el momento no se han mencionado las pruebas de tipo PCR que también se realizaron con las muestras de ADN genómico de los 42 transformantes es que no se lograron obtener resultados positivos. Ésta fue una de las razones por la cual se buscaron otros tipos de experimentos para confirmar la presencia de la cloroperoxidasa; sin embargo el no haber logrado una amplificación de este inserto por PCR es una fuerte evidencia de su ausencia. Dado que el tamaño del genoma de *Aspergillus nidulans* es muy grande (31 millones de pares de bases) y la secuencia de la cloroperoxidasa es relativamente pequeña (poco mas de mil bases), se realizaron unos cálculos para determinar cuantas copias de este gen estarían disponibles para una amplificación en un PCR típico. Los datos relevantes que se utilizaron para hacer este cálculo se muestran en la tabla 6.6.1.

Tamaño del genoma de <i>Aspergillus nidulans</i>	31,000,000 pares de bases
Tamaño del gen de la cloroperoxidasa	1,140 pares de bases
Porcentaje genómico de cada integración de <i>cpo</i>	0.003%
Peso promedio de cada par de nucleotidos	649 daltons
Peso molecular del genoma de <i>Aspergillus</i> .	20,119,000,000 gramos
Numero de moléculas en 1 mol	6×10^{23}
Peso de una sola molécula de genoma	0.33 picogramos
Cantidad de molde utilizado por PCR	~ 10 nanogramos
Estimación del numero de copias de genoma y consecuentemente <i>cpo</i> por PCR	~ 30, 000

Como se observa en la tabla 6.6.3, se llegó a la conclusión de que si hubiera una sola copia de la cloroperoxidasa integrada por genoma, en una amplificación típica que utiliza 10 nanogramos de ADN genómico por reacción,

habría 30 mil copias de la cloroperoxidasa disponibles para la amplificación, por lo que no parecería ser limitante.

7.0 Discusión

Desde que se descubrió en 1966, la cloroperoxidasa ha permanecido en el foco del interés biotecnológico por ser un catalizador muy versátil, que además presenta un plegamiento único (Sundaramoorthy *et al.*, 1995) Uno de los hallazgos más importantes de este proyecto fué la identificación de otras secuencias fúngicas con similitud significativa con la cloroperoxidasa. A nivel de aminoácidos la similitud es más evidente en las regiones que tienen interacción con el grupo hemo y que conforman la cavidad del sitio activo. Dado que en otras hemo peroxidases son estas regiones las que determinan la actividad catalítica y la especificidad, es posible que las proteínas que se identificaron posean capacidades parecidas a la cloroperoxidasa. La predicción de estructura secundaria sobre el alineamiento múltiple corrobora una posible similitud a nivel de plegamiento, aunque los índices de identidad son bajos.

Dado que hasta ahora la cloroperoxidasa se le ha considerado como una enzima única, la caracterización del producto de cualquiera de estas secuencias es de considerable interés. Para lograr este fin, una parte de este proyecto se dedicó a generar una base sólida para la caracterización de estos productos. De las 7 secuencias identificadas con similitud a la cloroperoxidasa, se aislaron u obtuvieron los genes de 3 de ellas y se diseñó una estrategia de construcción de vector de expresión para cada uno. Se completó la construcción de tres plásmidos distintos que pueden ser utilizados para expresar estas secuencias en *Aspergillus nidulans* o en cualquier otro ascomiceto. Estos sistemas de expresión utilizados en proyectos futuros para

producir y empezar a entender otras enzimas que podrían ser tan importantes como la cloroperoxidasa.

