

VCH-FC
DOC-B
L 779
C.1

**COMPONENTES DEL SISTEMA LIGNINOLITICO
DEL HONGO BASIDIOMICETE *Ceriporiopsis subvermispora***

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

SERGIO ROBERTO LOBOS CAMUS

Junio, 1996

Director de Tesis: Dr. Rafael Vicuña
Profesor Patrocinante: Dra. Rosalba Lagos



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

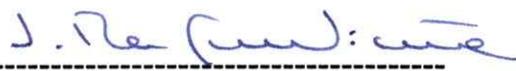
I N F O R M E D E A P R O B A C I O N
T E S I S D E D O C T O R A D O

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado Presentada por el candidato.

SERGIO ROBERTO LOBOS CAMUS

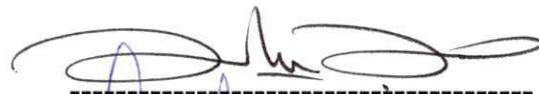
Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el Día5..... de ...*Agosto*...1996.

Director de Tesis:
Dr. Rafael Vicuña



Comisión de Evaluación de la Tesis

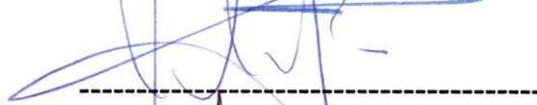
Dr. Carlos Jerez



Dra. Luz María Perez



Dr. Victor Cifuentes



Dr. Tito Ureta



*A la memoria de mi padre,
José Agustín Lobos Lobos
1917-1969*

AGRADECIMIENTOS

Al término de esta tesis quiero agradecer a las personas que directa o indirectamente contribuyeron para que este trabajo llegara a buen fin.

A Rafael Vicuña por su amistad y confianza; por su valiosa guía y visión en el desarrollo de mi tesis, influyendo de manera muy positiva en mi formación. También por haberme dado la posibilidad de innovar en su laboratorio sin restricciones de ninguna especie, en todos estos años. Su entusiasmo incansable, vitalidad, rectitud y comprensión como ser humano no pueden sino merecer mi gran admiración. Debo también manifestar mi satisfacción en el hecho de que todo este trabajo ha sido sólo el comienzo de una estrecha colaboración a futuro.

A Loreto Salas por su amistad y confianza. Su ayuda desinteresada, trabajando codo a codo junto a mí, permitió alcanzar meta tras meta, camino que muchas veces estuvo lleno de obstáculos.

A Gino Corsini, por su inestimable colaboración en todo el quehacer científico, y especialmente en el computador, dándole forma y color a esta tesis.

A mis colegas Juan Larraín, Carlos Salas y Julio Tapia, el primer trío de amigos que estuvo junto a mí en el comienzo de este estudio, por los innumerables momentos gratos en el trabajo, en el que aportaron con su calidad, entusiasmo juvenil y profesionalismo.

A Isabel Gómez, por su buena disposición en algunos momentos claves de este trabajo, especialmente en el diseño de oligonucleótidos y secuenciación.

A mis amigos Eduardo Karahanian, Gino Corsini, Luis Larrondo, Ulises Urzúa, Claudio Aguilar y Pablo de Ioannes por los gratos momentos compartidos, reflexionando y discutiendo en torno a la famosa mochila de los días Viernes.

A Cristián Real por su valiosa ayuda en el scanning de figuras de esta tesis.

A Enrique Valdebenito, por haber materializado con éxito todas mis ideas e innovaciones en el laboratorio, como el diseño de cámaras de isoelectroenfoque y electroforesis en general, las que fueron esenciales para el desarrollo de este estudio, dotando al laboratorio de la infraestructura suficiente para el trabajo en genética molecular.

A Rosario Galaz, secretaria del laboratorio de Bioquímica de la P. Universidad Católica por su buena disposición en todo momento, para la transcripción de informes, proyectos y redacción de cartas.

A Kent Kirk por haberme distinguido en dos oportunidades como parte integrante de su prestigioso grupo de investigadores en el Institute for Molecular Biology and Technology (IMBT) del Forest Products Laboratory en Madison, Wisconsin. Agradezco también a todos los integrantes del IMBT por su amable y desinteresado trato.

A Dan Cullen, por su calidad como persona y como científico, de quien adquirí una valiosa experiencia en técnicas de genética molecular de hongos. En su laboratorio disfruté de un grato y fructífero ambiente de trabajo, especialmente junto a mis amigos Philip "flaco" Stewart y Jill Gaskel, de quienes tengo recuerdos muy gratos.

A Marco Montero por haberme apoyado decididamente desde el momento en que comencé a escribir esta tesis, especialmente estableciendo la vinculación con la empresa John Jowett y Cia. Ltda.

A John A. H. Jowett, por su generoso donativo a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, a través de la cual pude solventar los gastos en aranceles del doctorado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Al Decano de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Dr. Hugo Zunino y al Dr. Hernán Lara, Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, por su interés y apoyo a mi persona, especialmente en el trámite de la donación concerniente al pago de mis deudas con la Facultad de Ciencias.

Al Sr. Carlos Castro, Director Económico y Administrativo de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, quien elaboró y concretó la idea de cómo cancelar mi deuda con la Facultad de Ciencias, lo que fue efectivo gracias a la donación de la empresa John Jowett y Cia. Ltda.

A mi colega y colaboradora Daniela Seelenfreund, por su valiosa amistad y constante apoyo durante todos los años que duró mi doctorado.

A Milena Cotoras por su inestimable ayuda, sugerencias y consejos durante todos estos años.

A Guido Mora, por su apoyo y confianza en mi persona, especialmente en las primeras y trascendentales etapas de mi doctorado.

A Verónica por su cariño, fortaleza y optimismo durante todo este tiempo, gracias al cual he podido afrontar muchos momentos difíciles, tanto científicos como también de los otros.

También dedicada a mis cuatro hijos Daniel, Milena, Felipe y Francisca, quienes me dan diariamente el cariño, la alegría y la fuerza para sobrellevar todos los problemas y enfrentar nuevos desafíos. Para mí, ellos son y serán la única razón verdadera y final de mi quehacer.

Mi estadía en el Forest Products Laboratory, en Madison, fue posible gracias al financiamiento de pasajes y viáticos de NSF/CONICYT/Fundación Andes.

Este trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 649/94.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE TABLAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xviii
ABREVIATURAS	xxii
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	16
1. Organismos	16
2. Condiciones de cultivo	16
2.1. Crecimiento del hongo en cultivos líquidos	16
2.2. Crecimiento del hongo sobre madera	17
3. Determinación de actividades enzimáticas	18
3.1. Lignina peroxidasa	18
3.2. Manganeso peroxidasa	19
3.3. Lacasa	19
4. IEF analítico de proteínas	19
5. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	20
6. Fraccionamiento de enzimas producidas en medio líquido	21
6.1. Manganeso peroxidasa	21
6.2. Lacasa	21
7. Fraccionamiento parcial de enzimas producidas en medio sólido	22

8. Aislamiento de isoenzimas de MnP y lacasa mediante IEF preparativo	23
9. Electrotransferencia de proteínas y secuenciación amino-terminal	24
10. Determinación del punto isoelectrico y masa molecular de la MnP y lacasa	25
10.1. Determinación del punto isoelectrico	25
10.2. Determinación de masas moleculares	26
11.- Tratamiento con endoglicosidasa	26
12. Purificación de acidos nucleicos	27
12.1. Aislamiento de DNA genómico de <i>C. subvermispora</i>	27
12.2. Aislamiento de RNA total de <i>C. subvermispora</i>	28
13. Análisis de ácidos nucleicos	29
13.1. DNA	29
13.2. RNA	29
14. Hibridación de tipo Southern de DNA genómico	30
15. Clonamiento de DNA genómico	31
15.1. Preparación de células competentes	31
15.2. Transformación de células competentes	33
16. Secuenciación de DNA	34
17. Transcripción reversa y amplificación por PCR	36
17.1. Síntesis del cDNA	37
17.2. Amplificación del cDNA	37

17.3. Clonamiento de productos amplificados por PCR	38
18. Construcción de una genoteca de cDNA y clonamiento en el vector λ /ZipLox	39
18.1. Síntesis de la primera hebra de cDNA	44
18.2. Síntesis de la segunda hebra de cDNA	46
18.3. Infección de <i>E. coli</i> Y1090(ZL) con el DNA empaquetado	48
18.4. Búsqueda de cDNA de MnP en la genoteca preparada en λ /ZipLox	50
18.5. Escisión del cDNA de los clones en el plasmidio pZL1 desde λ /ZipLox	51
19. Métodos misceláneos	51
RESULTADOS	53
I. Estudios Enzimológicos	53
1. Establecimiento de un ensayo general de actividad en geles analíticos de IEF	53
2. Isoenzimas producidas en cultivos líquidos de composición definida	55
3. Isoenzimas de MnP producidas en otros medios de cultivo	58
4. Purificación de las isoformas de MnP de <i>C. subvermispora</i> crecido en medio líquido salino	60

