

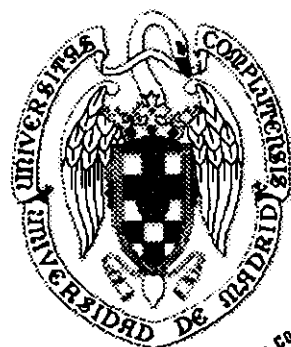
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN NUEVO TIPO DE PEROXIDASA LIGNINOLÍTICA

Francisco Javier Ruiz Dueñas

TESIS DOCTORAL



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Madrid 1998



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN NUEVO TIPO DE PEROXIDASA LIGNINOLÍTICA

Tesis presentada por Francisco Javier Ruiz
Dueñas para optar al grado de Doctor en
Biología por la Universidad Complutense de
Madrid



X-53-348607-5

Vº Bº del Director de la Tesis



Angel T. Martínez Ferrer
Investigador Científico
CIB, CSIC, Madrid



Fºº Javier Ruiz Dueñas

Madrid, Diciembre 1998

A mis padres

A mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), y ha sido parcialmente financiado por el proyecto del Programa Nacional de Biotecnología "Estudio y evaluación de los mecanismos enzimáticos y radicalarios en la degradación de la lignina por los hongos del género *Pleurotus* y *Phanerochaete*" (CYCIT Bio96-0393), y por el proyecto europeo "Biological delignification in paper manufacture" (AIR2-CT93-1219). Además, se ha contado con una ayuda de la Fundación Caja Madrid.

A continuación quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido a la elaboración de esta tesis:

Al Dr. Angel Martínez, director de esta tesis, por su esfuerzo y dedicación, y por la confianza que ha depositado en mí en todo momento, contribuyendo de esta manera a que haya podido adquirir mi formación científica durante estos años. También quiero agradecer el trato humano que siempre me ha dispensado, tanto dentro como fuera del laboratorio.

A la Dra. M^a Jesús Martínez por introducirme en el complejo mundo de la ciencia y haber sido en todo momento una maestra excepcional tanto a nivel científico como humano. Gracias por tu apoyo incondicional.

Al Dr. Paco Guillén por sus enseñanzas científico-económicas. Éstas me han permitido experimentar emociones fuertes tanto en el campo de las especies activas de oxígeno como en el mundo de otros activos en el que más de una vez he necesitado algo de oxígeno.

A la Dra Josefina Rodríguez de Lecea, tutora de esta tesis, por las facilidades que en todo momento me ha dado, no sólo desde el comienzo de la aventura que siempre supone la realización de una tesis sino desde mucho antes, cuando fui alumno suyo allá por el año 1989.

Al Dr Miguel Angel Peñalva por su asesoramiento científico y por haberme facilitado el material necesario para los experimentos de expresión heteróloga.

Al Dr Antonio Romero por la ayuda en la elaboración de los modelos moleculares.

A la Dra Luisa Botella por su inestimable ayuda en mis comienzos en el campo de la Genética Molecular.

Me gustaría agradecer también a todos mis compañeros de laboratorio, Susana, Ana, Elisa, Carmen, Brigitte, María José, Marta, Víctor, Lucilia, José María, Sovan, Oscar, Raul, María del Carmen, Carmelina, Angelines, Tere y Ramón, los buenos momentos que hemos pasado y el estupendo ambiente de laboratorio que entre todos hemos contribuido a generar. A Elisa, su ayuda en el mundo de las hibridaciones, y a Susana, su colaboración en los estudios con la siempre ingrata peptona.

También tengo que agradecer a los chicos y chicas del grupo de Virus Vegetales, Maite, Belén, Benjamín César, Ana, Félix, Esteban, Maribel y Pablo, por los buenos momentos tanto dentro como fuera del CIB.

A Patricia, con quien he compartido los años de carrera universitaria y tesis, por haberme apoyado en los buenos y malos momentos, y por haberme hecho ver que también fuera del laboratorio hay todo un mundo por descubrir.

Y por último, quiero agradecer a mi familia su cariño, apoyo, y la confianza que siempre ha depositado en mi.

ABREVIATURAS

A	alanina
AAO	aril alcohol oxidasa
ABTS	2,2,-azinobis (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato)
APX	ascorbato peroxidasa
ARP	peroxidasa de <i>Arthromyces ramosus</i>
C	cisteína
CcP	citocromo <i>c</i> peroxidasa
CIP	peroxidasa de <i>Coprinus cinereus</i>
D	aspartato
DHP	polímero sintético de deshidrogenación de alcoholes cinamílicos ("dehydrogenation polymer")
DMP	2,6-dimetoxifenol (siringol)
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
E	glutamato
EDTA	tetracetato de etilendiamino ("ethylenediamine tetracetate")
ϵ	coeficiente de extinción molar
F	fenilalanina
G	glicina
H	histidina
HRP	peroxidasa de rábano (<i>Armoracia rusticana</i>) ("horseradish peroxidase")
HSE	elemento de respuesta a choque térmico ("heat shock element")
I	isoleucina
IEF	isoelectroenfoque
IPTG	isopropil tio- β -D-galactósido
K	lisina
KTBA	ácido 2-ceto-4-tiometilbutírico ("2-keto-4-thiomethylbutyric acid")
L	leucina
LiP	lignina peroxidasa
M	metionina
MALDI-TOF	espectrometría de masas de tiempo de vuelo tras desorción-ionización por láser asistida por matriz ("matrix-assisted laser desorption and ionization-time of fly")
MnP	manganeso peroxidasa
Mr	masa molecular relativa
MRE	elemento de respuesta a metales ("metal response element")
N	asparagina
NMR	resonancia magnética nuclear
OD	densidad óptica
ORF	fase abierta de lectura ("open reading frame")

P	prolina
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
pfu	unidades formadoras de placas de lisis (“plaque-forming units”)
pI	punto isoeléctrico
PNP	peroxidasa de cacahuete
Q	glutamina
R	arginina
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	transcripción reversa seguida de una amplificación por PCR
S	serina
SDS	dodecil sulfato sódico
T	treonina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
V	valina
W	triptófano
Y	tirosina

ÍNDICE

RESUMEN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PEROXIDASAS	5
1.1.1 Ciclo catalítico	6
1.1.2 Clasificación	7
1.1.2.1 clase I: Peroxidasas de procedencia procariota	7
1.1.2.2 clase II: Peroxidasas fúngicas	7
1.1.2.3 clase III: Peroxidasas de secreción en plantas	8
1.1.2.4 Procesamiento y secreción	8
1.1.3 Características estructurales	9
1.1.4 Centro activo	11
1.1.4.1 Residuos del lado proximal	11
1.1.4.2 Residuos del lado distal	12
1.1.5 Sitios de unión a sustratos	13
1.2 PEROXIDASAS LIGNINOLÍTICAS	15
1.2.1 Descubrimiento de estas enzimas	15
1.2.2 Mecanismo de acción	18
1.2.2.1 Lignina peroxidasa	19
1.2.2.2 Manganeso peroxidasa	24
1.2.3 Clonación de genes <i>lip</i> y <i>mnp</i>	26
1.2.4 Aspectos estructurales	27
1.2.4.1 Oxidación del Mn^{2+} por la MnP	27
1.2.4.2 Dependencia del pH	28
1.2.4.3 Potencial de reducción	29
1.2.4.4 Papel de los carbohidratos	30
1.2.5 Aspectos biotecnológicos	30
1.3 OBJETO DEL TRABAJO	33

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MICROORGANISMOS Y VECTORES	37
2.1.1 Hongos	37
2.1.2 Bacterias	37
2.1.3 Vectores	39
2.2 MEDIOS Y SOLUCIONES	40
2.2.1 Medios de cultivo	40
2.2.2 Soluciones	42
2.3 VALORACIONES ENZIMÁTICAS	43

2.3.1 AAO	43
2.3.2 Lacasa	43
2.3.3 LiP	43
2.3.4 MnP	44
2.3.5 Peroxidasa independiente de Mn ²⁺	44
2.4 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PEROXIDASAS	44
2.4.1 Preparación de inóculos y condiciones de cultivo	44
2.4.2 Purificación	45
2.5 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE PEROXIDASAS	45
2.5.1 Valoración de proteínas	45
2.5.2 Concentración de peróxido de hidrógeno	45
2.5.3 PAGE y determinación de la <i>Mr</i>	46
2.5.4 Isoelectroenfoque	46
2.5.5 Contenido en carbohidratos y desglicosilación	47
2.5.6 Análisis de aminoácidos	47
2.5.7 Determinación de la secuencia N-terminal	47
2.5.8 Hidrólisis con tripsina	48
2.5.9 Inmunodetección	48
2.6 AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	48
2.6.1 Aislamiento de ácidos nucleicos	48
2.6.2 Electroforesis en geles de agarosa	49
2.6.3 Análisis de DNA genómico por el método de “Southern”	49
2.6.4 Análisis de mRNA	50
2.6.5 Marcaje de ácidos nucleicos	50
2.6.6 Amplificación de ácidos nucleicos por PCR	50
2.6.7 Secuenciación automática de DNA y análisis de las secuencias	51
2.6.8 Preparación y transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	51
2.7 CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN Y MODELADO MOLECULAR	51
2.7.1 Diseño de cebadores y preparación de sondas de DNA de la proteína MnPL	51
2.7.2 Librería genómica de <i>Pleurotus eryngii</i>	52
2.7.2.1 Construcción	52
2.7.2.2 Titulación	53
2.7.2.3 Amplificación	53
2.7.2.4 “Screening”	54
2.7.3 Librería de cDNA enriquecida	54
2.7.3.1 Construcción	54
2.7.3.2 Titulación	54
2.7.3.3 “Screening”	55
2.7.4 Modelado molecular de la proteína MnPL	55
2.8 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL	55
2.8.1 Efecto de la fuente de nitrógeno y Mn ²⁺	55
2.8.2 Efecto del estrés oxidativo	56

2.9 EXPRESIÓN HETERÓLOGA	56
2.9.1 Expresión en <i>Escherichia coli</i>	56
2.9.1.1 Vectores de expresión	56
2.9.1.2 Producción de la peroxidasa recombinante	57
2.9.2 Expresión en <i>Emericella nidulans</i>	58
2.9.2.1 Vector de expresión	58
2.9.2.2 Preparación y transformación de protoplastos de <i>Emericella nidulans</i>	58
2.9.2.3 Producción y purificación de la peroxidasa recombinante	59

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA PEROXIDASA MNPL DE <i>Pleurotus eryngii</i>	63
3.1.1 Producción: Influencia de la fuente de nitrógeno y efecto del Mn ²⁺	63
3.1.2 Purificación	65
3.1.3 Caracterización fisico-química	65
3.1.4 Propiedades catalíticas	67
3.2 CLONACIÓN Y SECUENCIA DEL GEN <i>mnpl</i>	70
3.2.1 Elaboración de sondas homólogas de DNA	70
3.2.2 “Screening” de las librerías genómicas y de cDNA	70
3.2.3 MnPL1 y MnPL2 proceden de dos alelos del gen <i>mnpl</i>	73
3.2.4 Descripción de la secuencia de nucleótidos del gen <i>mnpl</i>	73
3.2.5 Descripción de la secuencia de aminoácidos	77
3.2.6 Comparación de los alelos <i>mnpl1</i> y <i>mnpl2</i>	79
3.2.7 Secuencias relacionadas en otros hongos ligninolíticos	82
3.3 MODELADO MOLECULAR DE LA PEROXIDASA DE <i>Pleurotus eryngii</i>	85
3.3.1 Descripción del modelo	85
3.3.2 Superposición de la peroxidasa MnPL con otras peroxidases de hongos	88
3.4 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN <i>mnpl</i>	90
3.4.1 Influencia de la peptona	90
3.4.2 Efecto del Mn ²⁺	94
3.4.3 Respuesta al estrés oxidativo	94
3.5 EXPRESIÓN HETERÓLOGA	99
3.5.1 Expresión en <i>Escherichia coli</i>	99
3.5.2 Expresión en <i>Emericella nidulans</i>	101
3.5.2.1 Cepas con una fusión transcripcional capaz de expresar transcritos <i>mnpl2</i>	101
3.5.2.2 Expresión de la peroxidasa MnPL2* por <i>Emericella nidulans</i> MPR2	103
3.5.2.3 Purificación de la peroxidasa recombinante	104

4 DISCUSIÓN

4.1 INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y DEL Mn^{2+}	111
4.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS PEROXIDASAS DE <i>Pleurotus eryngii</i>	113
4.3 COMPARACIÓN CON OTRAS PEROXIDASAS FÚNGICAS	115
4.3.1 Estructura génica de las peroxidasas fúngicas	115
4.3.2 Comparación de secuencias de varias peroxidasas fúngicas	116
4.3.3 Búsqueda de secuencias relacionadas con el gen <i>mnpl</i> en otros hongos ligninolíticos	121
4.4 ANÁLISIS DE UN MODELO MOLECULAR	122
4.4.1 Centro activo	122
4.4.2 Sitio de unión a Mn^{2+}	123
4.4.3 Oxidación de otros sustratos	124
4.5 RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO	128
4.6 EXPRESIÓN HETERÓLOGA	130

5 CONCLUSIONES

6 REFERENCIAS

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica producida en cultivos líquidos del hongo *Pleurotus eryngii*. La búsqueda de esta enzima estuvo motivada por el hallazgo relativo a la degradación de la lignina mediada por manganeso en cultivos de *Pleurotus*. Tras los primeros estudios, en los que se trató de detectar una MnP típica, se comprobó que la peroxidasa que se había purificado difería de las producidas por otros hongos ligninolíticos, tanto en la regulación de la expresión como en las propiedades catalíticas. Esta peroxidasa no sólo oxida eficientemente el manganeso (sustrato de la MnP), sino que también puede oxidar otros compuestos aromáticos como el alcohol veratrílico (sustrato típico de la LiP). Además muestra gran actividad sobre fenoles, compuestos que ni la MnP ni la LiP son capaces de oxidar directamente, y varios colorantes. Esta nueva enzima se purificó como dos proteínas denominadas MnPL1 y MnPL2. El conocimiento de la secuencia del extremo amino terminal y de determinadas porciones internas de la proteína MnPL1 permitió clonar las secuencias de DNA y cDNA correspondientes a las dos proteínas purificadas, comprobándose que ambas son realmente el producto de dos alelos del gen *mnpl*. Las dos secuencias de aminoácidos presentan una identidad del 99%, constan de 361 aminoácidos (incluyendo un péptido señal de 30 aminoácidos) y se diferencian en tan solo tres residuos. Las secuencias de DNA que flanquean las regiones codificantes también son parecidas, con la única diferencia significativa de una delección de siete nucleótidos en un posible elemento de respuesta a metales presente en el promotor del alelo *mnpl1*. La secuencia de aminoácidos de la peroxidasa MnPL (proteínas MnPL1 y MnPL2) presenta mayor identidad con las isoenzimas de LiP (58-60%) de *Phanerochaete chrysosporium* que con las de MnP (55%) producidas por este mismo hongo, y cuando se comparó con otras 22 peroxidases fúngicas quedó englobada conjuntamente con las peroxidases de *Trametes*. Tras hibridación con la sonda de DNA de la peroxidasa MnPL se detectó la presencia de secuencias relacionadas con el gen *mnpl* en otros hongos ligninolíticos en los que hasta ahora no se había detectado actividad peroxidasa. La estructura molecular de la proteína MnPL de *Pleurotus eryngii* (obtenida por modelado de homología utilizando como molde la estructura cristalográfica de tres peroxidases fúngicas) se ajusta más a la LiP que a la MnP (con unas distancias medias entre los C α de 1.2 y 1.5 Å respectivamente) pero incluye un sitio de unión a Mn²⁺ próximo al propionato interno del hemo que justifica la capacidad para oxidar este catión. La oxidación de los sustratos aromáticos podría implicar interacciones con los residuos aromáticos que se encuentran en el borde del

canal de acceso al hemo. Otra posibilidad podría implicar una transferencia electrónica de largo rango en la que podría participar el W164, que ocupa la misma posición que el W171 de la LiP. Recientemente se ha implicado este residuo en el ciclo catalítico de esta peroxidasa. La expresión de la peroxidasa MnPL está regulada a nivel de transcripción génica por la fuente de nitrógeno, Mn^{2+} , y especies reducidas de oxígeno. Los análisis realizados por "Northern blot" demostraron que tanto la peptona como el H_2O_2 y el $OH\cdot$ regulan positivamente la expresión, mientras que los resultados obtenidos con el Mn^{2+} son bastante ambiguos, ya que este catión parece estar implicado tanto en procesos de activación como de represión del gen *mnpl* bajo diferentes condiciones. La variante MnPL2 de la peroxidasa de *P. eryngii* se expresó en *Emericella nidulans*. Para ello se utilizó una fusión del cDNA de la proteína completa, incluyendo la secuencia señal, con el promotor del gen *alcA* y el terminador transcripcional del gen *trpC* de *E. nidulans*. La proteína recombinante (MnPL2*) se secretó en forma activa y pudo ser rápidamente detectada y purificada. El desarrollo de este sistema de expresión en *E. nidulans* supone la base para posteriores estudios de mutagénesis dirigida que puedan ayudar a establecer las relaciones estructura/función en este nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PEROXIDASAS

Las peroxididasas son hemoproteínas con actividad catalítica. En su centro activo presentan un grupo hemo tipo b que contiene un ion de hierro en cuya coordinación participan los cuatro nitrógenos pirrólicos y el nitrógeno ϵ del anillo imidazólico de una histidina axial denominada histidina proximal (Fig. 1.1). El sexto ligando varía a lo largo del ciclo catalítico.

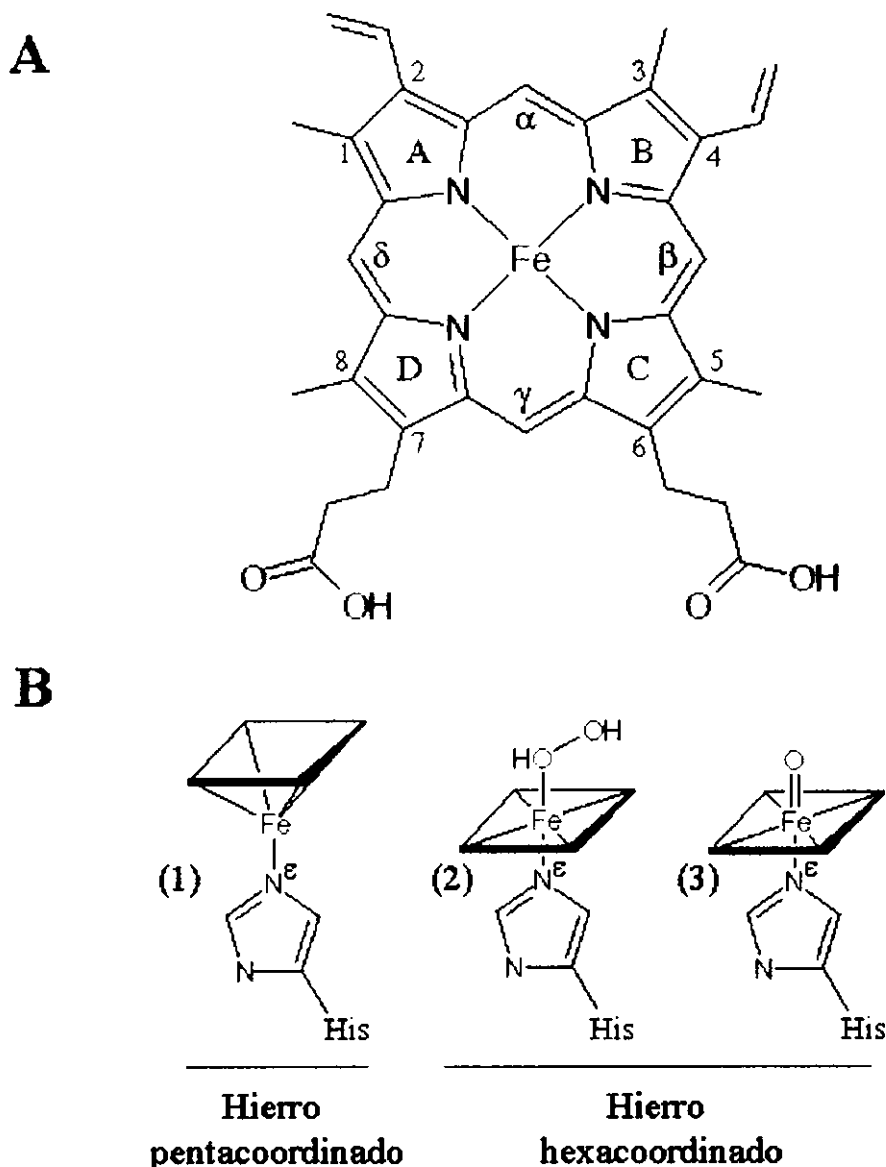


Fig. 1.1. Hemo tipo b con el hierro ligado a los nitrógenos de los cuatro pirroles (A). Diferentes estados de coordinación del hierro (B) en los que como ligandos axiales participan: (1) el N^{ϵ}_{His} (Nitrógeno ϵ de la His proximal), (2) el N^{ϵ}_{His} y una molécula de H_2O_2 , y (3) el N^{ϵ}_{His} y un O.

1.1.1 CICLO CATALÍTICO

Las peroxidasas utilizan hidroperóxidos, incluyendo H_2O_2 , como aceptores de electrones para catalizar un gran número de reacciones oxidativas (Li y Poulos, 1994). La mayoría siguen el mecanismo de reacción que se describe en la Fig. 1.2.

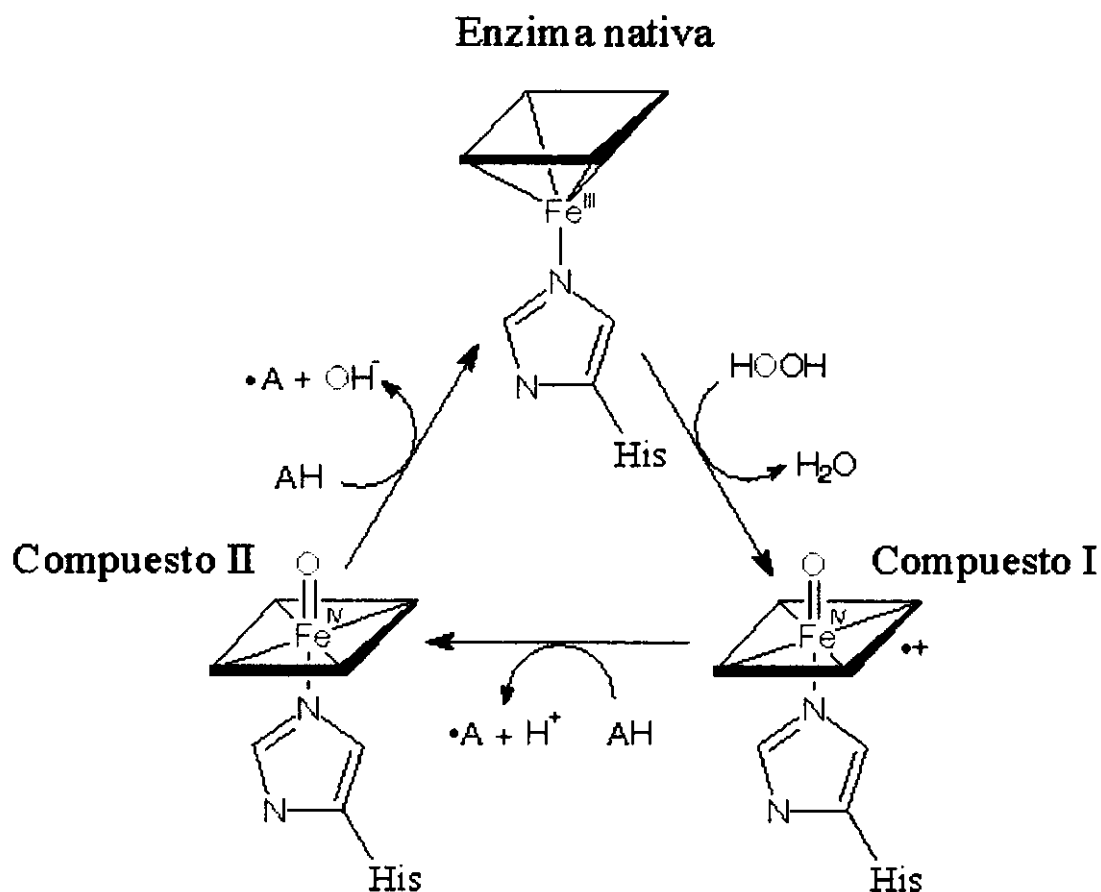


Fig. 1.2. Ciclo catalítico de las peroxidasas (Dawson, 1988).

La enzima reacciona con un equivalente de H_2O_2 para dar lugar al Compuesto I. Esto implica una reacción de oxido-reducción de dos electrones en la que el H_2O_2 es reducido a H_2O y la enzima es oxidada. Un equivalente de oxidación reside en el hierro en forma de un intermediario oxoferril ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) y el otro, en la mayoría de las peroxidasas, reside en la porfirina (en forma de radical catiónico π de la porfirina, representado en la Fig. 1.2 como $\cdot+$). En algunos casos, como en la citocromo *c* peroxidasa (CcP), pueda estar centrado en un aminoácido. A continuación, el Compuesto I puede oxidar un sustrato mediante una reacción de transferencia electrónica en la que se forma el radical del sustrato correspondiente ($\cdot\text{A}$). La enzima queda como Compuesto II con un centro $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ coordinado con la porfirina que ha

recuperado su electrón. Finalmente, el $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ del Compuesto II es reducido a la forma férrica (Fe^{3+}) de la enzima nativa mediante la sustracción de un electrón de otra molécula de sustrato. En ausencia de sustratos reductores adecuados, un exceso de H_2O_2 reacciona con el Compuesto II para formar el Compuesto III ($\text{Fe}^{3+} \text{O}_2^-$) produciéndose la inactivación de la enzima y la pérdida del grupo hemo (Wariishi y Gold, 1990).

1.1.2 CLASIFICACIÓN

Las peroxidasas se encuentran en una gran variedad de organismos, y se pueden clasificar en dos superfamilias en función de sus diferencias estructurales (Welinder, 1992): la superfamilia de las peroxidasas animales (Kimura e Ikeda-Saito, 1988) y la superfamilia de las peroxidasas bacterianas, fúngicas y de plantas, cuyos componentes a pesar de mostrar en algunos casos una identidad de secuencia baja, presentan el mismo plegamiento y están evolutivamente relacionados (Welinder y Gajhede, 1993). Esta última superfamilia se puede dividir a su vez en tres clases bien diferenciadas.

1.1.2.1 clase I : Peroxidasas de procedencia procariota

Incluye peroxidasas intracelulares, entre las que se encuentran la CcP de levaduras, una proteína soluble que participa en la cadena de transporte de electrones mitocondrial como oxidasa terminal cuando la citocromo *c* oxidasa respiratoria está inhibida (Erecinska *et al.*, 1973); las peroxidasas-catalasas bacterianas, que muestran los dos tipos de actividades enzimáticas y pueden estar implicadas en la protección de las células frente al estrés oxidativo (Welinder, 1991), y la ascorbato peroxidasa (APX), responsable de la eliminación del H_2O_2 en cloroplastos y citosol de plantas superiores (Dalton, 1991).

Estas peroxidasas no contienen en ningún caso puentes disulfuro, carbohidratos, iones calcio estructurales, o una secuencia señal que permita su secreción vía retículo endoplásmico (elementos característicos de las peroxidasas de las clases II y III).

1.1.2.2 clase II: Peroxidasas fúngicas

Engloba proteínas de secreción como la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (o peroxidasa dependiente de Mn^{2+}) (MnP) producidas por los hongos ligninolíticos (Hatakka, 1994). Las peroxidasas fúngicas maduras tienen en su dominio C-terminal 40-60 residuos más que los otros

miembros de la superfamilia y, salvo alguna excepción como la MnP de *Phanerochaete chrysosporium* (Sundaramoorthy *et al.*, 1994), presentan cuatro puentes disulfuro conservados. Estos se encuentran en una disposición diferente a los de las peroxidases de plantas, proporcionando un alto grado de rigidez a su estructura. Tienen dos iones calcio de gran importancia en el mantenimiento de la estructura y están glicosiladas, con un contenido medio en carbohidratos del 5%. Además, en su secuencia no aparece ningún residuo de tirosina (exceptuando una de las LiP de *P. chrysosporium*, que parece incluir un residuo de este tipo).

1.1.2.3 clase III: Peroxidasas de secreción en plantas

Las funciones fisiológicas de estas peroxidases son muy variadas y específicas del tejido en el que se producen. Pueden participar en la oxidación de compuestos tóxicos, en la biosíntesis de la pared celular, en el catabolismo del ácido 3-indolacético, en la biosíntesis de etileno, etc. (Campa, 1991). Estas proteínas, al igual que las de la clase II, son glicoproteínas monoméricas con dos iones calcio estructurales y cuatro puentes disulfuro conservados. La mayoría están altamente glicosiladas. Dentro de este grupo se incluye la peroxidasa más estudiada, la de rábano (*Armoracia rusticana*) (HRP).

1.1.2.4 Procesamiento y secreción

La totalidad de los genes de las peroxidases de las clases II y III presentan secuencias en su extremo N-terminal que codifican los llamados péptidos señal. Estos péptidos señal dirigen a las peroxidases hasta el espacio extracelular siguiendo una ruta de secreción en la que se suceden diferentes eventos: un plegamiento cotraduccional en el retículo endoplásmico donde se forman los puentes disulfuro (Freedman, 1989), la incorporación de una secuencia precursora (Glucosa₃-Manosa₉-Glucosa-N-acetilglucosamina₂) que se une a la asparagina de la mayoría de las secuencias NXT/S de la proteína (Gavel y von Heijne, 1990), y la unión de iones calcio que estabilizan la estructura de la apoperoxidasa resultante. Por último, si el contenido en hemo presente en la célula es suficiente, se incorpora a la proteína dando lugar a la holoperoxidasa correspondiente. Las peroxidases así formadas progresan en el aparato de Golgi, donde tiene lugar un procesamiento adicional de los carbohidratos antes de ser secretadas.

Aunque la exportación al espacio extracelular es la ruta seguida por defecto, también se han detectado peroxidases en vacuolas (Gaspar *et al.*, 1982). En algunos casos se ha comprobado la presencia de secuencias ácidas

en el extremo C-terminal (propéptidos ácidos) cuya función parece ser dirigirlas a vacuolas donde el propéptido es eliminado (Bednarek *et al.*, 1990).

1.1.3 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

La primera peroxidasa que se analizó por difracción de rayos-X fue la CcP (Finzel *et al.*, 1984) (Fig. 1.7). El estudio cristalográfico permitió diferenciar dos dominios bien definidos en una estructura dominada por 10 α -hélices, que representan alrededor del 50% de la molécula, junto con cinco láminas β , cuatro de ellas formando pares antiparalelos. El dominio I (dominio distal), formado por el extremo N-terminal y las hélices A-D, se encuentra distribuido sobre la hélice B que se localiza sobre el hemo. Un lazo de gran longitud entre las hélices D y E conecta este dominio con el dominio II. Éste contiene las hélices E-I y la mayor parte de la estructura β . La última hélice (hélice J) comienza en el dominio II (por debajo del hemo) y se proyecta en el dominio I. Esta organización en dos dominios estructurales con los extremos N y C-terminal situados en el mismo dominio es característica de muchas estructuras compuestas por dos dominios. Un amplio canal, entre los dos dominios, conecta el lado distal de la cavidad del hemo con la superficie de la proteína permitiendo el acceso del H₂O₂ al centro activo.

Tras el conocimiento de su estructura, la CcP se convirtió en la base estructural para el análisis de las propiedades y función del resto de las peroxidosas hasta que fueron cristalizadas. Actualmente se conocen las estructuras de la LiP y la MnP de *P. chrysosporium* (Piontek *et al.*, 1993; Poulos *et al.*, 1993; Sundaramoorthy *et al.*, 1994), la peroxidasa de *Coprinus cinereus* (CIP) (Petersen *et al.*, 1994) y *Arthromyces ramosus* (ARP) (especie inválida que podría corresponder a un estado conidial de *Coprinus*) (Kunishima *et al.*, 1994) (CIP y ARP deben ser la misma proteína, y por eso en este trabajo se tratan como una sola con el nombre ARP-CIP), la APX de guisante (Patterson y Poulos, 1995), la peroxidasa de cacahuete (PNP) (Schuller *et al.*, 1996) y la HRP (Gajhede *et al.*, 1997). Al comparar las peroxidosas bacterianas, fúngicas y de plantas se puede comprobar que, a pesar de que la identidad de secuencia es inferior al 20%, el plegamiento global y la organización de la estructura secundaria están conservados (Li y Poulos, 1994; Poulos *et al.*, 1995; Welinder y Gajhede, 1993), incluyendo la organización en dos dominios estructurales. Todas están compuestas por 10-11 α -hélices unidas por lazos sin apenas estructuras β . Algunos residuos de prolina y glicina implicados en el plegamiento de la cadena principal están conservados por razones estructurales, al igual que sucede con un puente de hidrógeno que conecta los dos dominios.

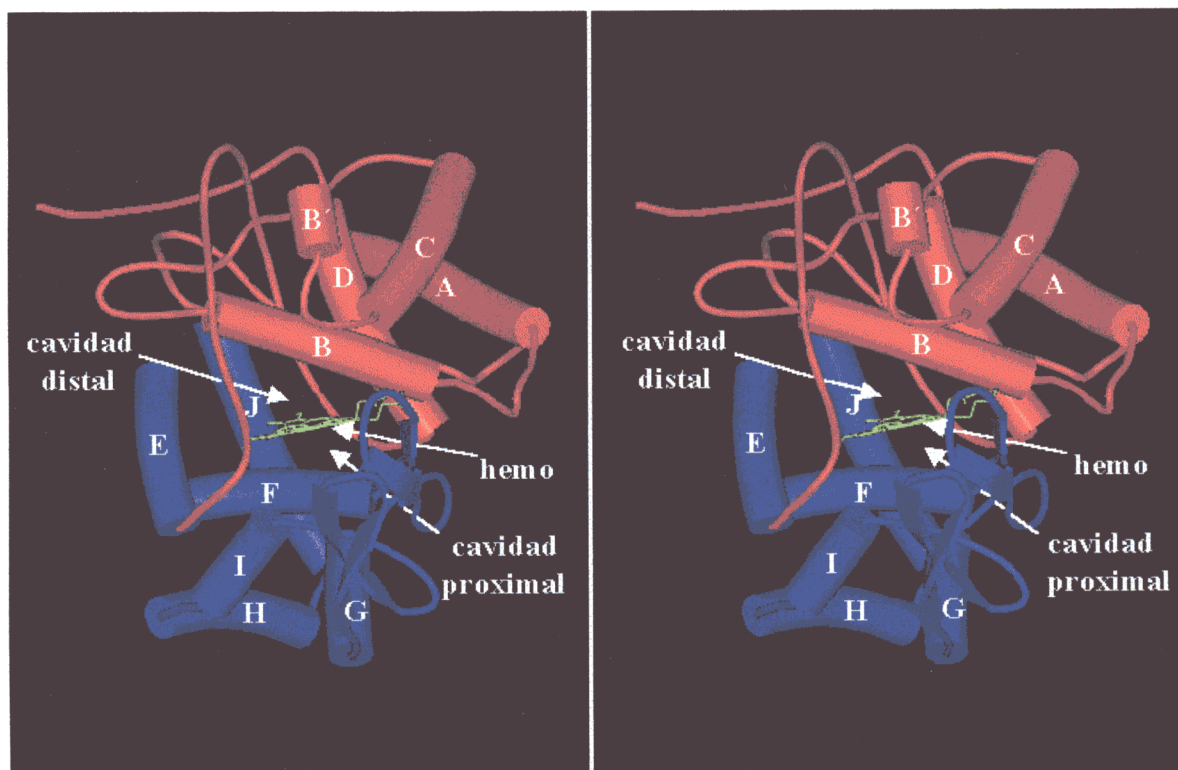


Fig. 1.3. Imagen estereoscópica del modelo esquemático de la CcP de *Saccharomyces cerevisiae* (Finzel *et al.*, 1984). Los dos dominios estructurales de la proteína aparecen representados en rojo (dominio distal) y azul (dominio proximal) a ambos lados del plano del hemo.

Las peroxidasas de las Clases II y III presentan dos iones calcio esenciales en el mantenimiento de su estructura (Welinder, 1992). Los sitios de unión de iones calcio, determinados por difracción de rayos-X, están altamente conservados en las peroxidasas de hongos y plantas. Cada uno de ellos se encuentra en un dominio diferente. El ion calcio del dominio proximal está fuertemente unido, mientras que el distal parece estarlo más débilmente por su cercanía a la superficie molecular y exposición al solvente. Los iones calcio se encuentran ligados a residuos pertenecientes a las hélices B y F, que constituyen las superficies distal y proximal de la cavidad del hemo, contiguos a cada una de las histidinas catalíticas (Banci, 1997). Estudios en los que se llevó a cabo la eliminación de los iones calcio de la HRP y la peroxidasa catiónica de cacahuete (CPRx) dieron como resultado una reducción en la actividad del 40% y 50% respectivamente (Shiro *et al.*, 1986; Barber *et al.*, 1995). Sin embargo, la eliminación de los iones calcio en la MnP de *P. chrysosporium* provocó una inactivación total. Ésta fue el

resultado de un cambio estructural en el entorno distal del hemo que provocó un desplazamiento de la histidina hasta unirse al hierro del hemo, hexacoordinándolo e impidiendo su unión al H₂O₂ (ver Fig. 1.1) (Sutherland y Aust, 1996; Sutherland *et al.*, 1997).

1.1.4 CENTRO ACTIVO

A partir del análisis estructural de las diferentes peroxidasas cristalizadas hasta la fecha se han podido identificar una serie de residuos implicados en la ruptura heterolítica del H₂O₂ y en la estabilización de los diferentes estados de oxidación del hierro a lo largo del ciclo catalítico. Estos residuos (Tabla 1.1) se encuentran localizados por encima y por debajo del plano que ocupa el grupo hemo, en los denominados respectivamente lados distal y proximal en referencia a las dos histidinas axiales, una de las cuales actúa como quinto ligando del hierro (ver Fig. 1.1).

Tabla 1.1. Residuos de los lados distal y proximal del hemo en diferentes peroxidasas de la superfamilia de las peroxidasas bacterianas, fúngicas y de plantas.

Enzima	Lado distal			Lado proximal		
CcP	R48	W51	H52	H175	W191	D235
APX	R38	W41	H42	H163	W179	D208
LiP	R43	F46	H47	H176	F193	D238
MnP	R42	F45	H46	H173	F190	D242
ARP-CIP	R52	F55	H56	H184	L201	D246
PNP	R38	F41	H42	H169	F213	D239
HRP	R38	F41	H42	H170	F221	D247

1.1.4.1 Residuos del lado proximal

El lado proximal del hemo presenta dos residuos invariables en todas las peroxidasas: una histidina axial situada en la hélice F y un aspartato que forma parte de la hélice H (H175 y D235 en la CcP) (Welinder y Gajhede, 1993). La histidina es el ligando proximal del hierro y se encuentra unida a la cadena lateral del aspartato por un fuerte puente de hidrógeno (Fig. 1.4). Esta interacción proporciona al residuo de histidina el carácter aniónico

imprescindible para la estabilización de los elevados estados de oxidación del hierro (Goodin y Mcrec, 1993; Banci *et al.*, 1995). En el lado proximal de todas las peroxidasas también se puede observar un residuo aromático que varía en las tres clases de peroxidasas. Este residuo es un triptófano en las de la Clase I y una fenilalanina en las de las clases II y III, con la excepción de la ARP-CIP que presenta una leucina en dicha posición. En la CcP (no en otras peroxidasas de la Clase I) el radical del Compuesto I se sitúa en el triptófano (Sivaraja *et al.*, 1989), una posición diferente a la del resto de las peroxidasas en las que el radical queda centrado en el grupo hemo. Esta diferencia es debida a que el triptófano, a diferencia de la fenilalanina, es susceptible de oxidación por el radical catiónico del grupo hemo.

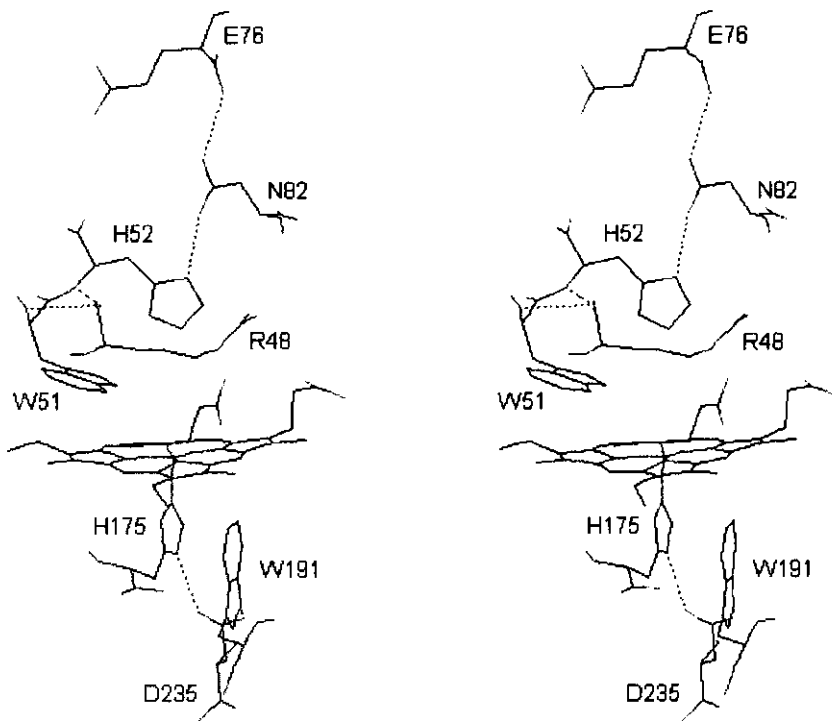


Fig. 1.4. Imagen estereoscópica de los residuos que componen el centro activo de la CcP de *Saccharomyces cerevisiae*. Las líneas discontinuas representan puentes de hidrógeno.

1.1.4.2 Residuos del lado distal

Los residuos del lado distal cumplen una doble función. Conjuntamente con los del lado proximal participan en la estabilización de los estados de

oxidación del hierro en los compuestos I y II de la enzima, e intervienen directamente en la interacción con el H_2O_2 . Al igual que en el lado proximal, dos residuos aparecen conservados en todas las peroxidasas: una histidina distal y una arginina distal (H52 y R48 en la CcP) (Welinder y Gajhede, 1993).

El H_2O_2 accede al centro activo y se une como sexto ligando hexacoordinando el hierro del hemo. Por tanto, esta posición tiene que estar libre en la enzima nativa para que se pueda iniciar el ciclo catalítico. En esta tarea parecen estar implicados los residuos hidrofílicos del lado distal, capaces de estabilizar una extensa red de moléculas de H_2O mediante una red de puentes de hidrógeno que, junto con el fuerte enlace $\text{Fe-N}\epsilon_2$ entre el hierro y la histidina proximal, impiden que alguna de estas moléculas interaccione con el hierro.

La reacción con el H_2O_2 funciona en dos pasos. En el primero el H_2O_2 se une al hierro del hemo, y en el segundo el enlace O-O del H_2O_2 (**Fig. 1.1 B2**) se rompe dando lugar al Compuesto I y una molécula de H_2O (Vitello *et al.*, 1993). En la formación y estabilización de este compuesto parecen tener un papel importante la histidina distal y la arginina distal (Erman *et al.*, 1993; Vitello *et al.*, 1993). La transferencia de un protón del H_2O_2 a la histidina distal (en forma desprotonada, en estado nativo, debido a una extensa red de puentes de hidrógeno (**Fig. 1.4**)) facilita la unión del anión peróxido al Fe(III) del hemo. La estabilización mediada por la R48 (un residuo cargado positivamente) estaría provocada por interacciones electrostáticas con la carga negativa del oxígeno distal (**Fig. 1.1 B2**) durante la ruptura heterolítica del enlace O-O del H_2O_2 . Una vez roto este enlace, el extremo guanidina de la arginina se desplazaría hacia el interior de la cavidad distal formando un puente de hidrógeno con el oxígeno que queda unido al hierro, estabilizando así los compuestos I y II (Edwards *et al.*, 1987).

1.1.5 SITIOS DE UNIÓN A SUSTRATOS

Las peroxidasas catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos. Estos van desde metaloproteínas (como el citocromo *c*) o polímeros de gran tamaño (como la lignina) hasta pequeñas moléculas aromáticas (sustrato de peroxidasas de plantas y hongos) o iones inorgánicos (como el Mn^{2+} , sustrato de peroxidasas producidas por los hongos ligninolíticos).

La especificidad de estas enzimas frente a los diferentes sustratos depende de dos factores.

- Potencial de reducción de las diferentes formas activas de la enzima (Compuestos I y II) con respecto al potencial de reducción de los sustratos:

2. Introducción

esta propiedad está determinada por la capacidad de la enzima para estabilizar los elevados estados de oxidación del hierro durante el ciclo catalítico, que se debe tanto al fuerte carácter aniónico del quinto ligando del hierro (histidina proximal) como a la naturaleza hidrofílica de los residuos del lado distal del hemo y a las interacciones electrostáticas en el interior de la molécula (Banci, 1997).

- Propiedades estructurales de la proteína, que determinan los sitios de unión a los sustratos: esta especificidad está probablemente modulada por algunos cambios en la superficie de las peroxidasas y por sustituciones en un pequeño número de aminoácidos, sin llegar a provocar un cambio significativo a nivel de la estructura secundaria y del plegamiento global de la proteína (Li y Poulos, 1994; Poulos *et al.*, 1995).

Mientras que para otras hemoproteínas, como los citocromos *P450*, hay estudios cristalográficos sobre la unión proteína-sustrato, en el caso de las peroxidasas dicha interacción ha sido determinada mediante rayos-X solamente en tres ocasiones: en la unión entre citocromo *c* y CcP (Pelletier y Kraut, 1992), en la unión del Mn^{2+} a la MnP (Sundaramoorthy *et al.*, 1994) y más recientemente en la unión del BHA (ácido benzohidroxámico) a la HRP (Henriksen *et al.*, 1998). En el primer caso parece ser que las interacciones hidrofóbicas y de van der Waals son las fuerzas dominantes que mantienen unido el complejo citocromo *c*-CcP, mientras que en la MnP la esfera de coordinación del Mn^{2+} se mantiene gracias a la formación de un complejo entre el Mn^{2+} y una serie de residuos ácidos de la proteína. En el caso de la HRP se ha observado la existencia de un bolsillo hidrofóbico que rodea el anillo aromático del sustrato en el canal del hemo.

En lo que se refiere a la unión de las peroxidasas a otros sustratos aromáticos, la falta de datos estructurales imposibilita la identificación de los sitios de unión, aunque se han realizado diversas aproximaciones. Así, para la LiP se han construido modelos en los que se reflejan posibles sitios de unión para el alcohol veratrílico (3,4-dimetoxibencílico) (Poulos *et al.*, 1993), que es un sustrato tipo de esta enzima y actúa como mediador en la degradación del polímero de lignina. También se han determinado posibles sitios de unión, que incluyen residuos de fenilalanina, en base a estudios de 1H -NMR (Banci *et al.*, 1993). Incluso se han realizado estudios de mutagénesis dirigida con la HRP analizando posteriormente la proteína recombinante por 1H -NMR (Veitch *et al.*, 1995).

1.2 PEROXIDASAS LIGNINOLÍTICAS

La lignina es el polímero aromático más abundante en la tierra (Sarkanen y Ludwig, 1971). Representa alrededor del 15-30% de las paredes celulares de las plantas vasculares donde forma una matriz que rodea las microfibrillas de celulosa, el polímero más abundante en la naturaleza. Esta matriz limita la despolimerización de la celulosa impidiendo el acceso de las enzimas celulolíticas. Por tanto, la degradación de la lignina es un paso clave en el reciclado del carbono de los ecosistemas terrestres así como en diferentes aprovechamientos de la biomasa vegetal (Kirk y Farrell, 1987).

1.2.1 DESCUBRIMIENTO DE ESTAS ENZIMAS

Para poder abordar los estudios de degradación de la lignina primeramente fue necesario conocer su estructura. Los estudios de biosíntesis proporcionaron información muy útil en este sentido. La lignina se forma por polimerización deshidrogenativa de los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos (*p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico, procedentes de las rutas del siquimato-cinamato) en una reacción de condensación catalizada por peroxidasas. Freudenberg (1968) fue el primero en proponer un modelo esquemático para este polímero. Posteriormente se ha modificado y se han elaborado nuevos modelos para diferentes tipos de lignina (Nimz, 1974; Adler, 1977), comprobándose que su estructura contrasta, por su heterogeneidad, con la de los otros biopolímeros existentes en la naturaleza (ácidos nucleicos, proteínas, celulosa, etc.) (Fig. 1.5). A partir de las informaciones anteriores, Kirk *et al.* (1975) prepararon lignina sintética marcada (^{14}C -DHP) por polimerización enzimática de alcoholes *p*-hidroxicinamílicos que pudo ser utilizada como sustrato en los estudios de biodegradación.

Muy pocos organismos son capaces de degradar la lignina. Entre ellos se han citado algunas bacterias, principalmente actinomicetos del género *Streptomyces*, hongos de tipo ascomiceto (como *Fusarium* y *Aspergillus*) y basidiomicetos, siendo estos últimos los principales responsables de la mineralización de la lignina en la naturaleza (Crawford, 1981; Leisola y Fiechter, 1985; Ramachandra *et al.*, 1988; Kirk, 1983). De todos los basidiomicetos, los más interesantes son los de podredumbre blanca por su mayor capacidad para degradar la lignina, y dentro de este grupo el hongo más estudiado es *P. chrysosporium*. Sin embargo, las especies con mayor potencial biotecnológico son aquellas que degradan preferentemente la lignina, como es el caso de ciertas especies del género *Pleurotus*, conservando

2. Introducción

la celulosa del sustrato (Blanchette *et al.*, 1985; Valmaseda *et al.*, 1990; Moyson y Verachtert, 1991).

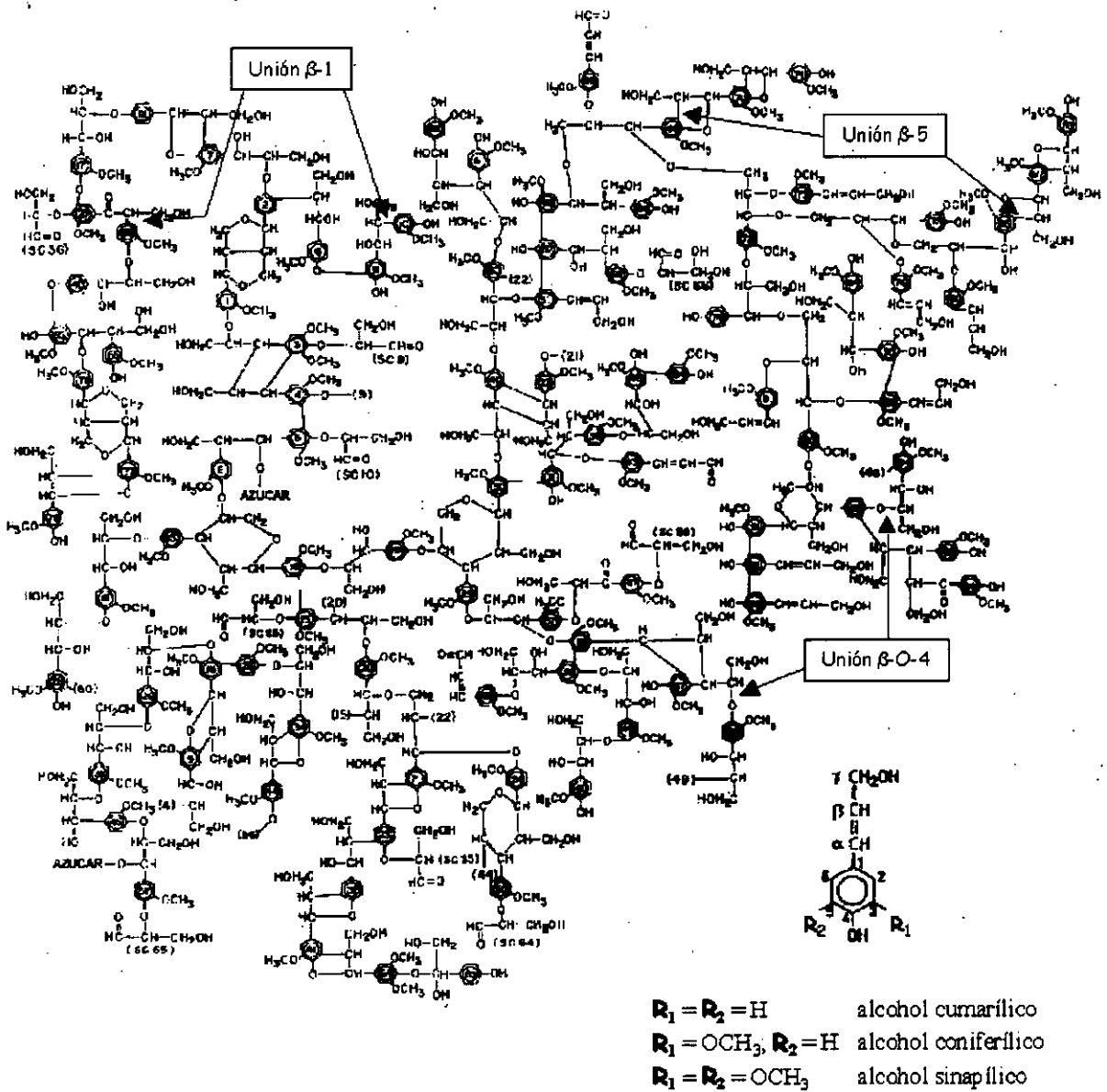


Fig. 1.5. Modelo estructural de la lignina de coníferas (Fengel y Wegener, 1984). A la derecha, estructura de los monolignoles precusores de la lignina.