El hongo *Aspergillus nidulans* ha sido utilizado extensivamente para la expresión de proteínas heterólogas (Liu *et al.*, 2003; Valkonen *et al.*, 2003) y fue seleccionado para este proyecto por los antecedentes de la expresión de la CPO en otra especie de *Aspergillus* (Conesa *et al.* 2001). Desafortunadamente, no se logró expresar la cloroperoxidasa en este proyecto. Aunque posible, es poco probable que *A. nidulans* sea un organismo incapaz de sintetizar la cloroperoxidasa en su forma activa como ha sucedido con otros organismos debido a las complejas modificaciones post-traduccionales que se llevan a cabo en esta enzima (Conesa *et al.*, 2001). Sin embargo, los problemas que surgieron en este proyecto parecen tener su origen en el proceso de obtener transformantes de este hongo. Una preparación no óptima de los protoplastos, aunada con una caracterización de pocos transformantes primarios nos impidió identificar un aislado homogéneo con la integración genómica estable del vector. Esto se debió en parte a la naturaleza de los protoplastos, pues son células multinucleadas que hay que llevar a un estado de homogeneidad genómica con al menos un ciclo de esporulación y aislamiento de las esporas (Yelton *et al.*, 1984).

En este proyecto, se decidió en primera instancia caracterizar los transformantes primarios heterogéneos mediante la técnica de PCR. Inicialmente se creyó que el analizar transformantes primarios de tres ensayos, transformados con las dos versiones del vector de expresión para la cloroperoxidasa, sería un buen criterio para encontrar un aislado con las características que se buscaban, pero no fue así. Ante la falta de resultados

consistentes se decidió caracterizar esporas aisladas. Analizamos exhaustivamente 42 posibles recombinantes, provenientes de esporas aisladas de cinco transformaciones (A5, B5, H6, 36, Z11). La razón por la que esta cantidad de transformantes no es un número adecuado es porque existe la posibilidad de que en los eventos de transformación no se incorporara el vector completo, sino sólo la porción que resulta en el fenotipo deseado. Esto observaron Yelton *et al.* (1984) en el 25% de sus transformantes de *Aspergillus nidulans* utilizando un vector con el gen *trpC* para transformar una cepa *trpC*-. Aparentemente esto sucedía por eventos de recombinación homóloga donde se incorporaba *trpC*+ y se eliminaba el resto del plásmido. Esta podría ser la razón por la cual las cepas de *A. nidulans* analizadas en este proyecto adquirieron la capacidad para crecer en medio sin arginina (*argB*+), después de su transformación, sin mostrar evidencia de haber incorporado el gen de la cloroperoxidasa.

La cepa de *A. nidulans* (PW-1) es *argB*- por una mutación puntual, y una segunda posibilidad por la cual se obtienen cepas *argB*+ es por reversión genética, lo cual ocurre aproximadamente en un 1% de cepas que recuperan su capacidad de sintetizar arginina. Desafortunadamente, no se analizaron las colonias que se obtuvieron en el control negativo para ver si esto era un factor significativo en este proyecto.

Existe una tercera posibilidad para explicar el por qué se obtuvieron cepas de *A. nidulans* PW-1 con la capacidad de crecer en medio sin arginina pero sin la cloroperoxidasa. En algún momento, estos transformantes primarios habían mostrado evidencia de la cloroperoxidasa, por amplificación en PCR. Por lo tanto, otro factor que hay que tomar en cuenta es el tiempo

(varios meses) que había pasado desde la transformación hasta el análisis de las esporas aisladas en estos transformantes. Creo que a pesar de que el vector de expresión llevaba el gen *argB* completo que complementaba una de las auxotrofías, ya había pasado por varios ciclos de vida el transformante primario (derivado de un protoplasto genéticamente heterogéneo) y estos ciclos en medio sin arginina no favorecían la selección del vector completo. Aunque no los caracterizaron, Yelton *et al.* (1984) reportaron que aparentemente hasta un 12% de sus transformantes pierden alguna parte de su vector de transformación con varios ciclos de esporulación. Se podría esperar que este número se incrementaría al analizar un cultivo de *A. nidulans* con ADN heterogéneo proveniente de un protoplasto con un número indeterminado de núcleos, como fue el caso de este proyecto.