5. Masas moleculares de las MnPs de	
<i>C. subvermispora</i>	66
6. Determinación de la secuencia amino-terminal	
de algunas isoformas de MnP aisladas desde	
medio líquido salino	66
7. Producción de lacasa en diferentes medios	68
8. Purificación de las lacasas producidas en medio	
YMPG	70
9. Secuenciación amino-terminal de las tres	
isoformas de lacasa	73
II. Estudios Genéticos	77
1. Análisis mediante Southern blot de DNA genómico	
aislado de <i>C. subvermispora</i> usando una sonda	
heteróloga	78
2. Amplificación de cDNAs que codifican paraMnP de	
<i>C. subvermispora</i> mediante el protocolo RACE (Rapid	
Amplification of cDNA ends)	79
3. Amplificación de cDNAs de MnP mediante un	
protocolo PCR de dos etapas que utiliza oligo(dT)	
y un partidor específico	81
4. Construcción de una genoteca cDNA de	
<i>C. subvermispora</i> en el vector λ /ZipLox	82
5. Búsqueda de los cDNA de MnP en la genoteca	83

6. Caracterización de los cDNAs MnP13-1 y MnP2-1 de <i>C. subvermispora</i>	87
DISCUSION	92
PROYECCIONES	109
BIBLIOGRAFIA	111

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapas y secuencias de la región de múltiple clonamiento de los vectores Bluescript KS II y PCR II	32
Figura 2. Esquema simplificado del procedimiento para construir una genoteca cDNA en el vector λ/ZIPLOX	41
Figura 3. Mapa del vector λ/ZIPLOX y plasmidio pZL1	43
Figura 4. Esquema del proceso de subclonamiento automático de λ/ZIPLOX en <i>E. coli</i> DH10B(ZIP)	45
Figura 5. Análisis por IEF de enzimas ligninolíticas producidas por <i>C. subvermispora</i> en cultivos de composición definida	54
Figura 6. Perfil isoenzimático de MnP y lacasa de <i>C. subvermispora</i> cultivado en medio salino con diferentes concentraciones de Mn^{+2}	57
Figura 7. IEF analítico en el rango de pH 3-6 de sobrenadantes de cultivo de <i>C. subvermispora</i> realizado en YMPG	59
Figura 8. Cromatografía en Q-Sepharose del sobrenadante de un cultivo de <i>C. subvermispora</i>	61

Figura 9. Análisis por IEF de MnP y lacasa en fracciones obtenidas mediante cromatografía Q-Sepharose de un sobrenadante de cultivo de <i>C. subvermispora</i>	62
Figura 10. IEF analítico de isoformas de MnP y lacasa de <i>C. subvermispora</i> despues de cromatografía en Q-Sepharose	63
Figura 11A. IEF analítico de las MnPs de cultivo líquido de <i>C. subvermispora</i> aisladas por IEF preparativo	64
Figura 11B. SDS-PAGE al 12% de las MnPs de cultivo líquido de <i>C. subvermispora</i> aisladas por IEF preparativo	65
Figura 12. Alineamiento de secuencias N-terminales de MnPs	67
Figura 13. IEF de lacasas secretadas por <i>C. subvermispora</i> en cultivos líquidos: salino, YMPG y salvado de trigo	71
Figura 14. Espectro de absorción de una fracción combinada de cuatro isoformas de lacasa secretadas por <i>C. subvermispora</i> en medio YMPG	74
Figura 15. SDS-PAGE al 12% de una de las isoformas de lacasa de <i>C. subvermispora</i> (pI 3,6) antes y después de tratamiento con una mezcla de endoglicosidasa F y N-endoglicosidasa F	75

- Figura 16. Alineamiento de secuencias N-terminales de lacasas de hongos basidiomicetes** 76
- Figura 17. Alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas en la región 5' de los cDNAs MnP13-1 y MnP2-1 de *C. subvermispora*** 85
- Figura 18. Estrategia de subclonamiento y secuenciación de los clones cDNA MnP13-1 y MnP2-1 de *C. subvermispora*** 86
- Figura 19. Secuencia nucleotídica completa del clon cDNA MnP13-1 y secuencia aminoacídica deducida** 88
- Figura 20. Comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas de los cDNAs MnP13-1 y MnP2-1 de *C. subvermispora* con los de MnPs de *P. chrysosporium*** 91
- Figura 21. Comparación de la secuencia aminoacídica de MnP13-1 de *C. subvermispora* con otras peroxidases en las regiones cercanas a la His proximal, His distal y sitio de unión aromático** 105

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de lacasa extracelular por <i>C. subvermispora</i> en diferentes medios	69
Tabla 2. Purificación de lacasas desde cultivos de <i>C. subvermispora</i> en medio YMPG	72
Tabla 3. Composición aminoacídica de MnP13-1	108

RESUMEN

El estudio de la biodegradación de la lignina tiene importancia tanto por la trascendencia del nuevo conocimiento básico que se puede obtener, como por las aplicaciones biotecnológicas que pueden derivar de él. Uno de los aspectos que más llama la atención en el campo de la ligninólisis es que en la naturaleza los hongos parecen disponer de sistemas degradativos que difieren en la identidad de sus componentes, lo que sumado a la carencia de mutantes que afecten específicamente a la ligninólisis, ha dificultado el establecimiento de un esquema preciso y universal del proceso. Con el fin de ampliar el conocimiento acerca de uno de los sistemas degradativos de lignina, en esta tesis se profundizó en la caracterización enzimológica y se inició el estudio genético de los componentes del sistema ligninolítico del hongo basidiomicete *Ceriporiopsis subvermispota*, un hongo que se distingue por su alta eficiencia ligninolítica y su especificidad en degradar selectivamente la lignina por sobre los demás componentes de la madera, siendo el mejor entre cientos de especies de hongos examinados para biopulpaje.

C. subvermispota produce dos familias de enzimas ligninolíticas cuando crece ya sea en cultivos líquidos o sobre madera, las que corresponden a las enzimas manganeso-peroxidasa (MnP) y lacasa. La búsqueda sistemática de actividad lignina peroxidasa tanto en medios de composición definida como sobre madera, dio resultados negativos. En medios de cultivo que contenían 11 ppm de Mn^{+2} , fueron resueltas siete isoformas de MnP y cuatro de lacasa mediante isoelectroenfoque, con valores de pI en el rango de 4,10- 4,60 y 3,45- 3,65, respectivamente. En cultivos con 25 y 40 ppm de Mn^{+2} , se produjeron principalmente las MnPs con mayores valores de pI. El perfil de isoenzimas de MnP, detectable mediante IEF a partir del

octavo día, no se alteró a través de todo el período de crecimiento del hongo en medio líquido. Por el contrario, el perfil isoenzimático experimentó notorios cambios con la edad de los cultivos sobre madera. La masa molecular de las distintas enzimas de MnP secretadas por el hongo en medio líquido fue de 52,5 kDa, mientras que la masa de las isoenzimas extraídas desde madera fue incrementando entre 52,5 kDa y 62,5 kDa a medida que aumentaba la edad del cultivo. Se determinó las secuencias amino-terminales de siete isoenzimas de MnP. La secuencia de consenso de las MnPs de cultivos líquidos fue claramente distinta a la correspondiente a los cultivos sólidos, aunque ambas muestran homología a las MnPs de otros hongos de pudrición blanca.

Con respecto a la lacasa, sus niveles en medio líquido aumentaron dos veces en presencia de p-anisidina y fueron severamente afectados cuando Mn^{+2} o Cu^{+2} fueron omitidos de los cultivos. En medio rico, la actividad lacasa fue 10 veces superior a la de medio líquido salino, y ésta no fue afectada por la presencia de p-anisidina o Mn^{+2} . En estos cultivos, se detectaron cuatro isoenzimas de lacasa con pIs en el rango de 3,63 a 3,46, similares a las detectadas tempranamente en medio sólido, más una quinta isoforma de alto pI (4,82). El espectro de absorción de una fracción combinada de cuatro isoformas de lacasa aisladas desde medio rico mostró un máximo a 600 nm, lo cual es típico de lacasas con un átomo de Cu de tipo I. La masa molecular de la isoenzima de pI 3,60 fue de 79 kDa, determinada mediante SDS-PAGE. Después de tratamiento con endoglicosidasa F, la masa molecular de esta isoforma disminuyó a 63 kDa, sugiriendo un alto grado de glicosilación. Los pIs de las lacasas parecen variar levemente con la composición del medio y el tiempo de cultivo. Los pIs de las lacasas secretadas en medio salvado de trigo e YMPG son mayores a los pIs de las isoformas de medio líquido salino. Las secuencias amino-

terminales de tres isoformas aisladas no mostraron grandes diferencias entre ellas y revelaron una clara homología con lacasas de otros microorganismos.