Kirk *et al.* (1978) determinaron las condiciones ligninolíticas para *P. chrysosporium* valorando el ¹⁴CO₂ liberado tras la despolimerización oxidativa del ¹⁴C-DHP, y comprobaron que los mayores niveles de

degradación se conseguían en cultivos estáticos con concentraciones limitantes de nitrógeno, a pH 4-4.5, en una atmósfera saturada de O₂. La descomposición de la lignina necesitó del consumo de un sustrato cometabolizable (glucosa) utilizado como fuente de carbono y energía. Una vez determinadas las condiciones ligninolíticas se buscaron los agentes causantes de dicha despolimerización. Faison y Kirk, (1983) establecieron una relación entre la degradación de la lignina y la producción de especies reducidas de oxígeno por *P. chrysosporium*. En los cultivos crecidos en atmósfera saturada de oxígeno los niveles de H₂O₂ fueron mayores que en aquellos crecidos bajo aire, y la adición de catalasa a los cultivos ligninolíticos provocó una disminución en la degradación de la lignina, confirmando la importancia del H₂O₂ en el proceso de degradación. El mismo año, dos grupos anunciaron el descubrimiento de una enzima extracelular que requería H₂O₂ y era producida en cultivos ligninolíticos de *P. chrysosporium* (la lignina peroxidasa, LiP, inicialmente descrita como ligninasa) (Tien y Kirk, 1983; Glenn *et al.*, 1983). Tien y Kirk, (1983) demostraron que esta enzima era capaz de romper dímeros modelo no fenólicos representantes de más del 50% de las subestructuras que componen la lignina y de despolimerizar parcialmente este polímero, dando como resultado los mismos productos obtenidos tras la utilización de cultivos ligninolíticos completos. Al mismo tiempo, Glenn *et al.* (1983) detectaron esta enzima utilizando KTBA, un sustrato que solamente es oxidado por agentes oxidantes fuertes, como el OH· o enzimas con un elevado potencial de reducción, liberándose etileno como producto de la reacción. Un año después, Kuwahara *et al.* (1984) separaron y caracterizaron otra peroxidasa diferente de la LiP a partir de cultivos ligninolíticos de *P. chrysosporium*. Esta peroxidasa (peroxidasa dependiente de Mn²⁺ o Mn²⁺-peroxidasa, MnP) mostró una dependencia absoluta de iones Mn²⁺ para completar su ciclo catalítico y oxidar fenoles u otros sustratos (a través de quelantes del Mn³⁺ formado).

Aunque estos trabajos pusieron de manifiesto una relación entre el proceso de degradación de la lignina y la producción de LiP y MnP, estudios con LiP purificada sugirieron que esta enzima puede catalizar el proceso inverso, es decir, la repolimerización (Sarkanen *et al.*, 1991). Según esta teoría, las peroxidasas ligninolíticas podrían participar en la eliminación de compuestos fenólicos tóxicos, liberados en el proceso de descomposición de la lignina, mediante su repolimerización en entidades moleculares suficientemente grandes para que no puedan penetrar en las hifas. Sin embargo, para otros autores (Hammel *et al.*, 1993) las condiciones de reacción en estos estudios no fueron las óptimas, ya que la despolimerización de la lignina por la LiP es un proceso complejo que depende de las condiciones del entorno en el que se produce. Así, hay varias características

que se deben considerar cuando se intenta reproducir el proceso ligninolítico *in vitro* (Hammel *et al.*, 1993): i) la lignina es insoluble en agua (su degradación *in vivo* no tiene lugar en un entorno acuoso y parece que los polisacáridos extracelulares producidos por el hongo podrían aportar el entorno hidrofóbico apropiado, además de impedir la repolimerización de los productos de degradación (Leisola y García, 1989); ii) la despolimerización de los compuestos modelo de lignina necesita H_2O_2 exógeno; y iii) los fragmentos de lignina producidos durante la degradación son asimilados rápidamente y oxidados a CO_2 por el hongo evitándose su repolimerización. Por otro lado, Muheim *et al.* (1991) y Marzullo *et al.* (1995) demostraron en *P. chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* la producción de enzimas capaces de reducir los productos de degradación debidos a la acción de la LiP impidiendo su repolimerización.

Con posterioridad al descubrimiento de la LiP y la MnP se buscaron enzimas que pudieran generar el H_2O_2 utilizado durante la degradación de lignina. Se estudiaron varias oxidasas en cultivos de *P. chrysosporium* que pudieran llevar a cabo esta tarea: glioxal oxidasa (Kersten y Kirk, 1987), glucosa oxidasa (Eriksson *et al.*, 1986; Kelley y Reddy, 1986) y metanol oxidasa (Nishida y Eriksson, 1987) (estas dos últimas intracelulares). En *P. chrysosporium* y otros hongos ligninolíticos, concretamente *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* y diferentes especies de *Pleurotus*, se ha detectado otra oxidasa (AAO) capaz de actuar sobre compuestos aromáticos estructuralmente relacionados con la lignina (Asada *et al.*, 1995b; Farmer *et al.*, 1960; Muheim *et al.*, 1990; Guillén *et al.*, 1992). En *Pleurotus eryngii* se ha comprobado que la AAO genera H_2O_2 dentro de un sistema cíclico de oxido-reducción de compuestos aromáticos en el que también participan reductasas miceliales (Guillén *et al.*, 1994; Guillén y Evans, 1994). Tal como proponen Guillén *et al.* (1995; 1997), el H_2O_2 podría también participar en la degradación de la lignina a través de la generación de otras especies activas de oxígeno, como el radical hidroxilo ($OH\cdot$), produciéndose el reciclado del hierro a través del radical superóxido ($O_2\cdot^-$) formado en el “redox cycling” de las quinonas.

1.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN

Las diferencias entre las enzimas LiP y MnP producidas por *P. chrysosporium* están en función de los compuestos que son capaces de oxidar. En la Fig. 1.6 se muestran sus ciclos catalíticos (adaptados de Renganathan y Gold, (1986) y Wariishi *et al.* (1988)). La MnP necesita Mn^{2+} para reducir el Compuesto II, aunque el Compuesto I puede ser reducido por fenoles, mientras que la LiP

solamente puede completar el ciclo catalítico con dadores de electrones aromáticos no fenólicos, tales como el alcohol veratrílico (los fenoles provocan la inactivación de la enzima por un mecanismo aún no establecido).

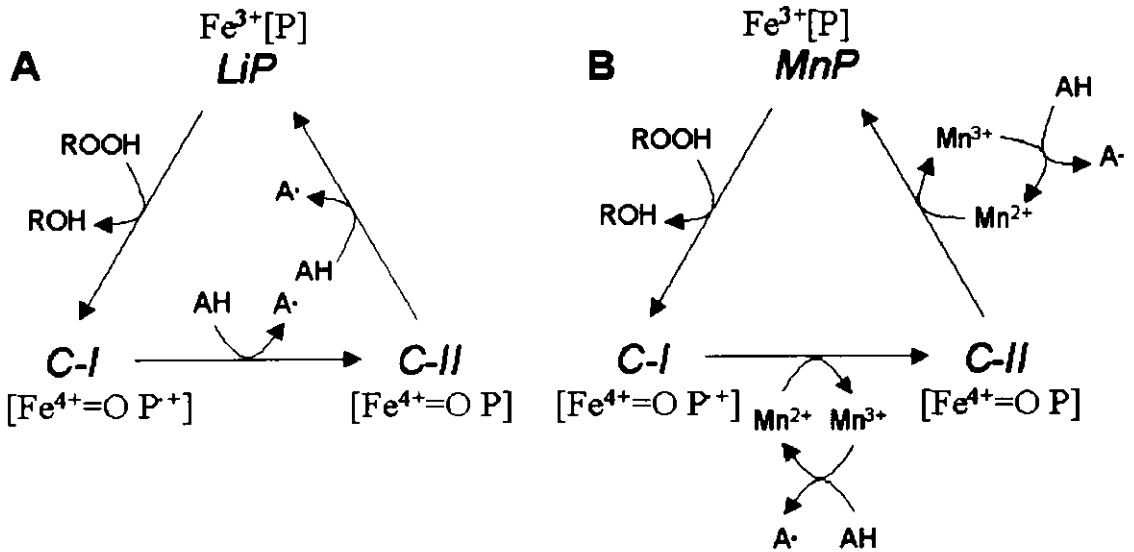


Fig. 1.6. Esquema de los ciclos catalíticos de la LiP (A) y la MnP (B) de *Phanerochaete chrysosporium*, adaptados de Renganathan y Gold, (1986), y Gold *et al.* (1987).

1.2.2.1 Lignina peroxidasa

La LiP de *P. chrysosporium* presenta una amplia especificidad sobre sustratos aromáticos no fenólicos y cataliza su oxidación, en presencia de H_2O_2 , por un mecanismo consistente en la sustracción de un electrón del anillo aromático dando lugar a los radicales catiónicos aromáticos correspondientes. Los radicales catiónicos así formados son bastante inestables y sufren una gran variedad de reacciones no enzimáticas (Kersten *et al.*, 1985; Schoemaker *et al.*, 1985).

- **Oxidación del alcohol veratrílico**

Se ha comprobado que el alcohol veratrílico, un metabolito aromático secretado durante el metabolismo secundario de *P. chrysosporium*, posibilita la oxidación de ciertos sustratos de potencial redox alto (como el alcohol

anisílico) y de la lignina polimérica por la LiP. Generalmente se admite que el radical catiónico del alcohol veratrílico actúa como mediador redox (Fig. 1.7 A) (Harvey *et al.*, 1986), pero otros estudios sugirieren que la función principal del alcohol veratrílico sería el cierre del ciclo catalítico (Cancel *et al.*, 1993) (Fig. 1.7 B).

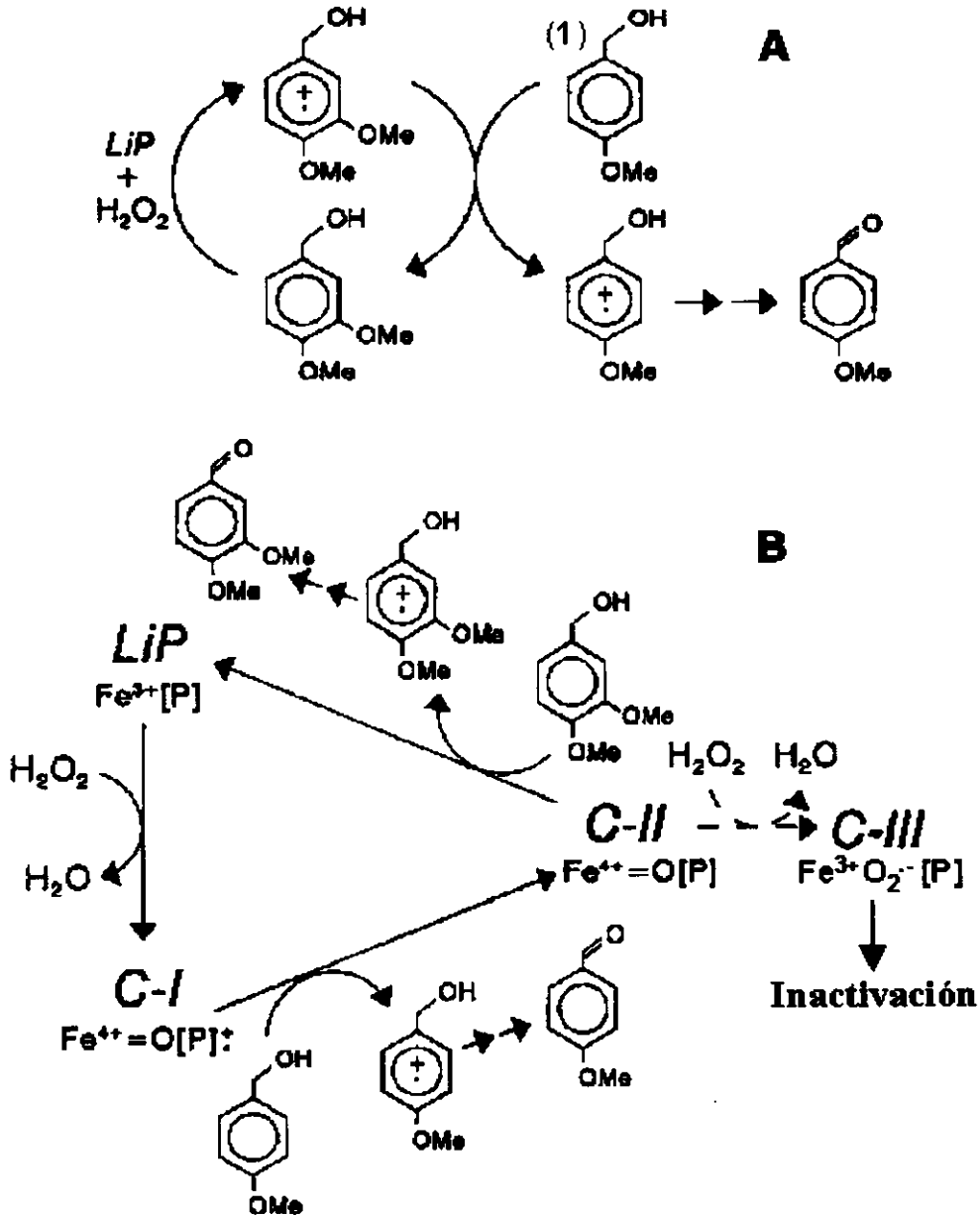


Fig. 1.7. Participación del alcohol veratrílico en la oxidación de la lignina: A. Hipótesis del intermediario; B. Cierre del ciclo catalítico en la oxidación del alcohol anisílico (basado en Gutiérrez , 1995).

Harvey *et al.* (1986) propusieron al alcohol veratrílico como un intermediario natural en la degradación de la lignina, ya que la LiP necesita de un mediador para poder oxidar compuestos a los que no puede acceder directamente como el polímero de lignina. Estudios recientes han mostrado que la vida media del radical catiónico del alcohol veratrílico es de alrededor de 60 ms (Candeias y Harvey, 1995), un valor demasiado bajo para poder actuar como un mediador eficaz entre la LiP y la lignina de la pared vegetal. Sin embargo, se había sugerido que la LiP podría dar lugar a una degradación a distancia, no por desplazamiento del radical sino por una reacción de transferencia electrónica (Harvey y Palmer, 1990), efecto túnel (Fig. 1.8), hasta alcanzar la zona de la lignina donde se produzca la degradación.

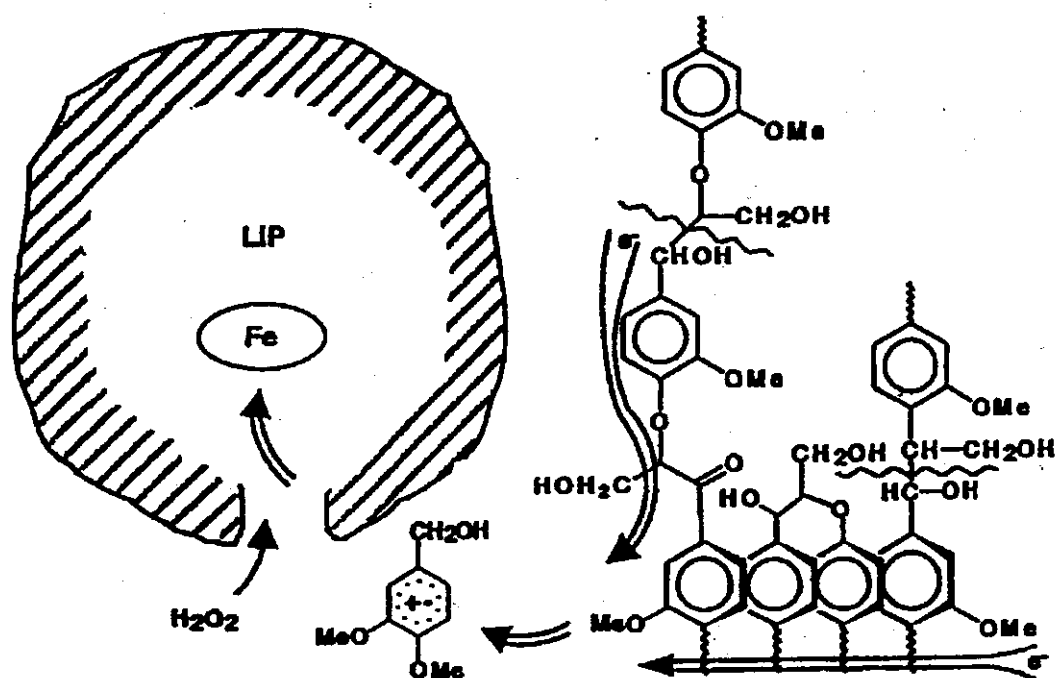


Fig. 1.8. Efecto túnel en la degradación de la lignina por la LiP, incluyendo la presencia de alcohol veratrílico que facilita la transferencia electrónica de la lignina al hemo (Gutiérrez y Martínez, 1996).

El radical catiónico del alcohol veratrílico en ausencia de otros compuestos con los que poder reaccionar, como por ejemplo el polímero de lignina, puede evolucionar descomponiéndose de forma no enzimática dando lugar a varios productos de forma parecida a como lo hacen los dímeros

modelo (ver más abajo) o el polímero de lignina. El veratraldehído es el mayoritario, aunque también se pueden producir quinonas e incluso la apertura del anillo aromático (Schoemaker *et al.*, 1991) (Fig. 1.9).

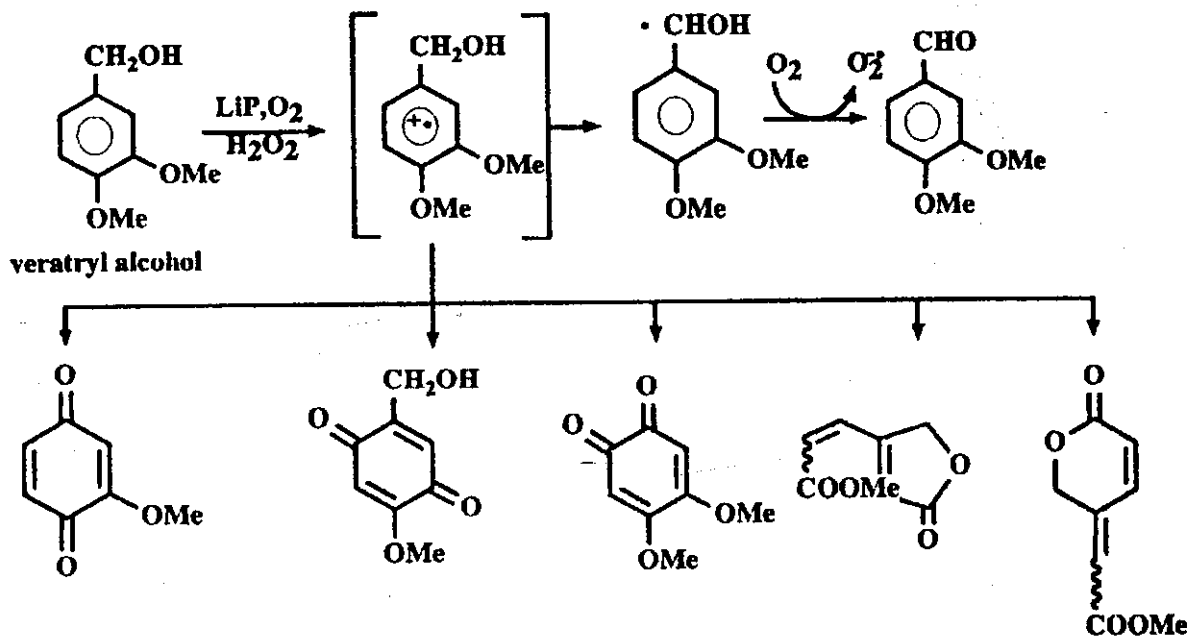


Fig. 1.9. Mecanismo de oxidación del alcohol veratrílico por la LiP, que resulta en una variedad de productos de reacción (Schoemaker *et al.*, 1991).

• Oxidación de compuestos modelo

Los compuestos modelo son monómeros, dímeros, etc., representativos de algunas de las unidades estructurales de la lignina. Pueden ser fenólicos o no fenólicos. Los más ampliamente utilizados son estructuras diméricas que contienen uniones β -1, β -5 y β -O-4 (representadas en la Fig. 1.5). Estos tres tipos de uniones representan más del 65% de todas las que se establecen en las ligninas de coníferas y caducifolias (Fengel y Wegener, 1984).

La oxidación de estos compuestos por la LiP se produce, al igual que sucede con en el alcohol veratrílico, mediante la sustracción de un electrón de alguno de los anillos aromáticos del dímero. El que un núcleo aromático sea sustrato para la LiP depende de su potencial de oxidación (Hammel *et al.*, 1986) que viene definido por los sustituyentes que presenta y su posición en el anillo aromático. Los sustituyentes, a su vez, condicionan las reacciones que sufren los radicales catiónicos (Kirk *et al.*, 1986): rupturas de enlaces

(C_{α} - C_{β} , alquil-arílica, β -O-4 en dímeros de este tipo, del anillo aromático y desmetoxilaciones), oxidación del grupo hidroxilo del C_{α} , y polimerización por unión de radicales (Kirk y Farrell, 1987; Tien, 1987; Higuchi, 1990; Shimada e Higuchi, 1991;). En las Fig. 1.10 y 1.11 se muestran los productos resultantes de la oxidación monovalente de dímeros β -1 y β -O-4 por la LiP. En la oxidación del dímero β -1 (Fig. 1.10), tras la formación de un radical intermediario sobre el sustrato (1), la unión C_{α} - C_{β} se rompe homolíticamente para dar un radical centrado en el carbono y un aldehído aromático (2). A continuación, el radical puede reaccionar con oxígeno (condiciones aerobias) formándose un radical centrado en el oxígeno (Hammel *et al.*, 1985). La evolución de este radical da lugar a otro producto de reacción (4) que ha incorporado un átomo de oxígeno. Bajo condiciones anaerobias el radical centrado en el carbono es atacado por el oxígeno del agua dando los mismos productos finales obtenidos en condiciones aerobias a través de un intermediario (3).

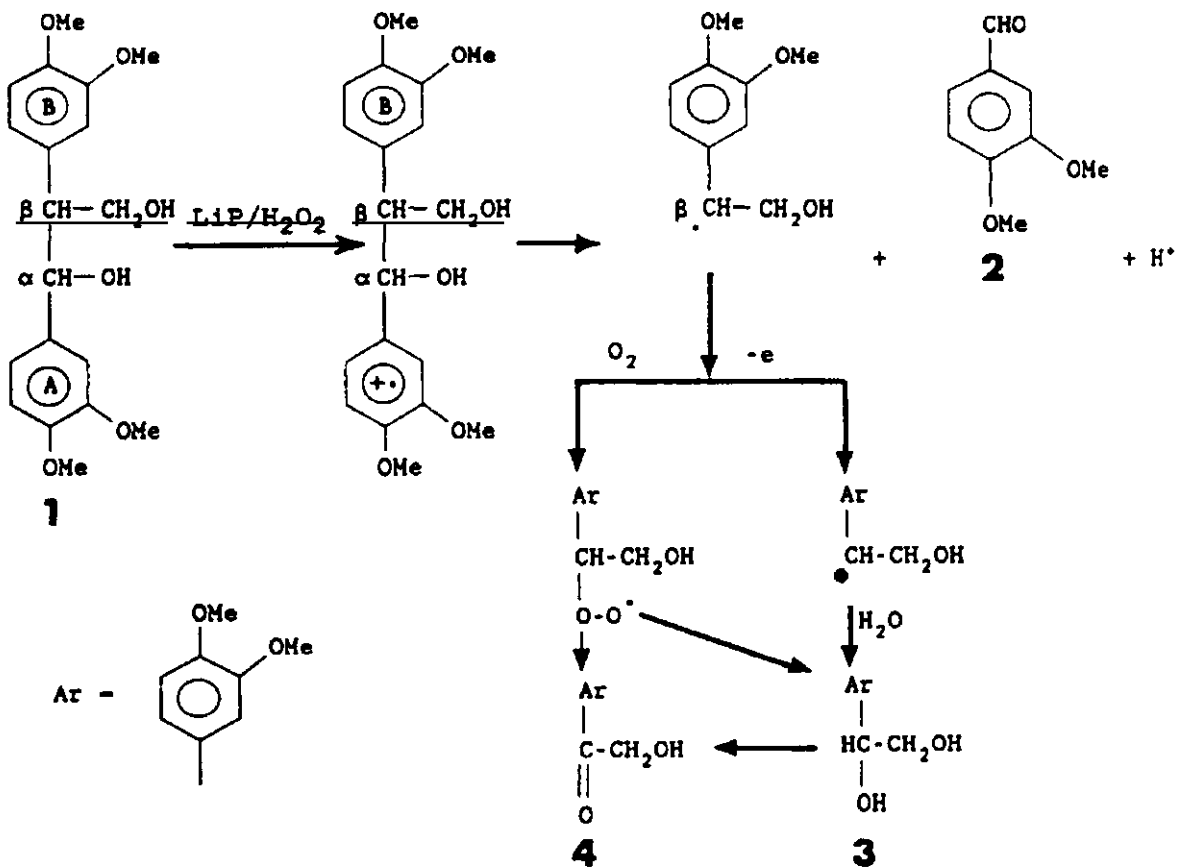


Fig. 1.10 Mecanismo de degradación de dímeros modelo de lignina no fenólicos de tipo β -1 por la LiP: ruptura C_{α} - C_{β} (Kurek, 1992, adaptado de Schoemaker, 1990).

En el caso de las estructuras β -O-4 (Fig. 1.11), la ruptura C_{α} - C_{β} catalizada por la LiP está generalmente seguida por la ruptura de la unión éter entre el fragmento de la cadena lateral y el segundo anillo aromático (2). Ésta da lugar a pequeños fragmentos alifáticos solubles en agua (3) y estructuras fenólicas (4).

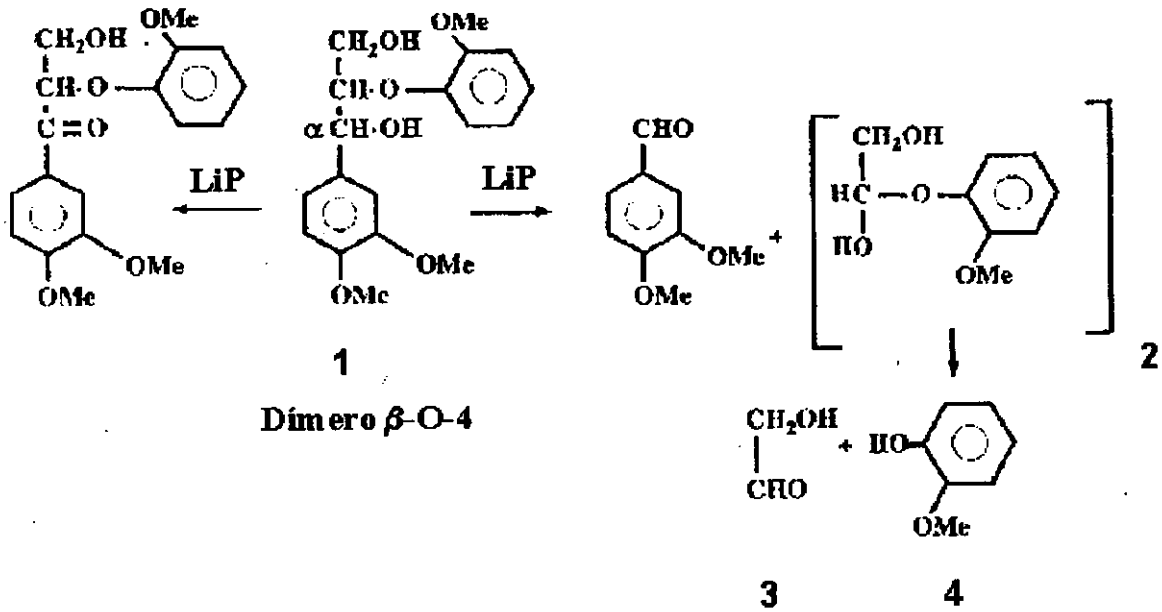


Fig. 1.11. Mecanismo de degradación de dímeros modelo de lignina no fenólicos de tipo β -O-4 por la LiP: ruptura C_{α} - C_{β} (derecha) y oxidación C_{α} (izquierda) (Schoemaker *et al.*, 1991).

1.2.2.2 Manganeso peroxidasa

Como se describió anteriormente, la principal reacción catalizada por la MnP es la oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} por el H_2O_2 (Glenn *et al.*, 1986). El Mn^{3+} es un oxidante con una vida media muy corta en medios acuosos (Archibald y Fridovich, 1982). Sin embargo, los hongos de podredumbre blanca secretan metabolitos aromáticos (como el alcohol veratrílico y el anisaldehído) y alifáticos al mismo tiempo que las enzimas ligninolíticas, incluyendo ácidos dicarboxílicos que actúan eficientemente como quelantes de iones metálicos como el Mn^{3+} (Kirk y Farrell, 1987; Kuan y Tien, 1993; Wariishi *et al.*, 1992). Estos quelantes, entre los que se encuentran el oxalato, no compiten con la enzima por el Mn^{2+} debido a que presentan una constante de unión muy baja por él. Sin embargo, unen el Mn^{3+} facilitando su disociación de la enzima y lo estabilizan en solución acuosa con un potencial redox elevado (0.9-1.2).

Tras la estabilización del Mn^{3+} producido por la MnP, éste puede difundir en el medio de reacción llegando a zonas donde la enzima no puede acceder. La desventaja que presenta el Mn^{3+} quelado como agente ligninolítico con respecto a la LiP es su bajo poder oxidante en condiciones fisiológicas. La pareja MnP/Mn oxida solamente las unidades fenólicas de la lignina que son minoritarias en la composición global de este polímero, y es incapaz de oxidar las unidades no fenólicas. Sin embargo, se ha comprobado que la MnP es capaz de llevar a cabo una despolimerización de la lignina *in vitro* (Wariishi *et al.*, 1991b), tal como se había demostrado para la LiP. Por otro lado, en un estudio sobre la degradación de la lignina en condiciones naturales por *Pleurotus pulmonarius*, un hongo que no produce LiP, se ha podido comprobar como la adición de Mn^{2+} estimula fuertemente la mineralización de la lignina (Camarero *et al.*, 1996).

El mecanismo de acción del Mn^{3+} sobre modelos fenólicos es vía formación de un radical fenoxilo que posteriormente evoluciona dando lugar a una serie de productos de reacción parecidos a los obtenidos tras la oxidación por la LiP. Se ha comprobado que se producen rupturas C_{α} - C_{β} sobre compuestos de tipo diaril propano (Wariishi *et al.*, 1989a), rupturas alquil-fenil y oxidaciones C_{α} .

Para explicar algunos de los resultados expuestos anteriormente, algunos autores han propuesto que además de poder oxidar compuestos fenólicos a través de la acción del Mn^{3+} , la MnP también puede oxidar compuestos aromáticos no fenólicos a través de ciertos intermediarios entre los que se encuentran radicales derivados de tioles y lípidos insaturados. En presencia de agentes reductores, como los tioles (GSH, DTT, DTE, etc...), el Mn^{3+} puede conducir a la oxidación de compuestos aromáticos no fenólicos (Wariishi *et al.*, 1989b). El mecanismo seguido, a diferencia del de la LiP, no implica la formación de un radical catiónico. El Mn^{3+} producido por la MnP oxida los tioles a radicales tiilo y éstos a continuación pueden sustraer un electrón del C_{α} de un compuesto aromático no fenólico.

La degradación oxidativa de compuestos modelo de lignina (fenólicos y no fenólicos) y lignina sintética también se ha observado en reacciones en las se produce la peroxidación de lípidos insaturados en presencia de MnP y ausencia de H_2O_2 (Bao *et al.*, 1994). Parece ser que el mecanismo comienza con la autooxidación de los lípidos insaturados, generándose los hidroperóxidos correspondientes. La reducción de éstos por parte de la MnP en presencia de Mn^{3+} daría lugar a radicales peroxilo de los ácidos grasos, responsables en última instancia de la oxidación de la lignina o compuestos relacionados. Los radicales de los lípidos formados por mediación de la MnP son relativamente estables, con una vida media de segundos, y

suficientemente pequeños como para poder entrar por los poros de la madera donde enzimas como la LiP no puede penetrar.

1.2.3 CLONACIÓN DE GENES *lip* Y *mnp*

El conocimiento de la genética molecular de los hongos de podredumbre blanca, sobre todo de *P. chrysosporium*, ha avanzado considerablemente durante la pasada década. Se han establecido metodologías para la producción de cepas auxótrofas (Gold *et al.*, 1982), análisis de recombinantes (Alic y Gold, 1985; Gaskell *et al.*, 1994), purificación de DNA y RNA (Raeder y Broda, 1988; Haylock y Broda, 1988) y transformación génica por complementación auxótrofa (Alic *et al.*, 1989, 1990, 1991 y 1993) y por resistencia a drogas (antibióticos) (Randall *et al.*, 1989 y 1991; Randall y Reddy, 1992).

En 1987 Tien y Tu clonaron y secuenciaron por primera vez el cDNA que codificaba una LiP (la isoenzima H8 de *P. chrysosporium*), y dos años más tarde Pease *et al.* (1989) y Pribnow *et al.* (1989) caracterizaron por primera vez el cDNA de una MnP (la isoenzima MnP1 del mismo hongo). Desde entonces se han clonado las secuencias de DNA genómico y cDNA de diferentes isoenzimas LiP (H8, H2, H6 y H10) y MnP (MnP1, MnP2 y MnP3) de *P. chrysosporium*. Los genes *lip* se encuentran agrupados en "clusters" en el genoma de *P. chrysosporium* (Gaskell *et al.*, 1991), y las isoenzimas LiP y MnP están codificadas por dos familias de genes estrechamente relacionados, que se pueden clasificar en subfamilias atendiendo al número y posición de los intrones (Gold y Alic, 1993; Alic *et al.*, 1997).

En otras especies fúngicas también se han caracterizado genes *lip* y *mnp* con las mismas características que los de *P. chrysosporium*. Entre ellos se incluyen cuatro genes *lip* en *T. versicolor* (clones VLGI (Black y Reddy, 1991); LiP12 (Jönsson y Nyman, 1992); LiPGII (Jönsson y Nyman, 1994); y LiP7 (Johansson y Nyman, 1995)) y uno en *B. adusta* (clon LPO-1 (Kimura *et al.*, 1991)) y *Phlebia radiata* (*lpg3* (Saloheimo *et al.*, 1989)); un gen *mnp* de *P. ostreatus* (Asada *et al.*, 1995a) y una peroxidasa hipotética de *T. versicolor* (clon PGV (Jönsson *et al.*, 1994)) con características generales intermedias entre LiP y MnP. Además de los hongos de podredumbre blanca en los que se han caracterizado secuencias de DNA y cDNA que codifican peroxidases ligninolíticas, hay muchos otros en cuyos cultivos se ha detectado actividad LiP y/o MnP. (Hatakka, 1994; Peláez *et al.*, 1995).

El micelio vegetativo de estos hongos es cenocítico, con pocos septos y varios núcleos haploides genéticamente distintos por célula. A partir de una basidiospora (espora sexual) uninucleada se forma un micelio homocariótico que se fusiona con otro dando lugar a un micelio heterocariótico. En

ocasiones las basidiosporas son ya binucleadas y dan micelios heterocarióticos. Debido a estos hechos existe la posibilidad de encontrar variantes alélicas del mismo gen, como se ha demostrado para algunos genes *lip* y *mnp* de *P. chrysosporium* (Gaskell *et al.*, 1991; Mayfield *et al.*, 1994a; Godfrey *et al.*, 1990).

La clonación de los genes de estas peroxididasas no sólo ha permitido caracterizar las secuencias codificantes e intrones, sino que también ha posibilitado la identificación de posibles secuencias reguladoras en la región del promotor, que podrían estar implicadas en la regulación de la transcripción de las isoenzimas LiP por limitación de nitrógeno (Li *et al.*, 1994) y de las MnP por manganeso, choque térmico o estrés oxidativo (Mayfield *et al.*, 1994a; Li *et al.*, 1995).

Por otro lado, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos posibilitó a su vez la elaboración de modelos moleculares de estas proteínas en base a la estructura cristalográfica de otras peroxididasas como la CcP o la LiP (Du *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1994; Selvaggini *et al.*, 1995). Los modelos así contruidos demostraron ser bastante acertados cuando posteriormente estas proteínas se cristalizaron y compararon con los datos obtenidos por difracción de rayos-X.

1.2.4 ASPECTOS ESTRUCTURALES

Como se comentó con anterioridad, la función de las diferentes peroxididasas está determinada por los sustratos que son capaces de oxidar. Esta capacidad depende en último término de la estructura proteica, que determina el potencial de reducción del hierro catalítico y los sitios de unión a los sustratos. Buena parte de los aspectos estructurales relacionados con los aspectos generales del ciclo catalítico han sido ya comentados anteriormente. En este apartado se abordan aspectos concretos de las peroxididasas ligninolíticas y se relacionan determinadas características estructurales con propiedades catalíticas específicas de la LiP y la MnP.

1.2.4.1 Oxidación del Mn^{2+} por la MnP

Los primeros modelos tridimensionales de la MnP de *P. chrysosporium* contruidos utilizando como molde la LiP incluían tres posibles sitios de unión para el principal sustrato de esta enzima, el Mn^{2+} (Johnson *et al.*, 1994; Selvaggini *et al.*, 1995). Posteriormente uno de éstos fue confirmado por difracción de rayos-X de la enzima cristalizada (Sundaramoorthy *et al.*, 1994). En él (Fig. 1.12), el Mn^{2+} aparece hexacoordinado por los oxígenos de

los carboxilatos pertenecientes a los aminoácidos E35, E39, y D179, un oxígeno de uno de los propionatos del hemo, y dos oxígenos de dos moléculas de agua. El resultado es una coordinación octaédrica típica de los complejos de coordinación del Mn^{2+} . De todos los residuos que ligan el Mn^{2+} en la MnP solamente uno, equivalente al E39, se encuentra conservado en la LiP. En otras peroxididasas (ARP-CIP y CcP) no aparece ninguno de estos residuos en las mismas posiciones.

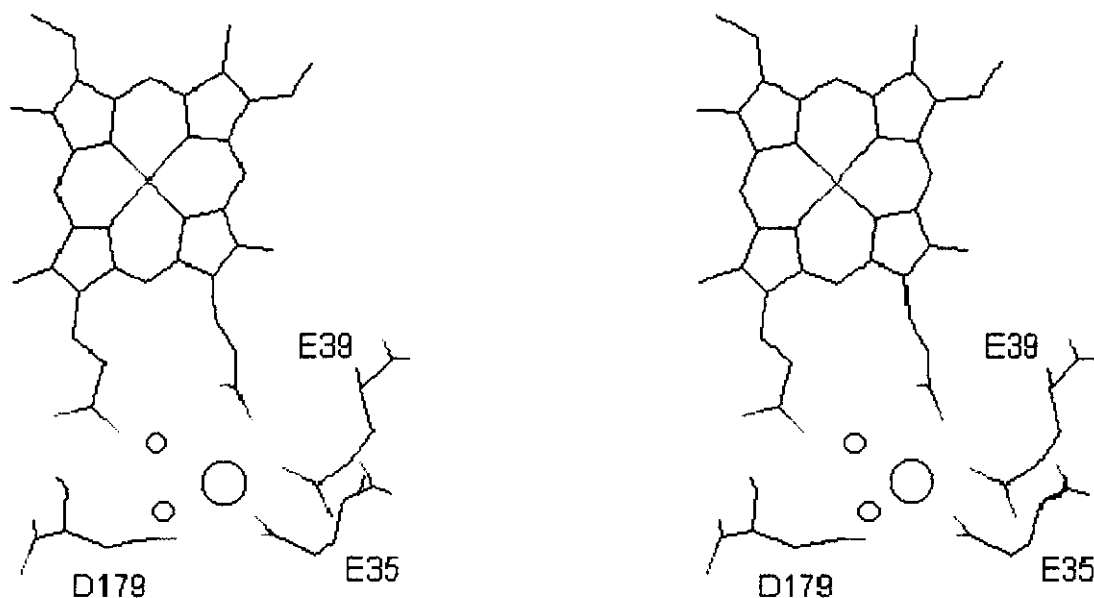


Fig. 1.12. Imagen estereoscópica del sitio de unión a Mn^{2+} en la MnP de *Phanerochaete chrysosporium* (Sundaramoorthy *et al.*, 1994). Las esferas pequeñas representan moléculas de agua y la esfera grande el ion Mn^{2+} .

1.2.4.2 Dependencia del pH

Como sucede con otras peroxididasas, la formación del Compuesto I de la LiP y la MnP (oxidación de la enzima por el H_2O_2) no se ve prácticamente afectada en un amplio rango de pH (entre pH 3-8). Sin embargo, la reducción de Compuesto I a Compuesto II de la LiP presenta un pH óptimo cercano a pH 3 (Wariishi *et al.*, 1991a). Un pH tan bajo sugiere la participación de carboxilatos cuya desprotonación podría afectar a la unión del sustrato o a la transferencia de electrones (Poulos *et al.*, 1993). Sin embargo, si se tiene en cuenta que en otras peroxididasas, como la CcP y la HRP, el potencial redox del Compuesto I aumenta a medida que disminuye el pH, se podría pensar lo mismo para la LiP. Según esto, un descenso en el pH sería un requisito

imprescindible para alcanzar el potencial redox necesario para oxidar sustratos no fenólicos con un potencial redox elevado. En cuanto a la MnP, la naturaleza del sitio de unión explica el pH óptimo para la oxidación del Mn^{2+} (pH 5). Los tres aminoácidos ácidos y el propionato interno deben estar disociados para que se una el catión.

1.2.4.3 Potencial de reducción

Actualmente se cree que la fuerza del enlace entre el hierro y la histidina proximal (Fe-N ϵ 2), determinada por la posición de la histidina con respecto al hierro, es la causa de los diferentes potenciales de reducción de las distintas peroxididasas (Banci *et al.*, 1991).

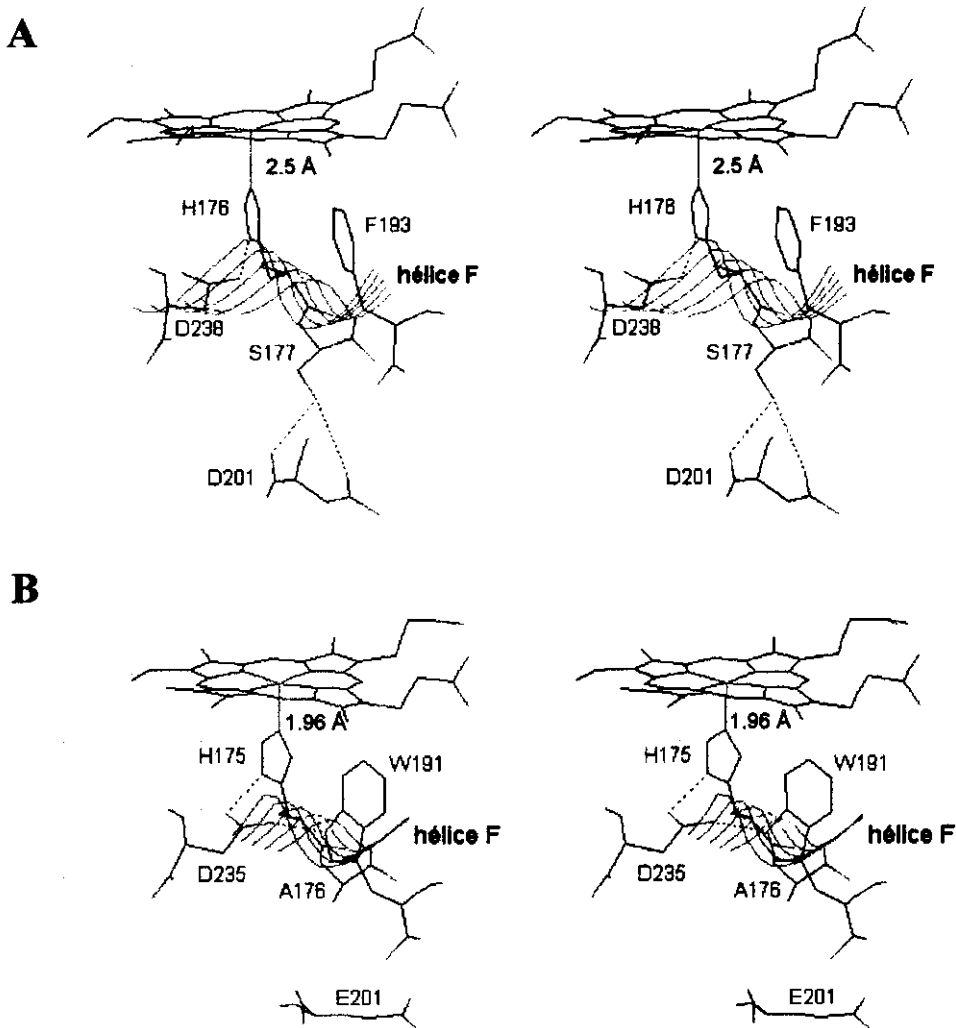


Fig. 1.13. Imagen estereoscópica de los residuos del lado proximal del hemo, algunos de los cuales parecen determinar la diferencia entre el potencial de reducción de la LiP (A) y de la CcP (B). Las líneas discontinuas representan puentes de hidrógeno.

2. Introducción

En la LiP y la MnP, la histidina proximal se encuentra más alejada del plano del hemo que en la CcP. El desplazamiento es debido a la formación de un fuerte puente de hidrógeno entre la cadena lateral de la S177 y la cadena lateral del D201, que arrastra la hélice F alejándola del hemo (**Fig. 1.13 A**). Este puente de hidrógeno no existe en la CcP debido a que la serina está sustituida por una alanina (Piontek *et al.*, 1993) (**Fig. 1.13 B**). El desplazamiento de la hélice F provoca una mayor deficiencia de electrones en el hemo aumentando el potencial de reducción.

1.2.4.4 Papel de los carbohidratos

Los estudios estructurales no se limitan a estudiar la parte proteica de las peroxidasas. También tratan de encontrar una posible función para la porción glucídica. Así, Piontek *et al.* (1993) demostraron la existencia carbohidratos próximos a la entrada del canal de acceso al hemo en la estructura de la LiP. Un resultado que abrió el camino para que Schoemaker *et al.* (1994) propusieran que estos carbohidratos podrían jugar un papel crucial en el ciclo catalítico de la LiP, modulando la evolución del radical catiónico formado tras la oxidación del alcohol veratrílico.

1.2.5 ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS

En los últimos años el uso de la biotecnología se ha convertido en una realidad dentro de la industria papelera. La capacidad que presentan los hongos de podredumbre blanca para degradar el polímero de lignina los ha convertido en herramientas potenciales en las distintas fases de la fabricación de papel. Entre estas fases se incluye la producción de la pasta, que supone la separación de las fibras vegetales unidas entre sí por la lignina; el refinado, que tiene por objeto completar la separación de las fibras y producir una pasta homogénea (especialmente importante en las pastas mecánicas); y la eliminación del color de la pasta a través de procedimientos de blanqueo que suponen secuencias de oxidación y extracción de la lignina alterada. El uso de hongos o enzimas fúngicas capaces de degradar la lignocelulosa puede rebajar los costos de los reactivos y la energía utilizados en los procesos de fabricación de papel, pero sobre todo supone una posibilidad para reducir la polución del medio acuático causada por esta industria. En este sentido los efluentes del blanqueo de la pasta de papel causan un fuerte impacto ambiental como consecuencia de la presencia de clorofenoles y cloroligninas, cuyo contenido podría reducirse con la utilización de enzimas fúngicas en lugar del Cl_2 o el ClO_2 usados en los procesos tradicionales de blanqueo

(Martínez *et al.*, 1992). Actualmente las empresas que incorporan enzimas en sus secuencias de blanqueo utilizan hidrolasas que degradan la hemicelulosa (que actúa de unión entre la celulosa y la lignina), principalmente xilanasas (Viikari *et al.*, 1994), como una ayuda para eliminar la lignina y los productos derivados de ésta. El uso de enzimas ligninolíticas (lacasa, LiP y MnP) no ha llegado a introducirse aún a nivel industrial, aunque existen varias patentes al respecto. Su uso debe ser la alternativa de futuro, no sólo para el blanqueo sino también en procesos de deslignificación enzimática para la fabricación de pasta de papel (**Fig. 1.14**), en combinación con métodos mecánicos o químicos suaves. En relación con las lacasas, fenoloxidasas descritas en la mayor parte de los hongos de podredumbre blanca incluyendo recientemente especies de *Phanerochaete* (Srinivasan *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 1996), varios estudios han mostrado que pueden oxidar compuestos no fenólicos (incluidos dímeros modelo) en presencia de ciertos mediadores (Bourbonnais *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 1994). Este descubrimiento ha abierto las puertas para su utilización en la industria papelera (Bourbonnais *et al.*, 1995; Call y Mucke, 1997). De igual forma existen estudios recientes sobre blanqueo de pasta de papel con MnP que ofrecen perspectivas prometedoras (Archibald, 1992; Paice *et al.*, 1993; Kaneko *et al.*, 1994; Kondo *et al.*, 1994).

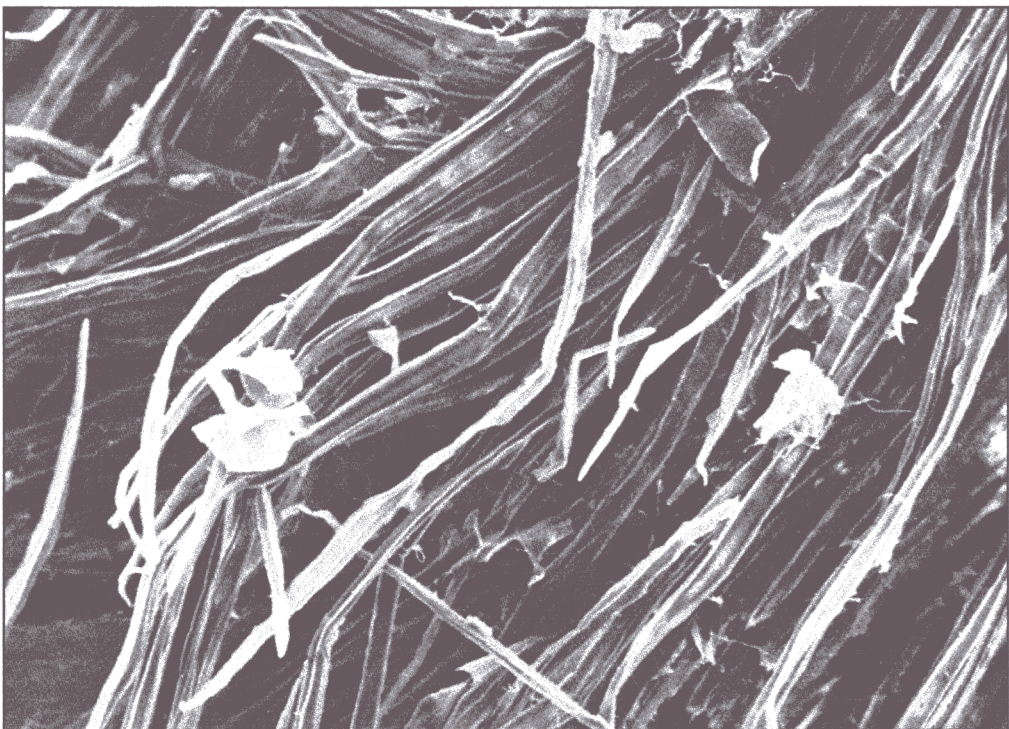


Fig. 1.14. “Pasta biológica” tras tratamiento de la madera con un hongo ligninolítico que causa la separación de las fibras (microscopía electrónica de barrido, x 125) (Martínez *et al.*, 1992).

2. Introducción

Las posibles aplicaciones medioambientales y comerciales de las peroxidasas ligninolíticas han estado limitadas durante mucho tiempo por los bajos niveles de producción enzimática conseguidos. Inicialmente algunos grupos trataron de incrementar la producción de LiP por *P. chrysosporium* modificando las condiciones de cultivo (composición del medio, agitación, aireación, etc.), e incluso se desarrollaron mutantes con el crecimiento alterado. Sin embargo, tras la clonación del cDNA de la LiP, los trabajos se orientaron hacia la sobreexpresión de estas proteínas en sistemas heterólogos. *Escherichia coli* fue el primer organismo utilizado (Maione *et al.*, 1987) y diferentes grupos lo han seguido empleando para expresar la LiP (Doyle y Smith, 1996) y la MnP (Whitwam *et al.*, 1995; Whitwam y Tien, 1996). No obstante, *E. coli* es incapaz de procesar correctamente proteínas eucariotas, y la necesidad de un repliegado *in vitro* representa un obstáculo para su utilización a nivel industrial por su elevado coste. Para evitar este problema se ha intentado expresar estas enzimas en organismos eucariotas con diferentes resultados. Así, mientras que el intento de expresión de la LiP de *P. radiata* en *Trichoderma reesei* fue fallido (Saloheimo *et al.*, 1989), la lacasa de *P. radiata* y la MnP de *P. chrysosporium* se consiguieron producir, ambas activas, en *T. reesei* (Saloheimo y Niku-Paavola, 1991) y *Aspergillus oryzae* (Stewart *et al.*, 1996) respectivamente. Por otro lado Mayfield *et al.* (1994b) prepararon un sistema de expresión homóloga para la MnP en *P. chrysosporium*. Los resultados muestran que, si bien para un estudio de carácter cualitativo sobre peroxidasas ligninolíticas puede ser mejor un sistema de expresión homólogo, para conseguir una producción a gran escala es imprescindible el uso de otros organismos, como *Aspergillus niger* y *A. oryzae*, con capacidad para secretar varios gramos de proteína heteróloga por litro de cultivo.

Los diferentes sistemas de expresión no solo son de utilidad para expresar proteínas en gran cantidad, sino que también se pueden emplear para la realización de estudios de “ingeniería de proteínas”. Éstos consisten en cambios puntuales en la secuencia nucleotídica, generalmente por mutagénesis dirigida, que se reflejan en la secuencia de aminoácidos produciendo alteraciones en la estructura de la proteína con objeto de modificar las propiedades catalíticas. Un ejemplo bastante ilustrativo es la construcción de un sitio de unión a manganeso en la CcP que permite a la enzima mutante oxidar el Mn^{2+} con una eficacia cinco veces mayor que la CcP nativa (Yeung *et al.*, 1997).