Otro aspecto de este proyecto que fue inesperado y tal vez distrajo la atención de obtener y analizar nuevos transformantes fue la detección de una actividad extracelular oxidante en los cultivos de *Aspergillus*. Inicialmente parecía que esto se podría atribuir a la presencia de la cloroperoxidasa, por lo que se realizaron varias pruebas para tratar de determinar el origen de la actividad, resultando que la actividad era inducida pero no se encontraron los factores responsables para la inducción. Se observó que no parecía tener ninguno de los requisitos de la cloroperoxidasa y que no demostraba un comportamiento típico de las enzimas (K_m , saturación de sustrato, etc.). Además, la actividad provenía de un compuesto muy pequeño, ya que se escapaba de una bolsa de diálisis con poros de 12 kDa. Después de varias pruebas se concluyó que la actividad tenía un origen químico y no enzimático, por lo que se realizó una revisión extensa de la literatura sin encontrar ninguna

explicación específica. Solo nos queda asumir que *Aspergillus nidulans* es un organismo complejo que, a pesar de haber sido un modelo genético por años, produce algunos metabolitos secundarios que todavía no se han caracterizado o reportado. Sin embargo, esta no es razón suficiente para eliminar *A. nidulans* como candidato para la producción de la cloroperoxidasa, cuya presencia se puede cuantificar con base en alguna de sus otras actividades para evitar confusión.

Sin embargo, antes de llegar a esta etapa, se tienen que superar los obstáculos de la expresión heteróloga de la cloroperoxidasa. Con base en los resultados que se obtuvieron en este proyecto, se sugieren varias estrategias que se podrían utilizar a futuro para aumentar la probabilidad de una producción exitosa de la cloroperoxidasa. Primero, se recomienda optimizar la preparación de los protoplastos y la transformación con el vector de expresión. Así, durante el proceso de selección, se obtendrán un mayor número de posibles transformantes para analizar aumentando la probabilidad de encontrar algunas que incorporaron el vector completo. Aquí los problemas que podrían surgir serían: 1) la enzima cloroperoxidasa no se produce o se produce de una manera inactiva, 2) la presencia de la cloroperoxidasa (genética o enzimática) le causa algún problema a *Aspergillus nidulans* y resulta en la inestabilidad genética por lo que el gen de la cloroperoxidasa se elimina después de algunos ciclos de esporulación. Si se encontrara alguno de estos problemas, la mejor estrategia sería elegir otro organismo para la producción heteróloga. Considero relativamente sencillo experimentar con esta alternativa, sin necesidad de cambiar el vector de expresión porque a pesar de que los componentes del

vector son propios de *A. nidulans*, son comúnmente utilizados en varias especies de ascomicete.

Otra alternativa que es muy importante explorar, es el análisis de las otras tres probables cloroperoxidasas, cuyos vectores de expresión se completaron en este proyecto. Nadie ha caracterizado estas enzimas y no se sabe cuales son sus capacidades y posibilidades. Puede que sean más versátiles que la cloroperoxidasa de *C. fumago*, o mas fáciles de manipular y producir, y por lo tanto con mayores posibilidades y utilidad en las industrias que podrían beneficiarse de estas actividades enzimáticas. Con la construcción de los vectores de expresión de los genes que codifican para estas enzimas, ya se completó el primero de muchos pasos necesarios para la caracterización de los productos. Puede que los resultados de estos futuros proyectos generen impacto en el campo de la biotecnología.

6.6.6 Conclusiones

Con base en la evidencia acumulada por los experimentos, se pudo concluir que la actividad identificada en el sobrenadante de los cultivos de *Aspergillus nidulans* definitivamente no proviene de la cloroperoxidasa heteróloga de *Caldariomyces fumago* y debido a que también fue identificada en el hongo silvestre, parece ser independiente del evento de transformación. Después de los experimentos en los cuales se observó que la actividad se escapaba de una bolsa de diálisis con un corte de 12 KDa y no representaba una cinética de saturación por sustrato, se concluyó que la actividad no era de origen enzimático sino de origen químico. No se logró identificar como se induce la actividad, ni exactamente de donde viene pero al suponer que es producido por *Aspergillus*, se consideraron las posibilidades de que el organismo esta liberando algún metabolito que (1) pueda ser algún compuesto oxidante capaz de oxidar el guayacol, o (2) es capaz de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} y se esta llevando acabo la Reacción de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\bullet$) en el medio. En el segundo caso hay que suponer alguna fuente de peróxido natural no limitante ya que la actividad no cambio significativamente al añadir más peróxido.

