



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIOS *in-silico* Y PARA LA EXPRESIÓN DE NUEVAS ENZIMAS REDOX
DEL TIPO PEROXIGENASAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ADRIÁN JESÚS QUINTANA BEDOYA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARCELA AYALA ACEVES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. WENDY XOLALPA VILLANUEVA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DR. FIDEL ALEJANDRO SANCHEZ FLORES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Cuernavaca, Mor., marzo, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Este trabajo fue realizado en el laboratorio de biocatálisis redox bajo la dirección de la Dra. Marcela Ayala Aceves, que pertenece al departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante la realización de este trabajo se contó con una beca de estudios de maestría que otorgó el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marcela Ayala Aceves, que sin su consejo, paciencia, dirección y apoyo nada de esto hubiera sido posible. Gracias por haber sido mi tutora y maestra.

A la Biol. Rosa Román Miranda por sus consejos y apoyo técnico en la realización de esta tesis.

A la Dra. Clarita Olvera Carranza y Joaquín Ramírez Ramírez, por sus consejos y apoyo en la realización de esta tesis.

Al proyecto PAPIIT IN214619 por el financiamiento para la realización de este proyecto.

A Leslie Feregrino, por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles. Por haber sido mi amiga, mi compañera, confidente, y por ser la persona a la que me gustaría llevar a conocer éste y otros mundos. Gracias por existir.

A mis padres, que estuvieron conmigo a la distancia en todo momento.

A mi hermano, por sus consejos y por su apoyo permanente para con mi persona incluso en los momentos más álgidos.

A “La Poderosa”, cuya participación fue crítica en el desarrollo de los eventos. Por nunca haberme dejado tirado e ir conmigo a los diferentes rincones de la república.

A mis amigos de la maestría, por los buenos momentos compartidos.

Esta tesis utilizó recursos de la supercomputadora Miztli a través del proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-293.

RESUMEN

Las peroxididasas inespecíficas (UPO por sus siglas en inglés) son enzimas de la familia hemo-tiolato peroxidasa (HTPs) que catalizan reacciones de oxidación y oxigenación sobre sustratos diversos empleando un mecanismo de reacción tipo “ping-pong”, en donde el peróxido de hidrógeno actúa como cosustrato, activando al grupo hemo. Son enzimas muy versátiles, extracelulares, solubles y estables en el medio ambiente, que utilizan al peróxido de hidrógeno como aceptor final de electrones. De forma particular, su existencia sólo ha sido probada experimentalmente a partir de cultivos de hongos y de genomas fúngicos a modo de proteínas hipotéticas.

Son interesantes desde el punto de vista biotecnológico debido a que catalizan reacciones de oxidación y oxigenación sobre múltiples sustratos, de forma especial en carbonos no activados, las cuales son reacciones químicas altamente demandantes desde el punto de vista de síntesis química y cuyos productos muchas veces consisten en precursores de compuestos biológicamente activos.

A la fecha se ha confirmado experimentalmente la existencia de 12 UPOs, de las cuales han sido plenamente caracterizadas 9, siendo la correspondiente a *Agrocybe aegerita* (AaeUPO) la más estudiada. A partir de la gran cantidad de genomas de hongos disponibles en el GenBank, estudios recientes postulan que pudieran existir cientos de UPOs en especies fúngicas, principalmente basidiomicetos y ascomicetos. Además, estudios filogenéticos realizados en secuencias de UPOs hipotéticas revelan que como tal integrarían una superfamilia de peroxididasas dividida en 7 subfamilias, cada una con dominios conservados específicos e integrada por especies no cercanas taxonómicamente, y que las UPOs completamente caracterizadas al momento solo corresponden a dos de estas subfamilias, por lo cual es importante ampliar el conocimiento respecto a este tipo de enzimas.

El presente proyecto tuvo por objetivo evaluar y caracterizar enzimáticamente los productos de genes correspondientes a UPOs hipotéticas encontrados en genomas de basidiomicetos, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* como sistema de expresión, bajo la hipótesis de que las enzimas codificadas en estos genomas son efectivamente activas y capaces de ser producidas y caracterizadas *in-vitro*. Para ello se utilizaron métodos de modelamiento molecular y similitud conformacional del sitio activo respecto a AaeUPO, seguido de técnicas de biología molecular para el clonamiento y expresión en levaduras de los genes seleccionados para intentar demostrar que las secuencias predichas corresponden a proteínas funcionales.

Como resultado se logró clonar 2 genes correspondientes a UPOs de los basidiomicetos *Galerina marginata* y *Sphaerobolus stellatus*, detectándose actividad oxidativa sobre ABTS para la UPO de *S. stellatus*. De esta manera, se concluye que la UPO de *S. stellatus* es una enzima funcional y, a reserva de experimentos complementarios, podría tratarse de una peroxigenasa funcional.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Mecanismo de acción de las UPOs y selectividad	4
UPO de <i>Agrocibe aegerita</i>	5
Características del sitio activo: túnel de acceso del sustrato	9
Diversidad de UPOs	11
Búsqueda y caracterización de nuevas UPOs	13
Expresión de UPOs en sistemas heterólogos	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
METODOLOGÍA	18
Búsqueda de nuevas secuencias UPO codificantes y potencialmente funcionales	18
Obtención de secuencias hipotéticas codificantes para UPOs funcionales.	18
Análisis de secuencia primaria	18
Generación de modelos <i>in-silico</i> por homología	18
Inspección visual del túnel y análisis de residuos que integran el túnel	19
Clonamiento de UPOs hipotéticas y transformación en <i>E.coli</i> DH5 α	19
Preprocesamiento de genes UPO y del vector pJRoC30	19
Clonamiento de genes UPO en el vector pJRoC30 y selección de colonias recombinantes	20
Transformación de las construcciones en <i>S. cerevisiae</i> BJ5465	20
Expresión de UPOs hipotéticas en <i>S. cerevisiae</i> BJ5465	21
Producción de UPOs hipotéticas en sistema heterólogo y su concentración.	21
Ensayos cualitativos de actividad enzimática sobre NDB, ABTS y Guaiacol.	22
Ensayos de actividad sobre ABTS	22
Actividad sobre NBD	22
Actividad sobre Guaiacol (G-OH)	22
RESULTADOS y DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	41
PERSPECTIVAS	41
REFERENCIAS	42
ANEXOS	46
ANEXO 1: Métodos generales de biología molecular	46
ANEXO 2: Soluciones de trabajo y medios de cultivo utilizados.	54
ANEXO 3: Detalle de alineamientos, modelos, esquema de clonamiento y cálculo de unidades	57
ANEXO 4: Posición de residuos que integran el túnel en la secuencia primaria para las UPOs estudiadas.	70

INTRODUCCIÓN

La superfamilia de peroxigenasas inespecíficas (unspecific peroxigenases – UPOs) (Faiza et al. 2019) está compuesta por enzimas del tipo óxido reductasa que pertenecen al grupo de las hemo-tiolato peroxidadasas (HTPs); utilizan peróxido de hidrógeno como cosustrato/aceptor final de electrones en la catálisis de reacciones de oxidación y oxigenación sobre sustratos diversos, siendo esta inespecificidad la razón de su nombre. El grupo hemo de las UPOs, al igual que en otras hemo-enzimas, se encuentra estabilizado por un ion magnesio (Mg^{+2}) en el sitio catalítico (Hrycay & Bandiera, 2015). Los principales tipos de reacciones catalizadas por este grupo de enzimas se ilustran en la figura 1. La diversidad de sustratos sobre los cuales las UPOs actúan influyeron en que fueran llamadas originalmente peroxigenasas aromáticas (APOs) (Gröbe et al. 2011), para finalmente recibir la denominación de peroxigenasas inespecíficas (UPOs).

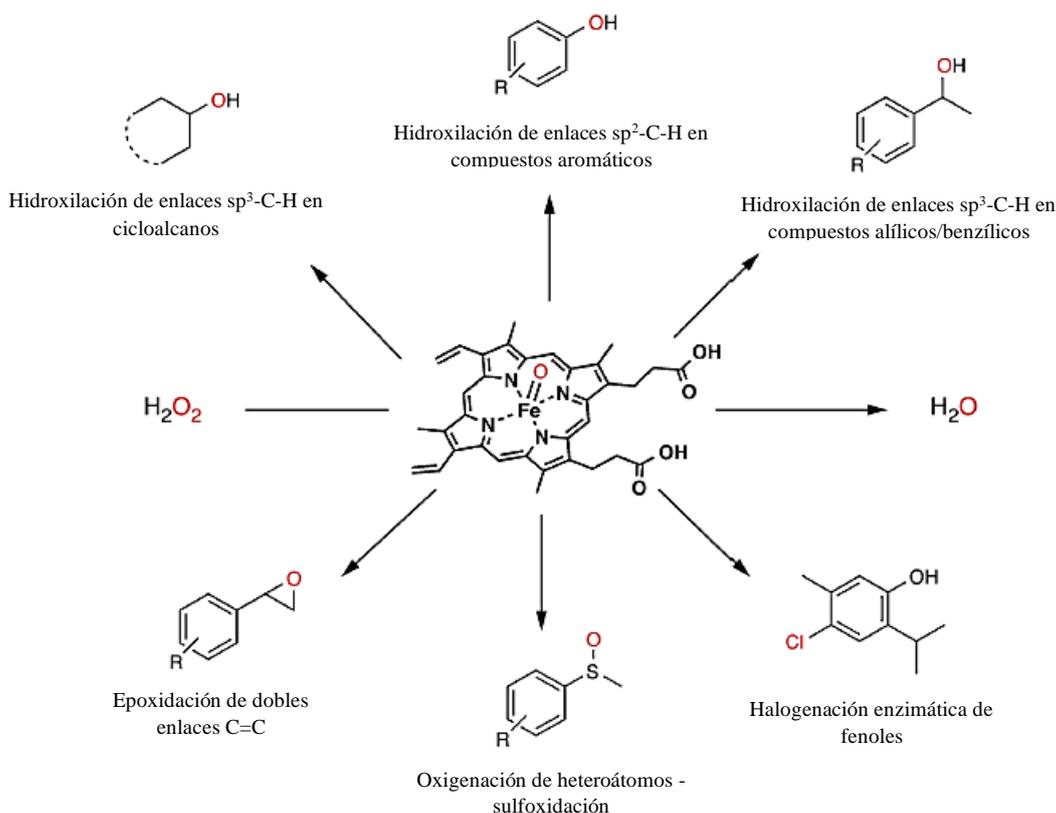


Figura 1. Principales tipos de reacciones catalizadas por las UPOs. Oxifuncionalización de carbonos no activados (hidroxilación de compuestos alifáticos, tanto lineales como cíclicos), hidroxilación de compuestos aromáticos, epoxidación de compuestos alifáticos, reacciones de halogenación y reacción de dismutación de peróxido de hidrógeno.
Imagen tomada de Wang et al. 2017.

A diferencia de las hemo-peroxidadasas clásicas, las UPOs poseen el grupo hemo coordinado a la proteína a través del átomo de azufre de un residuo de cisteína, siendo este un punto de similitud con las enzimas de la familia de los citocromos p450 (CytP450). No obstante, las enzimas de la familia CytP450 requieren de cofactores como

aqueellos derivados de flavina (NADPH) a modo de fuente de poder reductor y oxígeno molecular como agente oxidante; estos cofactores necesitan ser reciclados por lo que normalmente los biocatalizadores basados en citocromo P450 son células completas. CytP450 es una amplia familia de proteínas de membrana (con más de 11000 enzimas conocidas a la fecha) por lo que un gran número de estas enzimas no son solubles en suspensión y son altamente inestables en condiciones de reacción fuera del lumen celular; además, la diversidad de reacciones que catalizan es debido a la gran cantidad de enzimas diferentes que integran esta familia ya que cada una es altamente específica por un sustrato particular.

Por el contrario, las UPOs son enzimas glicosiladas extracelulares, solubles, estables y autosuficientes que utilizan H₂O₂ como aceptor de electrones y fuente de oxígeno. Tienen relativa poca especificidad por sustratos, lo cual constituye en sí mismo una ventaja en la búsqueda de un biocatalizador eficiente y “multiusos” (Hrycay & Bandiera, 2015). El H₂O₂, a diferencia del NADPH en caso de CytP450, se comporta como un cosustrato de las reacciones catalizadas por las UPOs, por lo que se consume: Estas enzimas no necesitan regenerar su poder reductor. A la fecha se han caracterizado experimentalmente 12 enzimas de esta familia (Tabla 1.) a partir exclusivamente de hongos filamentosos. Así mismo, la existencia de cientos de UPOs ha sido predicha exclusivamente en genomas fúngicos (Hrycay & Bandiera, 2015).

El rol que estas enzimas cumplen en la naturaleza no se conoce aún, a excepción de la UPO de *Leptoxyphium fumago* (LfuUPO), cuya función fisiológica es participar en la síntesis de la caldariomicina, un metabolito clorado (Morris & Hager, 1966). Sin embargo, es posible que la función fisiológica de las UPOs sea tan versátil como sus propiedades catalíticas. Por ejemplo, la LfuUPO es una enzima predominantemente halogenasa que muestra baja actividad de peroxigenasa mientras que las UPOs más recientemente descubiertas tienen alta actividad peroxigenasa y algunas, como la UPO de *Marasmius rotula* (MroUPO), tienen casi nula actividad halogenasa (Grobe et al. 2011).

Tabla 1. UPOs producidas y caracterizadas.

Enzima	Producción	Especie	Phyllum	Referencia
AaeUPO	Nativa y recombinante	<i>Agrocybe aegerita</i>	Basidiomycota	Ullrich et al. 2004; Molina-Espeja et al. 2014.
CraUPO	Nativa	<i>Coprinellus radians</i>	Basidiomycota	Ahn et al. 2007
CveUPO*	Nativa	<i>Coprinopsis verticillata</i>	Basidiomycota	Ahn et al. 2008
MroUPO	Nativa	<i>Marasmius rotula</i>	Basidiomycota	Gröbe et al. 2011
CciUPO	Recombinante	<i>Coprinopsis cinérea</i>	Basidiomycota	Babot et al. 2013
ApaUPO*	Nativa	<i>Agrocybe parasitica</i>	Basidiomycota	Hofrichter et al. 2015
AniHTP	Recombinante	<i>Aspergillus niger</i>	Basidiomycota	Dachs et al. 2016
CglUPO	Recombinante	<i>Chaetomium globosum</i>	Ascomycota	Kiebitz et al. 2017
MweUPO*	Nativa	<i>Marasmius wettsteinii</i>	Basidiomycota	Ulrich et al. 2018
HinUPO	Recombinante	<i>Humicola insolens</i>	Ascomycota	Aranda et al. 2019
LfuCPO	Nativa	<i>Leptoxyphium fumago</i> (ex <i>Caldariomyces fumago</i>)	Ascomycota	Morris & Hager, 1966
PabUPO	Recombinante	<i>Psathyrella aberdarensis</i>	Basidiomycota	Kimani et al. 2019

*: Su existencia ha sido experimentalmente confirmada, pero carece de una caracterización bioquímica detallada y/o con sustratos estándar.

La estabilidad y versatilidad de las UPOs, así como su capacidad de actuar con relativa estereoselectividad y regioselectividad sobre determinados sustratos complejos, muchos de ellos precursores de moléculas biológicamente activas, sumado a sus bajos costos de producción y reacción, han hecho que algunos autores las denominen “el biocatalizador soñado” y que la industria biotecnológica propicie investigaciones dirigidas a este grupo de enzimas (Martínez et al. 2017; Wang et al. 2017).

ANTECEDENTES

Mecanismo de acción de las UPOs y selectividad

Las UPOs poseen un mecanismo de tipo “ping pong”, el cual es ilustrado en la figura 2 (Wang et al. 2015). Este mecanismo involucra la formación del “compuesto I” a partir de la reacción entre el grupo hemo y una molécula de peróxido de hidrógeno, facilitada por un par ácido-base conformado por un glutámico y una base como arginina. El compuesto I es un radical oxoferril con dos equivalentes oxidativos por encima del estado basal, y es la especie responsable de realizar la oxidación del sustrato, tal y como también ocurre en otras hemo-peroxidasas de las plantas, bacterias y hongos. En las reacciones de peroxigenación catalizadas por las UPOs, el átomo de oxígeno del compuesto I es transferido al sustrato, según se muestra en la figura 2.

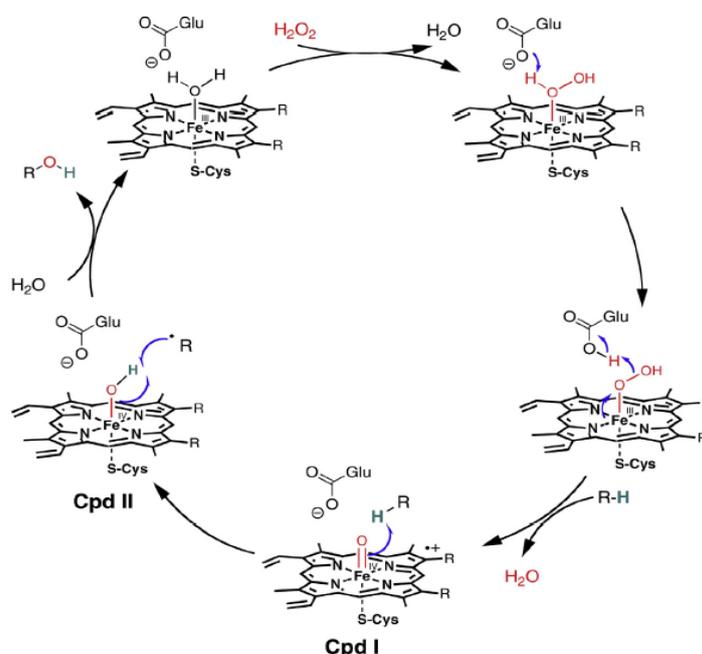


Figura 2. Mecanismo de reacción general propuesto para las UPOs - “peróxido – ping pong”. Fue demostrado experimentalmente mediante marcaje con isótopos de oxígeno al utilizar $\text{H}_2\text{O}_2^{18}$ y posterior análisis de los productos. Imagen tomada de Wang et al. 2017.

Las UPOs en su estado nativo frecuentemente enfrentan un problema de poca selectividad en lo que respecta a productos obtenidos. Por ejemplo, la hidroxilación de grupos CH_3 - y CH_2 - frecuentemente es acompañada de reacciones de sobreoxidación en el sentido de que la formación del primer alcohol (quiral) en algunos casos es susceptible de volver a ser oxidado, dando como resultado el correspondiente compuesto cetónico, aldehído o ácido carboxílico. Este problema, que varía de UPO a UPO, también es frecuentemente observado en la hidroxilación de enlaces C-H activados, tanto alílicos como bencílicos. Está reportado que, en el caso de hidroxilación del ciclohexano, AaeUPO forma

mayoritariamente ciclohexanol mientras que MroUPO forma predominantemente ciclohexanona (Peter et al. 2014); por su parte, en caso de la hidroxilación del tolueno por parte de LfuUPO, se obtiene una mezcla de productos de sobreoxidación: alcohol bencílico, benzaldehído y ácido benzoico (Zak and Dodds, 1995). En la figura 3 se ilustra el problema de sobreoxidación.

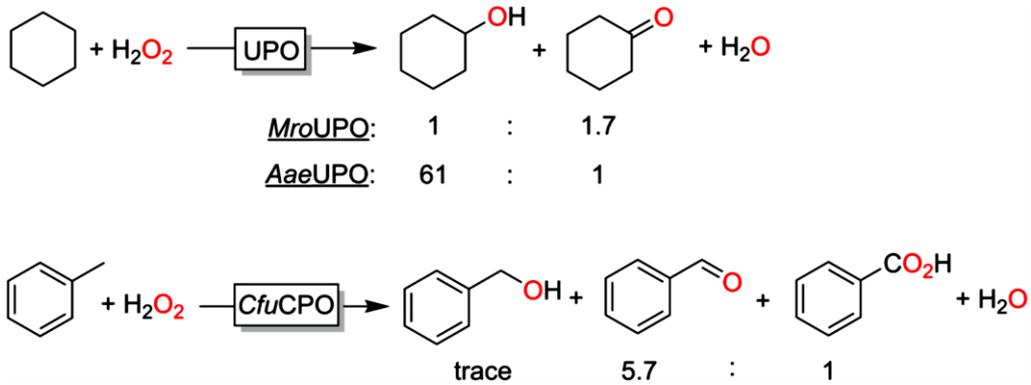


Figura 3. Problemas de sobreoxidación en productos de hidroxilaciones catalizadas por UPOs sobre enlaces C-H. Dependiendo de la UPO utilizada, la oxidación de ciclohexano produce mayoritariamente ciclohexanol o ciclohexanona. Por su parte, la oxidación catalizada por LfuUPO del tolueno produce una mezcla de productos de sobreoxidación como lo son el alcohol bencílico, benzaldehído y ácido benzoico. Imagen tomada de Hobish et al. 2021.

UPO de *Agrocybe aegerita*

La UPO más estudiada al momento es la correspondiente al basidiomiceto comestible *Agrocybe aegerita* (AaeUPO), la cual fue aislada por primera vez por Ullrich y colaboradores en 2004 (Ullrich et al. 2004). Algunas de las reacciones que esta enzima puede catalizar se listan en la tabla 2, e ilustran en la figura 4.

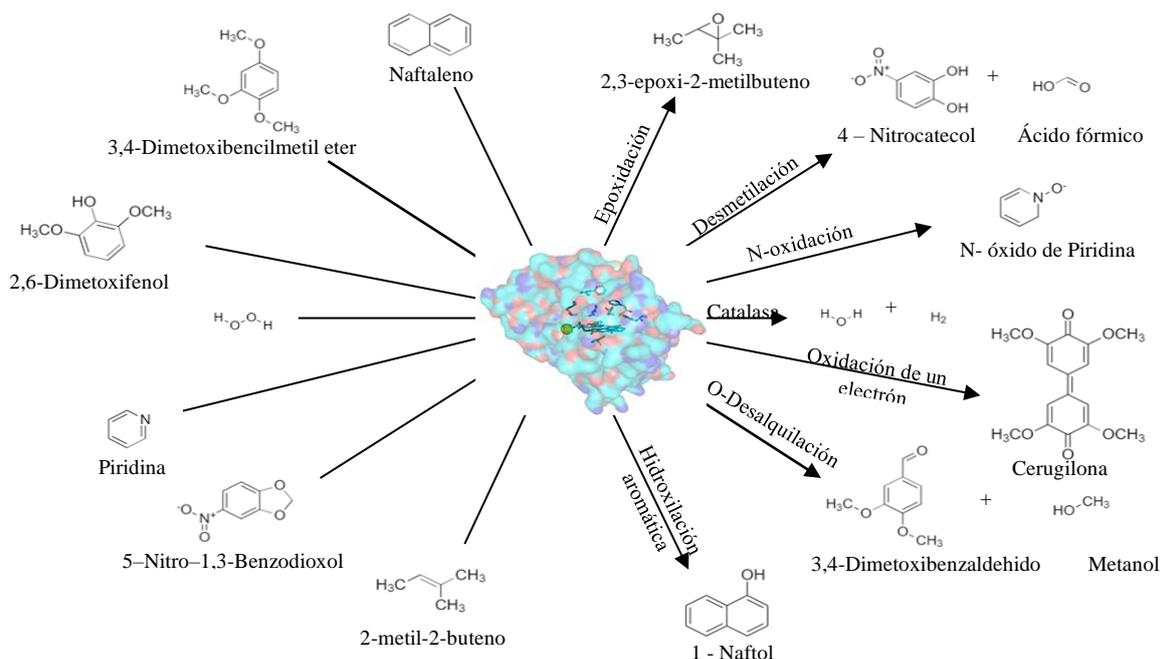


Figura 4. Reacciones representativas descritas para AaeUPO.

Tabla 2. Principales reacciones descritas para AaeUPO

Sustrato	Producto mayoritario	Tipo de reacción	Km (μM)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (l/M*s)	Referencia
Naftaleno	1-Naftol	Oxigenación aromática	320	166	5.17*10 ⁵	Kluge et al. 2007
Diclofenaco	4'-hidroxidiclofenaco	Oxigenación aromática	690	651	9.42*10 ⁵	Poraj-kobielska et al. 2013
Piridina	N-óxido de piridina	N-oxidación	69	0.21	3.04*10 ³	Ullrich et al. 2008
2-metil-2-buteno	2,3-epoxi-2-metilbuteno	Epoxidación	4976	1257	2.3*10 ⁵	Peter et al. 2013
Ciclohexano	Ciclohexanol	Hidroxilación de alcanos	994	72	7.2*10 ⁴	Peter et al. 2014
Etilbenceno	(R)-Feniletanol	Hidroxilación de alquilos	694	410	5.9*10 ⁵	Kluge et al. 2012
3,4-Dimetoxibencilm etil éter	3,4-Dimetoxibenzaldehído, metanol	O-Desalquilación	1430	720	5.0*10 ⁵	Kinne et al., 2009
5-Nitrobenzodioxol (NBD)	4-Nitrocatecol, Ácido fórmico	N-Desalquilación	1190	457	3.8*10 ⁵	Poraj-kobielska et al. 2012
Alcohol bencílico	Benzaldehído	Oxidación de alcohol cíclico	1001	269	2.69*10 ⁵	Ullrich et al. 2004
2,6-Dimetoxifenol	Cerugilona	Oxidación de un electrón	298	108	3.61*10 ⁵	Ullrich et al. 2004
ABTS	Radical catiónico de ABTS	Oxidación de un electrón	37	283	7.67*10 ⁶	Ullrich et al. 2004
Propanolol	5'-hidroxipropanolol	Hidroxilación	2239	150	6.7*10 ⁴	Santos et al. 2018
Isoforona	4-hidroxiisoforona 4-ketoisiforona	Hidroxilación	1380	20.1	14.6*10 ³	Aranda et al. 2019

En lo que respecta a la selectividad de los productos obtenidos con esta enzima, se tiene que la acción sobre alquenos frecuentemente produce mezclas de epóxidos y productos de hidroxilación alílica; no se han encontrado productos de oxidaciones en metilos terminales de alquenos (Peter et al. 2013). Para las reacciones de hidroxilación catalizadas por AaeUPO sobre alquilos aromáticos, se sabe que pueden producirse oxidaciones sobre la cadena alifática o el anillo. Se tiene así que, por ejemplo, la hidroxilación de etil benceno produce casi exclusivamente (R)-1-fenil etanol, presentándose los productos de sobreoxidación en concentraciones traza, mientras que su acción sobre tolueno produce una mezcla compleja de alcohol bencílico y varios productos de sobreoxidación e hidroxilación del anillo aromático, según se ilustra en la figura 5 (Peter et al. 2014; Ullrich and Hofrichter, 2005). Si bien algunas reacciones o condiciones de reacción favorecen que haya enantioselectividad y regioselectividad en la formación de productos, esto no es necesariamente extrapolable a todas las reacciones catalizadas por AaeUPO u otras UPOs. Las causas fundamentales que condicionan su selectividad o falta de selectividad en ese sentido son motivo de investigación.

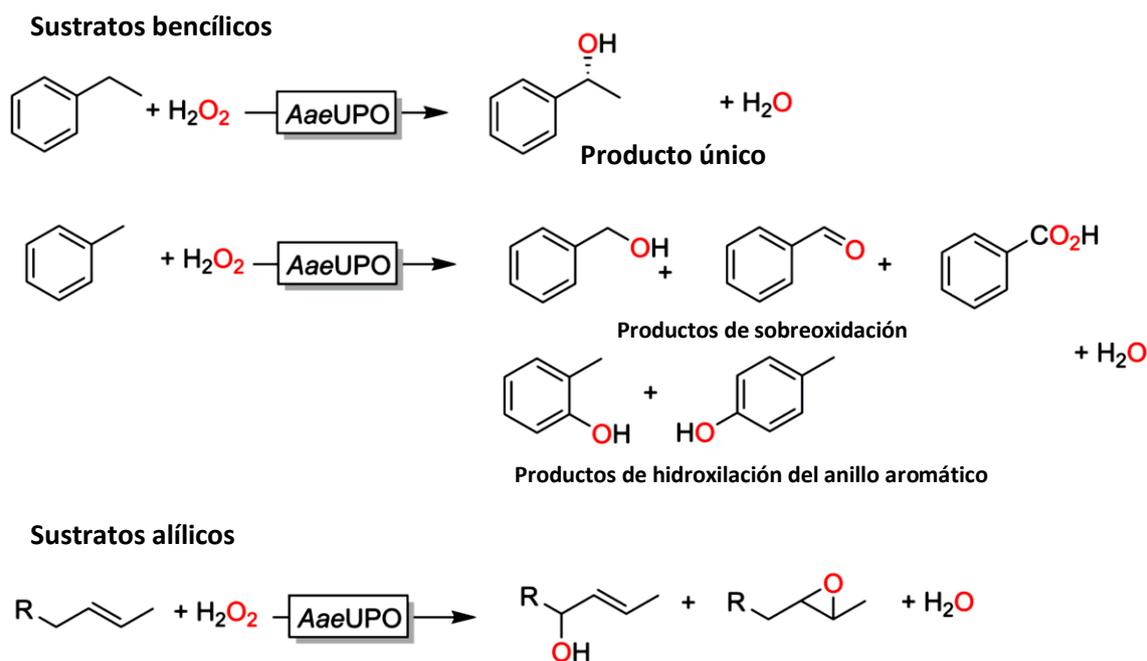


Figura 5. Problemas de selectividad observados en reacciones de hidroxilación catalizadas por AaeUPO sobre sustratos bencílicos o alílicos activados. Imagen tomada de Hobish et al. 2021.

La amplia diversidad de reacciones catalizadas por AaeUPO y su bajo nivel de producción por el hongo *A. aegerita* (2 ABTS U/L) ha hecho que se desarrollen sistemas experimentales que someten esta enzima a evolución dirigida con el fin de favorecer su producción recombinante en levaduras (6500 ABTS U/L) (Molina-espeja et al. 2014) y su producción a gran escala (232000 ABTS U/L) (Molina-Espeja et al. 2015). Esto ha impulsado a su vez diferentes investigaciones orientadas al mejoramiento y especialización de dicha enzima en la catálisis de reacciones especialmente relevantes para la industria. En la tabla 3 se presentan algunas variantes obtenidas por evolución dirigida o mutación puntual, para generar enzimas con propiedades específicas.

Por ejemplo: La variante PaDa-1 es una variante generada por evolución dirigida con el único objetivo de mejorar su secreción en un sistema recombinante basado en levaduras (Molina-espeja et al. 2014) y posee las mutaciones F12Y-A14V-R15G-A21D en el péptido señal y V57A-L67F-V75I-I248V-F311L en la proteína madura, las cuales se localizan lejos del sitio activo y se hipotetiza que tendrían un rol en la estabilización del plegamiento de la proteína. La variante JaWa fue obtenida con el propósito de incrementar la eficiencia catalítica de PaDa1 en la reacción de síntesis de alfa-naftol, tras la introducción de las mutaciones específicas G241D-R257K. La variante SoLo fue obtenida pensando en su aplicación industrial para la síntesis de 5'-hidroxipropanolol bajo un sistema de regeneración de H_2O_2 , y donde se favorezca específicamente la actividad peroxigenativa de esta enzima pero se reduzcan al máximo la actividad peroxidativa y su inactivación por peróxido de hidrógeno por medio del incremento del número total de recambios (TTN), fue producida a partir de JaWa e incluye la mutación puntual F191S. Finalmente, la variante JEd-I fue generada a partir de PaDa1 con la finalidad de estudiar el rol de la mutación puntual A316P, la cual se ubicada en un loop

de entrada al túnel y restringe la flexibilidad local, y demostró ser benéfica en términos de k_{cat}/K_m (incremento de 1.5 – 6 veces) para los sustratos NBD y ABTS.

Debido a la versatilidad de AaeUPO y sus variantes, se han desarrollado múltiples investigaciones dirigidas a comprender las bases estructurales que permiten la diversidad de reacciones catalizadas por este grupo de enzimas (Molina-espeja et al. 2016; Ramirez-Escudero et al. 2018; Gomes de Santos et al. 2018).

Tabla 3. Parámetros cinéticos determinados para AaeUPO nativa y sus variantes obtenidas mediante evolución dirigida.