1.3 OBJETO DEL TRABAJO

Las peroxidasas ligninolíticas, LiP y MnP, desempeñan un papel central en la degradación de la lignina por los hongos. Estas peculiares peroxidasas fueron descritas por primera vez en *P. chrysosporium*. La MnP de *P. chrysosporium* se caracteriza por su estricta dependencia de Mn^{2+} . Teniendo en cuenta que se han descrito enzimas de tipo MnP en la mayoría de los basidiomicetos ligninolíticos, se planteó la búsqueda de una enzima similar en cultivos de *P. eryngii*. Una vez detectada una peroxidasa que actuaba sobre Mn^{2+} se comprobó que no se podía catalogar como una típica LiP o MnP (similar a las descritas en *P. chrysosporium*). Con objeto de encontrar una explicación a las peculiares propiedades catalíticas que presenta esta nueva peroxidasa se procedió a su estudio a nivel molecular. Para ello hubo que plantearse objetivos concretos como: i) la clonación del gen que la codifica; ii) la obtención de un modelo molecular válido para establecer posibles relaciones de estructura-función ; iii) el estudio de la regulación de su expresión; y iv) el desarrollo de un sistema de expresión heteróloga que pueda servir de herramienta en futuros estudios de mutagénesis dirigida.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MICROORGANISMOS Y VECTORES

2.1.1 Hongos

Las cepas utilizadas en este trabajo proceden de la colección de cultivos de hongos (IJFM) del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del CSIC. Se mantuvieron a 28°C en agar extracto de malta (2%) con resiembras periódicas o cubiertos con parafina a 15°C en medio con acaricida (dialdrin 4 µg/ml) y cloranfenicol (50 µg/ml). Para la conservación de los basidiomicetos se añadió un fungicida (benomilo 6 µg/ml) que restringe el crecimiento de contaminantes de tipo ascomiceto.

Tabla 2.1. Relación de cepas fúngicas empleadas.

	Familia	IJFM	Origen
Basidiomicetos			
<i>Pleurotus eryngii</i>	Lentinaceae	A169	Carpóforo (Madrid) (CBS 613.91)
<i>Coriolopsis gallica</i>	Coriolaceae	A241	Dr. G. Gómez (CIB-Madrid)
<i>Fomes fomentarius</i>	Coriolaceae	A166	Carpóforo (Burguete, Navarra)
<i>Heterobasidion annosum</i>	Coriolaceae	A102	Carpóforo (Exeter, Inglaterra)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Coriolaceae	A168	Carpóforo (Burguete, Navarra)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Meruliaceae	A547	VKM-F1767, CBS 481.73
<i>Phlebia chrysocrea</i>	Meruliaceae	A469	Carpóforo (Futrono, Chile)
<i>Phlebia radiata</i>	Meruliaceae	A588	CBS 184.83
Ascomicetos			
<i>Emericella nidulans</i> (anamorfo: <i>Aspergillus nidulans</i>) (<i>biA1</i> , <i>metG1</i> , <i>argB2</i>)	Trichocomaceae	A729	Dr. M.A. Peñalva (CIB, Madrid)
Deuteromicetos			
<i>Aspergillus niger</i>		A570	Dr. J.C. Duarte (INETI, Lisboa)

CBS: Centraalbureau vor Schimmelcultures; IJFM: colección de cultivos de hongos del CIB (procedente del antiguo Instituto Jaime Ferrán de Microbiología).

2.1.2 Bacterias

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo se crecieron a 37°C en placas de agar-LB, con resiembras periódicas conservadas a 4°C. Para el mantenimiento de las cepas de forma indefinida se crecieron en LB líquido, se añadió glicerol hasta una concentración final del 20% y se guardaron a -80°C.

2. Materiales y métodos

Tabla 2.2. Relación de cepas de *Escherichia coli* utilizadas.

Cepa	Aplicación y Genotipo	Referencia
DH5 α	<ul style="list-style-type: none"> • Mantenimiento y propagación de plásmidos • <i>SupE44</i>, Δ<i>lacU169</i> (ϕ80 <i>lacZ</i>ΔM15) <i>hsdR17</i>, <i>recA1</i>, <i>endA1</i>, <i>gyrA96</i>, <i>thi-1</i>, <i>relA1</i> 	(Hanahan, 1983)
XL1-Blue MRA.	<ul style="list-style-type: none"> • Titulación y “screening” de librerías genómicas en el bacteriófago λEMBL3 • Δ(<i>mcrA</i>)183, Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1</i>, <i>supE44</i>, <i>thi-1</i>, <i>gyrA96</i>, <i>recA1</i>, <i>lac</i> 	(Stratagene)
XL1-Blue MRA (P2)	<ul style="list-style-type: none"> • Titulación y “screening” de librerías genómicas en el bacteriófago λEMBL3 • XL1-Blue MRA con el bacteriófago P2 lisógeno 	(Stratagene)
L87	<ul style="list-style-type: none"> • Titulación de librerías de cDNA en el bacteriófago λgt10 • <i>HsdR</i> ($r_k^-m_k^+$), <i>trpR</i>, <i>metD</i>, <i>supE</i>, <i>supF</i>, <i>tonA</i> 	(Amersham)
NM514	<ul style="list-style-type: none"> • Titulación y “screening” de librerías de cDNA en el bacteriófago λgt10 • <i>HsdR514</i> ($r_k^-m_k^+$), <i>argH</i>, <i>galE</i>, <i>galX</i>, <i>strA</i>, <i>lycB7*</i>, (<i>Hfl</i>⁺) 	(Amersham)
BL21(DE3)	<ul style="list-style-type: none"> • Huésped de expresión de genes clonados en plásmidos pET. Lisógena para el bacteriófago λDE3 que porta el gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control de <i>lacUV5</i> • F⁻, <i>ompT</i>, <i>hsdS_B</i> ($r_B^-m_B^-$), <i>dcm</i>, <i>gal</i> (DE3) 	(Novagen)
BL21(DE3)pLysS	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa BL21(DE3) portadora del plásmido pLysS que codifica la lisozima T7. Esta enzima disminuye la expresión basal de los genes que se encuentran bajo el control del promotor T7, inhibiendo a la RNA polimerasa T7, sin afectar los niveles de expresión inducida. • F⁻, <i>ompT</i>, <i>hsdS_B</i> ($r_B^-m_B^-$), <i>dcm</i>, <i>gal</i> (DE3) pLysS, Cm^r. 	(Novagen)

2.1.3 Vectores

pBluescript SK (+/-) (pBSK) (Stratagene). Se utilizó para clonar fragmentos de DNA procedentes de reacciones de PCR y para subclonar a partir de clones positivos de las librerías de DNA y cDNA.

pDm 238 (Roiha *et al.*, 1981). Plásmido derivado del pBR322 que incluye un fragmento de 12kb de *Drosophila melanogaster* que codifica el rRNA 28S. Se utilizó como control interno en hibridaciones de RNA.

pET21a y pET22b (Novagen). Vectores de expresión en células huésped de *E. coli* que contienen en su cromosoma una copia del gen de la RNA polimerasa T7 bajo control del promotor *lacUV5* inducible por IPTG. Estos vectores presentan un operador lactosa asociado al promotor T7 y una secuencia que codifica el represor lac capaz de reprimir los promotores *lacUV5* y T7 en ausencia de IPTG. Las proteínas expresadas a partir de pET21a se acumulan en el citoplasma. Sin embargo, pET22b es portador de una secuencia señal a la que se fusiona la secuencia de la proteína objeto de estudio de forma que, una vez expresada, permite su desplazamiento al periplasma donde queda acumulada.

pMal-c2 (New England Biolabs). Vector de expresión en *E. coli* que permite fusionar el gen de la proteína que se quiere expresar al gen *malE* que codifica una proteína de unión a maltosa (MBP). Esta fusión tiene por objeto facilitar el proceso de purificación (utilizando columnas de maltosa) y, en cierta medida, estabilizar la proteína de interés. El gen de la proteína objeto de estudio se fusiona al promotor *lac* inducible por IPTG.

palcA1 (Fernández-Cañón y Peñalva, 1995). Vector de expresión, derivado del pBluescript SK+, portador del promotor y secuencias reguladoras de la transcripción del gen *alcA* de *Emericella nidulans* (anamorfo: *Aspergillus nidulans*) Este gen codifica la alcohol deshidrogenasa, proteína inducible por una gran variedad de compuestos entre los que se encuentran la treonina o el etanol, y reprimible por glucosa (Lockington *et al.*, 1985). *palcA1* presenta el terminador transcripcional del gen *trpC* de *E. nidulans* y, como marcador de selección, el gen *argB* que codifica la ornitina carbamoiltransferasa implicada en la biosíntesis de la arginina. Este plásmido fue cedido por el Dr. M.A. Peñalva (CIB).

λEMBL3 (Stratagene). Bacteriófago empleado como vector de reemplazamiento en la construcción de la librería de DNA genómico de *P. eryngii*. Puede aceptar fragmentos de DNA de entre 9 y 23 kb con extremos compatibles *Bam*HI (*Sau*3A, *Mbo*I, *Bgl*III, o *Bam*HI) tras la eliminación de un fragmento interno *Bam*HI-*Bam*HI de 13.13 kb.

λgt10 (Amersham). Bacteriófago utilizado como vector de inserción para la construcción de librerías de cDNA. Puede aceptar insertos de DNA de hasta 7.6 kb en el único sitio *Eco*RI que presenta.

2.2 MEDIOS Y SOLUCIONES

2.2.1 Medios de cultivo

Medio glucosa-tartrato amónico-extracto de levadura (Guillén *et al.*, 1990) (composición por litro).

Glucosa	10 g
Tartrato amónico	2 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
KCl	0.5 g
Extracto de levadura	1 g
Elementos traza	1 ml

Solución de elementos traza (composición por litro).

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	100 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	70 mg

Autoclavar a 110°C, 30 min.

Medio glucosa-peptona-extracto de levadura (Kimura *et al.*, 1990) (composición por litro).

Glucosa	20 g
Peptona (Bacto-peptona, Difco)	5 g
Extracto de levadura (Difco)	2 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g

Ajustar a pH 5.5 con HCl. Autoclavar a 110°C, 30 min.

Aunque éste es el medio que se usó para la producción de la peroxidasa MnPL de *P. eryngii*, se realizaron algunas modificaciones en su composición con objeto de estudiar la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la producción de esta enzima.

- Glucosa 2%, peptona 0.5%, extracto de levadura 0.2%
- Glucosa 2%, "corn-steep liquor" (Cerestar) 0.5%, extracto de levadura 0.2%
- Glucosa 2%, extracto de levadura 0.7%
- Extracto de malta 2.7%
- Glucosa 2%, peptona 0.7%
- Glucosa 2%, tartrato amónico 0.7%

Todos incluían KH_2PO_4 0.1% y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, y el pH final se ajustó a 5.5.

2. Materiales y métodos

Medio LB (Sambrook *et al.*, 1989) (composición por litro).

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Ajustar a pH 7.0 con NaOH 5N. Autoclavar a 120°C, 20 min.

Medio NZY. Modificado a partir del descrito en Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989) (composición por litro).

NZ Amina (hidrolizado de caseína)	10 g
NaCl	5 g
Extracto de levadura	5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g

Ajustar a pH 7.5 con NaOH 5N. Autoclavar a 120°C, 20 min.

Medio M9. Modificado a partir del descrito en Sambrook *et al.* (1989) (composición por litro).

Solución de sales 10 X	100 ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O 1 M	2 ml
Glucosa 20%	20 ml
Cl ₂ Ca 1 M	100 µl

Esterilizan por filtración las soluciones de MgSO₄ · 7H₂O 1 M, glucosa y Cl₂Ca 1 M.

Solución de sales 10 X (composición por litro).

Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	60 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	10 g

Ajustar a pH 7.4 y autoclavar a 110°C, 30 min.

Medio mínimo de *Emericella nidulans* (composición por litro).

Solución de sales 50 X	20 ml
Glucosa	10 g
Tartrato amónico	0.92 g

Ajustar a pH 6.8 con NaOH y autoclavar a 110°C, 30 min.

Solución de sales 50 X (composición por litro).

2. Materiales y métodos

KCl	26 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	26 g
KH ₂ PO ₄	76 g
Elementos traza	50 ml

Solución de elementos traza (composición por litro).

Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	40 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	400 mg
Fe ₂ (SO ₄) ₃ · 2 H ₂ O	800 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	800 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	8 mg

Por último, añadir al medio los requerimientos específicos de la cepa *biA1*, *metG1*, *argB2* (composición por litro de medio).

D-biotina 100 mg/l	10 ml
L-metionina 14.9 g/l	5 ml
L-arginina 53 g/l	10 ml

Medio completo de *Emericella nidulans* (composición por litro).

Solución de sales 50 X	20 ml
Solución de casaminoácidos	10 ml
Glucosa	10 g
Bactopeptona	2 g
Extracto de levadura	1 g

Ajustar el pH a 6.8 con NaOH y autoclavar a 110°C, 30 min. A continuación añadir 10 ml de la solución de vitaminas.

Solución de casaminoácidos: 150 g/l de hidrolizado de caseína.

Solución de vitaminas (composición por litro).

Tiamina-HCl	50 mg
Biotina	10 mg
Ácido nicotínico	100 mg
D-pantotenato de calcio	200 mg
Piridoxina-HCl	50 mg
Riboflavina	100 mg
PABA	100 mg

Esterilizar por filtración.

2.2.2 Soluciones

Solución de Denhardt 50 X Albúmina de suero bovino (fracción v, Sigma) 1%, Ficoll (tipo 400, Pharmacia) 1%, Polivinilpirrolidona 1%.

2. Materiales y métodos

Solución HSE	Hepes 10 mM, pH 6.9, sacarosa 0.5 M, EDTA 20 mM, pH 8.0.
Tampón MOPS	MOPS 40 mM, acetato sódico 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.0.
Tampón PBST	NaCl 140 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8.1 mM, KCl 2.7 mM, Tween 20 0.05%.
Tampón SM	Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8 mM, gelatina 100 mg/l.
Solución SSC	NaCl 0.15 M, citrato sódico 15 mM, pH 7.0.
Tampón STE	Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 10 mM, EDTA 1mM pH 8.0.
Tampón TAE	Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0.
Tampón TE	Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1mM.

2.3 VALORACIONES ENZIMÁTICAS

Se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Shimazu UV-160 a temperatura ambiente. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que transforma 1 μmol de sustrato por minuto.

2.3.1 AAO (EC 1.1.3.7)

Se determinó en espectrofotómetro siguiendo la formación del veratraldehído ($\epsilon_{310} = 9\ 300\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) resultante de la oxidación del alcohol veratrílico (3,4-dimetoxibencílico) 5 mM en tampón fosfato 0.1 M, pH 6 (Guillén *et al.*, 1992).

2.3.2 Lacasa (EC 1.10.3.2)

Se valoró utilizando como sustrato ABTS 5 mM en tampón acetato 0.1M, pH 5. El producto resultante de la oxidación, el radical catiónico del ABTS, se siguió espectrofotométricamente a 436 nm ($\epsilon_{436} = 29\ 300\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) (Muñoz *et al.*, 1997).

2.3.3 LiP (EC 1.11.1.14)

Esta actividad enzimática se investigó siguiendo la oxidación dependiente de H_2O_2 del alcohol veratrílico 2 mM, en tampón tartrato sódico 0.1 M, pH 3, según Tien y Kirk, (1984). La reacción se inició por adición de H_2O_2 0.4 mM, y el blanco se preparó en ausencia de H_2O_2 .

2.3.4 MnP (EC 1.11.1.13)

Se emplearon métodos de valoración directos e indirectos.

Oxidación del Mn^{2+}

El $MnSO_4$ fue oxidado directamente por la MnP en una mezcla de reacción compuesta por $MnSO_4$ 0.1 mM y H_2O_2 0.1 mM en tartrato sódico 0.1 M, pH 5. El producto formado, Mn^{3+} -tartrato, es un complejo estable que presenta un máximo de absorción a 238 nm ($\epsilon_{238} = 6\ 500\ M^{-1}cm^{-1}$). La reacción se inició con la adición del H_2O_2 y se siguió el aumento lineal de absorbancia con el tiempo a 238 nm. El blanco se preparó sin $MnSO_4$.

Oxidación del DMP dependiente de Mn^{2+}

La valoración de la actividad MnP fue indirecta. La reacción se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas en el apartado anterior con la diferencia de que se incluyó un fenol, DMP 0.1 mM, que es oxidado por el Mn^{3+} (producto de la oxidación del $MnSO_4$ por la MnP). En la reacción se forma un dímero denominado cerulignona (3,3',5,5'-tetrametoxi-p,p'-difeni quinona), resultado de la oxidación de dos moléculas de DMP, cuya formación fue seguida a 469 nm. El ϵ_{469} de la cerulignona se estimó por oxidación completa de diferentes concentraciones de DMP con lacasa o MnP, obteniéndose un valor de $55\ 000\ M^{-1}cm^{-1}$ para concentraciones de cerulignona entre 0 y 5 μM ($\epsilon_{469} = 27\ 500\ M^{-1}cm^{-1}$ cuando se refirió a la concentración de DMP).

Para cuantificar la oxidación debida a la actividad peroxidasa de la MnP se prepararon los blancos respectivos: actividad peroxidasa independiente de Mn^{2+} y actividad lacasa en ausencia de H_2O_2 .

2.3.5 Peroxidasa independiente de Mn^{2+}

La valoración de esta actividad se llevó a cabo utilizando como sustratos DMP (ver apartado anterior) y alcohol veratrílico. La oxidación del DMP 0.1 mM, se siguió por la formación de cerulignona, y la oxidación del alcohol veratrílico 2 mM por la formación de veratraldehído, en ambos casos en ausencia de $MnSO_4$. La reacción se llevó a cabo en presencia de H_2O_2 0.1 mM y EDTA 1 mM en tartrato sódico 0.1 M a pH 3. La concentración de alcohol veratrílico y pH de la reacción fueron aquellos utilizados para la estimación de la actividad LiP, y todos los blancos se hicieron en ausencia de H_2O_2 .

2.4 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PEROXIDASAS

2.4.1 Preparación de inóculos y condiciones de cultivo

Como inóculo se utilizaron "pellets" procedentes de cultivos en agitación de 6 días en medio glucosa-peptona-extracto de levadura, homogeneizados durante 20 segundos en un Omni-Mixer Sorvall, modelo 230.V-AC-50/60 CY, a la velocidad mínima. El inóculo se preparó en un 5% del volumen a inocular ajustando la cantidad de micelio, en peso seco, a 1mg/ml y se inocularon matraces de 1 litro que contenían 200 ml del mismo medio. Los cultivos se incubaron a 28°C en un agitador orbital Gallenkamp a 180 rpm.

2.4.2 Purificación

Después de 6 días de incubación, momento en el cual la actividad MnP presentó su pico de máxima actividad, el líquido de cultivo se concentró 15 veces y dializó frente a tartrato sódico 10 mM, pH 4.5 por ultrafiltración a través de membranas con un tamaño de poro de 5 kDa (filtros Minisette, Filtron), mediante el empleo de una bomba peristáltica (modelo 7518-02, Masterflex). El líquido concentrado, aproximadamente 75 ml, se cargó en un cartucho-Q de Biorad equilibrado en tartrato sódico 10 mM, pH 4.5 y se sometió a un flujo de 1 ml/min mediante el empleo de un equipo "Econo System" de Biorad. Las proteínas retenidas en el cartucho se eluyeron con NaCl 1 M. Se valoró la actividad MnP de todas las fracciones eluidas mezclando aquellas que presentaban actividad, y se concentraron y dializaron por ultrafiltración utilizando membranas con un tamaño de poro de 3 kDa (cartuchos Macrosep de Filtron). A continuación se cargaron muestras de 1 ml en una columna (K 16/100, Pharmacia) de Sephacryl S-200 HR equilibrada en tartrato sódico 10 mM, pH 4.5, con un flujo de la fase móvil, fijado por gravedad, de 0.8 ml/min. Se agruparon las fracciones que contenían actividad MnP y se concentraron y dializaron frente a tartrato sódico 10 mM, pH 5. Se aplicaron muestras de aproximadamente 1 ml a una columna de intercambio aniónico Mono-Q (Pharmacia HR 5/5) equilibrada en tartrato sódico 10 mM, pH 5.0. Las dos isoenzimas de la MnP se eluyeron con un gradiente lineal de 0 a 0.25 M de NaCl en el mismo tampón, utilizando un flujo de 0.8 ml/min durante 20 min y empleando un equipo cromatográfico formado por un inyector Rheodyne 7125, bomba formadora de gradiente de Pharmacia LKB 2249, detector de longitud de onda variable de Pharmacia LKB (WM. 2141) y los paquetes informáticos "HPLC manager" (versión 1.00) y Nelson (versión 5.5.5). Las fracciones que contenían actividad MnP fueron recogidas, concentradas, dializadas y conservadas a -20°C.

2.5 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE PEROXIDASAS

2.5.1 Valoración de Proteínas

La concentración de proteínas se determinó según el método de Bradford (1976) utilizando el reactivo y el procedimiento de Bio-Rad. Este se basa en el cambio de absorción, de 465 nm a 595 nm, que experimenta una solución ácida de "Coomassie Brilliant Blue G-250" al unirse a las proteínas. Las lecturas a 595 nm se transformaron en $\mu\text{g/ml}$ utilizando una recta patrón de albúmina bovina, lineal entre 0 y 0.8 unidades de absorbancia (0-22 $\mu\text{g/ml}$).

$$\text{OD}_{595} = 0.0397c + 0.0074 \quad (r = 0.99)$$

2.5.2 Concentración de peróxido de hidrógeno

La cantidad de H_2O_2 de una muestra problema se estimó utilizando el método colorimétrico descrito por Pick y Keisari, (1980). Éste se basa en la oxidación del rojo fenol, catalizada por peroxidasa, que a pH básico presenta la máxima diferencia de absorción a 610 nm con respecto a su forma reducida.

La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato 100 mM, pH 6, rojo fenol 0.01%, con 2.5 U de peroxidasa (grado I, Boheringer Mannheim S.A.) y el líquido problema.

2. Materiales y métodos

Transcurridos 5 min a temperatura ambiente se añadió NaOH (50 μ l de NaOH 4 M por ml de reacción). El blanco de la reacción se realizó añadiendo NaOH a la solución de peroxidasa antes de mezclar los componentes de la reacción. La lectura a 610 nm se transformó en concentración de H₂O₂ (μ M) utilizando una recta patrón elaborada con H₂O₂ comercial (Perhydrol 30% H₂O₂, Merck).

2.5.3 PAGE y determinación de la Mr

PAGE y SDS-PAGE se llevaron a cabo en geles verticales de poliacrilamida de 1mm de espesor, empleando cubetas "Mini Protean II" de Biorad según el método descrito por Laemmli, (1970). Cada gel estaba formado por una fase inferior (gel de separación) y una superior (gel de concentración) con la siguiente composición.

Gel de separación (acrilamida 11.5% y bisacrilamida 0.32%): 2.5 ml de Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, 4 ml de una solución de acrilamida 29%-bisacrilamida 0.8%, 50 μ l de persulfato amónico 10%, 5 μ l de TEMED y agua hasta un volumen final de 10 ml.

Gel de concentración (acrilamida 1.9% y bisacrilamida 0.05%): 2.5 ml de Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, 1.3 ml de la solución acrilamida 29%-bisacrilamida 0.8%, 50 μ l de persulfato amónico, 10 μ l de TEMED y agua hasta un volumen final de 10 ml.

Para PAGE las muestras se diluyeron (1:4) en tampón de muestra, compuesto por Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, azul de bromofenol 0.025% y glicerol 8.7%. El tampón de electroforesis se preparó mezclando 3 g de Tris-base con 14.4 g de glicina en agua hasta un volumen final de 1 litro. Para SDS-PAGE los geles y el tampón de electroforesis se prepararon con SDS 0.1%, y las muestras se hirvieron 5 min en tampón de muestra con SDS 2% y β -mercaptoetanol 5% antes de ser cargadas en el gel.

El potencial aplicado para correr las muestras fue de 25 V hasta su entrada en el gel de concentración, y de 100 a 125 V durante el proceso de separación.

Finalizada la electroforesis, el gel se tiñó en una solución compuesta por: azul de Coomassie R-250 0.2%, metanol 40% y ácido acético 10%. Por último se destiñó con una solución de metanol-ácido acético-agua (30:10:60).

Para la determinación del peso molecular mediante SDS-PAGE se utilizaron patrones de alto (45-200 kDa) y bajo peso molecular (14.4-97.4 kDa) de Biorad. Otras técnicas utilizadas para la determinación del peso molecular fueron espectrometría de masas en MALDI-TOF y cromatografía de exclusión molecular en columna Superosa-12 (Pharmacia) utilizando tartrato sódico 10 mM, pH 5, NaCl 150 mM como fase móvil y un flujo de 1 ml/min.

2.5.4 Isoelectroenfoque

Se realizó en geles de poliacrilamida al 7% según el método descrito por Grog *et al.* (1980). Los geles, de 0.4 mm de espesor, estaban compuestos por 1.87 ml de una solución de acrilamida 29%-bisacrilamida 0.8%, 0.57 ml de anfolitos LKB de distintos rangos de pH, 37.5 μ l de persulfato amónico 10%, 3.7 μ l de TEMED y agua hasta un volumen final de 7.5 ml. El gradiente de pH (de 2.5 a 5.5) se estableció utilizando una mezcla compuesta por un 15% de anfolitos con un rango de pH 3.5-10 y un 85% de anfolitos con un rango de pH 2.5-5.

Las muestras se aplicaron sobre papel Whatman nº 3 previamente colocado en la superficie del gel. Los electrodos de platino se colocaron sobre tiras de papel humedecidas

2. Materiales y métodos

con NaOH 1 N en el cátodo y H₃PO₄ 1 N en el ánodo, aplicándose a continuación una corriente constante de 7 mA y 5 W con un potencial máximo de 1200 V durante 3 h. El gradiente de pH formado en el gel se midió con un pH-metro Orion modelo 720, utilizando el electrodo de contacto modelo 9165SC. El gel se lavó en una solución de metanol-ácido acético-agua (30:10:60) para evitar interferencias con los anfolitos y posteriormente se tiñó añadiendo a 50 ml de esta solución 2 ml de la que contenía el azul de Coomassie R-250.

El cálculo del pI teórico, una vez conocida la secuencia proteica, se llevó a cabo con el programa "Expasy-tools".

2.5.5 Contenido en carbohidratos y desglicosilación

El contenido en carbohidratos de las enzimas purificadas se determinó por el método de Trevelyand y Harrison, (1952) basado en la formación de derivados de furfural a partir de los azúcares tras añadir ácido sulfúrico.

El procedimiento consistió en la adición de 0.2 ml de muestra a 1 ml de reactivo (0.2 g de antrona en 100 ml de ácido sulfúrico 14 M). Se hirvió en baño de agua durante 10 min, se dejó enfriar y a continuación se leyó la absorbancia a 660 nm. Para el cálculo de la concentración se empleó la siguiente recta patrón, lineal hasta una concentración 1 mM de glucosa.

$$OD_{660} = 0.0373c + 0.0069 \quad (r = 0.99)$$

La reacción de desglicosilación de las peroxidasas se llevó a cabo con la enzima endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (endo-H) de Boehringer, capaz de hidrolizar el enlace N-glicosídico entre dos residuos de N-acetilglucosamina unidos a una asparagina de la proteína.

La reacción se realizó con las proteínas previamente desnaturalizada con SDS 0.06% y β -mercaptoetanol 0.1 mM a 100°C durante 5 min. La mezcla de reacción, compuesta por azida 0.02% y 25 mU de endo-H por mg de proteína a hidrolizar en acetato 50 mM, pH 5.5, se incubó 16 h a 37°C. El resultado de la reacción de desglicosilación se reveló por SDS-PAGE comparando con la proteína glicosilada.

2.5.6 Análisis de aminoácidos

La composición en aminoácidos de una proteína se determinó con un analizador "Biochrom 20" de Pharmacia tras hidrolizar 20 μ g de proteína con HCl 6 N a 110°C durante 24 h.

2.5.7 Determinación de la secuencia N-terminal

Las secuencias N-terminal se obtuvieron por degradación de Edman automatizada de 5 μ g de proteína. Para ello se empleó un secuenciador Applied Biosystems (modelo 494) trabajando en modo líquido y un analizador de feniltiohidantoina "on-line" (modelo 140C), ambos de Perkin Elmer.

2.5.8 Hidrólisis con tripsina

Se resuspendieron 200 µg de proteína desglicosilada en acetato amónico 0.4 M y DTT 4 mM, incubándose la mezcla 15 min a 50°C. A continuación se añadió iodoacetamida hasta una concentración final 8 mM y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Por último se añadió la tripsina (Difco) (10 µg), previa dilución de la mezcla de reacción con 2.3 volúmenes de agua. La reacción se mantuvo a 37°C durante 16 h y se paró por congelación, conservándose a -20°C hasta su utilización.

Con objeto de separar los péptidos procedentes de la hidrólisis con tripsina se llevó a cabo una cromatografía en columna C18 (Spherisorb S50DS2, Hichrom). Para ello, se empleó un gradiente de acetonitrilo (0-70%) en ácido trifluoroacético 0.1% utilizando un flujo de 1 ml/min. La elución de los péptidos se siguió a 214 nm.

2.5.9 Inmunodetección

La detección inmunológica de la peroxidasa MnPL de *P. eryngii* se realizó por la técnica de "Western-blotting". Las proteínas, separadas en geles de poliacrilamida al 12%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa empleando el módulo "Mini Trans-Blot" de Bio-Rad y, como tampón de transferencia, una solución compuesta por tampón de electroforesis, metanol, agua (10:20:70) y SDS 0.1%. Las membranas se incubaron 1 h con leche desnatada 5% en tampón PBST. Se añadió el suero con anticuerpos policlonales anti-MnPL2 a una dilución 1:1000 y se incubó 2 h a 37°C. Tras varios lavados con PBST se incubó 2 h en PBST-leche 5% y el segundo anticuerpo, anti-inmunoglobulina G de conejo ligada a peroxidasa, a una dilución 1:5000. Después de varios lavados, nuevamente con PBST, se reveló por quimioluminiscencia con el kit "ECLTM" de Amersham.

2.6 AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.6.1 Aislamiento de ácidos nucleicos

DNA genómico

La extracción de DNA genómico se llevó a cabo siguiendo el método de González *et al.* (1992). El micelio (200 mg), congelado a -80°C, se homogeneizó en 2.5 ml de solución HSE con SDS 1% y se incubó 15 min a 65°C. A continuación se añadieron 2.5 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 20 mM y 5 ml de fenol. La mezcla se homogeneizó por inversión y centrifugó durante 10 min a 12000 x g. Se hicieron varias extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y una última extracción con cloroformo. El DNA de la fase acuosa se dejó precipitar durante 1 h a temperatura ambiente con 500 µl de acetato sódico 3 M, pH 6.0 y 3 ml de isopropanol, seguido de una centrifugación de 10 min a 12000 x g. El precipitado se lavó con etanol 70% y se disolvió en tampón TE. Tras dos incubaciones de 1 h a 37°C, primeramente con 20 µg/ml de RNasa y a continuación con 20 µg/ml de proteinasa K, la solución se trató con 1 volumen de fenol y se realizó una extracción con cloroformo. El DNA se precipitó con acetato sódico e isopropanol y finalmente, tras centrifugación a 12000 x g durante 10 min, se lavó con etanol 70% y se disolvió en tampón TE.

2. Materiales y métodos

El DNA de doble hebra obtenido se cuantificó espectrofotométricamente, considerando que una $OD_{260} = 1$ corresponde a aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$ y en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989) comparando la fluorescencia del DNA problema con la de una serie de concentraciones conocidas de un DNA patrón.

DNA plasmídico de *Escherichia coli*

Para las extracciones a pequeña escala se empleó el Kit “Wizard minipreps DNA Purification System” de Promega, consistente en una lisis alcalina seguida por un paso de purificación a través de una resina. Cuando se necesitó preparar DNA plasmídico a gran escala se utilizó el kit “Nucleon MaP” de Amersham que como en las preparaciones a pequeña escala utiliza el método de lisis alcalina.

RNA total

El RNA total se extrajo a partir de micelio de cultivos líquidos congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C . El método de extracción seguido fue “Ultraspec RNA isolation System” de Biotecx, basado en la utilización de una solución 14 M de sales de guanidina y urea que actúan como agentes desnaturizantes conjuntamente con fenol y otros detergentes. La cuantificación del RNA se llevó a cabo espectrofotométricamente considerando que una $OD_{260} = 1$ corresponde a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ (Sambrook *et al.*, 1989). También se comprobó la calidad del RNA obtenido visualizando los RNA ribosómicos en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio.

mRNA

El RNA mensajero poliadenilado (mRNA poliA⁺) se purificó a partir de RNA total por cromatografía de afinidad en columnas de oligo(dT)-celulosa (“mRNA Purification Kit” de Pharmacia-Biotech), siguiendo las indicaciones del fabricante. Su cuantificación se realizó espectrofotométricamente como se indica en el apartado anterior.

2.6.2 Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.5-1%, preparados en tampón TAE a los que se añadió bromuro de etidio hasta una concentración final 1.2 μM . Los marcadores de peso molecular utilizados fueron los marcadores VI y VII de Boehringer y DNA del fago λ digerido con *Hind*III. En aquellos casos que fue necesario purificar DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el kit “GeneClean” de BIO 101 Inc.

Las moléculas de RNA se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1.2%, preparados con formaldehído 6% en tampón 1 X MOPS. Las muestras se prepararon en un volumen de 10 μl con agua o tampón TE al que se añadió 12.5 μl de formamida, 4 μl de formaldehído 33% y 2.5 μl de 10 X MOPS. Se calentaron 10 min a 65°C y tras adición del tampón de muestra se corrieron a 30 voltios durante 16 h en 1 X MOPS.

La composición del tampón de muestra, tanto para DNA como para RNA, fue: glicerol 50%, EDTA 50 mM, azul de bromofenol 0.1% y xilencianol 0.1%.

2.6.3 Análisis de DNA genómico por el método de Southern

La transferencia de DNA de geles de agarosa a membranas de nitrocelulosa se realizó por la técnica de Southern según el protocolo descrito en Sambrook *et al.* (1989). El gel se irradió

2. Materiales y métodos

con luz UV durante 5 min y se sumergió, con agitación suave, en tres soluciones. Solución I (de desnaturalización) compuesta por NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 N, en la que permaneció durante 30 min; solución II (de neutralización) compuesta por NaCl 1.5 M y Tris-HCl 1.0 M, pH 7.4 en la que se incubó 30 min; y por último 20 X SSC en el que se sumergió durante 15 min. El DNA se transfirió por capilaridad a una membrana de nitrocelulosa (BA 85, 0.45 μm de Schleicher & Schuell) y después de un aclarado con 4 X SSC se secó sobre papel de filtro. Finalmente el DNA se fijó a la membrana con 120.000 μJ de energía UV mediante el empleo de un "UV crosslinker" de Stratalinker.

La membrana se prehibridó durante 2 h a 42°C en una solución compuesta por 50% de formamida, 5 X SSC, solución de Denhart 5 X, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 50 mM, pH 6.5 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado. Seguidamente se hibridó durante 16 h a 42°C en la misma solución con la sonda correspondiente, previamente marcada y desnaturalizada. Por último, se realizaron cuatro lavados: 2 de 15 min en 2 X SSC, SDS 0.1% a temperatura ambiente; 1 de 15 min en 0.2 X SSC, SDS 0.1% a 42°C; y el último de 15 min en 0.2 X SSC, SDS 0.1% a 58°C.

El revelado se realizó por exposición de las membranas a películas autoradiográficas (Kodak X-OMAT-AR) o a pantallas de europio ("Storage Phosphor Screen" de Molecular Dynamics). Las imágenes obtenidas en el equipo Phosphorimager fueron procesadas con el programa ImageQuant de Molecular Dynamics.

2.6.4 Análisis de mRNA

La transferencia del RNA de geles de agarosa a membranas de nitrocelulosa se realizó por el método de Northern, descrito inicialmente por Alwine *et al.* (1977), siguiendo el protocolo de Sambrook *et al.* (1989) con ligeras modificaciones. El RNA se transfirió por capilaridad a nitrocelulosa en 20 X SSC y se fijó en un "UV crosslinker" de Stratalinker con 120.000 μJ de energía UV. Las membranas de nitrocelulosa se prehibridaron 4 h a 42°C en 5 X SSC, formamida 50%, solución de Denhardt 5 X, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 50 mM, pH 6.5 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado. A continuación, la membranas se transfirieron a una solución de hibridación compuesta por 5 X SSC, formamida 50%, sulfato de dextrano 10%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, pH 7.5 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de esperma de salmón. Se incubó con la sonda apropiada durante 16 h a 42°C y los lavados que se realizaron a continuación fueron los mismos que se describen en el apartado 2.6.3.

2.6.5 Marcaje de ácidos nucleicos

Para el marcaje radiactivo de fragmentos de DNA se utilizó $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP y el kit "rediprime DNA labelling system" de Amersham.

2.6.6 Amplificación de ácidos nucleicos por PCR

Esta técnica se utilizó para amplificar fragmentos de DNA a partir de DNA genómico o plasmídico. Las reacciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 2400) en un volumen final de 25-100 μl que contenía 10-100 ng de DNA molde; 2.5 unidades de Amplitaq (Perkin Elmer); los oligonucleótidos correspondientes, a una concentración 200-4000 nM; dATP, dCTP, dGTP y dTTP 250 μM ; MgCl 2 mM; y el

2. Materiales y métodos

tampón de reacción compuesto por Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM. Las condiciones de cada reacción se determinaron en función de la estabilidad de apareamiento de los oligonucleótidos y del tamaño del fragmento a amplificar.

2.6.7 Secuenciación automática de DNA y análisis de las secuencias

En el proceso de secuenciación se siguió la estrategia de “primer walking” descrita por Strauss *et al.* (1986). Se utilizó la enzima FS Amplitaq DNA polimerasa para llevar a cabo reacciones de amplificación usando terminadores marcados (kit "ABI PRISM™") de Perkin Elmer. Como cebadores se emplearon oligonucleótidos universales “forward” y “reverse” del bacteriófago M13 y los correspondientes a secuencias internas de los fragmentos de ADN que se estaban secuenciando. Los productos de reacción se pasaron a un secuenciador automático (ABI PRISM 377) de Perkin Elmer, y las secuencias se analizaron con el paquete informático GCG-Wisconsin (versión 1.1 usando la “interface” W2H). Los programas BLAST y EXPASY (de los servidores NCBI y SwistProt <http>) se utilizaron para el análisis, alineamiento y comparación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos.

La elaboración del dendrograma que muestra las afinidades entre las secuencias de aminoácidos de diferentes peroxidases se realizó por el método UPGMA (“unweighted pair group method with arithmetic mean”) a partir de una matriz de distancias de Kimura, obtenida tras alineamiento múltiple por apareamiento progresivo de las secuencias.

2.6.8 Preparación y transformación de células competentes de *Escherichia coli*

Para la preparación de las células competentes de *E. coli* se utilizó el método del RbCl según Hanahan, (1983), y su transformación se llevó a cabo siguiendo el método descrito en Sambrook *et al.* (1989).

2.7 CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN Y MODELADO MOLECULAR

2.7.1 Diseño de cebadores y preparación de sondas de DNA de la proteína MnPL

Para la preparación de sondas de DNA y cDNA de la proteína MnPL se utilizaron respectivamente las técnicas de PCR y RT-PCR.

Se sintetizaron tres oligonucleótidos degenerados (sintetizador Beckman-oligo 1000M) correspondientes a: i) la secuencia que codifica parte del extremo N-terminal de la proteína madura (oligo Nt); y ii-iii) las secuencias de nucleótidos reversas y complementarias que codifican parte de dos de los péptidos obtenidos tras hidrólisis con tripsina de la proteína madura (oligos 5 y 14). En los extremos 5' de los oligonucleótidos se incluyeron dianas de restricción, *Bam*HI en el oligo Nt y *Eco*RI en los oligos 5 y 14, para una clonación posterior en el plásmido pBSK.

Por PCR se amplificó un fragmento de DNA de 1060 pb. En cada reacción, de 100 µl de volumen, se usaron 100 ng de DNA genómico de *P. eryngii* como molde y los oligos, como cebadores, a una concentración 4 µM. Las condiciones de la reacción fueron: i) 1 ciclo de 2 min a 94°C, 1 min a 55°C y 2 min a 72°C; ii) 25 ciclos de 35 s a 94°C, 1 min a 55°C y 2 min a 72°C; y iii) 1 ciclo de 10 min a 72°C.

2. Materiales y métodos

En paralelo se amplificó un fragmento de cDNA de 648 pb por RT-PCR. Para la obtención de la primera hebra de DNA se utilizaron 0.5 µg de RNA total, el oligo-14 4 µM como cebador y 1 unidad de transcriptasa reversa AMV (Amersham) en un volumen de reacción de 20 µl, que además contenía Tris-HCl 1M, pH 8.8, KCl 1 M, MgCl₂ 0.25 mM y 1 unidad de RNAsin (Promega). La mezcla de reacción se incubó 45 min a 42°C y a continuación se empleó como molde para una amplificación por PCR utilizando los oligos Nt y 14 como cebadores bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

2.7.2 Librería genómica de *Pleurotus eryngii*

2.7.2.1 Construcción

La metodología seguida para la construcción de la librería genómica fue la descrita en "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel *et al.*, 1987) y Sambrook *et al.* (1989). El DNA empleado se purificó como se describe en el apartado 2.6.1.

Digestión parcial del DNA con *Sau3A*. En primer lugar se establecieron las condiciones óptimas de digestión parcial del DNA de *P. eryngii* con *Sau3A*, con objeto de obtener el mayor número posible de fragmentos con un tamaño comprendido entre 9 y 23 kb. Para ello, se digirieron 50 µg de DNA con diferentes concentraciones de *Sau3A* a 37°C en un volumen de 1 ml. Cada 5 min se tomaron alícuotas de 40 µl a las que se añadió 10 µl de una solución compuesta por 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, glicerol 20%, SDS 0.1%, azul de bromofenol 0.1%. Las alícuotas se cargaron en un gel de agarosa al 0.5% empleando como marcador de peso molecular DNA del bacteriófago λ sin digerir y digerido con *HindIII*.

Se realizaron digestiones a gran escala bajo las condiciones consideradas como óptimas: 8.5 mU *Sau3A*/µg de DNA y un tiempo de reacción de 25 min. El DNA digerido se extrajo una vez con fenol-cloroformo, otra con cloroformo y se precipitó a -20°C con 1 volumen de NaCl 5M y 3 volúmenes de etanol 100%. Después de un lavado con etanol 70% se resuspendió en tampón STE y se analizó en un gel de agarosa al 0.5%.

Fraccionamiento por tamaño en gradiente de sacarosa. El DNA parcialmente digerido con *Sau3A* se fraccionó por diferencias en tamaño empleando una centrifugación en gradiente lineal de sacarosa. Para ello, el DNA se incubó 5 min a 65°C y se aplicó a la parte superior del gradiente (10-40%) preparado en el tubo de centrífuga en tampón STE. Se centrifugó a 20°C en un rotor SW-41 a 30000 rpm (154000 x g) durante 22 h empleando una ultracentrífuga Beckman XL-90. Se recogieron fracciones de 750 µl y se analizaron en un gel de agarosa al 0.5%. Aquellas que presentaron fragmentos de DNA comprendidos entre 9 y 23 kb se diluyeron con agua para reducir la concentración de sacarosa por debajo del 10% y el DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100% durante 16 h a -20°C. Se resuspendió en tampón STE y se volvió a precipitar con 2 volúmenes de etanol 100% a -20°C, esta vez durante 3 h. El DNA se resuspendió en tampón TE y se cuantificó en gel utilizando patrones de DNA de concentración conocida.

Ligación de los fragmentos de DNA a los brazos del bacteriófago λEMBL3 y empaquetamiento del DNA recombinante. 175 ng de DNA parcialmente digerido con *Sau3A* y separados en gradiente de sacarosa se ligaron a 1 µg de brazos del bacteriófago

2. Materiales y métodos

λ EMBL3 predigeridos con *Bam*HI ("Lambda EMBL3/BamHI Vector Kit" de Stratagene) siguiendo las indicaciones del proveedor. La mezcla de ligación se empaquetó utilizando extractos de empaquetamiento "Gigapack II Gold" de Stratagene.

2.7.2.2 Titulación

El sistema λ EMBL3 se fundamenta en la selección "spi" (sensibilidad a inhibición por P2). Los fagos Lambda que contienen genes *red* y *gam* activos no pueden crecer sobre células huésped con el fago P2 en lisogenia. Sin embargo, los que no contienen estos genes pueden seguir la vía lítica en cepas que contienen P2 como profago tales como XL1-Blue MRA (P2). Los genes *red* y *gam* se encuentran localizados entre las dos dianas *Bam*HI en el DNA de λ EMBL3. Por tanto, las cepas salvajes de este fago no pueden crecer sobre las células XL1-Blue MRA (P2). Cuando el fragmento flanqueado por las dos dianas *Bam*HI es reemplazado por un fragmento de DNA externo, el λ EMBL3 recombinante pasa a ser *red*/*gam*, y puede crecer sobre células con P2 en lisogenia. Solamente los fagos recombinantes podrán crecer sobre las células XL1-Blue MRA (P2).

Las células XL1-Blue MRA(P2) y XL1-Blue MRA se crecieron en medio LB que incluía maltosa 0.2% y $MgSO_4$ 10 mM durante 4-6 h a 37°C con agitación, en un baño termostatzado Julabo SW-21C, sin pasar de $OD_{600} = 1$. Las células, precipitadas por centrifugación, se resuspendieron en $MgSO_4$ 10 mM hasta alcanzar una $OD_{600} = 0.5$.

Se preparó un banco de diluciones de la librería en tampón SM. Se infectaron 300 μ l de células con 1 μ l de cada dilución y se incubaron a 37°C durante 15 min con agitación suave. Las células, resuspendidas en medio NZY con agarosa al 0.7% (w/v) a 48°C, se plaquearon sobre medio NZY-agar (15 g/l) y se incubaron a 37°C. Se contaron las placas de lisis y se obtuvo un título de 1×10^7 pfu/ml de librería. El título coincidió para las dos cepas (con y sin P2), lo que indica que el 100% de los fagos de la librería eran recombinantes.

2.7.2.3 Amplificación

Considerando que el genoma haploide de *Pleurotus eryngii* pueda ser semejante, en tamaño, al de *Phanerochaete chrysosporium* (aproximadamente 44000 kb según Raeder y Broda, (1988), de las cuales alrededor del 20-30% corresponden a DNA mitocondrial y ribosomal) y que el tamaño promedio de los fragmentos de DNA de *P. eryngii* presentes en los fagos recombinantes es de 16 kb, podríamos considerar que un equivalente genómico estaría contenido en ≈ 2750 pfu. Teniendo en cuenta esta estimación se infectaron células XL1-Blue MRA (P2) con aproximadamente 204000 pfu que representan ≈ 74 equivalentes genómicos (número suficiente de equivalentes para considerar que todos los genes están representados un número elevado de veces). Las células infectadas se incubaron como se indicó en el proceso de titulación, impidiendo que las placas de lisis superasen los 2 mm de diámetro. Las placas se cubrieron con tampón SM y se mantuvieron 16 h a 4°C con suave balanceo para que los fagos difundieran en el tampón. Se recuperó la suspensión de bacteriófagos, añadiéndose a continuación cloroformo hasta una concentración final del 5 %. Se incubó 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min a $2000 \times g$ para eliminar restos celulares. El sobrenadante fue transferido a un tubo al que se añadió cloroformo a una concentración final del 0.3 %, almacenándose a 4°C hasta su utilización. Para un almacenamiento prolongado la librería se conservó en DMSO 7 % a -80°C.

2.7.2.4 "Screening"

Las células infectadas con fagos recombinantes se plaquearon como se indica en el apartado 2.7.2.2 obteniéndose las correspondientes placas de lisis. Los fagos recombinantes se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Protran BA 85) sobre las que se fijó su DNA. Para ello se emplearon tres soluciones: de desnaturalización, NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 N, en la que se sumergió la membrana durante 2 min; de neutralización, NaCl 0.5 M y Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 en la que se mantuvo durante 5 min; y por último de aclarado, Tris-HCl 0.2 M, pH 7.5 y 2 X SSC, en la que se sumergió durante 30 s. Las membranas se secaron sobre papel de filtro y el DNA se fijó en un "UV crosslinker" de Stratalinker con 120.000 μ J de energía UV. A continuación se prehibridaron e hibridaron como se indica en el apartado 2.6.3 empleando la sonda de DNA de 1060 pb. Las condiciones de lavado fueron las que se indican en el apartado 2.6.3.

Una vez identificados y aislados los clones positivos se procedió a la preparación de pequeñas cantidades de su DNA por el método de lisado en placa "Plate lysate method" descrito en Sambrook *et al.* (1989).

2.7.3 Librería de cDNA enriquecida

2.7.3.1 Construcción

La librería de cDNA se construyó en el bacteriófago λ gt10 a partir de mRNA de *P. eryngii* obtenido de micelio crecido en medio glucosa-peptona-extracto de levadura durante 5 días a 28°C con agitación (180 rpm), coincidiendo con el momento de máxima producción de mRNA de la peroxidasa MnPL (Fig. 3.14). A partir de 1.25 mg de RNA total, extraído como se indica en el apartado 2.6.1, se purificaron 18.7 μ g de mRNA poliA⁺ (apartado 2.6.1) que se usaron para sintetizar cDNA. Se utilizó oligo dT para la obtención de la primera hebra de cDNA como se indica en las instrucciones del kit "cDNA synthesis module" de Amersham. Al cDNA, con extremos romos, se le añadieron adaptadores ("cDNA rapid adaptor ligation module" de Amersham) con extremos cohesivos *EcoRI*, que fueron fosforilados para poder ser ligados a los brazos del fago λ gt10 digeridos con *EcoRI* ("cDNA rapid cloning module- λ gt10" de Amersham). La mezcla de ligación se empaquetó *in vitro* como se describe para la librería de DNA.

2.7.3.2 Titulación

La librería de cDNA se tituló en la cepa NM514 de *E. coli* utilizando la cepa L87 como control. Los fagos λ gt10 parentales producen la proteína represora cI que favorece la ruta lisogénica en cepas salvajes de *E. coli*, incluyendo la L87. En las cepas de *E. coli* que llevan la mutación Hfl⁺ (lisogénicas de alta frecuencia), tales como la NM514, los fagos λ gt10 parentales pasan a ser totalmente lisogénicos. La inserción del cDNA en el sitio *EcoRI* de λ gt10 tiene como resultado la producción de una proteína represora cI inactiva, favoreciéndose de esta manera el ciclo lítico de los fagos recombinantes.

2. Materiales y métodos

La librería de cDNA se tituló de igual forma que la librería de DNA genómico (en este caso se utilizó el medio LB en lugar del NZY). El título obtenido fue de 6×10^4 pfu/ml de librería en la cepa NM514 y de 2×10^5 pfu/ml de librería en la cepa L87. El número de fagos recombinantes representó el 10% del total de fagos de la librería capaces de entrar en ciclo lítico en la cepa L87.

2.7.3.3 "Screening"

El screening se llevó a cabo de forma análoga al realizado para la librería de DNA. Las membranas que se utilizaron fueron "Hybond-N" de Amersham y la sonda empleada fue la de cDNA de 648 pb.

2.7.4 Modelado molecular de la proteína MnPL

El modelado molecular de la proteína MnPL, basado en homología de secuencia, se realizó con el programa ProMod. Para el refinamiento del modelo se utilizó el programa CHARMM del servidor de modelado SwistProt en Ginebra (Peitsch, 1996). El modelado se basó en el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína MnPL de *P. eryngii* con las secuencias de cuatro peroxidasaas fúngicas de estructura conocida por cristalografía de rayos X: LiP-H8 (Piontek *et al.*, 1993; Poulos *et al.*, 1993) con las claves de acceso 1LGA y 1LLP en Brookhaven PDB, LiP-H2 con la clave 1QPA y MnP1 (Sundaramoorthy *et al.*, 1994) con la clave 1MnP, de *P. chrysosporium*; y ARP-CIP (Petersen *et al.*, 1994), con la clave 1ARP, de *Coprinus*. La estructura secundaria se determinó con el programa DSSP (Kabsch y Sander, 1983). El modelado de la cavidad del grupo hemo y del sitio de unión a Mn^{2+} se optimizó con un refinamiento adicional por dinámica molecular utilizando el programa X-Plor ver. 3.1. Otros programas empleados para la comparación y representación de los modelos moleculares fueron: Frodo, RasMol, Swiss-PdbViewer y WebLab ViewerPro.

2.8 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

Para los estudios de regulación a nivel transcripcional del gen *mnpl* se realizaron hibridaciones RNA-DNA por la técnica de Northern-blot. Como sondas se emplearon el fragmento de cDNA de 648 pb del gen *mnpl* y el fragmento *EcoRI* de 12 kb que contiene la unidad transcripcional del rRNA 28S de *D. melanogaster* (control de la cantidad de RNA). En todas las membranas se incluyó una referencia interna consistente en RNA total extraído de micelio de *P. eryngii* cultivado en medio glucosa-peptona-extracto de levadura durante cinco días (Fig. 3.14). La cantidad de mRNA que codifica la proteína MnPL se cuantificó en valores relativos respecto a dicha referencia.

2.8.1 Efecto de la fuente de nitrógeno y Mn^{2+}

El RNA utilizado en estos estudios se extrajo de micelio de *P. eryngii* que se había cultivado en los medios glucosa-peptona-extracto de levadura (productor de actividad peroxidasa) y glucosa-tartrato amónico-extracto de levadura (no productor de actividad peroxidasa), a 28°C con agitación (180 rpm). El efecto de la peptona (5 g/l) y del Mn^{2+} (100

2. Materiales y métodos

μM) también se comprobó directamente sobre micelio de *P. eryngii* resuspendido en tartrato sódico 20 mM, pH 5, que posteriormente fue incubado a 28°C, 180 rpm. El micelio empleado procedía de cultivos líquidos de seis días en el medio glucosa-peptona-extracto de levadura.