8.0 Referencias

- Adams, T. H., J. K. Wieser, and J. H. Yu. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:35-54
- Ayala, M., R. Tinoco, V. Hernandez, P. Bremauntz, and R. Vazquez-Duhalt. (1998). Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization. *Fuel Proc Tech* 57 pp. 101-111.
- Barrat, R.W., G.B. Johnson, and W.N. Ogata (1965) Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52:233-246
- Bird, D. and R. Bradshaw (1997) Gene targeting is locus dependent in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 255: 219-225
- Brandhorst, T. and W. Kenealy (1995) Effects of leader sequences upon the heterologous expression of restrictocin in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*. *Can J Microbiol* 41: 601-611
- Broekhuijsen, M., I. Mattern, R. Contreras, J. Kinghorn, and C. van den Hondel (1993) Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL9 fusion protein. *J Biotechnol* 31(2):135-45
- Brown, D., J. Yu, H. Kelkar, M. Fernandes, T. Nesbitt, N. Keller, T. Adams, and T. Leonard (1996) Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci* 93:1418-1422
- Casselton, L. and M. Zolan (2002) The art and design of genetic screens in filamentous fungi. *Nature Reviews Genetics* 3:683-697
- Colonna, S., N. Gaggero, C. Richelmi, and P. Pasta (1999) Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. *TIBTECH* 17: 163-168
- Conesa, A., F. Velde, F. Rantwijk, R. Sheldon, C. Hondel, and P. Punt (2001) Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *J Biol Chem* 276 (21): 17635-17640
- Conesa, A., P. Punt, C. van den Hondel (2002) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J Biotechnology* 93: 143-158
- Henikoff, S. and J.G. Henikoff (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci* 89:10915-10919.
- Juge, N., B Svensson and G. Williamson (1998) Secretion, purification and characterization of barley α -amylase produced by heterologous gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 385-392

[Kamoun S., P. Hrabec, B. Sobral, D. Nuss, and F. Govers \(1999\).](#) Initial assessment of gene diversity for the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* based on expressed sequences. *Fungal Genet Biol* 28(2):94-106

Koukaki, M., E. Giannoutsou, A. Karagouni, and G. Diallinas (2003) A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *J Microbiol Methods* 55: 687-695

Liu, L., J. Liu, R. Qiu, X. Zhu, Z. Dong and G. Tang. (2003) Improving heterologous gene expression in *Aspergillus niger* by introducing multiple copies of protein-binding sequence containing CCAATT to the promoter. *Lett Appl Microbiol* 36: 358-361

[Machida M., K. Asai, M. Sano, T. Tanaka, T. Kumagai, G. Terai, K. Kusumoto, T. Arima, O. Akita, Y. Kashiwagi, K. Abe, K. Gomi, H. Horiuchi, K. Kitamoto, T. Kobayashi, M. Takeuchi, D.W. Denning, J.E. Galagan, W.C. Nierman, J. Yu, D.B. Archer, J.W. Bennett, D. Bhatnagar, T.E. Cleveland, N.D. Fedorova, O. Gotoh, H. Horikawa, A. Hosoyama, M. Ichinomiya, R. Igarashi, K. Iwashita, P.R. Juvvadi, M. Kato, Y. Kato, T. Kin, A. Kokubun, H. Maeda, N. Maeyama, J. Maruyama, H. Nagasaki, T. Nakajima, K. Oda, K. Okada, I. Paulsen, K. Sakamoto, T. Sawano, M. Takahashi, K. Takase, Y. Terabayashi, J.R. Wortman, O. Yamada, Y. Yamagata, H. Anazawa, Y. Hata, Y. Koide, T. Komori, Y. Koyama, T. Minetoki, S. Suharnan, A. Tanaka, K. Isono, S. Kuhara, N. Ogasawara, H. Kikuchi \(2005\).](#) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438(7071):1157-61