Los intentos por clonar algún gen para MnP usando una sonda heteróloga de MnP de *P. chrysosporium* fueron infructuosos. Así también, las estrategias para amplificar algún mRNA de MnP mediante transcripción reversa y PCR utilizando oligonucleótidos degenerados derivados de la secuencia aminoacídica amino-terminal dieron resultados negativos.

Se construyó una genoteca de cDNA con el RNA total extraído de un cultivo de *C. subvermispora* crecido en medio líquido salino durante 10 días. De cuatro clones cDNA de MnP aislados, dos se encontraron truncados en su extremo amino-terminal, mientras que los clones denominados MnP13-1 y MnP2-1 correspondieron al cDNA de todo el largo de los genes. Una primera caracterización de éstos mostró que corresponden a dos genes o alelos diferentes, presentando una homología cercana al 85% a nivel aminoacídico y de 83% a nivel nucleotídico, solamente en la región amino-terminal. La secuencia aminoacídica amino-terminal deducida de MnP2-1 resultó idéntica a la determinada experimentalmente para las enzimas secretadas en medio sólido, en cambio MnP13-1 presentó algunas diferencias. Este resultado demuestra la presencia de mensajeros de MnP de medio sólido en cultivos líquidos, a pesar de que en estos últimos no fueron detectadas isoenzimas típicas de los cultivos sobre madera.

El clon MnP13-1, que fue completamente secuenciado, posee 1.285 nucleótidos excluyendo la cola de poli-(A). La región codificadora tiene un contenido de G + C de 63,1%, lo que hizo especialmente difícil su secuenciación. La proteína madura deducida de MnP13-1 contiene 364 aminoácidos, precedidos por un péptido líder de 24 residuos. La masa molecular deducida para la proteína madura es

de 38.126 daltons, es decir, el 73% de la masa molecular experimentalmente determinada. Esta diferencia puede deberse a glicosilaciones, encontrándose seis sitios para N-glicosilación que siguen la regla N-Xaa-T/S. Además, el 16% del total de aminoácidos es susceptible de una potencial O-glicosilación. Consistente con el mecanismo de otras peroxidases, en esta secuencia de MnP, tanto las histidinas proximal como distal, y la arginina distal al grupo hemo se encuentran conservadas. Así también, las regiones adyacentes a estos residuos muestran gran homología con otras peroxidases. Tal como en las MnPs aisladas de *P. chrysosporium*, los sitios de unión del ión manganeso, E³⁵ y E³⁹, están perfectamente conservados. Un motivo de cuatro aminoácidos, L/V/I-P-Xaa-P, designado como el sitio de unión aromático, comparte alta homología con el informado para otras peroxidases, aunque se muestra menos hidrofílico. Este resultado sugiere una capacidad de MnP13-1 de unir y oxidar sustratos aromáticos en ausencia del ión manganeso, lo que concuerda con recientes resultados de nuestro grupo. Por último, la composición aminoacídica de MnP13-1 de *C. subvermispora* muestra un alto contenido D + E relativo a K + R, lo que es consistente con un pI ácido, tal como ha sido determinado experimentalmente para las MnP secretadas por el hongo cultivado sobre madera.

ABSTRACT

Studies on lignin biodegradation are relevant not only for the basic knowledge that can be obtained, but also for the potential biotechnological applications which may derive from it. One of the most intriguing aspects in this area is that the white rot fungi, which are responsible for biodegradation of lignin, possess degradative systems that differ in the identity of their components. On the other hand, the lack of mutants affecting ligninolysis makes it difficult to establish an exact and universal scheme of the process. The aim of this thesis was to gain insight into the ligninolytic system of one particular fungus called *Ceriporiopsis subvermispora*. This microorganism is a white rot basidiomycete that degrades lignin both efficiently and selectively when growing on wood.

C. subvermispora produces two families of ligninolytic enzymes, namely manganese-dependent peroxidases (MnPs) and laccases. In medium containing 11 ppm of Mn(II), up to seven isoenzymes of MnP and four isoenzymes of laccase were resolved by isoelectrofocusing (IEF), with pI values in the range of 4.10-4.60 and 3.45 and 3.65, respectively. Occasionally, a fifth laccase isoform of pI 4.70 was also detected. In cultures with 25 and 40 ppm. of Mn(II), mainly the MnPs with higher pI values are produced. The isoenzyme pattern of MnP, detected from day eighth, was not altered throughout the growth period of the fungus. In contrast, the isoenzyme profile changed upon ageing of cultures on wood chips of *Pinus radiata*. The molecular masses of MnP isoenzymes from liquid cultures was 52,5 kDa, whereas the molecular masses of MnPs extracted from wood varied from 52, 5 kDa in early cultures to 62,5 kDa in late cultures. The amino-terminal sequences of seven MnP isoenzymes was determined. The consensus sequences of MnPs from liquid and

solid cultures were clearly distinct, although both showed homology to MnPs from related white-rot fungi.

Regarding laccase, the activity levels increased 2-fold in the presence of p-anisidine and were severely affected when either Mn(II) or Cu(II) ions were omitted from the media. In rich medium, laccase activity was 10-fold higher than in salt medium, and it was not affected by the external addition of p-anisidine or Mn(II). Four isoenzymes were detected in these cultures, with pIs between 3.76 and 3.60. In a wheat bran medium, four isoenzymes were detected with pIs in the range of 3.63-3.46. A fifth isoenzyme of high pI (4.82), was also identified. The absorption spectrum of a pool containing the four isoenzymes from rich medium showed a maximum at 600 nm, typical of laccase possessing a type I copper atom. The molecular mass of the isoenzyme with pI 3.60 is 79 kDa, as determined by SDS-PAGE. Upon treatment with endoglycosidase F, the molecular mass of this isoform decreased to 63 kDa, indicating a high degree of glycosilation. The amino-terminal sequences (24 residues) of three isoenzymes isolated from rich medium were determined. Two of them are identical, whereas the third one differs from these in three amino acid residues. The consensus sequence reveals clear homology with laccases from other microorganisms.

Attempts to clone a gene coding for MnP using a heterologous probe from *P. chrysosporium* MnP were unsuccessful. Approaches to amplify a mRNA of MnP by RT/PCR using degenerate oligonucleotides derived from the amino-terminal sequences also failed.

A cDNA library was constructed using total RNA isolated from a day 10 culture of *C. suvermispora* in salt medium. Two of the four different cDNA clones isolated were truncated in the N-terminal, whereas two clones named MnP13-1 and

MnP2-1 corresponded to full length products. A preliminary characterization of these two clones showed differences indicating two separated genes or alleles, which display nucleotide and amino acid homology in the N-terminal region of 83% and 85%, respectively. The N-terminal amino acid sequence deduced for both MnP13-1 and MnP2-1 clones resulted identical to the experimentally-determined sequence of the isoenzymes secreted by the fungus in solid cultures. These results demonstrate the presence in liquid cultures of mRNA corresponding to MnPs typical of cultures on wood chips.

The complete sequence of MnP13-1 comprises 1,285 nucleotides, excluding the poly(A) tail. The coding region has a 63.1% G + C content. The deduced mature MnP protein contains 364 amino acids, which are preceded by a 24 amino acid leader sequence. The molecular mass of the mature MnP13-1 enzyme deduced from the cDNA is 38,126, which is 27% lower than the experimentally determined molecular mass. This difference can be assigned to glycosylation. There are six potential sites for N-glycosylation with the general sequence N-Xaa-T/S. Moreover, 16% of the total amino acids correspond to T/S, which constitute potential sites for O-glycosylation. Consistent with the peroxidase mechanism of MnP, the proximal histidine, distal histidine, and the distal arginine are all conserved, while regions flanking these residues display homology with other peroxidases. Like in MnPs isolated from *P. chrysosporium*, the manganese binding sites E³⁵ and E³⁸ are conserved. A four amino acid motif, L/V/I-P-Xaa-P, defined as an aromatic binding site, shares high homology with other peroxidases, although it is less hydrophilic. This suggests that MnP13-1 from this fungus is able to bind and oxidize aromatic compounds in the absence of Mn(II), which is in agreement with recent observations in our laboratory. Finally, the amino acid composition of MnP13-1 of *C.*

subvermispora exhibits a high content of D + E relative to K + R, which is consistent with the acidic pI experimentally determined for the MnPs secreted by the fungus in solid cultures.