2.8.2 Efecto del estrés oxidativo

P. eryngii se cultivó en medio glucosa-tartrato amónico-extracto de levadura, y posteriormente se lavó y resuspendió en tartrato sódico 20 mM, pH 5.0. El H_2O_2 (500 μM) se añadió directamente y el resto de las especies activas de oxígeno se generaron siguiendo el esquema que se muestra en la Fig. 3.1, que incluye el micelio así como enzimas ligninolíticas (lacasa y peroxidasa) producidas por el hongo. Para la generación del $\text{OH}\cdot$, el hongo tiene que producir previamente las otras dos especies reducidas de O_2 (O_2^- y H_2O_2). El O_2^- se genera por activación del O_2 mediante la adición de una quinona (menadiona), que una vez reducida por el micelio a la hidroquinona correspondiente (menadiohidroquinona) es capaz de autooxidarse a pH 5. Las enzimas ligninolíticas producidas por *P. eryngii* también participan en la oxidación de la menadiohidroquinona. La otra especie reducida de O_2 necesaria para la producción de $\text{OH}\cdot$, el H_2O_2 , se produce a través de la dismutación del O_2^- y de la reducción monovalente de éste por la menadiohidroquinona. De esta forma se mantiene un sistema cíclico de oxidación-reducción de quinonas capaz de generar O_2^- y H_2O_2 de forma continuada a expensas de equivalentes de reducción del micelio. El $\text{OH}\cdot$ es finalmente generado mediante la reducción del H_2O_2 por el O_2^- en una reacción catalizada por Fe^{3+} (reacción de Haber Weiss). Por tanto, para estudiar el efecto mediado por el $\text{OH}\cdot$ sobre la transcripción del gen *mnpI*, el micelio se incubó en presencia de menadiona (500 μM) y Fe^{3+} (100 μM) en tartrato sódico 20 mM, pH 5.

2.9 EXPRESIÓN HETERÓLOGA

2.9.1 Expresión en *Escherichia coli*

2.9.1.1 Vectores de expresión

Se utilizaron dos sistemas de expresión diferentes: el sistema pET (vectores pET21a y pET22b) y el vector pMal-c2 (las propiedades de cada vector están descritas en el apartado 2.1.3). El cDNA correspondiente a la peroxidasa MnPL2 madura se amplificó por PCR y se clonó en los diferentes vectores de expresión. Los cebadores utilizados se indican en la Tabla 2.3. El fragmento *NdeI-EcoRI* que se clonó en el plásmido pET21a portaba en el extremo 5' una secuencia codificante para 6 histidinas unidas a la de la proteína madura por la secuencia de aminoácidos IEGR (reconocible por el Factor Xa). La cola de histidinas permite la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad en columnas de níquel ("Ni-NTA Spin Kit" de Qiagen), y la posterior incubación con el factor Xa libera la proteína sin dicha cola. El fragmento *EcoRI-XhoI* se clonó en el plásmido pET22b detrás de una secuencia que permite el traslado de la proteína al periplasma, facilitando de este modo el proceso de purificación. El fragmento *EcoRI-XbaI* se clonó en el plásmido pMal-c2 a continuación de la secuencia que codifica para una proteína de unión a maltosa, quedando ambas secuencias separadas por la secuencia de aminoácidos IEGR.

2. Materiales y métodos

Tabla 2.3. Cebadores utilizados para la amplificación del cDNA de la proteína MnPL2 y posterior inserción en diferentes vectores de expresión.

Vector	<ul style="list-style-type: none"> • Secuencia de aminoácidos (Extremos N y C-terminal de la proteína madura) • Cebadores para PCR (secuencia de nucleótidos en dirección 5'→3'*)
pET21a	<ul style="list-style-type: none"> • Extremo N-terminal: MHHHHH IEGR ATCDDG <i>NdeI</i> • 5'-GGAATTC<u>CATATGCATCATCATCATCATATCGAAGGTCGTGCAACT</u> TGCGACGACGG-3'
	<ul style="list-style-type: none"> • Extremo C-terminal: PVPGS <i>EcoRI</i> • 5'-GGAATTC<u>TTACGATCCAGGGACGGG</u>-3'
pET22b	<ul style="list-style-type: none"> • Extremo N-terminal: IEGR ATCDDGRT <i>EcoRI</i> • 5'-GGAATTC<u>GATCGAAGGTCGTGCAACTTGCGACGACGGACGCACC</u>-3'
	<ul style="list-style-type: none"> • Extremo C-terminal: PVPGS IEGR <i>XhoI</i> • 5'-TATTCTC<u>GAGACGACCTTCGATCGATCCAGGGACGGG</u>-3'
pMal-c2	<ul style="list-style-type: none"> • Extremo N-terminal: IEGR ATCDDGRT <i>EcoRI</i> • 5'-GGAATTC<u>CATCGAGGGAAGGGCAACTTGCGACGACGGACGCACC</u>-3'
	<ul style="list-style-type: none"> • Extremo C-terminal: PVPGS <i>XbaI</i> • 5'-GCTCTA<u>GACTATTACGATCCAGGGACGGG</u>-3'

Las secuencias de nucleótidos corresponden a los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína madura. Las dianas que reconocen las endonucleasas de restricción aparecen subrayadas y flanqueadas en dirección 5' por un número determinado de bases con objeto de aumentar la frecuencia de corte.

*Las secuencias de nucleótidos C-terminal son reversas y complementarias de la hebra codificante.

IEGR-----secuencia de procesamiento proteolítico reconocida por el FactorXa.

HHHHH-----secuencia de 5 histidinas que permite purificar la proteína a través de una columna de níquel.

2.9.1.2 Producción de la peroxidasa recombinante

Con las construcciones realizadas en los plásmidos pET21a y pET22b se transformaron células BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS, y con la construcción realizada en el plásmido pMal-c2 se transformaron células DH5α (apartado 2.6.8).

2. Materiales y métodos

Las células transformadas se incubaron en dos medios diferentes (LB y M9) con 50 µg/ml de ampicilina en agitación (180 rpm) a 28-37°C hasta llegar a una OD₆₀₀ = 0.9. A continuación se añadió el inductor (IPTG a una concentración final 5 mM) manteniéndose el proceso de incubación bajo las mismas condiciones. Con objeto de comprobar el momento de máxima expresión se tomaron muestras de 500 µl cada 2 h. Tras centrifugación se resuspendieron en 50 µl de tampón de muestra (apartado 2.5.3) con SDS 2% y β-mercaptoetanol 5%. Las diferentes muestras recogidas se analizaron en geles de poliacrilamida, y por inmunolocalización de la proteína recombinante con anticuerpos policlonales anti-MnPL2.

La peroxidasa recombinante se expresó a gran escala (200 ml) bajo las condiciones descritas como óptimas (medio M9 a 28°C). Debido a su acumulación como proteína inactiva, tanto en forma soluble como formando cuerpos de inclusión en el citoplasma de *E. coli*, se siguieron los protocolo de solubilización y replegamiento descritos para la MnP de *P. chrysosporium* por Doyle y Smith (1996) y Whitwam y Tien, (1996) con objeto de conseguir una peroxidasa catalíticamente activa.

2.9.2 Expresión en *Emmericella nidulans*

2.9.2.1 Vector de expresión

El cDNA correspondiente a la peroxidasa MnPL2 se clonó en el sitio *Bam*HI-*Eco*RI del plásmido pAlcA1 dando lugar al plásmido pALMP2. El cDNA se preparó por PCR con dos oligonucleótidos sintéticos correspondientes a los extremos N-terminal y C-terminal de la secuencia de la proteína completa (incluyendo el péptido señal) que portaban, respectivamente en sus extremos 5', dianas para las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI.

N-terminal (*Bam*HI): 5'-cgggatcccccATGTCTTTCAAGACGC-3'

C-terminal (*Eco*RI): 5'-ggaattcTTACGATCCAGGGACGGG-3'

2.9.2.2 Preparación y transformación de protoplastos de *Emmericella nidulans*

Para la preparación de protoplastos de *E. nidulans* se siguió básicamente el método descrito por Tilburn *et al.* (1983). El micelio, recogido por filtración a partir de cultivos crecidos en medio mínimo con los requerimientos específicos (biotina, metionina y arginina), a 25°C durante 36 h y 180 rpm en un agitador orbital, se lavó con MgSO₄ 600 mM y se resuspendió (1g de peso húmedo/20 ml) en MgSO₄ 1.2 M frío, tamponado a pH 5.8 con tampón fosfato 10 mM. Se añadieron 20 mg de Novozima 234 (InterSpex Products, Inc) por cada gramo de peso húmedo de micelio, y después de 5 min de incubación en hielo se añadió albúmina de suero bovino (24 mg/g de peso húmedo de micelio). La mezcla se incubó en un baño con agitación a 30°C durante 110 min a 130 rpm. La formación de protoplastos se siguió al microscopio. Los protoplastos se separaron de los restos celulares por centrifugación a 4000 x g durante 10 min a 4°C (rotor HB4, Sorvall) después de añadir un volumen igual de una solución compuesta por sorbitol 600 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 7.5. Los protoplastos formaron una fina capa a la mitad del tubo, y los restos celulares quedaron precipitados en el fondo. La banda de protoplastos se resuspendió en 1 volumen

2. Materiales y métodos

de sorbitol 1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, se centrifugó de nuevo y los protoplastos precipitados se resuspendieron en 1 ml de esta solución.

El procedimiento de transformación fue, en líneas generales, el descrito por Tilburn *et al.* (1983). Los protoplastos se lavaron dos veces con sorbitol 1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, CaCl₂ 10 mM y se resuspendieron en un volumen de 200 µl de esta solución. El DNA transformante (1-2 µg) se añadió a la solución de protoplastos, sin sobrepasar 1/10 del volumen, conjuntamente con 50 µl de una solución de polietilenglicol (PEG) compuesta por PEG 60% (peso/volumen), CaCl₂ 10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5. Después de 20 min en hielo se añadió 1 ml de la solución de PEG y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Los protoplastos se centrifugaron, se lavaron con sorbitol 1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, CaCl₂ 10 mM y se plaquearon en el medio apropiado (selectivo y no selectivo, con agar al 1%) resuspendidos en un volumen de 2ml de agar blando (medio con agar al 0.4%). Se dejaron crecer en estufa a 37°C. El medio selectivo consistió en medio mínimo de *E. nidulans* con 1 mg/l de D-biotina y 74.5 mg/l de L-metionina, estabilizado osmóticamente con sacarosa 1 M. Se empleó medio no selectivo, cuya composición es la del medio selectivo mas 530 mg/l de L-arginina, para estimar la viabilidad de los protoplastos.

Para comprobar la integración del DNA problema en el genoma de *E. nidulans*, se realizaron una serie de reacciones de PCR a partir de micelio crecido en condiciones selectivas. La preparación de las muestras fue como se describe en Wang *et al.* (1993).

2.9.2.3 Producción y purificación de la peroxidasa recombinante

Los transformantes positivos de *E. nidulans* que incluían el gen de la peroxidasa de *P. eryngii* en su genoma se crecieron a partir de una suspensión de conidios (5 x 10⁶ conidios/ml de medio) durante 24 h, a 28°C y 180 rpm en diferentes medios de cultivo (completo, mínimo y mínimo con "corn steep liquor" 2.5%) con 30 g/l de glucosa. A continuación, el micelio (filtrado y lavado) se transfirió a un medio de inducción cuya composición era la misma que la del medio de crecimiento al que se le había sustituido la fuente de carbono por glucosa 0.05%, treonina 100 mM y se le había añadido 500 mg/l de hemina (Sigma).

El proceso de purificación fue el descrito para la peroxidasa producida por *P. eryngii* (apartado 2.4.2) al que se incorporó un paso adicional. Las muestras procedentes de Mono-Q que presentaban actividad MnP se agruparon, concentraron y equilibraron frente a tartrato 10 mM, pH 5.0, NaCl 0.5 M, MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM. Se cargaron en una columna de Con A Sepharosa (Pharmacia) equilibrada en el mismo tampón y se sometieron a un flujo de 1ml/min empleando un equipo "Econo System" de Biorad. Las glicoproteínas unidas al soporte se eluyeron con α-D-metilglucósido 0.2 M preparado en el mismo tampón, y las muestras con actividad MnP se agruparon, concentraron, dializaron y se conservaron a -20°C.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA PEROXIDASA MnPL DE *Pleurotus eryngii*

3.1.1 Producción: Influencia de la fuente de nitrógeno y efecto del Mn^{2+}

La fuente de nitrógeno resultó decisiva para detectar actividad peroxidasa en *P. eryngii* (Fig. 3.1). Todos los ensayos realizados utilizando medios con tartrato amónico como fuente de nitrógeno resultaron fallidos, a pesar de que las condiciones fueron similares a las empleadas para el estudio de las peroxidases ligninolíticas de *P. chrysosporium*. Sin embargo, cuando el nitrógeno inorgánico se sustituyó por peptona, no solo se detectó actividad peroxidasa (estimada por la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+}) sino que los niveles aumentaron a medida que se incrementaba la concentración de peptona en el

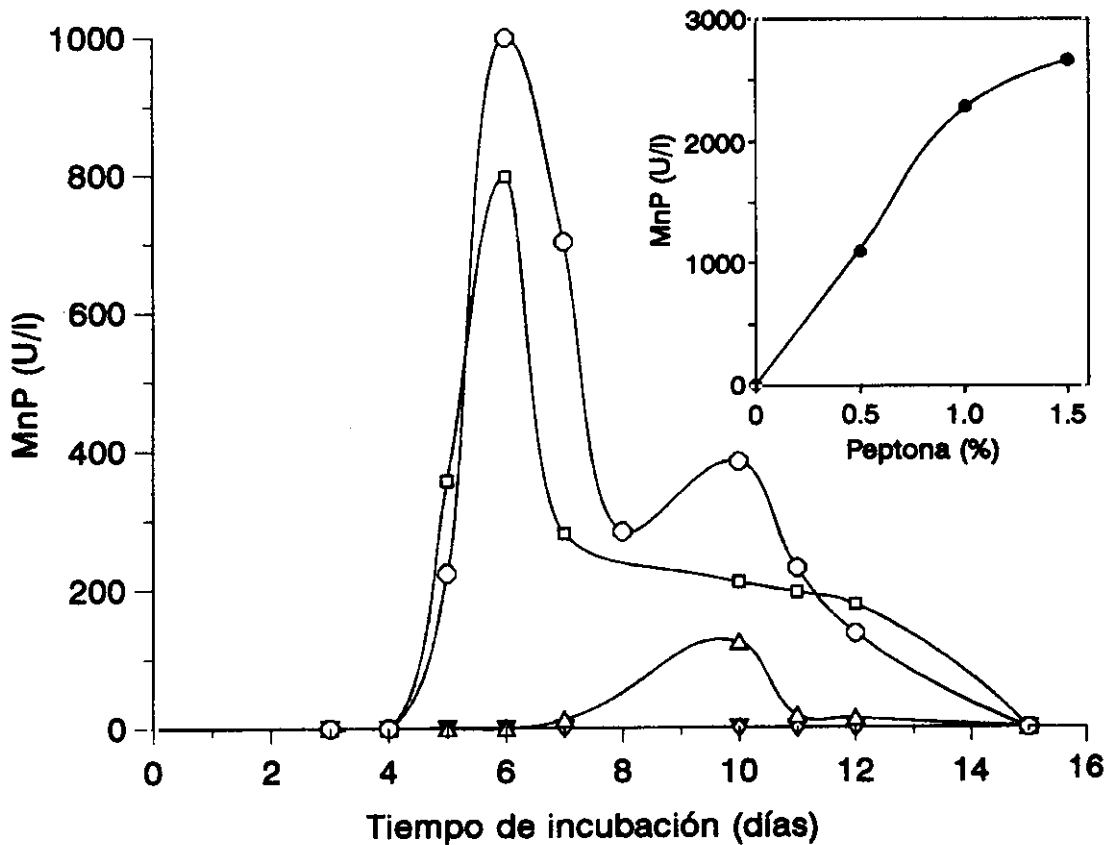


Fig. 3.1. Actividad peroxidasa en cultivos agitados de *Pleurotus eryngii* con diferentes fuentes de nitrógeno. Medios ensayados: glucosa (2%)-tartrato amónico (0.7%) (-■-), glucosa (2%)-"corn steep liquor" (0.5%)-extracto de levadura (0.2%) (-▽-), extracto de malta (2.7%) (-◇-), glucosa (2%)-extracto de levadura (0.7%) (-△-), glucosa (2%)-peptona (0.7%) (-□-) y glucosa (2%)-peptona (0.5%)-extracto de levadura (0.2%) (-○-). La actividad se estimó por la formación de Mn^{3+} -tartrato a pH 5 (MnP). El gráfico interior muestra la máxima actividad obtenida en función de la concentración de peptona en el medio glucosa-peptona-extracto de levadura.

3. Resultados

medio, llegándose a alcanzar 3000 U/l. Con otras fuentes de nitrógeno orgánico, como el extracto de malta o el "corn steep liquor", no se detectó actividad o ésta apenas superó las 100 U/l, como en el caso del extracto de levadura. Los mayores niveles de actividad se alcanzaron al añadir este último compuesto, utilizado a menudo como fuente de vitaminas, al medio glucosa-peptona.

También se estudió la influencia de diferentes concentraciones de Mn^{2+} sobre las actividades enzimáticas en cultivos de *P. eryngii* en medio glucosa-peptona-extracto de levadura (Fig. 3.2). El Mn^{2+} afectó positivamente a los niveles de AAO, aunque solamente a muy altas concentraciones, y no afectó a los niveles de lacasa. Por otro lado, los niveles más elevados de peroxidasa se obtuvieron en ausencia de Mn^{2+} . Una concentración 5 μM de este catión fue suficiente para producir una disminución de la actividad de aproximadamente el 90%, y no se detectó actividad cuando su concentración fue 25 μM .

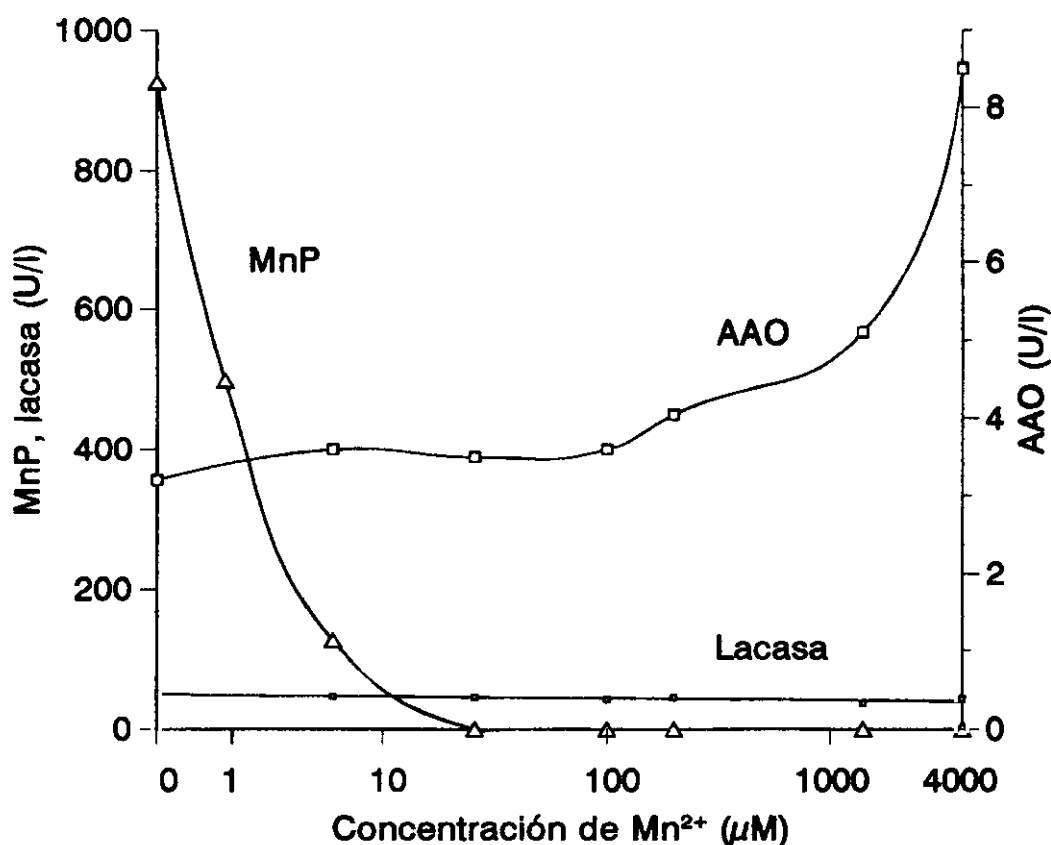


Fig. 3.2. Efecto de la concentración de Mn^{2+} sobre las máximas actividades peroxidasa, AAO, y lacasa producidas por *Pleurotus eryngii* en cultivos agitados en medio glucosa-peptona-extracto de levadura. La actividad peroxidasa se estimó por la formación del complejo Mn^{3+} -tartrato a pH 5 (MnP).

3.1.2 Purificación

En las Fig. 3.3 y 3.4 se muestran los diferentes pasos del proceso de purificación de la peroxidasa producida por *P. eryngii* en medio glucosa-peptona-extracto de levadura. En los distintos pasos de purificación la peroxidasa se siguió por la absorbancia que presenta el grupo hemo a 410 nm y por su actividad sobre Mn^{2+} , formando el complejo Mn^3 -tartrato. El líquido de cultivo ultrafiltrado se pasó por un cartucho-Q de intercambio iónico. La peroxidasa y la lacasa no se unieron al gel a pH 4.5, mientras que la AAO y la mayor parte del pigmento quedaron retenidos. Las fracciones no retenidas se pasaron por una columna de Sephacryl S-200 y la actividad coincidió con un pico de proteína después del pico de lacasa. La purificación se completó por cromatografía de intercambio iónico en columna Mono-Q de las fracciones con actividad procedentes de Sephacryl. Tras este último paso de purificación se detectaron dos picos con actividad peroxidasa y una relación A_{410}/A_{280} muy elevada. Las proteínas correspondientes a cada uno de los picos se denominaron MnPL1 y MnPL2, y se comprobó que cada una de ellas daba una única banda tras electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Fig. 3.5). Su coeficiente de extinción molar a 406 nm fue $150\,000\ M^{-1}\ cm^{-1}$. Al final del proceso de purificación se obtuvo un rendimiento global del 56% y un factor de purificación de 27 y 24 para las proteínas MnPL1 y MnPL2 respectivamente.

3.1.3 Caracterización fisico-química

La masa molecular relativa de las dos proteínas fue de 43 kDa cuando se calculó por SDS-PAGE (Fig. 3.5 A) y de 37 kDa cuando el cálculo se realizó por MALDI-TOF (Tabla 3.1 A). Por isoelectroenfoque analítico se pudo comprobar que diferían en el pI, 3.70 para MnPL1 y 3.65 para MnPL2 (Fig. 3.5 B). Esta pequeña diferencia fue suficiente para su separación en columna Mono-Q. Cuando se determinó el contenido en azúcares resultó que las dos eran glicoproteínas con un 5% (MnPL1) y un 7% (MnPL2) de carbohidratos.

La composición en aminoácidos (% molar) de las dos proteínas (MnPL1, MnPL2) fue similar (11.7, 11.8 D+N; 5.4, 5.4 T; 7.0, 6.8 S; 8.8, 9.0 E+Q; 9.8, 9.7 P; 9.7, 10.4 G; 13.5, 13.4 A; 5.3, 5.0 V; 1.2, 1.1 M; 4.5, 4.3 I; 7.1, 7.0 L; 0.0, 0.0 Y; 6.7, 6.8 F; 2.7, 2.7 K; 2.1, 2.2 H; 2.5, 2.7 R). Se secuenció el extremo N-terminal y se pudo comprobar que diferían tan solo en 2 de los 17 aminoácidos identificados (Tabla 3.1 A). Debido a estas características consideramos que las proteínas MnPL1 y MnPL2 podrían ser isoenzimas codificadas por dos genes diferentes, como se había descrito para las peroxidases de otros hongos ligninolíticos.

3. Resultados

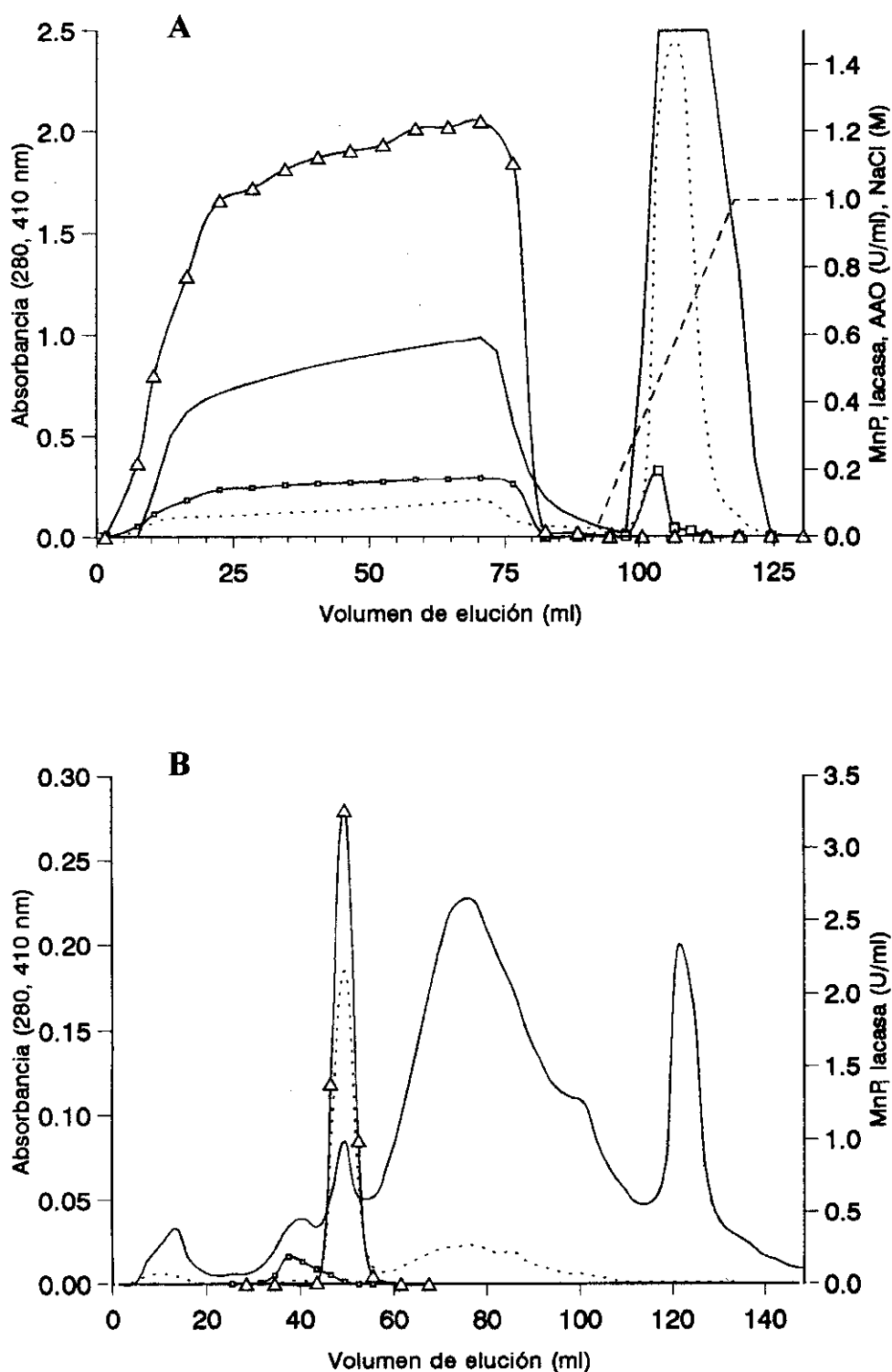


Fig. 3.3. Purificación de la peroxidasa presente en cultivos líquidos de *Pleurotus eryngii*. **A.** Cromatografía en cartucho-Q. **B.** Cromatografía en Sephacryl S-200. Los perfiles corresponden a las actividades peroxidasa (estimada como Mn^{3+} -tartrato, MnP) (-Δ-), laccasa (-□-) y AAO (-◻-), a la absorbancia a 280 nm (—) y 410 nm (· · ·) y al gradiente de NaCl (----).

3. Resultados

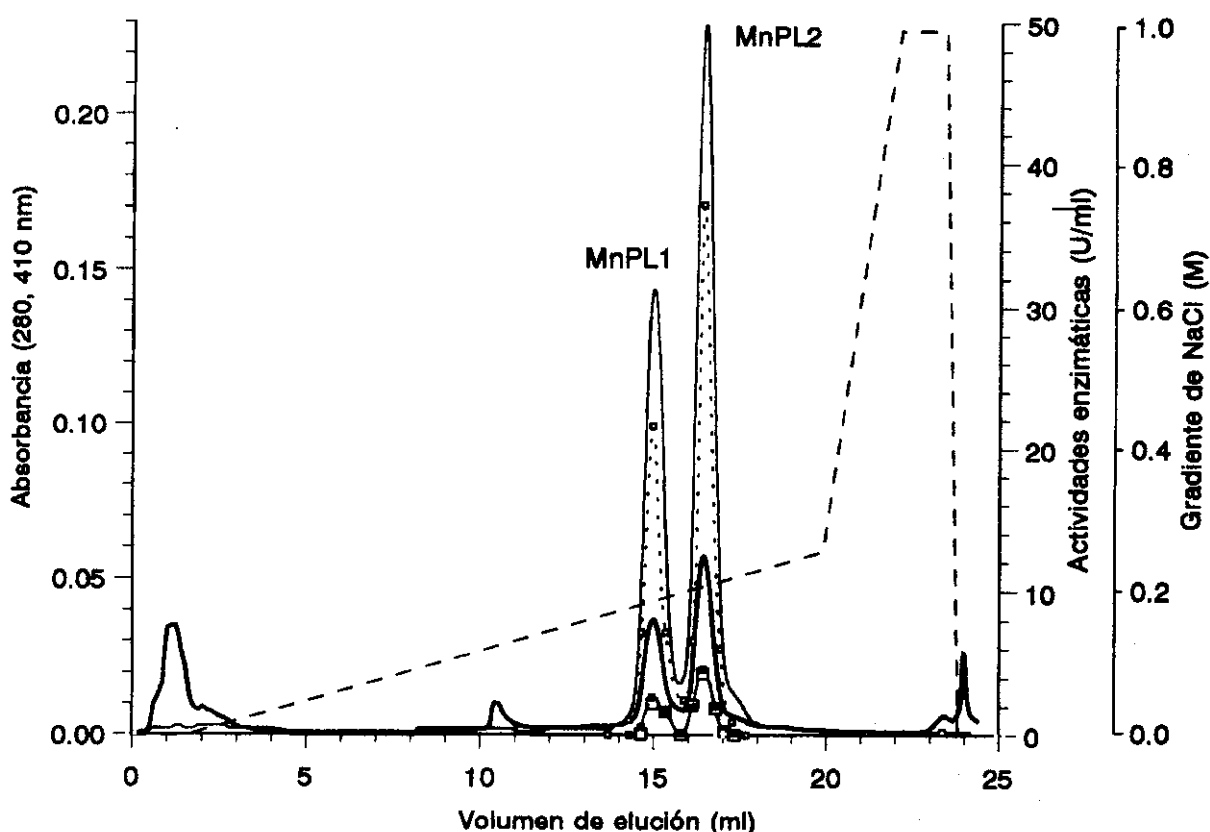


Fig. 3.4. Purificación de la peroxidasa presente en cultivos líquidos de *Pleurotus eryngii*. Cromatografía en Mono-Q y separación de las proteínas MnPL1 y MnPL2. Se muestran los perfiles correspondientes a las actividades peroxidasa sobre Mn^{2+} (MnP estimada por la formación de Mn^{3+} -tartrato, \square) e independiente de Mn^{2+} (x5) sobre DMP (\blacksquare) y sobre alcohol veratrílico (\circ), junto con las absorbancias a 280 nm (—) y 410 nm (---) y el gradiente de NaCl (---).

3.1.4 Propiedades catalíticas

Cuando se analizaron las propiedades catalíticas, se comprobó que las dos proteínas oxidaban el Mn^{2+} en presencia de H_2O_2 (pH óptimo 5), y además tenían actividad peroxidasa independiente de Mn^{2+} (pH óptimo 3) sobre alcohol veratrílico, hidroquinonas sustituidas (metoxihidroquinona), DMP, y otros sustratos fenólicos. Las constantes cinéticas se presentan en la **Tabla 3.1 B**, donde se puede observar la mayor afinidad por el Mn^{2+} y la metoxihidroquinona.

3. Resultados

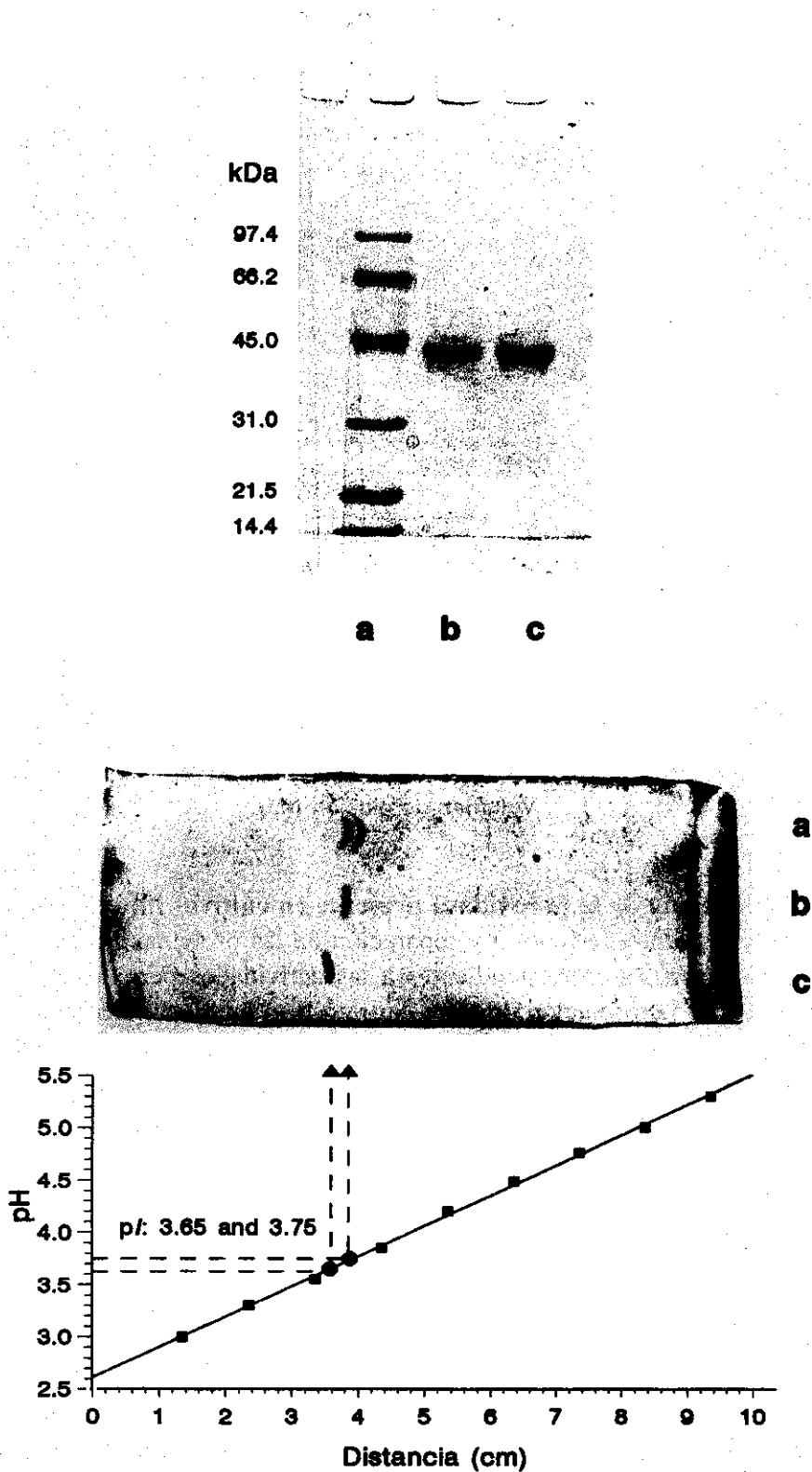


Fig. 3.5. Estimación de M_r (A) y pI (B) de las proteínas MnPL1 (c) y MnPL2 (b) de *Pleurotus eryngii*. A. SDS-PAGE de las proteínas purificadas, comparadas con marcadores de masa molecular (Biorad) (a). B. IEF de las dos proteínas tras cromatografía en Sephacryl S-200 (a) y una vez purificadas (b y c).

3. Resultados

TABLA 3.1. Propiedades fisicoquímicas (A) y constantes cinéticas del estado estacionario (B) de las dos proteínas con actividad peroxidasa, MnPL1 y MnPL2, purificadas a partir de cultivos líquidos de *Pleurotus eryngii*.

	MnPL1	MnPL2
A) Propiedades fisicoquímicas		
– Volumen de elución en Mono-Q (ml)	14.9	16.5
– Rendimiento (U/l)	187	375
– M_r por MALDI-TOF	37	37
– M_r por SDS-PAGE	43	43
– pI	3.70	3.65
– Relación A_{410}/A_{280}	4.5	4.5
– Secuencia N-terminal	ATCADGRRTANAACCVL	ATCDDGRRTANAACCIL
B) K_m (μM) y V_{max} (en paréntesis, U/mg)^a		
– H_2O_2	6	9
– Mn^{2+}	20 (158)	19 (165)
<i>Oxidación mediada por Mn</i>		
– DMP	9 (32)	9 (34)
<i>Oxidación independiente^b de Mn</i>		
– DMP	200 (25)	300 (24)
– alcohol veratrílico	3500 (18)	3000 (18)
– metoxihidroquinona ^c	-	19 (26)

^a Valores medios de las constantes aparentes

^b Las reacciones independientes de Mn se llevaron a cabo a pH 3 y el resto de las reacciones a pH 5

^c Heinfling *et al.*, 1998b

3.2 CLONACION Y SECUENCIA DEL GEN *mnpl*

3.2.1 Elaboración de sondas homólogas de DNA

La estrategia seguida para la construcción de una sonda homóloga fue la representada en la Fig. 3.6. La proteína MnPL1 purificada, procedente de columna Mono-Q, se hidrolizó con tripsina y los productos de hidrólisis se purificaron por cromatografía de fase reversa. Se seleccionaron dos picos, correspondientes a los péptidos denominados pep-5 y pep-14, y se secuenció su extremo N-terminal así como el de la proteína purificada. A partir de estas secuencias se sintetizaron oligonucleótidos degenerados: Nt (secuencia directa correspondiente a una porción del extremo N-terminal de la proteína madura) y 5 y 14 (correspondientes a la secuencia reversa y complementaria de parte del extremo N-terminal de los dos péptidos internos) incluyendo dianas de restricción para las enzimas *EcoRI* (oligo Nt) y *BamHI* (oligos 5 y 14) en 5'. Utilizando estos oligonucleótidos como cebadores y DNA genómico de *P. eryngii* como molde se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente 1 kb, tanto de la amplificación con los oligos Nt y 14 como con Nt y 5. El primero de ellos se clonó en pBluescript SK (+/-) y se secuenció (1060 pb). La secuencia reveló una identidad elevada con genes de otras peroxidasa ligninolíticas (incluyendo MnP de *P. ostreatus*, MnP y LiP de *T. versicolor* y LiP de *P. chrysosporium*), sugiriendo que el fragmento debía corresponder al gen de la peroxidasa de *P. eryngii*.

De forma análoga se amplificó un fragmento de cDNA de 648 pb por RT-PCR. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos Nt y 14, y RNA total extraído de micelio de *P. eryngii* en el momento de máxima actividad peroxidasa (estimada como Mn³⁺-tartrato). Este fragmento se clonó también en pBluescript SK (+/-) y se comprobó que la secuencia correspondía con la obtenida para el fragmento de 1060 pb sin la porción debida a los intrones.

3.2.2 "Screening" de las librerías genómicas y de cDNA

Se construyó una librería de DNA genómico de *P. eryngii* en el fago λ EMBL3 tal como se describe en el apartado 2.7.2. En el primer "screening" de la librería se plaquearon aproximadamente 5 equivalentes genómicos de *P. eryngii*, ≈ 14000 pfu, y se utilizó la sonda de DNA de 1060 pb. El resultado de este "screening" fue la detección de 5 fagos recombinantes, no independientes, que dieron hibridación positiva con la sonda de DNA (Fig. 3.6). Con cada uno de ellos se realizó un paso adicional de "screening" a partir del cual se aislaron fagos recombinantes independientes. El número de fagos recombinantes positivos del primer "screening" coincidió con el de

3. Resultados

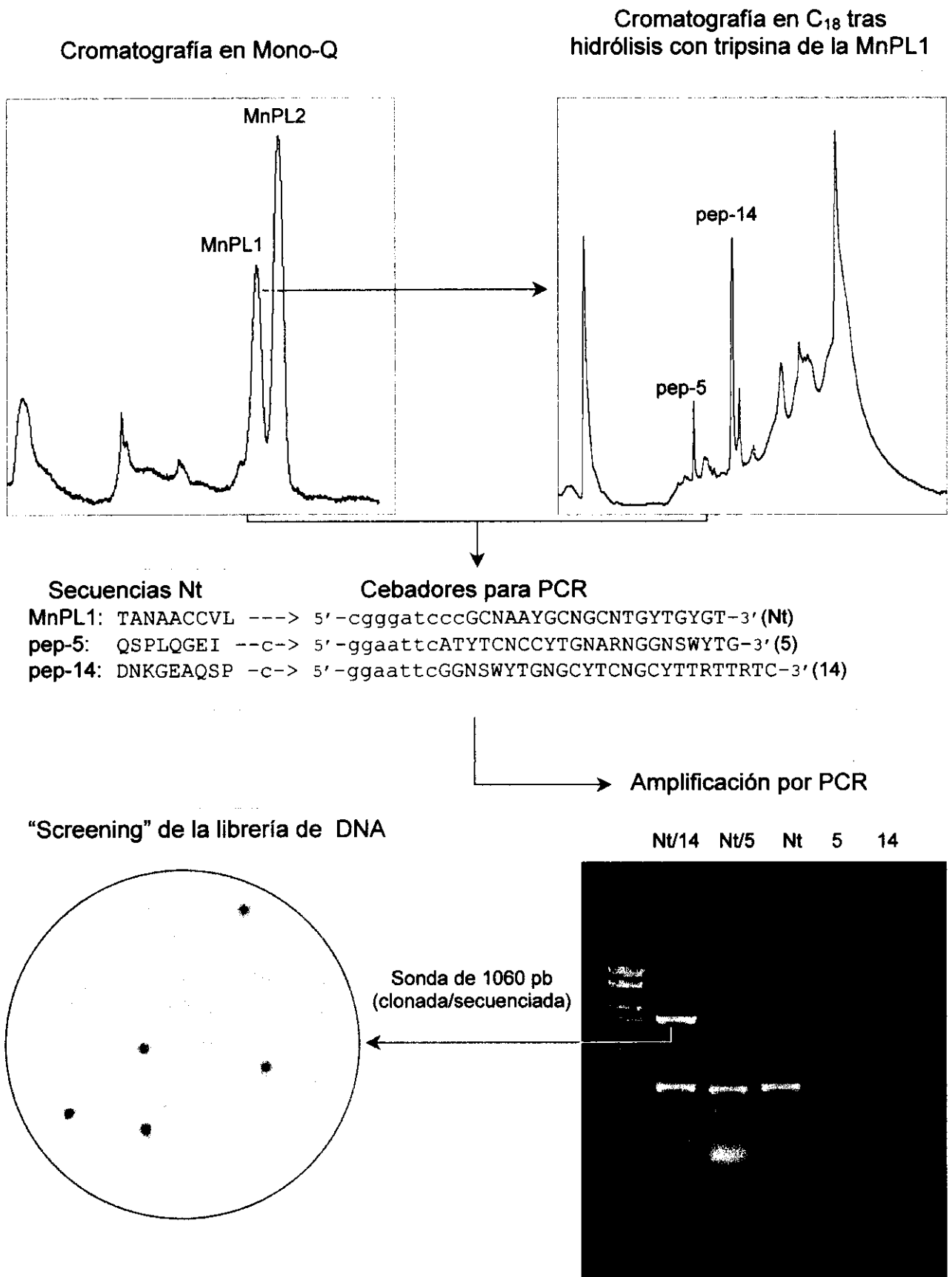


Fig. 3.6. Estrategia de clonación del gen *mnpl* de *Pleurotus eryngii*.

3. Resultados

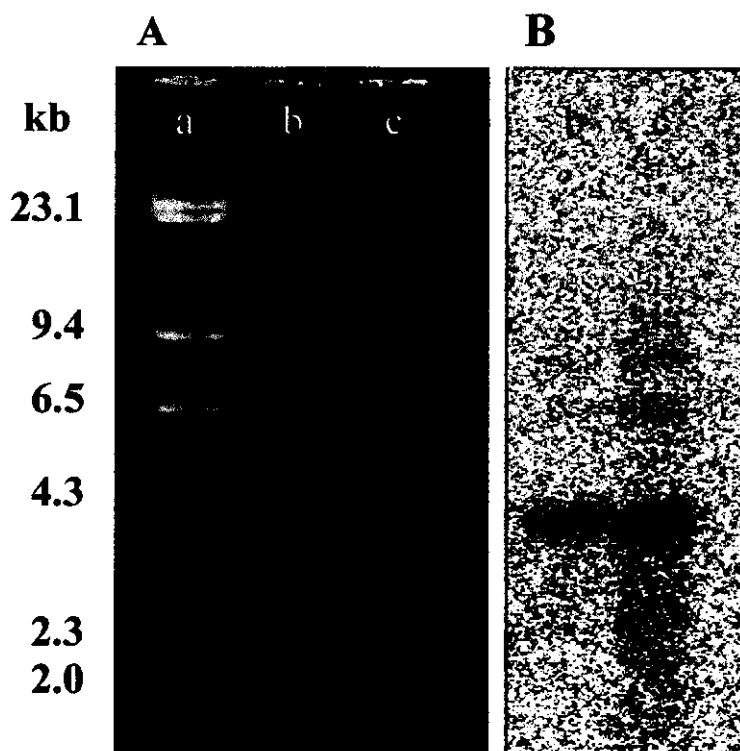


Fig. 3.7. A. Digestión con *SalI* del DNA de los fagos recombinantes F1 y F2 procedentes de la librería genómica de *Pleurotus eryngii* que, una vez secuenciados, se comprobó que codificaban las proteínas MnPL1 y MnPL2 respectivamente. B. Análisis por el método de Southern. La hibridación se realizó utilizando la sonda de DNA correspondiente al gen que codifica la proteína MnPL1: (a) marcadores de peso molecular (DNA del fago λ digerido con *HindIII*), (b) DNA de F1 y (c) DNA de F2.

equivalentes genómicos plaqueados, sugiriendo la presencia de una única copia del gen en el genoma de *P. eryngii*. El DNA de estos fagos (denominados F1 a F5) se digirió con *SalI* y tras electroforesis de los fragmentos de restricción y transferencia a una membrana de nitrocelulosa se hibridó con la sonda de DNA para la MnPL1. En todos los casos se detectó un fragmento de alrededor de 4 kb que daba hibridación positiva (**Fig. 3.7**). Estos fragmentos se subclonaron en pBluescript SK (+/-) y secuenciaron (clones D1 a D5).

Por otro lado, se utilizó una librería de cDNA construida en el bacteriófago λ gt10 a partir de mRNA extraído en el momento de máxima producción de transcritos para la proteína MnPL (apartado 2.7.3). En el primer "screening" se plaquearon alrededor de 1500 pfu y se seleccionaron tres fagos recombinantes que dieron hibridación positiva con el fragmento de 648 pb. Con cada uno de ellos se realizó un paso adicional de "screening", comprobándose que las placas de lisis volvían a hibridar con la sonda, se

aislaron fagos recombinantes independientes y se purificó su DNA. Los fragmentos correspondiente al cDNA de la proteína MnPL (1.2 kb) se subclonaron en pBluescript SK (+/-) y secuenciaron (clones C1 a C3).

3.2.3 MnPL1 y MnPL2 proceden de dos alelos del gen *mnpl*

La secuenciación de los subclones de DNA y cDNA permitió identificar dos secuencias de DNA y sus correspondientes cDNAs. Estos presentaron una única fase abierta de lectura (ORF) completa con capacidad para codificar las proteínas MnPL1 y MnPL2, identificadas por la diferencia en dos aminoácidos del extremo N-terminal (MnPL1/MnPL2: A4/D4 y V16/I16) (Tabla 3.1). El hecho de que los clones de DNA y cDNA de las proteínas MnPL1 y MnPL2 diesen hibridación positiva con la sonda construida para la proteína MnPL1 sugirió un grado de identidad muy elevado. Posteriormente, las dos secuencias de DNA genómico (4016 nucleótidos) revelaron una identidad del 99%. Este hecho, junto con el idéntico patrón de bandas tras digestión con *SalI* del DNA de los fagos recombinantes F1 y F2 (portadores de las secuencias de DNA correspondientes a las proteínas MnPL1 y MnPL2) e hibridación con la sonda de 1060 pb (Fig. 3.7), sugirieron que las dos proteínas purificadas de cultivos líquidos de la cepa dicariótica de *P. eryngii* no eran el producto de genes diferentes, sino que estaban codificados por dos alelos (*mnpl1* y *mnpl2*) del mismo gen *mnpl*. Las secuencias de DNA y cDNA se depositaron en GeneBank™ con los números de acceso AF007221 y AF007223 para el alelo *mnpl1*, y AF007222 y AF007224 para el alelo *mnpl2*.