Referencia	Enzima	Sustrato	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Molina-Espeja et al. 2014	AaeUPO	ABTS	25 ± 2	221 ± 6	$8 * 10^6 \pm 6.92 * 10^5$
		NBD	684 ± 207	219 ± 25	$3.2 * 10^5 \pm 6.4 * 10^4$
		Bencil-OH	1900 ± 110	329 ± 7	$1.74 * 10^5 \pm 7 * 10^3$
		VA-OH	5200 ± 310	88 ± 2	$1.7 * 10^4 \pm 7 * 10^2$
		H ₂ O ₂	1370 ± 160	290 ± 15	$2.11 * 10^5 \pm 1.5 * 10^4$
	PaDa-1	ABTS	48 ± 4	395 ± 13	$8.2 * 10^6 \pm 5.98 * 10^5$
		NBD	483 ± 95	338 ± 22	$7 * 10^5 \pm 9.9 * 10^4$
		Bencil-OH	2470 ± 320	307 ± 15	$1.24 * 10^5 \pm 1.1 * 10^4$
		VA-OH	7900 ± 700	121 ± 5	$1.5 * 10^4 \pm 9 * 10^2$
		H ₂ O ₂	490 ± 60	238 ± 8	$5 * 10^5 \pm 4.2 * 10^4$
Molina-Espeja et al. 2016	PaDa-1	DMP	126 ± 14	68 ± 2	$5.4 * 10^5 \pm 4.8 * 10^4$
		Naftaleno	578 ± 106	229 ± 17	$4.0 * 10^5 \pm 4.0 * 10^4$
	JaWa	ABTS	181 ± 22	125 ± 5	$6.9 * 10^5 \pm 6.3 * 10^4$
		DMP	866 ± 108	142 ± 8	$1.6 * 10^5 \pm 1.2 * 10^4$
		Naftaleno	127 ± 27	78 ± 3	$6.2 * 10^5 \pm 1.1 * 10^5$
H ₂ O ₂	1250 ± 300	447 ± 40	$3.6 * 10^5 \pm 5.9 * 10^4$		
Gomez de Santos et al. 2018	AaeUPO	Propanolol	2239 ± 333	150 ± 12	$6.7 * 10^4 \pm 4.8 * 10^3$
	PaDa-1	Propanolol	2268 ± 220	212 ± 11	$9.3 * 10^4 \pm 4.3 * 10^3$
	JaWa	Propanolol	244 ± 92	765 ± 76	$3.1 * 10^6 \pm 0.9 * 10^5$
	SoLo	ABTS	568 ± 91	365 ± 23	$6.4 * 10^5 \pm 6.7 * 10^4$
Propanolol		391 ± 97	497 ± 35	$1.3 * 10^6 \pm 0.2 * 10^5$	
Ramirez Escudero et al. 2018	PaDa-1	DMP	380 ± 20	175 ± 5	$4.64 * 10^5 \pm 1.7 * 10^4$
		VA-OH	10300 ± 1400	75 ± 5	$7.3 * 10^3 \pm 6 * 10^2$
		NBD	1000 ± 110	412 ± 21	$3.89 * 10^5 \pm 2.2 * 10^4$
	PaDa-1 revertida	ABTS	46 ± 8	1359 ± 31.5	$2.98 * 10^7 \pm 4.37 * 10^6$
		DMP	310 ± 2	165 ± 4.6	$5.28 * 10^5 \pm 2.3 * 10^4$
		VA-OH	6600 ± 700	152 ± 6	$2.3 * 10^4 \pm 1.7 * 10^3$
		NBD	710 ± 100	307 ± 18	$4.3 * 10^5 \pm 3.7 * 10^4$
	JeDi	ABTS	27 ± 6	1220 ± 25	$4.5 * 10^7 \pm 8.83 * 10^6$
		DMP	230 ± 30	166 ± 6	$7.06 * 10^5 \pm 5.2 * 10^4$
		VA-OH	5800 ± 500	191 ± 5	$3.3 * 10^4 \pm 2 * 10^3$
NBD		910 ± 80	491 ± 21.2	$5.41 * 10^5 \pm 2.8 * 10^4$	
VA-OH: Alcohol veratrílico. DMP: Dimetoxifenol.					

Características del sitio activo: túnel de acceso del sustrato

Las UPOs poseen un grupo hemo en el sitio activo. La presencia del grupo hemo en las hemo-enzimas fue determinada originalmente tras analizar la presencia de hierro mediante reacción con 1, 10 – fenantrolina, descrita por Cameron en 1965. La primera enzima UPO que se estudió mediante cristalografía fue la LfuCPO, donde se propuso por primera vez una posible relación con las enzimas Cyt P450 (Sundaramoorthy et al. 1995). Se observó que en ambas enzimas el grupo hemo se encuentra coordinado con el grupo tiol de un residuo de cisteína (Pecyna et al. 2009) (Figura 6A). En el caso de la AaeUPO el grupo hemo se encuentra flanqueado por los residuos Phe-69, Phe-121 y Phe-199 (Figura 6B), lo que sugiere que tienen la función de restringir su movimiento al interior del sitio, a la vez que dan forma a la cavidad, la cual tiene un diámetro de 8.5 Å (Piontek et al. 2013). Adicionalmente los propionatos del grupo hemo interactúan con un catión de magnesio en lugar de manganeso como lo indicaban las descripciones iniciales. Este catión se encuentra formando otras interacciones polares con 3 átomos de oxígeno correspondientes a los residuos Glu-122, Gly-123 y Ser-126 (Figura 6C) (Piontek et al. 2013). Por otra parte, se sabe que el par ácido-base necesario para la formación del compuesto 1 está integrado por los residuos Glu-196 y Arg-189 (Figura 6D), los cuales facilitan el rompimiento heterolítico de la molécula de peróxido de hidrógeno (Wang et al. 2012).

En lo que respecta a la interacción entre el grupo hemo y el sustrato, es necesario que éste se acerque a una distancia suficiente para que ocurra la transferencia del átomo de oxígeno presente en el compuesto 1; de esta manera el sustrato debe internalizarse en la proteína a través de un túnel de acceso al sitio activo, que conecta el seno de la solución con el grupo hemo activado (Figura 6E). En AaeUPO, el túnel tiene una longitud total de 17 Å desde la superficie de la proteína hasta el grupo hemo y está conformado por 9 residuos aromáticos, 8 Phe y 1 Tyr (Figura 6F). Los residuos Phe-76 y Phe-191 se ubican en la entrada y se ha postulado que cumplirían la función de guiar al sustrato hacia el sitio activo (Ramirez-Escudero et al. 2018); sin embargo, estudios recientes evidenciaron que estos residuos más bien cumplen un rol en la estabilización conformacional del túnel, a modo de andamiaje (Ramirez et al. 2020).

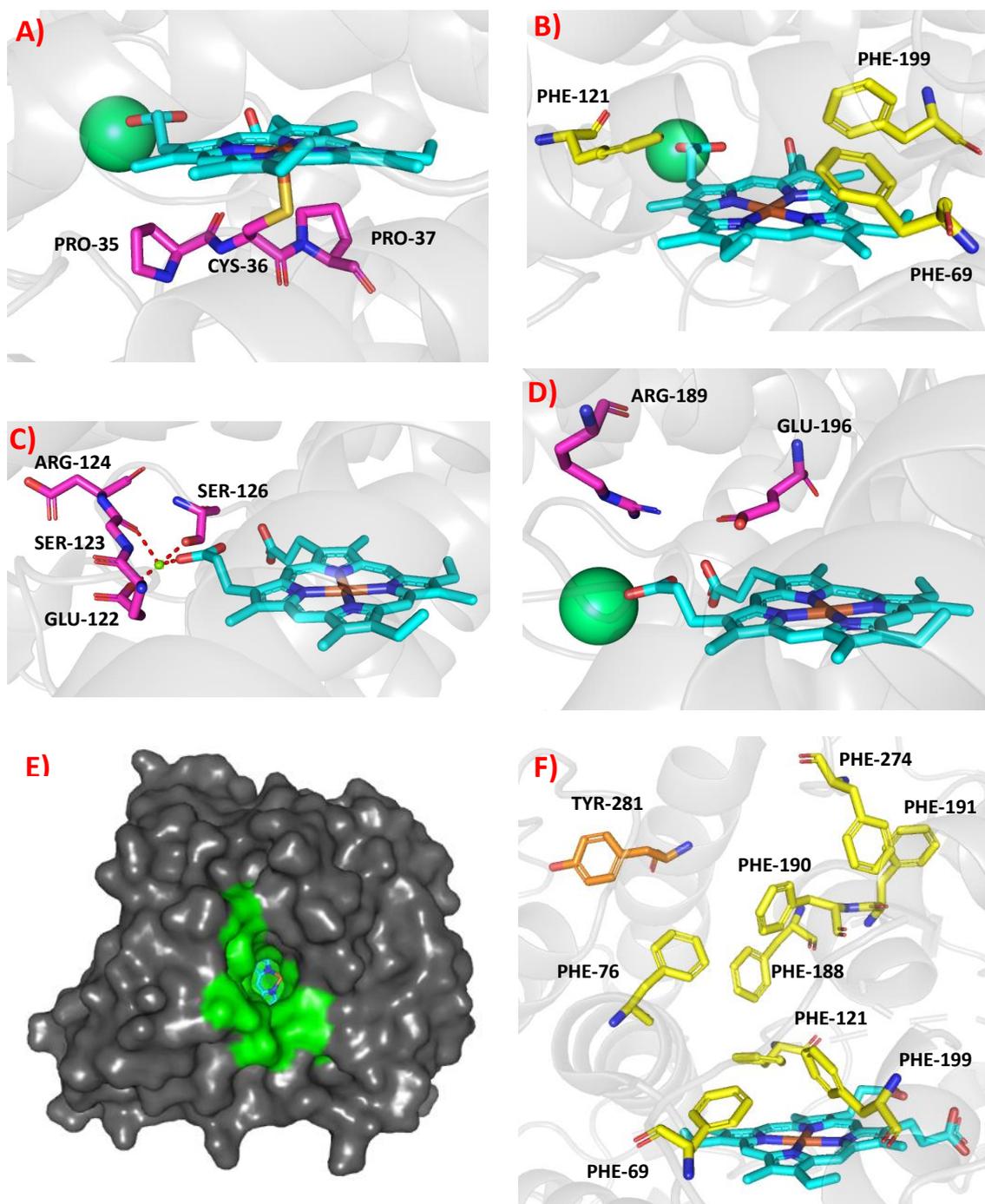


Figura 6. Estructura molecular de la AaeUPO y disposición de los principales residuos de aminoácidos en el sitio activo e intermediaciones. **A)** Grupo hemo coordinado al grupo tiol de Cys-36. **B)** Residuos de Phe-69, Phe-121 y Phe-199 al interior de la cavidad catalítica. **C)** Átomo de Mg^{+2} (esfera verde) e interacciones con los residuos Glu-122, Ser-123 y Ser-126, y propionatos del grupo hemo. **D)** Disposición del par ácido-base (Arg-189 y Glu-196) al interior de la cavidad catalítica. **E)** Vista frontal al túnel de acceso al sitio activo de AaeUPO. **F)** Disposición de residuos aromáticos principales para dar arquitectura al túnel de acceso al sitio activo e intermediaciones.

Diversidad de UPOs

La existencia de esta familia de enzimas, interesantemente, sólo ha sido evidenciada en hongos filamentosos ya sea a modo de enzimas nativas aisladas a partir de extractos o producidas de forma recombinante y posteriormente caracterizadas. Dado que día a día la cantidad de genomas fúngicos registrados en el GenBank se incrementa, resulta sensato pensar que la cantidad de UPOs hipotéticas en genomas también lo hace.

Un reciente estudio realizado por Faiza y colaboradores analizó el total de genomas fúngicos depositados a la fecha de su publicación (febrero de 2019) en busca de genes que posiblemente codifiquen a UPOs activas. Para la búsqueda, se basaron en criterios como la identidad de secuencia con AaeUPO y MroUPO (las UPO más estudiadas a la fecha), la presencia de motivos importantes para la catálisis como lo son EGD, PCP y RXXXXXXE (los cuales consisten de los residuos que interactúan con el catión de magnesio, el residuo de cisteína que coordina al hemo y el par ácido base catalítico), tamaño y peso molecular de la UPO hipotética, e identidad conformacional del sitio activo con los de AaeUPO y/o MroUPO. Como resultado de este estudio, los autores propusieron 35 secuencias de UPOs tentativas, pertenecientes a 35 especies de hongos para las cuales no se ha explorado la producción o actividad de estas enzimas.

Por otra parte, en este mismo estudio se buscaron relaciones filogenéticas entre las secuencias seleccionadas, encontrando que las UPOs podrían agruparse en 7 subfamilias pertenecientes a una misma superfamilia UPO (Figura 7.A). Cada subfamilia posee motivos conservados a nivel de las secuencias de aminoácidos predichas, y los autores suponen que estos motivos podrían conferir características, funciones o propiedades particulares (Figura 7.B) (Faiza et al. 2019). En esta clasificación estarían presentes especies no taxonómicamente asociadas como también había sido previamente observado por Hofrichter y colaboradores en 2015 (Figura 8).

Se puede notar entonces que, además de las enzimas de referencia y la LfuUPO (cloroperoxidasa), solo 1 de las UPOs de las que se tiene evidencia experimental, la UPO de *Coprinopsis cinérea* – (CciUPO), se asocia a uno de los clados (subfamilia 1). Esto revela que solo 2 de las 7 subfamilias UPO han sido exploradas. No se especifica en el estudio cómo se manejó la información correspondiente a UPOs descritas experimentalmente al momento; no obstante, y en función a los motivos conservados y con cierta reserva, algunas UPOs pueden asociarse a determinada subfamilia como es el caso de la UPO de *Chaetomium globosum* (CglUPO) que correspondería a la subfamilia denominada “Pog – Peroxidasas” o a la de las CPOs.

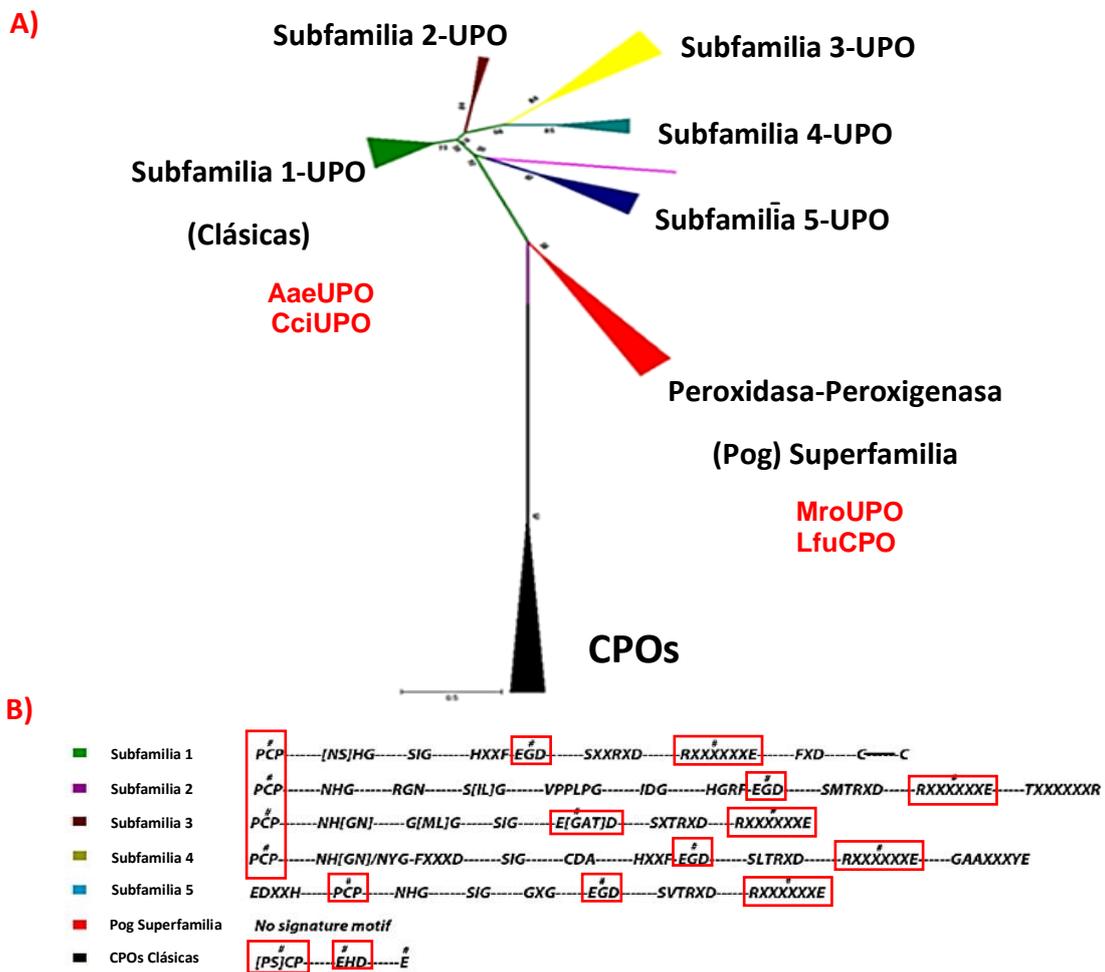


Figura 7. A) Dendrograma resumido a los 7 clados correspondientes a las subfamilias de UPOs. B) Motivos conservados y característicos para cada subfamilia UPO. En rojo se destacan los motivos conservados correspondientes al par ácido base, al residuo de cisteína que coordina al grupo hemo y los residuos que enlazan al átomo de magnesio. Imagen tomada y adaptada del estudio publicado por Faiza et al. 2019.

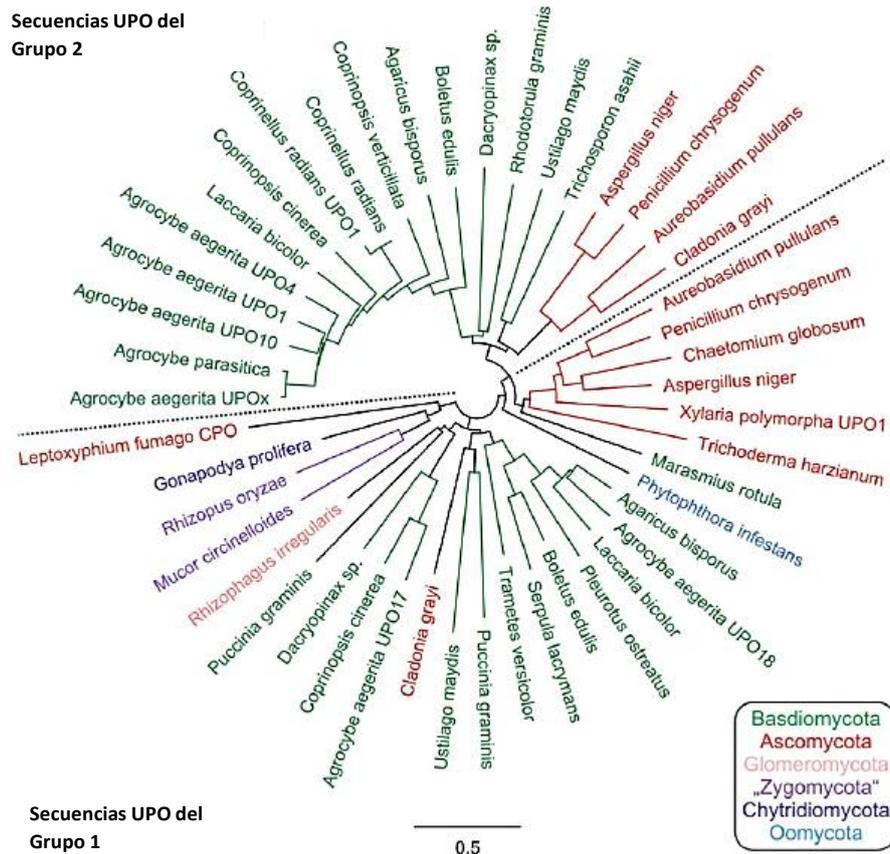


Figura 8. Análisis filogenético de posibles secuencias UPO y su relación con la clasificación taxonómica de sus respectivos hongos a nivel de phylum. En 2015 un capítulo publicado por Hofrichter y colaboradores mostraron una primera diferenciación entre UPOs largas y cortas (las cuales a grandes rasgos consisten de longitud de secuencia, motivos alfa-hélice a la entrada del túnel y conformación del N-terminal) y un estudio filogenético esperando encontrar relaciones evolutivas entre sus hongos correspondientes. Sin embargo, dicha relación evolutiva entre especies no se observó. Adicionalmente, cabe mencionar que para la construcción del presente dendrograma, las secuencias no fueron curadas antes de su análisis. Imagen tomada de Hrycay & Bandiera, 2015.

Búsqueda y caracterización de nuevas UPOs

Aunque en principio es posible obtener variantes de AaeUPO que catalicen reacciones de forma más eficiente o adicionales ya sea mediante evolución dirigida o diseño racional, esto tiene un límite. En ese sentido, desde 2011 se ha venido investigando nuevas enzimas UPO en diferentes hongos filamentosos, de modo que a la fecha se ha comprobado experimentalmente la existencia de 12 UPOs de las cuales 9 han sido plenamente descritas (mencionadas en la tabla 1.), y han sido capaces de catalizar reacciones novedosas y con elevados niveles de especificidad en muchos casos, siendo las principales las mencionadas en la tabla 4. Si bien algunas de estas enzimas no lograron ser obtenidas de forma nativa, fueron expresadas de forma recombinante con éxito tras tomar secuencias de genes hipotéticos anotados en bases de datos de genomas fúngicos, evidenciando experimentalmente que participan en reacciones de peroxigenación que utilizan sustratos complejos o en reacciones donde no se ha logrado adecuados niveles de estéreo o regioselectividad por métodos convencionales de síntesis. Estos trabajos, algunos

exploratorios, han tenido como parte de sus objetivos la búsqueda de una potencial aplicación biotecnológica para este grupo de enzimas. Por su parte, las reacciones más interesantes y/o novedosas desde el punto de vista químico son ilustradas en la Figura 9.

Si bien no se tiene ningún proceso industrial comercial registrado de producción de algún compuesto que implique el uso de estas enzimas, no se descarta que, en el corto o mediano plazo y dada la tendencia de “química verde”, estas enzimas sean activamente incorporadas al mercado y/o en la producción de moléculas biológicamente activas.

Tabla 4. Reacciones representativas que son catalizadas por UPOs diferentes a AaeUPO y que esta no puede catalizar o que lo hace con muy baja eficiencia.

Enzima	Sustrato o sustratos	Producto mayoritario	Tipo de reacción	Km (μM)	kcat (s^{-1})	kcat/Km ($1/\text{M}\cdot\text{s}$)	Referencia
MroUPO	Colesterol Ergosterol sitosterol	Derivados oxidados e hidroxilados	Oxidación de esteroides	—	—	—	Ullrich et al. 2018
MroUPO	Di-C14 C10	Ácidos grasos derivados (n-i)	Alfa-oxidación de ácidos grasos	557 703	32 293	966.7 7000	Olmedo et al. 2017
MweUPO	Colesterol Ergosterol sitosterol	Derivados oxidados e hidroxilados	Oxidación de esteroides	—	—	—	Ullrich et al. 2018
CglUPO	Isoforona	4-hidroxiisoforona 4-ketoisiforona	Hidroxilación selectiva de 4-hidroxiisoforona	309	4.4	$14.2 \cdot 10^3$	Aranda et al. 2019
CglUPO	Testosterona	4,5-beta-epóxido de testosterona	Hidroxilación y epoxidación de testosterona	0.0165	0.26	$1.6 \cdot 10^3$	Kiebist et al. 2017
CciUPO	Ácidos grasos varios	Ácidos grasos hidroxilados	Oxidación de compuestos alifáticos	—	—	—	Gutierrez et al. 2013
HinUPO	Isoforona	4-hidroxiisoforona 4-ketoisiforona	hidroxilación selectiva de 4-hidroxiisoforona	633	42.0	$66.4 \cdot 10^3$	Aranda et al. 2019
CraUPO	VA ; BA ; ABTS ; DMP ; Naftaleno	Derivados oxidados o hidroxilados	Hidroxilación de naftaleno y brominación de compuestos	88 635 49 342 584	34 176 123 2 15	$3.86 \cdot 10^5$ $2.77 \cdot 10^5$ $2.51 \cdot 10^6$ $5.85 \cdot 10^3$ $2.57 \cdot 10^4$	Ahn et al. 2007

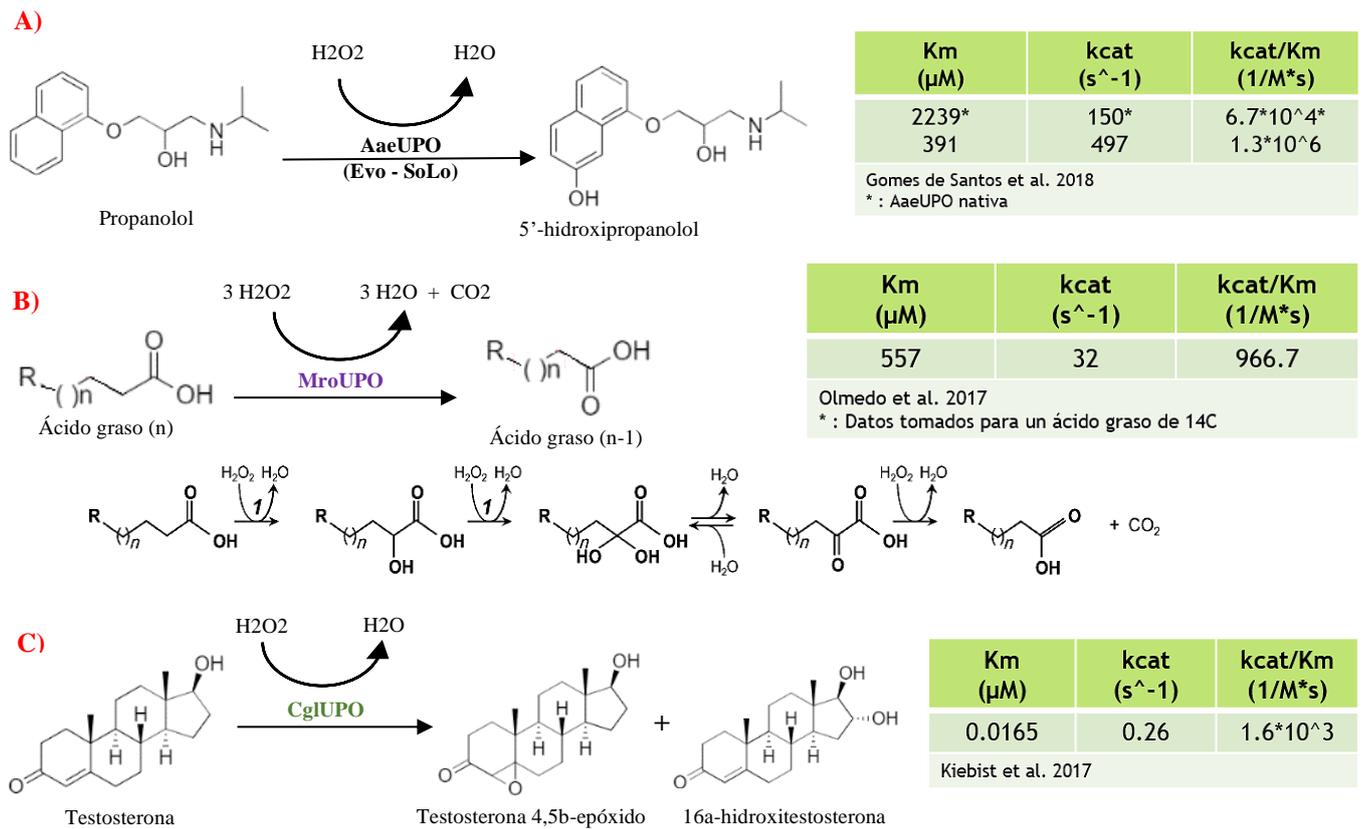


Figura 9. Algunas reacciones únicas catalizadas sobre sustratos particulares, químicamente demandantes, catalizadas por UPOs. **A)** Diferencia parámetros cinéticos entre AaeUPO nativa y AaeUPO sometida a evolución dirigida (SoLo). **B)** Reacción de alfa oxidación de ácidos grasos catalizada por la UPO de *Marasmius rotula*. **C)** Reacción de epoxidación e hidroxilación de testosterona por parte de la UPO de *Chaetomium globosum*.

Expresión de UPOs en sistemas heterólogos

Si bien recientemente se ha explorado la expresión heteróloga de UPOs en sistemas bacterianos con relativo éxito, como ha sido el caso de la UPO de *Psathyrella aberdarensis* (PabUPO) (Kimani et al. 2019), históricamente se ha tenido mayor éxito al emplear sistemas fúngicos ya que estas enzimas requieren modificaciones postraduccionales y glicosilación para ser estables en el medio en que se encuentren.

Estas enzimas pueden ser expresadas satisfactoriamente en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* empleando los vectores de expresión integrativos del tipo pPICZ α (Molina-Espeja et al. 2015). Aunque esto permite mejorar aspectos en la producción de UPOs en biorreactor, el uso de un plásmido integrativo resulta poco práctico al momento de realizar investigaciones relacionadas a ingeniería de proteínas en las que se requiere evaluar múltiples mutaciones a lo largo del gen codificante. Por esta razón fue necesaria la implementación de nuevos vectores de expresión en levaduras, como fue el caso del vector pJRoc30.

Originalmente desarrollado por la compañía Novozymes™, el vector pJRoC30 (Figura 10) es un vector de expresión episomal de tipo shuttle que cuenta con un gen de resistencia a ampicilina (criterio de selección en bacterias) y el gen URA3, fundamental para síntesis de uracilo por parte de cepas de levadura que tienen interrumpida esta vía metabólica (Criterio de selección en levaduras, por ejemplo: *Saccharomyces cerevisiae* Hansen - ATCC:BJ5465). La producción de proteínas recombinantes está gobernada por el promotor de galactosa.

Este vector ha sido particularmente utilizado en la expresión de lacasas fúngicas y de UPOs por parte del grupo de investigación conformado por Alcalde y colaboradores debido a que, entre otras cosas, este plásmido puede ser utilizado en técnicas de mutagénesis sitio dirigida por métodos poco convencionales de tipo saturación de combinaciones, destacándose el método de *in-vivo* overlap extensión (IVOE) (Alcalde et al. 2007).

Si bien a la fecha han sido estudiados experimentalmente unas cuantas enzimas UPO, la diversidad teórica de este grupo de enzimas contenidas en genomas fúngicos es mucho mayor. Múltiples secuencias de UPOs hipotéticas están actualmente depositadas en bases de datos como la del GenBank pero carecen evidencia experimental que respalde su funcionalidad. En ese sentido, el presente estudio busca ampliar el conocimiento respecto a las UPOs, por medio de la expresión y caracterización de nuevas enzimas de este grupo.