ABREVIATURAS

Aa	: aminoácido
ABTS	: 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)
CAPS	: ácido-(3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico)
Cs	: <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>
DEPC	: dietilpirocarbonato
DNA	: ácido desoxiribonucleico
FPLC	: cromatografía líquida de alta resolución de proteínas
HRP	: peroxidasa de rábano
H₂O_{dd}	: agua destilada y desionizada
IEF	: isoelectroenfoque
kDa	: kilodalton
Kpb	: miles de pares de bases
Le	: <i>Lentinus edodes</i>
LiP	: lignina peroxidasa
MnP	: manganeso peroxidasa:
NaOAc	: acetato de sodio
PAGE	: electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	: pares de bases
Pc	: <i>Phanerochaete chrysosporium</i>
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa
PEG	: polietilenglicol
pI	: punto isoeléctrico
ppm	: partes por millón

PVDF	: difluoruro de polivinilo
RACE	: amplificación rápida de los terminales cDNA
RNA	: ácido ribonucleico
RNasa	: ribonucleasa
rpm	: revoluciones por minuto
RT	: transcripción reversa
SDS	: dodecil sulfato de sodio
TAA	: ácido trans-aconítico
TEMED	: N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina
Tris	: tris-(hidroximetil)- aminometano
X-gal	: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosido
YMPG	: medio de cultivo que contiene extracto de levadura, maltosa, peptona y glucosa.

INTRODUCCION

La biomasa de las plantas está formada principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa, macromoléculas que por tal motivo constituyen los principales depósitos del carbono fijado fotosintéticamente. La lignina es el polímero renovable más abundante de la naturaleza, llegando a representar hasta el 30% en peso de la madera seca. La mayor parte de la lignina se encuentra íntimamente asociada a las hemicelulosas dentro de las paredes celulares, formando ambas una matriz que rodea las microfibrillas de celulosa. La más alta concentración de lignina se encuentra en la lamela media, estructura que hace las veces de pegamento entre las células contiguas. Esta disposición de la lignina confiere rigidez a las plantas y retarda la despolimerización microbiana de la celulosa, por lo que su degradación se convierte en una etapa limitante del ciclo global del carbono. Al mismo tiempo, dicha disposición constituye un obstáculo para la utilización eficiente de la celulosa en un amplio rango de procesos industriales (Eriksson y cols., 1990).

La lignina es un polímero fenilpropanoide sintetizado directamente en la pared de la célula vegetal a partir de precursores fenólicos. Los principales precursores son los alcoholes coniferílico, sinapílico y p-cumarílico. Las peroxidasas generan radicales libres a partir de estos compuestos, los cuales luego de reaccionar entre sí espontáneamente y al azar dan origen a una macromolécula amorfa, muy heterogénea, ópticamente inactiva y de estructura altamente ramificada. En ella se pueden distinguir a lo menos 12 tipos de enlaces distintos del tipo aril-aril, aril-eter y aril-alquil que conectan los núcleos aromáticos (Sarkanen y Ludwig, 1971). Estos enlaces no son susceptibles de hidrólisis

enzimática, de modo que la despolimerización de la lignina ocurre a través de mecanismos oxidativos no específicos que tienen lugar en el medio extracelular de los microorganismos degradadores (Kirk y Farrell, 1987).

En la naturaleza los principales microorganismos ligninolíticos pertenecen al grupo de los hongos basidiomicetes. Dentro de éstos, aquellos denominados de pudrición blanca son los únicos organismos capaces de degradar rápida y extensamente la lignina a CO_2 y H_2O , proceso durante el cual simultáneamente metabolizan los polisacáridos de la madera (Kirk y Farrell, 1987). En la última década se han aclarado varios aspectos relacionados con la bioquímica de la ligninólisis llevada a cabo por hongos, lo que ha permitido ir conformando un modelo del proceso.

Los primeros trabajos desarrollados con *Phanerochaete chrysosporium*, el hongo ligninolítico mejor estudiado, indicaron que la degradación de lignina es un proceso oxidativo y no específico. A la vez, éste es dependiente de la presencia de un sustrato co-metabolizable tal como la glucosa, ya que la lignina no es sustrato para el crecimiento del hongo. El trabajo realizado con sustratos diméricos como modelo de lignina permitió aislar las enzimas que componen el sistema ligninolítico de *P. chrysosporium*. Estas son una lignina peroxidasa (LiP) (Tien y Kirk, 1983; Tien y Kirk, 1984; Glenn y cols., 1983; Gold y cols., 1984) y una peroxidasa dependiente de manganeso o manganeso peroxidasa (MnP) (Paszczynski y cols., 1985; Glenn y Gold, 1985), ambas presentes en el medio extracelular. En otros hongos de pudrición blanca se han descrito además otras actividades que presumiblemente participan en la degradación de la lignina. Una de ellas, que no está presente en el hongo antes mencionado, es una fenol oxidasa conocida como lacasa (Milteins y cols., 1989; Haars y cols., 1980; Kay y cols.,

1986; Bourbonnais y cols., 1991). Un componente adicional del sistema consiste en una glioxal oxidasa, que sería la enzima encargada de generar el H_2O_2 extracelular necesario para la acción de las peroxidasas (Kersten y Kirk, 1987; Kersten, 1990).

La LiP nativa de *P. chrysosporium* es una hemoglicoproteína de masa molecular 42.000, dependiente de H_2O_2 , que es secretada sólo en la fase de metabolismo secundario del hongo inducido por la limitación en nitrógeno o carbono, y menos eficientemente por azufre (Tien y Kirk, 1983; Glenn y cols., 1983). La enzima contiene un grupo hemo con un átomo de Fe (III) de alto spin, como es característico de otras peroxidasas (Kuila y cols., 1985). Esta enzima tiene la particularidad de atacar anillos no fenólicos sustrayendo un electrón de la nube pi, generando radicales catiónicos que se reordenan de diversas formas produciendo la ruptura de enlaces intermonoméricos (Kirk y Farrel, 1987). Se ha propuesto que el alcohol veratrílico, un metabolito secundario secretado por *P. chrysosporium*, tendría un rol importante en la actividad de LiP, ya sea induciéndola (Faison y cols., 1986), protegiéndola de las concentraciones altas de H_2O_2 (Tonnon y Odier, 1988), o actuando como mediador de la actividad enzimática (Harvey y cols., 1986; Popp y cols., 1990; Harvey y Palmer, 1990). La regulación de la actividad de LiP ocurriría a nivel transcripcional (Tien y Tu, 1987).

La actividad LiP en *P. chrysosporium* se presenta en la forma de una serie de isoenzimas con pIs en el rango de 3,2 a 4,0. Estas pueden ser resueltas mediante una combinación de cromatografía de intercambio aniónico, filtración en gel, FPLC e isoelectroenfoque. Las isoenzimas difieren entre sí en sus masas moleculares, contenidos en azúcares, características espectrales, afinidad por

diferentes sustratos incluyendo H_2O_2 y en sus secuencias aminoacídicas N-terminales (Kirk y cols., 1986; Kirk, 1988; Farrel y cols., 1989; Glumoff y cols., 1990).

El clonamiento y secuenciación de los cDNA de LiP (Tien y Tu, 1987; de Boer y cols., 1987) ha reforzado el conocimiento previo que se tenía de esta enzima. Tres secuencias cDNA de LiP de *P. chrysosporium* cepa BKM 1767 muestran entre sí una homología que excede el 71%. Las secuencias indican polipéptidos maduros de 344, 344 y 345 aminoácidos, con masas moleculares de 37.000 daltons y homología aminoacídica del 68%. A su vez, los genes estructurales son precedidos por secuencias señales líderes para la secreción, de 27 y 28 aminoácidos. Se ha demostrado la presencia de los residuos de histidina distal y proximal responsables de quelar el grupo hemo, lo que es característico de las peroxidasas. Las isoenzimas de LiP de *P. chrysosporium* son codificadas por una familia de genes muy relacionados entre sí (Zhang y cols., 1986; Brown y cols., 1988). En la cepa BKM-1767 se han identificado seis genes, además de variantes alélicas (Stewart y cols., 1992). Los genes LiPB, GLG5 y O282 son muy semejantes con respecto a secuencia nucleotídica, preferencia codogénica y localización de los intrones. Las secuencias aminoacídicas deducidas exceden un 80% de identidad en cualquiera combinación. Por el contrario, los genes CLG4 (deBoer y cols., 1987) y V4 (Schalch y cols., 1989) son distintos entre sí y a los anteriores. Cinco genes LiP (LiPA, LiPB, GLG5, O282 y V4) han sido localizados en un sólo cromosoma dimórfico, estando tres de ellos (LiPA, LiPB y GLG5) en un fragmento de 30 kB (Gaskell y cols., 1991). La medición de los transcritos de estos genes en distintas condiciones indica que su regulación es compleja, ya que no responden todos del mismo modo a los cambios en el medio

(Stewart y cols., 1992). Transcritos de LipA, LipB y O282 muestran niveles similares en cultivos limitados en nitrógeno o carbono, mientras que los de CLG4 son los más abundantes en estas condiciones (Stewart y cols., 1992). Se encontró también que sólo CLG4 es expresado en carencia de carbono y que tanto CLG4 como CLG5 son expresados frente a una carencia de nitrógeno (Holzbaur y cols., 1988). Más recientemente se ha publicado la secuencia de dos clones genómicos de LiP de *Trametes versicolor* (Black y cols., 1991; Jönsson y Nyman, 1992) y un clon cDNA de LiP de *Phlebia radiata* (Saloheimo y cols., 1989).