Mullaney, E., J. Hamer, K. Roberti, M. Yelton and W. Timberlake (1985) Primary structure of the *trpC* gene from *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 199:37-45

Punt, P., R. Oliver, M. Dingenmanse, P. Pouwels, and C. van den Hondel (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56:117-124

Punt, P., M. Dingenmanse, A. Kuyvenhoven, R. Soede, P. Pouwels and C. van den Hondel (1990) Functional elements of the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene encoding glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* 93:101-109

Punt P.J., N.D. Zegers, M. Busscher, P.H. Pouwels, and C.A. van den Hondel (1991) Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of the highly expressed *Aspergillus nidulans gpdA* gene. *J Biotechnol* 17(1): 19-33

Rai, G., S. Sakai, A. Florez, L. Mogollon, L. Hager (2001) Directed evolution of chloroperoxidase for improved epoxidation and chlorination catalysis. *Adv Synth Catal* 343: 638-645

Redkar, R., R. Herzog and N. Singh (1998) Transcriptional activation of the *Aspergillus nidulans gpdA* promoter by osmotic signals. *Appl Environ Microbiol* 64(6): 2229-2231

Roach MP, Chen YP, Woodin SA, Lincoln DE, Lovell CR, Dawson JH (1997) *Notomastus lobatus* chloroperoxidase and *Amphitrite ornata* dehaloperoxidase both contain histidine as their proximal heme iron ligand. *Biochemistry*. 36(8):2197-202

Rotta C. and E. Bon (2002) 4-chlorophenol degradation by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Appl Biochem Biotech* 98-100:191

Sambrook, J. and D.W. Russell (2001) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3rd ed. Cold Springs Harbor Press, New York.

Sanchez, Alejandro (2001) Expresión recombinante de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. Tesis de licenciatura UNAM Instituto de Investigaciones Biomedicas

Sundaramoorthy, M. J. Turner and T. Poulos (1995) The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome p450 functional hybrid. *Curr Biol* 3: 1367-1377

Sundaramoorthy, M. J. Turner, and T. Poulos (1998) Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies. *Chem Biol* 5: 461-73

Tilburn, J., C. Scazzocchio, G. Taylor, J. Zabicky, JR. Lockington, and R. Davies (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26: 205-221

Torto, T., S. Li, A. Styer, E. Huitema, A. Testa, N. Gow, P. van West, and S. Kamoun (2003) EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Gen Res* 13: 1675-1685

Valkonen M, Ward M, Wang H, Penttila M, Saloheimo M. (2003) Improvement of foreign-protein production in *Aspergillus niger* var. *awamori* by constitutive induction of the unfolded-protein response *Appl Environ Microbiol* 69(12):6979-86

van Gorcom, R., P. Punt, P. Pouwels, and C. van den Hondel (1986) A system for The analysis of expression signals in *Aspergillus*. *Gene* 48: 211-217

Wang, X. H. Tachikawa, X. Yi, K. Manoj, and L. Hager (2003) Two-dimensional NMR study of the heme active site structure of chloroperoxidase. *J Biol Chem* 278(10): 7765-7774

Yelton, M., J. Hamer, and W. Timberlake (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* using a *trpC* plasmid. Proc Natl Acad Sci 81: 1470-1474

Yi, X., M. Mroczko, K. Manol, X. Wang, L. Hager (1999) Replacement of the proximal heme thiolate ligand in chloroperoxidase with a histidine residue. Proc Natl Acad Sci 96 (22): 12412-12417

Yi, X., A. Conesa, P. Punt, L. Hager (2003) Examining the role of Glutamic Acid 183 in chloroperoxidase catalysis. J Biol Chem 278: 13855-13859