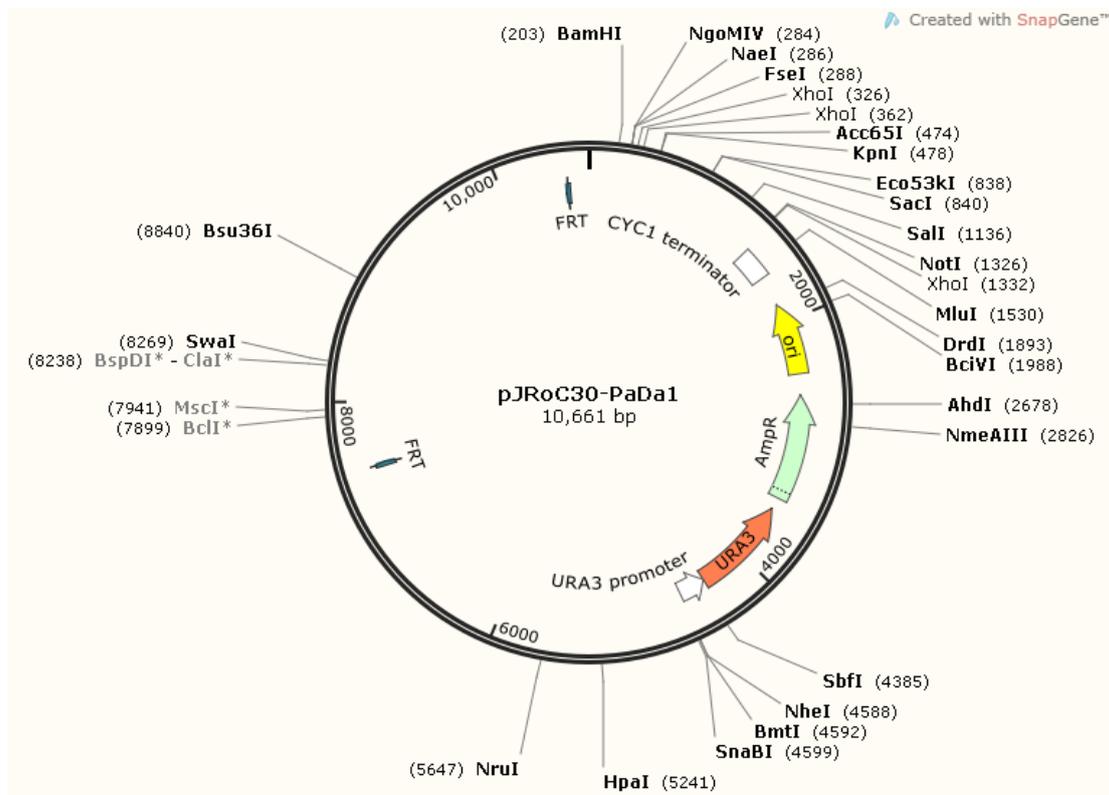


Figura 10. Mapa del vector pJRoC30. Se presenta conteniendo el gen correspondiente a PaDa1 delimitado por los sitios de restricción Xho1 (1332) y BamH1 (203). Estos sitios de restricción, junto con el sitio Not1 (1326) son los que normalmente se utilizan para clonar en este plásmido.

HIPÓTESIS

La correcta disposición de motivos conservados y de los residuos que componen el túnel, en el modelo por homología para enzimas UPO hipotéticas, permitirá reconocer y expresar nuevas UPOs funcionales.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar y caracterizar los productos de genes correspondientes a UPOs hipotéticas encontrados en genomas de hongos, priorizados en función a la disposición teórica de motivos conservados y propiedades del túnel, con respecto a AaeUPO.

Objetivos específicos

- ▶ Priorizar secuencias de UPOs hipotéticas con criterios estructurales y de identidad de secuencia, tomando como referencia a la UPO de *Agrocybe aegerita* (AaeUPO)
- ▶ Analizar *in silico* las propiedades del túnel de las secuencias seleccionadas, a través de modelamiento y simulaciones.
- ▶ Comprobar si los genes seleccionados codifican para UPOs funcionales por medio de su expresión heteróloga en levadura y ensayo de actividad oxidasa/peroxigenasa sobre los sustratos clave ABTS, NBD y Guaiacol.

METODOLOGÍA

Búsqueda de nuevas secuencias UPO codificantes y potencialmente funcionales

Obtención de secuencias hipotéticas codificantes para UPOs funcionales.

Se descargaron las secuencias aminoacídicas correspondientes a UPOs hipotéticas a partir de los códigos de acceso NCBI (National Center of Biotechnology Information) propuestos en el artículo publicado por Faiza y colaboradores en 2019. Las secuencias de aminoácidos que no se encontraron directamente disponibles en la base de secuencias de proteínas de este portal fueron obtenidas por medio del uso de la herramienta tBLASTn, tomando el genoma anotado del hongo de referencia. Se consideraron exclusivamente UPOs cuyo templatado propuesto en el estudio de Faiza y colaboradores haya sido AaeUPO y carecieran de evidencia experimental a la fecha. Las secuencias propuestas para integrantes de las subfamilias de UPOs 2 y 3, POG peroxigenasas y CPO fueron excluidas del presente estudio por presuntamente poseer predominantemente la actividad de halogenasa (Faiza et al. 2019), así como la secuencia de *Glarea lozoyensis* por no encontrarse actualmente disponible en GenBank.

Análisis de secuencia primaria

En primer lugar, se realizó un alineamiento por subfamilias (Faiza et al. 2019) y posteriormente se realizó el análisis de los residuos situados en las posiciones equivalentes a los residuos que integran el túnel de la UPO de *Agrocybe aegerita*, información tomada de la descripción de dicha enzima realizada por Ramirez y colaboradores en 2020 (Ramirez et al. 2020). Se utilizó la herramienta WebLogo® para ilustrar de forma gráfica la secuencia consenso por subfamilia para dichas posiciones.

Tomando como referencia a Faiza et al. 2019, se confirmó la presencia de motivos conservados clave para la catálisis: EGD, PCP, P-P-P, RXXXXXXE.

Generación de modelos *in-silico* por homología

Se empleó el programa SwissModel® (Expasy™) para proponer un modelo generado por homología para las diferentes UPOs seleccionadas y tomando como referencia la estructura de la UPO de *Agrocybe aegerita* (PDB: 2YP1). Se continuó el estudio con aquellas secuencias en las que su modelo presentó el sitio activo integrado por el grupo hemo debidamente unido al motivo PCP, un átomo de magnesio formando interacciones polares con los residuos del motivo EGD, y el par catalítico RXXXXXXE debidamente dispuesto. Así mismo, se tomaron en consideración los valores de QMEAN (Qualitative Model Energy ANalysis) y Z score calculados por el software como indicadores de la calidad de los modelos generados. Estos valores pueden ser interpretados respectivamente como el resultado de una función compuesta que describe los aspectos geométricos principales de la estructura del modelo propuesto, y como una estimación de qué tan comparable es el modelo respecto a estructuras experimentalmente sustentadas del mismo

tamaño depositadas en el PDB (Benkert et al. 2007; Benkert et al. 2011). Fueron priorizadas secuencias cuyos modelos presentaron valores de QMEAN > -4, y un Z score < a 2.

Inspección visual del túnel y análisis de residuos que integran el túnel

Los residuos que integran el túnel de acceso al sitio activo para cada caso se determinaron por medio de un análisis de superficies que partió desde la cavidad catalítica (delimitada por los residuos presentes en la vecindad del grupo hemo) y continuó hacia el exterior del modelo haciendo uso del software Pymol® (Schrodinger™). Estos fueron comparados tanto con la secuencia consenso previamente obtenida mediante alineamiento múltiple de secuencias por subfamilia, como con los residuos correspondientes a túnel de AaeUPO.

En lo que respecta a los túneles, se analizó que efectivamente haya conexión entre la cavidad catalítica y la superficie de la proteína, su conformación y disposición espacial, los aminoácidos que los componen y cómo se agrupan a lo largo del túnel (aromáticos, hidrofóbicos, cargados y otros). Aquellas secuencias cuyos modelos presentaron túneles con mayor similitud respecto a AaeUPO fueron priorizadas para su ensayo experimental y enviadas a sintetizar a la compañía Integrated DNA Technologies™ (IDT), optimizando el uso de codones para *S. cerevisiae* e introduciendo sitios de corte con enzimas de restricción: BamHI - 3' y XhoI / NotI - 5'.

Clonamiento de UPOs hipotéticas y transformación en *E. coli* DH5α

Preprocesamiento de genes UPO y del vector pJRoC30

Los genes seleccionados fueron originalmente insertados por el fabricante en el plásmido pUCIDT (pUCIDT-GmaUPO, pUCIDT-SstUPO y pUCIDT-UmaUPO), resistente a ampicilina. Los diferentes plásmidos conteniendo los genes de interés fueron transformados en la cepa de *E. coli* DH5α mediante el método de transformación por choque térmico descrito por Inoue y colaboradores en 1990 (Inoue et al. 1990) (Ver Anexo 1).

El vector pJRoC30 (Shuttle vector, URA3, Amp(r) - episomal en *Saccharomyces cerevisiae*), fue proporcionado por el Dr. Miguel Alcalde del CSIC, España, conteniendo la secuencia codificante para la enzima PaDa-1 (plásmido pJRoC30-PaDa1). Previo al clonamiento de los genes de interés, se realizó el colapso del sitio XhoI sobre el plásmido pJRoC30-PaDa1 de modo que un segmento mayoritario del gen PaDa1 fue removido, generando el plásmido denominado como pJRoC30-Clpso, el cual fue transformado también en *E. coli* DH5α. El plásmido pJRoC30-Clpso fue posteriormente utilizado también como control negativo en las diferentes pruebas de PCR (Ver Anexo 1).

Se seleccionó una colonia transformante de *E. coli* correspondiente a cada uno de los diferentes plásmidos pUCIDT y al vector pJRoC30-Clpso para ser cultivada en 25ml de caldo LB + Amp para posteriormente purificar los plásmidos mediante el kit Zymo Plasmid Miniprep® (ZymoResearch®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo 1). La calidad y concentración del DNA extraído fueron evaluadas espectrofotométricamente en NanoDrop® y/o mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% - TAE.

Clonamiento de genes UPO en el vector pJRoC30 y selección de colonias recombinantes

Los plásmidos correspondientes a las UPOs hipotéticas fueron sometidos a doble digestión seriada con las enzimas de restricción XhoI y BamHI (Anexo 1), modificando las condiciones sugeridas por el fabricante (ThermoScientific®).

Los fragmentos resultantes tras la digestión fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% - TAE. Las bandas del peso molecular correspondientes a los productos de doble digestión, inserto y vector, fueron purificados mediante el kit Zimoclean™ Gel DNA recovery (ZimoResearch®), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración del material purificado fueron evaluadas espectrofotométricamente en NanoDrop® y/o mediante electroforesis en gel de agarosa.

Los productos de digestión purificados fueron sometidos a ligación mediante ligasa T4, empleando una relación molar de 9:1 inserto – vector, en dos reacciones separadas partiendo 100ng de vector. El buffer ligasa T4 fue 1X, y 5U de ligasa T4. La mezcla se incubó 2 horas a 22°C. Los productos de ambas reacciones fueron purificados y concentrados en 20µl empleando el kit PCR Clean-UP (Qiagen®). Se emplearon 10µl de cada producto purificado en su transformación por choque térmico (5µl c/u) en la cepa de *E. coli* DH5α de acuerdo al procedimiento descrito. La selección de colonias transformantes se realizó mediante PCR de colonia (ver Anexo 1).

Las colonias transformantes seleccionadas fueron cultivadas en LB + Amp (100 µg/ml) para posteriormente extraer los plásmidos recombinantes con el kit Zimo Plasmid Miniprep® (ZimoResearch®) a partir de la biomasa contenida en 25ml de cultivo en saturación. La concentración e integridad del plásmido purificado fueron evaluadas espectrofotométricamente en NanoDrop®. La conformidad e integridad de la secuencia insertada fue verificada mediante secuenciamiento, empleando para ello los primers RMLN-Nu4 (5' – CTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCG – 3'), y RMLC (5' - GGGGGAGGGCGTGAATGTAAGC – 3') (Anexo 1).

Transformación de las construcciones en *S. cerevisiae* BJ5465

El plásmido extraído, purificado y verificado fue utilizado para transformar la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, teleomorph (ATCC - BJ5465) mediante el método de acetato de litio, de acuerdo a las instrucciones del kit de transformación proporcionado por SigmaAldrich - ThermoFisher® (ver Anexo 1). Dado que esta cepa de levadura como tal es URA3(-), las cepas transformantes con el plásmido pJRoC30 verán reestablecida la vía sintética de uracilo y serán seleccionadas en medio mínimo carente de uracilo (Anexo 2). Se eligieron las colonias transformantes que generaron mayor biomasa al cabo de un tiempo de incubación de 48h a 28 °C para estudios posteriores.

Expresión de UPOs hipotéticas en *S. cerevisiae* BJ5465

Producción de UPOs hipotéticas en sistema heterólogo y su concentración.

Dado que el vector pJRoc30 posee una región promotora correspondiente a GAL1, se requiere galactosa como fuente de carbono e inductor en el medio de expresión (Anexo 2).

El preinóculo fue elaborado tras sembrar un volumen de 5ml de medio SC-Rafinosa en un matraz de 25 ml e incubarlo a 28 °C durante 48h a 220 rpm. A partir de este se preparó el cultivo inóculo, el cual consistió de 50ml de medio SC-rafinosa en un matraz convencional de 250 ml y una OD₆₀₀ inicial = 0.25, que fue incubado a 28-30 °C durante 8 horas hasta lograr una OD₆₀₀ final = 1. El medio de cultivo de expresión suplementado con galactosa como inductor y FeCl₃ (Anexo 2) fue de un volumen de 100 ml dispuesto en un matraz bafleado de 500 ml, y fue incubado a 28 – 30 °C y 220 rpm durante 72 horas, partiendo de una biomasa inicial OD₆₀₀ = 0.1. El esquema correspondiente a esta etapa se presenta en la Figura 11.

La colecta del medio libre de células se realizó tras un paso de centrifugación a 10000 rpm en un rotor JA-14 durante 20 minutos y a 4 °C del total del cultivo para cada una de las UPOs ensayadas. La biomasa fue descartada en todos los casos. Las proteínas presentes en sobrenadante fueron concentradas mediante un paso de ultrafiltración en una membrana Amicon® con un cut-off de 30 kDa y cambio a buffer de fosfatos de potasio pH = 7, 50 mM.

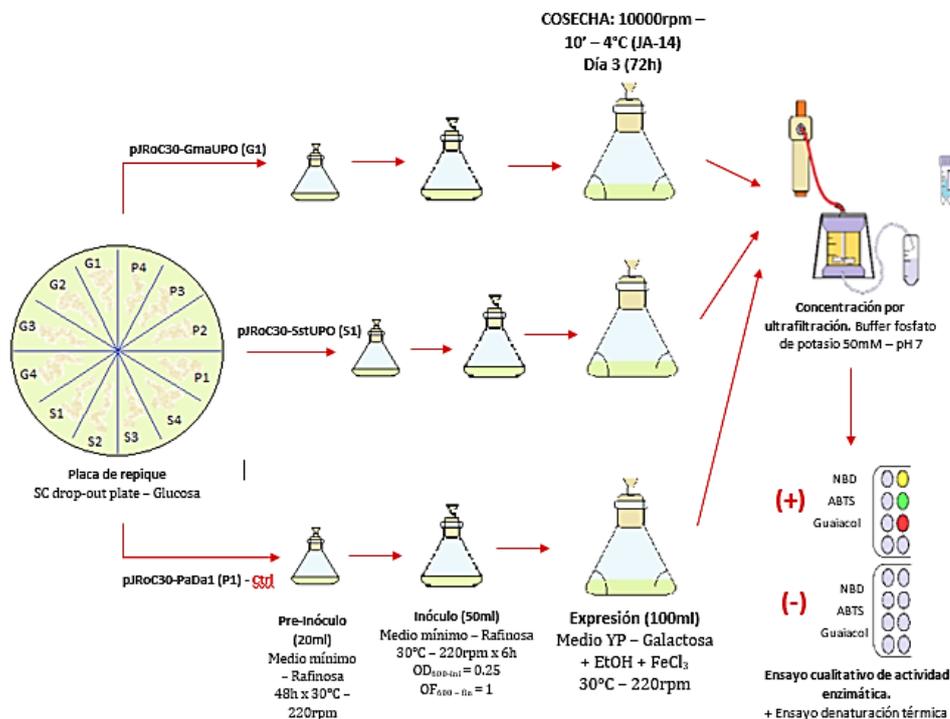


Figura 11. Esquema general del ensayo de expresión de UPOs hipotéticas en *S. cerevisiae* BJ5465. Los experimentos fueron diseñados con la finalidad de probar la expresión y funcionalidad de los genes de UPOs hipotéticas a evaluar en el presente estudio. La estrategia general consistió en la cosechar el cultivo a las 72 h, centrifugar y concentrar el volumen total del sobrenadante mediante ultrafiltración en Amicon (30 kDa cut-off), seguido de ensayo cualitativo de actividad enzimática sobre NBD, ABTS y Guaiacol.

Ensayos de actividad enzimática sobre NDB, ABTS y Guaiacol.

Ensayos de actividad sobre ABTS

Este ensayo mide la actividad peroxidasa. Está basado en cuantificar el producto de oxidación del ABTS, como resultado de la remoción de un electrón y consecuente formación de un radical libre, según se presenta en la figura 12. El ensayo de actividad se llevó a cabo en condiciones ácidas utilizando un buffer fosfato/citrato a pH 4.3 y 10 mM, ABTS 0.3 mM (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico) y peróxido de hidrógeno a una concentración final de 2mM. Se midió el cambio de absorbancia por minuto ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) a una longitud de onda de 418 nm ($\epsilon=36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) de acuerdo a la metodología seguida por Molina-Espeja et al. 2014.

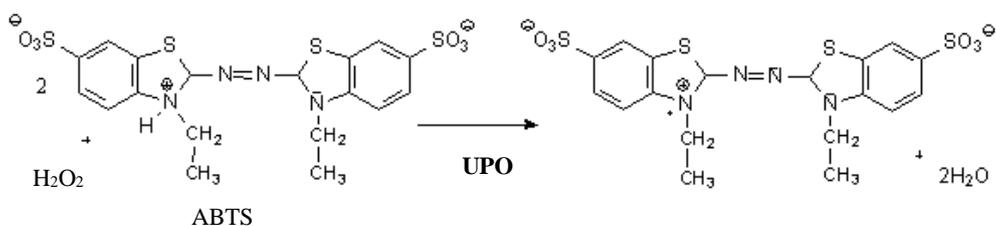


Figura 12. Reacción de peroxidación catalizada por una UPO sobre ABTS.

Actividad sobre NBD

Este ensayo mide la actividad peroxigenasa, una reacción de transferencia de dos electrones, y es específico de enzimas UPO. Está basado en la hidroxilación enzimática de un éter y su posterior degradación para formar 4-nitrocatecol; la reacción general se presenta en la figura 13. La actividad sobre NBD (5-nitro-1,3-benzodioxol) se midió empleando buffer de fosfatos de potasio 50 mM – pH 7, NBD 0.5 mM en 10% de acetonitrilo y H_2O_2 a 1 mM. El NBD es primero hidroxilado y después por una reacción de naturaleza no enzimática es hidrolizado a 4-nitrocatecol y ácido fórmico, siendo el primero cuantificable espectrofotométricamente a 425 nm ($\epsilon=9700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El progreso de la reacción se siguió minuto a minuto con la finalidad de determinar la actividad (Porajkobielska et al. 2012).

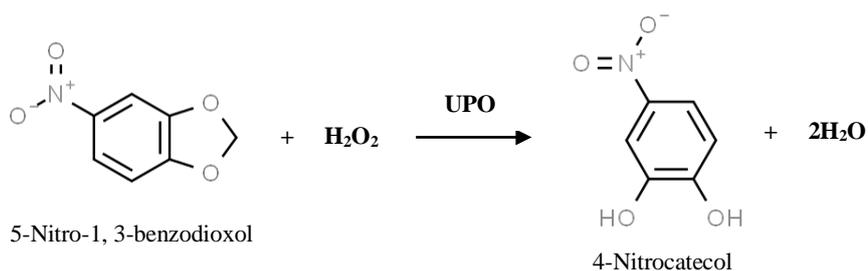


Figura 13. Reacción de peroxigenación catalizada por una UPO sobre NBD.

Actividad sobre Guaiacol (G-OH)

Este ensayo mide la actividad peroxidasa. El guaiacol es un fenol susceptible de perder un electrón en presencia de la enzima, formando radicales libres capaces de formar 3,3'-dimetoxi-4,4'-dihidroxibisfenil, que posteriormente es oxidado para formar 3,3'-dimetoxi-4,4'-bisfenolquinona, un compuesto cuya aparición puede seguirse espectrofotométricamente a 470 nm ($\epsilon=26600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Doerge et al. 1997). La reacción

general se presenta en la figura 14. En este ensayo no es necesario que el guaiacol ingrese propiamente dicho a un sitio activo por lo que es el ensayo típico de peroxidasas sin túnel. El medio de reacción empleado consistió de buffer de fosfatos de potasio 60 mM – pH 6, G-OH 5 mM y H₂O₂ 1mM.

Todas las reacciones enzimáticas previamente descritas fueron realizadas en un volumen de 1 ml y a 25°C (temperatura ambiente).

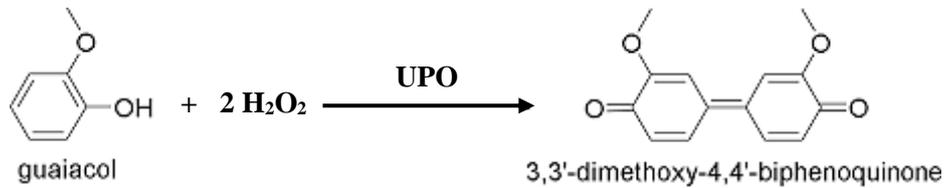


Figura 14. Reacción de peroxidación catalizada por una UPO sobre guaiacol.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Búsqueda de posibles nuevas secuencias UPO codificantes y funcionales

Obtención de secuencias hipotéticas a UPOs funcionales.

Las secuencias hipotéticas a estudiar fueron tomadas a partir del estudio realizado por Faiza y colaboradores en 2019 donde, luego de aplicar métodos bioinformáticos dirigidos al análisis filogenético, evolutivo y de funcionalidad teórica de secuencias correspondientes a UPO hipotéticas presentes en genomas de 812 especies de hongos depositadas en bases de datos de genomas ensamblados, se propuso 35 secuencias potencialmente codificantes de UPOs funcionales. Este estudio es el único a la fecha en el que se analizan bases de datos completas de genomas en búsqueda de nuevas UPOs. Dado que se cuenta en el laboratorio con un sistema optimizado para la expresión de la UPO de *Agrocybe aegerita*, ésta fue la enzima utilizada como modelo y control en el presente estudio.

Esta enzima también fue utilizada por Faiza et al. 2019 para proponer las 35 secuencias hipotéticas más probables, de modo que optó por explorar secuencias de UPOs cuyo análisis realizado en ese estudio haya tomado como templado a AaeUPO y cuyo organismo de origen fuese un hongo basidiomiceto que forme micelio propiamente dicho ya que a la fecha del estudio son el tipo de UPOs cuya producción ha tenido éxito en el sistema utilizado en el presente estudio, prescindiéndose de 9 secuencias. Con la intención de explorar la diversidad funcional se prescindió también de secuencias correspondientes a UPOs que a la fecha poseen evidencia experimental. Así mismo, se prescindió de secuencias correspondientes a genomas fúngicos no disponibles en bases curadas GenBank, descartando así 2 secuencias adicionales. Así mismo, y de acuerdo a lo planteado por Faiza y colaboradores respecto a las subfamilias UPO, fueron omitidas del análisis para el presente estudio las subfamilias 2 y 3 debido a tener presuntamente actividad mayoritariamente halogenasa, lo cual no quiere decir que no sea interesante explorar su funcionalidad en un futuro. De esta manera, se continuó el estudio con 17 secuencias que son presentadas en la tabla 5.

Tabla 5. Primera acotación de secuencias codificantes a UPOs hipotéticas a partir del estudio de Faiza et al. 2019.

Nombre del organismo	Subfamilia	Código
<i>Agaricus bisporus</i> (AbiUPO)	1	EKM83318
<i>Hebeloma cylindrosporus</i> (HciUPO)	1	KIM43689
<i>Piloderma croceum</i> (PcrUPO)	1	KIM85662
<i>Fibulorhizoctonia</i> sp. (FibuUPO)	1	KZP09816
<i>Ustilago maydis</i> (UmaUPO)	5	KIS69141
<i>Sphaerobolus stellatus</i> (SstUPO)	1	KIJ40725
<i>Galerina marginata</i> (GmaUPO)	1	KDR72025
<i>Hypholoma sublaterium</i> (HsuUPO)	1	KJA15764
<i>Kalmanozyma brasiliensis</i> (KbrUPO)	5	EST07231
<i>Mixia osmundae</i> (MosUPO)	1	GAA97831
<i>Laccaria amethystine</i> (LamUPO)	1	KIK06072
<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i> (PspUPO)	4	OAG12657
<i>Phialocephala scopiformis</i> (PscUPO)	4	KUJ12795
<i>Tilletia walkeri</i> (TwaUPO)	1	OAJ19358
<i>Acidomyces richmondensis</i> (AriUPO)	4	KXL42501
<i>Tilletia controversa</i> (TcoUPO)	1	OAJ12013
<i>Phialocephala subalpina</i> (PsuUPO)	4	CZR67509

Priorización de secuencias UPO a estudiar

Se generaron modelos por homología para las 17 secuencias de UPOs hipotéticas tomando a AaeUPO (PDB: 2YP1) como templado. Luego se realizó un análisis de secuencia primaria en términos de identidad de secuencia para cada modelo respecto a AaeUPO. La primera observación realizada consistió en evaluar el QMEAN, dato calculado y proporcionado por el propio software SwissModel®. Se priorizaron aquellas secuencias que tuviesen un resultado de QMEAN > -4 ya que, este es un valor de la calidad general del modelo generado que indica la fiabilidad del mismo para poder realizar predicciones, siendo un valor inferior a -4 de muy mala calidad mientras que un valor superior a -2, fiable. Tomando en cuenta que en general este término se relaciona directamente con el porcentaje de identidad general y el porcentaje de cobertura, era de esperarse que aquellas secuencias con menor porcentaje de identidad fueran excluidas, siendo 6 en total y pertenecientes mayoritariamente a la subfamilia 4. Estos resultados se presentan en la tabla 6.

Si bien este procedimiento no es infalible, nos permitió reducir el universo de secuencias a estudiar con un enfoque conservador. Esto deja la posibilidad de que alguna de las secuencias que no fueron tomadas en realidad codifiquen UPOs funcionales.

Tabla 6. Priorización de secuencias en función a QMEAN. Las secuencias presentadas en celdas sombreadas fueron descartadas en esta etapa debido a que su modelo posee un QMEAN < -4.

*: Basidiomicetos

** : Ascomycetos.

UPO hipotética	Subf.	QMEAN	Identidad de secuencia (%)
PsuUPO**	IV	-7.04	32.18
MosUPO*	I	-6.44	20.26
PscUPO**	IV	-5.93	34.31
AriUPO**	IV	-4.81	33.61
KbrUPO*	V	-4.78	36.54
PspUPO**	IV	-4.54	36.92
UmaUPO*	V	-3.75	35.00
FibuUPO*	I	-2.64	55.76
TwaUPO*	I	-2.49	56.78
TcoUPO*	I	-2.4	55.21
HsuUPO*	I	-2.26	63.84
SstUPO*	I	-2.13	66.56
PcrUPO*	I	-1.82	54.11
LamUPO*	I	-1.76	67.08
HciUPO*	I	-1.74	62.93
GmaUPO*	I	-1.49	71.52
AbiUPO*	I	-1.36	65.74

A continuación, las secuencias restantes fueron priorizadas en función de su porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a AaeUPO, siendo exclusivamente para la subfamilia I descartadas aquellas secuencias cuyo porcentaje de identidad se encuentre fuera del rango de 60 – 80%. Esto se hizo debido a que se buscó una UPO

similar pero no idéntica a AaeUPO con la finalidad de evitar posibles problemas de expresión de levadura (*S. cerevisiae*), pero que tampoco sea una molécula muy diferente.

Como se determinará posteriormente en este estudio, los criterios de priorización empleados tomaron la información obtenida de los modelos generados y no solo la secuencia primaria de las UPOs hipotéticas para esta etapa dado que un análisis solamente de secuencia primaria no es suficiente para realizar predicciones acerca del túnel de acceso al sitio activo.

Dado que otro de los propósitos del estudio es la exploración de UPOs novedosas, se decidió conservar la secuencia correspondiente a la UPO de *Ustilago maydis* (UmaUPO) como miembro representante de la subfamilia V a pesar de contar con un bajo porcentaje de identidad respecto a AaeUPO. Este resultado se presenta en la tabla 7.

Tabla 7. Priorización de secuencias en función a su porcentaje de identidad respecto a AaeUPO.

UPO hipotética	Subfamilia	QMEAN	Identidad de secuencia (%)
GmaUPO	I	-1.49	71.52
LamUPO	I	-1.76	67.08
SstUPO	I	-2.13	66.56
AbiUPO	I	-1.36	65.74
HsuUPO	I	-2.26	63.84
HciUPO	I	-1.74	62.93
TwaUPO	I	-2.49	56.78
FibuUPO	I	-2.64	55.76
TcoUPO	I	-2.4	55.21
PcrUPO	I	-1.82	54.11
UmaUPO	V	-3.75	35.00

Las secuencias presentadas en celdas sombreadas, y correspondientes a la subfamilia I, fueron descartadas en esta etapa debido a que poseen un porcentaje de identidad de secuencia total respecto a AaeUPO fuera del rango 60 – 80%. Como UPO representante de la subfamilia V se decidió continuar el estudio con UmaUPO.

Análisis de residuos correspondientes al túnel de acceso al sitio activo:

Alineamiento múltiple de secuencias.

Los alineamientos múltiples realizados con las secuencias completas de aminoácidos son presentados en la sección de Anexos 3. Un análisis de los aminoácidos presentes en regiones no continuas pero que corresponden a las posiciones referenciadas en el túnel de AaeUPO nos indica que en caso de la subfamilia I es presuntamente posible generar una secuencia consenso representativa, cosa que no ocurrió con el resto de subfamilias probablemente porque el número de secuencias estudiadas fue menor o igual a 4, lo cual es poco para sustentar un juicio. En la figura 15 se ilustra esta observación por medio del software WebLogo® 3.7.4, a la vez que se presentan alineamientos representativos a las subfamilias de UPOs hipotéticas.

Los porcentajes de identidad respecto al consenso para los aminoácidos presuntamente en túneles de UPOs hipotéticas correspondientes a la subfamilia I fueron: HciUPO=100%

(18/18); TwaUPO=72.22% (13/18); AaeUPO=11/18 (61.11%); CciUPO 10/18 (55.56%); PcrUPO=10/18 (55.56%); TcoUPO=13/18 (72.22%); FibuUPO= 15/18 (83.33%); LamUPO=18/18 (100%); SstUPO= 18/18 (100%); HsuUPO=17/18 (94.44%) ; GmaUPO= 15/18 (83.33%); AbiUPO= 14/18 (77.78%). Los porcentajes de identidad respecto al consenso para los aminoácidos presuntamente en túneles de UPOs hipotéticas correspondientes a la subfamilia 4 fueron: PsuUPO = 90.9% (10/11); PscUPO= 100% (11/11); PspUPO= 81.81% (9/11); AriUPO=9/11 (81.81%). Los porcentajes de identidad respecto al consenso para los aminoácidos presuntamente en túneles de UPOs hipotéticas correspondientes a la subfamilia 5 fueron: KbrUPO = 100% (20/20); ColUPO = 70% (14/20); ManUPO = 90% (18/20); Uma= 95% (19/20); Ser= 95% (19/20). En la figura 10 se ilustra esta observación por medio del software WebLogo® 3.7.4, a la vez que se presentan alineamientos representativos a las subfamilias de UPOs hipotéticas.

Por otro lado, y para comprobar si realmente un alineamiento múltiple de secuencias como el mostrado en la figura 15 es confiable para predecir los residuos en el túnel, los modelos estructurales generados para las secuencias de UPOs hipotéticas fueron analizados en la región del túnel. Los residuos que los conforman son presentados en la tabla 8. Los residuos observados en los modelos fueron comparados en primer lugar con los residuos predichos por el alineamiento de secuencias múltiples, a la vez que fueron comparados con los residuos de AaeUPO tanto por identidad de aminoácidos como por el tipo de estos. La posición de dichos residuos en la secuencia primaria de cada UPO se presenta en la sección Anexo 4.