3.2.4 Descripción de la secuencia de nucleótidos del gen *mnpl*

La secuencia completa de nucleótidos del alelo *mnpl2* (más larga que la del alelo *mnpl1*) y las secuencias de las regiones 5' y 3' no codificantes se presentan en la Fig. 3.8. Esta incluye un total de 4016 nucleótidos con un contenido G+C del 49%. La región 5' no codificante, de 844 nt, incluye elementos de unión para factores generales, que ayudan a la RNA polimerasa II a encontrar el sitio de inicio de la transcripción, y posibles elementos de regulación. Esta región promotora incluye una caja TATAAA (posición -61 a -56), dos elementos CCAAT invertidos para unión del factor CTF (posiciones -109 a -105 y -342 a -338) y una posible señal de unión para el factor SPI (posición -368 a -363). También se identificaron secuencias para proteínas de eucariotas implicadas en la regulación por nitrógeno (AP2) (posición -199 a -192) y carbono (CreA) (posiciones -137 a -142 y -388 a -383), además de otras de respuesta a metales (MRE) (posición -537 a -531) y a estrés, entre los que se encuentran un elemento de choque térmico (HSE) (posición -352 a -

3. Resultados

-844 TCGA -841

CCTGTATAACAATCGGTGAATCGCTTTATCAAGGTCTGATAACCGAAGGCATCAAACAT -781

GCCGAATTCATATCCAACCTCCGAAGGCTGCTTGGCGTCTCGCCCGTTACCGTACAGCTG -721

GAATGCGTTGACATCGTGTACAAAGGTGCAATCACAGCTCGCGTATTAGAGCTACTGCG -661

ATCTTTGAAGGCGTACGCACTATCCTCGGAGCTTGGCCCCATTCTGAGTGAGATGATAT -601

AP1

GGTGCCGAACCTTTGCGCCATTGCTGACGACTACTAGTATTCTCAGAGTGAACCTGGCTG -541

CTGTCACGCGCAATGAGAGGTCAGCGACCCAGACCCCGTTGAATCTTGAAGGTAAGG -481

MRE

AAAGAAGATGGCCACCCTCGGATAATGGACATCCTCGATTGTGCAATCGCAATTCGTGCA -421

TTTGTGCATTGTCTACATGGCGAACTGCTAAGCCGGGAAGAATTCTGATAGCCGCCCT -361

CreA SPI

TTGTTGTTGAAATTTTCAATTGGCATCAGGGTTTGTAGCATCTTGGCCGTAGCACTGG -301

HSE CTF

GACCCGTCGCGTCGGTCGCGCTCTCGGTCAAATGTATCGCATGGATCCCGCTCGACCTTT -241

AGGATGAGGTGGGAATACACGGCCTTTCCTTGCAGGTTATGCCATGCCCTCATGGCAA -181

AP2

CCTCTTCGTCGCTCCACACACCAAAGCAATGGACCCCTCCCGCTGACATTTTCATGGAAA -121

CreA

CGAGGGATGGTATTGGTCGAGTCATCGATATACTGACTCTTTACTGTGCGTTTTTTTCGGT -61

CTF

ATAAAGGGTGCCTACTAACTTTCTTTCTTCCCAAGATCCAGTCTTACAACCCACTGCA -1

TATA

región rica en C/T

ATGTCTTTCAAGACGCTCTCCGCTCTCGCGCTTGGCGCTCGGCGCCGCTGTCCAGTTCGCG 60

M S F K T L S A L A L A L G A A V Q F A -11

AGTGgtgggcttcgtctctgaccacaatgtcgaggcaaccctgctgactggtattttagC 120

S A *Intrón I* -9

TGCTGTGCCTCTCGTCCAGAAACGCGCAACTTGCAGACGACGGACGCACCACCGCAAATGC 180

A V P L V Q K R *A T C D D G R T T A N A 12

TGCATGTTGCATTCTGTTCCCCATCCTCGATGACATCCAAGAAAACCTCTTCGACGGTGC 240

A C C I L F P I L D D I Q E N L F D G A 32

CCAGTGTGGAGAAGAGgtggtataccattgtcctaattgcagaacggctattaattcacg 300

Q C G E *Intrón II* 37

cgcgtacacagGTGCACGAGTCCCTTCGTTTACTTTCCACGATGCAATCGGTTTCTCTC 360

V H E S L R L T F H D A I G F S P 54

CTACTTTAGGgtaaggtaacgatcaccactcgtgttcttaatttctaaccatgcacaa 420

T L G *Intrón III* 57

cagCGGAGGAGGAGCTGACGGTTCATCATCGGTTTCGACACCATTGAGACTAATTTCCC 480

G G G A D G S I I A F D T I E T N F P 76

CGCCAATGCTGGCATCGATGAAATCGTCAGTGCTCAGAAGCCATTCTGGCTAAACACAA 540

A N A G I D E I V S A Q K P F V A K H N 96

CATCTCCGCCGGCGACTTgtaagcagttcaagccaaaggttaaagtgacccttacaatc 600

I S A G D F *Intrón IV* 102

aattctagCATTCAATTTGCTGGCGCCGTTGGAGTCTCCAACCTGCCCTGGTGGTGTGTCAGG 660

I Q F A G A V G V S N C P G G V R 119

ATTCTTTCTTCTTGGGTCGCCCCGGATGCCGTTGGCCGCTCCCGGACCACCTCGTGCCA 720

I P F F L G R P D A V A A S P D H L V P 139

GAGCCTTTTGTgtagctttggataggtaaaattatcaacgagaactgagggtgtgggctc 780

E P F D *Intrón V* 143

gcatagATTCTGTTGACTCCATTCTTGCCAGAATGGGTGACGCAGGCTTCAGTCCCGTGC 840

S V D S I L A R M G D A G F S P V E 161

AGGTTGTTTGGCTCCTGGCTTCgtgagtgcagatgagatgtaagtaccaccatcgatct 900

V V W L L A S *Intrón VI* 168

aatttgttgcctagGCACTCCATTGCCGCTGCCGACAAGGTTGACCATCGgtaagtcga 960

H S I A A A D K V D P S 180

3. Resultados

gctgcattggcaagtttgttgtgaaggotaatacctgataattgtctagATTCTGGGta	1020
<i>Intrón VII</i>	I P G 183
agagcgaacatccactgacgcggcatgctactgaottcatgtcagAACGCCATTTCGATTC	1080
<i>Intrón VIII</i>	T P F D S 188
AACCCCGGAGTTTTTGTATTCTCAATTCTTCATCGAAACGCAACTTAAAGGCAGACTCTT	1140
T P G V F D S Q F F I E T Q L K G R L F	208
CCCAGGgtaagcgattccatttcttctcaccacgatatgacccatcatgtttgtgtttag	1200
<u>P G</u>	<i>Intrón IX</i> 210
CACTGCTGACAACAAGGGAGAAGCCCAATCTCCATTGCAAGGAGAGATCAGGCTTCAGTC	1260
<u>T A D N K G E A Q S P L Q G E I R L Q S</u>	230
CGATCACTTGgtgagaccattgtagttcattattctatcagtaatactgacaaatatcca	1320
D H L	<i>Intrón X</i> 233
ctggatagTTGGCTAGAGgtacgattcttctccttgcagccttgtaaatgctcaccgcctcc	1380
L A R D	<i>Intrón XI</i> 237
caaagACCCCGAGACTGCCTGCGAATGGCAGTCCATGGTTAgtgagtaaaatattccctt	1440
P Q T A C E W Q S M V N	249
tcatactttataacatagagactgactacatcgccctactaccagACAACCAACCGAAGA	1500
<i>Intrón XII</i>	N Q P K I 254
TTCAGAACCGTTTCGCTGCTACCATGTGCAAGATGGCTCTTCTTGGCCAAGACAAGACCA	1560
Q N R F A A T M S K M A L L G Q D K T K	274
AATTGATTGACTGTTCCGATGTTATCCCCACCCCTCCTGCCCTTGTCGGAGCGGCCACT	1620
L I D C S D V I P T P P A L V G A A H L	294
TACCGCGGGGATTTTCTTCTTAGCGATGTAGAGCAAGCGgtacgtgcacatgtttccctgg	1680
P A G F S L S D V E Q A	306
ataaatgaggggtctcaccatctgtgatcagTGCGCCGCGACGCCTTCCCTGCTCTTAC	1740
<i>Intrón XIII</i>	C A A T P F P A L T 316
TGCTGACCCAGgtgaatacatgcggtgtaaacattttatcaccggggccatttgaactgac	1800
A D P G	<i>Intrón XIV</i> 320
tgatatctctcttcagGCCAGTAACCTCCGTCCCTCCCGTgtaagttttcagtcacca	1860
P V T <u>S</u> V P P V	328
gtatgttatggcgcgctcattgtctacgtctcctacagCCCTGGATCGTAAATGCTTCGA	1920
<i>Intrón XV</i>	P G S ter 331
TACCTGAATATGCTCGTTCTGCTGCTATGAACTTCCAATTTTTGCCATTGGGTCTGTATT	1980
CGATTCTAGATGTTTGTGATATCAACTGTGTATAAATGATCTTTTT AAATATA CTTTTTT	2040
señal-pA	
CTG C GGAGTATGTTCCGGGTGTCTACGACCATTGCCCAACGCTCTTGACTAAAATCTTCTC	2100
sitio-pA	
ATGGCAGTTGTGAATTTACCGGGGCTCTTCGTCCAGTATCGTGACACTGTTTTGAGGGTC	2160
CGAGAATCTACAATTTAAATTACACCTTCTCAACTATTCTTGTCTTCACCAGTAAGTAA	2220
TCGAATAGATGTACATAAGGAGAATGGAGATGCACCTCCGCTCCCAATACGTATGGAGGA	2280
ACGGAAAGCCGGCAGCTAGTAATAGACGGTATGCATTTATGCTACAAAGGGACGGTGTGT	2340
GATTGGATTATCCAACAAAAGGTCGATAATTTGCCAAGCTTCGTCTTGAGTAACTTGGGA	2400
AAATCGTGCTTCCTTCACTTCTGCTGCTTTCCAAAGGCGAGCGAGTTCAGCGTGTCTAGC	2460
TCGAAACTGCCCTCCGGTTGGTCATCCAGCGGCCACATCGAAGTCACGCCAACCGTTTT	2520
CCTTGCCCAATCCTCACCAGCAAGGGCCTTGAAGGTACCTTCGTAGTGGCGATTGG TTG	2580
GATTCGGTTGTCTCCGATTTCTGCAAGTAGATAATACCATCCACGCTCTCTTAGGGCA	2640
TCTAAATCATTATGGTTAGTACATCGCGTGAATTGCTCTCGAGTTGAATGCCCTAGCTTA	2700
CTTAGCATGAACCTCGGCAATCTGAATTTGGTCCATACTTTGCAGCTCAGGTGTGTCGAT	2760
AAAGATGATCTCGCTCTCCCGTGTGAGTAGCTCGTAAGGGATAGCCTCGACCTCTACTGT	2820
ATTTGGTTCCAATGTCAGTTTATTTGGGTGAGAGGGCGGCATAGGCCTCCAGTAGCTGA	2880
GTTGATAAACTGAAAATACATGATAAAACAACCTCAGTAAAGGCCGGACTACCCGTTGAATA	2940
GTAATCACCGTGGACCGCCCGGATCCTGACGCTCCCAAAAGTCTATCGAGTATTTTTAGC	3000
TGGCTTTAGAAGCGCATTGGTGTTCAGAACGTACGCTATTACCGAACCTAGCAAACATT	3060
GAGATATATTATTGAGGTTTACATAAAAGTATTGCATAAAGCGCACGCCAATTATAC	3120
ATCCGATCGATTATGCGCCAGGCGTCTGCGTAGTCGCCATAAAATCGGTGCA	3172

3. Resultados

Tabla 3.2. Secuencias consenso de unión para factores generales de transcripción y proteínas reguladoras.

Factor de transcripción		Secuencia 5'→3'	Referencia
CTF	(+)	CCAAT	Dynan y Tjian (1985)
SP1	(+)	GGGCGG	Dynan y Tjian (1985)
Elemento regulador			
AP1	(+)	TGASTMA	Li y Jaiswal, (1992)
AP2	(+)	CCCMNSSS	Dhawale (1993)
CreA	(-)	SYGGRG	Kulmburg <i>et al.</i> (1993)
HSE	(+)	C--GAA--TTC--G	Dynan y Tjian (1985)
MRE	(+)	TGDCNC	Labbé <i>et al.</i> (1991)

(+) activador, (-) represor

D = A, G o T; M = A o C; N = A, C, G o T; R = A o G; S = C o G; Y = C o T

Fig. 3.8. (páginas anteriores) **Secuencia de DNA correspondiente al gen *mnpl* de *Pleurotus eryngii* (alelo *mnpl2*) y secuencia proteica deducida.** Para facilitar la posterior descripción del modelo molecular y la comparación con otras peroxidases descritas en la literatura, la numeración de los aminoácidos se inicia en el primer residuo de la proteína madura (asterisco). Las secuencias de inicio y finalización de intrones, así como las secuencias internas de ramificación están en cursiva. En la región promotora aparecen recuadradas secuencias que unen factores de transcripción generales y reguladores. En la región 3' no codificante aparecen recuadradas la señal y el sitio de poliadenilación. La secuencia deducida para la MnPL2, (con un péptido señal de 30 aminoácidos) presenta dos posibles sitios de N- y O-glicosilación (doble subrayado), seis aminoácidos característicos de los lados distal y proximal del hemo (círculos) y tres implicados en la unión a Mn²⁺ (recuadrados). Las secuencias confirmadas por secuenciación del extremo N-terminal de la proteína madura y péptidos 5 y 14 están subrayadas (estas dos últimas aparecen solapadas). Los 60 aminoácidos que aparecen invariablemente después de alineamiento múltiple de todas las peroxidases fúngicas examinadas se muestran en negrita.

344) y un elemento de respuesta antioxidante (AP1) (posición -615 a -609). Las secuencias consenso para estos elementos se pueden ver en la **Tabla 3.2**. Hay que mencionar que la secuencia AP1 difiere en un nucleótido de la secuencia consenso más frecuente. Entre la caja TATAAA y el extremo 3' del promotor hay una región rica en bases pirimidínicas (66%), tal como se ha visto en promotores de genes que se expresan fuertemente en levaduras (Dobson *et al.*, 1982). La región 3' no codificante, de 1261 nt, incluye una posible señal de poliadenilación (5'-AAATATA-3') (Fernández-Larrea y Stahl, 1996) en la posición 2027-2033 con respecto al codon de iniciación, que no corresponde exactamente a la secuencia AATAAA descrita para eucariotas (Ballance, 1986). El sitio de poliadenilación se identificó en la posición 2044.

El gen *mnpl* está constituido por 1911 nucleótidos y presenta una región codificante de 1086 nt con un contenido G+C del 53% y 15 intrones que varían en tamaño (47-65 nt). Algunos de ellos están separados por exones muy cortos, como sucede con los intrones VII-VIII y X-XI, separados tan solo por 8 y 10 nucleótidos respectivamente. Las secuencias dinucleotídicas en los extremos de los intrones siguen la regla GT----AG (Ballance, 1986) (**Tabla 3.3**). En la mayoría de los intrones se observan secuencias de procesamiento típicas de hongos filamentosos (Johansson y Nyman, 1996), aunque las secuencias consenso para los sitios de procesamiento 5' (GTRNDN), y 3' (HAG), y sitio interno de ramificación (NNMTNAB) de los intrones son ligeramente distintas. Estas diferencias afectan a 7 de las 15 secuencias del extremo de procesamiento 5' y solamente a una del extremo 3' y a otra del sitio interno de ramificación (**Tabla 3.3**).

Se evaluó el uso preferente de codones para los distintos aminoácidos comprobándose cierta selectividad para algunos codones sinónimos. Así, la histidina está siempre codificada por el triplete CAC, la fenilalanina en el 83% de los casos por TTC, la serina en el 44% por TCC, la treonina en el 42% por ACC y en el 37% por ACT, y la leucina en el 34% por CTT y en el 31% por CTC.

3.2.5 Descripción de la secuencia de aminoácidos

A partir de la secuencia codificante se predijo una secuencia de 361 aminoácidos para las dos variantes alélicas de la proteína MnPL. Treinta y nueve aminoácidos coincidieron con las secuencias previamente obtenidas por secuenciación del extremo N-terminal de la proteína madura y de los péptidos procedentes de la hidrólisis con tripsina (**Fig. 3.8**). Además, se pudo comprobar que los péptidos 5 (comienza en G216) y 14 (comienza en L207)

3. Resultados

solapaban, explicando los resultados de PCR obtenidos cuando se construyó la sonda de DNA (Fig. 3.6).

Se dedujo la existencia de un péptido señal de 30 aminoácidos cuando se comprobó que el inicio de la secuencia predicha para la proteína no coincidía con el inicio de la secuencia de la proteína madura, conocida por secuenciación de su extremo N-terminal. El péptido señal presenta una secuencia K-R, típica de procesamiento proteolítico en el sitio de inicio de la secuencia de la proteína madura.

Tabla 3.3. Secuencias de procesamiento de intrones del gen *mnpl* (incluidas las dos variantes alélicas) y secuencia consenso propuesta. En negrita los residuos que varían con respecto a la secuencia consenso determinada por Ballance (1991) para los hongos filamentosos.

Intrón	Procesamiento 5'	Distancia (pb)	Sitio de ramificación	Distancia (pb)	Procesamiento 3'
I	GTGGGC	5	CTCTGAC	34	TAG
II	GTGT TA	9	TCCTAAT	30	CAG
III	GTAAG G	20	GTCTAAT	17	CAG
IV	GTAAGC	24	CCCTTAC	10	TAG
*			CC A TTAC		
V	GTACGT	26	AACTGAG	14	TAG
VI	GTGAGT	28	ATCTAAT	8	TAG
VII	GTAAGT	28	GGCTAAT	14	TAG
VIII	GTAAG A	9	CACTGAC	23	CAG
IX	GTAAGC	11	TTCTCAC	27	TAG
X	GTGAG A	28	TACTGAC	14	TAG
XI	GTACG A	22	TGCTCAC	9	A AG
XII	GTGAGT	32	GACTGAC	16	CAG
XIII	GTACGT	27	GTCTCAC	10	CAG
XIV	GTGA AT	36	AACTGAC	13	CAG
XV	GTAAGT	26	CGCTCAT	15	CAG
consenso	GTRNDN	5-36	NNMTNAB	8-34	HAG

*Secuencia de ramificación de la variante *mnpl1* en el intrón IV

B =C, G o T; D =A, G o T; H =A, C o T; M =A o C; N =A, C, G o T; R =A o G

Además de los clones de cDNA que codifican las dos variantes alélicas de la proteína MnPL, también se aisló y secuenció un cDNA que codificaba 273 aminoácidos, resultantes de un procesamiento alternativo en el extremo 5' del

intrón XII del alelo *mnpl1*. Dicho extremo se desplazó cuatro nucleótidos en dirección 5' y la secuencia de procesamiento GTGAGT fue sustituida por la secuencia GTTAGT que, aunque no coincide en un nucleótido con la secuencia consenso determinada para el gen *mnpl*, coincide con la descrita para hongos filamentosos GTDHSY. La secuencia de aminoácidos predicha desde la posición 248 en que empieza a variar con respecto a la proteína MnPL1 sería TTNRRFRTVSLLPCRRSLFLAKTRPN, pero no se identificó el producto resultante en los cultivos de *P. eryngii*.

En la secuencia de aminoácidos se puede observar un único sitio de N-glicosilación (NXS/T) localizado en la posición de la N96. El contenido en carbohidratos unidos a esta asparagina representa alrededor del 3% de la masa molecular de la proteína MnPL, estimado por SDS-PAGE después de tratamiento con endo-H. De igual forma se localizan 42 residuos de S/T que pueden ser susceptibles de O-glicosilación. La composición en aminoácidos obtenida por hidrólisis ácida concuerda en términos generales con la deducida de la secuencia de la proteína. Además, se confirma la ausencia de tirosina.

La M_r deducida a partir de la secuencia, 34 553 para la MnPL1 y 34 581 para la MnPL2, se aproxima a la obtenida por MALDI-TOF después de deducir el contenido en carbohidratos totales (ver **Tabla 3.1**). Finalmente, el pI teórico de las proteínas MnPL1 y MnPL2 (4.44 y 4.41 respectivamente) fue mayor que el obtenido por isoelectroenfoque (**Fig. 3.5**). Este podría estar afectado por los carbohidratos unidos a la proteína, aunque con mayor probabilidad la diferencia sea debida a que el plegamiento afecta a la exposición de los residuos cargados.

3.2.6 Comparación de los alelos *mnpl1* y *mnpl2*

Tras secuenciar varios clones de DNA y cDNA se pudo determinar con precisión la secuencia de los dos alelos del gen *mnpl*. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos del gen y de las regiones 5' y 3' no codificantes se comparan en la **Fig. 3.9**. Ésta presenta la totalidad de la secuencia *mnpl2* (la de mayor longitud) y las diferencias observadas en la secuencia *mnpl1*.

Con una única excepción, las diferencias son de un nucleótido, e incluyen 32 sustituciones, una delección y una inserción. Aproximadamente el 70% de las sustituciones corresponden a cambios de A por G o de T por C, probablemente causados durante la replicación del DNA por las formas tautoméricas de estas bases (forma enólica de T y G y forma imino de A y C). El hecho de que la variación en las regiones flanqueantes (1%), intrones (1%) y exones (0.5%) sea muy parecida confirma que las dos secuencias corresponden a alelos del mismo gen. Las diferencias más significativas se describen a continuación:

3. Resultados

	-844 TCGA	-841 <i>mnpl2</i>
	-837	-834 <i>mnpl1</i>
CCTGTATAACAATCGGTGAATCGCTTTATCAAGGTCTGATAACCGAAGGCATCAAACAT		-781 <i>mnpl2</i>
GCCGAATTCATATCCAACCTCCGAAGGCTGCTTGGCGTCTCGCCGTTACCGTACAGCTG		-774 <i>mnpl1</i>
GAATGCGTTGACATCGTGTACAAAGGTGCAATCACAGCTCGCGTATTAGAGCTACTGCG		-721 <i>mnpl2</i>
ATCTTTGAAGGCGTACGCACTATCCCTCGGAGCTTGGCCCCATTTGTGAGTGAGATGATAT		-714 <i>mnpl1</i>
GGTGCCGAACCTTTCGCGCCATTGCTGACGACTACTAGTATTCTCAGAGTCGAACCTGGCTG		-661 <i>mnpl2</i>
CTGTGCACGCCGCAATGAGAGGTGAGCGACCCAGACCCCGTTGAATCTTGAGAGGTAAGG		-654 <i>mnpl1</i>
AAAGAAGATGGCCACCCTCGGATAATGGACATCCTCGATTGTGCAATCGCAATTCGTGCA		-601 <i>mnpl2</i>
TTTGTGCATTGTCTACATGGCGAACTGCTAAGCCGGGAAGAATTCTGATAGCCGCCCT		-594 <i>mnpl1</i>
TTGTTGTTGAAATTTTCAATTGGCATCAGGGTTTGTAGCATCTTTGCCCGTAGCACTGG		-541 <i>mnpl2</i>
GACCCGTCGCGTCGGTCGCGCTCTCGGTCAAATGTATCGCATGGATCCCGCTCGACCTTT		-534 <i>mnpl1</i>
AGGATGAGGTGGGAATACACGGCCTTTCCTTGCAAGTTATGCCCATGCCTCTATGGCAA		-481 <i>mnpl2</i>
CCTCTTCGTGCGTCCACACACCAAAGCAATGGACCCTCTCCGCTGACATTTTCATGAAA		-480 <i>mnpl1</i>
CGAGGGATGGTATTGGTCGAGTCATCGATATACTGACTCTTTACTGTGCGTTTTTTCGGT		-421 <i>mnpl2</i>
ATAAAGGGTCGCGTAACTTTCTTTCTTCCCAAGATCCAGTCTTACAACCCACTGCA		-421 <i>mnpl1</i>
ATGTCTTCAAGACGCTCTCCGCTCTCGCGCTTGCCTCGCGCCGCTGTCCAGTTCGCG		-361 <i>mnpl2</i>
M S F K T L S A L A L A L G A A V Q F A		-361 <i>mnpl1</i>
AGTGgtgggcttctgctctgaccacaatgtcgaggcaaccctgctgactggtatttttagC		-301 <i>mnpl2/1</i>
S A		-241 <i>mnpl2/1</i>
TGCTGTGCCTCTCGTCCAGAAACGCGCAACTTGGACGACGGACGCACCACCGCAAATGC		-181 <i>mnpl2</i>
A V P L V Q K R A T C D D G R T T A N A		-181 <i>mnpl1</i>
TGCATGTTGCAATCTGTTCCCATCCTCGATGACATCCAAGAAACCTCTTCGACGGTGC		-61 <i>mnpl2/1</i>
A C C I L F P I L D D I Q E N L F D G A		-1 <i>mnpl2</i>
CCAGTGTGGAGAAGAGgtgttataaccattgtcctaatgcagaacggctattaattcacg		-1 <i>mnpl1</i>
Q C G E E		60 <i>mnpl2</i>
cgcgctacacagGTGCACGAGTCCCTTCGTTTACTTTCCACGATGCAATCGGTTTCTCTC		60 <i>mnpl1</i>
V H E S L R L T F H D A I G F S P		-11 <i>MnPL2/1</i>
CTACTTTAGGgtaagtaacgatcaccactcgtgtgtctaatttctaaccatgcacaa		120 <i>mnpl2/1</i>
T L G		-9 <i>MnPL2/1</i>
cagCGGAGGAGGAGCTGACGGTTCATCATCGGTTTCGACACCATTGAGACTAATTTCCC		180 <i>mnpl2</i>
G G G A D G S I I A F D T I E T N F P		180 <i>mnpl1</i>
CGCCAATGCTGGCATCGATGAAATCGTCAGTGCTCAGAAGCCATTTCGTGGCTAAACACAA		12 <i>MnPL2</i>
A N A G I D E I V S A Q K P F V A K H N		12 <i>MnPL1</i>
CATCTCCGCCGGCGACTTgtaagcagttcaagccaaaggttaaagtgaccattacaaatc		240 <i>mnpl2</i>
I S A G D F		240 <i>mnpl1</i>
aattctagCATTCAATTTGCTGGCGCCGTTGGAGTCTCCAACCTGCCCTGGTGGTGTGAGG		32 <i>MnPL2</i>
I Q F A G A V G V S N C P G G V R		32 <i>MnPL1</i>
ATTCTTTTCTTCTGGGTCGCCCCGATGCCGTGGCCGCCTCCCCGGACCACCTCGTGCCA		300 <i>mnpl2/1</i>
I P F F L G R P D A V A A S P D H L V P		37 <i>MnPL2/1</i>
GAGCTTTTGTacggttgataggtaaaattatcaacgagaactgagggtgtgggctc		360 <i>mnpl2/1</i>
E P F D		54 <i>MnPL2/1</i>
gcatagATTCTGTTGACTCCATTCTTGCCAGAATGGGTGACGCAGGCTTCAGTCCCCTCG		420 <i>mnpl2/1</i>
S V D S I L A R M G D A G F S P V E		57 <i>MnPL2/1</i>
AGTTGTTTGGCTCCTGGCTTCgtgagtgcagatgagatgtaagtaccaccatcgatct		480 <i>mnpl2/1</i>
V V W L L A S		76 <i>MnPL2/1</i>
aatttgttgccctagGCACTCCATTGCCGCTGCCGACAAGGTTGACCCATCGgtaagtcga		540 <i>mnpl2/1</i>
H S I A A A D K V D P S		96 <i>MnPL2/1</i>
		600 <i>mnpl2</i>
		600 <i>mnpl1</i>
		102 <i>MnPL2/1</i>
		660 <i>mnpl2/1</i>
		119 <i>MnPL2/1</i>
		720 <i>mnpl2/1</i>
		139 <i>MnPL2/1</i>
		780 <i>mnpl2/1</i>
		143 <i>MnPL2/1</i>
		840 <i>mnpl2</i>
		840 <i>mnpl1</i>
		161 <i>MnPL2</i>
		161 <i>MnPL1</i>
		900 <i>mnpl2/1</i>
		168 <i>MnPL2/1</i>
		960 <i>mnpl2</i>
		960 <i>mnpl1</i>
		180 <i>MnPL2/1</i>

3. Resultados

gctgcattggcaagtttgttgaaggttaatacctgataattgtctagATTCCTGGgta	1020	<i>mnpl2</i>
a	1020	<i>mnpl1</i>
		I P G
agagcgaacatccactgacgctgcatgctactgacttcatgtcagAACGCCATTCGATTC	1080	<i>mnpl2</i>
t	1080	<i>mnpl1</i>
		T P F D S
AACCCCGGAGTTTTTATTCTCAATTCTTCATCGAAACGCAACTTAAAGGCAGACTCTT	1140	<i>mnpl2/1</i>
T P G V F D S Q F F I E T Q L K G R L F	208	<i>MnPL2/1</i>
CCCAGGgtaagcgattccatttcttctcaccacgatatgacccatcatgtttgttttag	1200	<i>mnpl2</i>
a	1200	<i>mnpl1</i>
P G	210	<i>MnPL2/1</i>
CACTGCTGACAACAAGGGAGAAGCCCAATCTCCATTGCAAGGAGAGATCAGGCTTCAGTC	1260	<i>mnpl2</i>
TCC	1260	<i>mnpl1</i>
T A D N K G E A Q S P L Q G E I R L Q S	230	<i>MnPL2/1</i>
CGATCACTTGgtgagaccattgtagttcatttattctatcagtaataactgacaaatatcca	1320	<i>mnpl2/1</i>
D H L	233	<i>MnPL2/1</i>
ctggatagTTGGCTAGAGgtacgattcttctctgagccttgtaaatgctcaccgcctcc	1380	<i>mnpl2/1</i>
L A R D	237	<i>MnPL2/1</i>
caaagACCCCGAGACTGCCTGCGAATGGCAGTCCATGGTTAgtgagtaaaatattcoctt	1440	<i>mnpl2/1</i>
P Q T A C E W Q S M V N	249	<i>MnPL2/1</i>
tcatactttataacatagagactgactacatcgccctactaccagACAACCAACCGAAGA	1500	<i>mnpl2/1</i>
N Q P K I	254	<i>MnPL2/1</i>
TTCAGAACCGTTTCGCTGCTACCATGTGCAAGATGGCTCTTCTTGGCCAAGACAAGACCA	1560	<i>mnpl2/1</i>
Q N R F A A T M S K M A L L G Q D K T K	274	<i>MnPL2/1</i>
AATGATTGACTGTTCCGATGTTATCCCCACCCCTCCTGCCCTTGTTCGGAGCGGCCACT	1620	<i>mnpl2/1</i>
L I D C S D V I P T P P A L V G A A H L	294	<i>MnPL2/1</i>
TACCGCGGGATTTCTCTTAGCGATGTAGAGCAAGCGgtacgtgcacatgtttccctgg	1680	<i>mnpl2/1</i>
P A G F S L S D V E Q A	306	<i>MnPL2/1</i>
ataaatgaggggtctcaccatctgtgatcagTGCGCCGCGACGCCTTTCCTGCTCTTAC	1740	<i>mnpl2/1</i>
C A A T P F P A L T	316	<i>MnPL2/1</i>
TGCTGACCCAGgtgaatacatgctggtgtaaacattttatcaccgggccatttgaactgac	1800	<i>mnpl2/1</i>
A D P G	320	<i>MnPL2/1</i>
tgatatctctctcagGCCAGTAACCTCCGTCCTCCCGTgtaagttttcagtcaccca	1860	<i>mnpl2/1</i>
P V T S V P P V	328	<i>MnPL2/1</i>
gtatgttatggcgctcattgtctacgtctcctacagCCCTGGATCGTAAATGCTTCGA	1920	<i>mnpl2/1</i>
P G S ter	331	<i>MnPL2/1</i>
TACCTGAATATGCTCGTTCGCTGCTATGAACTTCCAATTTTTGCCATTGGGTCTGTATT	1980	<i>mnpl2/1</i>
CGATTCTAGATGTTGTGATATCAACTGTGTATAAATGATCTTTTGAATATACTTTTTT	2040	<i>mnpl2/1</i>
CTCGAGTATGTTTCGGGTGTCTACGACCATTGCCAACGCTCTTGACTAAAATCTTCTC	2100	<i>mnpl2</i>
T	2100	<i>mnpl1</i>
ATGGCAGTTGTGAATTTACCGGGGCTCTTCGTCAGTATCGTGACACTGTTTTGAGGGTC	2160	<i>mnpl2/1</i>
CGAGAATCTACAATTTAAATTACACCTTCTCAACTATTCTTGTCTTCCACCAGTAAGTAA	2220	<i>mnpl2/1</i>
TCGAATAGATGTACATAAGGAGAATGGAGATGCACTCCGCTCCAATACGTATGGAGGA	2280	<i>mnpl2</i>
A	2280	<i>mnpl1</i>
ACGGAAAGCCGGCAGCTAGTAATAGACGGTATGCATTTATGCTACAAAGGGACGGTGTGT	2340	<i>mnpl2/1</i>
GATTGGATTATCCAACAAAAGGTCGATAATTTGCCAAGCTTCGTCTTGAGTAACCTTGGA	2400	<i>mnpl2/1</i>
AAATCGTGCTTCTTCATTCTGCTGCTTTCCAAAGGCGAGCGAGTTCAGCGTGTCTAGC	2460	<i>mnpl2/1</i>
TCGAAACTGCCCTCCGGTTGGTCATCCAGCGCCACATCGAAGTCACGCCAACCGTTTT	2520	<i>mnpl2/1</i>
CCTTGCCCAATCCTCACCAGCAAGGGCCTTGAAGTACCTTCGTAGGTGGCGATTGGTTG	2580	<i>mnpl2</i>
C	2580	<i>mnpl1</i>
GATTCCGGTTGTCTCCGATATTCTGCAAGTAGATAATACCATCCACGCGTCTCTTAGGGCA	2640	<i>mnpl2</i>
C	2640	<i>mnpl1</i>
TCTAAATCATTATGTTAGTACATCGCGTGAATTGCTCTCGAGTTGAATGCCTAGCTTA	2700	<i>mnpl2/1</i>
CTTAGCATGAACTTCGGCAATCTGAATTTGGTCCATACTTTGCAGCTCAGGTGTGTCGAT	2760	<i>mnpl2/1</i>
AAAGATGATCTCGCTCTCCCGTGTGAGTAGCTCGTAAGGGATAGCCTCGAOCCTACTGT	2820	<i>mnpl2</i>
T C	2820	<i>mnpl1</i>
ATTGGTTCCAATGTCAGTTTATTTGGGTGAGAGGGCGGCATAGGCCTCCAGTAGCTGA	2880	<i>mnpl2</i>
G	2880	<i>mnpl1</i>
GTTGATAAACTGAAAATACATGATAAACAACCTCAGTAAAGGCCGGACTACCCGTTGAATA	2940	<i>mnpl2/1</i>
GTAATCACCGTGGACCGCCGGATCCTGACGCTCCCAAAAGTCTATCGAGTATTTTTAGC	3000	<i>mnpl2/1</i>
TGGCTTTAGAAGCGCATTGGTGTTCAGAACGTACGCTATTACGCGAACCTAGCAAACATT	3060	<i>mnpl2/1</i>
GAGATATATTATTGAGGTTACATAAAAAGTATTGCATAAAGCGCACGCACCGAATTATAC	3120	<i>mnpl2/1</i>
ATCCGATCGATTATGCGCCAGCGCTCTGCGTAGTCGCCATAAAATCGGTCTGA	3172	<i>mnpl2/1</i>

3. Resultados

- a) Una delección de 7 nucleótidos (posición -539 a -533) que afecta a cinco nucleótidos de un posible MRE. Esta delección sugiere que el alelo *mnpl2* podría estar regulado por metales, aunque hasta ahora no se han obtenido evidencias que confirmen esta posibilidad.
- b) Tres sustituciones de un nucleótido (posiciones 156, 191 y 816) que provocan un cambio en tres aminoácidos de la proteína madura (MnPL2→MnPL1: A4D, V16I y S153G). La sustitución de los dos primeros aminoácidos fue útil para la identificación de los productos codificados por los dos alelos ya que se encuentran en el extremo N-terminal de la proteína madura.
- c) La sustitución de un nucleótido en la posición 2046 de la región no codificante, que probablemente también afectó a la transcripción, ya que podría ser la causa de un desplazamiento de 30 nucleótidos del sitio de poliadenilación en el mRNA (de la posición 2044 en el alelo *mnpl2* a la posición 2074 en *mnpl1*).

3.2.7 Secuencias relacionadas en otros hongos ligninolíticos

Para llevar a cabo esta búsqueda se utilizó la técnica de “Southern blot”. El DNA de diferentes hongos, digerido parcialmente con *EcoRI* y con *HindIII*, se hibridó con la sonda de DNA de 1060 pb. Los resultados presentados en la **Fig. 3.10** muestran hibridación positiva con el DNA de *F. fomentarius*, *C. gallica*, *P. radiata* y *H. annosum* (dos bandas de hibridación tras digestión con *EcoRI*). Las bandas de hibridación fueron de baja intensidad con el DNA de *P. cinnabarinus* y *A. niger*, y no se detectó señal alguna con el DNA de *P. chrysosporium* y *P. chrysocrea*.

Fig. 3.9 (en la página anterior) **Comparación de los alelos *mnpl1* y *mnpl2***. Para facilitar la comparación se muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes al alelo *mnpl2* (que presenta una secuencia de nucleótidos más larga que la del alelo *mnpl1*) y solamente aquellos nucleótidos o tripletes (región codificante) y aminoácidos del alelo *mnpl1* que difieren de *mnpl2*. las filas marcadas como *mnpl1/2* o MnPL1/2 presentan idéntica secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, en ambos alelos. Las delecciones se indican con rayas y las secuencias obtenidas por secuenciación de los extremos N-terminal aparecen subrayadas. Las diferencias más importantes están indicadas con cajas y círculos (en negrita), e incluyen: una delección de siete nucleótidos que afecta al MRE, tres sustituciones de un nucleótido que provocan un cambio en tres aminoácidos, y el cambio en un nucleótido que probablemente hace variar el sitio de poliadenilación.

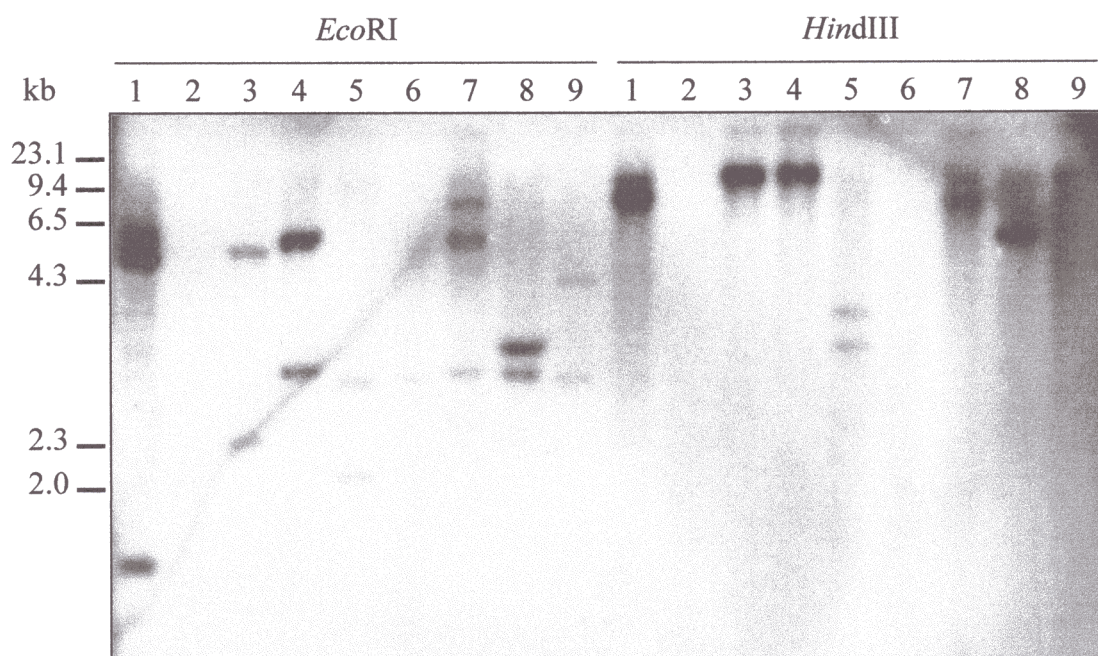


Fig 3.10. "Screening" por "Southern-blot" en busca de secuencias relacionadas con el gen *mnpl* de *Pleurotus eryngii* en otros hongos. El DNA fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, e hibridado con la sonda de cDNA del gen *mnpl*. Los diferentes carriles corresponden a: 1, *Pleurotus eryngii*; 2, *Phanerochaete chrysosporium*; 3, *Heterobasidion annosum*; 4, *Fomes fomentarius*; 5, *Pycnoporus cinnabarinus*; 6, *Phlebia chrysocrea*; 7, *Phlebia radiata*; 8, *Corioloopsis gallica*; y 9, *Aspergillus niger*.

Entre las especies que dieron hibridación positiva, solamente *P. radiata* está descrita como productora de peroxidasa ligninolítica, pero los resultados obtenidos demuestran la presencia de secuencias relacionados con el gen *mnpl* también en los otros hongos. Por otro lado, se ha descrito que *P. cinnabarinus* solamente produce lacasa (Eggert *et al.*, 1996), pero en la Fig. 3.10 se observan dos señales de baja intensidad en las digestiones con *EcoRI* y con *HindIII*. No se han descrito peroxidasa ligninolíticas en ascomicetos, con la única excepción de *Chrysonilia sitophila* (Rodríguez *et al.*, 1997), por lo que la débil señal de hibridación con el DNA de *A. niger* (incluido como control negativo) podría corresponder al gen de una peroxidasa diferente. Los resultados negativos con *P. chrysocrea* son un poco sorprendentes, teniendo en cuenta que hay hibridación con el DNA de *P. radiata*. Aunque no existe información sobre peroxidasa ligninolíticas producidas por *P. chrysocrea*, este hongo es capaz de llevar a cabo una deslignificación extensiva de la

3. Resultados

madera (Barrasa *et al.*, 1992). Las diferencias entre los genes que codifican peroxidasas capaces de oxidar Mn^{2+} en *P. chrysosporium* y *P. eryngii* ya habían sido apuntadas con anterioridad (Sarkar *et al.*, 1997) por la falta de hibridación del DNA de *P. chrysosporium* con sondas específicas para el gen *mnp1* de *P. eryngii* y un gen *mnp* de *P. ostreatus* similar al descrito por Asada *et al.* (1995a).

3.3 MODELADO MOLECULAR DE LA PEROXIDASA DE *Pleurotus eryngii*

Las propiedades catalíticas de una enzima están relacionadas con aspectos específicos de su estructura molecular. Con objeto de encontrar una explicación a las propiedades catalíticas de la peroxidasa MnPL de *P. eryngii*, se construyeron modelos moleculares para las variantes alélicas MnPL1 y MnPL2 sin péptido señal. Estos modelos se realizaron por homología de secuencia, utilizando como molde los modelos cristalográficos de las peroxidases LiP-H8, LiP-H2 y MnP1 de *P. chrysosporium* y ARP-CIP de *Coprinus*. Todas ellas presentan una identidad de aminoácidos con la peroxidasa MnPL de *P. eryngii* de 49-60%.

3.3.1 Descripción del modelo

En las Fig. 3.11 y 3.12 se puede ver una representación esquemática de la estructura molecular de la peroxidasa MnPL de *P. eryngii*, así como algunos detalles de la región que rodea al grupo hemo (MnPL1 y MnPL2 no presentan diferencias significativas a la hora de describir el modelo). El modelo refinado presenta una buena geometría, con unas desviaciones medias (rms) en distancias y ángulos de enlace de 0.016Å y 1.60° respectivamente, e incluye los siguientes elementos:

- a) Doce hélices predominantemente α (con porciones de estructura 3_{10} en las hélices A y F) denominadas, siguiendo la nomenclatura de la CcP (Finzel *et al.*, 1984), como hélices A (A12-N27), B (E36-G51), B_a' (S64-A67), B_b' (D69-E72), C (I81-H95), D (A99-N113), E (V145-A155), F (P159-I171), G (S195-E200), H (E229-R236), I (A241-M247) y J (E251-A266); cuatro láminas β de dos aminoácidos (F123-L124, E217-A218, R227-L228 e I276-D277); y 3 hélices 3_{10} muy cortas, definidas por los aminoácidos P76-N78, S279-V281 y L300-D302.
- b) Cuatro puentes disulfuro (C3:C15, C14:C278, C34:C114 y C242:C307).
- c) La cavidad del hemo, que incluye un grupo hemo de tipo b y los residuos del lado distal (R43, F46, H47, implicados en la reacción con el H₂O₂) y del lado proximal (H169, F186 y D231; el Ne de la histidina actúa como quinto ligando del Fe³⁺) conservados en todas las peroxidases fúngicas, con la única excepción de la ARP-CIP de *Coprinus* que presenta una leucina en la posición ocupada por la F186 de la peroxidasa MnPL de *P. eryngii*.

3. Resultados

- d) Dos sitios de unión a Ca^{2+} , en los que participan los oxígenos del D48, G60, D62 y S64 (Ca^{2+} distal que une las hélices B y B'_a), y S170, D187, T189, V192 y D194 (Ca^{2+} proximal que une la hélice F al lazo que se encuentra entre las hélices F y G).

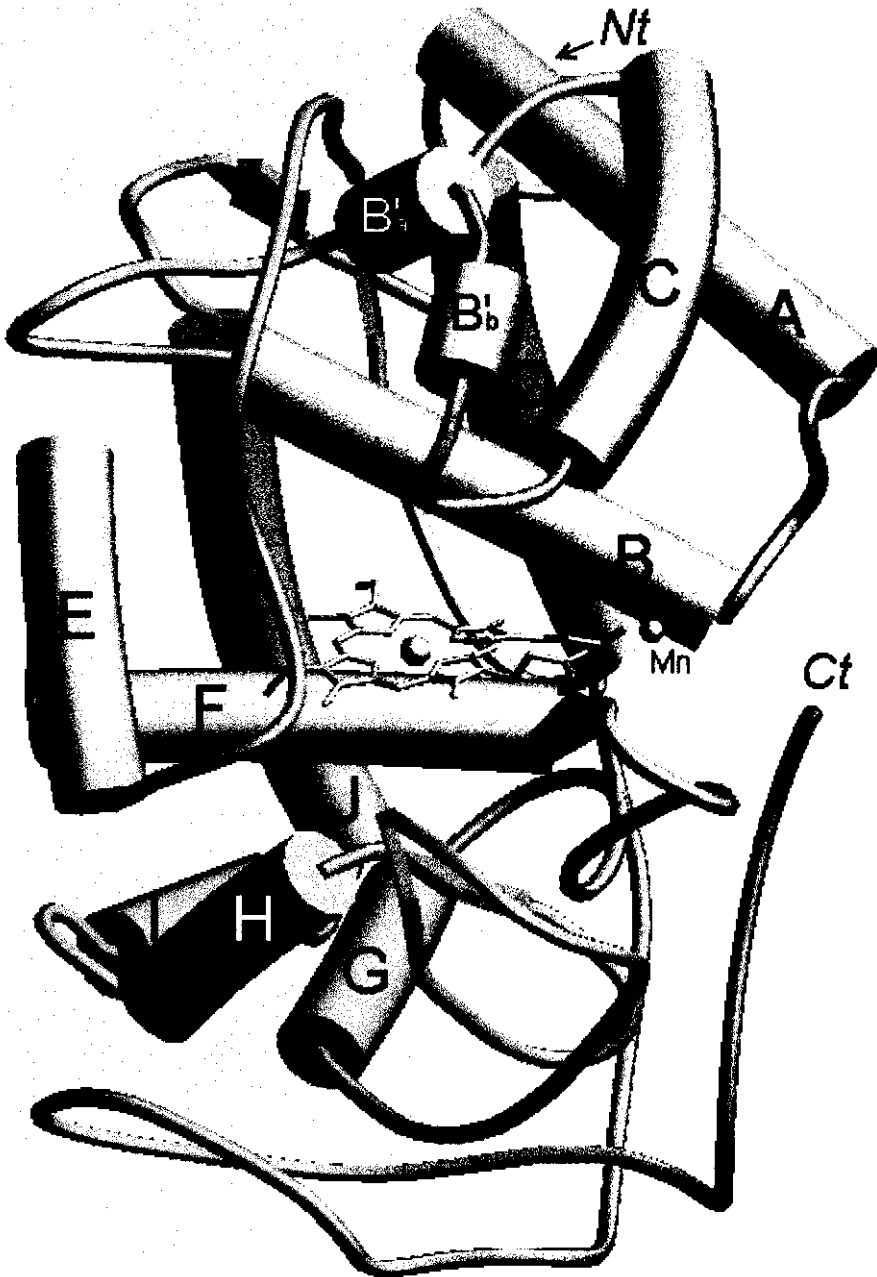


Fig. 3.11. Representación esquemática del modelo molecular de la peroxidasa MnPL de *Pleurotus eryngii* (variante alélica MnPL1). En el modelo se muestra la posición de doce hélices predominantemente α (cilindros), cuatro láminas de dos aminoácidos (flechas), el grupo hemo, el Mn^{2+} , y los extremos C y N terminal (este último detrás de la hélice A).

3. Resultados

- e) Un sitio de unión a Mn^{2+} en el que están implicados los oxígenos carboxílicos de tres residuos ácidos (E36, E40, D175) y el propionato del anillo C del grupo hemo (propionato interno), que permite la fijación del Mn^{2+} en la vecindad del hemo y la transferencia de electrones al anillo de porfirina del compuesto I o al Fe^{4+} del compuesto II.

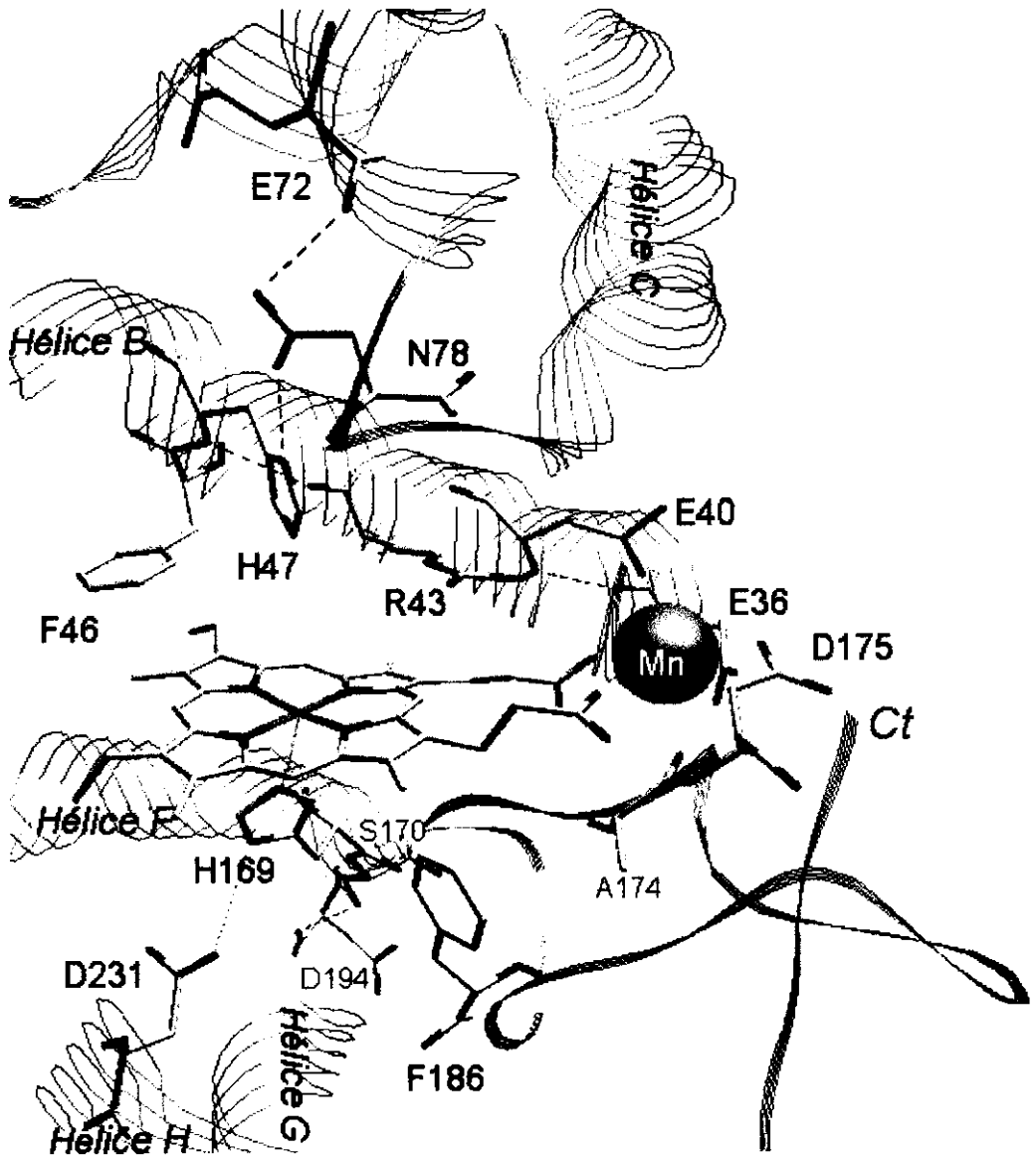


Fig. 3.12. Detalle de la cavidad del grupo hemo y sitio de unión a Mn^{2+} del modelo molecular de la peroxidasa MnPL de *Pleurotus eryngii* (variante alélica MnPL1). Se muestra la posición de los aminoácidos relevantes, las hélices y los puentes de hidrógeno en el entorno del grupo hemo (el Mn^{2+} aparece representado como una esfera de van der Waals).

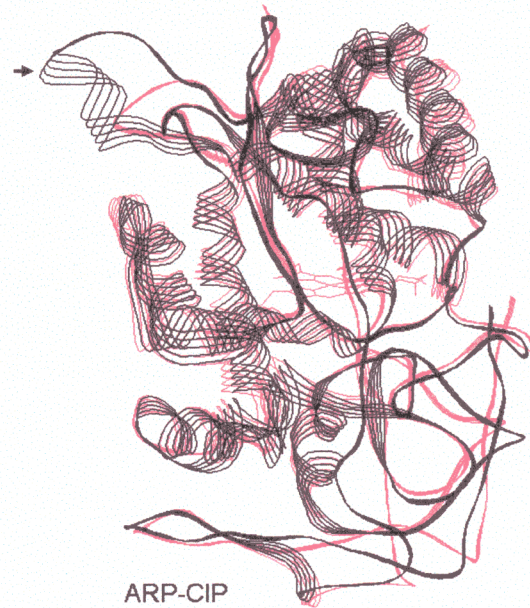
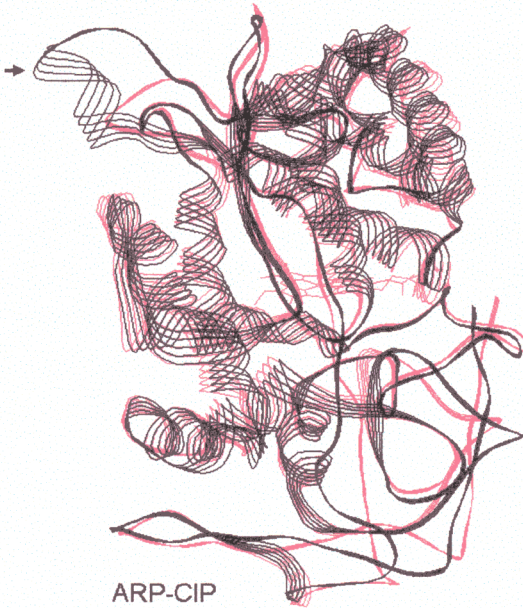
3.3.2 Superposición de la peroxidasa MnPL con otras peroxidases de hongos

Todas las peroxidases de las clases I y II comparten la misma topografía helicoidal y plegamiento terciario. Basándonos en este hecho, se superpuso el modelo molecular construido para la peroxidasa MnPL1 de *P. eryngii* con los modelos cristalográficos de la LiP y MnP de *P. chrysosporium*, y con el de la ARP-CIP de *Coprinus*, obteniéndose las siguientes distancias medias entre sus C α : 1.24 Å con la LiP-H8 (329 residuos computados), 1.47 Å con la ARP-CIP (328 residuos), 1.48 Å con la LiP-H2 de *P. chrysosporium* (327 residuos) y 1.49 Å con la MnP1 de *P. chrysosporium* (324 residuos). Este resultado indica una elevada afinidad estructural con la LiP-H8, teniendo en cuenta que la distancia media entre las isoenzimas H2 y H8 es de 1.1 Å. Las diferencias más significativas en la arquitectura global de los modelos (Fig. 3.13) se describen a continuación:

- a) Una larga cola en la región C-terminal (flecha superior derecha) de la MnP1 de *P. chrysosporium* (la cola de la peroxidasa MnPL es 17 y 3 residuos más corta que las de la MnP1 y LiP-H8 respectivamente).
- b) Un lazo de 7 residuos (flecha inferior derecha) en la MnP1 de *P. chrysosporium* (L228-T234), que no aparece en las otras peroxidases comparadas.
- c) Un lazo interno en la zona de F301 (flecha interior) de la LiP-H8 de *P. chrysosporium*, que es más corto en la MnP1 de *P. chrysosporium* y está ausente en la peroxidasa MnPL de *P. eryngii*.
- d) Un tercer lazo de 6 residuos (flecha superior izquierda) en la LiP-H8 de *P. chrysosporium* (E57-F62), que es más reducido en la MnP1 de este hongo y está ausente en la peroxidasa MnPL de *P. eryngii* (esta región presenta factores B elevados en todas las peroxidases fúngicas, al igual que las que conectan las hélices E y F, y la cola C-terminal de la peroxidasa MnPL, e incluye cierta con formación helicoidal en las peroxidases ARP-CIP y LiPH8).

Fig. 3.13. (pagina siguiente) Imagen estereoscópica de la superposición del modelo de cintas de la peroxidasa MnPL de *Pleurotus eryngii* (variante alélica MnPL1) (color rojo) con los de las peroxidases MnP1 y LiP-H8 de *Phanerochaete chrysosporium* y ARP-CIP de *Coprinus* (color negro).

3. Resultados



3.4 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *mnpl*

Tras la identificación en la región 5' no codificante del gen *mnpl* de una serie de elementos que podrían estar implicados en la regulación de su expresión, incluyendo un AP2, un MRE (ausente en el alelo *mnpl1*), un HSE, un AP1 y dos CreA, y conociendo el efecto que tienen determinados compuestos (incluyendo Mn^{2+} y peptona) sobre los niveles de actividad peroxidasa, se llevaron a cabo estudios de regulación a nivel transcripcional del gen *mnpl*.