Además de *P. chrysosporium*, unas 16 especies de hongos ligninolíticos y otros no relacionados producen LiP (Orth y cols., 1993) e incluso se ha demostrado su presencia en hongos de pudrición parda (Dey y cols., 1991). Muchos estudios recientes han acentuado la participación de LiP en la degradación de lignina. El rol protagónico asignado a la LiP en la ligninólisis obedece a diversas evidencias, tales como la capacidad de la LiP purificada de despolimerizar lignina sintética *in vitro* (Hammel y Moen, 1991; Pérez y Jeffries, 1990; Boominathan y cols., 1990), la disminución en la capacidad de mineralizar lignina de cepas de *P. chrysosporium* mutantes de LiP (Boominathan y cols., 1990) y la directa correlación entre la capacidad del hongo de mineralizar lignina y la aparición de esta actividad en los medios de cultivo (Perez y Jeffries, 1990). A la vez, estudios inmunocitoquímicos de madera degradada por *P. chrysosporium* y *T. versicolor* han mostrado que LiP está asociada con la hifa del hongo en zonas no degradadas de la madera (Srebotnik y cols., 1988; Evans y cols., 1991), lo que podría implicar que la actividad responsable de iniciar la degradación de lignina *in vivo* sería otra enzima o algún ión metálico como Mn^{+3} complejado (Gold y cols., 1991; Tien y Myers, 1990). Por otra parte, hay varios

hongos que exhiben una importante actividad ligninolítica en los cuales no se ha detectado LiP (Perié y Gold, 1991; Maltseva y cols., 1991; Galliano y cols., 1991; Rüttimann y cols., 1992). En dos de ellos, *Phlebia brevispora* y *Ceriporiopsis subvermispora*, se han detectado sin embargo secuencias tipo LiP mediante Southern usando una sonda heteróloga de *P. chrysosporium* (Rüttimann y cols., 1992). De estos antecedentes se deduce que es necesaria evidencia adicional para determinar el rol preciso de la LiP en la ligninólisis.

Otro componente fundamental del sistema ligninolítico es una peroxidasa diferente a la lignina peroxidasa, descubierta por el grupo de M. Gold (Glenn y Gold, 1984) y más tarde por el grupo de R. Crawford (Paszczyński y cols., 1985), en el medio extracelular de cultivos de *P. chrysosporium*. Esta enzima fue purificada y caracterizada como una peroxidasa dependiente de Mn, por lo que recibe el nombre de manganeso peroxidasa (MnP). Al igual que la LiP, la MnP requiere de H_2O_2 , contiene un grupo protohémico IX con ión hierro de alto spin, y es una glicoproteína (Kirk, 1988). La enzima nativa posee una masa molecular de 46.000 y oxida el Mn^{+2} a Mn^{+3} , el cual difunde desde el sitio activo de la enzima y oxida a sustratos fenólicos generando radicales fenoxi. La actividad MnP es estimulada por la presencia de ácidos carboxílicos como lactato, malonato, tartrato y oxalato, los cuales quelan y estabilizan al Mn^{+3} (Gold y cols., 1991). Se ha observado que la mayoría de los hongos basidiomicetes de pudrición blanca secretan oxalato al medio, tanto en cultivos líquidos sintéticos como también en fase sólida, por lo que se presume que este ácido carboxílico tendría una importancia fisiológica en la degradación de lignina (Dutton y cols., 1993). Tal es el caso de *P. chrysosporium*, el que produce oxalato en paralelo con MnP durante

el metabolismo secundario, aumentando así la actividad enzimática y el recambio de esta enzima (Kuan y Tien, 1993).

La MnP tiene esencialmente el mismo ciclo catalítico que la LiP y la peroxidasa de rábano (HRP), involucrando tres estados de oxidación: estado en reposo (Fe^{+3}), compuesto I ($\text{Fe}^{+4}=\text{O}$ + catión radical porfirínico p) y compuesto II ($\text{Fe}^{+4}=\text{O}$) (Gold y cols., 1987). Al igual que las otras peroxidases, la MnP puede ser reducida al estado de Fe^{+2} y convertida al compuesto III ($\text{Fe}^{+3} \text{O}_2^-$). El ciclo catalítico comprende la oxidación de la enzima en dos equivalentes a compuesto I mediante H_2O_2 . Luego ocurren dos reducciones secuenciales mediante Mn^{+2} , primero para dar compuesto II y luego la enzima en reposo. El compuesto I puede también ser reducido a compuesto II mediante fenoles, pero el compuesto II no puede ser reducido por fenoles para dar la enzima en reposo. Por lo tanto, la enzima requiere de Mn^{+2} para completar su ciclo catalítico (Gold y cols., 1987). Cuatro isoformas de MnP han sido detectadas en el fluido extracelular de cultivos limitados en nitrógeno de *P. chrysosporium*, poseyendo todas ellas secuencias aminoacídicas amino-terminales diferentes, indicando la existencia de una familia multigénica (Farrel y cols., 1989; Pease y Tien, 1992).

También se ha encontrado MnP en otros hongos ligninolíticos, como *Phlebia radiata* (Karhunen y cols., 1990; Vares y cols., 1995), *Lentinula edodes* (Forrester y cols., 1990) y *Trametes versicolor* (Johanson y cols., 1993a y 1993b), y en todos ellos se da el fenómeno de la multiplicidad de isoformas. Experimentos de tipo Northern han demostrado que el ión Mn^{+2} regula la expresión de la MnP a nivel transcripcional en cultivos limitados en nitrógeno (Brown y cols., 1991). En ausencia de este ión metálico no hay actividad ni expresión de MnP (Bonnarne y Jeffries, 1990; Gold y cols., 1991). También se ha demostrado que la

concentración de Mn^{+2} y la edad del cultivo afectan en forma diferente a las distintas isoformas de MnP (Pease y Tien, 1992).

Recientemente se ha determinado la estructura cristalina de la MnP isoenzima 1 de *P. chrysosporium* (Sundaramoorthy y cols., 1994). En términos generales, su estructura es similar a la de LiP, teniendo dos iones calcio estructurales, una histidina proximal (His¹⁷³) formando un enlace de hidrógeno con un residuo Asp²⁴², la His⁴⁶ distal y Arg⁴² formando el bolsillo de unión para el H_2O_2 , los que son responsables de la catálisis ácido-base en la formación del compuesto I. Adicionalmente, la MnP posee un sitio extra para unión a un catión, presumiblemente Mn^{+2} y que incluye Asp¹⁷⁹, Glu³⁵ y Glu³⁹, más un propionato hémico y dos moléculas de H_2O . Un puente disulfuro adicional presente en la MnP, generado entre las Cys³⁴¹-Cys³⁴⁸ cerca del carboxilo terminal de la cadena polipeptídica, sería responsable de separar la cola del carboxilo terminal desde el cuerpo de la enzima formando probablemente el sitio de unión para el Mn.

En 1989 dos grupos clonaron simultáneamente los primeros cDNAs para la MnP de *P. chrysosporium* (Pease y cols., 1989; Pribnow y cols., 1989), correspondientes a la isoenzima 1 de la cepa OCG101 y H4 de la cepa BKM-1767. Recientemente se caracterizó el cDNA de MnP que codifica para la isoenzima H3 de *P. chrysosporium* BKM-F-1767 (Orth y cols., 1994). Las isoenzimas H3 y H4 son sintetizadas con secuencias líderes o péptidos señales de 25 y 24 aminoácidos respectivamente, los cuales son posteriormente procesados para producir una proteína madura con una masa molecular deducida de la secuencia nucleotídica de 39.050 daltons. Esto es menor que los 45.000 a 46.000 daltons, determinados mediante SDS-PAGE, debido a una modificación postranscripcional por glicosilación de la proteína (Farrel y cols., 1989). Al

comparar las secuencias aminoacídicas de las MnP con las de LiP, se revela un alto grado de homología cercano al sitio activo. Además de las histidinas distal y proximal, una arginina cercana a la histidina distal es muy conservada en MnP, LiP y en otras peroxidases. Usando los cDNA como sondas en hibridaciones Northern, también se ha demostrado que la MnP es regulada a nivel transcripcional mediante iones Mn y por estrés térmico (Brown y cols., 1993).