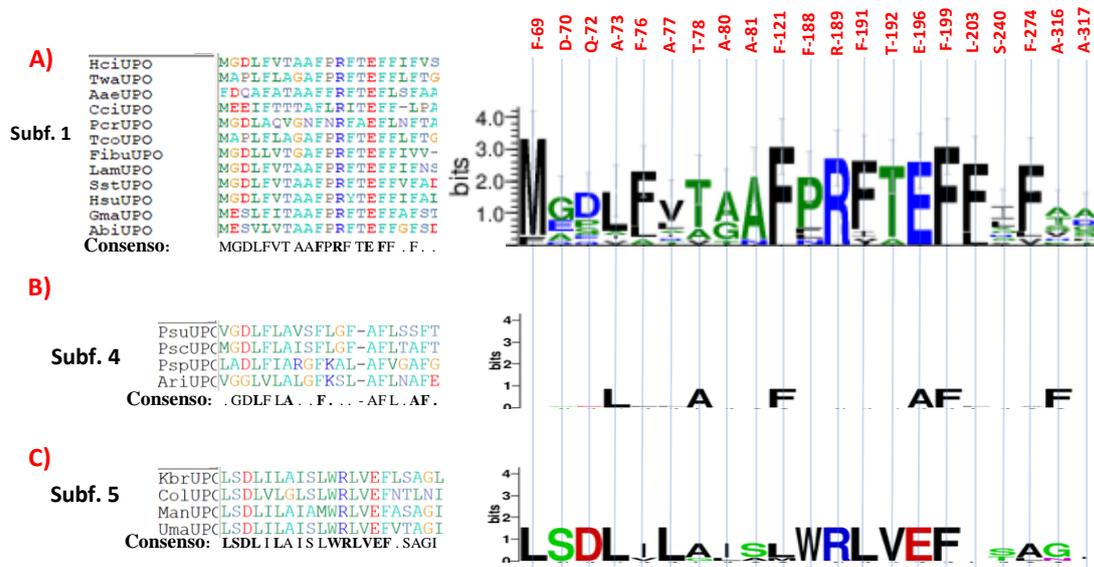


Figura 15. Aminoácidos que presuntamente integrarían los túneles de acceso a los sitios activos de acuerdo a análisis de secuencia primaria de UPOs hipotéticas agrupadas por subfamilia. Dada la cantidad de secuencias disponibles, solo se pudo preparar logos informativo con la secuencia consenso para las subfamilias 1 y 5. En la parte superior y en color rojo se indican los residuos correspondientes al túnel de AaeUPO (Ramirez et al. 2020). **A)** Alineamiento y logo de residuos correspondientes al túnel para la subfamilia 1. **B)** Alineamiento y logo de residuos correspondientes al túnel para la subfamilia 4. **C)** Alineamiento y logo de residuos correspondientes al túnel para la subfamilia 5.

Tabla 8. Análisis de residuos que conforman el túnel de las diferentes UPOs priorizadas. Leyenda de colores: Residuos aromáticos (rojo), residuos hidrofóbicos no aromáticos (negro), residuos polares (verde), residuos cargados (azul).

UPO hipotética	Subf.	Residuos del túnel en función de la comparación estructural de los modelos propuestos con AaeUPO	Residuos del túnel en función de un alineamiento múltiple (21aa)	% identidad del modelo respecto al Alin.	% Identidad respecto a AaeUPO
AaeUPO	I	FDQAFATAA FFRFTEFLS FAA 33.33% ; 33.33% ; 19.05% ; 14.29%	(21aa) FDQAFATAA FFRFTEFLS FAA 33.33% ; 33.33% ; 19.05% ; 14.29%	61.0	---
AbiUPO	I	MVALVAF FRFTA AEFFGL 52.94% ; 23.53% ; 11.76% ; 11.76%	(17aa) MESVLVTA AFPRFTEFFG FSD 28.57% ; 23.81% ; 28.57% ; 19.05%	58.8	50.0
GmaUPO	I	MESLFIT AFPRFTA EFFFS D 25% ; 30% ; 25% ; 20%	(20aa) MESLFIT AFPRFTEFFA FST 28.57% ; 28.57% ; 23.81% ; 14.29%	90.0	45.0
HsuUPO	I	MLAFVTA FYTYAE FLIFFS F 38.1% ; 38.1% ; 14.29% ; 9.52%	(21aa) MGDLFVTA AFPRYTEFFI FAL 38.1% ; 28.57% ; 19.05% ; 14.29%	61.9	47.62
HciUPO	I	MLAFVFR FTAAESIF TLDL 47.37% ; 21.05% ; 15.79% ; 15.79%	(19aa) MGDLFVTA AFPRFTEFFI FVS 28.57% ; 28.57% ; 28.57% ; 14.29%	50.0	44.44
SstUPO	I	MGDLFVTA AFPRFTA EFFGLFAN 34.78% ; 26.09% ; 26.09% ; 13.04%	(23aa) MGDLFVTA AFPRFTEFFV FAD 33.33% ; 28.57% ; 23.81% ; 14.29%	82.6	60.87
LamUPO	I	MLAFVTA FRFTA AEFFN 41.18% ; 29.41% ; 17.65% ; 11.76%	(17aa) MGDLFVTA AFPRFTEFFI FNS 28.57% ; 28.57% ; 28.57% ; 14.29%	82.4	64.71
UmaUPO	V	LLAILALGS VWRLVAYGESG FVTTPLSLD (29aa) 48.28% ; 10.34% ; 31.03% ; 10.34%	-----	---	13.79

Un análisis más fino de los residuos que integran el túnel de acceso al sitio activo en los modelos de las UPOs hipotéticas (tabla 8) mostró que las diferentes UPOs presentan diferencias en cuanto a los residuos que integran el túnel, así como la proporción y distribución de estos según su tipo.

Los residuos predichos por el simple alineamiento múltiple de secuencia para la subfamilia 1, la más representativa de este grupo de enzimas hipotéticas, no son consistentes con los residuos observados en los modelos tanto en cantidad como en tipo, presentando una identidad de residuos de entre 50 y 90%, valores obtenidos al comparar los residuos presentados en el alineamiento múltiple de secuencias con lo observado en los modelos conformacionales tras hacer un alineamiento estructural con AaeUPO, para cada UPO hipotética analizada. Una primera conclusión que se desprende hasta esta etapa es que el alineamiento simple de residuos correspondientes a las posiciones de los del túnel de AaeUPO no es suficiente para predecir los residuos que conformarían el túnel en una UPO hipotética.

Por su parte, el porcentaje de identidad de los residuos que componen el túnel en los diferentes modelos respecto a AaeUPO es de entre 50 y 64.71%, lo cual quiere decir que

los modelos predicen amplias diferencias en el tipo de residuos que integran los túneles respecto a AaeUPO y que ello seguramente se verá reflejado en su arquitectura y funcionalidad.

Algo importante en este punto es que tras realizar un nuevo alineamiento múltiple esta vez con los residuos que integran los túneles de los modelos de las diferentes UPOs (Figura 16) no fue posible obtener un consenso fiable dado que este solo cubrió 12 de las 25 posiciones correspondientes a residuos en la secuencia de túnel más extensa. Si bien una cobertura de 12/25 residuos es poco, no quiere decir que sea bueno o malo debido a que uno de los propósitos del presente trabajo era evaluar UPOs novedosas, lo cual implica la búsqueda de túneles diferentes.

Al comparar los entre 20 y 25 aminoácidos que conforman los túneles se observa que algunos se conservan. Notoriamente, y como era esperado, se conservan los residuos catalíticos R y E correspondientes a las posiciones 189 y 196 en AaeUPO. Por su parte, se conservan también dos residuos de F correspondientes a las posiciones 76 y 191 en AaeUPO, lo cual podría tratarse incluso de una firma de la subfamilia. En un trabajo publicado por nuestro grupo (Ramirez et al. 2020), se demostró que el rol de estas F es mantener la topología del túnel y si son reemplazadas el túnel adquiere flexibilidad. El rol de otros residuos conservados como la metionina, un aminoácido susceptible a oxidarse, está pendiente de estudio.

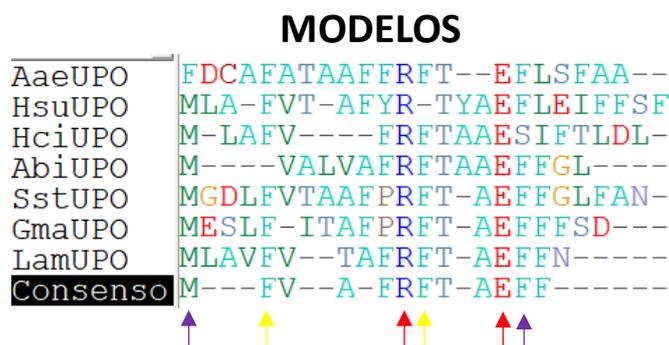


Figura 16. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas correspondientes a los túneles observados en los modelos generados por homología. Los residuos analizados corresponden a posiciones no continuas en las secuencias sino que componen el túnel en las diferentes UPOs hipotéticas. En flechas rojas se remarcan los residuos correspondientes al par ácido-base catalíticos, en amarillo los residuos correspondientes a las posiciones 76 y 191 en la AaeUPO responsables de dar arquitectura al túnel, y en flechas moradas se marcan residuos presuntamente importantes para la estabilidad de la cavidad catalítica (Ver Figura 20).

Vista de los túneles de acceso al sitio activo

Los diferentes modelos estructurales fueron inspeccionados visualmente en búsqueda de un túnel de acceso al sitio activo que conecte el solvente con la cavidad catalítica de forma ininterrumpida, confirmando en primer lugar la existencia del mismo. Aquellos túneles que presentaron obstrucciones (perdida de continuidad en algún punto de su superficie que impida la conexión propiamente dicha entre la superficie de la proteína y el grupo

hemo de la cavidad catalítica) o bifurcaciones (dos sitios de entrada al sitio activo desde el solvente) fueron considerados atípicos.

Una visualización frontal de los túneles (figura 17), mostró que los modelos estructurales de HsuUPO y HciUPO presentan obstruido el túnel mientras que los modelos propuestos para las otras secuencias no. Una visualización transversal de los diferentes modelos en la que se destaca la vista de la superficie del túnel (figura 18), permitió observar diferentes arquitecturas para estos. Tomando como referencia el túnel de AaeUPO, algunos de los modelos generados para las diferentes secuencias UPO fueron atípicos en el sentido de que presentaron bifurcaciones (AbiUPO) u obstrucción (HciUPO y HsuUPO) (figura 19). Ya que hasta este momento se han señalado diferencias grandes, no se espera haber cometido una apreciación errónea. No obstante, para un análisis cuantitativo más riguroso sí sería necesario el uso de herramientas bioinformáticas más sofisticadas dirigidas a medir el volumen propiamente dicho de la cavidad.

Una vista detallada de la disposición de motivos conservados importantes para la catálisis (PCP, EGD y RXXXXXXE) (figura 20), mostró que éstos estarían ordenados espacialmente de la forma esperada. Por su parte, y en función a la disposición de residuos hidrofóbicos/aromáticos importantes para la estabilización del hemo (Phe-69, Phe-121 y Phe-199 en AaeUPO), los modelos generados podrían clasificarse en aquellos modelos en los que el grupo hemo se encuentra presuntamente estabilizado por 3 Phe (Fig. 20.A), 2 Phe (Fig. 20. B) y 1 Phe (Fig. 20.C); en este sentido, las UPOs descritas experimentalmente al momento presentan o 3 o 2 residuos de Phe presuntamente estabilizando al grupo hemo al interior de la cavidad catalítica, en ningún caso hasta el momento se tiene un caso en el que haya solo 1 o ningún residuo de Phe.

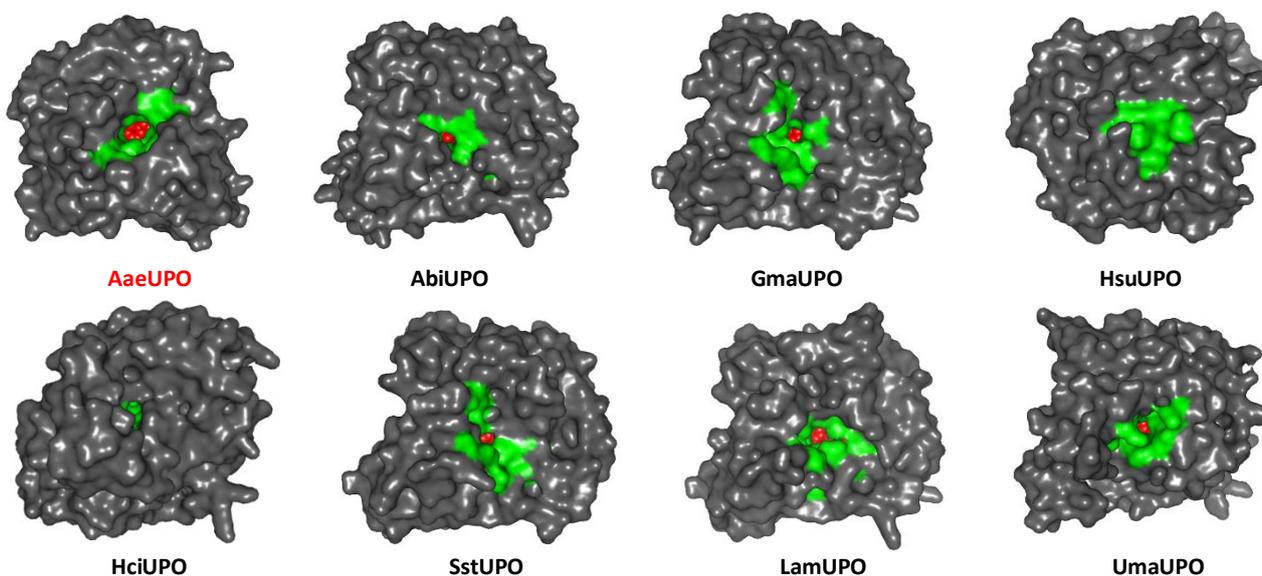


Figura 17. Entrada del túnel de acceso al sitio activo para las diferentes UPOs modeladas. Con referencia a AaeUPO, se eligió como característica favorable aquellos modelos que presenten un túnel que conecte al grupo hemo, coloreado en color rojo. En color verde se presenta la superficie correspondiente a los residuos que integran el túnel.

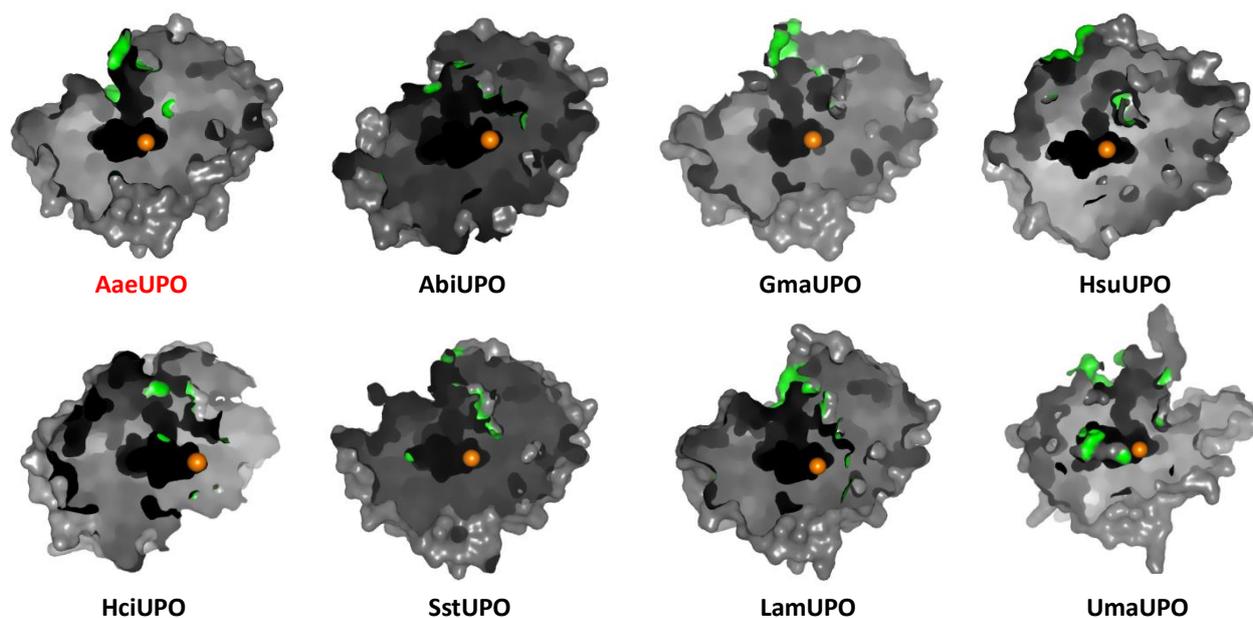


Figura 18. Vista interna de la estructura propuesta para las diferentes UPOs, destacando el túnel y posición del ión Mg⁺². Con referencia a AaeUPO, se eligió como característica favorable aquellos modelos que presenten un túnel no interrumpido desde el interior de la cavidad catalítica con el exterior.

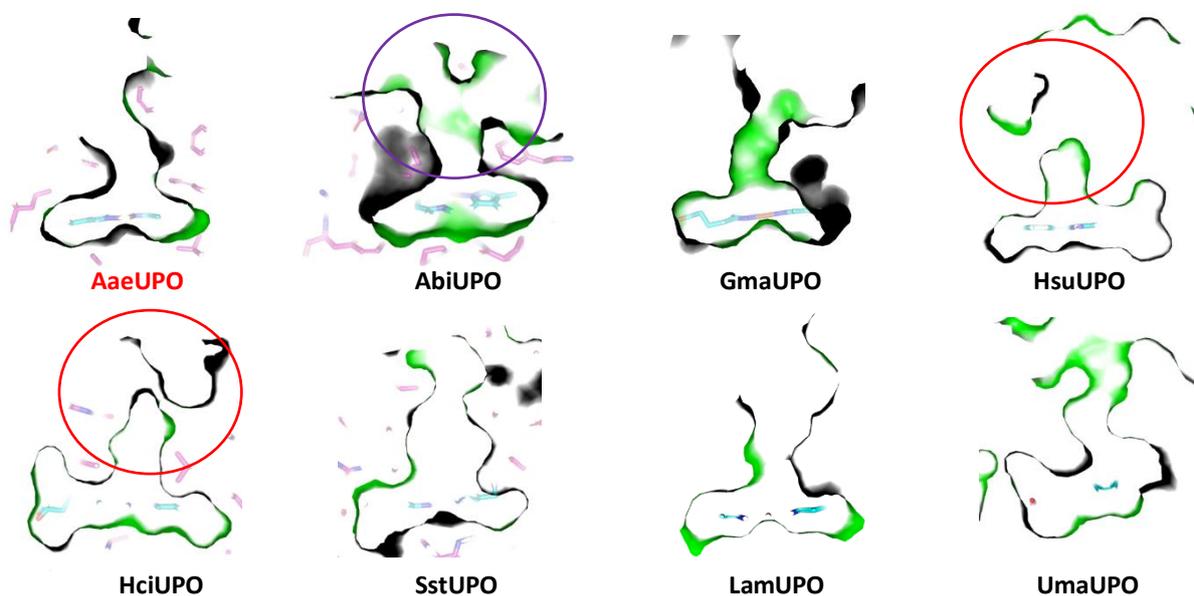


Figura 19. Detalle de la superficie del interior de los túneles de las estructuras propuestas para las diferentes UPOs. Con referencia a AaeUPO, se eligió como característica favorable aquellos modelos que presenten un único túnel que conecte el exterior con el interior de la cavidad catalítica. Esta imagen en 2D es el resultado de un análisis más exhaustivo en 3D.

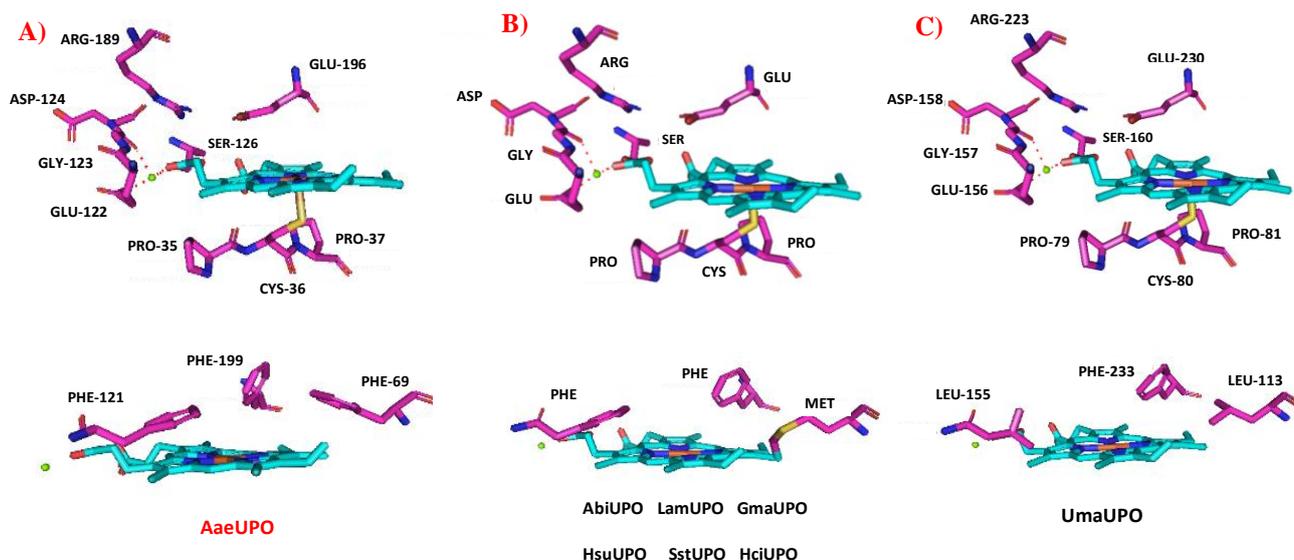


Figura 20. Visualización de los residuos correspondientes a los motivos PCP, EGC y RXXXXXXE presentes en las estructuras propuestas para las diferentes UPOs. Con referencia a AaeUPO, se eligió como característica favorable aquellos modelos que presenten en la posición correspondiente los residuos exactos correspondientes a los motivos mencionados, así como 4 enlaces de coordinación al ión Mg^{+2} . **A)** Disposición de los residuos en la enzima de referencia AaeUPO; se disponen 3 residuos de PHE en la cavidad catalítica. **B)** Disposición de los residuos en los modelos generados para UPOs hipotéticas de la subfamilia 1; se disponen 2 residuos de PHE en la cavidad catalítica y 1 de MET. **C)** Disposición de los residuos en los modelos generados para UmaUPO (Subf. 5); se disponen 1 residuos de PHE y 2 de LEU en la cavidad catalítica.

Disposición de los residuos que conforman el túnel de acceso al sitio activo

Se estudió la disposición espacial de los residuos antes presentados en la tabla 8, no encontrándose un patrón específico para la disposición de estos.

En el caso de HsuUPO, la obstrucción previamente observada en el túnel se debe a la disposición mayoritaria de residuos aromáticos a la entrada del mismo (Figura 21). Esto podría relacionarse con que quizá haya mayor afinidad por residuos hidrofóbicos o que la enzima hipotética simplemente no sea funcional, a reserva de que posteriormente se genere evidencia experimental que verifique o refute esta hipótesis. En el caso de HciUPO, no se observó tendencia alguna o agrupación por tipo de residuo en alguna sección del túnel (Figura 21) pero sí un pequeño bloqueo a la entrada; si bien de acuerdo a lo previamente establecido esto constituye una obstrucción, es muy pequeña y la propia naturaleza del análisis empleado deja caber también la posibilidad de que se trate de un artefacto del modelo. Una alternativa para tratar de explorar *in-silico* si es o no el caso de un artefacto es relajar la estructura y permitir su movilidad mediante herramientas de dinámica molecular por tiempos mayores a 100ns para así poder detectar posibles movimientos a nivel de cadena principal y en el túnel; no obstante, la mejor manera de probar esta hipótesis sería medir experimentalmente la actividad y especificidad de esta enzima.

Para AbiUPO se obtuvo la predicción de un túnel bifurcado, es decir, un túnel que desemboca en dos cavidades orientadas al solvente; con la información disponible no hay

forma de predecir si esto será ventajoso o perjudicial para la enzima en términos de eficiencia catalítica por algún sustrato en particular.

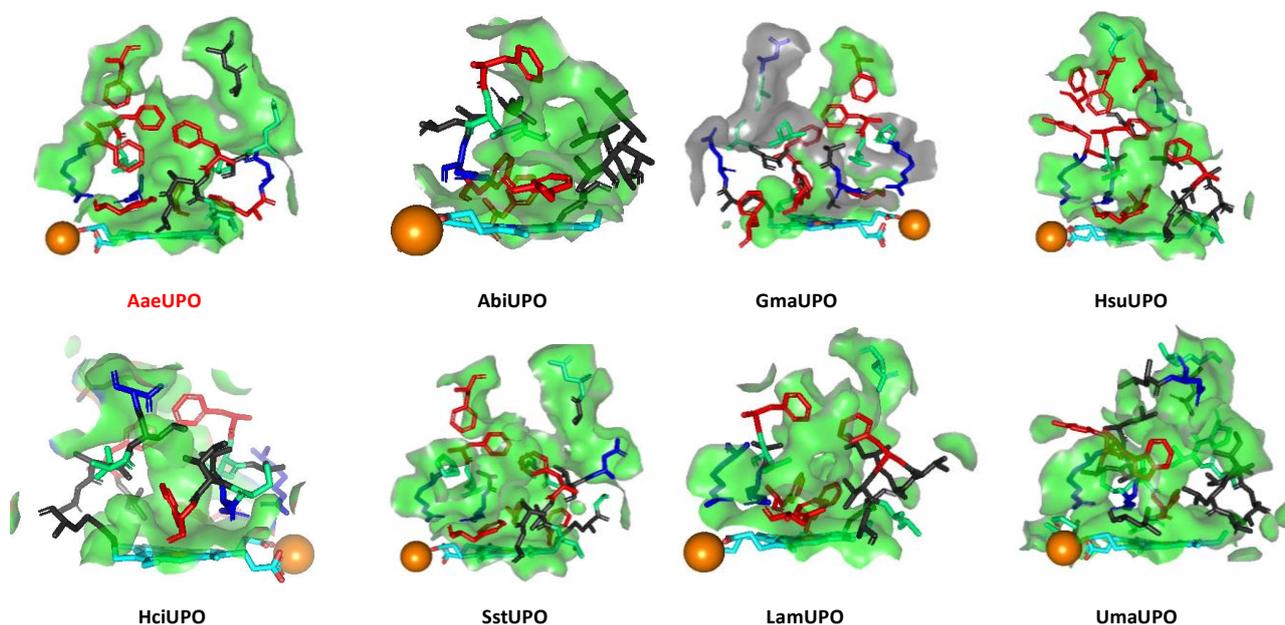


Figura 21. Visualización de residuos que conforman el túnel de los modelos estructurales generados para las diferentes UPOs hipotéticas analizadas. Leyenda de colores: Residuos aromáticos (Rojo), residuos hidrofóbicos no aromáticos (negro), residuos polares (verde), residuos cargados (azul). El detalle de estos residuos se presenta en la table 8.

Una comparación gruesa de la proporción de los residuos que conforman los túneles (Figura 22) agrupados por su tipo muestra que estos no tienen una tendencia definida o que sea unánimemente compartida. Entonces, en esta etapa del análisis, cualquier secuencia cuyo modelo sea afín a la estructura de AaeUPO en términos de la estructuración del túnel hipotéticamente podría ser activa, cosa que tendría que ser corroborada experimentalmente casi con seguridad mediante su expresión heteróloga.

Los modelos propuestos hasta el momento permiten predecir que, aunque HsuUPO y AbiUPO pudieran ser correctamente expresadas y plegadas en *S. cerevisiae*, probablemente no serán funcionales o presentarán una actividad muy diferente a la exhibida por AaeUPO, cosa que también respondería al propósito del estudio de encontrar una UPO novedosa. No obstante, estas secuencias al presentar un túnel atípico y distinto al de AaeUPO pueden ser consideradas como “riesgosas” y por ende se decidió investigarlas como parte de un estudio independiente.

Tomando esto en consideración, y habiendo reducido el universo de secuencias a explorar experimentalmente a solo 4, se decidió que todas ellas eran igualmente adecuadas para iniciar la etapa experimental del estudio de modo que se eligieron por una parte las dos secuencias pertenecientes a la subfamilia 1 que presenten los mayores porcentajes de identidad y similitud estructural respecto a AaeUPO (GmaUPO y SstUPO), y al único representante de una subfamilia distinta que fue conservada hasta el final (UmaUPO).

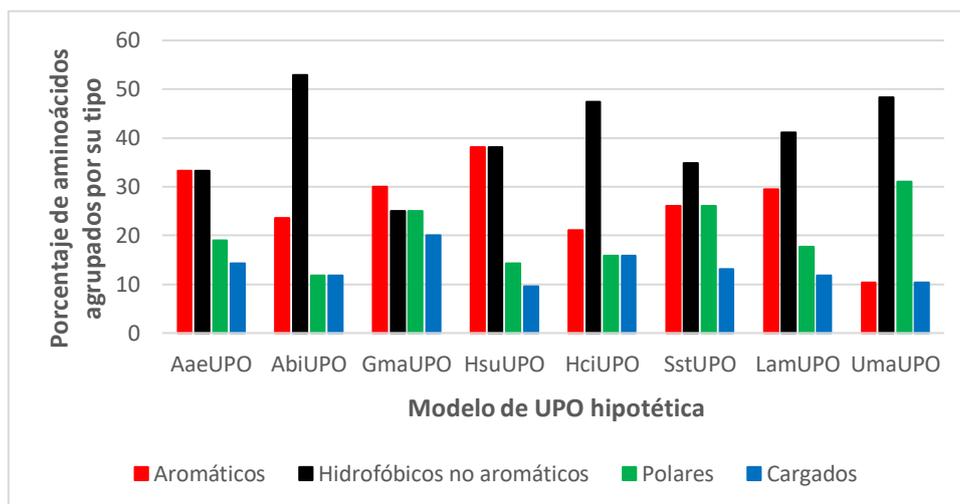


Figura 22. Comparación porcentual del tipo de residuos que integran el túnel de acceso al sitio activo para las secuencias UPO priorizadas. Una representación visual de los datos presentados en la tabla 8 permite observar que los diferentes modelos generados difieren en cuanto a la proporción de los tipos de residuos que integran el túnel.

Clonamiento de UPOs hipotéticas en *E. coli* DH5 α

Preprocesamiento de genes UPO y del vector pJRoC30

Se decidió por la síntesis de los genes correspondientes a GmaUPO, SstUPO y UmaUPO. Para la síntesis de las secuencias nucleotídicas se optó por optimizar los codones para su expresión en *Saccharomyces cerevisiae* y conservar el péptido señal original de cada secuencia puesto que estudios previos han demostrado experimentalmente que reemplazar el péptido señal no es una estrategia beneficiosa para la expresión heteróloga de estas enzimas, cosa que por sí mismo podría suponer un cuello de botella en el presente estudio. (Molina-espeja et al. 2014; Pérez, 2018).

Las secuencias fueron insertadas en el vector de clonamiento pUCIDT (2752pb), el cual confiere resistencia a ampicilina, para ser transformados en la cepa de *E. coli* DH5 α . La metodología propuesta para su transformación y los mapas de los plásmidos utilizados se presentan en el Anexo 1.

Durante los ensayos de clonamiento iniciales realizados de acuerdo a la metodología planteada en Anexos 1 se obtuvieron muchos resultados negativos, lo que planteó preguntas sobre la integridad del plásmido pJRoC30-PaDa1 y la mutagenicidad de la *E. coli* utilizada. Tras demostrar experimentalmente deficiencias en ambos elementos, se decidió continuar el estudio con una *E. coli* DH5 α , trabajar con una versión más primitiva del plásmido pJRoC30-PaDa1 y realizar un colapso del sitio de restricción Xho1 como preprocesamiento de este plásmido con la finalidad de retirar parte de la secuencia de PaDa1 (AaeUPO) que allí se encontraba, generando así el plásmido pJRoC30-Clpso (Anexo 1). La secuencia de la región procesada fue verificada por secuenciación. El plásmido pJRoC30-Clpso sirvió propiamente dicho como plásmido donador del vector de expresión y como control negativo en los ensayos de clonamiento (Figura 23) mientras que el propio plásmido pJRoC30-PaDa1, como control positivo.

Los diferentes plásmidos fueron transformados en *E. coli* DH5 α con la finalidad de propagarlos y posteriormente purificar, a partir de cultivos de 25ml, una cantidad superior a 5mg para cada uno de los diferentes plásmidos.

Clonamiento de genes UPO en el vector pJRoc30 y selección de colonias recombinantes.

Los plásmidos pUCIDT-GmaUPO, PUCIDT-SstUPO y pJRoc30-Clpso fueron procesados satisfactoriamente mediante la metodología propuesta y detallada en el Anexo 1. Se logró obtener los plásmidos recombinantes pJRoc30-GmaUPO y pJRoc30-SstUPO, según se presenta en la Figura 24, si bien el porcentaje de clonas exitosas obtenidas fue bajo (20 y 8.33% respectivamente). La secuencia y el marco de lectura de los genes insertados en el vector pJRoc30 fueron verificados mediante secuenciación. El plásmido correspondiente a UmaUPO no logró ser clonado en esta etapa.