3.4.1 Influencia de la peptona

En los estudios de regulación de la transcripción del gen *mnpl* por peptona se utilizó RNA de *P. eryngii* crecido en glucosa-tartrato amónico-extracto de levadura y glucosa-peptona-extracto de levadura (condiciones productoras y no productoras de actividad peroxidasa respectivamente). En la **Fig. 3.14** se puede observar un aumento de transcritos del gen *mnpl* en presencia de peptona, con un máximo después de cinco días de incubación, comparado con el mantenimiento de niveles basales en el medio con tartrato amónico. En estos experimentos se puso de manifiesto cierta inestabilidad del mRNA de la peroxidasa MnPL, ya que los niveles máximos disminuyeron un 80% en tan solo dos días (disminución que se refleja en la curva de incremento diario de la actividad peroxidasa). Estos datos contrastan con la estabilidad de la actividad en el líquido de cultivo, que se mantiene por encima de las 600 U/l durante cuatro días. Sin embargo, a partir del día nueve predomina el proceso degradativo y la actividad peroxidasa desciende.

Cuando la adición de peptona se realizó sobre micelio lavado crecido en medio productor de la peroxidasa se detectó un ligero descenso de los niveles de mRNA iniciales, comparado con la drástica desaparición observada en el control sin peptona (**Fig. 3.15**). En el micelio incubado en presencia de esta fuente de nitrógeno se determinó un contenido en transcritos a los treinta minutos equivalente al 65% del inicial, mientras que en el control (sin peptona) pasó a ser del 3% en el mismo tiempo de incubación. Los niveles de mRNA a los 60 y 120 min de incubación no se muestran en la **Fig. 3.15** ya que fueron independientes de la presencia o ausencia de peptona. Aunque la peptona no fue capaz de mantener los niveles iniciales de mRNA, los resultados obtenidos parecen indicar que o bien influye en la síntesis o en la estabilidad de los transcritos.

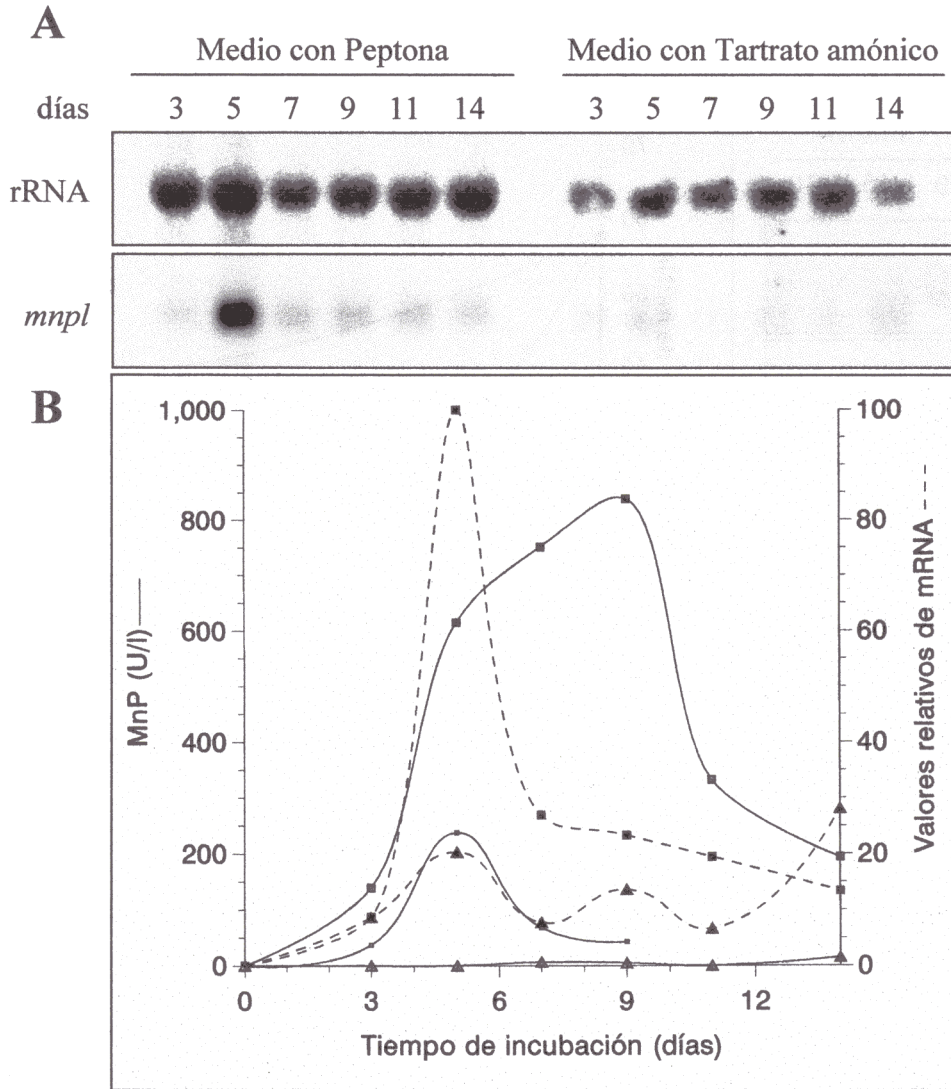


Fig. 3.14. Influencia de la peptona en la transcripción del gen *mnpl*, y niveles de actividad peroxidasa en el líquido de cultivo. **A.** Hibridación de muestras de RNA total procedentes de micelio de *Pleurotus eryngii*, crecido en medio glucosa-peptona-extracto de levadura y medio glucosa-tartrato amónico-extracto de levadura, utilizando como sondas el cDNA del gen *mnpl* y el DNA ribosómico de *Drosophila melanogaster*. **B.** Actividad peroxidasa acumulada en el líquido de cultivo, estimada como Mn³⁺-tartrato (MnP) (—), y cuantificación de los niveles de mRNA (A) respecto al rRNA (----), producidos por *Pleurotus eryngii* en glucosa-peptona-extracto de levadura (■) y glucosa-tartrato amónico-extracto de levadura (▲). La curva (-.-) representa el incremento diario de la actividad peroxidasa en el medio glucosa-peptona-extracto de levadura.

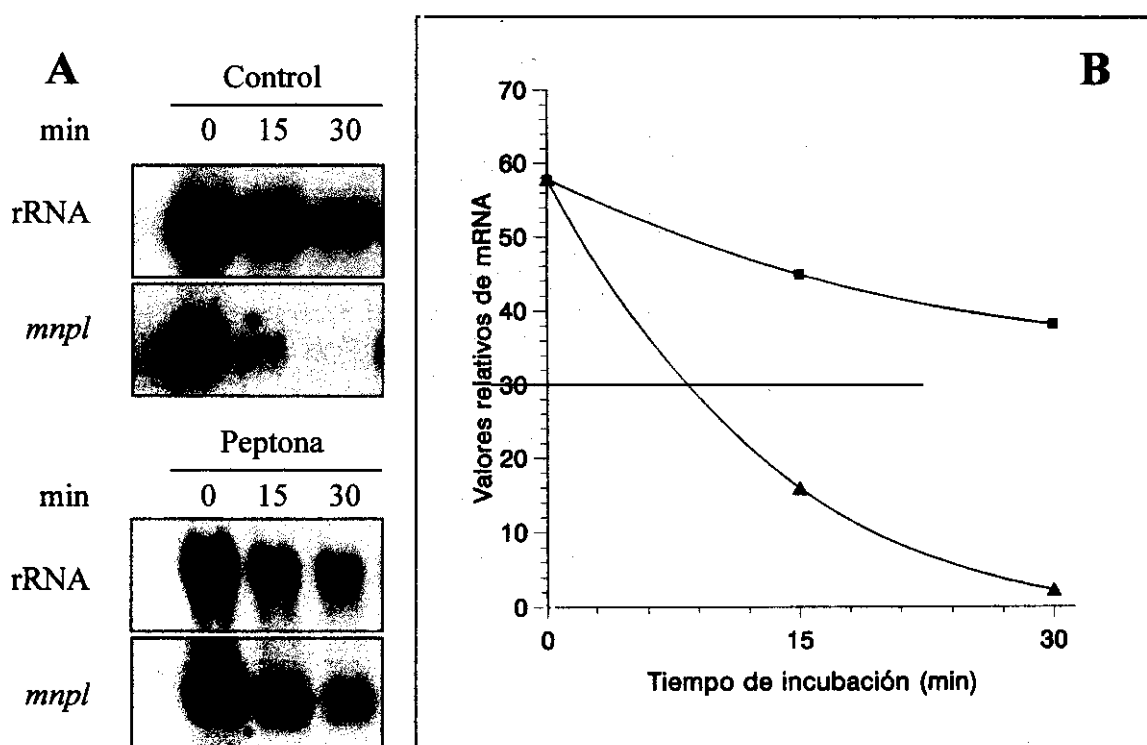


Fig. 3.15. Efecto de la peptona sobre la transcripción del gen *mnpl* en micelio de *Pleurotus eryngii* en el que estaba inducida la síntesis de mensajeros. A. Hibridación, con las sondas de cDNA del gen *mnpl* y DNA ribosómico de *Drosophila melanogaster*, de muestras de RNA total procedente de micelio de *Pleurotus eryngii* crecido en medio glucosa-peptona-extracto de levadura durante seis días, lavado y resuspendido en tartrato sódico 20 mM, pH 5 con o sin peptona (5 g/l), e incubado a 28°C y 180 rpm durante 30 min. **B.** Cuantificación de los niveles de mRNA de la peroxidasa MnPL, respecto al rRNA, en presencia (■) o ausencia (▲) de peptona.

Posteriormente se fraccionó la peptona por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G15 (Fig. 3.16 A), y se cultivó *P. eryngii* en medio glucosa-tartrato amónico-extracto de levadura al que se añadió cada una de las fracciones a una concentración equivalente a 5 g/l de peptona. En los medios preparados con las fracciones de bajo peso molecular se detectó actividad peroxidasa únicamente en los primeros días de cultivo. Los mayores niveles de actividad se detectaron en el medio preparado con la fracción de alto peso molecular a tiempos de incubación más largos (Fig. 3.16 B). Esta fracción parece ser la responsable del efecto provocado por la peptona sobre la actividad peroxidasa de *P. eryngii*. Cuando se añadieron casaminoácidos en lugar de peptona no se produjo prácticamente ningún efecto.

3. Resultados

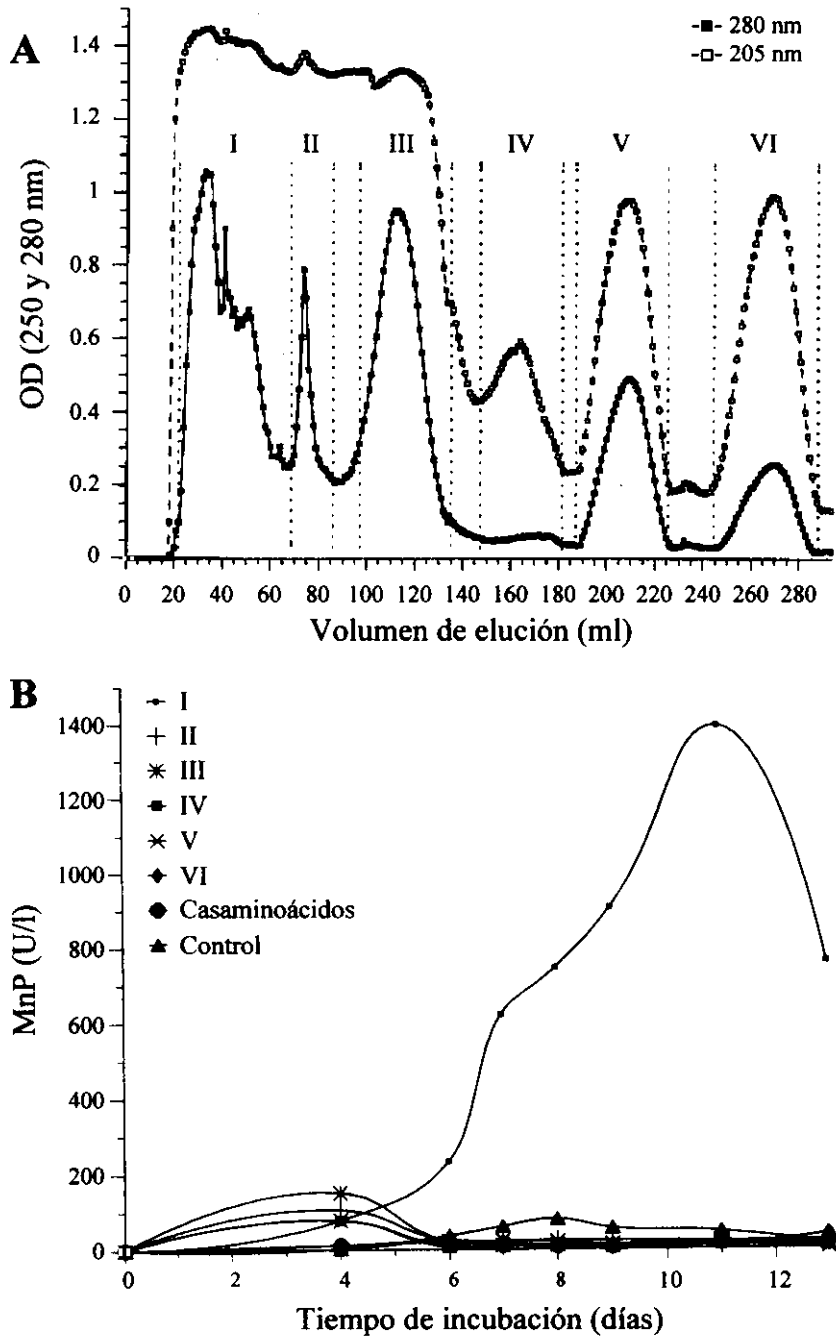


Fig. 3.16. A. Fraccionamiento de la peptona en Sephadex G15. B. Actividad peroxidasa (estimada como Mn³⁺-tartrato, MnP) tras la adición de las diferentes fracciones (y casaminoácidos) al medio glucosa-tartrato amónico-extracto de levadura. Como control se empleó medio sin suplementar.

Considerando estos resultados conjuntamente podríamos deducir que la inducción de la actividad peroxidasa por la peptona es debida a péptidos, como sucede en *Bjerkandera* sp. (Mester *et al.*, 1996), y no a aminoácidos. Los péptidos de las fracciones de bajo peso molecular provocarían la inducción de la transcripción del gen *mnpl* a tiempos cortos, pero por su carácter minoritario el efecto aparece limitado en el tiempo. La fracción mayoritaria de alto peso molecular necesitaría varios días de incubación para ser hidrolizada por el hongo, dando lugar a péptidos pequeños que provocarían un aumento significativo y estable de la actividad peroxidasa en el medio de cultivo.

3.4.2 Efecto del Mn^{2+}

El efecto producido por el Mn^{2+} sobre los niveles de mRNA de la peroxidasa MnPL se investigó en cultivos líquidos de *P. eryngii*, con peptona o tartrato amónico como fuentes de nitrógeno. En presencia de 25 μM Mn^{2+} no se detectó en ningún caso actividad MnP en el líquido de cultivo, ni mRNA procedente de la transcripción del gen *mnpl* en el micelio.

Al igual que en el caso anterior se estudió el efecto del Mn^{2+} sobre micelio de *P. eryngii* lavado crecido en condiciones productoras y no productoras de peroxidasa. El Mn^{2+} no presentó efecto alguno cuando se añadió sobre micelio crecido en condiciones no productoras (Fig. 3.17 A). Sin embargo, cuando la adición se llevó a cabo sobre micelio crecido en condiciones productoras, los niveles de partida de mRNA de la peroxidasa MnPL no solo no descendieron sino que aumentaron ligeramente en los quince primeros minutos (Fig. 3.17 B y 3.17C). Este resultado es difícil de explicar, puesto que no se había detectado actividad MnP cuando la peptona y el Mn^{2+} formaban parte del medio de cultivo (Fig. 3.2). Los resultados obtenidos a los 60 y 120 min de incubación no se muestran ya que, al igual que en los estudios realizados con la peptona, son independientes de la adición del Mn^{2+} .

3.4.3 Respuesta al estrés oxidativo

Se estudió la respuesta mediada por diferentes especies activas de oxígeno sobre la transcripción del gen *mnpl*. La adición de H_2O_2 (500 μM) al micelio produjo un aumento de los niveles de mRNA de la peroxidasa MnPL con un máximo a los 60 min de incubación, comparado con el ligero aumento experimentado a los 30 min por el control sin H_2O_2 (Fig. 3.18). Después de dos horas los niveles disminuyeron un 33% respecto al máximo observado. Previamente la concentración de H_2O_2 había descendido a 70 μM en 15 min y prácticamente desaparecido a los 30 min.

3. Resultados

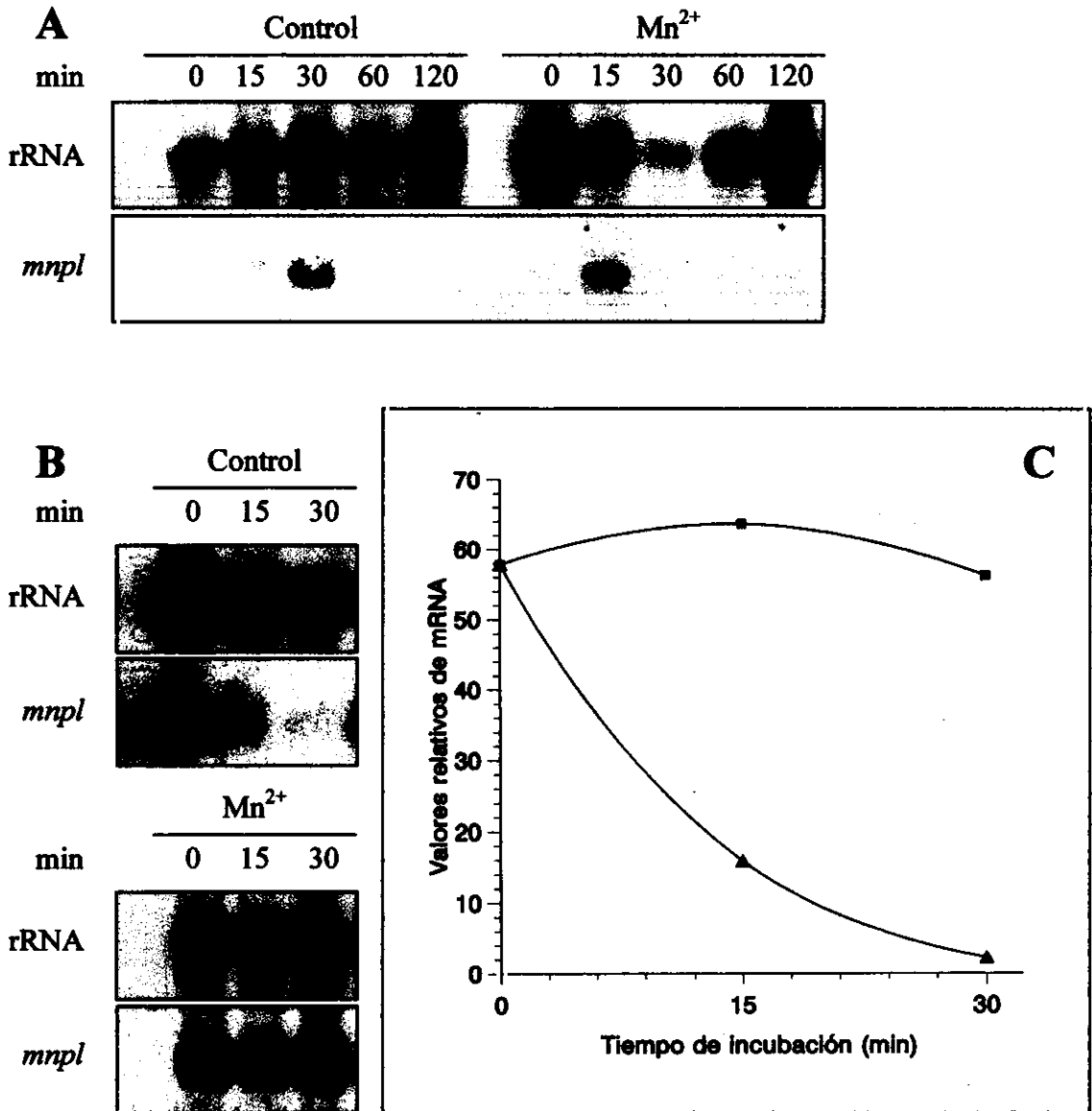


Fig. 3.17. Efecto del Mn²⁺ sobre la transcripción del gen *mnpl* en *Pleurotus eryngii*. Hibridación de muestras de RNA total obtenidas, a diferentes tiempos, de micelio de *Pleurotus eryngii* incubado en tartrato 20 mM, pH 5, con o sin Mn²⁺. El micelio procede de cultivos en medio glucosa-tartrato amónico-extracto de levadura (A) y glucosa-peptona-extracto de levadura de levadura (B) (condiciones no productoras y productoras de la peroxidasa MnPL respectivamente). C. Cuantificación de los niveles de mRNA de la peroxidasa MnPL, respecto al rRNA, en presencia (■) o ausencia (▲) de Mn²⁺ en el caso (B). Como sondas se utilizaron el cDNA del gen *mnpl* y el DNA ribosómico de *Drosophila melanogaster*.

3. Resultados

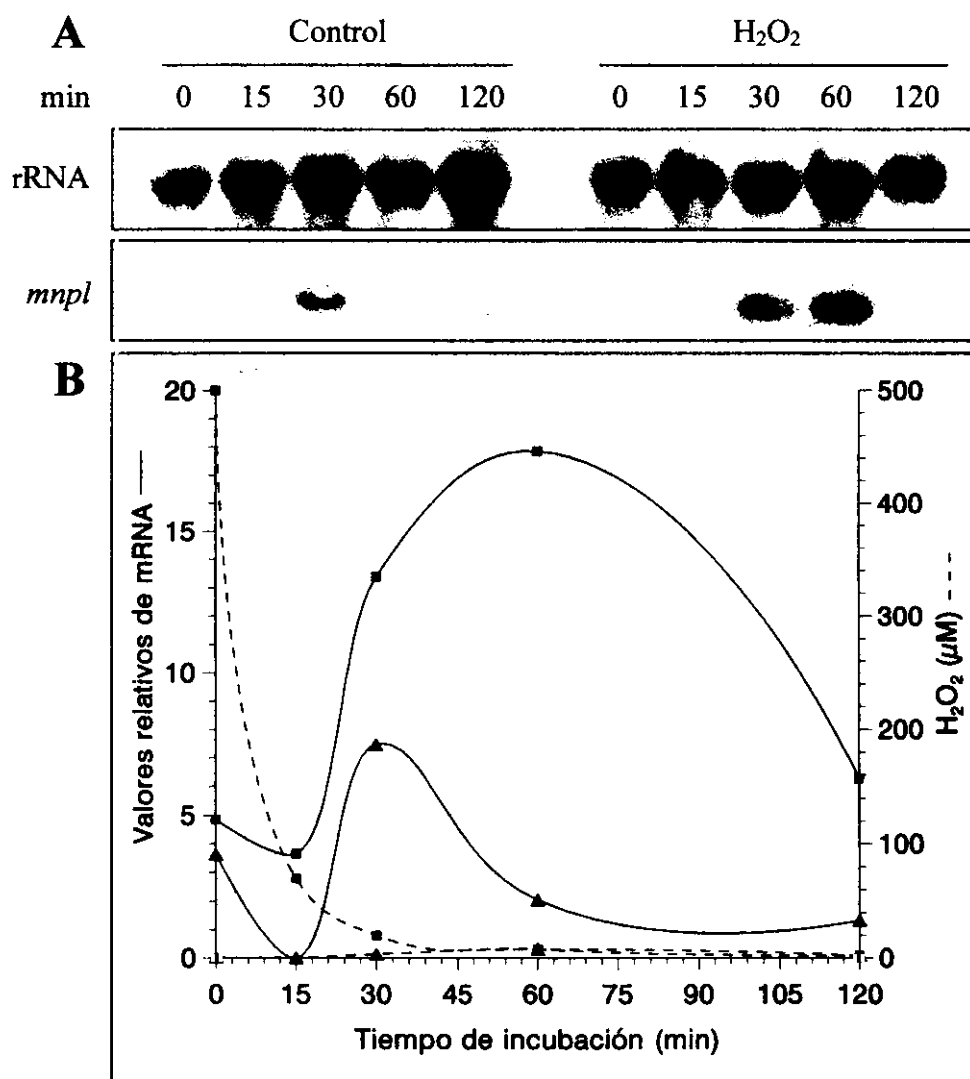


Fig. 3.18. Efecto del H₂O₂ sobre la transcripción del gen *mnpl*. A. Hibridación de muestras de RNA total procedente de micelio de *Pleurotus eryngii* incubado en presencia o ausencia de H₂O₂ (500 µM). Como sonda se utilizó DNA ribosómico de *Drosophila melanogaster* y cDNA del gen *mnpl*. B. Cuantificación de los niveles de mRNA de la peroxidasa MnPL respecto al rRNA en presencia (■) o ausencia (▲) de H₂O₂. En línea discontinua se muestran las variaciones en la concentración de H₂O₂. El efecto de otras especies activas de oxígeno se muestra en la Fig. 3.19.

Para la generación de otras especies activas de oxígeno se utilizaron sistemas de producción en continuo en presencia de micelio de *P. eryngii* (Guillén *et al.*, 1995). El anión superóxido (O₂⁻) se generó durante la

autooxidación de la correspondiente semiquinona en el “redox-cycling” de la menadiona (el $O_2^{\cdot -}$ formado puede tener un efecto por sí mismo o dismutar dando H_2O_2). El radical hidroxilo ($OH\cdot$) se generó al añadir Fe^{3+} a la reacción anterior, que fue reducido por el $O_2^{\cdot -}$ dando lugar al reactivo de Fenton (en presencia del H_2O_2 formado también a partir del $O_2^{\cdot -}$) (ver el apartado 2.8.2). El resultado se muestra en la **Fig. 3.19**. La inducción de la transcripción del gen *mnpl* por el $OH\cdot$ (en presencia de menadiona y Fe^{3+}) se detectó a los 15 min, momento en el cual la acumulación de mRNA de la peroxidasa MnPL fue máxima. Aunque el contenido en transcritos se redujo levemente tras una hora de incubación, los niveles se mantuvieron elevados tras dos horas de incubación (como era de esperar por el carácter cíclico del sistema utilizado, que garantiza la producción continuada del $OH\cdot$). El funcionamiento del sistema productor del $OH\cdot$ se vio confirmado por la falta de acumulación de H_2O_2 extracelular, que rápidamente reacciona con el Fe^{2+} formado tras reacción entre Fe^{3+} y $O_2^{\cdot -}$ para dar lugar al $OH\cdot$ (ver **Fig. 2.1**).

Los controles realizados dieron los siguientes resultados (**Fig. 3.19**) : i) en ausencia de menadiona y Fe^{3+} no se produjo un aumento significativo del mRNA de la peroxidasa MnPL, aunque se detectó una pequeña producción de H_2O_2 por parte del micelio, con niveles en torno a 5 μM ; ii) el Fe^{3+} (sin menadiona) no tuvo efecto como inductor del gen *mnpl*; pero iii) en presencia de menadiona y ausencia de Fe^{3+} (sistema productor de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2) se indujo la producción de mRNA de la MnPL, con una acumulación máxima a los 60 min de incubación, que pudo ser debida a la menadiona, al $O_2^{\cdot -}$ producido o al H_2O_2 procedente de la dismutación $O_2^{\cdot -}$ que alcanza un equilibrio producción-consumo sobre 50 μM . Según estos resultados podría parecer poco claro el efecto asociado al $OH\cdot$, puesto que el control con menadiona también induce la transcripción del gen *mnpl*. Sin embargo, si tenemos en cuenta otros datos obtenidos en la incubación del micelio con menadiona y Fe^{3+} , como son la ausencia de H_2O_2 extracelular y la transcripción del gen *mnpl* en tan solo 15 min (se necesitó una hora en presencia de menadiona), podemos concluir que en este caso es probablemente el $OH\cdot$ (la especie reducida de oxígeno más reactiva) el responsable de la inducción del gen *mnpl*.

3. Resultados

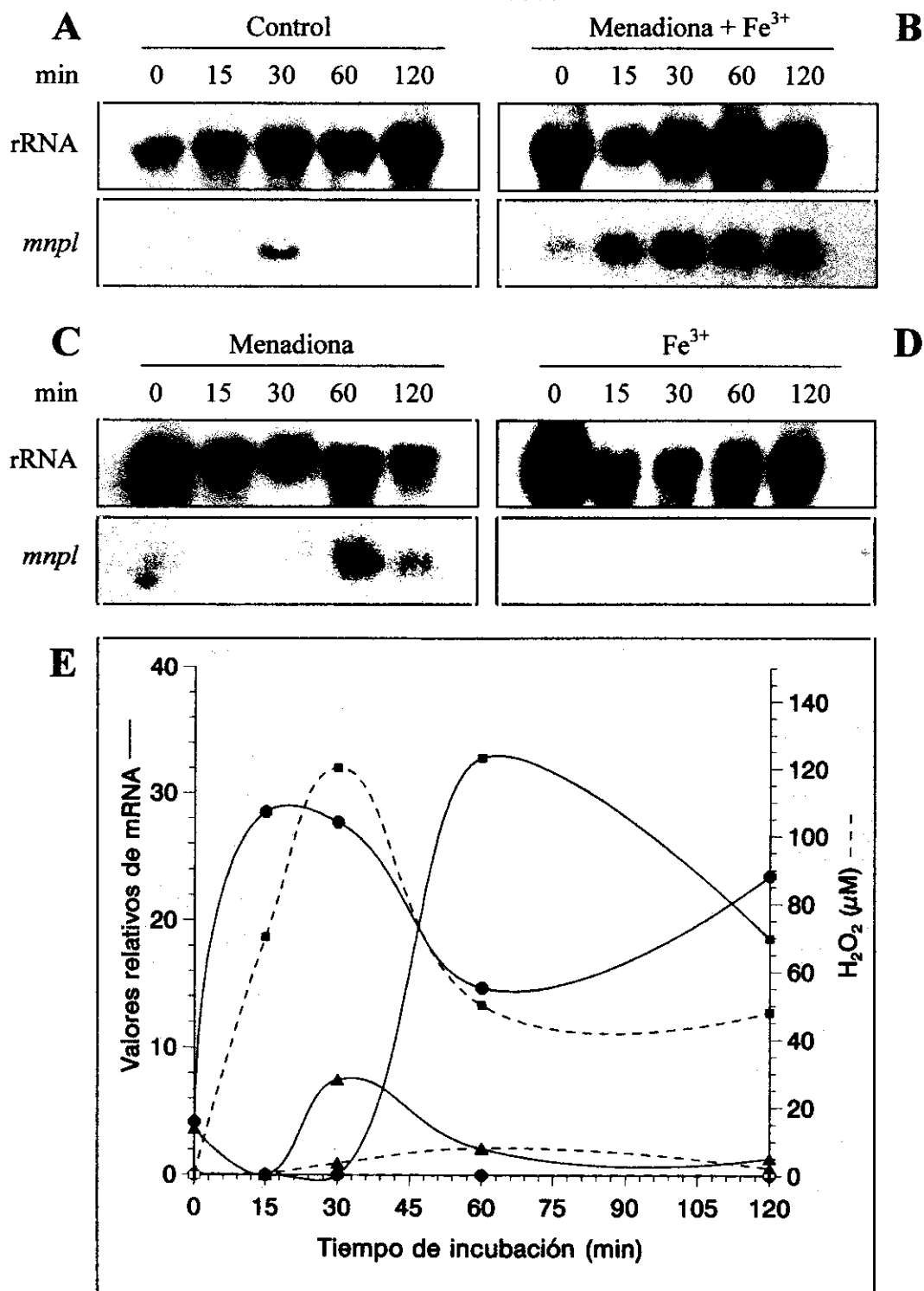


Fig. 3.19. Influencia de especies activas de oxígeno sobre la transcripción del gen *mnpl*. Hibridación de muestras de RNA total procedente de micelio de *Pleurotus eryngii* utilizando como sondas cDNA del gen *mnpl* y DNA ribosómico de *Drosophila melanogaster*. **A.** Control negativo. **B.** Sistema generador de OH[•]. **C.** Sistema generador de O₂⁻ y H₂O₂. **D.** Control negativo (efecto del Fe³⁺). **E.** Cuantificación de los niveles de mRNA de la peroxidasa MnPL respecto al rRNA en los casos **A** (-▲-), **B** (-●-), y **C** (-■-). En línea discontinua se muestran las variaciones en la concentración de H₂O₂ extracelular en cada uno de los casos. El efecto del H₂O₂ se muestra en la figura 3.18.

3.5 EXPRESIÓN HETERÓLOGA

Se probaron diferentes sistemas de expresión heteróloga con objeto de producir una proteína MnPL2 recombinante (MnPL2*) con las mismas propiedades fisicoquímicas y catalíticas que la proteína nativa producida por *P. eryngii*.

3.5.1 Expresión en *Escherichia coli*

En los experimentos de expresión en *E. coli* se utilizaron los vectores pET21a, pET22b y pMal-c2. Se crearon diferentes fusiones entre el promotor, T7lac de los vectores pET o lac del pMal-c2, y la porción de cDNA correspondiente a la proteína madura (sin secuencia señal) de la variante MnPL2. El cDNA utilizado en estas construcciones se preparó por PCR usando diferentes oligonucleótidos (ver **Tabla 2.3**).

De todas las construcciones realizadas, solamente las fusiones T7lac(p)::*mnpl2m*(cdna) establecidas en el vector pET21a fueron viables. El resto experimentó siempre deleciones de uno o varios nucleótidos con el consiguiente cambio en la fase de lectura. El fragmento *mnpl2m*(cdna) corresponde a la secuencia codificante de la proteína madura (sin péptido señal) e incluye en su extremo 5' una secuencia codificante para 6 histidinas seguida de la secuencia IEGR (reconocible por el Factor Xa). Con la inclusión de esta secuencia se pretendió facilitar el proceso de purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad en columnas de níquel. El plásmido obtenido tras ligar el fragmento *mnpl2*(cdna) en los sitios *NdeI*-*EcoRI* del vector pET21a se denominó pEMP2M (**Fig. 3.20 A**). Dos tipos de cepas de *E. coli* se transformaron con este plásmido, pero únicamente la BL21(DE3)pLysS expresó la proteína MnPL2* cuando se cultivó en medio 9 a 28°C. Los niveles de expresión fueron muy bajos y la proteína se acumuló inactiva en el citoplasma en forma soluble y como cuerpos de inclusión (**Fig. 3.21**). La proteína MnPL2* sólo pudo ser detectada con anticuerpos anti-MnPL2, y cuando se comparó su *Mr* con la de la proteína nativa producida por *P. eryngii* no pareció estar glicosilada (**Fig. 3.20 B y 3.21**). En la **Fig. 3.20 B** se observan bandas inespecíficas debidas a reacción cruzada del suero con proteínas de *E. coli*. Estas bandas desaparecieron cuando el suero fue inmunoabsorbido con un extracto de células BL21(DE3)pLysS (**Fig. 3.21**).

Una vez producida la MnPL2* se intentó su renauralización con objeto de obtener una peroxidasa catalíticamente activa, y para ello se utilizó el protocolo basado en los de Doyle y Smith (1996) y Whitwam y Tien (1996). El resultado siguió siendo una peroxidasa sin actividad catalítica debido a que la proteína MnPL2* es producida siempre en pequeñas cantidades e

interacciona con el resto de proteínas de *E. coli* formándose uniones intermoleculares que provocan su precipitación.

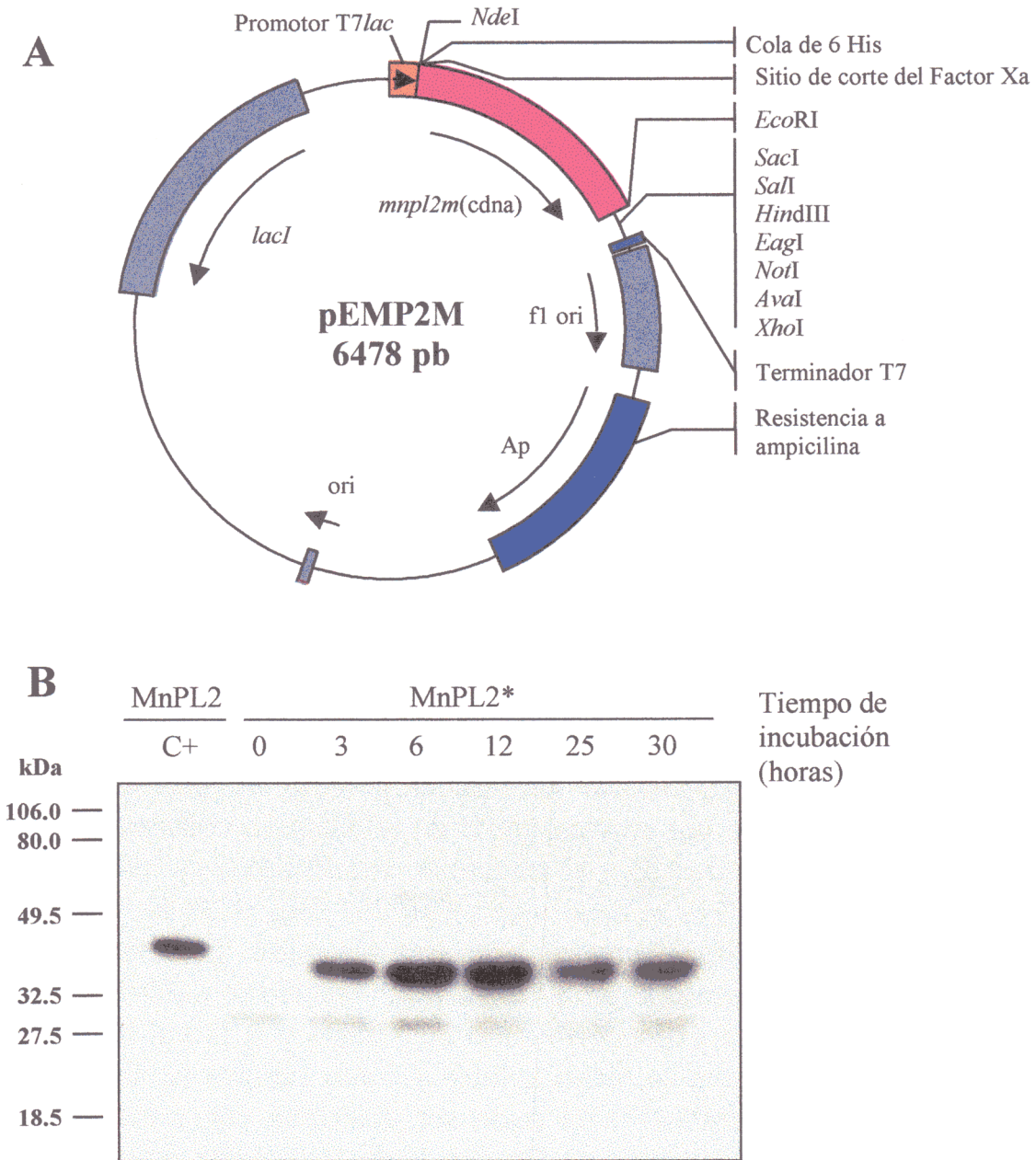


Fig. 3.20. Mapa del plásmido pEMP2M (A), y expresión de la peroxidasa MnPL de *Pleurotus eryngii* (variante alélica MnPL2) en la cepa BL21(DE3)pLysS de *Escherichia coli* (B). La cepa BL21(DE3)pLysS transformada con la construcción pEMP2M se incubó en medio 9 a 28°C y 180 rpm. Se tomaron muestras del cultivo a diferentes tiempos y se procesaron como se indica en materiales y métodos (apartado 8.1.2). Tras SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se reveló por ECL con anticuerpos policlonales anti-MnPL2. En el primer carril, como control positivo (C+), se incluyó proteína MnPL2 producida por *Pleurotus eryngii*.

3. Resultados

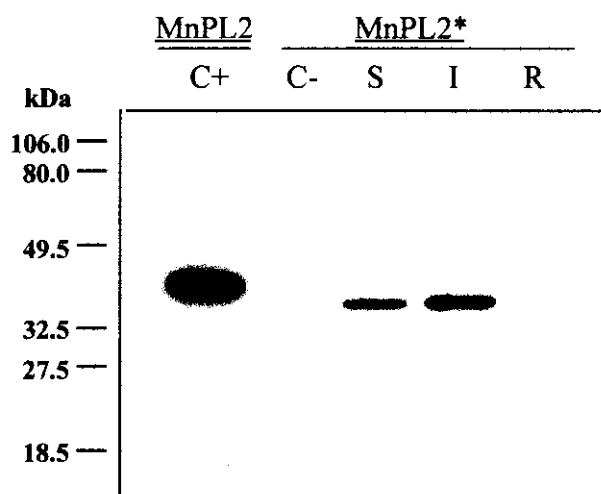


Fig. 3.21. “Western-blot” de la proteína MnPL2* producida por *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS en diferentes pasos del proceso de renaturalización comparada con la proteína nativa de *Pleurotus eryngii*. Se muestra la reacción tras SDS-PAGE con anticuerpos policlonales inmunoabsorbidos, de la peroxidasa MnPL2 nativa (C+); extracto de células de *E. coli* transformadas con el plásmido pEMP2M no inducidas con IPTG (C-); proteína MnPL2* en la fracción soluble intracelular (S), en forma de cuerpos de inclusión (I), y renaturalizada (R).

3.5.2 Expresión en *Emericella nidulans*

Debido a la baja eficacia de los sistemas de expresión en *E. coli* se optó por cambiar a un sistema eucariota, eligiéndose *Emericella nidulans* (forma conidial: *Aspergillus nidulans*) por las ventajas que supone trabajar con un organismo modelo en el que se han llevado a cabo numerosos estudios de genética formal y molecular, y en el que se espera un procesamiento y secreción adecuados de la proteína recombinante.

3.5.2.1 Cepas con una fusión transcripcional capaz de expresar transcritos *mnpl2*

Se utilizó el promotor del gen *alcA* [*alcA*(p)], incluido en el vector *palcA1*, para dirigir la expresión de la variante alélica *mnpl2*. El gen *alcA*, que codifica la alcohol deshidrogenasa, está controlado por represión por glucosa a través del represor transcripcional CreA, y es inducido via AlcR.

Para construir la fusión *alcA*(p)::*mnpl2*(cdna), el fragmento *Bam*HI-*Eco*RI de 1099 pb correspondiente a la región codificante *mnpl2* completa, incluyendo la secuencia señal, se fusionó con *alcA*(p) y el terminador

3. Resultados

transcripcional *trpC* del plásmido *palcA1* dando lugar al plásmido *pALMP2* (Fig. 3.22 A). Este plásmido, además de la fusión transcripcional, lleva el gen salvaje *argB* que se utilizó como marcador de selección. Se transformaron protoplastos de cepas *argB⁻* de *E. nidulans* *biA1*, *metG1*, *argB2* con *pALMP2*, y se aislaron los clones que crecieron en ausencia de arginina.

El análisis de la integración del plásmido en el genoma de *E. nidulans* se realizó por “Southern blot” (Fig. 3.22 B). Para ello se utilizó DNA genómico de los clones transformantes *argB⁺* y de la cepa *argB⁻* (control negativo) digerido con *EcoRI* (el gen *argB* está flanqueado por dos dianas *EcoRI* en el genoma de *E. nidulans*). El producto de la digestión se fraccionó en un gel de agarosa al 0.8% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La hibridación se realizó utilizando como sonda un fragmento de DNA específico de *argB*. La cepa *argB⁻* presentó una única banda de hibridación correspondiente al gen mutado, mientras que los clones transformados con el gen *argB⁺* presentaron dos bandas de hibridación: una correspondiente al gen original mutado y la otra al gen salvaje, integrado en una posición distinta del genoma. La nueva cepa así obtenida se denominó MPR2.

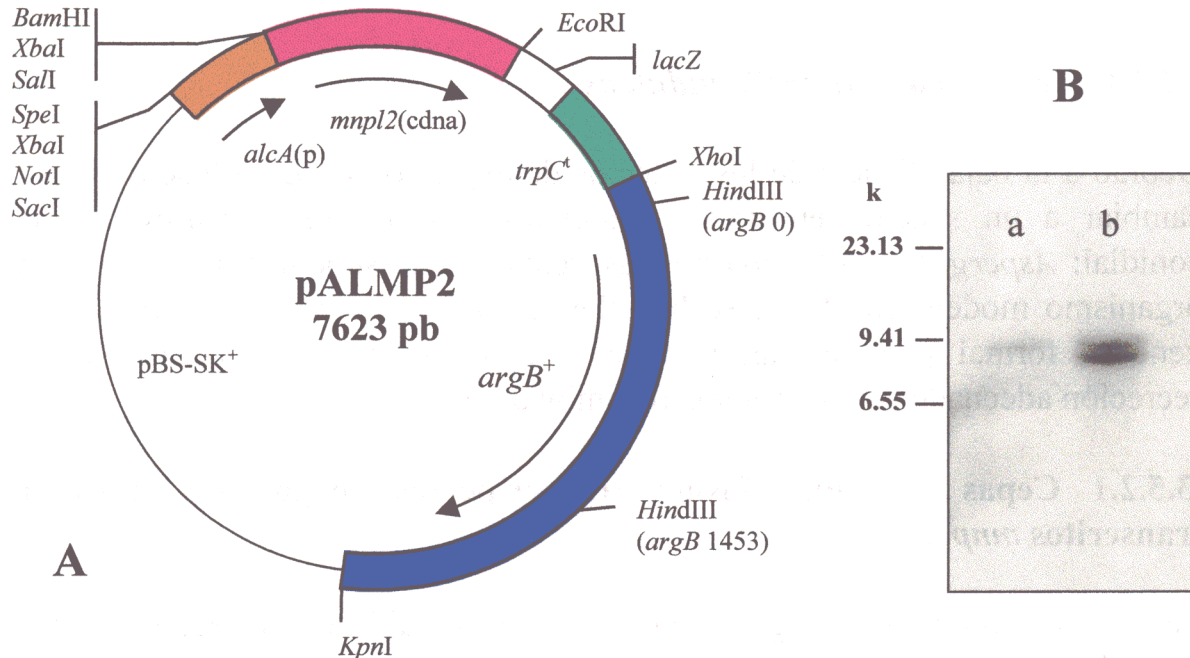


Fig. 3.22. Mapa del plásmido *pALMP2* (A) y análisis de su integración en el genoma de *Emericella nidulans* (B). Este último se llevó a cabo por “Southern blot” del DNA, digerido con *EcoRI*, de la cepa *argB⁻* (control negativo) (carril a) y de la cepa *argB⁺* transformada con el plásmido *pALMP2* (carril b).

3.5.2.2 Expresión de la peroxidasa MnPL2* por *Emericella nidulans* MPR2

Una vez seleccionada la cepa, se procedió a la expresión de la proteína MnPL2* y para ello se ensayaron diferentes medios de cultivo. En ninguno de los medios sin hemo se detectaron niveles apreciables de MnPL2*, y la proteína recombinante extracelular fue obtenida en medio completo con 500 mg/ml de hemo (Fig. 3.23). La actividad MnP asociada al micelio fue despreciable, lo que indica el correcto procesamiento del péptido señal de la MnPL2* por parte de *E. nidulans* (dicho péptido es el correspondiente a la peroxidasa MnPL2 nativa de *P. eryngii*). El pico de máxima producción, en torno a las 43 horas después de la inducción, fue de corta duración y los niveles representaron tan solo el 5% de la actividad producida normalmente por *P. eryngii*.

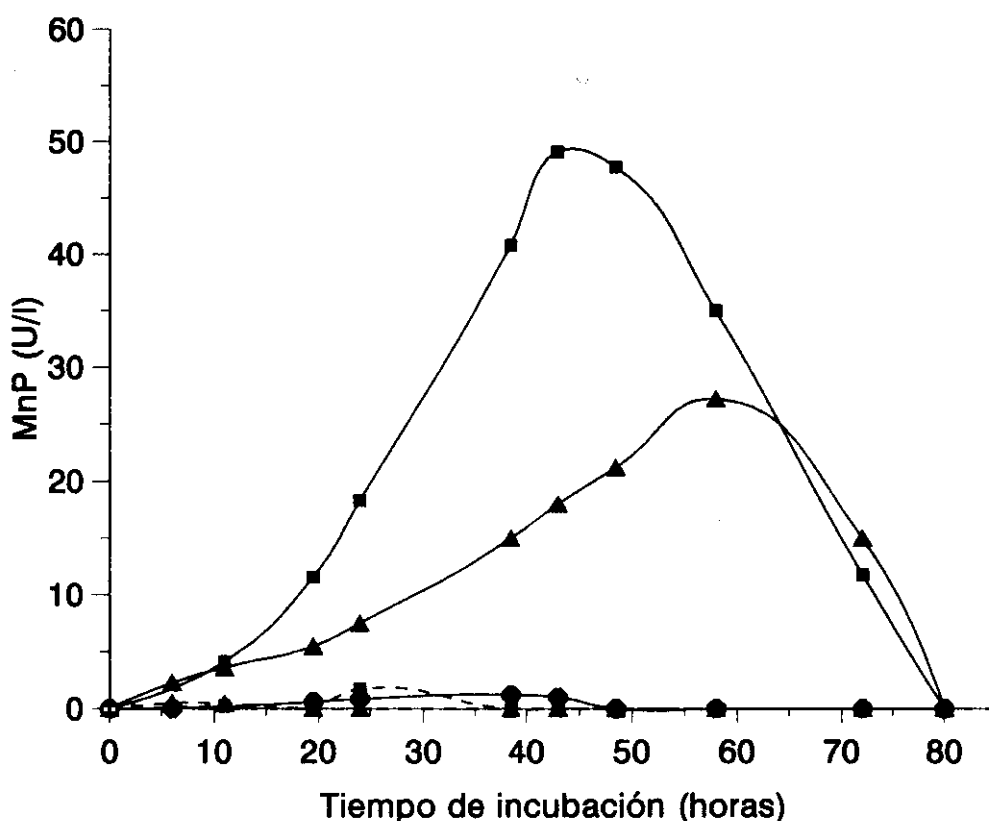


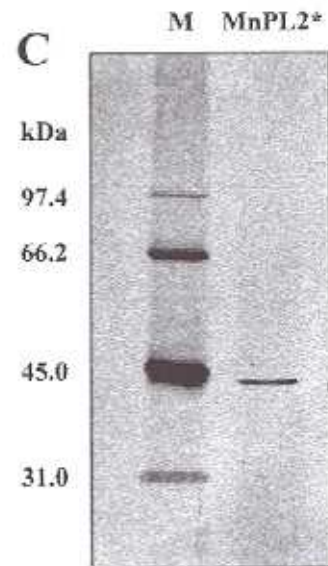
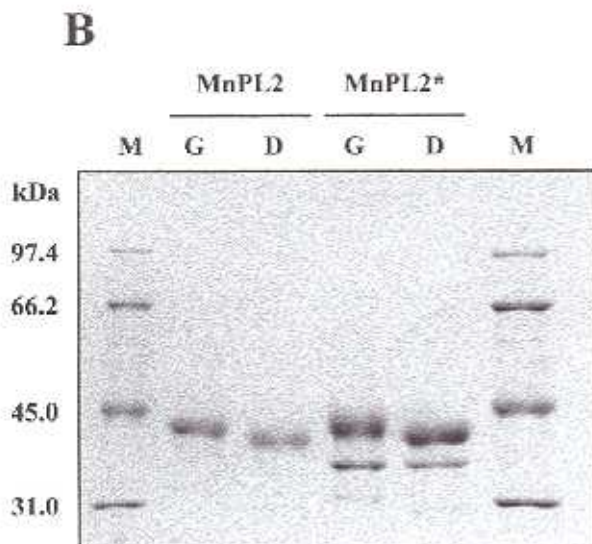
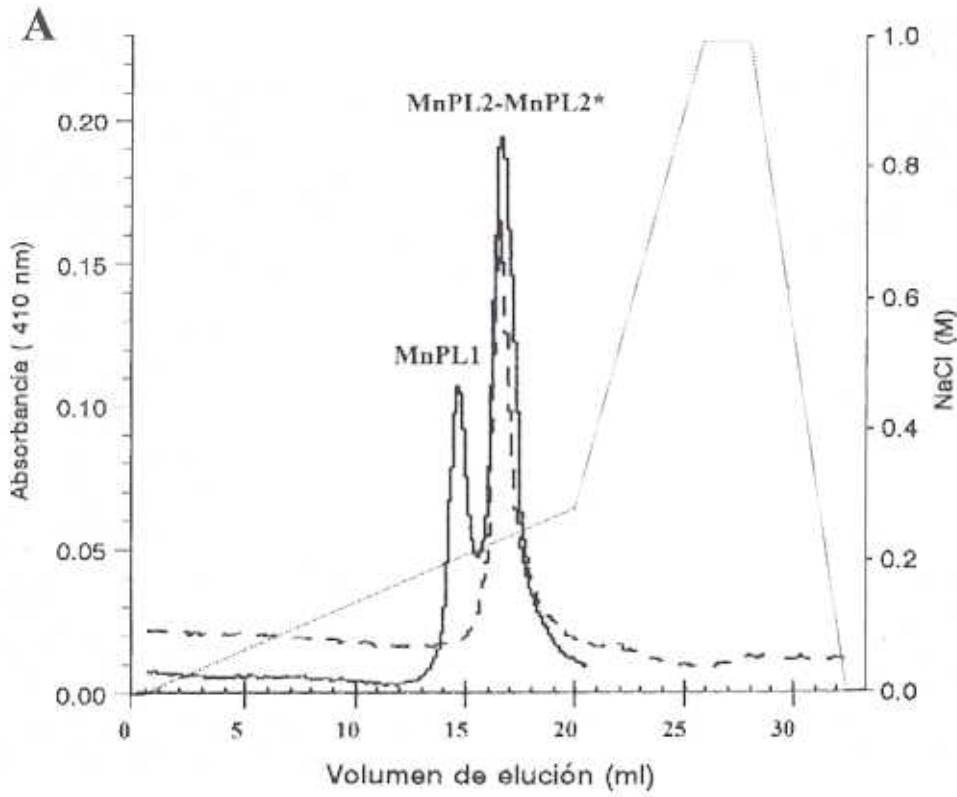
Fig. 3.23. Producción de la proteína MnPL2* por *Emericella nidulans* MPR2. Los medios utilizados fueron: medio completo con hemo (—■—) y sin hemo (---■---); medio mínimo con hemo (—▲—) y sin hemo (---▲---). Como control se incluyó *Emericella nidulans* *biA1*, *metG1*, *argB2* sin transformar en medio completo con hemo (—●—). La actividad peroxidasa se estimó por la formación de Mn³⁺-tartrato (MnP).