Los clones genómicos para la isoenzima 1 (Godfrey y cols., 1990) e isoenzima 2 (Mayfield y cols., 1994) de *P. chrysosporium* cepa BKM-1767 han sido caracterizados. Las regiones de codificación de los genes *mnp2* y *mnp1* tienen 81% de identidad a nivel nucleotídico y 85% de identidad a nivel aminoacídico. El gen *mnp2* posee siete intrones con tamaños que oscilan entre 50 y 55 pb, todos los cuales alinean perfectamente con los intrones del gen *mnp1*. Un intrón adicional fue encontrado en *mnp2*, el cual divide el tercer exón de la *mnp1* justo en el codón para la histidina distal. La región promotora de *mnp2* contiene una probable caja TATAA, un elemento de estrés térmico (HSE), un elemento de respuesta a metales, cajas CCAAT y un sitio de unión para el factor de transcripción SP-1. Todas estas regiones se encuentran también en *mnp1*.

Aunque en principio se pensó que la MnP no tendría un rol protagónico en la degradación de lignina por no ser capaz de oxidar compuestos no fenólicos, actualmente se tiene antecedentes que sugieren lo contrario. Entre éstos destaca el hecho de que esta enzima es capaz de oxidar y romper enlaces en compuestos modelos de lignina del tipo fenildiarilpropanos y arilglicerol β -aril éteres fenólicos (Wariishi y cols., 1989; Tuor y cols., 1992), e incluso es capaz de despolimerizar lignina *in vitro* (Wariishi y cols., 1991). También resulta interesante el hecho que al crecer *P. chrysosporium* sobre pulpa de madera, su

sustrato natural, la principal actividad que se detecta es la MnP y no la LiP (Datta y cols., 1991), produciéndose gran acumulación de Mn en las zonas de degradación de la madera (Blanchette, 1984). Se puede mencionar también que *T. versicolor* produce LiP, MnP y lacasa en cultivos líquidos (Johansson y Nyman, 1993), pero sólo se detecta MnP y lacasa durante el blanqueamiento, desmetilación y deslignificación de pulpa (Paice y cols., 1993), como también en la fermentación en estado sólido (Valmaseda y cols., 1991). En otros hongos ligninolíticos productores de MnP, tales como *C. subvermispora* (Lobos y cols., 1994), *Pleurotus ostreatus* (Valmaseda y cols., 1991), *P. eryngii* (Martinez y cols., 1994) y *L. edodes* (Forrester y cols., 1990), la actividad LiP no ha sido detectada en cultivos líquidos ni durante la degradación en estado sólido de sustratos ligninocelulósicos. Por lo tanto, resulta de gran interés estudiar la MnP expresada durante la deslignificación de sustratos naturales por hongos de pudrición blanca.

Las enzimas LiP y MnP requieren como se ha dicho de H_2O_2 extracelular. La enzima productora de este compuesto ya ha sido identificada en *P. chrysosporium* (Kersten y Kirk, 1987). Se trata de la llamada glioxal oxidasa, la que oxida a diferentes sustratos de dos átomos de carbono en presencia de O_2 generando H_2O_2 . La glioxal oxidasa es activada al ser acoplada a las reacciones catalizadas por LiP (Kersten, 1990). También ha sido sugerida la posibilidad de que la propia MnP sea responsable de generar H_2O_2 , ya sea oxidando NADH o NADPH, como también otras moléculas pequeñas (Pasazcynsky y cols., 1985; Kuan y Tien, 1993a; Kuan y Tien, 1993b).

Muchos hongos de pudrición blanca, pero no *P. chrysosporium*, producen una actividad extracelular llamada lacasa. Esta enzima es una fenol oxidasa que

contiene cobre y que cataliza la oxidación de los fenoles a radicales fenoxi por extracción de un electrón, transfiriendo eventualmente cuatro electrones al O₂ (Reinhamer, 1984). La lacasa se encuentra en plantas superiores y en hongos. En estos últimos, se encuentra ampliamente distribuída entre los ascomicetes, deuteromicetes y basidiomicetes (Bollag y Leonowicz, 1984). Múltiples isoformas de la enzima, todas ellas con pls ácidos, han sido encontradas en cultivos de *Trametes (Coriolus) versicolor* (Morohoshi, 1991), *Panus tigrinis* (Maltseva y cols., 1991), en el basidiomicete *PM1* (Coll y cols., 1993) y *Rigidoporus lignosus* (Geiger y cols., 1986), entre otros. En contraste, *Phlebia radiata* produce una sola enzima con un pI de 3,5 (Niku-Paavola y cols., 1988).

Las lacasas también son glicoproteínas y han sido detectadas tanto extra como intracelularmente (Rigling y Van Alfen, 1993). Poseen masas moleculares entre 55.000 y 65.000 daltons y contienen 1 a 4 átomos de cobre por molécula (Galliano y cols., 1991; Maltseva y cols., 1991; Vares y cols., 1992) que son responsables de la actividad enzimática (Tollin y cols., 1993, Finazzi y Rossi, 1992). El ión cobre puede presentarse en tres estados, tipo I, II o III, dependiendo de la naturaleza de los ligandos y su geometría alrededor del metal. El llamado cobre azul, de tipo I, presenta una intensa absorción alrededor de los 600 nm y es coordinado por dos residuos histidinas, una metionina y una cisteína, conformando una geometría tetrahédrica (Reinhammer, 1984). El cobre tipo II presenta una baja absorción en el rango UV-visible y el cobre tipo III consiste en un par de iones cobre con spin acoplado magnéticamente anti-hierro. Hay enzimas que solamente contienen cobre tipo I, otras que solo contienen tipo II, pero todas las estudiadas contienen cobre del tipo III (Finazzi y Rossi, 1992). El tipo de cobre que contienen influye en el poder oxidativo de la enzima. Es así

como las enzimas que contienen un átomo de cobre tipo II pueden reducir O_2 a H_2O_2 , mientras que aquellas que contienen cobre tipo I, tipo II y dos átomos de cobre del tipo III, como por ejemplo la ascorbato oxidasa, son capaces de reducir el O_2 a H_2O (Finazzi y Rossi, 1992). El cobre tiene una participación directa en los procesos de óxido-reducción y hace posible que la enzima sea capaz de extraer un electrón desde grupos hidroxilos fenólicos y grupos aminos de un amplio rango de sustratos fenólicos y aminas aromáticas, generando intermediarios quinoidales (Ericksson y cols., 1990), transfiriéndose eventualmente los electrones al O_2 para formar H_2O_2 o H_2O . Esta reacción generadora de radicales, demostrada con compuestos modelo de lignina, puede conducir a reordenamientos que provocan la ruptura de enlaces alquil-aril, la oxidación de alcoholes bencílicos y la ruptura de cadenas laterales y de anillos aromáticos (Kawai y cols., 1988; Kawai y cols., 1988). Recientes estudios han mostrado que en presencia de mediadores apropiados, la lacasa también es capaz de oxidar sustratos no fenólicos (Kawai y cols., 1989; Bourbonnais y Paice, 1990; Muheín y cols., 1992) como también Mn^{+2} (Archibald y Roy, 1992).

Algunos genes de lacasa de hongos han sido clonados y secuenciados (Saloheimo y cols., 1991; Williamson, 1994; Coll y cols., 1993; Perry y cols., 1993; Kojima y cols., 1990; Imura y cols., 1992). Se puede destacar que en la mayoría de las secuencias de lacasa se encuentra la sucesión His-X-His, la cual según muchos autores sería la responsable de la coordinación del cobre en sus tres tipos de estados (Coll y cols., 1993b; Finazzi y Rossi, 1992; Kosman, 1984; Williamson, 1994; Reinhammer, 1984). Estos aminoácidos son altamente conservados en la mayoría de las lacasas y oxidasas que contienen cobre, como

son la citocromo c-oxidasa, superóxido dismutasa y urato oxidasa (Williamson, 1994).

La función que desempeña la lacasa durante la degradación de la lignina aún no ha sido dilucidada con certeza. Algunos estudios sugieren que contribuiría a la despolimerización del sustrato (Galliano y cols., 1991; Bourbonnais y Paice, 1992; Morohoshi y cols., 1989), mientras que otros indican que esta enzima podría catalizar el acoplamiento de intermediarios de la degradación que son tóxicos para el hongo (Bollag y cols., 1988). Estudios inmunocitoquímicos han mostrado que la lacasa se localiza en las paredes celulares de la madera degradada, lo que sugiere que efectivamente participaría en la ligninólisis (Nicole y cols., 1992).