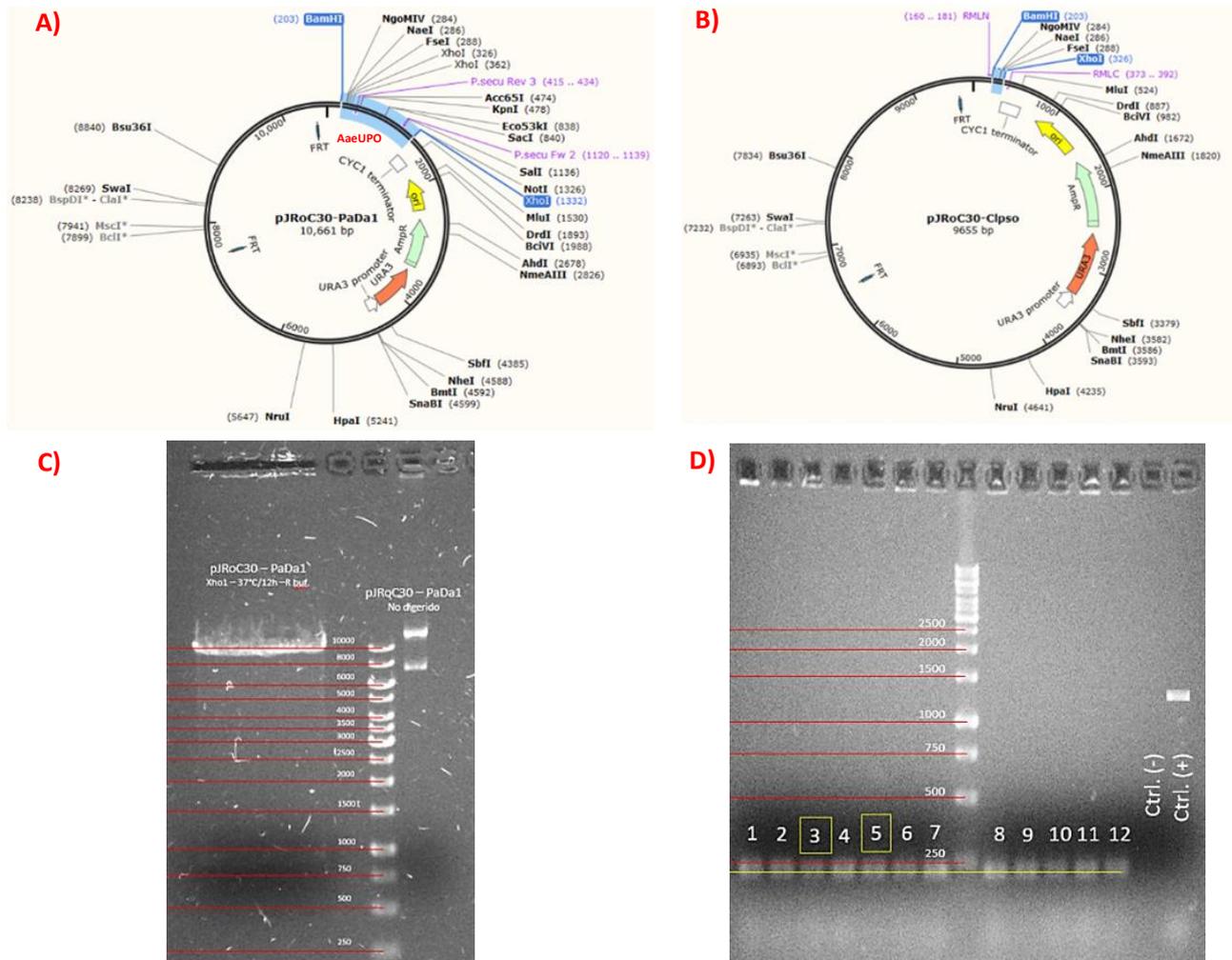


Figura 23. Preprocesamiento del plásmido pJRoc30-PaDa1. A) Mapa del plásmido pJRoc30-PaDa1. Se resalta la región correspondiente al gen codificante para AaeUPO. B) Mapa del plásmido pJRoc30-Clpso. Se resalta el fragmento residual correspondiente al gen codificante para AaeUPO. C) Digestión del plásmido pJRoc30 con XhoI. D) PCR de colonia tras la ligación y transformación mediante shock térmico en *E. coli* DH5 α . En todos los casos se verificó la pérdida de la mayor parte del gen correspondiente a AaeUPO. Se seleccionaron las colonias 3 y 5 para ensayos posteriores.

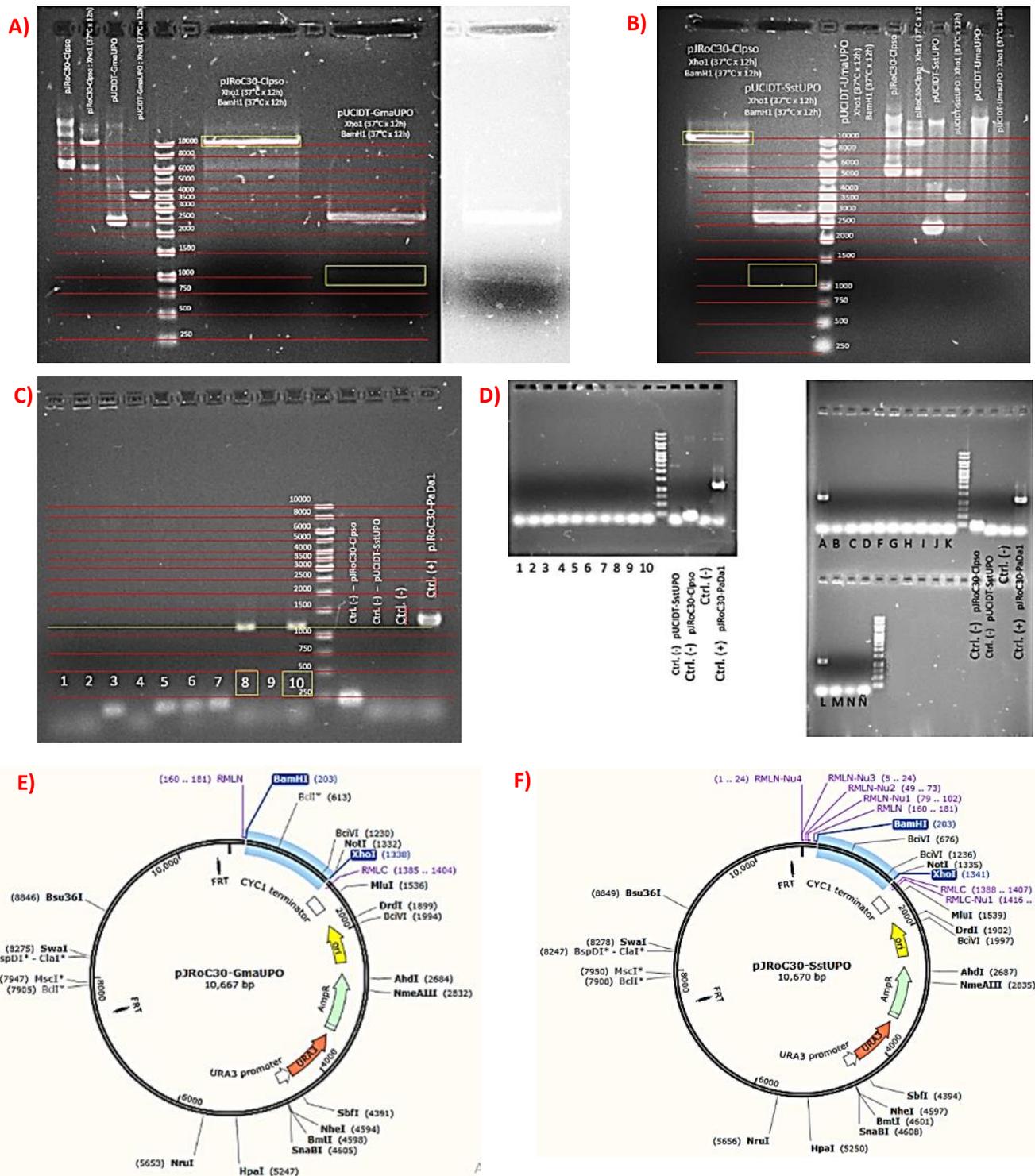


Figura 24. Clonamiento de los genes UPO en el vector pJRoc30. A) Doble digestión de los plásmidos pJRoc30-Clpso y pUCIDT-GmaUPO con las enzimas de restricción XhoI y BamHI. B) Doble digestión de los plásmidos pJRoc30-Clpso y pUCIDT-SstUPO con las enzimas de restricción XhoI y BamHI. El plásmido correspondiente a pUCIDT-UmaUPO no pudo ser procesado lamentablemente debido a degradación. C) Selección de colonias recombinantes pJRoc30-GmaUPO tras la ligación y transformación de los productos de digestión mediante PCR. D) Selección de colonias recombinantes pJRoc30-SstUPO tras la ligación y transformación de los productos de digestión mediante PCR. E) Mapa del plásmido recombinante pJRoc30-GmaUPO. Se resalta en celeste la región correspondiente al gen de GmaUPO. F) Mapa del plásmido recombinante pJRoc30-SstUPO. Se resalta en celeste la región correspondiente al gen de SstUPO.

Transformación de UPOs hipotéticas en *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465

Se realizó satisfactoriamente de acuerdo a lo planteado en la sección de protocolos, comprendida en la sección Anexos 1, obteniéndose un recuento >2400 UFC en las placas de transformación, y una eficiencia de transformación estimada >120 UFC/ng de plásmido (Figura 25). Las 4 colonias de mayor crecimiento fueron repicadas en placa, a la vez que se comprobó mediante tinción gram la naturaleza fúngica de las colonias seleccionadas.

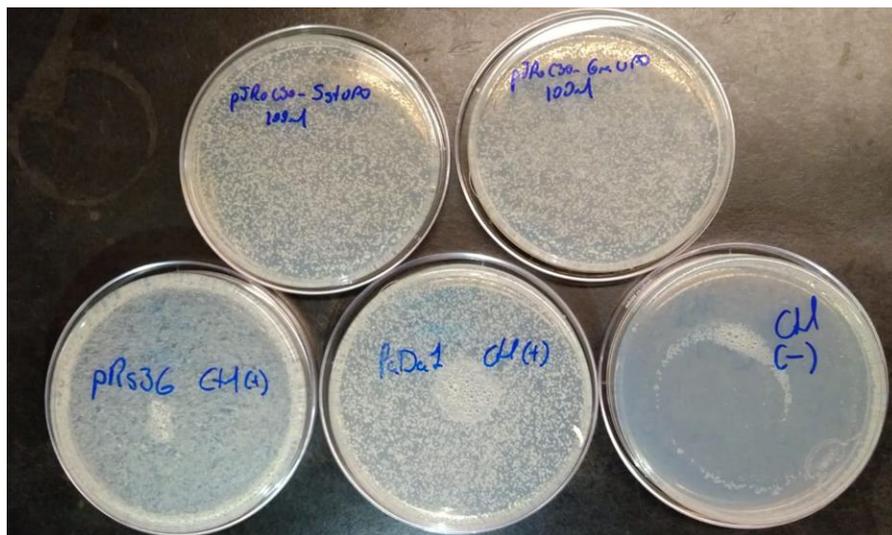


Figura 25. Transformación de los plásmidos recombinantes pJRoC30-GmaUPO, pJRoC30-SstUPO y pJRoC30-PaDa1 en *S. cerevisiae* BJ5465. A modo de control positivo de procedimiento se utilizó el plásmido pRs36, el cual fue proporcionado en el kit de transformación.

Expresión de UPOs hipotéticas en *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465

Ensayos de expresión de UPOs hipotéticas en sistema heterólogo

Estos ensayos de expresión se realizaron de acuerdo al esquema mostrado en la sección metodológica (Figura 11). Los factores de concentración (FC) alcanzados para cada caso tras la cosecha a las 72 horas de cultivo fueron de 15.36X para GmaUPO, 40.00X para SstUPO y 15.15X para PaDa1 y se logró mediante ultrafiltración en membrana Amicon® 30kDa cut-off y cambio a buffer fosfato de potasio pH7 – 50mM. Los factores de concentración fueron calculados tras dividir el volumen del medio de cultivo libre de células (volumen inicial) sobre el volumen del medio concentrado (volumen final). Este paso fue crítico ya que en función al estudio realizado en 2014 por Molina-Espeja y colaboradores en el cual se optimizó la producción volumétrica de AaeUPO (ABTS U/L) mediante evolución dirigida en el mismo sistema de expresión utilizado en este estudio, se tuvo que en condiciones iniciales la producción de AaeUPO es de apenas 2 U ABTS/L; en este sentido, era esperable una producción ínfima para cualquiera de las UPOs

ensayadas puesto que ello fue lo observado en estudios similares de expresión heteróloga de UPOs nativas en *S. cerevisiae*, y la razón de aplicar métodos de evolución dirigida con el propósito de maximizar su producción volumétrica (Molina-Espeja et al. 2014).

Los valores iniciales y finales de biomasa, medidos en densidad óptica para cada uno de los cultivos se presenta en la tabla 9.

Tabla 9. Valores de biomasa iniciales y finales medidos durante la producción de UPOs hipotéticas en el sistema heterólogo *S. cerevisiae* BJ5465.
FC: Factor de concentración.

Cultivo	OD ₆₀₀ inicial	OD ₆₀₀ final (72h)	FC
GmaUPO	0.160	41.52	15.36X
SstUPO	0.136	52.16	40.00X
PaDa1	0.114	48.92	15.15X

Ensayos de actividad enzimática sobre NDB, ABTS y Guaiacol.

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron por duplicado en tubos de ensayo. Como control interno de expresión se empleó el producto del plásmido pJRoC30-PaDa1 mientras que como control externo se empleó PaDa1 producida previamente por parte del laboratorio de Biocatálisis Redox (IBT- UNAM) en un estudio independiente. El control negativo consistió en la propia mezcla de reacción, pero en ausencia de biocatalizador.

Además, y de forma complementaria, se incluyó un ensayo de tratamiento térmico de 95°C durante 10 minutos con la finalidad de denaturar el biocatalizador producido ya que este debería ser de naturaleza proteica y termolábil, ayudando así a discriminar de la presencia de algún compuesto químico desconocido en el medio de reacción que permita la peroxidación de los sustratos y sirviendo como un control interno adicional de actividad.

Si bien ninguna de las reacciones observadas fue comparable en intensidad respecto al control positivo (PaDa1), sí se observó reacción tenue pero positiva para ABTS (Figura 26.A) por parte de SstUPO, mientras que la reacción para NBD no pudo ser detectada visualmente. Los mismos ensayos fueron repetidos esta vez por un método cuantitativo en el espectrofotómetro, pero no se logró obtener una medición legible tras 10 minutos de captura de datos para la reacción en ABTS para SstUPO. Los resultados de ello a modo de cálculo de unidades de actividad enzimática se presentan en el anexo 3.

Si bien los factores de concentración de los productos para GmaUPO y SstUPO fueron diferentes (15.36X y 40.00X respectivamente), se detectó actividad sobre ABTS (actividad peroxidasa) por parte de SstUPO pero no para GmaUPO, cosa que podría explicarse con la diferencia en factores de concentración entre GmaUPO y SstUPO, pero también deja la posibilidad de que GmaUPO no sería una enzima funcional mientras que SstUPO sí ya que la actividad peroxidasa sobre este sustrato es común a todas las enzimas UPO descritas hasta la fecha.

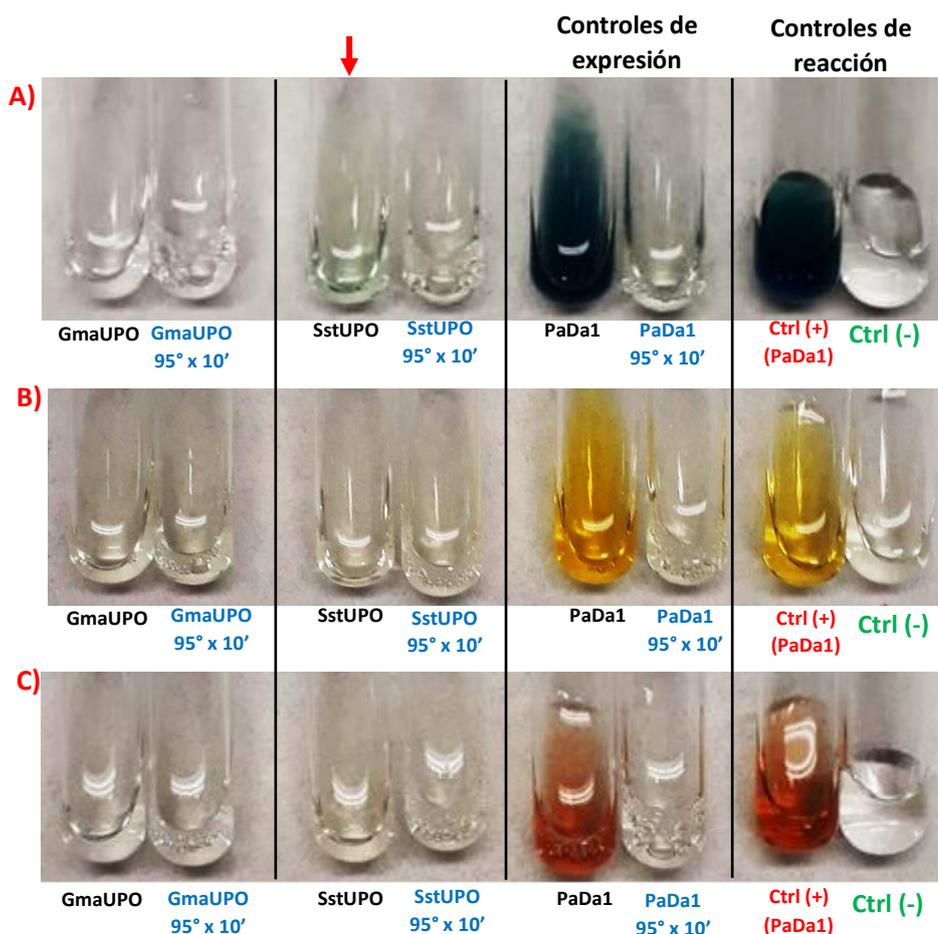


Figura 26. Ensayos cualitativos de actividad enzimática sobre ABTS, NBD y Guaiacol. Fotografías ilustrativas de los tubos tras 10 minutos de reacción a temperatura ambiente con cada uno de los sustratos, para cada uno de las enzimas producidas. **A)** Reacción con ABTS. **B)** Reacción con NBD. **C)** Reacción con Guaiacol.

Haber observado actividad sobre NBD (actividad peroxigenasa) hubiese sido muy deseable y concluyente respecto a la actividad peroxigenasa de SstUPO, pero no fue el caso. Una posible explicación, nuevamente, pudiera ser que la concentración de enzima producida fue tan baja que no pudo ser detectada actividad con este sustrato dado que, a pesar de que la reacción fue revisada a los 10, 30 minutos y 12 horas de incubación, no se detectó ningún progreso luego del minuto 10. Esta explicación puede apoyarse en que la reacción con ABTS, transferencia de 1 electrón, procede mucho más rápido respecto a la reacción con NBD, transferencia de 2 electrones, siendo los valores de eficiencia catalítica (kcat/Km) reportados para PaDa1 de $4.92 \cdot 10^5 \pm 3.59 \cdot 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ y $4.2 \cdot 10^4 \pm 5.94 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ respectivamente (Molina-Espeja et al. 2014); es decir, la reacción de peroxidación del ABTS es un orden de magnitud más eficiente que de la peroxigenación del NBD y por ende es mucho más sencilla de detectar incluso con bajas cantidades de biocatalizador.

Por otra parte, no es claro si se dio una reacción positiva o no para la peroxidación de guaiacol (actividad peroxigenasa) y esto sencillamente también podría ser explicado por la baja cantidad de enzima producida y lo cual, como ya se mencionó, era absolutamente esperable. La producción volumétrica de SstUPO no logró ser cuantificada

electroforéticamente en geles de poliacrilamida puesto que no se detectó banda alguna en correspondiente al peso molecular esperado, por lo que el resultado de actividad enzimática detectado es el único al momento que indicaría que probablemente la UPO de *Sphaerobolus stellatus* es una enzima funcional y puede expresarse satisfactoriamente en un sistema heterólogo de levadura.

Este experimento fue repetido de acuerdo a lo planteado en la figura 9 para SstUPO pero a una escala mayor (1L de medio), logrando un factor de concentración de x268 pero prolongando el tiempo de concentración del producto de 8 a 30 horas. Los resultados observados a pequeña escala no lograron ser replicados a mayor escala lo cual plantea preguntas adicionales respecto a estas novedosas enzimas y cuánto realmente se sabe de estas como grupo: ¿Necesariamente todas las UPOs serán igual de estables que AaeUPO? ¿Diferentes UPOs requieren diferentes condiciones para su concentración y purificación?, entre otras. Se requerirán estudios adicionales para dar respuesta a esta y otras interrogantes.

CONCLUSIONES

- Las herramientas *in-silico* son útiles para estudiar en detalle enzimas desconocidas, permitiendo hacer una selección de secuencias interesantes a reserva de la evidencia experimental que se genere posteriormente.
- A pesar de utilizar secuencias de UPOs muy similares a la de *Agrocybe aegerita*, los túneles predichos mediante modelado por homología pueden llegar a ser bastante diferentes y particulares, además de no ser consistentes en composición a lo predicho en un alineamiento simple de secuencia.
- La UPO hipotética correspondiente a *Sphaerobolus stellatus* (SstUPO), a reserva de una caracterización bioquímica detallada, puede expresarse en un sistema heterólogo de levadura y es funcional en términos de poder catalizar reacciones de peroxidación.

PERSPECTIVAS

- Explorar diferentes estrategias dirigidas a mejorar la producción y tiempo de concentración de la SstUPO a escala laboratorio.
- Clonar y expresar el gen correspondiente a la UmaUPO de acuerdo a la estrategia seguida en el presente trabajo.
- Explorar experimentalmente otras secuencias correspondientes a UPOs hipotéticas presentadas como candidatas a UPOs funcionales con alto porcentaje de identidad de secuencia a la AaeUPO.

REFERENCIAS

Alcalde M., Zumarraga M., Polaina J., Ballesteros A. y Pluo FJ. Combinatorial Saturation Mutagenesis by In Vivo Overlap Extension for the Engineering of Fungal Laccases. *Combinatorial Saturation Mutagenesis by in vivo Overlap Extension for the Engineering of Fungal Laccases. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening.* 2007. <https://doi.org/10.2174/138620706779026079>

Aranda C., Municoy M., Guallar V., Kiebish J., Scheibner K., Martínez A. y Gutiérrez, A. Selective synthesis of 4-hydroxyisophorone and 4-ketoisophorone by fungal peroxygenases. *Catalysis Science & Technology*, 2019. 9, 1398-1405. <https://doi.org/10.1039/c8cy02114g>

Anh D., Ullrich R., Benndorf D., Svatoš A., Muck A. y Hofrichter M. The coprophilous mushroom *Coprinus radians* secretes a haloperoxidase that catalyzes aromatic peroxygenation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. 73(17), 5477–5485. <https://doi.org/10.1128/AEM.00026-07>

Babot E., Del Rio J., Kalum L., Martinez A. y Gutierrez A. Oxyfunctionalization of Aliphatic Compounds by a Recombinant Peroxygenase From *Coprinopsis cinerea*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013. 110(9), 2323–2332. <https://doi.org/10.1002/bit.24904>

Benkert P., Tosatto S. y Schomburg D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins*. 2008. 71:261–277. <https://doi.org/10.1002/prot.21715>

Benkert P., Biasini M. y Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 2011. Vol. 27 (3), pages 343-350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>

Doerge D., Divi R. y Churchwell M. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. 1997. *Analytical biochemistry*. 250, 10–17. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2191>

Faiza M., Huang S., Lan D. y Wang Y. New insights on unspecific peroxygenases: superfamily reclassification and evolution. *BMC Evolutionary Biology* 2019. 19:76. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1394-3>

Gomes P., Can M., Tieves F., Younes S., Molina-Espeja P., Hofrichter M., Hollman F., Guallar V. y Alcalde M. Selective Synthesis of the Human Drug Metabolite 5' - Hydroxypropranolol by an Evolved Self-Sufficient Peroxygenase. *ACS Catalysis*. 2018. 8, 4789-4799. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b01004>

Gröbe G., Ullrich R., Pecyna M., Kapturska D., Friedrich S., Hofrichter M. y Scheibner K. High-yield production of aromatic peroxygenase by the agaric fungus *Marasmius rotula*. *AMB Express*, 2011, 1:31. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-31>

- Hobisch M., Haltman D., Gomes de Santos P., Alcalde M., Hollmann F. y Kara S. Recent developments in the use of peroxygenases – Exploring their high potential in selective oxyfunctionalisations. 2021. *Biotechnology Advances*. Volume 51, 107615. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107615>
- Hrycay E. G., & Bandiera S. M. Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015. (851), 341–368. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16009-2>
- Inoue H., Nojima H. y Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990. 96, 23–28. [https://doi.org/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/0378-1119(90)90336-P)
- Kiebitz J., Schmidtke K., Zimmermann J., Kellner H., y Jehmlich N. A Peroxygenase from *Chaetomium globosum* Catalyzes the Selective Oxygenation of Testosterone. *ChemBioChem* 2017. 18, 563–569. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600677>
- Kinne, M., Poraj-Kobielska, M., Ralph, S. A., Ullrich, R., Hofrichter, M., & Hammel, K. E. 2009. Oxidative cleavage of diverse ethers by an extracellular fungal peroxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43), 29343–29349. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.040857>
- Kluge M., Ullrich R., Scheibner K. y Hofrichter M. Spectrophotometric assay for detection of aromatic hydroxylation catalyzed by fungal haloperoxidase-peroxygenase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007. 75(6), 1473–1478. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0942-8>
- Kluge M., Ullrich R., Scheibner K. y Hofrichter M. Stereoselective benzylic hydroxylation of alkylbenzenes and epoxidation of styrene derivatives catalyzed by the peroxygenase of *Agrocybe aegerita*. *Green Chemistry*. 2012. 14(2), 440–446. <https://doi.org/10.1039/c1gc16173c>
- Martínez A., Ruiz-dueñas F., Camarero S., Serrano A., Linde D., Lund H., Vind J., Tovborg M., ... Alcalde M. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnology Advances*. 2017. 35(April), 815–831. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.06.003>
- Molina-espeja P., Cañellas M., Plou F., Hofrichter M., Lucas, F., Guallar, V. y Alcalde M. Synthesis of 1-Naphthol by a Natural Peroxygenase Engineered by Directed Evolution. *ChemBioChem*. 2016. 17, 341–349. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500493>
- Molina-espeja P., Garcia-ruiz E., Gonzalez-perez D., Ullrich R. y Hofrichter M. Directed Evolution of Unspecific Peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014. 80(11), 3496–3507. <https://doi.org/10.1128/AEM.00490-14>
- Molina-Espeja P., Ma S., Mate D., Ludwig R., y Alcalde M. Tandem-yeast expression system for engineering and producing unspecific peroxygenase. *Enzyme and Microbial Technology*. 73–74, (2015) 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.03.004>

Morris R., & Hager L. P. Chloroperoxidase. *Enzymology*. 1966. 241(8), 1763-1768.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)96701-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)96701-3)

Olmedo A., Del Río J., Kiebist J., Ullrich R., Hofrichter M., Scheibner K., Martinez A. y Gutierrez A. Fatty Acid Chain Shortening by a Fungal Peroxygenase. *Chemistry a European Journal. Biocatalysis*. 2017, 23, 16985–16989.
<https://doi.org/10.1002/chem.201704773>

Pecyna M., Ullrich R., Bittner B., Clemens A., Scheibner K., Schubert R. y Hofrichter M. Molecular characterization of aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 84(5), 885–897.
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2000-1>

Perez Forcado, Priscila. Oxidación de asfaltenos catalizada por una peroxigenasa fúngica versátil. Tesis de Maestría realizada en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM). Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. 2018

Peter S., Karich A., Ullrich R., Gröbe G., Scheibner K. y Hofrichter M. Enzymatic one-pot conversion of cyclohexane into cyclohexanone: Comparison of four fungal peroxygenases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014, 103, 47–51.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.016>

Peter S., Kinne M., Ullrich R., Kayser G., y Hofrichter M. Epoxidation of linear, branched and cyclic alkenes catalyzed by unspecific peroxygenase. *Enzyme and Microbial Technology*. 2013, 52(6–7), 370–376.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.02.013>

Piontek K., Strittmatter E., Ullrich R., Gröbe G., Pecyna M., Kluge M., Scheibner K., Hofrichter M. y Plattner D. Structural basis of substrate conversion in a new aromatic peroxygenase: Cytochrome P450 functionality with benefits. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, 288(48), 34767–34776.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.514521>

Poraj-kobielska M., Kinne M., Ullrich R., Scheibner K. y Hofrichter M. A spectrophotometric assay for the detection of fungal peroxygenases. *Analytical Biochemistry*. 2012, 421, 327–329.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.10.009>

Ramirez-Escudero M., Molina-espeja P., Gomez P., Hofrichter M., Sanz-Aparicio J. y Alcalde M. Structural Insights into the Substrate Promiscuity of a Laboratory-Evolved Peroxygenase. *ACS Chemical Biology*. 2018, 13, 3259-3268.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00500>

Ramirez-Ramirez J., Martin-Diaz J., Pastor N., Alcalde M. y Ayala M. Exploring the Role of Phenylalanine Residues in Modulating the Flexibility and Topography of the Active Site in the Peroxygenase Variant PaDa-I. *International Journal of Molecular Science*. 2020, 21, 5734.
<https://doi.org/10.3390/ijms21165734>

Sundaramoorthy M., Turner J. y Poulos T. The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure*, 1995, 3, 1367–1378.
[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00274-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00274-X)

Ullrich R. y Hofrichter M. The haloperoxidase of the agaric fungus *Agrocybe aegerita* hydroxylates toluene and naphthalene. 2005. *FEBS Letters*. Volume 579, Issue 27, 6247-6250.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.014>

Ullrich R., Nuske J., Scheibner K., Spantzel J. y Hofrichter M. Novel Haloperoxidase from the Agaric Basidiomycete *Agrocybe aegerita* Oxidizes Aryl Alcohols and Aldehydes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. 70(8), 4575–4581.

<https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4575>

Ullrich R., Dolge C., Kluge M. y Hofrichter M. Pyridine as novel substrate for regioselective oxygenation with aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *FEBS Letters*. 2008. 582(29), 4100–4106.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.006>

Ullrich R., Poraj-Kobielska M., Scholze S., Halbout C., Sandvoss M., Pecyna M., Scheibner K. y Hofrichter, M. Side chain removal from corticosteroids by unspecific peroxygenase. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2018. 183, 84–93.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.011>

Wang X., Sebastian P., Kinne M., Hofrichter M. y Groves T. Detection and Kinetic Characterization of a Highly Reactive Heme–Thiolate Peroxygenase Compound I. *Journal of the American Chemical Society*. 2012. 134, 31, 12897–12900.

<https://doi.org/10.1021/ja3049223>

Wang X., Ullrich R., Hofrichter M., y Groves J. Heme-thiolate ferryl of aromatic peroxygenase is basic and reactive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015. 112(12), 3686–3691.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1503340112>

Wang Y., Lan D., Durrani R. y Hollmann F. Peroxygenases en route to becoming dream catalysts. What are the opportunities and challenges? *Current Opinion in Chemical Biology*. 2017. 37, 1–9.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.10.007>

Zaks A. y Dodds D. Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric oxidations: substrate specificity and mechanistic study. 1995. *Journal of the American Chemical Society*. 117, 42, 10419–10424.

<https://doi.org/10.1021/ja00147a001>

ANEXOS

ANEXO 1: MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

PREPARACIÓN DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES –*E. coli* DH5 α

Preparar un preinóculo en 5mL en caldo LB. Incubar a 37°C toda la noche a 200rpm.