3.5.2.3 Purificación de la peroxidasa recombinante

La purificación de la proteína MnPL2* se realizó a partir de cultivos de *E. nidulans* MPR2 crecidos en medio completo y transferidos posteriormente a medio de inducción (medio completo con treonina 100 mM, glucosa al 0.05% y hemo 500 mg/l). El protocolo de purificación fue inicialmente el descrito para la proteína MnPL producida por *P. eryngii* (ver apartado 3.1.2). La comparación de los perfiles procedentes de la cromatografía de intercambio iónico en Mono-Q de las peroxidasas MnPL2 y MnPL2* reveló que las dos presentan el mismo tiempo de retención (Fig. 3.24 A). Además, cuando se analizó la pureza de la proteína recombinante así obtenida y su contenido en carbohidratos, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se pudo comprobar que el grado de glicosilación era el mismo que el de la proteína nativa (Fig. 3.24 B). Sin embargo, este paso no fue suficiente para obtener una proteína MnPL2* pura, debido a la existencia de una proteína contaminante con propiedades fisicoquímicas muy parecidas a las de la MnPL2, pero que no parecía estar glicosilada. Por este motivo, como último paso de purificación de la proteína MnPL2* se realizó una cromatografía de afinidad para glicoproteínas (usando Con A Sepharosa). El análisis posterior por SDS-PAGE de la fracción con actividad MnP reveló una única banda de proteína correspondiente a la MnPL2* pura (Fig. 3.24 C). Las propiedades catalíticas de la peroxidasa MnPL2* fueron las mismas de la forma nativa.

Fig. 3.24. (página siguiente) **Purificación de MnPL* producida por *Emericella nidulans* MPR2.** A. Perfil Mono-Q de la proteína MnPL2* (línea discontinua), comparado con el perfil obtenido para las proteínas MnPL1 y MnPL2 en *Pleurotus eryngii* (línea continua). El gradiente de NaCl se muestra como una línea punteada. B. SDS-PAGE tras cromatografía en Mono-Q, mostrando las proteínas MnPL2 y MnPL2* en su forma glicosilada (G) y tras desglicosilación con Endo-H (D). C. SDS-PAGE de la proteína MnPL2* glicosilada después del último paso de purificación en Con A Sepharosa. (M) marcadores de peso molecular.

3. Resultados



4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se procedió a la caracterización molecular de las peroxidasas ligninolíticas de *Pleurotus eryngii*. Este es un basidiomiceto de podredumbre blanca estudiado en nuestro laboratorio por su capacidad para degradar selectivamente la lignina de las gramíneas, sin apenas alterar las fibras de celulosa (Kühn *et al.*, 1992; Martínez *et al.*, 1994). Esta capacidad es importante para su posible aplicación en la industria papelera sustituyendo a procedimientos químicos de eliminación de la lignina potencialmente contaminantes ya que, como mostraron Camarero *et al.* (1998a), las fibras de celulosa deben mantener una serie de propiedades para poder ser utilizadas en la fabricación de papel.

Las peroxidasas producidas por *P. eryngii* en cultivo líquido (variantes alélicas MnPL1 y MnPL2) fueron purificadas y sus propiedades catalíticas estudiadas. A partir de la secuencia N-terminal de la proteína MnPL1 y de las correspondientes a dos péptidos internos de la misma se diseñaron oligonucleótidos que fueron utilizados como cebadores en reacciones de PCR. Los fragmentos obtenidos se utilizaron como sondas en el “screening” de librerías genómicas y de cDNA, lo que permitió clonar los dos alelos (*mnpl1* y *mnpl2*) del gen *mnpl*; en la búsqueda de secuencias relacionadas con el gen *mnpl* en otros hongos ligninolíticos (apartado 4.3.3); y en los estudios de expresión del gen *mnpl* en respuesta a diferentes estímulos (peptona, Mn^{2+} y especies activas de oxígeno) (apartados 4.1 y 4.5). La estructura del gen *mnpl* se comparó con las correspondientes a otras peroxidasas ligninolíticas (apartado 4.3.1), y lo mismo se hizo con la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de cDNA (apartado 4.3.2).

Por otro lado, en base a la estructura primaria de la proteína y su estructura secundaria deducida de la secuencia, se elaboró un modelo tridimensional para la proteína MnPL utilizando como modelo la estructura cristalográfica de otras peroxidasas (apartado 4.4). El modelado se hizo con objeto de poder explicar las propiedades catalíticas de esta peroxidasa, como ya habían hecho otros autores con la MnP y la LiP antes de que fueran cristalizadas (Du *et al.*, 1992; Hoffrén *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1994).

Por último, se estableció un sistema de expresión heteróloga en *Emericella nidulans* para la peroxidasa MnPL (apartado 4.5). De esta forma, tras realizar modificaciones puntuales por mutagénesis dirigida sobre la secuencia de aminoácidos, se podrá expresar la proteína mutada y ver como afectan dichas mutaciones a sus propiedades catalíticas.

4.1 INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y DEL Mn^{2+}

La búsqueda de peroxidasas en *P. eryngii* se inició utilizando los medios de cultivo descritos para la producción de las otras enzimas implicadas en la degradación de la lignina por este hongo (lacasa y AAO) (Guillén *et al.*, 1992). Cuando se analizaron las condiciones óptimas para la producción de peroxidasa MnPL en cultivos líquidos de *P. eryngii*, se pudo comprobar que eran diferentes de las descritas para *Phanerochaete chrysosporium*, capaz de producir peroxidasas cuando se cultiva en medios con amonio como fuente de nitrógeno (Kuwahara *et al.*, 1984). La producción de MnP y LiP en cultivos de *P. chrysosporium* tras agotarse la fuente de nitrógeno o carbono limitante (Holzbaur y Tien, 1988; Stewart *et al.*, 1992), también contrasta con las condiciones definidas para *P. eryngii*, que produce la peroxidasa MnPL durante su crecimiento (en el medio glucosa-peptona-extracto de levadura el carbono es limitante con respecto al nitrógeno, y no se agota hasta el día diez, cuatro días después del pico de máxima actividad peroxidasa).

La estimulación de las peroxidasas ligninolíticas por peptona en un medio rico en nitrógeno se ha descrito también para *Bjerkandera* sp. (Kaal *et al.*, 1993). La peptona está compuesta principalmente por péptidos de diferentes tamaños, y se ha sugerido que algunos de ellos podrían inducir eventos del metabolismo secundario, tales como la secreción de peroxidasas ligninolíticas, al presentar semejanzas con los liberados durante la autólisis del micelio (Kaal *et al.*, 1993). En el presente trabajo se fraccionó la peptona, y las fracciones obtenidas se utilizaron como potenciales inductores de la actividad peroxidasa en *P. eryngii*. De esta forma se comprobó que la adición al medio de las fracciones de bajo peso molecular provocaba la aparición de la actividad peroxidasa en un corto periodo de tiempo, mientras que las de alto peso molecular necesitaban probablemente ser hidrolizadas para ejercer un efecto inductor sobre la actividad peroxidasa MnPL (que se manifestaba a largo plazo). Cuando se profundizó a nivel molecular se pudo comprobar que el efecto de la peptona sobre la peroxidasa MnPL se produce a nivel transcripcional. Su adición a micelio de *P. eryngii* aislado, o a cultivos completos, provocó un mantenimiento o incluso aumento de los niveles de mRNA de esta proteína.

Por otro lado, la falta de actividad peroxidasa en presencia de concentraciones de Mn^{2+} superiores a 25 μM también contrasta con los resultados obtenidos en *P. chrysosporium* y otros hongos ligninolíticos (Hatakka, 1994; Bonnarne y Jeffries, 1990; Périé y Gold, 1991). *Phanerochaete chrysosporium* produce tres isoenzimas MnP a niveles basales en ausencia de Mn^{2+} . Dos de ellas se inducen al añadir Mn^{2+} al medio de cultivo, que actúa controlando la expresión a nivel de transcripción (Gettemy



4. Discusión

et al., 1998). Sin embargo, es difícil establecer el efecto del Mn^{2+} en la expresión de la peroxidasa MnPL en cultivos líquidos de *P. eryngii*. Su presencia en el medio de cultivo anula el efecto inductor de la peptona y no se detecta actividad peroxidasa. Por otro lado, cuando se analizan los niveles de mRNA se comprueba que el Mn^{2+} no induce la transcripción del gen *mnpl* en ausencia de peptona. Con estos resultados se podría concluir que el Mn^{2+} reprime la síntesis de la proteína MnPL en los cultivos líquidos de *P. eryngii*. Sin embargo, el efecto que presenta sobre el gen *mnpl* cuando previamente se ha inducido su transcripción con peptona, parece indicar que el Mn^{2+} también puede participar de forma positiva en la regulación de la transcripción de este gen. Con estos datos se puede postular que la transcripción del gen *mnpl* está regulada mediante un mecanismo que combina represión y activación de una forma jerarquizada, de manera que el Mn^{2+} produce diferentes efectos dependiendo del estado en el que se encuentre la transcripción en el momento de la adición. Este tipo de regulación difiere de lo descrito por otros autores para *P. chrysosporium*, donde no se había encontrado que el Mn^{2+} reprima la expresión de la LiP ni de la MnP.

4.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS PEROXIDASAS DE *Pleurotus eryngii*

Las peroxididasas producidas por cultivos líquidos de *P. eryngii* fueron inicialmente descritas como manganeso peroxididasas (MnP) por su actividad sobre el Mn^{2+} (Martínez *et al.* 1996). Sin embargo, el hecho de que las proteínas MnPL1 y MnPL2 presentasen tanto actividad peroxidasa sobre Mn^{2+} como actividad mediada por Mn^{2+} sobre fenoles, y actividad independiente de Mn^{2+} sobre DMP e hidroquinonas sustituidas así como sobre alcohol veratrílico (sustrato típico de la LiP), puso de manifiesto que eran diferentes de las típicas peroxididasas producidas por el resto de los hongos ligninolíticos (Shimada e Higuchi, 1991; Kirk y Farrell, 1987). Teniendo en cuenta estos datos se propuso un ciclo catalítico para la peroxidasa MnPL (Fig. 4.1) que incluye características de tipo LiP y de tipo MnP (Fig. 1.6 A y B). Este nuevo tipo de peroxidasa no sólo lo produce *P. eryngii*. Se han identificado enzimas con propiedades catalíticas similares en *Pleurotus pulmonarius* (Camarero *et al.*, 1996) y *Pleurotus ostreatus* (Sarkar *et al.*, 1997), siendo esta última diferente de la peroxidasa estudiada por Asada *et al.* (1995a), así como en *Bjerkandera adusta* (Heinfling *et al.*, 1998a y b) y *Bjerkandera* sp. (Mester y Field, 1998).

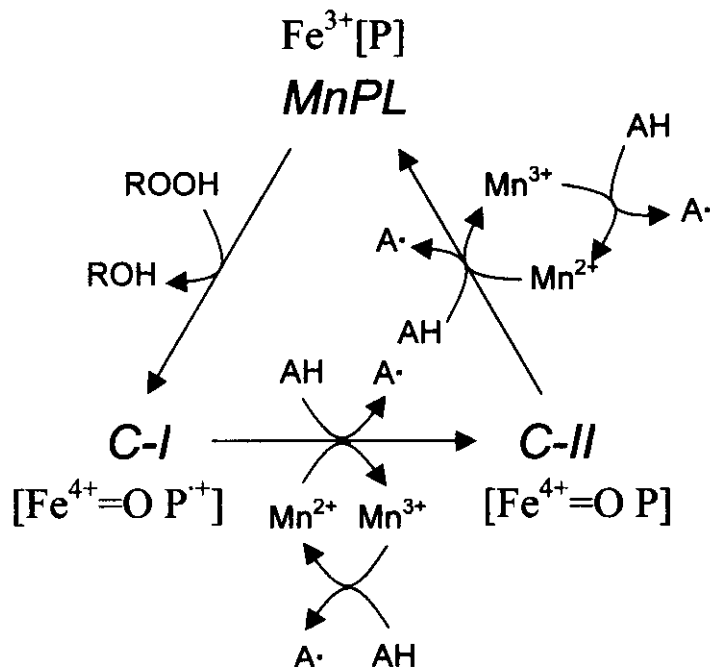


Fig. 4.1. Esquema del ciclo catalítico propuesto para la peroxidasa MnPL producida por *Pleurotus eryngii*. AH: compuestos aromáticos fenólicos o no fenólicos. Para comparación con LiP y MnP de *Phanerochaete chrysosporium* ver Fig. 1.6.

4. Discusión

Las constantes cinéticas del estado estacionario de las dos variantes alélicas de la peroxidasa MnPL para diferentes sustratos fueron similares. Ambas mostraron una afinidad elevada por el H₂O₂ (con una K_m aparente de 6-9 μ M). Entre los diferentes sustratos reductores de la enzima, la mayor afinidad fue por el Mn²⁺ y las hidroquinonas sustituidas, con valores de K_m aparente alrededor de 20 μ M (hidroquinona, metoxihidroquinona y 2,6-dimetoxihidroquinona proceden de la degradación de los tres tipos de unidades que componen la lignina (Higuchi, 1985)), mientras que la oxidación eficiente del alcohol veratrílico requiere una concentración de sustrato en el rango milimolar. Recientemente se ha publicado una amplia comparación de los diferentes sustratos reductores de esta peroxidasa de *P. eryngii* entre los que se incluyen hidroquinonas, fenoles sustituidos, colorantes, otros compuestos aromáticos y Mn²⁺ (Heinfling *et al.*, 1998b).

Conviene comentar que no se ha detectado una LiP típica en los cultivos de las diferentes especies de *Pleurotus*, y tampoco hibridación de su DNA con sondas del gen *lpo* que codifica una LiP de *P. chrysosporium* (Huoponen *et al.*, 1990; Varela, 1998). Estos datos sugieren que las peroxidases polivalentes descritas en este trabajo, que comparten propiedades catalíticas de MnP y LiP y además oxidan eficientemente sustratos fenólicos (que la MnP es incapaz de oxidar en ausencia de Mn²⁺ y con los que la LiP se inactiva rápidamente) (Harvey y Palmer, 1990) podrían jugar un importante papel en la degradación de la lignina por *P. eryngii*.

4.3 COMPARACIÓN CON OTRAS PEROXIDASAS FÚNGICAS

Las secuencias de nucleótidos del gen *mnpl* (alelos *mnpl1* y *mnpl2*) y sus correspondientes regiones promotoras se describen con detalle en el apartado 3.2 y **Fig. 3.8** y **3.9**. El conocimiento de la secuencia de nucleótidos y de la secuencia de aminoácidos que codifica permitió llevar a cabo comparaciones con otras peroxidasas fúngicas. Con esto se pretendió contribuir al establecimiento de las relaciones existentes entre este grupo de enzimas.

4.3.1 Estructura génica de las peroxidasas fúngicas

La **Fig. 4.2 A** muestra una representación esquemática en la que se comparan el tamaño y la disposición de los intrones y exones en varios genes que codifican peroxidasas fúngicas. En ella se incluyen tres isoenzimas MnP y tres LiP de *P. chrysosporium* (se han aislado varios genes que codifican proteínas del tipo LiP-H8); la peroxidasa MnPL de *P. eryngii* y la MnP de *P. ostreatus*; la MnP2 y dos isoenzimas LiP de *Trametes versicolor*; la ARP-CIP de *Coprinus*; y tres peroxidasas de *T. versicolor* (PGV, PGVII y LiPGII) que aún están sin aislar (las referencias bibliográficas correspondientes se indican en la **Fig. 4.3**). Una característica del gen *mnpl* digna de mención es su elevado número de intrones, un total de 15, que es el mismo encontrado en un gen *mdp* de *P. ostreatus* (Asada *et al.*, 1995a) pero mucho más elevado que el encontrado en otras peroxidasas. Para poder optimizar el alineamiento de los 15 genes se establecieron hasta seis huecos en las secuencias de entre 3 y 33 nucleótidos (**Fig. 4.2 B**). En el alineamiento, el gen *arp-cip* aparece desplazado debido a que una porción de la región codificante correspondiente al péptido señal de las peroxidasas ligninolíticas es, en este caso, una parte de la proteína madura. Tras situar los huecos, probablemente correspondientes a deleciones o inserciones, las diferentes secuencias codificantes muestran un buen alineamiento de los triplete que codifican residuos característicos. La coincidencia de la posición de las histidinas distal y proximal se muestra en la **Fig. 4.2 B**. Cuando se comparó la posición de los intrones, los genes quedaron organizados en varios grupos, en los que dicha posición era relativamente constante. Solamente uno de los intrones (el intrón XV de *P. eryngii*) presenta la misma posición en tres de los grupos. Los 15 intrones encontrados en los genes *mnpl* de *P. eryngii* y *mdp* de *P. ostreatus* presentan aproximadamente la misma posición (aunque se detectan diferencias en los intrones I y III), y cuando se comparan con el gen *pgv* de *T. versicolor* se encuentra una coincidencia del 74% en la posición de los intrones.

4.3.2 Comparación de secuencias de varias peroxididasas fúngicas

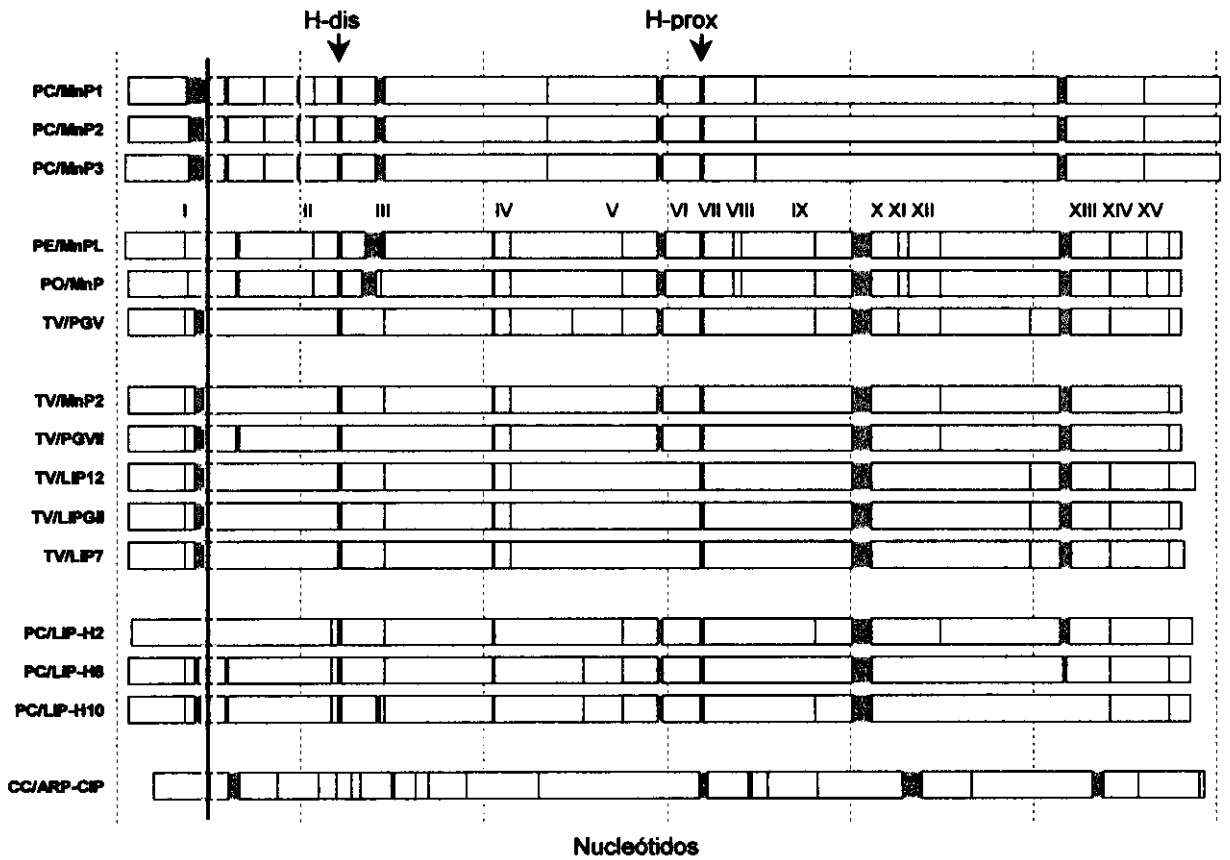
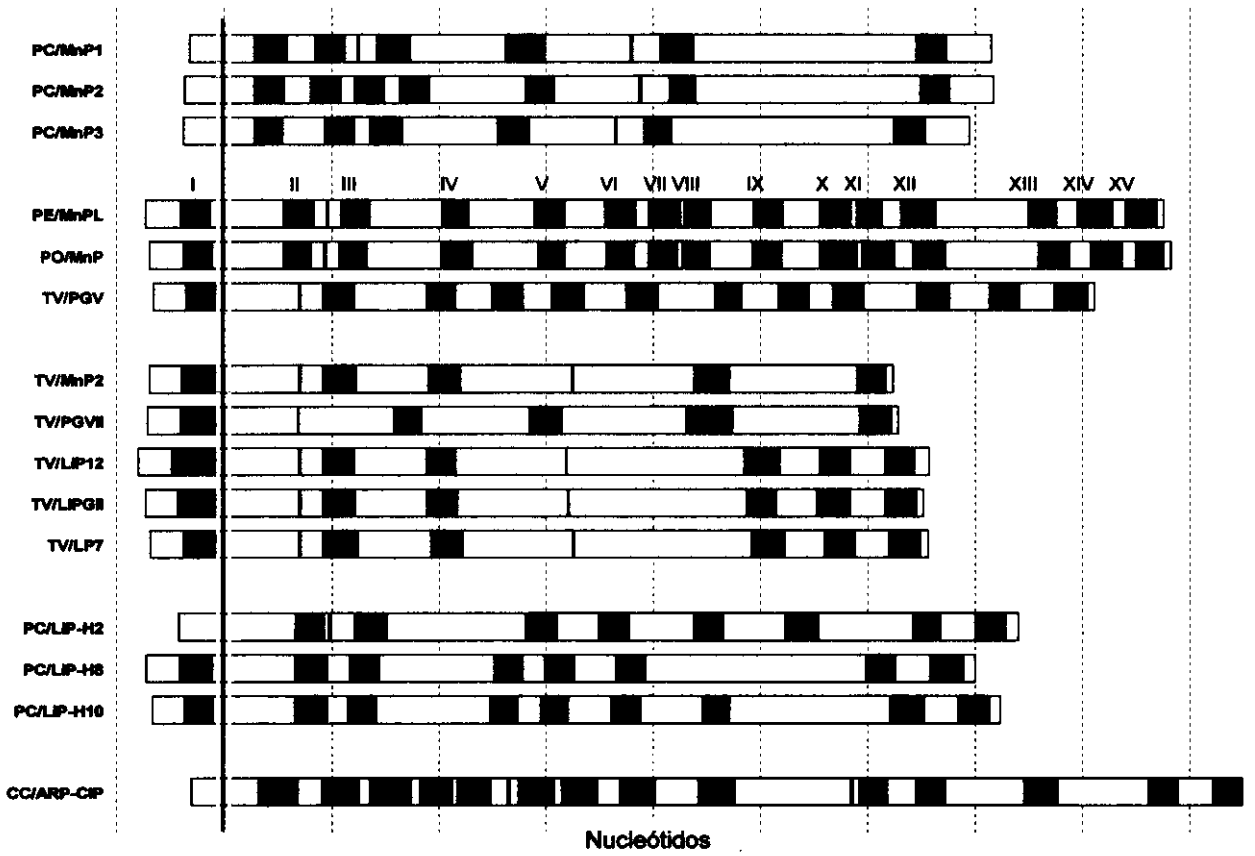
Se compararon un total de 23 peroxididasas fúngicas en base a las secuencias de aminoácidos de las proteínas maduras (referencias en la Fig. 4.3). Algunas no estaban incluidas en la anterior comparación de genes debido a que solamente están disponibles las secuencias de cDNA.

En cuanto a tamaño, la proteína MnPL de *P. eryngii* es la peroxidasa más pequeña (331 aminoácidos), seguida de las peroxididasas MnP2 de *P. ostreatus* (332 aminoácidos), LiP de *Phlebia radiata* (337 aminoácidos), la mayoría de las peroxididasas de *T. versicolor* (338-342 aminoácidos), ARP-CIP de *Coprinus* (343 aminoácidos), LiP de *P. chrysosporium* (343-344 aminoácidos), LiP12 de *T. versicolor* (346 aminoácidos), LiP de *B. adusta* (349 aminoácidos), MnP de *P. chrysosporium* (357-358 aminoácidos) y MnP de *Poria* (sinónimo: *Ceriporiopsis*) *subvermispora* (364 aminoácidos).

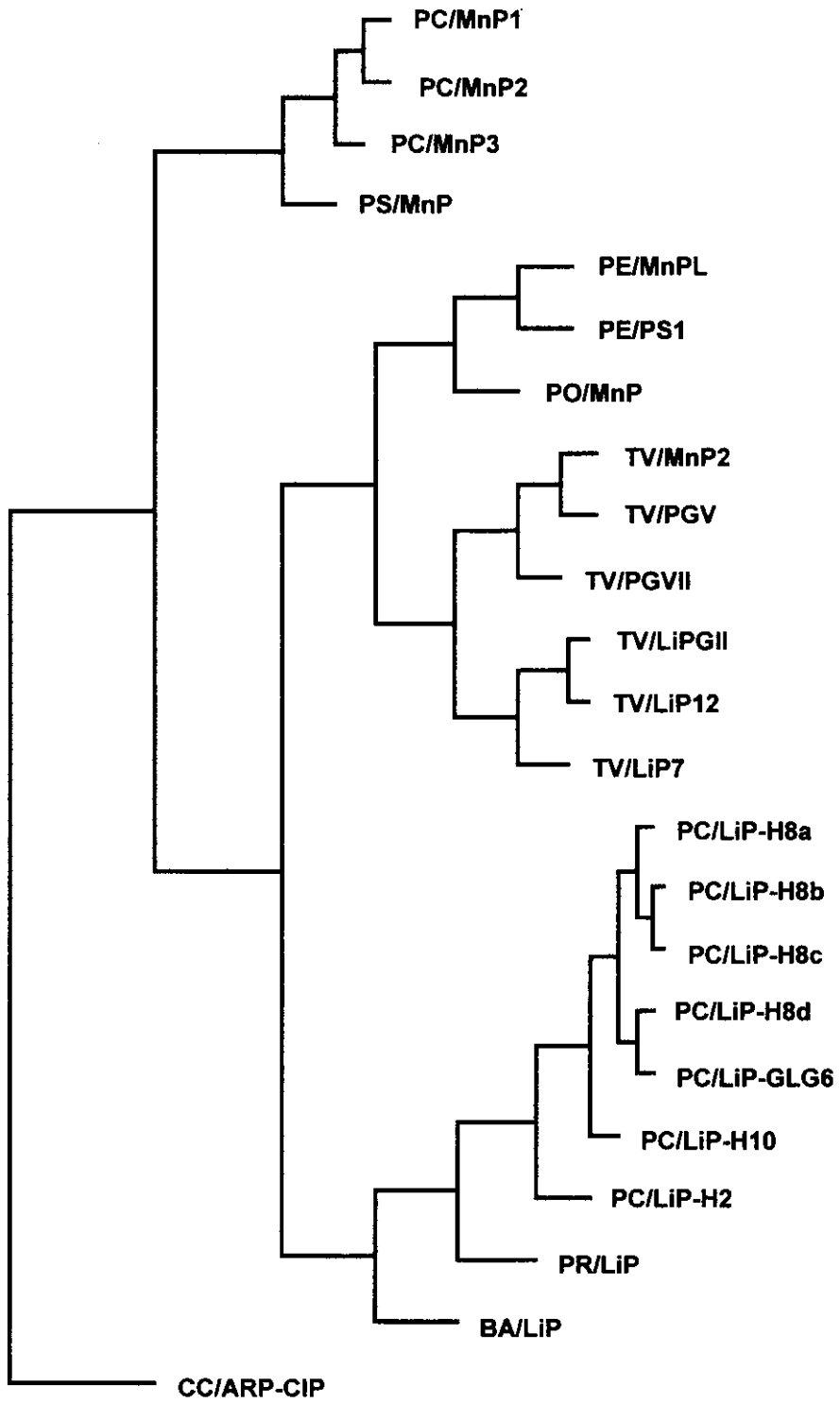
La peroxidasa MnPL de *P. eryngii* presenta la mayor identidad de secuencia (74%) con la peroxidasa PS1, producida por el mismo hongo bajo condiciones de fermentación en estado sólido (Camarero *et al.* 1998b), pero este valor es muy inferior al encontrado entre las tres isoenzimas MnP de *P. chrysosporium* (83-84% de identidad) (Tabla 4.1). Cuando se compara con las peroxididasas producidas por otros hongos, la peroxidasa MnPL muestra la identidad más alta con las peroxididasas PGV (69%), MnP2 (67%), PGVII (66%) y LiP7 (62%) de *T. versicolor* y con la MnP de *P. ostreatus* (69%). Es interesante mencionar que la identidad de la peroxidasa MnPL con las isoenzimas MnP de *P. chrysosporium* (MnP1-MnP3) es del 55%, inferior a la encontrada con la LiP del mismo hongo (60% y 58% con las isoenzimas H2 y H8 respectivamente) y con la LiP de *B. adusta* (58%).

Fig. 4.2. Comparación de los genes de 15 peroxididasas fúngicas. Se muestran las secuencias completas, incluyendo intrones y exones (A); y el alineamiento de las secuencias codificantes, marcando la posición de los intrones y “huecos” en el DNA (B). Los intrones aparecen en negro y los “huecos” en gris. La separación entre las líneas verticales corresponde a 200 nt. Abreviaturas para las diferentes especies fúngicas: CC, *Coprinus cinereus*; PC, *Phanerochaete chrysosporium*; PE, *Pleurotus eryngii*; PO, *Pleurotus ostreatus*; y TV, *Trametes versicolor*. Las referencias de los genes se incluyen en la Fig.4.3.

4. Discusión



4. *Discusión*



Durante el alineamiento múltiple de las 23 peroxidasaas fúngicas se observó que había un total de 60 aminoácidos de la peroxidasa MnPL de *P. eryngii* invariables en todas las peroxidasaas examinadas (Fig. 3.8). Es interesante mencionar que los residuos de alanina y valina de las posiciones correspondientes a la A4 y V16 de la proteína MnPL1 de *P. eryngii* están presentes en las secuencias de otras peroxidasaas, pero no se han encontrado aspartato ni isoleucina en ninguna peroxidasa fúngica en las posiciones correspondientes al D4 o la I16 de la proteína MnPL2. Durante la comparación de secuencias, también se observó que la peroxidasa MnPL de *P. eryngii* incluye los residuos V118 y N239 en posiciones ocupadas invariablemente por prolina y arginina respectivamente. El significado estructural y funcional de estos residuos, inusuales en el resto de las peroxidasaas, está todavía por determinar. El resultado final de la comparación múltiple se muestra en el dendrograma de la Fig. 4.3, basado en distancias de Kimura entre sus secuencias. El agrupamiento obtenido sugiere que la peroxidasa ARP-CIP de *Coprinus* no está relacionada con las peroxidasaas ligninolíticas, y que éstas se pueden catalogar en tres grupos principales: a) MnP de *P. chrysosporium* y *P. subvermispora*; b) peroxidasaas de *P. eryngii*, *P. ostreatus* y *T. versicolor*; y c) LiP de *P. chrysosporium*, *P. radiata* y *B. adusta*. Estos resultados concuerdan con una comparación anterior de varias de estas proteínas (Baunsgaard *et al.*, 1993). El último grupo obtenido incluye cuatro proteínas LiP-H8 agrupadas conjuntamente con el producto del gen *lip-gl6*, que probablemente corresponda a otra isoenzima H8. Este grupo se

Fig. 4.3. Comparación de las secuencias codificadas por los genes de la Fig. 4.2 y cDNA de MnP de *Poria* (sinónimo: *Ceriporiopsis*) *subvermispora*, y LiP de *Bjerkandera adusta* y *Phlebia radiata*. Abreviaturas para las diferentes especies fúngicas: BA, *B. adusta*; CC, *Coprinus cinereus*; PC, *Phanerochaete chrysosporium*; PE, *Pleurotus eryngii*; PO, *Pleurotus ostreatus*; PR, *P. radiata*; PS, *P. subvermispora*; y TV, *Trametes versicolor*. Referencias y número de acceso a "GenBank": PC/MnP1 (Godfrey *et al.*, 1990), M60672; PC/MnP2 (Mayfield *et al.*, 1994a), L29039; PC/MnP3 (Alic *et al.*, 1997), U70998; PS/MnP (Lobos *et al.*, 1998), U60413; PE/MnPL (esta tesis), AF007224; PE/PS1 (Camarero *et al.* 1998b); PO/MnP (Asada *et al.*, 1995a), U21878; TV/MnP2 (Johansson y Nyman, 1996), Z30668; TV/PGV (Jönsson *et al.*, 1994), X77154; TV/PGVII (sin publicar), Z54279; TV/LiPGII (Jönsson y Nyman, 1994), X75655; TV/LiP12 (Jönsson y Nyman, 1992), M64993; TV/LiP7 (Johansson y Nyman, 1995), Z30667; PC/LiP-H8a -gen *lg2*- (Ritch y Gold, 1992), M92644; PC/LiP-H8b -gen *lipob* (Walther *et al.*, 1988), M37701; PC/LiP-H8c (Smith *et al.*, 1988), M27401; PC/LiP-H8d -gen *lip11*- (Brown *et al.*, 1988), M24082; PC/LiP-GLG6 (Naidu *et al.*, 1990), M77508; PC/LiP-H10 -gen *lip6*- (Zhang *et al.*, 1991), M63496; PC/LiP-H2 (sin publicar), X15599; PR/LiP (Saloheimo *et al.*, 1989), 126290; BA/LiP (Kimura *et al.*, 1991), 444058; CC/ARP-CIP (Baunsgaard *et al.*, 1993), X70789.

4. Discusión

encuentra unido al grupo c, dato que revela una mayor afinidad entre las peroxididasas de *Pleurotus* y *Trametes* con la LiP que con la MnP de *P. chrysosporium*. Finalmente es interesante mencionar que, aunque las proteínas PGV y PGVII englobadas en el grupo b aún no se han aislado, *pgv* ha sido descrito como un nuevo gen con características de tipo *lip* y *mnp* (Jönsson *et al.*, 1994).

Tabla 4.1. Porcentaje de identidad y semejanza (entre paréntesis) de las peroxididasas maduras MnPL2 de *Pleurotus eryngii* y MnP1 de *Phanerochaete chrysosporium* con otras peroxididasas fúngicas. Las abreviaturas y referencias aparecen en la Fig. 4.3.

	PE/MnPL2	PC/MnP1
PC/MnP1	54.5 (72.4)	100
PC/MnP2	54.8 (70.6)	84.3 (90.8)
PC/MnP3	54.8 (71.2)	83.5 (89.6)
PS/MnP	48.9 (67.2)	71.3 (79.2)
PE/MnPL2	100	54.5 (72.4)
PE/PS1	74.4 (81.9)	57.6 (73.5)
PO/MnP	69.2 (80.7)	51.1 (69.2)
TV/MnP2	66.5 (80.4)	52.1 (71.6)
TV/PGV	69.2 (79.8)	55.7 (73.1)
TV/PGVII	66.2 (76.4)	53.0 (70.4)
TV/LiPGII	57.4 (73.6)	49.1 (68.7)
TV/LiP12	55.3 (72.1)	47.8 (68.0)
TV/LiP7	62.0 (76.6)	46.6 (68.1)
PC/LiP-H8a	57.6 (73.9)	46.0 (66.8)
PC/LiP-H8b	58.0 (73.7)	47.5 (68.2)
PC/LiP-H8c	58.6 (73.7)	48.8 (69.0)
PC/LiP-H8d	59.5 (73.1)	48.8 (69.0)
PC/LiP-GLG6	59.5 (74.0)	50.4 (68.8)
PC/LiP-H10	57.7 (72.2)	48.4 (67.7)
PC/LiP-H2	60.1 (72.8)	49.0 (66.7)
PR/LiP	55.8 (73.2)	47.6 (66.8)
BA/LiP	58.5 (73.7)	43.7 (62.8)
CC/ARP-CIP	49.2 (66.0)	42.9 (68.1)

4.3.3 **Búsqueda de secuencias relacionadas con el gen *mnpl* en otros hongos ligninolíticos**

Utilizando como sonda un fragmento de DNA correspondiente al gen que codifica estas peroxidasas se pudo llevar a cabo una búsqueda de secuencias relacionadas en otros hongos ligninolíticos. Como resultado se detectaron secuencias similares en *Heterobasidion annosum*, *Fomes fomentarius*, *Coriolopsis gallica* y *P. radiata*. La falta de hibridación con el DNA de *P. chrysosporium* confirma la diferencia existente entre las peroxidasas de este hongo y las de *P. eryngii*. Además, es probable que la hibridación con el DNA de *P. radiata* sea con un gen distinto al descrito por Saloheimo *et al.* (1989), ya que este gen es bastante parecido a los genes *lip* de *P. chrysosporium*, como se observa cuando se comparan las proteínas maduras resultantes (Fig. 4.3).

4.4 ANÁLISIS DE UN MODELO MOLECULAR

Las comparaciones de estructura génica y de secuencia proteica descritas en este trabajo pueden contribuir a establecer las relaciones evolutivas entre las peroxidasas fúngicas. Sin embargo, sus propiedades catalíticas están relacionadas con aspectos específicos de la arquitectura molecular. Los modelos de homología para la LiP de *P. chrysosporium* y *P. radiata* (Du *et al.*, 1992; Hoffrén *et al.*, 1993), así como para la MnP de *P. chrysosporium* (Johnson *et al.*, 1994) anticiparon valiosa información sobre la arquitectura de estas enzimas y la disposición espacial de algunos aminoácidos importantes antes de que fueran cristalizadas. Debido a este hecho, en este trabajo se planteó obtener una explicación a las peculiares propiedades catalíticas de la peroxidasa MnPL en base al análisis de un modelo molecular de esta proteína. Este modelo se encuentra descrito en detalle en el apartado 3.3 y **Fig. 3.11** y **3.12** y a continuación se discuten algunos aspectos relacionados con la actividad catalítica.

4.4.1 Centro activo.

El bolsillo entre las hélices B y F es de gran importancia en las peroxidasas, ya que ahí es donde se encuentra el hemo anclado por la histidina proximal, diferentes puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Las interacciones con el Mn^{2+} y un puente de hidrógeno que va desde el propionato externo a un residuo de lisina (MnPL-K176), que corresponde a la K180 en la peroxidasa MnP1 de *P. chrysosporium*, parecen implicados en el anclaje del hemo en la peroxidasa de *P. eryngii*. Los aminoácidos de los lados distal y proximal del hemo participan en la coordinación del hierro y en el ciclo catalítico (Poulos *et al.*, 1993; Banci, 1997). En el modelo de la peroxidasa MnPL de *P. eryngii* existe una red de puentes de hidrógeno en el lado distal. En dicha red estarían implicados los aminoácidos H47, N78 y E72, que deberían contribuir a la capacidad de la histidina distal para aceptar un protón del H_2O_2 durante la formación del compuesto I (**Fig. 3.12**). Por otro lado, un fuerte puente de hidrógeno entre las hélices F y G de la peroxidasa MnPL de *P. eryngii*, en el que estarían participando la S170 y el D194, aleja la histidina proximal de la superficie del hemo, lo que puede aumentar su potencial de reducción tal como sugieren Piontek *et al.* (1993). En la **Fig. 4.4** se puede ver una superposición de las cadenas laterales de los residuos del bolsillo del hemo y los residuos de unión a Mn^{2+} , así como del extremo C-terminal de la cadena principal de las peroxidasas MnPL de *P. eryngii* y LiP-H8 y MnP1 de *P. chrysosporium*. Se observan algunas diferencias en los residuos del lado proximal, incluyendo el desplazamiento del aspartato y la

rotación del anillo de la histidina. Además, la orientación del anillo bencénico de la fenilalanina proximal en la LiP-H8 de *P. chrysosporium* es diferente de la observada en las peroxidases MnPL de *P. eryngii* y MnP1 de *P. chrysosporium* (está rotado alrededor de 60°). El residuo que ocupa esta posición es importante en las peroxidasas, ya que es el responsable de la formación de un radical centrado en un aminoácido en la CcP y además puede afectar a la accesibilidad de sustratos al anillo del hemo (Banci, 1997; Kishi *et al.*, 1996).

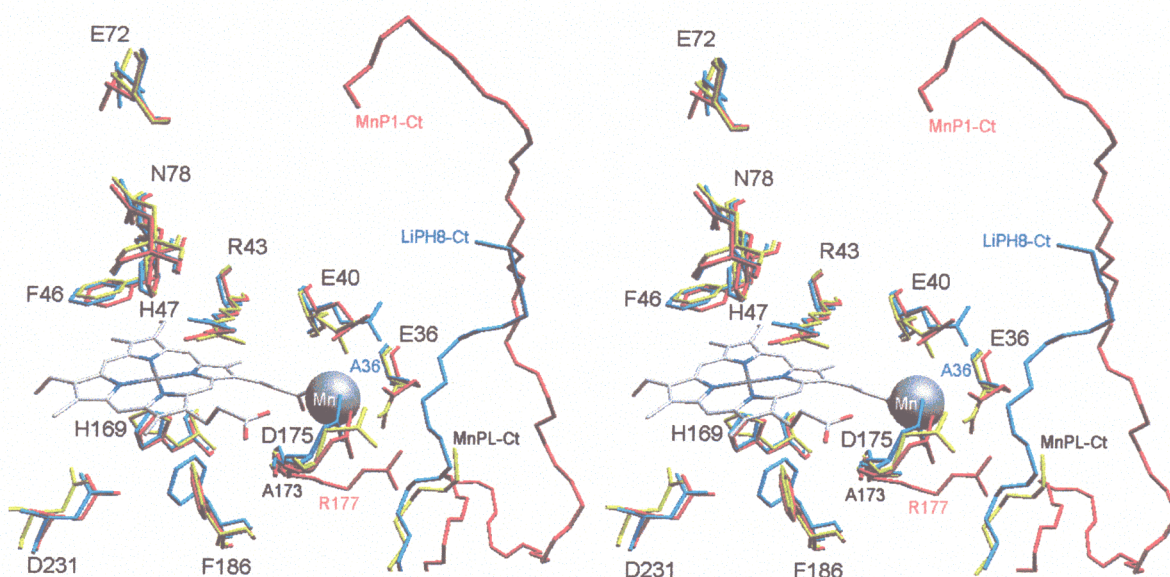


Fig. 4.4. Imagen estereoscópica de los aminoácidos de la cavidad del hemo y sitio de unión a Mn^{2+} , y cola C-terminal tras superposición de los modelos de las peroxidasas MnPL de *Pleurotus eryngii* (amarillo) y MnP (rojo) y LiP-H8 (azul) de *Phanerochaete chrysosporium*. Los residuos que se muestran son los siguientes (MnPL1/MnP1/LiP-H8): R43/R42/R43, F46/F45/F46, H47/H46/H47, E72/E74/E78 y N78/N80/N84 del lado distal del hemo; H169/H173/H176, F186/F190/F193 y D231/D242/D238 del lado proximal del hemo; y E36/E35/A36, E40/E39/E40, D175/D179/D182 y A173/R177/A180 en el sitio de unión a Mn^{2+} (el Mn^{2+} se muestra como una esfera de van der Waals).

4.4.2 Sitio de unión a Mn^{2+}

En el modelo cristalográfico de la peroxidasa MnP1 de *P. chrysosporium* (Sundaramoorthy *et al.*, 1994) se ha descrito que el Mn^{2+} está hexacoordinado

por los oxígenos carboxílicos de los residuos E35, E39, D179 y del propionato interno del hemo, y por dos oxígenos de dos moléculas de agua. Este sitio de unión a Mn^{2+} se postuló en modelos teóricos (Johnson *et al.*, 1994), y después fue confirmado por mutagénesis dirigida (Kusters-van Someren *et al.*, 1995; Sundaramoorthy *et al.*, 1997). La Fig. 4.4 muestra que los mismos residuos (MnPL E36, E40 y D175) ocupan posiciones similares en la peroxidasa MnPL de *P. eryngii*. La LiP de *P. chrysosporium* (y la peroxidasa ARP-CIP de *Coprinus*) presenta residuos diferentes en estas posiciones, y como resultado no hay unión a Mn^{2+} (Fig. 4.4). El modelo para la peroxidasa MnPL de *P. eryngii* mostró el oxígeno del residuo A174 (que aparece rotado cerca de 90° con respecto al de la A178 de la MnPI de *P. chrysosporium*) a 2.97 Å del Mn^{2+} , y en una posición espacial compatible con una coordinación octaédrica del Mn^{2+} junto con los oxígenos de los cuatro carboxilatos, que en el modelo están a 2.65-2.81 Å del Mn^{2+} (Fig. 3.12). Esto sugiere que un carbonilo de la cadena principal podría ser el quinto ligando del Mn^{2+} en la peroxidasa MnPL de *P. eryngii*, en lugar de una de las moléculas de agua mencionadas anteriormente. Por otro lado se ha sugerido que la R177 contribuye a la oxidación del Mn^{2+} por la MnP de *P. chrysosporium* al desplazar la larga cola C-terminal, alejándola del sitio de unión a este sustrato (Sundaramoorthy *et al.*, 1994) (Fig. 4.4), mientras que en la LiP la cola está cerca del hemo debido a la presencia de la A180 (Poulos *et al.*, 1993; Piontek *et al.*, 1993). Sin embargo, la oxidación del Mn^{2+} por parte de la peroxidasa MnPL de *P. eryngii* es eficiente a pesar de la presencia de un residuo pequeño en esta posición (A173), probablemente porque la cola C-terminal de esta peroxidasa es más corta (Fig. 4.4). Otra diferencia es la ausencia del puente de hidrógeno encontrado entre la R177 y el E35 de la MnP de *P. chrysosporium*. Se ha descrito que esta unión es importante para orientar el residuo de glutamato y reducir el “exceso” de carga negativa alrededor del sitio de unión a Mn^{2+} (Sundaramoorthy *et al.*, 1994).

4.4.3 Oxidación de otros sustratos

Del análisis de superficie de los modelos moleculares de la MnP de *P. chrysosporium* y la peroxidasa MnPL de *P. eryngii* se puede deducir que el acceso del Mn^{2+} es a través de un pequeño canal situado directamente sobre el propionato interno del hemo, que incluye los tres residuos ácidos implicados en su unión. Éste es distinto del acceso a través del canal principal, tal y como se sugirió inicialmente (Harris *et al.*, 1991), que implicaba una interacción en la posición C₂₀ (δ -meso) del hemo. En la Fig. 4.5 se presenta una comparación de los residuos que se encuentran en la abertura del canal principal de acceso al hemo de cuatro peroxidases fúngicas. Si observamos su

tamaño, la abertura mayor es la de la peroxidasa ARP-CIP de *Coprinus* y la más estrecha es la de la LiP de *P. chrysosporium*, siendo la de la peroxidasa MnPL de *P. eryngii* de un tamaño similar al de la MnP de *P. chrysosporium* (A79 y K215 de MnPL son únicos en las posiciones correspondientes).

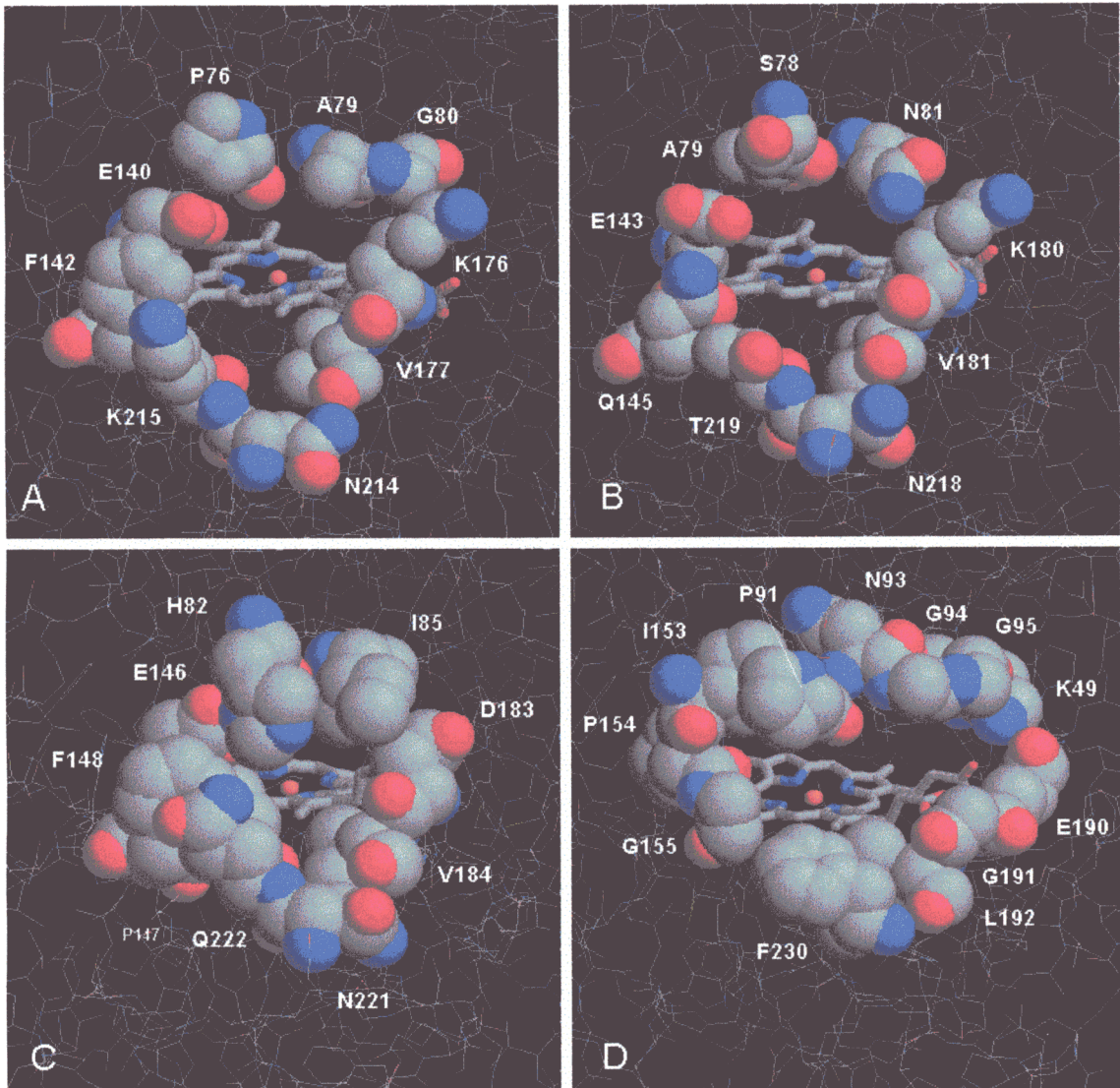


Fig. 4.5. Comparación de los aminoácidos que forman la apertura del canal de acceso al hemo en la peroxidasa MnPL de *Pleurotus eryngii* (A), MnP1 (B) y LiP-H8 (C) de *Phanerochaete chrysosporium* y ARP-CIP de *Coprinus* (D) (representación en forma de esferas de van der Waals y colores CPK).

Si tenemos en cuenta el tamaño de los sustratos que puede oxidar cada una de estas peroxidasas, parece que el tamaño del canal no es un factor determinante a la hora de explicar sus propiedades catalíticas. En la LiP de *P. chrysosporium* se ha postulado un sitio de unión al alcohol veratrílico en el canal principal de acceso al hemo que implicaría la formación de puentes de hidrógeno con los residuos H82 y Q222 (Poulos *et al.*, 1993). Un sitio de unión de compuestos aromáticos en *P. eryngii* debería presentar analogías con el sitio de unión de la HRP y poder acomodar una variedad de sustratos aromáticos (Banci *et al.*, 1993; Gajhede *et al.*, 1997; Henriksen *et al.*, 1998). Después de examinar los aminoácidos que se encuentran en el canal principal de acceso al hemo (**Fig. 4.5**), parece ser que la existencia de un entorno apolar podría ser un requerimiento para la unión de sustratos aromáticos a la peroxidasa MnPL de *P. eryngii* y peroxidasas relacionadas. Este podría incluir residuos aromáticos como la F148 en la isoenzima LiP-H8 de *P. chrysosporium* y la F142 en la peroxidasa MnPL de *P. eryngii*, que ocupan la misma posición que la F142 en la HRP (un residuo implicado en la unión de sustratos aromáticos) (Gajhede *et al.*, 1997; Veitch *et al.*, 1995). Es interesante mencionar que esta fenilalanina está ausente en la MnP de *P. chrysosporium*, que presenta dos residuos polares (Q145 y N81) ocupando las posiciones de la F142 y A79 de la peroxidasa MnPL. Este hecho probablemente impide la oxidación directa de sustratos aromáticos por la MnP de *P. chrysosporium*.