Toda la información anteriormente comentada acerca de aspectos específicos del sistema ligninolítico de diversos hongos, no permite aún formarse un cuadro armónico del proceso tal como ocurre en ambientes naturales. En primer lugar, resulta sorprendente la variabilidad en la producción de enzimas ligninolíticas entre las distintas especies. Algunos secretan LiP, MnP y lacasa (Johansson y cols., 1990; Jonsson y cols., 1987). Otros las dos primeras (Kirk y Farrel, 1987), o bien MnP y lacasa (Perié y Gold, 1991; Maltseva y cols., 1991; Galliano y cols., 1991; Rüttimann y cols., 1992), mientras que hay hongos que secretan enzimas supuestamente ligninolíticas que son diferentes a las tres mencionadas (Vares y cols., 1992; de Jong y cols., 1992). Dada la exclusividad exhibida por la LiP en atacar residuos no fenólicos, resulta de gran importancia estudiar en profundidad el sistema ligninolítico de algún hongo que no produzca esta enzima, para posteriormente compararlo con el de *P. chrysosporium*. Para tal

efecto hemos seleccionado como hongo modelo a *Ceriporiopsis subvermispora*, por ser muy selectivo en su ataque a la lignina cuando crece sobre madera (Otjen y Blanchette, 1987). Por tener esta cualidad, esta especie ha sido ampliamente utilizada por otros grupos en experimentos de biopulpaje con resultados preliminares muy auspiciosos (Akhtar y cols., 1992 a y b; Akhtar, 1994).

Los hallazgos ya efectuados por nuestro grupo, demuestran que *C. subvermispora* tiene un sistema compuesto por MnP y lacasa. Por lo tanto, parece del máximo interés en cuanto fenómeno biológico, confirmar la existencia de un sistema alternativo al de *P. chrysosporium*. Ello constituiría una muestra más de la versatilidad de la naturaleza, en este caso orientada a asegurar el reciclaje del carbono presente en un polímero orgánico de alta persistencia que solo es aventajado por la celulosa en cuanto a su abundancia en la biósfera. En esta tesis se propuso continuar los estudios enzimológicos e iniciar al mismo tiempo estudios a nivel genético molecular. En concreto, dentro de los primeros se desea analizar el patrón isoenzimático de MnP y lacasa en medios de diversas composiciones. También se planteó el desarrollo de los procedimientos metodológicos necesarios para lograr la purificación de cada una de las isoenzimas de MnP y lacasa producidas por el hongo creciendo en cultivos líquidos o sobre madera. Posteriormente, y como una primera aproximación a definir el número de genes de MnP y lacasa, se propone determinar las secuencias aminoacídicas amino-terminales respectivas. Por último se plantea el clonamiento de al menos un gen de MnP de *C. subvermispora*, el que se espera entregue una importante información acerca de la estructura primaria de la proteína precursora y de la enzima madura, masa molecular deducida y secuencias conservadas en regiones cercanas al sitio activo, las cuales son esenciales para la actividad

peroxidásica. La disponibilidad de un cDNA de todo el largo del gen de la MnP de *C. subvermispora* permitirá a corto plazo el estudio de la regulación a nivel transcripcional de esta actividad.

MATERIALES Y METODOS

1.- Organismos.

C. subvermispora FP-105752 fue facilitado por el Center for Forest Mycology Research, CFMR (Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin, USA). Esta cepa, utilizada durante todo el estudio, fue mantenida en tubos extendidos con medio agar papa-dextrosa (Difco) (39 g/l).

También se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α F' adquirida de Gibco BRL Life Technologies. Células de *E. coli* One Shottm competentes fueron obtenidas de Invitrogen y utilizadas para el clonamiento de algunos productos PCR. La cepa de *E. coli* JM109 conteniendo el plasmidio pDK101, también utilizada para clonamiento de productos PCR, fue donada gentilmente por el laboratorio del Dr. Daniel Cullen (Forest Products Laboratory, Madison, WI, USA).

2.- Condiciones de cultivo.

2.1.- Crecimiento del hongo en cultivos líquidos. Debido a que el hongo *C. subvermispora* no produce conidiosporas fue necesario utilizar siempre micelio molido para los inóculos. Trozos de aproximadamente 1 cm³ de agar papa-dextrosa que contenían micelio crecido del hongo fueron utilizados para inocular cultivos estacionarios del hongo para su propagación. Estos cultivos de propagación se hicieron en matraces de 500 ml con 14,5 ml de medio líquido que contenían 2,0 g/l de KH₂PO₄, 0,5 g/l de MgSO₄, 0,1 g/l de CaCl₂, 10 g/l de glucosa, 10 mM de ácido trans-aconítico (TAA) pH 4,5 como amortiguador, 1,0 mg/ml de tiamina-HCl, 1 ml/l de solución de trazas y 1 o 10 mM de tartrato de amonio según se indique. La solución de trazas contenía (por litro): 15 g de ácido

nitrilotriacético, 1,0 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,8 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,07 g de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de H_3BO_3 , 0,1 g de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 30 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g de NaCl , 0,82 g de CaCl_2 y 5 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Después de crecido el hongo por 7 días a 30°C y sin agitación, el micelio fue molido y homogeneizado en matraces de 125 ml que contenían 15 g de bolitas de vidrio de 5 mm de diámetro, estériles. Alícuotas de cultivo sirvieron para cuantificar el peso seco de micelio presente en el inóculo. A partir de este micelio se inocularon medios de cultivo líquido salino o medio YMPG (que contiene por litro, 10 g de glucosa, 10 g de extracto de malta, 2 g de peptona, 2 g de extracto de levadura, 1 g de asparagina, 2 g de KH_2PO_4 , 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1 mg de tiamina) con 0,45 mg de micelio por cada ml de cultivo. Los cultivos líquidos salinos se hicieron en matraces de 125 ml que contenían 30 ml de medio de igual composición a los estacionarios, pero con agitación (180 rpm). A menos que se indique otra cosa, estos medios tenían una concentración final de 11 ppm de Mn^{+2} (195 mM MnSO_4) y 10 mM de tartrato de amonio como fuente de nitrógeno.

En el medio salvado de trigo, la concentración de ácido trans-acónítico, pH 4,5, elementos trazas y MnSO_4 fueron las mismas que las usadas en medio salino. Además, el medio salvado de trigo contiene, por litro, 30 g de capa exterior del grano de trigo finamente molida, 10 g de extracto de levadura (Difco) y 1 g de Tween 20.

2.2.- Crecimiento del hongo sobre madera. Matraces Erlenmayer de 250 ml que contenían 15 g de astillas de *Pinus radiata* (astillas de 5 mm^2 , con una humedad inicial de 40%) fueron suplementados con 4 ml de un medio de composición

definida (Leatham, 1983) que contenía 10 mM de tartrato de amonio y 2,5% (p/v) de glucosa, más 6 ml de agua. Los matraces fueron cubiertos con papel de aluminio y autoclavados por 45 min a 121°C, quedando con una humedad final de 60%. Después de alcanzar la temperatura ambiente, los matraces que contenían las astillas de pino fueron inoculados con pedazos de agar de 1 cm³ que contenían el hongo crecido en agar papa-dextrosa y mezclados vigorosamente. Los matraces fueron incubados a 30°C por hasta 4 semanas, siendo constantemente suplementados con aire filtrado y humedecido (1,5 L/h).

3.- Determinación de actividades enzimáticas.

3.1.- Lignina peroxidasa. Se realizaron dos tipos de ensayos:

A) Oxidación de alcohol veratrílico (Tien y Kirk, 1983). El medio de ensayo contenía 2 mM alcohol veratrílico, 25 mM amortiguador tartrato de sodio pH 2.5 y 0,4 mM H₂O₂, en un volumen final de 1 ml. La reacción se inició mediante la adición de H₂O₂. Se midió el aumento de absorbancia a 310 nm correspondiente a la formación de veratraldehído ($E_{310} = 9.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a 30°C en un espectrofotómetro Shimadzu UV160. Una unidad de LiP fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1,0 mmol de veratraldehído por minuto.

B) Oxidación del colorante Azure B (Archibald, 1992). El medio de ensayo contenía 0,032 mM Azure B, 50 mM tartrato de sodio pH 2,5 y 0,1 mM H₂O₂, en un volumen final de 1,0 ml. Se midió la disminución de la absorbancia a 651 nm a 30°C ($E_{651} = 48.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Una unidad de LiP es la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1,0 mmol de Azure B por minuto.