- Inocular un cultivo de 500mL de caldo LB a una OD600 = 0.05. Incubar a 37°C y 250rpm de agitación hasta alcanzar una biomasa OD600 = 0.5 – 0.6.
- Enfriar las células en baño de hielo durante 10 minutos.
- Centrifugar a 2500xg por 10' a 4°C.
- Resuspender el pellet en 80mL de **TB (transformation buffer)** frío (4°C) y mantener en baño de hielo durante 10' adicionales.
- Centrifugar a 2500xg por 10' a 4°C.
- Resuspender el pellet en 20mL de TB.
- Agregar DMSO hasta alcanzar una concentración de 7% (Ejm: 1.4mL DMSO para un total de 20mL). Mantener la agitación en el proceso.
- Incubar en hielo durante 10'.
- Dispensar a razón de 0.5 – 1mL en tubos eppendorf (polipropileno) y congelar de inmediato directamente en una refrigeradora -70°C.

NOTAS:

- La eficiencia de transformación calculada para el lote utilizado en el presente estudio fue de **156.6 UFC/ng pJR0C30-PaDa1 (10661pb)**.
- Las células se mantienen competentes durante al menos 3 meses.

PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* DH5 α MEDIANTE CHOQUE TÉRMICO

(Referencia: Inoue et al. 1990)

- Descongelar las células de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes en baño de hielo por al menos 10' antes de iniciar el proceso. Dispensar a razón de 50 μ l en microtubos de polipropileno previamente enfriados.
- Incorporar mínimo 10pg del plásmido a la suspensión celular ocupando un volumen de hasta 20 μ l (agua o buffer TE) y homogeneizar.
- Incubar en baño de hielo durante 30'.
- **Shock térmico:** 42°C por 45segundos. Retornar al baño de hielo durante 10'.
- Incorporar 1mL de medio SOC. Incubar a 37°C y en agitación durante 1 hora.
- Plaquear en Agar LB + 50 μ g/mL de ampicilina

EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO - Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit

Se realizará a partir de un cultivo de *E. coli* de 25mL de caldo LB + Amp (50µg/mL) inoculado toda la noche hasta saturación (12 - 14h) incubado a 37°C – 250rpm.

- Concentrar el volumen total del cultivo mediante centrifugación (6000xg) y resuspender en 3mL de H₂O -MQ estéril, y dispensar a razón de 600µl en tubos de microcentrífuga de 1.5mL.
- Agregar 100µl de **7X Lysis Buffer** y homogeneizar por inversión a temperatura ambiente durante 2 – 4 minutos, o hasta que la mezcla cambie de color opaco a azul claro.
- Agregar 350µl de **Buffer de Neutralización frío** y mezclar por inversión hasta que la mezcla torne de color amarillo y forme un precipitado de color anaranjado, prueba de que la neutralización ha concluido.
- Centrifugar a 13000rpm durante 4 minutos.
- Transferir el sobrenadante (≈900 µl) en la **columna Zymo-Spin™ IIN**, sin arrastrar el pellet. Colocar la columna en un **tubo colector** y centrifugar a 13000rpm por 30 segundos.
- Descartar el eluido y colocar la columna de vuelta en el **tubo colector**.
- Agregar 200 µl de **Endo-Wash Buffer** a la columna. Centrifugar a 13000rpm por 30’’.
- Agregar 400ul de **Zyppy Wash Buffer** a la columna. Centrifugar a 13000rpm por 1’. Descartar el eluido y repetir.
- Trasferir la columna a un tubo limpio de 1.5mL y agregar 30 – 50µl de **Zyppy™ Elution Buffer** precalentado a 70°C directamente a la matriz de la columna y esperar 1’.
- Centrifugar a 13000rpm por 30’’. Almacenar el DNA eluido a -20°C hasta su uso posterior.
- Determinar espectrofotométricamente la concentración y pureza del DNA extraído en el equipo NanoDrop®.

PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSA – Zymoclean Gel DNA Recovery Kit

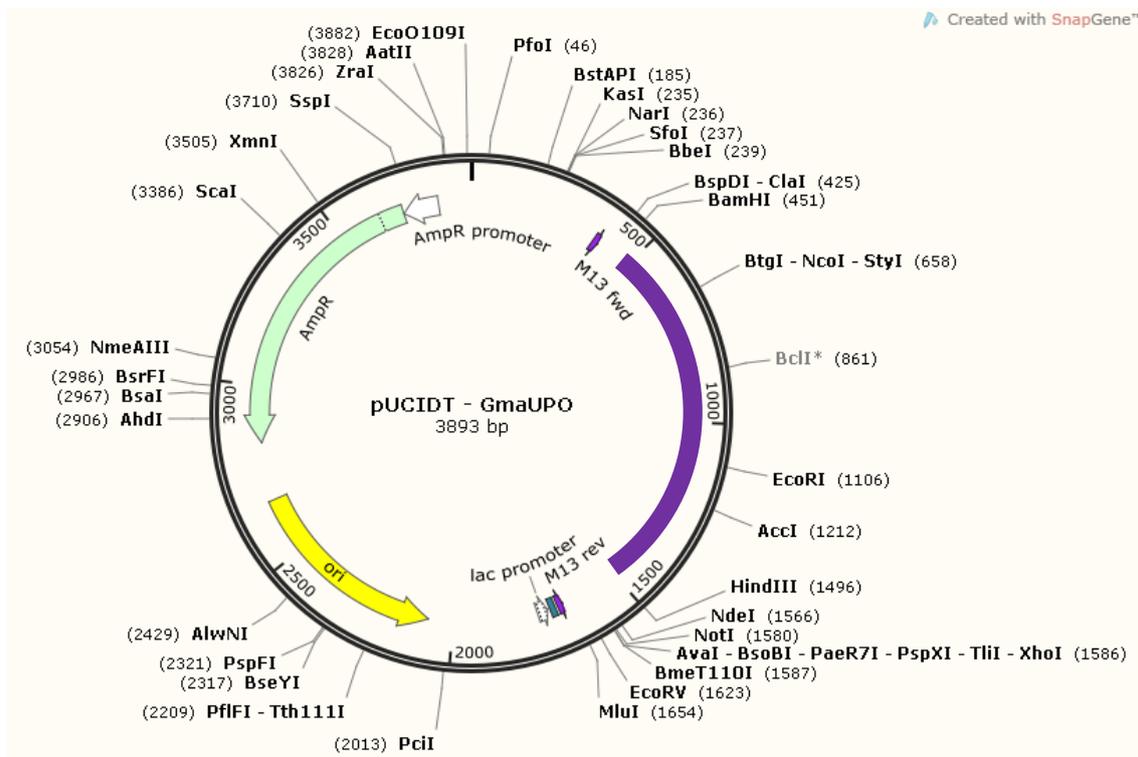
En todos los casos se purificarán bandas a partir de corridas electroforéticas en gel de agarosa - TAE 0.8% y revelados con Bromuro de Etidio.

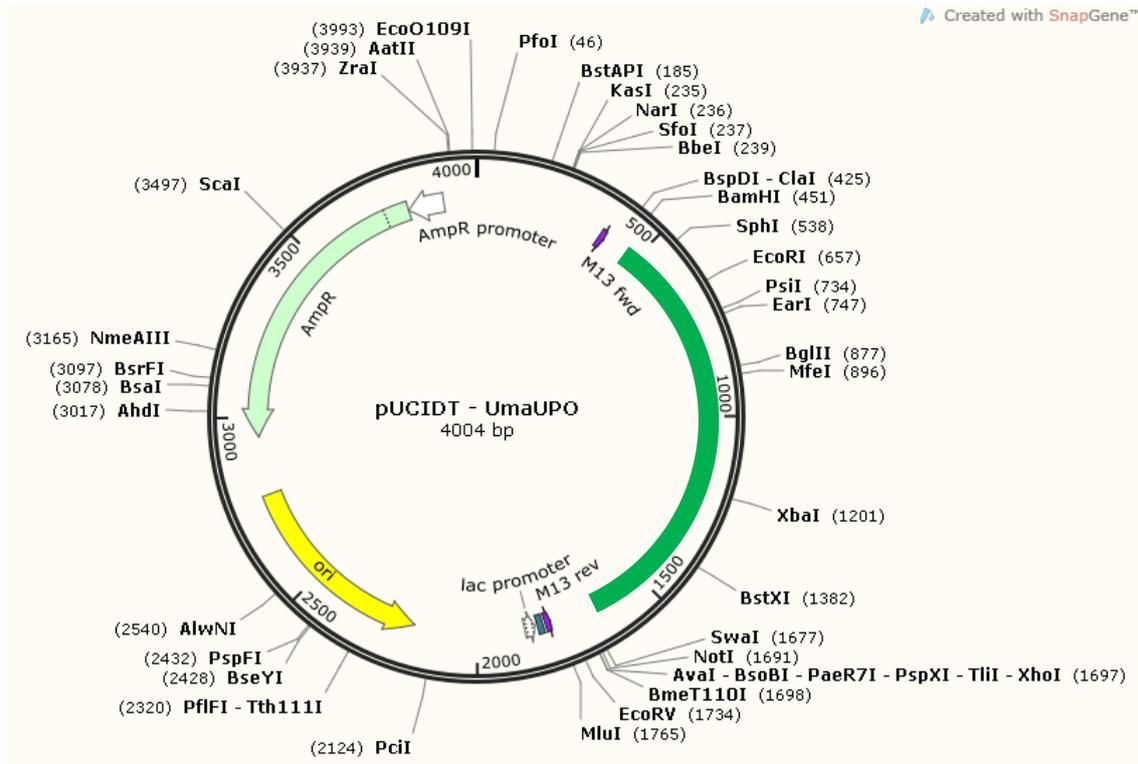
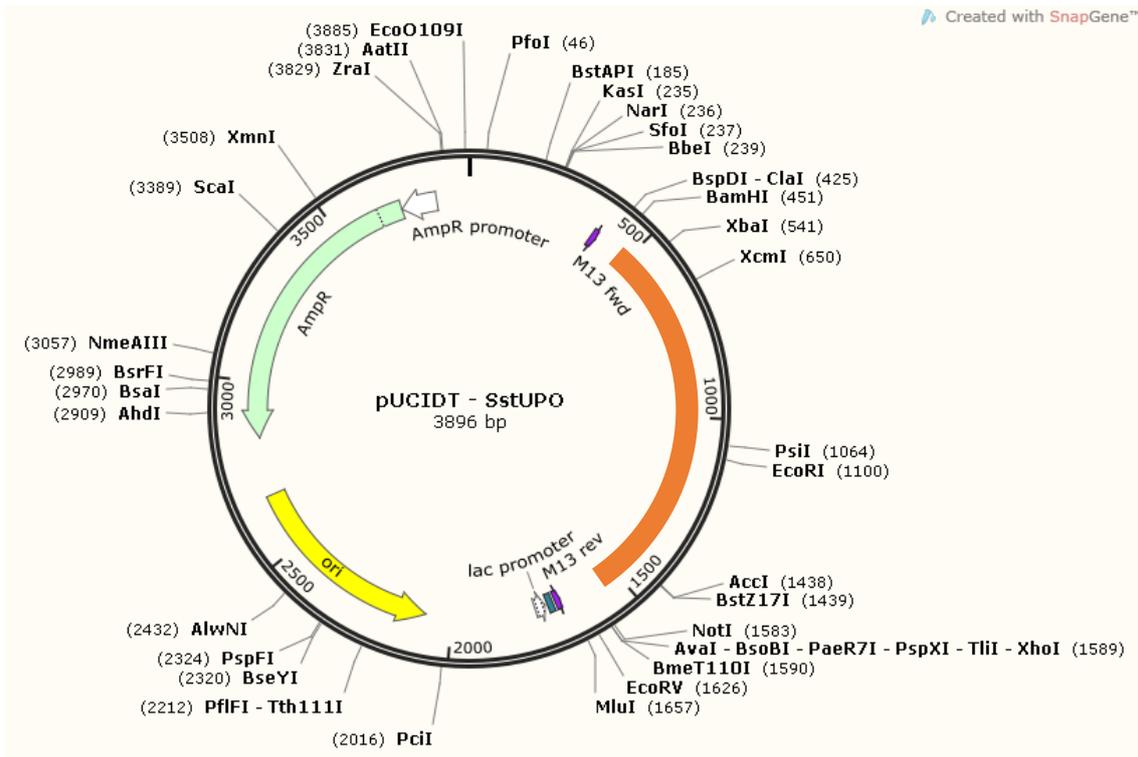
- Cortar las bandas de DNA de interés a partir del gel de agarosa con ayuda de un bisturí y transferidos a tubos de microcentrífuga de 1.5mL a razón de un volumen de entre 200 y 250 µl.
- Agregar 3 volúmenes de **ABD** (+ 1 volumen de agua y 100µl extra de ABD para fragmentos mayores a 8Kb) con respecto al volumen de agarosa a purificar. Vortexear hasta resuspender la agarosa y dar un spin.
- Incubar a 55°C y agitación durante 5 – 10 minutos hasta que el gel de agarosa haya sido completamente disuelto.
- Transferir la solución con agarosa disuelta a una columna **Zymo-Spin™** previamente colocada en un tubo colector.
- Centrifugar a 13000rpm por 60’’. Descartar el volumen eluido.

- Agregar 200ul de **DNA Wash Buffer** a la columna y centrifugar a 13000rpm por 30". Repetir este paso una vez más y descartar el volumen eluido.
- Agregar 20ul de DNA Elution Buffer precalentado a 70°C directamente a la matriz de la columna y esperar 1'. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5mL y centrifugar a 13000rpm por 2'.
- Almacenar a -20°C hasta su uso posterior.
- Determinar espectrofotométricamente la concentración y pureza del DNA extraído en el equipo NanoDrop®.

MAPAS DE LOS PLÁSMIDOS pUCIDT GmaUPO, SstUPO y UmaUPO

Las zonas coloreadas en morado, anaranjado y verde corresponden a los genes UPO, los cuales tienen una longitud de entre 1150 y 1250pb. En todos los casos, el gen de interés se encuentra flanqueado por sitios de restricción a BamH1, Xho1 y Not1.



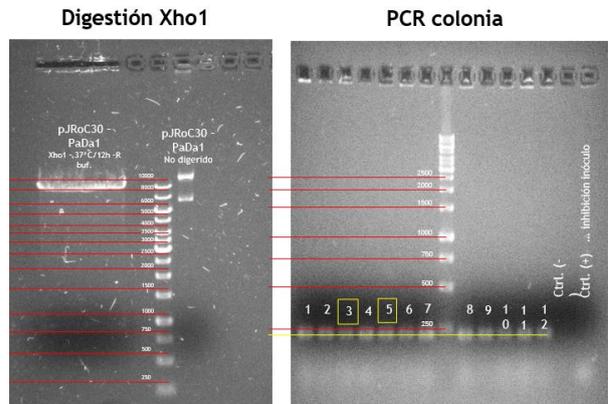


PROTOCOLO DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

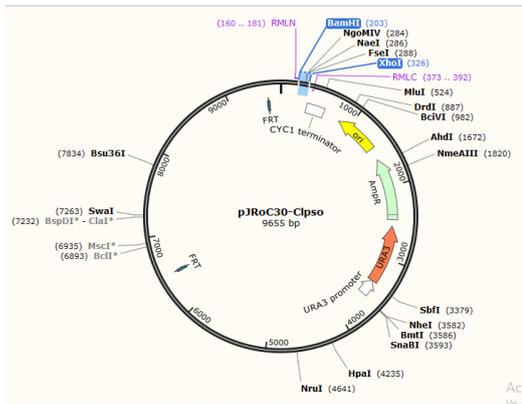
Colapso del sitio *Xho1* de restricción en el plásmido *pJRoC30-PaDa1*: Generación del plásmido *pJRoC30-Clpso*

Cálculos digestión <i>Xho1</i>					
	N° pb	Pmol/μg	<i>Xho1</i>	Pmol/sitio *μg	U*g/h
Lambda	48502	0.0312	1	0.0312	1
<i>pJRoC30-PaDa1</i>	10661	0.1419	3	0.4258	13.65

Digestión <i>Xho1</i>		Ligación	
DNA (196ng/μl)	5μl	DNA (32.4ng/μl)	4.63μl
Buffer R	4μl	Buffer Ligasa	2μl
<i>Xho1</i>	1μl (10U)	Ligasa T4	1μl (1U)
H2O	30μl	H2O	12.37μl
Total	40	Total	20



Purificación producto de ligación: 17.4 ng/μl
 Transformación por electroporación: 32.6 * 10² UFC/ml



```
CTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTGTATCTATTAACAGATATATAAATGCAAAAACGCATAAC
CACTTTAACTAATACTTCAACATTTTCGGTTTGATCTTCTATTCAAATGTAATAAAGATCAACAAAA
AATTGTTAATATACCTCTATACCTTAAACGCAAGGAGAAAAACTATAGGATCATAAGGATCCATGAAATATT
TCCCCTGTTCCCAACCTTGCTACGCAGTGGGGGTCGTGCTTTCTGACTACGCCTCATTGGCCGGCC
TCAGCCAGCAGGAATGGACGCTATAATCCCAACACTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCGCATCATGTAATT
AGTTATGTCACGCTACATTACAGCCCTCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAGGAAGGAGTTAGACAAC
CTGAAGTCTAGGTCCTATTTATTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATTTCAAATTTTC
```

Legenda:

Celeste: Fragmento residual de la secuencia correspondiente al gen de *AaeUPO* (*PaDa1*) presente en el plásmido *pJRoC30-Clpso*.

Morado: Sitio de restricción *BamHI*

Amarillo: Sitio de restricción *NotI*

Rosado: Localización de los primers RMLN y RMLC

Digestión *Xho1* – *BamHI* de los plásmidos *pJRoC30-Clpso* y *pUCIDT-GmaUPO*: Generación del plásmido *pJRoC30-GmaUPO*

Cálculos digestión <i>BamHI/Xho1</i>								
	N° pb	Pmol/μg	<i>BamHI</i>	Pmol/sitio *μg	U*g/h	<i>Xho1</i>	Pmol/sitio *μg	U*g/h
Lambda	48502	0.0312	5	0.156	1	1	0.0312	1
<i>pJRoC30-Clpso</i>	10661	0.1419	1	0.1593	1.0211	1	0.1593	5.1058
<i>pUCIDT-GmaUPO</i>	3893	0.3887	1	0.3887	2.4917	1	0.3887	12.4583

Purificación producto de ligación: 26.3 ng/μl

Transformación por electroporación(1:100): 14 UFC
 Transformación Shock Térmico (5μl): 5UFC

Ligación	
<i>pJRoC30-Clpso</i> (20.8ng/μl)	7.21μl
<i>GmaUPO</i> (32.4ng/μl)	4.63
Buffer Ligasa	2μl
Ligasa T4	1μl (1U)
H2O	5.16μl
Total	20

Digestión <i>BamHI/Xho1</i>		
	<i>pUCIDT-GmaUPO</i> (122.5ng/μl)	<i>pJRoC30-Clpso</i> (189.6ng/μl)
DNA	16.33μl	10.55μl
Buffer <i>BamHI</i>	8μl	8μl
<i>BamHI</i>	0.5μl (5U)	0.5μl (5U)
H2O	55.17μl	60.95μl
Total	80	80
Purificación kit limpieza		
DNA	30	30
Buffer R	8	8
<i>Xho1</i>	1	1
H2O	41	41
Total	80	80

Digestión Xho1 – BamH1 de los plásmidos pJRoC30-Clpso y pUCIDT-SstUPO: Generación del plásmido pJRoC30-SstUPO

Cálculos digestión BamH1/Xho1								
	N° pb	Pmol/μg	BamH1	Pmol/sitio *μg	U*g/h	Xho1	Pmol/sitio *μg	U*g/h
Lambda	48502	0.0312	5	0.156	1	1	0.0312	1
pJRoC30-Clpso	10661	0.1419	1	0.1593	1.0211	1	0.1593	5.1058
pUCIDT-SstUPO	3896	0.3887	1	0.3887	2.4917	1	0.3887	12.4583

Digestión BamH1/Xho1		
	pUCIDT-SstUPO (131.2ng/μl)	pJRoC30-Clpso (189.6ng/μl)
DNA	15.24μl	10.55μl
Buffer BamH1	8μl	8μl
BamH1	1μl (10U)	1μl (10U)
H2O	55.76μl	60.45μl
Total	80	80

Ligación (x2)	
pJRoC30-Clpso (17.5ng/μl)	5.71μl
SstUPO (17.2ng/μl)	5.8μl
Buffer Ligasa	2μl
Ligasa T4	1μl (1U)
H2O	5.49μl
Total	20

Purificación kit limpieza		
DNA	30	30
Buffer R	8	8
Xho1	1	1
H2O	41	41
Total	80	80

Purificación producto de ligación: ----
Transformación Shock Térmico (10μl): 24 UFC

Comprobación de actividad mutagénica en *E. coli*

El estudio originalmente inició con la cepa de *E. coli* XL1-Blue. No obstante, aun tras repetidos ensayos de clonamiento por métodos convencionales y modificando las condiciones y parámetros recomendados por el fabricante, no se logró tener éxito en ninguno de los casos. Tras realizar un secuenciamiento de diferentes “generaciones” producidas de plásmido pJRoC30-PaDa1, entendiéndose por generación un ciclo de transformación, cultivo en 25mL de LB y purificación de plásmido, se encontró una deleción de 8pb exactamente en el sitio de restricción BamH1 para la tercera generación la cual fue el lote de plásmido para el presente trabajo, habiendo también una serie de mutaciones conservadas y acumuladas en plásmidos de generaciones previas.

Las medidas correctivas empleadas fueron por una parte regresar hasta un plásmido “original” (presuntamente de segunda o primera generación y producido fuera de este estudio) y cambiar la cepa de *E. coli* XL1-Blue por *E. coli* DH5α ya que se tenía evidencia de actividad mutagénica en la cepa de *E. coli* XL1-Blue utilizada hasta el momento; no se hicieron experimentos para determinar la causa de este fenómeno. Posteriormente se colapsaría el sitio de restricción Xho1 con la finalidad de incrementar la eficiencia de digestión al llevar a cabo la reacción con menos sustrato.

Original: ¿Segunda generación?

```

PaDa1      351 AAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAATATAG 400
          |||
7527      451 AAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAATA--- 497
          |||
PaDa1      401 GATCATAGGATCCATGAAATATTTCCCTGTTCCCAACCTTGGTCTAC 450
          |||
7527      498 -----TAGGATCCATGAAATATTTCCCTGTTCCCAACCTTGGTCTAC 542
          |||
  
```

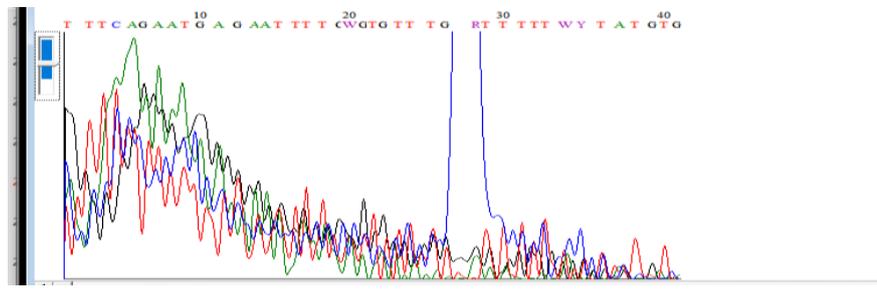
el plásmido original disponible para este estudio ya presenta alteraciones. No obstante, en un origen sí se tiene un sitio de restricción BamH1 intacto propiamente dicho

Primera propagación del plásmido (Tercera generación)

```

Se-Rev3    401 GGATC-----CATGAAATATTTCCCTGTTCCCAACCTTGGTCTAC 442
          |||
PaDa1      363 GGATCATAGGATCCATGAAATATTTCCCTGTTCCCAACCTTGGTCTAC 412
          |||
  
```

Segunda propagación del plásmido (Cuarta generación)



PCR DE COLONIA

Tabla A.2.1. Componentes utilizados en PCR de colonia y su concentración.

Componente	Concentración inicial	Concentración final	1 Rx	15 Rx
Buffer PCR	10X	1X	2 µl	30 µl
MgCl ₂	25mM	2.5mM	2 µl	30 µl
dNTPs	2mM	0.2mM	0.4 µl	6 µl
Primer RMLN (FW)**	10µM	1 µM	2 µl	30 µl
Primer RMLC (RV)**	10µM	1 µM	2 µl	30 µl
Taq Pol.	5 U/µl	0.5 U/Rx	0.06 µl	1 µl
H ₂ O*	-	-	11.54 µl	173

*Volumen de Rx = 20ul
 **Considerar que los Oligos se encuentran en los extremos del vector que flanquean la región insertada.
 RMLN: CCTCTATACTTTAACGTCAAGG
 RMLC: GGGGGAGGGCGTGAATGTAAGC

El programa de ciclamiento utilizado en PCR de colonia será:

- 1) 95°C x 5'
 - 2) 95°C x 30''
 - 3) 55°C x 30''
 - 4) 72°C x 30''
 - 5) 72°C x 5'
 - 6) 4°C x 12 horas
- } x34 ciclos

TRANSFORMACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* ATCC - BJ5465 – MÉTODO DE ACETATO DE LITIO (Yeast transformation kit ThermoFisher®)

Preparación de levaduras quimiocompetentes

- Inocular un cultivo de 25mL de caldo YPD (matraz de 125mL) directamente desde el criovial de *S. cerevisiae* BJ5465. Incubar toda la noche a 30°C y 250rpm.
- Inocular un cultivo de 100mL de YPD (matraz de 500mL) hasta obtener una biomasa inicial OD600 = 0.3. Incubar a 30°C – 200rpm hasta lograr una biomasa OD600 = 1 – 1.2. Este proceso tarda aproximadamente 4 horas.
- Cosechar las células en su totalidad por centrifugación a 6000rpm x 5' – 4°C. Resuspender el pellet en 50mL de H₂O-MQ.
- Repetir el paso de centrifugación y lavado a las mismas condiciones.
- Resuspender las células mediante agitación orbital en 1mL de **Transformation Buffer** (Thermo®). Almacenar en hielo durante 1 – 1.5 horas.

NOTAS:

- Las células ya competentes pueden ser almacenadas en refrigeración a 4°C hasta por una semana aunque su estado de competentes se reduce gradualmente día a día. Así mismo, pueden ser almacenadas por tiempos prolongadas en 15% de glicerol y a -70°C.

Transformación de levaduras mediante choque térmico

- En un tubo de microcentrífuga de polipropileno de 1.5mL, colocar 10µl de ssDNA acarreador **Salmon testes (10mg/mL)**.
- Adicionar 100ng de cada uno de los plásmidos a transformar. El plásmido pRS316 (+ URA3) se incluye a modo de control interno de la técnica.
- Adicionar 100µl de células competentes y homogeneizar.
- Adicionar 600µl de **plate buffer** y homogeneizar.
- Incubar en agitación a 30°C en agitación (250rpm) durante 30 minutos.
- Adicionar DMSO hasta un 10% v/v y homogeneizar.
- Choque térmico: Someter la mezcla a 42°C durante 15 minutos en agitación.
- Dar un spin de 5'' en microcentrífuga. Retirar el sobrenadante con micropipeta.
- Resuspender las células ya transformadas en 500µl de H₂O-MQ estéril.
- Sembrar a razón de 100µl en placas de medio mínimo SIN uracilo + Cloranfenicol 25µg/mL. Incubar a 30°C durante 48 horas.

ANEXO 2: Soluciones de trabajo y medios de cultivo utilizados.

Soluciones y medios utilizados para el clonamiento en *E. coli*

LB (Luria bertani ; pH = 6.8 – 7)

- Cloruro de sodio 5g/L
- Extracto de levadura 5g/L
- Peptona de caseína 10g/L

Transformation buffer - TB (pH = 6.7 ; ajustar pH con KOH)

- 10mM Hepes/Pipes - 2.3830 g/L
- 55mM MnCl₂ - 6.92142 g/L (Anhidro)
- 15mM CaCl₂ - 1.6647 g/L
- 250mM KCl - 18.6378 g/L
 - MnCl₂ agregar al final. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C.

SOC (pH = 6.8 – 7)

- Bacto triptona 2% (w/v) - 20 g/L
- Extracto de levadura 0.5% (w/v) - 5 g/L
- NaCl 10mM - 0.5844 g/L
- KCl 2.5mM - 0.1864 g/L
- MgCl₂ 10mM - 1.2584 g/L
- MgSO₄ 10mM - 1.2036 g/L
- Glucosa 20mM - 3.6031 g/L
 - **NOTA:** Recomendable incorporar glucosa previamente filtrada desde un stock.

Soluciones y medios utilizados para la transformación y expresión en *S. cerevisiae*

Transformation buffer - TB - pH 7.6

- Acetato de litio 100mM - 0.5101g / 50mL
- Tris-HCl (pH 7.6) 10mM - Stock 100mM : 0.3029g / 25mL
- EDTA 1mM - Stock 50mM : 0.4653g / 25mL
 - **NOTA:** Esterilizar por filtración.

Plate Buffer

- Acetato de litio 100mM - 0.5101g / 50mL
- Tris-HCl (pH 7.6) 10mM - Stock 100mM : 0.3029g / 25mL
- EDTA 1mM - Stock 50mM : 0.4653g / 25mL
- 40% (p/v) PEG
 - **NOTA:** Válido utilizar directamente Transformation buffer. Preparar un mínimo de 5mL.

YNB 10X

Disolver 6.7g de Yeast Nitrogen Base without aminoacids en 100mL de H₂O-MQ. Prefiltrar en membrana de 0.45µm antes de esterilizar por filtración en membrana de 0.22µm.

Suplemento sintético de levadura (SIN Uracilo) 10X

Disolver 1.92g de suplemento sintético SIN uracilo en H₂O-MQ. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22µm.

Glucosa 50% (p/v)

Disolver 50g de glucosa en 100mL de H₂O -MQ. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22µm.

Rafinosa 20% (p/v)

Disolver 20g de rafinosa en 100mL de H₂O -MQ. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22µm.

Galactosa 20% (p/v)

Disolver 20g de galactosa en 100mL de H₂O -MQ. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22µm

Cloranfenicol 25mg/mL

Disolver 0.25g de cloranfenicol en 10mL de Etanol. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22µm.

Caldo YPD

- Bactopeptona 20g/L
- Extracto de levadura 10g/L
- Glucosa 20g/L
 - **NOTA:** Deseable incorporar glucosa 50% (40mL /L) después de autoclavar.

Medio mínimo para levaduras SIN uracilo

- YNB 10X 10% (v/v)
- Suplemento sintético SIN uracilo 10X 10% (v/v)
- Glucosa 50% 4% (v/v)
- Agar 2% (p/v)
- Cloranfenicol 25mg/mL 0.1% (v/v)
 - **NOTA:** Esterilizar por autoclave agua y agar.

Medio Inóculo Rafinosa SIN uracilo

- YNB 10X 10% (v/v)
- Suplemento sintético SIN uracilo 10X 10% (v/v)
- Rafinosa 20% 10% (v/v)
- Cloranfenicol 25mg/mL 0.1% (v/v)
 - **NOTA:** Utilizar H₂O-MQ estéril.

Medio de expresión Galactosa – S. cerevisiae – pJRoC30

- Extracto de levadura 10g/L
- Peptona 20g/L
- Buffer fosfato de potasio 60mM pH6
 - KH_2PO_4 0.7691 g/L
 - K_2HPO_4 0.0607 g/L
- Sulfato de magnesio 1mM 0.2465 g/L
- H_2O 865 mL /L
- Galactosa 20% (p/v) 10% (v/v)
- FeCl_3 (100mM) 0.5% (v/v)
- Etanol 3% (v/v)
- Cloranfenicol 25mg/mL 0.1% (v/v)
 - **NOTA:** Ajustar el pH a 6 con KOH o KCl previo a la esterilización por autoclave de aquellos componentes que pueden ser pesado y diluidos en agua.

Soluciones utilizadas para ensayos de actividad enzimática

Buffer de fosfatos de potasio pH 7 - 50mM

- KH_2PO_4 0.4205 g/100mL
- K_2HPO_4 0.3327 g/100mL
 - **NOTA:** Ajustar el pH con KOH 5N

Buffer de fosfatos de potasio pH 6 - 60mM

- KH_2PO_4 0.7691 g/100mL
- K_2HPO_4 0.0607 g/100mL
 - **NOTA:** Ajustar el pH con KOH 5N

Buffer citratos pH 4.3 - 100mM

- Ácido cítrico 0.6404 g/100mL
- Na_2HPO_4 0.9464 g/100mL
 - **NOTA:** Ajustar el pH con HCl 5N

ANEXO 3: Detalle de alineamientos, modelos, esquema de clonamiento y cálculo de unidades

Detalle del cálculo de unidades enzimáticas de UPOs hipotéticas.