La oxidación por parte de la LiP del alcohol veratrílico y sustratos aromáticos relacionados podría producirse en contacto directo con el hemo (ruta A en la parte superior de la **Fig. 4.6**) o por transferencia electrónica de largo rango, como se ha comprobado para la oxidación del citocromo *c* por la CcP. Schoemaker *et al.* (1994) propusieron una posible ruta de transferencia electrónica en la LiP. Ésta se inicia en la H82, implicada en la unión al alcohol veratrílico, y discurre a través de P83 y N84, residuo que finalmente se encuentra unido por un puente de hidrógeno a la histidina distal (H47) (ruta B en la parte superior de la **Fig. 4.6**). Recientemente se ha observado la hidroxilación del W171 en cristales de LiP (Blodig *et al.*, 1998). Este hecho ha permitido sugerir otra transferencia electrónica de largo rango desde este residuo aromático superficial hasta el hemo, en este caso hasta la M172 (ruta C en la parte superior de la **Fig. 4.6**). El W171 se encuentra junto a un segundo potencial sitio de unión para sustratos aromáticos en la LiP (Du *et al.*, 1992) que incluye tres residuos aromáticos. Cuando se compara la región que rodea el grupo hemo en las peroxidasas de *P. chrysosporium* se puede comprobar que las dos rutas citadas no existen en la MnP, ya que la S78 y la S168 ocupan las posiciones de la H82 y el W171. Sin embargo, el W164 en el modelo molecular de la peroxidasa MnPL de *P. eryngii* ocupa la misma

4. Discusión

posición que el W171 en el modelo de la isoenzima LiP-H8 (parte inferior de la Fig. 4.6). Con estos datos se puede postular una transferencia electrónica desde este residuo de la superficie de la peroxidasa MnPL, que podría estar implicada en la oxidación de colorantes de alto peso molecular y de otros sustratos aromáticos que no pueden interaccionar directamente con el hemo. Este hecho constituye otra característica de tipo LiP de la peroxidasa MnPL de *P. eryngii*, que como sabemos también oxida el Mn^{2+} .

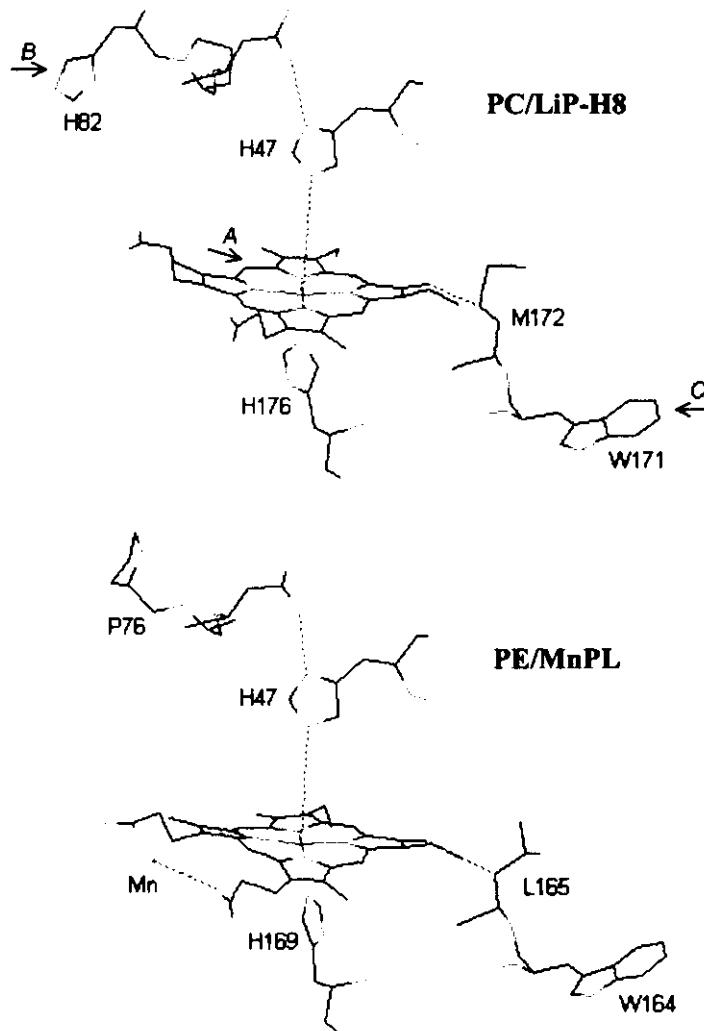


Fig. 4.6. Rutas de transferencia electrónica propuestas para la oxidación de sustratos por la LiP de *Phanerochaete chrysosporium* (A, borde del hemo; B, H82→H47; y C, W171→M172), y posición del hemo y los correspondientes aminoácidos en el modelo molecular de la peroxidasa MnPL de *Pleurotus eryngii*.

4.5 RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO

En la región 5' no codificante del gen *mnpl* se identificaron una serie de elementos potencialmente implicados en la regulación de su expresión. Varios de estos elementos habían sido ya identificados en genes de peroxidasas producidas por otros hongos ligninolíticos: genes *mnp* y *lip* de *P. chrysosporium* (Godfrey *et al.*, 1990; Mayfield *et al.*, 1994a; Alic *et al.*, 1997), genes *mnp* de *P. ostreatus* (Asada *et al.*, 1995a) y genes *mnp* y *lip* de *T. versicolor* (Johansson y Nyman, 1996). El interés suscitado por la presencia de estos posibles elementos reguladores se centró principalmente en aquellos que pudieran mediar en la respuesta observada frente a la peptona (AP2) y al Mn^{2+} (MRE), resultados ya discutidos anteriormente, y a las especies activas de oxígeno (AP1 y/o HSE).

El interés en el estudio del efecto de las especies activas de oxígeno sobre la transcripción del gen *mnpl* se debe al carácter oxidativo del proceso de degradación de lignina por los basidiomicetos de podredumbre blanca (Kirk y Farrell, 1987), que necesita la presencia de H_2O_2 y en el que se ha sugerido que participa el $OH\cdot$ (Joseleau *et al.*, 1994). Se considera que estas especies podrían ser importantes en el comienzo de la de la lignina en los materiales lignocelulósicos, cuando la acción de las enzimas se vería imposibilitada por impedimentos estéricos debido al pequeño tamaño de los poros entre las microfibrillas de celulosa (Flournoy *et al.*, 1993). Estas especies, a su vez, podrían participar en la regulación de la expresión de las peroxidasas, que una vez producidas continuarían con el proceso de degradación ya iniciado.

Ninguno de los potenciales elementos reguladores del gen *mnpl* que mediarían en la respuesta frente a las especies activas de oxígeno se ajustan al 100% a las secuencias consenso descritas en la bibliografía (Tabla 3.2). El elemento AP1 difiere en un nucleótido de la secuencia TGASTMA (Li y Jaiswal, 1992) y el elemento HSE tampoco se ajusta a la secuencia C--GAA--TTC--G propuesta por Dynan and Tjian, (1985), al igual que sucede en el resto de los genes de peroxidasas de otros hongos ligninolíticos. Sin embargo, se ha demostrado que estos genes se activan respondiendo al estrés oxidativo, como sucede con el gen *mnpl* de *P. chrysosporium* (Li *et al.*, 1995). En el gen *mnpl* de *P. eryngii* el HSE coincide tan solo en cinco de los ocho nucleótidos establecidos para la secuencia consenso. Sin embargo, si se consideran los nucleótidos que rodean esta secuencia, se comprueba que hay trece nucleótidos (TTGAAAATTCAA) que conforman una secuencia palindrómica que se asemeja bastante al tipo de secuencia que representa un HSE. Este elemento también podría responder a cambios de temperatura. Sin embargo, las verdaderas proteínas de choque térmico presentan una serie de características entre las que se encuentra la presencia de un gran número de

HSE en su promotor, como sucede en los genes *mnpl* de *P. chrysosporium*. En el gen *mnpl* de *P. eryngii* la presencia de un único posible HSE parece indicar que no se trata realmente de un elemento de choque térmico. No se ha encontrado HSE en genes *lip* de *P. chrysosporium* (Asada *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1988; Walther *et al.*, 1988) aunque si en genes *lip* de *T. versicolor* (Johansson y Nyman, 1996).

La adición de H_2O_2 al micelio de *P. eryngii* indujo la transcripción del gen *mnpl*, observándose una acumulación máxima de mRNA a los 60 minutos de incubación, cantidad equivalente al 18% de la máxima obtenida en cultivos líquidos con peptona. A partir de ese momento los niveles disminuyeron, probablemente debido a la acción de las catalasas presentes en el micelio que provocaron la práctica desaparición del H_2O_2 en 30 min. Li *et al.* (1995) y Gettemy *et al.* (1997) observaron el mismo efecto del H_2O_2 sobre la transcripción del gen *mnp* de *P. chrysosporium*. La diferencia con este trabajo se encuentra en las condiciones de cultivo previas a la inducción con H_2O_2 , ya que en *P. chrysosporium* solamente se indujo la transcripción del gen *mnp* cuando se había cultivado el micelio en un medio con nitrógeno mineral limitado.

Hasta ahora no se había estudiado el efecto del $OH\cdot$ y $O_2^{\cdot-}$ sobre la transcripción de las peroxidasas ligninolíticas. En este trabajo se demuestra por primera vez que el $OH\cdot$ actúa como inductor, y que es capaz de disparar la síntesis del mRNA de la proteína MnPL más rápidamente que el H_2O_2 . Así, si con la adición de H_2O_2 500 μM se consiguieron los mayores niveles de mRNA después de 60 min de incubación, cuando se empleó el sistema generador de $OH\cdot$ mostrado en la Fig. 2.1 tan solo fueron necesarios 15 min para llegar a niveles máximos de mRNA. Se intentó también analizar el efecto del $O_2^{\cdot-}$, pero se pudo comprobar que no era posible producir esta especie de forma aislada, ya que por dismutación producía H_2O_2 , con una concentración constante en torno a 50 μM . Por tanto, el efecto observado sobre la transcripción del gen *mnpl* pudo ser provocado tanto por el H_2O_2 como por el $O_2^{\cdot-}$ (o incluso por la menadiona). Sin embargo, si se compara la curva de mRNA con la obtenida cuando se añadió una cantidad fija de H_2O_2 al micelio, se comprueba que son similares. Esto parece indicar que el efecto observado con el sistema generador de $O_2^{\cdot-}$ es mayoritariamente debido al H_2O_2 . Esto sugiere que elevadas concentraciones de H_2O_2 (500 μM) añadidas puntualmente provocan el mismo efecto inductor sobre la transcripción del gen *mnpl* que bajas concentraciones (50 μM) mantenidas constantes en el medio extracelular.

4.6 EXPRESIÓN HETERÓLOGA

Se intentaron desarrollar dos sistemas de expresión para la peroxidasa MnPL*. La expresión heteróloga en *Escherichia coli* ya había sido utilizada para expresar la LiP y MnP de *P. chrysosporium* (Doyle y Smith, 1996; Whitwam *et al.*, 1995; Whitwam y Tien, 1996). Sin embargo, un sistema de expresión basado en el hongo ascomiceto *Emericella nidulans* (más conocido por el nombre su forma conidial, *Aspergillus nidulans*) no se había utilizado hasta ahora con peroxidasas ligninolíticas, aunque se habían utilizado *Trichoderma reesei* (Saloheimo y Niku-Paavola, 1991) y *Aspergillus oryzae* (Stewart *et al.*, 1996) con resultados parcialmente satisfactorios.

La expresión en *E. coli* presentó varios inconvenientes. Se produjeron niveles bajos de enzima inactiva que se acumuló intracelularmente en forma soluble y en cuerpos de inclusión. Doyle y Smith, (1996) y Whitwam y Tien, (1996) han descrito renaturalización de LiP y MnP a partir de cultivos de *E. coli*. Sin embargo, el proceso parece problemático y, en el caso de la LiP, requirió mantener una porción de péptido señal que parece participar en el plegamiento. Con anterioridad Smith *et al* (1990) habían expresado la HRP en *E. coli* utilizando un gen sintético. La cantidad de proteína obtenida fue muy elevada pero también se acumuló inactiva. Tras el proceso de replegado el rendimiento total de la enzima activa purificada fue tan solo del 2-3%, ya que el resto precipitó por interacciones intermoleculares. Los niveles de proteína MnPL2* obtenidos en este trabajo fueron muy inferiores a los de MnP, LiP y HRP descritos por estos autores. Debido a este hecho, y al rendimiento tan bajo del proceso de renaturalización, no se consiguió producir una peroxidasa recombinante con actividad catalítica.

La expresión de proteínas heterólogas en especies de *Aspergillus* y *Emericella* ha dado generalmente buenos resultados debido a que el DNA extraño se integra de manera estable en el genoma y, con la secuencia señal apropiada, la proteína se procesa y secreta correctamente (Kersten *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 1992). Cuando se utilizó *E. nidulans* como huésped de expresión para la proteína MnPL2, los resultados fueron muy diferentes a los obtenidos con *E. coli*. La enzima recombinante se secretó al medio extracelular y presentó actividad catalítica sobre los diferentes sustratos que oxida la enzima nativa producida por *P. eryngii* (datos no mostrados). Además no pareció estar hiperglicosilada, como se pudo ver por su movilidad relativa en SDS-PAGE. Si bien para la expresión se utilizó un promotor y un terminador transcripcional de *E. nidulans*, la secuencia señal correspondió a la original del gen *mnpl* de *P. eryngii*. Por tanto la secreción de la proteína recombinante fue dependiente del péptido señal que codifica dicha secuencia, demostrando que funciona tanto en *P. eryngii* como en *E. nidulans*. El

4. Discusión

desarrollo de este sistema, capaz de expresar la peroxidasa MnPL recombinante activa con unas propiedades catalíticas idénticas a la enzima nativa producida por *P. eryngii*, facilitará extraordinariamente los estudios posteriores de relación estructura-función. De hecho, ya se están llevando a cabo experimentos de mutagénesis dirigida sobre el gen *mnpl* con objeto de verificar experimentalmente la implicación de determinados aminoácidos sobre las propiedades catalíticas de este nuevo tipo de peroxidasa.

5. CONCLUSIONES

- 1 El hongo *Pleurotus eryngii* produce un nuevo tipo de peroxidasa que comparte propiedades catalíticas de la LiP y la MnP producidas por otros basidiomicetos y, además, es capaz de oxidar compuestos (como fenoles y colorantes) que estas dos enzimas no son capaces de oxidar directamente. En el presente trabajo se describe el nuevo ciclo catalítico de esta peroxidasa ligninolítica.
- 2 La clonación del gen que codifica esta peroxidasa reveló la presencia de dos alelos, *mnpl1* y *mnpl2*, en el micelio dicariótico de *P. eryngii*. Aunque se han aislado alelos de genes que codifican otras peroxidases ligninolíticas, en el presente trabajo se purifican y caracterizan por primera vez tanto los alelos como las proteínas correspondientes.
- 3 Los alelos del gen *mnpl* codifican proteínas que difieren en tan solo tres aminoácidos. Al analizar las diferencias en la región promotora se observó que sólo el alelo *mnpl2* contiene un potencial MRE, lo que parece sugerir que sólo este alelo estaría regulado por metales.
- 4 La búsqueda de secuencias relacionadas con el gen *mnpl* ha conducido a su detección en otros hongos ligninolíticos en los que hasta ahora no se habían detectado peroxidases ligninolíticas.
- 5 El gen *mnpl* presenta un número muy elevado de intrones, 15, solamente comparable con los descritos en genes de *Pleurotus ostreatus* (*mnp*) y *Trametes versicolor* (*pgv*).
- 6 La secuencia de aminoácidos de la peroxidasa MnPL presenta mayor identidad con la LiP de *Phanerochaete chrysosporium* que con las típicas MnP de *P. chrysosporium*. También existen identidades elevadas con otras peroxidases de *Trametes* y *Pleurotus* (incluyendo una peroxidasa producida por *P. eryngii* al crecer sobre sustratos lignocelulósicos).

5. Conclusiones

- 7 El análisis del modelo molecular construido para esta nueva peroxidasa presenta la mayor afinidad estructural con la LiP. Sin embargo, en su estructura no solo incluye los residuos potencialmente implicados en la oxidación de sustratos aromáticos (típicos de la LiP), sino que además también presenta un sitio de unión a Mn^{2+} (típico de la MnP).
- 8 La expresión de la peroxidasa MnPL está regulada a nivel de transcripción génica por peptona, Mn^{2+} y especies activas de oxígeno. Entre éstas últimas, el radical hidroxilo, que es la especie más reactiva, es el que más rápidamente induce la transcripción.
- 9 El sistema de expresión heteróloga desarrollado para la peroxidasa MnPL en *Emericella nidulans* permitirá generar proteínas mutantes por mutagénesis dirigida para poder completar los estudios de relación estructura-función de la nueva peroxidasa descrita en el presente trabajo.

6. REFERENCIAS

- Adler, E.** (1977) Lignin chemistry - Past, present and future. *Wood Sci. Technol.* 11, 169-218.
- Alic, M. y Gold, M.H.** (1985) Genetic recombination in the lignin-degrading basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 27-30.
- Alic, M., Akileswaran, L. y Gold, M.H.** (1993) Gene replacement in the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 136, 307-311.
- Alic, M., Akileswaran, L. y Gold, M.H.** (1997) Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isoenzyme 3 from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochim. Biophys. Acta* 1338, 1-7.
- Alic, M., Clark, E.K., Kornegay, J.R. y Gold, M.H.** (1990) Transformation of *Phanerochaete chrysosporium* and *Neurospora crassa* with adenine biosynthetic genes from *Schizophyllum commune*. *Curr. Genetics* 17, 305-311.
- Alic, M., Kornegay, J.R., Pribnow, D. y Gold, M.H.** (1989) Transformation by complementation of an adenine auxotroph of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 406-411.
- Alic, M., Mayfield, M.B., Akileswaran, L. y Gold, M.H.** (1991) Homologous transformation of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr. Genetics* 19, 491-494.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J. y Stark, G.R.** (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5350
- Andersen, H.D., Jensen, E.B. y Welinder, K.G.** (1992) A process for producing heme proteins. Patent Application WO 92/16634,
- Archibald, F.S.** (1992) Lignin peroxidase activity is not important in biological bleaching and delignification of unbleached Kraft pulp by *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3101-3109.
- Archibald, F.S. y Fridovich, I.** (1982) The scavenging of superoxide radical by manganous complexes: in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* 214, 452-463.
- Asada, Y., Kimura, Y., Kuwahara, M., Tsukamoto, A., Koide, K., Oka, A. y Takanami, M.** (1988) Cloning and sequencing of a ligninase gene from a lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29, 469-473.
- Asada, Y., Watanabe, A., Irie, T., Nakayama, T. y Kuwahara, M.** (1995a) Structures of genomic and complementary DNAs coding for *Pleurotus ostreatus* manganese (II) peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1251, 205-209.
- Asada, Y., Watanabe, A., Ohtsu, Y. y Kuwahara, M.** (1995b) Purification and characterization of an aryl-alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 1339-1341.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, R., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.** (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Ballance, D.J.** (1986) Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* 2, 229-236.
- Ballance, D.J.** (1991) Transformation systems for filamentous fungi and overview of fungal gene structure. In: *Molecular and industrial mycology*. Anonymous Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-29.
- Banci, L.** (1997) Structural properties of peroxidases. *J. Biotechnol.* 53, 253-263.

6. Referencias

- Banci, L., Bertini, I., Bini, T.Z., Tien, M. y Turano, P.** (1993) Binding of horseradish, lignin, and manganese peroxidases to their respective substrates. *Biochemistry* 32, 5825-5831.
- Banci, L., Bertini, I., Pierattelli, R., Tien, M. y Vila, A.J.** (1995) Factoring of the hyperfine shifts in the cyanide adduct of lignin peroxidase from *P. chrysosporium*. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 8659-8667.
- Banci, L., Bertini, I., Turano, P., Tien, M. y Kirk, T.K.** (1991) Proton NMR investigation into the basis for the relatively high redox potential of lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6956-6960.
- Bao, W.L., Fukushima, Y., Jensen, K.A., Moen, M.A. y Hammel, K.E.** (1994) Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Lett.* 354, 297-300.
- Barber, K.R., Rodríguez Marañón, M.J., Shaw, G.S. y van Huystee, R.B.** (1995) Structural influence of calcium on the heme cavity of cationic peanut peroxidase as determined by ¹H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 232, 825-833.
- Barrasa, J.M., González, A.E. y Martínez, A.T.** (1992) Ultrastructural aspects of fungal delignification of Chilean woods by *Ganoderma australe* and *Phlebia chrysocrea*: A study of natural and *in vitro* degradation. *Holzforschung* 46, 1-8.
- Baunsgaard, L., Vind, J. y Dalboge, H.** (1993) The sequence of *Coprinus cinereus* peroxidase gene *cip1*. In: *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. (Eds.: Welinder, K.G., Rasmussen, S.K., Penel, C. y Greppin, H.), University Geneva, Geneva, pp. 239-242.
- Bednarek, S.Y., Wilkins, T.A., Dombrowski, J.E. y Raikhel, N.V.** (1990) A carboxyl terminal pro-peptide is necessary for proper sorting of barley lectin to vacuoles of tobacco. *Plant Cell* 2, 1145-1155.
- Black, A.K. y Reddy, C.A.** (1991) Cloning and characterization of a lignin peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 428-435.
- Blanchette, R.A., Otjen, L., Effland, M.J. y Eslyn, W.E.** (1985) Changes in structural and chemical components of wood delignified by fungi. *Wood Sci. Technol.* 19, 35-46.
- Blodig, W., Doyle, W.A., Smith, A.T., Winterhalter, K., Choinowski, T.H. y Piontek, K.** (1998) Autocatalytic formation of hydroxy group at C β of Trp171 in lignin peroxidase. *Biochemistry* 37, 8832-8838.
- Bonnarme, P. y Jeffries, T.W.** (1990) Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 210-217.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P. y Yaguchi, M.** (1995) Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1876-1880.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown, A., Sims, P.F.G., Raeder, U. y Broda, P.** (1988) Multiple ligninase-related genes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 73, 77-85.

6. Referencias

- Call, H.P. y Mucke, I.** (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *J. Biotechnol.* 53, 163-202.
- Camarero, S., Barrasa, J.M., Pelayo, M. y Martínez, A.T.** (1998a) Evaluation of *Pleurotus* species for wheat-straw biopulping. *J. Pulp Paper Sci.* 24, 197-203.
- Camarero, S., Böckle, B., Martínez, M.J. y Martínez, A.T.** (1996) Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1070-1072.
- Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J. y Martínez, A.T.** (1998b) Description of a polyvalent peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites. *J. Biol. Chem* (in press).
- Campa, A.** (1991) Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: *Peroxidases in Chemistry and Biology*. (Eds.: Everse, J., Everse, K.E. y Grisham, M.B.), CRC Press, Boca Raton, pp. 25-50.
- Cancel, A.M., Orth, A.B. y Tien, M.** (1993) Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2909-2913.
- Candeias, L.P. y Harvey, P.J.** (1995) Lifetime and reactivity of the veratryl alcohol radical cation - Implications for lignin peroxidase catalysis. *J. Biol. Chem.* 270, 16745-16748.
- Crawford, R.L.** (1981) *Lignin Biodegradation and Transformation*. Wiley Interscience, New York.
- Dalton, D.A.** (1991) Ascorbate peroxidase. In: *Peroxidases in Chemistry and Biology*. (Eds.: Everse, J., Everse, K.E. y Grisham, M.B.), CRC Press, Boca Raton, pp. 139-153.
- Dawson, J.H.** (1988) Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science* 240, 433-439.
- Dhawale, S.S.** (1993) Is an Activator Protein-2-Like Transcription Factor Involved in Regulating Gene Expression During Nitrogen Limitation in Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2335-2338.
- Dobson, M.J., Tuite, M.F., Roberts, N.A., Kingsman, A.J., Kingsman, S.M., Perkins, R.E., Conroy, S.C., Dunbar, B. y Fothergill, L.A.** (1982) Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 10, 2625-2637.
- Doyle, W.A. y Smith, A.T.** (1996) Expression of lignin peroxidase H8 in *Escherichia coli*: Folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and haem. *Biochem. J.* 315, 15-19.
- Du, P., Collins, J.R. y Loew, G.H.** (1992) Homology modeling of a heme protein, lignin peroxidase, from the crystal structure of cytochrome *c* peroxidase. *Protein Eng.* 5, 679-691.
- Dynan, W.S. y Tjian, R.** (1985) Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* 316, 774-778.
- Edwards, S.L., Xuong, N.h., Hamlin, R.C. y Kraut, J.** (1987) Crystal structure of cytochrome *c* peroxidase compound I. *Biochemistry* 26, 1503-1511.
- Eggert, C., Temp, U. y Eriksson, K.E.L.** (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1151-1158.

- Erecinska, M., Oshino, N., Loh, P. y Brocklehurst, E.** (1973) *In vitro* studies on yeast cytochrome *c* peroxidase and its possible function in the electron transfer and energy coupling reactions. *Biochim. Biophys. Acta* 292, 1-12.
- Eriksson, K.-E., Pettersson, B., Volc, J. y Musilek, V.** (1986) Formation and partial characterization of glucose-2-oxidase, a H₂O₂ producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 257-262.
- Erman, J.E., Vitello, L.B., Miller, M.A., Shaw, A., Brown, K.A. y Kraut, J.** (1993) Histidine 52 is a critical residue for rapid formation of cytochrome *c* peroxidase compound I. *Biochemistry* 32, 9798-9806.
- Faison, B.D. y Kirk, T.K.** (1983) Relationship between lignin degradation and production of reduced oxygen species by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1140-1145.
- Farmer, V.C., Henderson, M.E.K. y Russell, J.D.** (1960) Aromatic-alcohol-oxidase activity in the growth medium of *Polystictus versicolor*. *Biochem. J.* 74, 257-262.
- Fengel, D. and Wegener, G.** (1984) *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions.* De Gruyter, Berlin.
- Fernández-Cañón, J.M. y Peñalva, M.A.** (1995) Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 246, 110-118.
- Fernández-Larrea, J. y Stahl, U.** (1996) Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* 252, 539-551.
- Finzel, B.C., Poulos, T.L. y Kraut, J.** (1984) Crystal structure of yeast cytochrome *c* peroxidase refined at 1.7-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 259, 13027-13036.
- Flournoy, D.S., Paul, J.A., Kirk, T.K. y Highley, T.L.** (1993) Changes in the size and volume of pores in sweetgum wood during simultaneous rot by *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Holzforschung* 47, 297-301.
- Freedman, R.B.** (1989) Protein disulfide isomerase: Multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* 57, 1069-1072.
- Freudenberg, K. and Neish, A.C.** (1968) *Constitution and Biosynthesis of Lignin.* Springer-Verlag, New York.
- Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T. y Poulos, T.L.** (1997) Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Structural Biology* 4, 1032-1038.
- Gaskell, J., Dieperink, E. y Cullen, D.** (1991) Genomic organization of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Nucleic Acids Res.* 19, 599-603.
- Gaskell, J., Stewart, P., Kersten, P.J., Covert, S.F., Reiser, J. y Cullen, D.** (1994) Establishment of genetic linkage by allele-specific polymerase chain reaction: Application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology* 12, 1372-1375.
- Gaspar, Th., Penel, C., Thorpe, T. and Greppin, H.** (1982) *Peroxidases 1970-1980. A Survey of their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants.* Université de Genève, Genève.
- Gavel, Y. y von Heijne, G.** (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: Implications for protein engineering. *Protein Eng.* 3, 433-442.
- Gettemy, J.M., Li, D., Alic, M. y Gold, M.H.** (1997) Truncated-gene reporter system for studying the regulation of manganese peroxidase expression. *Curr. Genetics* 31, 519-524.

6. Referencias

- Gettemy, J.M., Ma, B., Alic, M. y Gold, M.H. (1998) Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 569-574.
- Glenn, J.K., Akileswaran, L. y Gold, M.H. (1986) Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 251, 688-696.
- Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M. y Gold, M.H. (1983) An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114, 1077-1083.
- Godfrey, B.J., Mayfield, M.B., Brown, J.A. y Gold, M.H. (1990) Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 93, 119-124.
- Gold, M.H. y Alic, M. (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* 57, 605-622.
- Gold, M.H., Cheng, T.M. y Mayfield, M.B. (1982) Isolation and complementation studies of auxotrophic mutants of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 996-1000.
- Gold, M.H., Wariishi, H., Akileswaran, L., Mino, Y. y Loehr, T.M. (1987) Spectral characterization of Mn-peroxidase, an extracellular heme enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. *Colloq. INRA* 40, 113-118.
- González, R., Ramón, D. y Pérez González, J.A. (1992) Cloning, sequencing analysis and yeast expression of the *egl1* gene from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 370-378.
- Goodin, D.B. y Mcree, D.E. (1993) The Asp-His-Fe triad of cytochrome *c* peroxidase controls the reduction potential, electronic structure, and coupling of the tryptophan free radical to the heme. *Biochemistry* 32, 3313-3324.
- Grog, A., Posterl, W. y Westermeier, R. (1980) *Electrophoresis'79*. (Ed.: Radola, B.J.), Walter de Gruyter and Co., New York.
- Guillén, F. y Evans, C.S. (1994) Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2811-2817.
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1990) Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 465-469.
- Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 209, 603-611.
- Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. y Evans, C.S. (1994) Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 465-470.
- Guillén, F., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1995) Studies on quinone redox cycling in *Pleurotus eryngii*. *Abs. 6th Intern. Conf. Biotechnol. Pulp Paper Industr.*, Vienna, 11-15 June p 149
- Guillén, F., Martínez, M.J., Muñoz, C. y Martínez, A.T. (1997) Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 339, 190-199.

6. Referencias

- Gutiérrez, A.** (1995) Exopolisacáridos y Metabolitos Aromáticos de *Pleurotus*. Naturaleza y Función en la Degradación de la Lignina. Tesis, Universidad Sevilla.
- Gutiérrez, A. y Martínez, A.T.** (1996) Mecanismo de biodegradación de la lignina. *Rev. Iberoam. Micol.* 13, 18-23.
- Hammel, K.E., Jensen, K.A., Mozuch, M.D., Landucci, L.L., Tien, M. y Pease, E.A.** (1993) Ligninolytic activity of a purified lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* 268, 12274-12281.
- Hammel, K.E., Kalyanaraman, B. y Kirk, T.K.** (1986) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 261, 16948-16952.
- Hammel, K.E., Tien, M., Kalyanaraman, B. y Kirk, T.K.** (1985) Mechanism of oxidative C α -C β cleavage of a lignin model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 260, 8348-8353.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Harris, R.Z., Wariishi, H., Gold, M.H. y Ortiz de Montellano, P.R.** (1991) The catalytic site of manganese peroxidase. Regiospecific addition of sodium azide and alkylhydrazines to the heme group. *J. Biol. Chem.* 266, 8751-8758.
- Harvey, P.J. y Palmer, J.M.** (1990) Oxidation of phenolic compounds by ligninase. *J. Biotechnol.* 13, 169-179.
- Harvey, P.J., Schoemaker, H.E. y Palmer, J.M.** (1986) Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 195, 242-246.
- Hatakka, A.** (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi - Production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 125-135.
- Haylock, R. y Broda, P.** (1988) Preparation and characterization of mRNA from ligninolytic fungi. *Methods Enzymol.* 161, 221-227.
- Heinfling, A., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Bergbauer, M. y Szewzyk, U.** (1998a) Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiol. Lett.* 165, 43-50.
- Heinfling, A., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Bergbauer, M., Szewzyk, U. y Martínez, A.T.** (1998b) A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Lett.* 428, 141-146.
- Henriksen, A., Schuller, D.J., Meno, K., Welinder, K.G., Smith, A.T. y Gajhede, M.** (1998) Structural interactions between horseradish peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by X-ray crystallography. *Biochemistry* 37, 8054-8060.
- Higuchi, T.** (1985) Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Academic Press, Orlando.
- Higuchi, T.** (1990) Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24, 23-63.
- Hoffrén, A.-M., Saloheimo, M., Thomas, P., Overington, J.P., Johnson, M.S., Knowles, J.K.C. y Blundell, T.L.** (1993) Modelling of the lignin peroxidase LIII of *Phlebia radiata*: Use of a sequence template generated from a 3-D structure. *Protein Eng.* 6, 177-182.
- Holzbaumer, E. y Tien, M.** (1988) Structure and regulation of a lignin peroxidase gene from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 626-633.

6. Referencias

- Huoponen, K., Ollikka, P., Kälin, M., Walther, L., Mäntsälä, P. y Reiser, J. (1990) Characterization of lignin peroxidase-encoding genes from lignin-degrading basidiomycetes. *Gene* 89, 145-150.
- Johansson, T. y Nyman, P.O. (1995) The gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* encoding the lignin peroxidase isozyme LP7. *BBA-Gene. Struct. Express.* 1263, 71-74.
- Johansson, T. y Nyman, P.O. (1996) A cluster of genes encoding major isozymes of lignin peroxidase and manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Gene* 170, 31-38.
- Johnson, F., Loew, G.H. y Du, P. (1994) Homology models of two isozymes of manganese peroxidase: Prediction of a Mn(II) binding site. *Protein-Struct. Funct. Genet.* 20, 312-319.
- Jönsson, L., Becker, H.G. y Nyman, P.O. (1994) A novel type of peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *BBA-Protein. Struct. Mol. Enzym.* 1207, 255-259.
- Jönsson, L. y Nyman, P.O. (1992) Characterization of a lignin peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biochimie* 74, 177-182.
- Jönsson, L. y Nyman, P.O. (1994) Tandem lignin peroxidase genes of the fungus *Trametes versicolor*. *BBA-Gene. Struct. Express.* 1218, 408-412.
- Jönsson, L., Becker, H.G. y Nyman, P.O. (1994) A novel type of peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *BBA-Protein. Struct. Mol. Enzym.* 1207, 255-259.
- Joseleau, J.P., Gharibian, S., Comtat, J., Lefebvre, A. y Ruel, K. (1994) Indirect involvement of ligninolytic enzyme systems in cell wall degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 255-264.
- Kaal, E.E.J., de Jong, E. y Field, J.A. (1993) Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera* sp strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4031-4036.
- Kabsch, W. y Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen bonds and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577-2637.
- Kaneko, R., Iimori, T., Yoshikawa, H., Machida, M., Yoshioka, H. y Murakami, K. (1994) A possible role of manganese peroxidase during biobleaching by the pulp bleaching fungus SKB-1152. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1517-1518.
- Kelley, R.L. y Reddy, C.A. (1986) Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 166, 269-274.
- Kersten, P.J. y Kirk, T.K. (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169, 2195-2201.
- Kersten, P.J., Tien, M., Kalyanaraman, B. y Kirk, T.K. (1985) The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *J. Biol. Chem.* 260, 2609-2612.
- Kersten, P.J., Witek, C., van den Wymelenberg, A. y Cullen, D. (1995) *Phanerochaete chrysosporium* glyoxal oxidase is encoded by two allelic variants: Structure, genomic organization, and heterologous expression of glx1 and glx2. *J. Bacteriol.* 177, 6106-6110.
- Kimura, S. y Ikeda-Saito, M. (1988) Human myeloperoxidase and thyroid peroxidase, two enzymes with separate and distinct physiological functions, are evolutionarily related members of the same gene family. *Proteins* 3, 113-120.

6. Referencias

- Kimura, Y., Asada, Y. y Kuwahara, M.** (1990) Screening of basidiomycetes for lignin peroxidase genes using a DNA probe. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 436-442.
- Kimura, Y., Asada, Y., Oka, T. y Kuwahara, M.** (1991) Molecular Analysis of a *Bjerkandera adusta* Lignin Peroxidase Gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 510-514.
- Kirk, T.K.** (1983) Degradation and conversion of lignocelluloses. In: *The Filamentous Fungi*. Vol. 4. Fungal Technology. (Eds.: Smith, J.E., Berry, B.R. y Kristiansen, B.), Arnold, Londres, pp. 266-294.
- Kirk, T.K. y Farrell, R.L.** (1987) Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 465-505.
- Kirk, T.K., Connors, W.J., Bleam, R.D., Hackett, W.F. y Zeikus, J.G.** (1975) Preparation and microbial decomposition of synthetic [¹⁴C]lignins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2515-2519.
- Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F. y Zeikus, J.G.** (1978) Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 117, 277-285.
- Kirk, T.K., Tien, M., Kersten, P.J., Mozuch, M.D. y Kalyanaraman, B.** (1986) Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. Mechanism of its degradation of the non-phenolic arylglycerol β -aryl ether substructure of lignin. *Biochem. J.* 236, 279-287.
- Kishi, K., Kusters-van Someren, M., Mayfield, M.B., Sun, J., Loehr, T.M. y Gold, M.H.** (1996) Characterization of manganese(II) binding site mutants of manganese peroxidase. *Biochemistry* 35, 8986-8994.
- Kondo, R., Kurashiki, K. y Sakai, K.** (1994) In Vitro Bleaching of Hardwood Kraft Pulp by Extracellular Enzymes Excreted from White Rot Fungi in a Cultivation System Using a Membrane Filter. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 921-926.
- Kuan, I.C. y Tien, M.** (1993) Stimulation of Mn-peroxidase activity: A possible role for oxalate in lignin biodegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1242-1246.
- Kühn, S., Camarero, S., Valmaseda, M., Almendros, G., Martínez, M.J., González, A.E. y Martínez, A.T.** (1992) Straw Biopulping: Selective Delignification with *Pleurotus eryngii*. In: *Biotechnology in Pulp and Paper Industry*. (Eds.: Kuwahara, M. y Shimada, M.), UNI Pub.Co., Ltd., Tokyo, pp. 15-20.
- Kulmburg, P., Mathieu, M., Dowzer, C., Kelly, J. y Felenbok, B.** (1993) Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CreA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 7, 847-857.
- Kunishima, N., Fukuyama, K., Matsubara, H., Hatanaka, H., Shibano, Y. y Amachi, T.** (1994) Crystal structure of the fungal peroxidase from *Arthromyces ramosus* at 1.9 Å resolution - Structural comparisons with the lignin and cytochrome *c* peroxidases. *J. Mol. Biol.* 235, 331-344.
- Kurek, B.** (1992) Potential Applications of Fungal Peroxidases in the Biological Processing of Wood, Lignocelluloses and Related Compounds. In: *Plant Peroxidases 1980-1990, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects*. (Eds.: Penel, C., Gaspar, T. y Greppin, H.), University of Geneva, Geneva, pp. 139-186.
- Kusters-van Someren, M., Kishi, K., Lundell, T. y Gold, M.H.** (1995) The manganese binding site of manganese peroxidase: Characterization of an Asp179Asn site-directed mutant protein. *Biochemistry* 34, 10620-10627.

- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. y Gold, M.H.** (1984) Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 169, 247-250.
- Labbé, S., Prévost, J., Remondelli, P., Leone, A. y Séguin, C.** (1991) A nuclear factor binds to the metals regulatory elements of the mouse gene encoding metallothioneine-I. Nucleic Acids Res. 19, 4225-4231.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227, 680-685.
- Leisola, M. y Fiechter, A.** (1985) New trends in lignin biodegradation. Adv. Biotechnol. Processes 5, 59-89.
- Leisola, M.S.A. y García, S.** (1989) The mechanism of lignin degradation. In: Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation. (Ed.: Coughlan, M.P.), Elsevier Appl. Sci., London, pp. 89-99.
- Li, D., Alic, M. y Gold, M.H.** (1994) Nitrogen regulation of lignin peroxidase gene transcription. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3447-3449.
- Li, D., Alic, M., Brown, J.A. y Gold, M.H.** (1995) Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress, and molecular oxygen. Appl. Environ. Microbiol. 61, 341-345.
- Li, H.Y. y Poulos, T.L.** (1994) Structural variation in heme enzymes: A comparative analysis of peroxidase and P450 crystal structures. Structure. 2, 461-464.
- Li, Y. y Jaiswal, A.K.** (1992) Regulation of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene. Role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element. J. Biol. Chem. 267, 15097-15104.
- Lobos, S., Larrondo, L., Salas, L., Karahanian, E. y Vicuña, R.** (1998) Cloning and molecular analysis of a cDNA and the *Cs-mnp1* gene encoding a manganese peroxidase isoenzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Gene 206, 185-193.
- Lockington, R.A., Sealy-Lewis, H.M., Scazzocchio, C. y Davies, R.W.** (1985) Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. Gene 33, 137-149.
- Maione, T.E., Javahaerian, K., Belew, M.A., Gómez, L.E. y Farrell, R.L.** (1987) Activities of recombinant ligninase. Colloq. INRA 40, 177-1983.
- Martínez, A.T., Camarero, S., Guillén, F., Gutiérrez, A., Muñoz, C., Varela, E., Martínez, M.J., Barrasa, J.M., Ruel, K. y Pelayo, M.** (1994) Progress in biopulping of non-woody materials: Chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat-straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. FEMS Microbiol. Rev. 13, 265-274.
- Martínez, A.T., González, A.E., Martínez, M.J., Guillén, F. y Barrasa, J.M.** (1992) Biotecnología en la industria papelera: Utilización de los hongos y sus enzimas en la fabricación de papel y en el tratamiento de efluentes. Rev. Iberoam. Micol. 9, 76-80.
- Martínez, M.J., Muñoz, C., Guillén, F. y Martínez, A.T.** (1994) Studies on homoglutamic acid transformation by the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41, 500-504.
- Martínez, M.J., Ruiz-Dueñas, F.J., Guillén, F. y Martínez, A.T.** (1996) Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. Eur. J. Biochem. 237, 424-432.

6. Referencias

- Marzullo, L., Cannio, R., Giardina, P., Santini, M.T. y Sannia, G. (1995) Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *J. Biol. Chem.* 270, 3823-3827.
- Mayfield, M.B., Godfrey, B.J. y Gold, M.H. (1994a) Characterization of the *mnp2* gene encoding manganese peroxidase isozyme 2 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 142, 231-235.
- Mayfield, M.B., Kishi, K., Alic, M. y Gold, M.H. (1994b) Homologous expression of recombinant manganese peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4303-4309.
- Mester, T. y Field, J.A. (1998) Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *J. Biol. Chem.* 273, 15412-15417.
- Mester, T., Peña, M. y Field, J.A. (1996) Nutrient regulation of extracellular peroxidases in the white rot fungus, *Bjerkandera* sp strain BOS55. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 778-784.
- Moyson, E. y Verachtert, H. (1991) Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 421-424.
- Muheim, A., Waldner, R., Leisola, M.S.A. y Fiechter, A. (1990) An extracellular aryl-alcohol oxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Enzyme Microb. Technol.* 12, 204-209.
- Muheim, A., Waldner, R., Sanglard, D., Reiser, J., Schoemaker, H.E. y Leisola, M.S.A. (1991) Purification and properties of an aryl-alcohol dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Biochem.* 195, 369-375.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1997) Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2166-2174.
- Naidu, P.S., Zhang, Y.Z. y Reddy, C.A. (1990) Characterization of a new lignin peroxidase gene (*GLG6*) from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 994-1000.
- Nimz, H. (1974) Beech lignin- Proposal of a constitutional scheme. *Angew. Chem. Int. Ed.* 13, 313-321.
- Nishida, A. y Eriksson, K.-E. (1987) Formation, purification, and partial characterization of methanol oxidase, a H₂O₂-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9, 325-338.
- Paice, M.G., Reid, I.D., Bourbonnais, R., Archibald, F.S. y Jurasek, L. (1993) Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies Kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 260-265.
- Patterson, W.R. y Poulos, T.L. (1995) Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Biochemistry* 34, 4331-4341.
- Pease, E.A., Andrawis, A. y Tien, M. (1989) Manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Primary structure deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.* 264, 13531-13535.
- Peitsch, M.C. (1996) ProMod and Swis-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 274-279.
- Peláez, F., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1995) Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol. Res.* 99, 37-42.
- Pelletier, H. y Kraut, J. (1992) Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome *c* peroxidase and cytochrome *c*. *Science* 258, 1748-1755.

- Pérez, J., Martínez, J. y de la Rubia, T.** (1996) Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavido-alba*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4263-4267.
- Périé, F.H. y Gold, M.H.** (1991) Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2240-2245.
- Petersen, J.F.W., Kadziola, A. y Larsen, S.** (1994) Three-dimensional structure of a recombinant peroxidase from *Coprinus cinereus* at 2.06 Å resolution. *FEBS Lett.* 339, 291-296.
- Pick, E. y Keisari, Y.** (1980) A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 38, 161-170.
- Piontek, K., Glumoff, T. y Winterhalter, K.** (1993) Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett.* 315, 119-124.
- Poulos, T.L., Edwards, S.L., Wariishi, H. y Gold, M.H.** (1993) Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *J. Biol. Chem.* 268, 4429-4440.
- Poulos, T.L., Patterson, W.R. y Sundaramoorthy, M.** (1995) The crystal structure of ascorbate and manganese peroxidases: The role of non-haem metal in the catalytic mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 228-232.
- Pribnow, D., Mayfield, M.B., Nipper, V.J., Brown, J.A. y Gold, M.H.** (1989) Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase, from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 264, 5036-5040.
- Raeder, U. y Broda, P.** (1988) Preparation and characterization of DNA from lignin-degrading fungi. *Methods Enzymol.* 161, 211-220.
- Ramachandra, M., Crawford, D.L. y Hertel, G.** (1988) Characterization of an extracellular lignin peroxidase of lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3057-3063.
- Randall, T., Rao, T.R. y Reddy, C.A.** (1989) Use of a shuttle vector for the transformation of the white rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 720-725.
- Randall, T., Reddy, C.A. y Boominathan, K.** (1991) A novel extrachromosomally maintained transformation vector for the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 173, 776-782.
- Randall, T.A. y Reddy, C.A.** (1992) The Nature of Extra-Chromosomal Maintenance of Transforming Plasmids in the Filamentous Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr. Genetics* 21, 255-260.
- Renganathan, V. y Gold, M.H.** (1986) Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 25, 1626-1631.
- Ritch, T.G. y Gold, M.H.** (1992) Characterization of a highly expressed lignin peroxidase-encoding gene from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 118, 73-80.
- Rodríguez, J., Ferraz, A., Nogueira, R.F.P., Ferrer, I., Espósito, E. y Durán, N.** (1997) Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 62, 233-242.

6. Referencias

- Roiha, H., Miller, J.R., Woods, L.C. y Glover, D.M. (1981) Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertion in *D.melanogaster*. *Nature* 290, 749-753.
- Saloheimo, M. y Niku-Paavola, M.-L. (1991) Heterologous production of a ligninolytic enzyme: Expression of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology* 9, 987-990.
- Saloheimo, M., Barajas, V., Niku-Paavola, M.-L. y Knowles, J.K.C. (1989) A lignin peroxidase-encoding cDNA from the white-rot fungus *Phlebia radiata*: Characterization and expression in *Trichoderma reesei*. *Gene* 85, 343-351.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor laboratory Press, New York.
- Sarkanen, K.V. and Ludwig, C.H. (1971) *Lignins. Occurrence, Formation, Structure and Reactions*. Wiley-Interscience, New York.
- Sarkanen, S., Razal, R.A., Piccariello, T., Yamamoto, E. y Lewis, N.G. (1991) Lignin peroxidase: Toward a clarification of its role *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 266, 3636-3643.
- Sarkar, S., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1997) Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1339, 23-30.
- Schoemaker, H.E. (1990) On the chemistry of lignin degradation. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 109, 255-272.
- Schoemaker, H.E., Harvey, P.J., Bowen, R.M. y Palmer, J.M. (1985) On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. *FEBS Lett.* 183, 7-12.
- Schoemaker, H.E., Lundell, T.K., Floris, R., Glumoff, T., Winterhalter, K.H. y Piontek, K. (1994) Do carbohydrates play a role in lignin peroxidase cycle? Redox catalysis in the endergonic region of the driving force. *Bioorg. Med. Chem* 2, 509-519.
- Schoemaker, H.E., Tuor, U., Muheim, A., Schmidt, H.W.H. y Leisola, M.S.A. (1991) White-rot Degradation of Lignin and Xenobiotics. In: *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*. (Ed.: Betts, W.B.), Springer-Verlag, London, pp. 157-174.
- Schuller, D.J., Ban, N., van Huystee, R.B., McPherson, A. y Poulos, T.L. (1996) The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure.* 4, 311-321.
- Selvaggi, C., Salmona, M. y de Gioia, L. (1995) Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. A homology-based molecular model. *Eur. J. Biochem.* 228, 955-961.
- Shimada, M. y Higuchi, T. (1991) Microbial, Enzymatic and Biomimetic Degradation of Lignin. In: *Wood and Cellulosic Chemistry*. (Eds.: Hon, D.N.S. y Shiraishi, N.), Marcel Dekker, N.Y., pp. 557-619.
- Shiro, Y., Kurono, M. y Morishima, I. (1986) Presence of endogenous calcium ion and its functional and structural regulation in horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* 261, 9382-9390.
- Sivaraja, M., Goodin, D.B., Smith, M. y Hoffman, B.M. (1989) Identification by ENDOR of Trp191 as the free-radical site in cytochrome-c peroxidase compound ES. *Science* 245, 738
- Smith, A.T., Santama, N., Dacey, S., Edwards, M., Bray, R.C., Thorneley, R.N.F. y Burke, J.F. (1990) Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and heme. *J. Biol. Chem.* 265, 13335-13343.

- Smith, T.L., Schalch, H., Gaskel, J., Covert, S. y Cullen, D.** (1988) Nucleotide sequence of a ligninase gene from *Phanerochaete chrysosporium*. *Nucleic Acids Res.* 16, 1219-1219.
- Srinivasan, C., D'Souza, T.M., Boominathan, K. y Reddy, C.A.** (1995) Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4274-4277.
- Stewart, P., Kersten, P., Vandenwymelenberg, A., Gaskell, J. y Cullen, D.** (1992) Lignin Peroxidase Gene Family of *Phanerochaete chrysosporium* - Complex Regulation by Carbon and Nitrogen Limitation and Identification of a 2nd Dimorphic Chromosome. *J. Bacteriol.* 174, 5036-5042.
- Stewart, P., Whitwam, R.E., Kersten, P.J., Cullen, D. y Tien, M.** (1996) Efficient expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 860-864.
- Strauss, E.C., Kobori, J.A., Siu, G. y Hood, L.E.** (1986) Specific-primer-directed DNA sequencing. *Anal. Biochem.* 154, 353-360.
- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M.H. y Poulos, T.L.** (1994) The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 269, 32759-32767.
- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M.H. y Poulos, T.L.** (1997) Crystal Structures of Substrate Binding Site Mutants of Manganese Peroxidase. *J. Biol. Chem.* 272, 17574-17580.
- Sutherland, G.R.J. y Aust, S.D.** (1996) The effects of calcium on the thermal stability and activity of manganese peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 332, 128-134.
- Sutherland, G.R.J., Zapanta, L.S., Tien, M. y Aust, S.D.** (1997) Role of calcium in maintaining the heme environment of manganese peroxidase. *Biochemistry* 36, 3654-3662.
- Tien, M.** (1987) Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 15, 141-168.
- Tien, M. y Kirk, T.K.** (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221, 661-663.
- Tien, M. y Kirk, T.K.** (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2280-2284.
- Tien, M. y Tu, C.-P.D.** (1987) Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Nature* 326, 520-523.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A. y Davies, R.W.** (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26, 205-221.
- Trevelyand, W.E. y Harrison, J.S.** (1952) Studies of yeast metabolism. 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.* 50, 298-302.
- Valmaseda, M., Almendros, G. y Martínez, A.T.** (1990) Substrate-dependent degradation patterns in the decay of wheat straw and beech wood by ligninolytic fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 481-484.
- Varela, E.** (1998) Detección de genes que codifican lignina peroxidasa y aril-alcohol oxidasa (AAO) en hongos ligninolíticos. Caracterización bioquímica y molecular de la AAO de *Pleurotus*. Tesis, Universidad Autónoma de Madrid.
- Veitch, N.C., Williams, R.J.P., Bone, N.M., Burke, J.F. y Smith, A.T.** (1995) Solution characterisation by NMR spectroscopy of two horseradish peroxidase isoenzyme C

6. Referencias

- mutants with alanine replacing either Phe142 or Phe143. *Eur. J. Biochem.* 233, 650-658.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. y Linko, M.** (1994) Xylanases in Bleaching - From an Idea to the Industry. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 335-350.
- Vitello, L.B., Erman, J.E., Miller, M.A., Wang, J. y Kraut, J.** (1993) Effect of Arginine-48 replacement on the reaction between cytochrome *c* peroxidase and hydrogen peroxide. *Biochemistry* 32, 9807-9818.
- Walther, I., Kälén, M., Reiser, J., Suter, F., Fritsche, B., Saloheimo, M., Leisola, M., Teeri, T., Knowles, J.K.C. y Fiechter, A.** (1988) Molecular analysis of a *Phanerochaete chrysosporium* lignin peroxidase gene. *Gene* 70, 127-137.
- Wang, H., Qi, M. y Cutler, A.J.** (1993) A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21, 4153-4154.
- Wariishi, H. y Gold, M.H.** (1990) Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* 265, 2070-2077.
- Wariishi, H., Akileswaran, L. y Gold, M.H.** (1988) Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry* 27, 5365-5370.
- Wariishi, H., Huang, J., Dunford, H.B. y Gold, M.H.** (1991a) Reactions of lignin peroxidase compounds I and II with veratryl alcohol. Transient-state kinetic characterization. *J. Biol. Chem.* 266, 20694-20699.
- Wariishi, H., Valli, K. y Gold, M.H.** (1989a) Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 28, 6017-6023.
- Wariishi, H., Valli, K. y Gold, M.H.** (1991b) *In vitro* depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 269-275.
- Wariishi, H., Valli, K. y Gold, M.H.** (1992) Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *J. Biol. Chem.* 267, 23688-23695.
- Wariishi, H., Valli, K., Renganathan, V. y Gold, M.H.** (1989b) Thiol-mediated oxidation of nonphenolic lignin model compounds by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 264, 14185-14191.
- Welinder, K.G.** (1991) Bacterial catalase-peroxidases are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* 1080, 215-220.
- Welinder, K.G.** (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 388-393.
- Welinder, K.G. y Gajhede, M.** (1993) Structure and evolution of peroxidases. In: *Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology.* (Eds.: Greppin, H., Rasmussen, S.K., Welinder, K.G. y Penel, C.), University of Copenhagen and University of Geneva, Geneva, pp. 35-42.
- Whitwam, R. y Tien, M.** (1996) Heterologous expression and reconstitution of fungal Mn peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 439-446.
- Whitwam, R.E., Gazarian, I.G. y Tien, M.** (1995) Expression of fungal Mn peroxidase in *E. coli* and refolding yield active enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 1013-1017.
- Yeung, B.K.S., Wang, X.T., Sigman, J.A., Petillo, P.A. y Lu, Y.** (1997) Construction and characterization of a manganese-binding site in cytochrome *c* peroxidase: Towards a novel manganese peroxidase. *Chem Biol.* 4, 215-221.

6. Referencias

Zhang, Y.Z., Reddy, C.A. y Rasooly, A. (1991) Cloning of several lignin peroxidase (LIP)-encoding genes: Sequence analysis of the *LIP6* gene from the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 97, 191-198.



BIBLIOTECA