Vol. Extracto	L1	L2	L3	PROMEDIO (Abs/seg)	Desv.Est	%Error	Unidades Abs/min
10ul (1:100)	0.13912	0.13648	0.13784	0.1378133	0.0013202	0.9579639	0.0082688
100ul	0.008424	0.008672	0.008331	0.0084757	0.0001763	2.092515	0.0005085

$\epsilon(420nm) = 36000 (M.cm)^{-1}$							
Vol. Extracto	FD	U (μmol/min) = ((Abs/min)/ε)*FD	Volumen total recuperado (μl)	FD muestra	Factor 10ul : 6500ul	U totales	
10ul (1:100)	100	0.0230	6500	100	650	1492.9778	
100ul	1	0.0000	2500	1	25	0.0003532	

Detalles de alineamiento de secuencias UPOs propuestas.

```
# Aligned_sequences: 2
# 1: AaeUPO
# 2: GmaUPO
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 374
# Identity: 253/374 (67.6%)
# Similarity: 296/374 (79.1%)
# Gaps: 4/374 ( 1.1%)
# Score: 1363.5
#
#
#=====
```

```
AaeUPO 1 MKYFPLFPTLV--FAARVAFPAYASLAGLSQQELDAIIPLEAREPGLP 48
GmaUPO 1 MRGTAIILSVLIALFANAATAFPAYGSLAGLTKEQDEVLPLEIRELTSP 50
AaeUPO 49 PGPLENSAKLVNDEAHPKPLRPGDIRGCPGLNLTASHGYLPRNGVAT 98
GmaUPO 51 PGLNDTSAKLVNDEAHPKMPVAPADIRGCPGLNLTASHGWLPRNGIAS 100
AaeUPO 99 PVQIINAVQEGLNFDNQAAVFATYAAHLVDGNLITDLSIGRKTALTPGD 148
GmaUPO 101 PSEIITAVQEGFNENSLAVFITYAAHLVDGNLITDLSIGVKTALTPGT 150
AaeUPO 149 PPPASVGGLEHNGTFEGDASMTRGDAFFGNHDFNETLFEQLVDVSNRFF 198
GmaUPO 151 PPAPALVGGLEHNGTFEGDTSMTRGDFFGNHDFNETLFEQVDFSNRFF 200
AaeUPO 199 GGGKYNLTAVAGELRFKRIQDSIATNPNFSDVDFRFFAYGETTFPANLTV 248
GmaUPO 201 GGGKYNLTAVASEFRMKRIQDSIATNPTFSFVSPRYFTAYAESFTPIINF 250
AaeUPO 249 DGRDQGLDMDAARSFFQFSRMPDDFFRAPSRSRGTGVEVVIQAHMNP 298
GmaUPO 251 DGRDQGLDLDLVARGFFQNSMPDDFFRANGTRATAGINWVAHAHP 300
AaeUPO 299 GTRVGVKINSYTVDPITSSDFSTPCLMYKFNLTIVKSLYPNPTVQLRKA 348
GmaUPO 301 GTNVGGVNNYVDPMSANFNFTCLLYENFVNTVKGLYPNPTGALLQALN 350
AaeUPO 349 TNLDFFFQGVAA--AGCTQVFPYGRD 371
GmaUPO 351 TNLDFFFSGLSDTGTCTQVFPYK-- 373
```

```
# Aligned_sequences: 2
# 1: AaeUPO
# 2: SstUPO
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 376
# Identity: 239/376 (63.6%)
# Similarity: 278/376 (73.9%)
# Gaps: 7/376 ( 1.9%)
# Score: 1236.5
#
#
#=====
```

```
AaeUPO 1 MKYFPLFPTLVFAARVAFPAYASLAGLSQQELDAIIPLEAREPGLPPG 50
SstUPO 1 MARFAALLGFVLAFTVLAFAHESLAGLSREVLQDIPTLKLAKPPPPPG 50
AaeUPO 51 PLENSAKLVNDEAHPKPLRPGDIRGCPGLNLTASHGYLPRNGVATPV 100
SstUPO 51 PLNDTSAKLVNDEAHPKPLRPHGDIRGCPGLNLTASHGYLPRNGIATPA 100
AaeUPO 101 QIINAVQEGLNFDNQAAVFATYAAHLVDGNLITDLSIGRKTALTPGPPP 150
SstUPO 101 QIVNAVQEGFNMGNDLAVFVTYAAFVLDGNLVTNLSIGSKTPTLTPGNPP 150
AaeUPO 151 PPASVGGLEHNGTFEGDASMTRGDAFFGNHDFNETLFEQLVDVSNRFFG 200
SstUPO 151 APALVGGLEHNGTFEGDASMTRADDAFFGNHDFNETLFEQLVDFSNKFGA 200
AaeUPO 201 GKYNLTVAGELRFKRIQDSIATNPNFSDVDFRFFAYGETTFPANLFDVG 250
SstUPO 201 GNYNLTVGGQFRFQRIQDSIATNPQFSFISPRYFTAYAESVFTIFFVDG 250
AaeUPO 251 RRDQGLDMDAARSFFQFSRMPDDFFRAPSRSRGTGVEVVIQAHMNP 298
SstUPO 251 RVANGQLNDVARGFFQMSHPAGFFRNASAGLAAVAAGIGEVFAAHP 300
AaeUPO 297 QPGRNVGKINSYTVDPITSSDFSTPCLMYKFNLTIVKSLYPNPTVQLRKA 346
SstUPO 301 EPGANQGAINTFTLDPNASADFSDICKLYDFVNTVKGLYPNPTGVLN 350
AaeUPO 347 LNTNLDFFFQGVAA--AGCTQVFPYGRD 371
SstUPO 351 LNTNLNLFQPLANDGCTQVPPFG-- 374
```

```

# Aligned_sequences: 2
# 1: AaeUPO
# 2: UmaUPO
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 457
# Identity: 121/457 (26.5%)
# Similarity: 172/457 (37.6%)
# Gaps: 133/457 (29.1%)
# Score: 359.0
#
#
#=====
AaeUPO      1 MKYFPLFPTLVFAARWAFPAYASLAGLSQQELDAIPTLEAREPGLPPG 50
UmaUPO      1 MKLSFNLPILLSAA-FMAAPALA-----LPNLHAM---MAPG 33
AaeUPO     51 P-----LENSSAKL----- 59
UmaUPO     34 PMSPESHLEKRLLSANPLHLNLFNDIKNKVAELNSNVTVPDVGSLNTK 83
AaeUPO     60 -----VNDEAHPKPLRPGDIRGPCPLNTL 85
UmaUPO     84 ITDITPESIYNTFGIRRDGLLPPAEDKYHPWQPPKGAKRGPCPLNTI 133
AaeUPO     86 ASHGYLEPRNGVATPVQIINAVQELNFDNQAAVFATYAHLVDGNLITDL 135
UmaUPO    134 ANHGYLEPRSGVINPIDLVGTFGLMLSPDLAGLAAISFVGMGDLLOMK 183
AaeUPO    136 LSTGRKRLTGPDPPPPASVGLNEHGTFFGDASMTRGDAFFGNHDFNE 185
UmaUPO    184 LSTIGRYGLG-----GGLSHHGILEGDASVTRKDNVYFNGSHDADP 223
AaeUPO    186 TLFEQLVDYSNRFGGKYNLTVAGELRFRKIQDSIATNPNFSVDFRFF 235
UmaUPO    224 KLVKQFIQETNTYKGNVNIHSLANSRYRANVYGRKNPVDFNPHMLV 273
AaeUPO    236 AYGETTFPAMLFVDGRDDQLMDAARSFFQFSRMPDDFFRAPSRSPT 285
UmaUPO    274 AYGESGFVHEVL---RGSFVKFDETMKNWFIDERFKGNSKRIVPMTTP 320
AaeUPO    286 GV----EVTIQAHFVQGRNVGK---INSYTVDPSTPCLMYEKFV 328
UmaUPO    321 EILAWAGIVFVAKPTIPGWSIGKAFIPLPTDGAAYQELKS--LDPKTT 368
AaeUPO    329 NITVKSLYPHNPTVQLRKALNTLDF-----FQGVAA--GCTQ 364
UmaUPO    369 GATLESL-----LCDASNAVLGFFPSQITNLLGVIGKVGVAQFKCK- 410
AaeUPO    365 VFPYGRD 371
UmaUPO    411 ----- 410

```

Detalle de los modelos generados para las GmaUPO, SstUPO y UmaUPO

En lo que respecta al modelo obtenido para la UPO de *Galerina marginata* (GmaUPO), el porcentaje de identidad de la secuencia a modelar fue de 71.52% con respecto al modelo generado para AaeUPO (2yp1) y un porcentaje de cobertura del 100%, obteniendo un valor de QMEAN = -1.49 y un QMQE = 0.89 (Figura A3.1.A), lo cual quiere decir que la consistencia del modelamiento puede considerarse adecuada para la elaboración de inferencias. En el diagrama de calidad local estimada se ilustra en color amarillo aquellas regiones que implican el residuo de cisteína y el par ácido base requerido para la catálisis, mientras que en color verde se ilustran aquellas regiones que corresponden al túnel de GmaUPO (Figura A3.2.B), observándose un alto grado de similitud respecto a AaeUPO. Por su parte, el diagrama de valores Z (Figura A3.1.C) mostró que el plegamiento propuesto calza, aunque casi marginalmente, dentro de la base de plegamientos reportados. Todo esto es útil para indicar que el modelo propuesto para GmaUPO es similar a AaeUPO y es confiable. Así mismo, el valor de RMSD calculado para el presente modelo fue de 0.631, con 2371 átomos alineados.

Haciendo un análisis más exhaustivo de la región C-terminal, la cual corresponde a los residuos 360 en adelante y no fueron modelados adecuadamente de acuerdo al diagrama de calidad local (figura A3.2.B), se tiene que serían solo los residuos 360 – 364 aquellos que formarían parte de la entrada al túnel mientras que aquellos desde el 364 hasta el 373, no, según se observa en la figura A3.2.B. Además, según lo observado en las figuras A3.2.C, no se espera que aminoácidos 360 – 364 afecten negativamente la entrada al túnel del sitio activo en el sentido de que no deberían obstaculizar o bloquear la entrada, en su

lugar, se esperaría que al ser diferentes a los de AaeUPO, permitan la captación de nuevos sustratos.

Por su parte, respecto a SstUPO, el porcentaje de identidad de la secuencia a modelar fue de 71.52% con respecto al modelo generado para AaeUPO (2yp1) y un porcentaje de cobertura del 100%, obteniendo un valor de QMEAN = -2.13 y un QMQE = 0.56 (Figura A.3.3.A), lo cual quiere decir que la consistencia del modelamiento puede considerarse adecuada para la elaboración de inferencias, aunque de acuerdo al QMEAN, éste se encuentra ligeramente por debajo del límite inferior -2.00 para hacer predicciones altamente fiables, declarado por el software. En el diagrama de calidad local (Figura A.3.3.B) estimada se ilustra en color amarillo aquellas regiones que implican el residuo de cisteína y el par ácido base requerido para la catálisis, mientras que en color morado se ilustran aquellas regiones que corresponden al túnel de SstUPO, observándose un grado de similitud conformacional respecto a AaeUPO de 85%, aunque con regiones marcadamente diferentes. Por su parte, el diagrama de comparación (Figura A.3.3.C) nos muestra que el plegamiento propuesto es marginal con respecto a la base de plegamientos reportados. Todo esto es útil para indicar que el modelo propuesto para SstUPO es similar a AaeUPO y confiable para realizar inferencias al respecto, obteniéndose a su vez un valor de RMSD de 1.23, con 2252 átomos alineados.

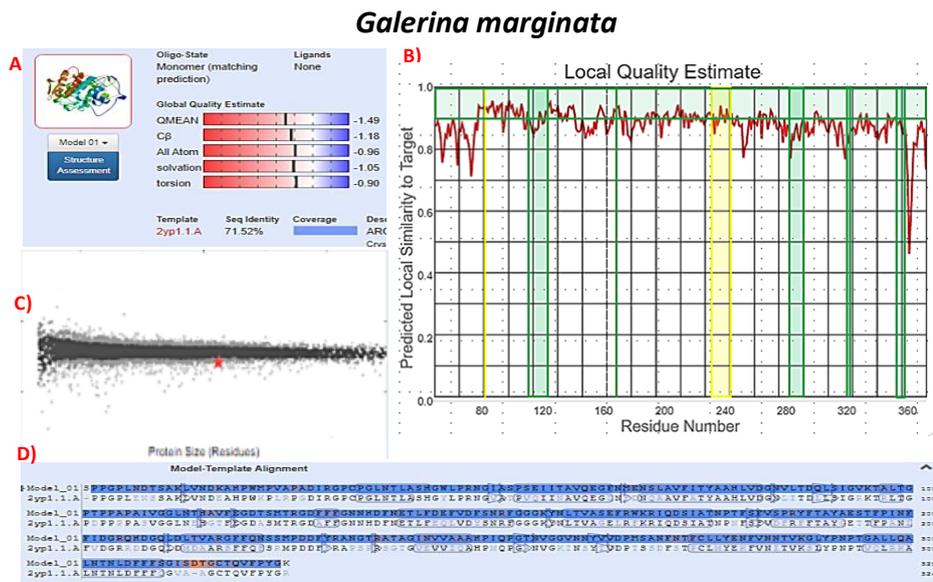


Figura A.3.1. Modelamiento por reemplazo molecular de GmaUPO. A) Resumen general de la calidad del modelamiento de GmaUPO respecto a AaeUPO (2yp1). B) Diagrama de calidad local del modelamiento generado respecto a AaeUPO. C) Diagrama de comparación del modelo generado respecto a otros modelos para proteínas de tamaño similar. D) Alineamiento de secuencias aminoacídicas de AaeUPO y GmaUPO.

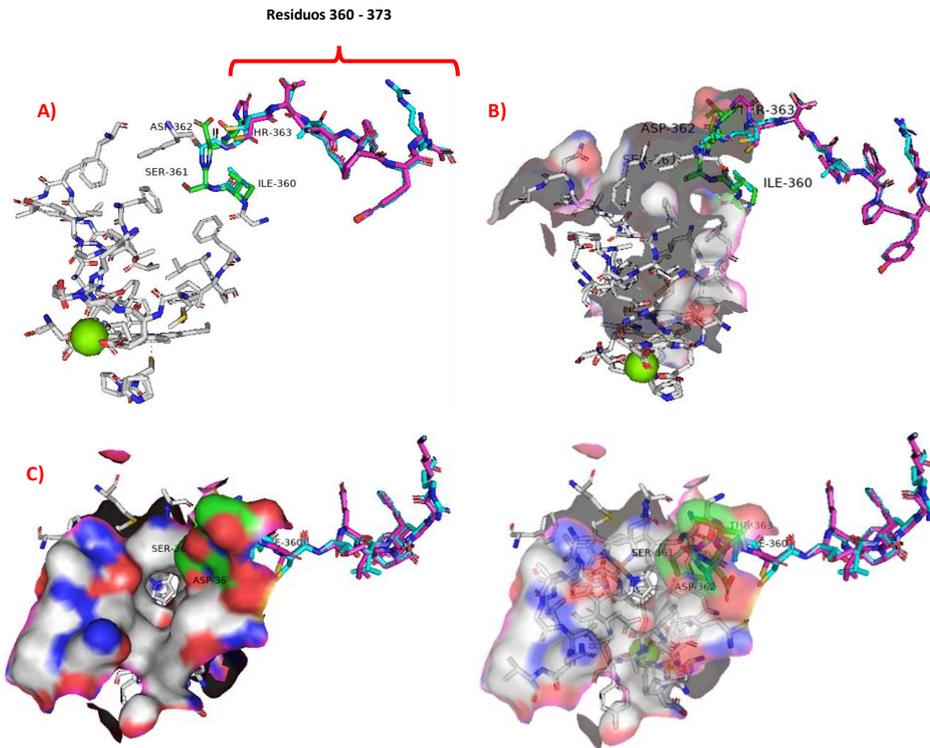


Figura A.3.2. Modelamiento por reemplazo molecular de GmaUPO (morado) respecto a AaeUPO (celeste), con énfasis en región de la cadena de aminoácidos no modelada satisfactoriamente. En los colores blanco se tiene a los aminoácidos que integran el túnel de acceso al sitio activo de GmaUPO y en verde se tiene a los aminoácidos correspondientes a la región no adecuadamente modelada. **A)** Se tiene que la región señalada correspondo al extremo C terminal de la proteína y que solo 4aa (360 – 364) participan del túnel de acceso al sitio activo. **B)** Énfasis en la superficie modelada para los Residuos 360 – 364 y su disposición en el túnel de acceso al sitio activo. **C)** Disposición espacial de la entrada al túnel, donde se presentan en verde los Residuos 360 – 364.

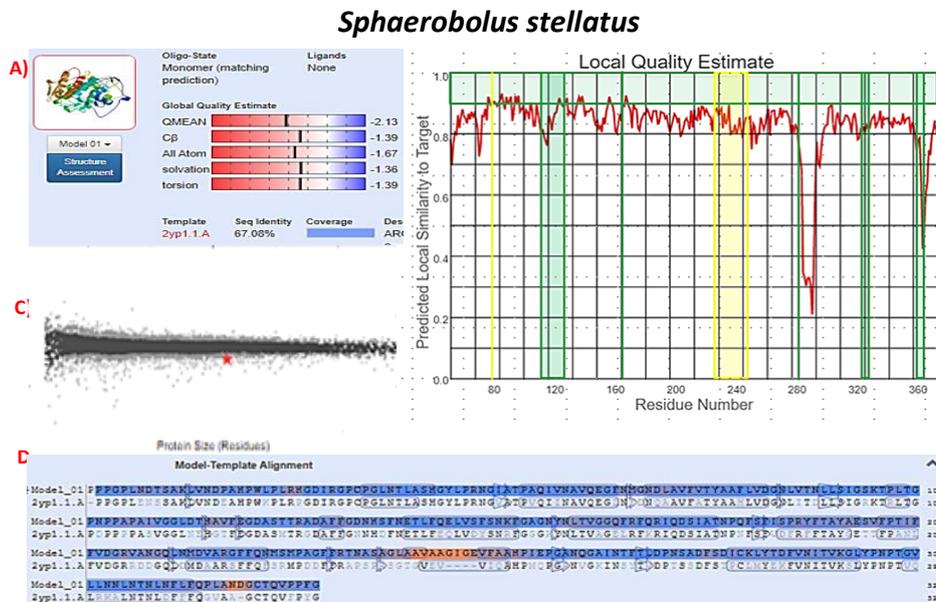


Figura A.3.3. Modelamiento por reemplazo molecular de SstUPO. **A)** Resumen general de la calidad del modelamiento de SstUPO respecto a AaeUPO (2yp1). **B)** Diagrama de calidad local del modelamiento generado respecto a AaeUPO. **C)** Diagrama de comparación del modelo generado respecto a otros modelos para proteínas de tamaño similar. **D)** Alineamiento de secuencias aminoacídicas de AaeUPO y SstUPO.

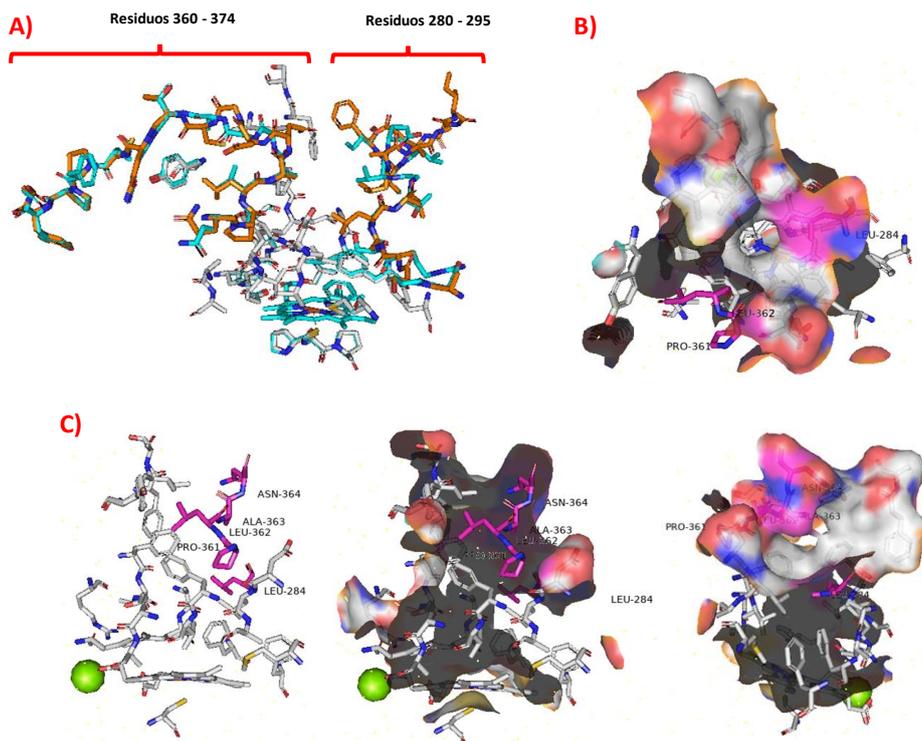


Figura A.3.4. Modelamiento por reemplazo molecular de SstUPO (anaranjado) respecto a AaeUPO (celeste), con énfasis en las regiones de la cadena de aminoácidos no modeladas satisfactoriamente. En los colores blanco se tiene a los aminoácidos que integran el túnel de acceso al sitio activo de SStUPO y en morado se tiene a los aminoácidos correspondientes a la región no adecuadamente modelada y que a su vez forman parte del túnel. **A)** Se tiene que la región correspondiente a los Residuos 280 – 295 se encuentran formando un loop que se encuentra espacialmente lejos del sitio activo aunque el Residuos LEU 284 forma parte del túnel. La región correspondiente a Residuos 360 – 374 correspondo al extremo C terminal de la proteína y solo 4aa (360 – 364) participan del túnel; dada su localización, no se esperarían que participen sustancialmente de la catálisis. **B)** Énfasis en los residuos, que integran el túnel de SstUPO, así como de la superficie modelada para estos. Se tiene que ALA-363 y ASN-364 forman una estructura por encima de la entrada al túnel pero de acuerdo al modelo, no constituye un obstáculo. **C)** Disposición espacial de la entrada al túnel.

Finalmente, respecto a UmaUPO, el porcentaje de identidad de la secuencia a modelar fue de 31.75% con respecto al modelo generado para AaeUPO (2yp1) y un porcentaje de cobertura cercano al 80%, obteniendo un valor de QMEAN = -3.75 y un QMQE = 0.56 (Figura A.3.4.A), lo cual quiere decir que la consistencia del modelamiento no es adecuada para la elaboración de inferencias. En el diagrama de calidad local estimada (Figura A.3.4.B) se ilustra en color amarillo aquellas regiones que implican el residuo de cisteína y el par ácido base requerido para la catálisis, mientras que en color verde se ilustran aquellas regiones que corresponden al túnel de UmaUPO, observándose un grado de similitud respecto a AaeUPO bastante bajo, con regiones que tan solo alcanzan un 0.3 de similitud. Por su parte, el diagrama de comparación (Figura A.3.4.C) nos muestra que el plegamiento propuesto cae fuera respecto a la base de plegamientos reportados. Todo esto permite afirmar que el modelo propuesto para UmaUPO es diferente al de AaeUPO, lo cual a su vez se evidencia en el valor de RMSD, calculado en 5.234, con 1728 átomos alineados.

Analizando en detalle el modelo generado, se tiene que las regiones correspondientes a los residuos 184 – 194, 285 – 290, 317 – 326, 342 – 350 y 368 – 380 fueron las que peor se ajustan al modelo generado. De estas, las regiones 184 – 194 y 285 – 290 se encuentran

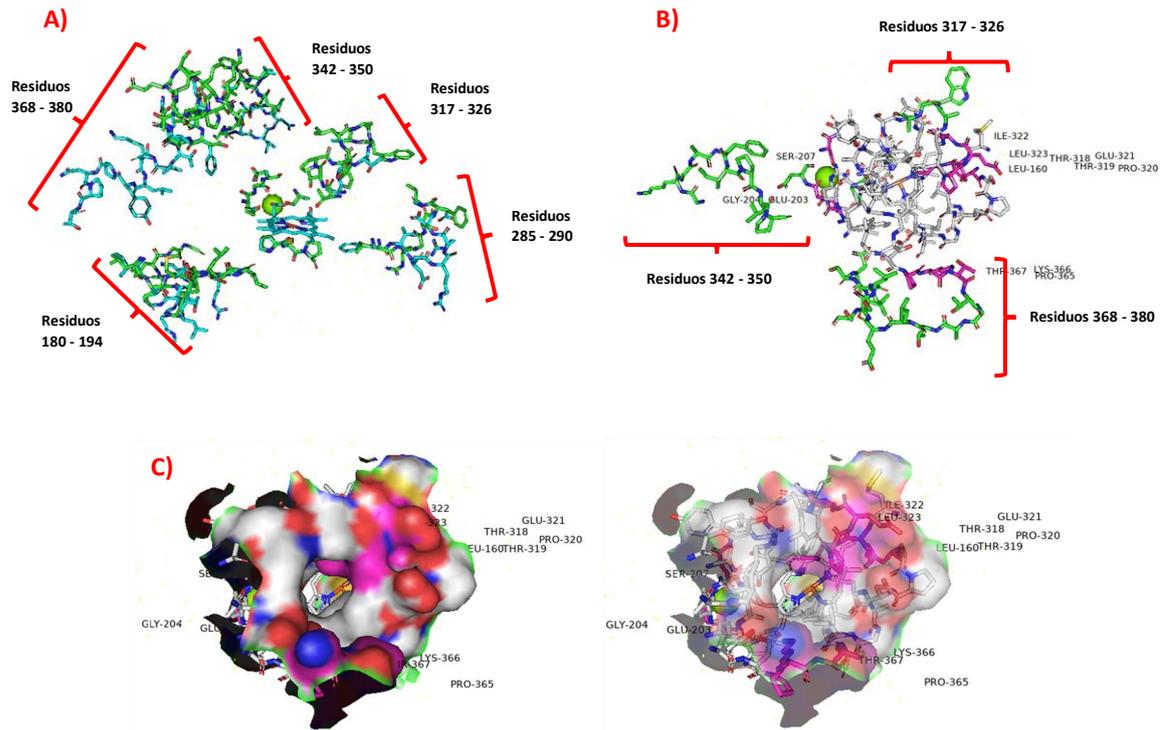


Figura A.3.6. Modelamiento por reemplazo molecular de UmaUPO (verde) respecto a AaeUPO (celeste), con énfasis en las regiones mayoritarias de la cadena de aminoácidos no modeladas satisfactoriamente. En los colores blanco se tiene a los aminoácidos que integran el túnel de acceso al sitio activo de UmaUPO y en morado se tiene a los aminoácidos no adecuadamente modelada y que a su vez forman parte del túnel. **A)** Disposición en el espacio de regiones mayoritarias no modeladas adecuadamente. **B)** En color morado se muestran los aminoácidos que integran el túnel de UmaUPO, según el modelo, y que discrepan respecto a AaeUPO. **C)** Vista frontal del túnel de acceso al sitio activo.

Detalle de los alineamientos de las secuencias de UPOs hipotéticas analizadas sin AaeUPO

Subfamilia 1

TwaUPO	1	PAPSPQTNIAAKLVNDAHPKAPSATAQRGPCPGLNTLANHG-----YLNRSGIV
TcoUPO	1	PAPSPQTDTSKLVNDASHPKAPATDORGPCPGLNTLANHG-----YLNRGTIV
AbiUPO	1	APPGPLKENGTKLVNDQHPKPLHGDIRGPCPGLNTLASHG-----YLPRNGIA
GmaUPO	1	SPPGPLNDTSAKLVNDKHPMPVAPADIRGPCPGLNTLASHG-----YLPRNGIA
PcrUPO	1	PPPGPLNDTSTRKLVNDKHPMPGGPDDIRGPCPGLNTLANHG-----YLPRNGIA
FibuUPO	1	PAPPGPLKDDGKLVNDAHPKAAAGPNDIRGPCPGLNTLASHG-----YLPRNGIA
LamUPO	1	PPPGPLKNTSTRKLVNDKHPKPLDGDIRGPCPGLNTLASHG-----YLPRNGIA
SstUPO	1	PPPGPLNDTSAKLVNDPAHPMPPLHGDIRGPCPGLNTLASHG-----YLPRNGIA
HsuUPO	1	PPPGPLNDTSAKLVNDPAHPMPAPADIRGPCPGLNTLASHG-----YLPRNGIA
HciUPO	1	SPPGPLNDTSAKLVNDKHPKPAKGDIRGPCPGLNTLASHG-----YLPRNGIA
CciUPO	1	PPPGPLAENGTKLVNDEHPMPKGLARGGPCPGLNTLASHGNLIDLLDCGYLPRNGIA
consensus	1	..*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*
TwaUPO	52	TFAQIINAVQEGFNMGNDLAVFVYAAHLVDGNLITDLSIGGKTSSTGCTNPPAPAVGG
TcoUPO	52	EQDITIKAVQAGNMAQPLASETAFCAHLVDGNLITDLSIGGKTSATGQDPPAPAVGG
AbiUPO	52	TFVQIINAVQEGFNMGNSARLVTYAAHLVDGNLITDKLSIGGKSLTGFSPPAPANAAG
GmaUPO	52	QSEIITAVQEGFNMGNSLAVETTYAAHLVDGNLITDQLSIGVKTALTGFTPPAPAVGG
PcrUPO	52	RFSQIINAVQEGFNMGNDLAKAQVYFNHLINGNLITDLSIGGKTSLTGHPDS-FSVGG
FibuUPO	52	TFAQIINAVQEGFNMGNDLAVTFCQHLVDGNLITDLSIGGKTSSTGCTNPPAPAVGG
LamUPO	52	TFAQIINAVQEGFNMGNDLAVFVYAAHLVDGNLITDLSIGGKTPQTGFPDPPAPAVGG
SstUPO	52	TFAQIINAVQEGFNMGNDLAVFVYAAHLVDGNLITNLLSIGSKTPLTGFNPPAPAVGG
HsuUPO	52	TFAQIINAVQEGFNMGNDLAVFVYAAHLVDGNLITNLLSIGGKTNETGEPAPAVGG
HciUPO	52	TFAQIINAVQEGFNMGNDLAVFVYAAHLVDGNLITNLLSIGGKTNETGEPAPAVGG
CciUPO	61	TFAQIINAVQEGFNMGNETARHTTYAHLMDGNLITDLSIGGKTKPKTGHDPFPAPAVGG
consensus	61	*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*
TwaUPO	112	LNTHGLFEGDASTTRGDAQFGDNHFNETLFOVLSKSKQYGGYKYNLTAABVRARIQ
TcoUPO	112	LNTHGLFEGDASTTRGDAQFGDNHFNETLFOVLSKSKQYGGYKYNLTAABVRARIQ
AbiUPO	112	LNTHALFEGDVSMTRDAFFGDHNSFNETLFDFTAFSNQFCGKYNLTVAAERHRHRIQ
GmaUPO	112	LNTHAVFEGDTSMTRGDAFFGNHNSFNETLFDDEFDFSNRFGGKYNLTVAAERKRRIQ
PcrUPO	111	LNKHITFEGDASVTRDAFFGDHNSFNETLFEFFRASRQSVDRGSDSKVLLLRQRFK
FibuUPO	112	LNTHVVFEGDASTTRGDAFFGDHNSFNETLFOVLDKSNITGGKYNLTAABLRARIQ
LamUPO	112	LDTHAVFEGDASMTRGDAFFGDHNSFNETQDFSAFNSRFGGKYNLTVAAERQRRIQ
SstUPO	112	LDTHAVFEGDASTTRDAFFGDHNSFNETLFDLQFSNSRFGGKYNLTVAAERQRRIQ
HsuUPO	112	LDTHAVFEGDASTTRGDAFFGDHNSFNETLFDLQFSNSRFGGKYNLTVAAERQRRIQ
HciUPO	112	LNTHAVFEGDASTTRDAFFGDHNSFNETLFDLQFSNSRFGGKYNLTVAAERQRRIQ
CciUPO	121	LNNHITFEGDASLRDAFFGDHNSDQBLFDQERNFSALYGNCFNNTVAABLRHRIQ
consensus	121	*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*
TwaUPO	172	DSIARNPFFDFTPRYFTAYESSFPPIRFVVDGRDT---SALGTMNARLFFQNTPEAD
TcoUPO	172	DSIARNPFFDFTPRYFTAYESSFPPIRFVVDGRDK---SALDMTARLFFQNTPEAN
AbiUPO	172	DSIATNPFFSFSPPRYFTAYAESFFPIRFFDGRQG---DGLDLTVARGFFQNMRFMDG
GmaUPO	172	DSIATNPFFSFSPPRYFTAYAESFFPIRFFDGRQH---DGLDLTVARGFFQNSMPPDD
PcrUPO	171	DSIATNPFFNYLTNRYFAAYQEGVFTYMLFVDGLSK---YPRRLMDAARSFFQFGKMDG
FibuUPO	172	DSIARNPFFDFVTPRYFTAYAESFFFYRFVVDGRDT---SALSLNTVARGFFQHNQPEAD
LamUPO	172	DSIATNPFFSFSPPRYFTAYAESFFPIRFFVVDGRVTS---DGRLSFNARGFFQNSQMPD
SstUPO	172	DSIATNPFFSFSPPRYFTAYAESFFETIRFVVDGEVA---NGCLNMDVARGFFQNSMSPAG
HsuUPO	172	DSIATNPFFSFSPPRYFTAYAESFFVAFVFDGRQT---NGCLDMTVARGFFQNTPEPN
HciUPO	172	DSIATNPFFDFTPRYFTAYAESFFPIRFFDGRDK---SLHLDMMVARGFFQNSRFPD
CciUPO	181	DSIATNPFFSFAGLRHIITAYABASFPPIRFVVDGRKTGAEBAGLDMAAAESFKHMMFPPD
consensus	181	***.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*
TwaUPO	229	FRRRSGETTNGOISGLTIQIAQRHYIQPGANKGACNYVVDNDPGFEG--GTGGLYKK
TcoUPO	229	FRRRSGETTNQISGLTIQIAQRHYIQPGSNQGACNYVVDNDPGFEG--GTGGLYNK
AbiUPO	229	FRRASMPGT---LEGLAEIASVHPISPGANVGVNTYTFDPSADFET---FCLLYVN
GmaUPO	229	FVRANGTR---ATAGINVAAAHPIQPGTNVGGVNNYVDPMSENFNT---FCLLYEN
PcrUPO	229	FRRANOPSSLENQLDEEVNAHPNITGONNGTVNSITAVPLSNPEPT---CLGYKD
FibuUPO	229	FRRRNGSFGLAETCPDSNARAPHPILPGHNDGACNYVVDPEDPGVAGGHGTQVLYTK
LamUPO	229	FRRNOSIGLDVIGDGISATASAHPIAPGKNEGVCNYVVDPTSADFEDH---FCLLYIN
SstUPO	229	FRRTNASAGLAAYRAGIGEVFAAHPIEPGANOGANTITDENSADEFD---ICKLYTD
HsuUPO	229	FRRSGVSSGLREIAGIQEVFVPHPIVPGGNAGVNSYTPNENSADFEN---FCKLYTD
HciUPO	229	FRRSNTSTLDVLCGGIDYIFSKHPVFPGSNNGTVNSYTPNENSADFQ---FCKLYTD
CciUPO	241	FRRPAPEN---SD-AQAVFEVHPFQPGRNVGGVNNYVDESLSGLLD---FCGFYEN
consensus	241	*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*
TwaUPO	285	HVTITVPSQYPISSTGALRTALKANLRTFYQCATSGG---SSNCPELFPYQO---
TcoUPO	285	HVSIITVPSQYFVGKTSGALLTALKINLHNFLCATNGG---SSNCPELFPYQO---
AbiUPO	281	FVNOVVRSLYPE---PTGNLKKALKKNLEHLYGPF---SDCCSQQVFPYQKDN
GmaUPO	281	FVNNFVGLYLPN---PTGALLQALNTNLDFFSGLS----DTGCTQVFPYQK---
PcrUPO	285	FVEQVPLLYPN---VTGDLRKSLEINLHLYFCEFT----SANTCEHFL----
FibuUPO	287	HVNVITLGLYLPN---PTGALKKALLENAAFTYQAVG---DDCTQVFPYQO---
LamUPO	284	FVNOVVRSLYLPN---PTGVLRLDALKRNLNLFYSPIN----GSDCVQFPYQK---
SstUPO	285	FVNVITVGLYLPN---PTGVLLNNLNTNLLLEQLA----NDGCTQVFPYQ---
HsuUPO	285	FVNVITVRSLYPT---ASGALLDALNTNLEFFGPIA----LLGCTQVPAFT---
HciUPO	285	FVNVITVRLYLPN---AKGALLTALKNLEYFYSPLV----GSGCFQVFPYQ---
CciUPO	292	FVNKTAKGLYLPN---PTGVLKRNLYINLDELALPKAGDGSQCFQVFPYQGH---
consensus	301	*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*.*.....*

Subfamilia 2

SniUPO	1	HTPPRST DVGLKL P----- DADHPF VAPG----- PGDMRG PCPLNT ANHGYP LPRNGV
SsuUPO	1	VLPRLP VDTGLKKIP----- DAAHPK APG----- ETDORG PCPLNT ANHGYP RTGL
JarUPO	1	TFFPPL PNTCSLIP----- DAHP MPFG----- PSDORG PCPLNT ANHGYP LPRNGV
GloUPO	1	SEKTRR AVGFDAAAQYVSNQ QYAE NPE KNVN TPL GDORG PCPLNANHGYP L HN GV
consensus	1*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
SniUPO	51	ASMEQI INNTR EGFN MD DLAA F DA F AMLARG NAF NRLS IGGE PLVP PPLPGQID GG
SsuUPO	51	ASMEQI INGT EGFN MD DLAA F DA F AMLARG NAF NRLS IGGE DHRV PPLPGQID GG
JarUPO	51	VSAA D LINGA Q EAFN DYNF S VALAS F ALLS R GNV LL DRV S IGL ES P L V P PLP G IDG --
GloUPO	61	AMIQ Q FI D CTY K V GM G ADL AF L AL YCA FDG -- DLT WS I GGP S IAT S L L GL GE F
consensus	61*.....*.....*.....*.....*.....*
SniUPO	111	SPGGI AKHGR FE G DV S MTR EDAAL G D S VNF Q DAL DELL Y T G FGD DS P TGN R SIV
SsuUPO	111	SPGGI AKHGR FE G DV S MTR QDAAL G D RHF Q D S L DC F L A Y G FGD NS P TGN Y SIV N
JarUPO	109	SPGGI GK HGR FE G DV S MTR EDF A L G D N VHF Q D L ANN L L T Y V AN S D E----- HIV S
GloUPO	118	QCIS S HN R EGD A S P TR P LYQ Y GN D YK V I KQ E Q FAL Q PD A T N----- YD
consensus	121*.....*.....*.....*.....*.....*
SniUPO	170	KKVM A E F K V AR F V DC A R N LS F HAG R I A SY N E A A F LN L F A NG T----- PGV L S I Q
SsuUPO	170	LKVM Q E F K W ER F DD Q S R DK L S F HAG R I G S Y N E A A F L K F F A NG T----- DEL T S I P
JarUPO	161	EVV Q E Y R E AR F V S Y L R N PL L F H V G R H CG F Y G E A E F L N F F PN K ----- EGN L Y P
GloUPO	169	LSV T P F AD R EQ Q S V SN P YF E NG A FT G V A VP A A T F I R F M KN S A E Y P ER L D Q E
consensus	181**.....*.....*.....*.....*.....*
SniUPO	224	M L G N I I R N----- CT F G A N W F R R S S ----- PGT F D L I T T Q A A E L LA V HP V S
SsuUPO	224	S L G S I F ER N----- CT F A E N W RR A S ----- PGD V L L L A TS S V L S A HP V Q
JarUPO	215	V T S F EQ H----- E T F P Q G W F R A L ----- R F T D G V I N A A D V E L HP V P
GloUPO	228	T L K S F S V T GT P GN F K W T E Y E KI P DN W K R A I G D E Y TI F F L T D L AAAA Q Y P K F L S L G
consensus	241*.....*.....*.....*.....*
SniUPO	265	PGAN D EN G NY I V D PF S T PC N A A Y DL A V L S PA S Y S----- AT G L F R ----- EN V
SsuUPO	265	PGQ A N P N L Y T TD PP Y VC P C N A A Y YL A V L N LP Y TY T L I N H S T L F A ----- EN V
JarUPO	256	A G A K N A S C V Y ED G ES Y TD I C L Y L N L AG E N VP A V L L ----- NT G L F R ----- Q N V
GloUPO	288	G N T G T V NS F TG V D P AD L G S V F N A D T L E GN A V C YI QL A E MA P D L G I L T D V T R PM
consensus	301*.....*.....*.....*.....*
SniUPO	311	D T L L G --- A L A K P F G C P V I Q P Q----- G P V G V ---
SsuUPO	316	K T L L G --- V L A G A E N C T V I F E A----- G F V G T ---
JarUPO	304	D T L R G V Y I F E L N C T L V E P S ----- G H A G V ---
GloUPO	348	D M L T Q G I T Q V L K P I N C P V Q D I D K S Q F A Q P F A K S A Y
consensus	361*.....*.....*.....*.....*

Subfamilia 3

AnaUPO	1	Y G--- I F D A A S Q R V D V S G A H A F N PP --- G A G D Q R G P C P L N A L A N H G Y L P H N G V G T I D Q F I T
AmeUPO	1	A G--- I F D A A S Q R V D V S G R H A F N PP --- G S G D Q R G P C P L N A L A N H N Y L P H N G V G T I D E F I D
NdiUPO	1	E K R L L F D P L T P L V I G D H K F F P D F E NG A Q R G P C P L N S L A N H G Y I S R K G V T S L V E V T G
consensus	1**.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
AnaUPO	57	S T G Q V F G M G DL A T I L A V Y G A I D GN L L S W --- S I G G P T P N V P S I N ----- L L G Q P Q I
AmeUPO	57	S T S V F G M G AD L AA L A V Y G A A I D GN L L E W --- S I G G P T A N V P S I N ----- L L G Q P Q I
NdiUPO	61	A I N Q L G M G DL A T I L A T M G T V F V G N P L S L N P G F S I G D A A S G A Q N L G N L G G L L G T ER G L
consensus	61*.....**.....*.....*.....*.....*.....*.....*
AnaUPO	108	S G S H N K Y E G D A S P T R G D L Y V D G Q D Y L L K M E N F Q A L Y D A G K A D D N Y D L Q L L T D R R A A R F Q E
AmeUPO	108	S G S H N K Y E G D A S P T R G D L Y V D G Q D Y L L K M K N F Q A L Y D A G K A D D N Y D L Q L L T D R R A A R F Q E
NdiUPO	121	N G S H N I I E G D S N TR D L Y V T GD A S T V M E FQ S L Y D M S T CG D Y D FT FA H R A S I R F HE
consensus	121**.....**.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
AnaUPO	168	N I D G N P Y F F N A P F S G V V A Q P A A W S F I Y R F M KN S A E Y P A G K L N G E V L K S F Y A I T G D G N F
AmeUPO	168	N I D G N P Y F F N A P F S G V V A Q P A A W S F I Y R F M KN S A E Y P A G K L D G E V L K S F Y A I T G D G N F
NdiUPO	181	T V A T N P E N Y P F G V A R N A G Y L E A R M F A N H S A E N F CG V L N K E L K S F A M Q G E CS L
consensus	181**.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
AnaUPO	228	T Y T P G H ER I P E N W Y T R N Q D P Y D L L N Q D T T F OL L Q H L E F A S I G G N T G T NS F V G V D PE
AmeUPO	228	T Y T P G H ER I P E N W Y T R N Q D P Y D L L N V D V D Q L L Q H L E F A S I <i>G</i> G N T G T NS F V G V D PE
NdiUPO	241	T Y K R G H ER I P E N W Y --- R T P D Y G L L S L N V D I A L A K Y E L S I G G N M G K V N AG V D L S
consensus	241	**.....*.....**.....*.....*.....*.....*.....*.....*
AnaUPO	288	L L T D G V F N A C T L L Q G N L M C Y L Q L A V Q E L P D L S L G L V T N L S A L N Q V S S A F G N A T E K L G
AmeUPO	288	E L T N G V F N A A T L T Q G N N M C Y L Q L V V Q E L P D L S L G V T N L S A N Q V S S A F G N A T E K L G
NdiUPO	299	N L T G V L N L E K L E GN N L M C V F E V K T V A P N S L S T L F I I K V P K L V D T L G A I L D L
consensus	301	**.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*
AnaUPO	348	C E L T K I N Q--- D Q F N----- K Y P G Y T K L K S D G T Y
AmeUPO	348	C E K L T Q I N Q --- D Q F N----- K Y P G Y T K L K S D G T Y
NdiUPO	359	C E A F E D TV G K S GD G M E Q K P G --- A K L S G S V L
consensus	361	**.....*.....*.....*.....*.....*.....*

PsuUPO 275 PVFGGNVN-GAFVGLDFPP-IEGGNT-AAKPSDYACLLYQLISGFPSSLNLVLTPT
PscUPO 275 PVGIIGNVD-GAFVGLDFPP-IEGGNT-AATPADYACFLYQLISGFPSSLNSITPL
PspUPO 279 PKLFGGNVAGNFLAINTTFCIENGTIPGDATAADFTCLLYQLADNIPGTVGNEAALP
AriUPO 591 PVIEFGNTEIGSFGNG-LNYGAIQNGKIIPNITPAITVCLLYQVAMGQPSLNGITPA
consensus 601 *...***...*...***...*

PsuUPO 332 IHALQFVLTMLGSSFTNLGCAIPVTK
PscUPO 332 VHALBEVLEVEVGGETFTNLGCPPLTR
PspUPO 339 IIVLANVLTQIN-PVFGNLGCPPLKLS-
AriUPO 650 VVALSFAAKHVD-PLFENLGCPRPLT-
consensus 661 ...*...***...*

Subfamilia 5

KbrUPO 1 APLQLNGLLNTIKSKVNELNENVVPAGDLLNTKITDITETTYKAFGIVRGCQ-----
UmaUPO 1 APLHLNLFNDIKNKVAELNSNVVDPVGSLLNTKITDITPEISYNTFGRRDL-----
SreUPO 1 ADATQLGLTFSDKSKASELNDESYVAGAGYLDVQVTDITPNTYEAFCRRDG-----
ColUPO 1 IIPGKNNLFSIINGVAEFG-NVSVPOGAFENKDWSTIBEDIQYTFNIDRNNDCGC
ManUPO 1 ADFQLGDLISDKSKVSELTKKAVNDAGELLNTKITDITAEKIYATFGRRDG-----
consensus 1*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

KbrUPO 56 -----GLPPAEDAHPWQAPPAGAKRGPCPLNTIANHGYPRLNGVNP ELLIGT
UmaUPO 56 -----GLLPPAEDKYHPWQPPKAGAKRGPCPLNTIANHGYPRLSGVNP ELLVGT
SreUPO 56 -----GLLPPAEDDEHPWQPPKAGAKRGPCPLNTIANHGYPRLGIVNP ELLVGT
ColUPO 60 DEPERLGYG WGI EDEAHPWQAFGFNDQRGPCPLNTIANHGYPRDGIVNP QLFVGT
ManUPO 56 -----GLLPPAEDAHPWQPPKAGAKRGPCPLNTIANHGYPRLSGVNP ELLVGT
consensus 61*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

KbrUPO 108 FEGNLNSPDLAAILAISFVGMGDLLOKLSIGDRYGLDGLNHHGILEGDASVTRKDHY
UmaUPO 108 FEGNLNSPDLAAILAISFVGMGDLLOKLSIGCRYGLGGLSHHGILEGDASVTRKDNV
SreUPO 108 FEGNLNSPDLAAILVVISFVGLGDLLOKLSIGDRYGLGGLSHHGILEGDASVTRQDHY
ColUPO 120 VRGLNSPDVYAILTVLSIPFMGDLTMMKLSIGTVGLDGLAHHGILEGDASVTRDDAV
ManUPO 108 FENGLNSPDLAAILAIAISFVGMGDLLOKLSIGDRYGLGGLSHHGILEGDASVTRKDHY
consensus 121 .**...***...*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

KbrUPO 168 FGNWDADPALVAQFINETNTYGNGLVSWLSANRYRAWDRGRNNPQDFDNPWRMLVA
UmaUPO 168 FGNWDADPKLVKQFTEINTYCKGNVNSWLSANRYRAWDRGRNNPQDFDNPWRMLVA
SreUPO 168 FGNWDADPDLVDMFINETNTYGNGNVNSWLSANRYRAWNRGRNNPQDFDNPWRMLVA
ColUPO 180 QGNQNSLSQDRWNQKKEIITFCNGHVTKALAEARYRAWKSYDNNPQDFDNPWRMLVA
ManUPO 168 FGNWDADPQLVAQFINETNTYGNGNVNSWLSANRYRAWDRGRNNPQDFDNPWRMLVA
consensus 181 .**...*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

KbrUPO 228 YGESGFVHEVLRGSSVVFDESMIKSWFLDERFPKWSKRLVPESTPEILAWAGIIEVAKF
UmaUPO 228 YGESGFVHEVLRGSSVVFDESMIKSWFLDERFPKWSKRLVPESTPEILAWAGIIEVAKF
SreUPO 228 YGESGFVHEALRGSYVVFDESMISWFLDERFPKWSKRLVPESTPEILAWAGIIEVAKF
ColUPO 240 YGESGFVYQALRGDARETVDMVESWFLDERFPKWSKRLVPESTPEILAWAGIIEVAKF
ManUPO 228 YGESGFVHEALRGSYVVFDESMIKSWFLNERFPEKWSKRLVPESTPEILAWAGIIEVAKF
consensus 241 *.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

KbrUPO 288 TTPGWSIG-KGAFIPLPTTDGAYQELASLDPKTTGATLGRLECDAGNAVLGFFPSQITN
UmaUPO 288 TTPGWSIG-KGAFIPLPTTDGAYQELKSLDPKTTGATLESLECDASNAVLGFFPSQITN
SreUPO 288 TTPGWSIG-RGMFIPLPTTDGAYKELASLDPKTTGATLSNLECDAGNAVLGFFPSQITN
ColUPO 300 AIPGWRIF-GMIGLNFHTLSTFFKPGPG-ATGSSTLKDTGCNVNIVLTVPESTFEN
ManUPO 288 TTPGWSIGKKGAFIPLPTTDAYKELASLDPKTTGATLGELECDAGNAVLGFFPSQITN
consensus 301 .**...*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

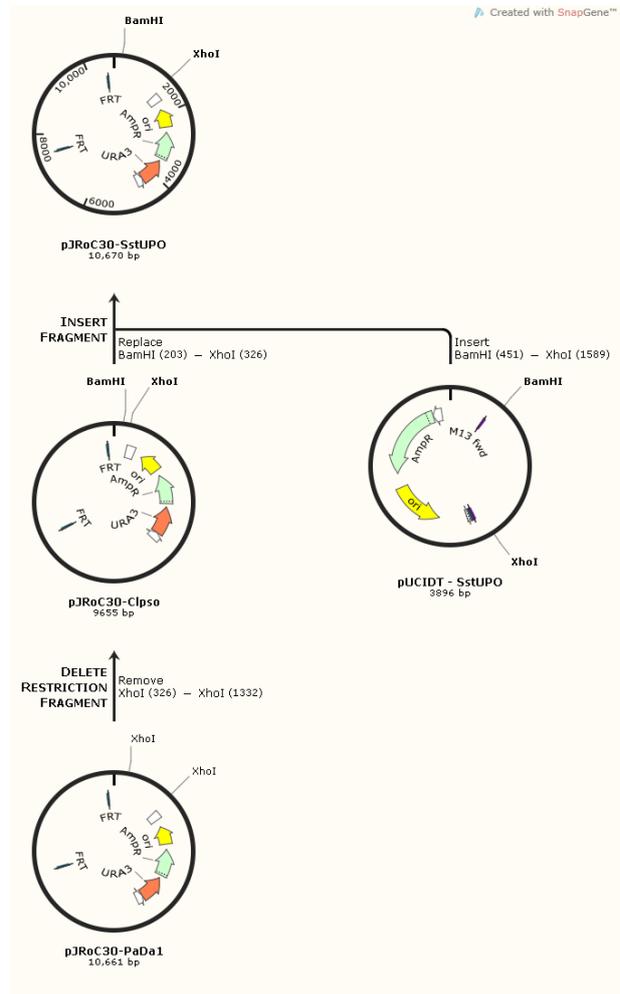
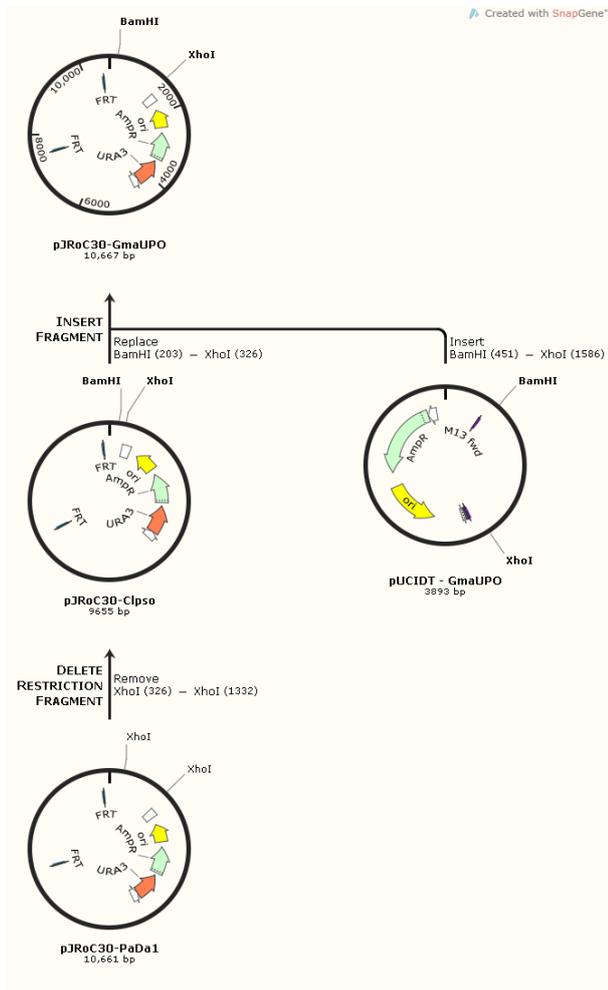
KbrUPO 347 LLAGIGIKGVGIPKRC-
UmaUPO 347 LLGVIGIKGVGQPKRC-
SreUPO 347 LLGNFGIQGVGEGFKCH
ColUPO 357 LLGGNIGQINQVSC-
ManUPO 348 LLGNFGIKGVGSTKRC-
consensus 361*.....*

Detalle de aminoácidos aromáticos en secuencias de UPOs seleccionadas

AaeUPO	1	--MKYFPLFPTLV--FAARVVAFFPAASLAGLSQQ-----EL
S. stellat	1	--MARFAALLGFV--LASTVLAFPAHESLAGLSRE-----VL
G. margina	1	--MRGTAIILSVLIALFANAATAFFPAGSLAGLTKE-----QL
U. maydis	1	MKLSFNLPLLLSAAAFMAAPALALPNLHAMMAPGPNGEPHLEKRLLSANPLHLNNLFNDI
consensus	1*.*.*.....
AaeUPO	34	DAIIPLEAREPGLPPGLENSSAKLVN-----DEAHPKPLRP
S. stellat	34	DQIIPTLKLAKP PPPGPLNDTSAKLVN-----DPAHP LPLRH
G. margina	36	DEVLP TLEIRELTS PPGPLNDTSAKLVN-----DKAHP MPVAP
U. maydis	61	KNKVAELNSNVTVPDVGSLLNTKITDITPESIYNTFGIRRD LGLLPPAEDKYHPQPPK
consensus	61*.....*.*.....*.....*
AaeUPO	73	GDIRGPCPGLNNTLASHGYLPRNGVATPVQI INAVQEGLNFDNQAAVFATYAAHLVDGNLI
S. stellat	73	GDIRGPCPGLNNTLASHGYLPRNGIATPAQIVNAVQEGFNMGNLAVFVYAAFLVDGNLV
G. margina	75	ADIRGPCPGLNNTLASHGYLPRNGIASPSEIITAVQEGFNMENS LAVFITYAAHLVDGNVL
U. maydis	121	GAKRGPCPGLNTIANHGYLPRSGVINPIDLIVGTF LGLNLSPLDLAGILAAISFVGMGDDL
consensus	121	...*****.*.*.*.*.....*.....*
AaeUPO	133	TDLLSIGRKT RL TGPDP P P P P A S V G G L N E H G T F E G D A S M T R G D A F F G N N H D F N E T L F E Q L V
S. stellat	133	TNLLSIGSKT P L T G P N P P A P A I V G G L D T H A V F E G D A S T T R A D A F F G D N H S F N E T L F Q E L V
G. margina	135	TDQLSIGVKTALTGPT P P A P A I V G G L N T H A V F E G D T S M T R G D F F F G N N H D F N E T L F D E F V
U. maydis	181	QMKLSIGGRYGLGG-----GLSHHGILEGDASVTRKDN YFGNSDADDPKLVKQFI
consensus	181	...**** ..*.*.....**.*.....**.*.....**.*.....*
AaeUPO	193	DYSNRFGGKYNLTVAGELRFKRIQDSIATNP NFSFVDFRFFTA YGETTFPANLFVDGRR
S. stellat	193	SFSNKFGAGNYNLTVGGQFRFQRIQDSIATNPQFSFISPRYFTA YAESVFPTIFFVDGRV
G. margina	195	DFSNRFGGKYNLTVASEFRKRIQDSIATNP TFSFVSPRYFTA Y AESTFPINFFIDGRQ
U. maydis	231	QETNTYKGNVNIWISLANSRYRAN DYGRKNNPVDFNFRMLVAYGESGFVHEVLRG---
consensus	241	...*.*.*.*.....*.....**.*.....**.*.....**.*.....*
AaeUPO	253	DDGQLMDAARSFFQFSRMPDDFFRA PS PR----SGTGVEVVIQAHMPQGRNVGKINSY
S. stellat	253	ANGQLNMDVARGFFQNSMPAGFFRTNASAGLAAVAAGIGE VFAAHP IEPGANQGAINTF
G. margina	255	HGQLDLTVARGFFQNSMPDDFYRANGTR----ATAGIN VVA AHP IQPGTINVGGVNNY
U. maydis	288	SFVKFDETMIKNFIDERFPKGSKRIVPMTTPEILAGIVFVAKPTIPGWSIGKGAFI
consensus	301*.....*.....*.....**.*.....**.*.....**.*.....*
AaeUPO	309	TVDP TSSDFSTPCLMYEKFVN-ITVKSLY PNPTVQLRKALNTNLDFFFQVA-AGCTQVF
S. stellat	313	TLDPNSADFS DI CKLYTD FVN-ITVKGLY PNPTGVLLNNLNTNLNLFQPLANDGCTQVP
G. margina	311	VVDPMSANFNTFCLLYENFVN-NTVKGLY PNPTGALLQALNTNLDFFFSGISDTGCTQVF
U. maydis	348	PLPTDGA YQELKSLLDPKTTGATLESLLCDASNAVLGFFPSQITNLLGVIGIKVGVAQF
consensus	361*.....*.....*.....*.....*
AaeUPO	367	PYGRD
S. stellat	372	PFG--
G. margina	370	PYGK-
U. maydis	408	KCK--
consensus	421

En verde y amarillo se muestran los residuos de Trp y Tyr presentes en las secuencias.

Historia de clonamiento para la producción de los plásmidos pJRoC30-GmaUPO y pJRoC30-SstUPO.



ANEXO 4: Posición de residuos que integran el túnel en la secuencia primaria para las UPOs estudiadas.

Tabla A.4.1. Residuos de aminoácidos que conforman el túnel para cada una de las UPOs hipotéticas evaluadas. En rosado, se presentan los residuos que conforman el túnel de AaeUPO. En verde se presentan los residuos de las diferentes UPOs hipotéticas tras alineamiento con el túnel de AaeUPO. En Azul por su parte se presentan los residuos observados que integran el túnel en los modelos generados para cada una de las UPOs hipotéticas.

Túnel AaeUPO - Propuesto en Ramirez et al. 2020								GmaUPO - Observado							
F-69	D-70	Q-72	A-73	F-76	A-77	T-78	A-80	M-66	E-67	S-69	L-70	F-73	I-74	T-75	A-78
A-81	F-121	F-188	R-189	F-191	T-192	E-196	F-199	F-118	P-185	R-186	F-188	T-189	A-192	E-193	F-196
L-203	S-240	F-274	A-316	A-317				F-200	F-271	S-313	D-314				
AbiUPO - Observado								GmaUPO - Alineamiento desde LPPG respecto a AaeUPO							
M-66	V-70	A-71	L-73	V-74	A-77	F-118	F-188	M-66	E-67	S-69	L-70	F-73	I-74	T-75	A-77
T-189	A-190	A-192	E-193	F-196	F-200	G-237	L-238	A-78	F-118	P-185	R-186	F-188	T-189	E-193	F-196
								F-200	A-237	F-271	S-313	D-314			
AbiUPO - Alineamiento desde LPPG respecto a AaeUPO								UmaUPO - Observado							
M-66	E-67	S-69	V-70	L-73	V-74	T-75	A-77	L-59	L-63	A-64	I-66	L-67	A-68	L-101	G-103
A-78	F-118	P-185	R-186	F-188	T-189	E-193	F-196	S-106	V-107	W-168	R-169	L-171	V-172	A-173	Y-174
F-200	G-237	F-271	S-313	D-314				G-175	E-176	S-177	G-178	F-179	V-180	T-217	T-218
HciUPO - Observado															
M-66	L-70	A-71	F-73	V-74	F-118	F-188	T-189	P-219	L-222	S-260	L-262	D-263			
A-190	A-192	E-193	S-194	I-195	F-196	T-237	L-238	UmaUPO - Alineamiento desde LPPG respecto a AaeUPO							
D-239	L-316							L-59	S-60	D-62	L-63	I-66	L-67	A-68	I-70
HciUPO - Alineamiento desde LPPG respecto a AaeUPO								S-71	L-101	W-168	R-169	L-171	V-172	E-176	F-179
M-66	G-67	D-69	L-70	F-73	V-74	T-75	A-77	V-183	T-217	Y-255	G-298	I-299			
A-78	F-118	P-185	R-186	F-188	T-189	E-193	F-196	LamUPO - Observado							
F-200	T-237	F-275	V-317	G-318				M-66	L-70	A-71	V-72	F-73	V-74	T-75	A-78
SstUPO - Observado								F-118	R-186	F-188	T-189	A-192	E-193	F-196	F-200
M-66	G-67	D-69	L-70	F-73	V-74	T-75	A-77	N-316							
A-78	F-118	P-185	R-186	F-188	T-189	A-192	E-193	LamUPO - Alineamiento desde LPPG respecto a AaeUPO							
F-196	F-200	G-237	L-238	F-275	A-317	N-318		M-66	G-67	D-69	L-70	F-73	V-74	T-75	A-77
SstUPO - Alineamiento desde LPPG respecto a AaeUPO								A-78	F-118	P-185	R-186	F-188	T-189	E-193	F-196
M-66	G-67	D-69	L-70	F-73	V-74	T-75	A-77	F-200	G-237	F-274	N-316	G-317			
A-78	F-118	P-185	R-186	F-188	T-189	E-193	F-196	HsuUPO - Observado							
F-200	G-237	F-275	A-317	A-318				M-66	L-70	A-71	F-73	V-74	T-75	A-78	F-118
								Y-188	R-186	T-189	Y-191	A-192	E-193	F-196	L-238
								E-240	I-245	F-249	F-275	S-276	F-278		
								HsuUPO - Alineamiento desde LPPG respecto a AaeUPO							
								G-67	N-68	L-70	A-71	V-74	T-75	Y-76	A-78
								F-79	E-119	R-186	F-187	T-189	A-190	S-194	P-197
								F-201	L-238	S-272	G-314	P-315			