3.2.- Manganeso peroxidasa. El ensayo se realizó midiendo la desaparición de vanillilacetona a 336 nm ($E_{336} = 18.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El medio de ensayo contenía 0,1 mM vanillilacetona, 100 mM tartrato de sodio pH 5,0, 0,1 mM MnSO_4 y 50 mM H_2O_2 en un volumen final de 1 ml (Pasczynsky y cols., 1985). La reacción fue iniciada por adición de H_2O_2 y se midió la disminución de absorbancia a 336 nm a 30°C en presencia de la enzima. Una unidad de MnP fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1,0 mmol de vanillilacetona por minuto.

3.3.- Lacasa. El ensayo utilizado se basa en la oxidación de ABTS (Bourbonnais y Paice, 1990). Para ello se midió el aumento de absorbancia a 436 nm ($E_{436} = 29.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a 30°C, debido a la aparición de un producto oxidado de color verde. El medio de ensayo contenía 4,33 mM del sustrato ABTS en amortiguador glicina-HCl 50 mM, pH 3,0. Una unidad de lacasa fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1,0 mmol del sustrato en un minuto.

4.- IEF analítico de proteínas.

Los IEF fueron realizados en el rango de pH 3-6, usando geles planos de poliacrilamida Servalyt Precotes 3-6 obtenidos de Serva. Las muestras fueron dializadas contra 40% de polietilenglicol 8.000 disuelto en 10 mM acetato de sodio pH 6,0, de manera de reducir la concentración de sal y al mismo tiempo concentrar el volumen alrededor de 20 veces. Las muestras fueron aplicadas en los geles utilizando aplicadores especiales de goma (Serva). Entre 0,5 y 1,0 μg de proteína fueron aplicados por carril y el IEF se realizó a una temperatura entre 2 y 4°C. Se aplicó 200 volts por 30 min, 400 volts por 15 min, 800 volts por 5 min y finalmente el voltaje fue elevado a 1200 volts hasta que la corriente en

disminución no superó los 2 mA. Las bandas de MnP fueron desarrolladas sumergiendo el gel en una solución preparada de la siguiente manera: 15 mg de 4-cloro-1-naftol fueron disueltos en 5 ml de metanol; 1 ml de esta solución fue mezclado con 6,3 ml de una solución que contenía 20 mM tris-HCl pH 7,5 y 0,5 M NaCl. Posteriormente, 4 ml de la solución resultante se mezclaron con 25 ml de un amortiguador tartrato de sodio 50 mM pH 5,0 que contenía 0,2 mM de $MnSO_4$. Peróxido de hidrógeno fue utilizado para iniciar la reacción a una concentración final de 50 mM. La solución utilizada para el desarrollo de las bandas de lacasa fue preparada de la misma manera, pero careciendo de $MnSO_4$ y de peróxido de hidrógeno. Ocasionalmente ambas enzimas fueron analizadas usando ABTS, guaiacol o rojo de fenol como sustratos a concentraciones de 5 mM, 5,6 mM y 480 mM respectivamente. Cuando se indica, 1 U/ml de catalasa (Sigma) fue agregada para el desarrollo de las bandas de lacasa. Los estándares de pI para IEF fueron todos obtenidos de Sigma: amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (pI 3,6), glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (pI 4,2), inhibidor de tripsina de poroto (pI 4,6), β -lactoglobulina A de leche de bovino (pI 5,1), anhidrasa carbónica II de eritrocito humano (pI 5,4 y 5,9) y anhidrasa carbónica I de eritrocito humano (pI 6,6).

5.- Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

La electroforesis fue realizada en mini-geles en placa de poliacrilamida (7 x 10 x 0,05 cm) que contenía 0,1 % SDS, de acuerdo a un protocolo modificado de Laemmli (1970). El gel concentrador se hizo al 5% y el de separación al 8% o 10%, este último contenía una concentración final de 0,2% NaCl y 2% glicerol (Lobos y Mora, 1991). Las proteínas se mezclaron con

amortiguador de muestra (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 6% SDS , 20% glicerol , 10% β -mercaptoetanol y 0,07% azul de bromofenol) y se calentaron por 5 min a 100°C antes de ser cargadas. Se desarrolló la electroforesis por 2 a 3 h a 150 V. Los geles se tñieron con nitrato de plata utilizando un kit "Silver Stain" de Sigma. Ocasionalmente se usó la tinción con azul de coomasie R-250 en una solución que contenía 10% ácido acético y 50% metanol, y los geles se destñieron con 10% ácido acético.

6.- Fraccionamiento de enzimas producidas en medio líquido.

6.1.- Manganeso peroxidasa: Un litro de medio de cultivo de 15 días fue centrifugado por 20 min a 12.000 x g a 4°C, para remover el micelio y el glucano extracelular. El sobrenadante fue concentrado a 4°C aproximadamente 20 veces mediante ultrafiltración a través de una membrana Amicon de corte 10 kDa en una celda de 185 ml y dializado contra 10 mM acetato de sodio pH 6,0. El concentrado proteico (50 mg) fue cargado sobre una columna de intercambio aniónico (0,6 cm² x 27 cm) de Q-Sepharosa (Pharmacia) equilibrada previamente a 4°C con la misma solución. Las enzimas fueron eluidas con un gradiente lineal de 60 ml de 10 a 600 mM de acetato de sodio pH 6,0 a 4°C y se colectaron fracciones de 1 ml. Para los IEF preparativos se juntaron las fracciones enriquecidas en actividad MnP las que fueron procesadas como se indica en el punto 8.

6.2.- Lacasa: Para el aislamiento de las isoenzimas de lacasa, todas las operaciones fueron realizadas a 4°C. Un litro de cultivo del hongo, de 15 días de crecimiento, ya sea proveniente de medio de composición definida o de medio YMPG, fue centrifugado por 30 min a 12.000 x g para remover el micelio y el

glucano extracelular. El sobrenadante fue precipitado con sulfato de amonio, el que fue agregado lentamente hasta una concentración final de 80%. La suspensión fue centrifugada por 20 min a 40.000 x g y la pella obtenida fue resuspendida en de acetato de sodio 50 mM pH 4,8. Después de una extensiva diálisis contra este mismo amortiguador, la proteína fue colocada sobre una columna (0,8 cm² x 16 cm) de Q-Sepharosa (Pharmacia) la que estaba previamente equilibrada con el mismo amortiguador. La columna fue lavada primero con tres volúmenes de acetato de sodio 50 mM pH 4,8, para luego ser eluída con otros tres volúmenes de un gradiente lineal de 50 a 500 mM de este amortiguador, colectándose fracciones de 1 ml. Las fracciones enriquecidas en la actividad lacasa fueron juntadas y dializadas contra de acetato de sodio 50 mM pH 4,8 previo al IEF preparativo (véase el punto 8).

7.- Fraccionamiento parcial de enzimas producidas en medio sólido.

Aproximadamente 15 g de astillas de pino inoculadas con el hongo fueron lavadas con 30 ml de acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 (amortiguador A). La mezcla se agitó intermitentemente por 1 hora a 4°C. La fase líquida se separó de las astillas mediante centrifugación a 28.000 x g por 50 min y el sobrenadante fue diluído dos veces con agua destilada estéril. La solución obtenida fue cargada sobre una columna Q-Sepharosa con 2 ml de resina equilibrada con el amortiguador A. La columna fue lavada con 3 volúmenes de amortiguador A y las enzimas fueron eluídas mediante lavado en etapas con 2 volúmenes del mismo amortiguador A que contenía 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M de NaCl, obteniéndose fracciones de 4 ml de cada lavado en las cuales se determinó las actividades lacasa, LiP y MnP. Las actividades lacasa y MnP fueron siempre recuperadas en

la fracción 0,2 M NaCl. Durante la primera semana de crecimiento alguna actividad MnP también pudo ser detectada en eluidos de NaCl 1M. Este procedimiento fue posteriormente aumentado incrementado, previo a la realización de IEF preparativos.

8.- Aislamiento de isoenzimas de MnP y lacasa mediante IEF preparativo.

Los geles de IEF preparativos utilizados para el aislamiento de las isoformas de MnP fueron llevados siempre a cabo con proteínas previamente fraccionadas por cromatografía de intercambio aniónico en una columna de Q-Sepharosa. Las fracciones que contenían actividad fueron concentradas mediante diálisis en bolsas de corte 3.500 kDa contra 40% polietilenglicol 8.000 disuelto en tampón acetato de sodio 10 mM pH 6,0, hasta una concentración final de proteína de aproximadamente 1 mg/ml. Los geles de IEF fueron preparados y desarrollados como se indica más abajo.

Para el aislamiento de las bandas de lacasa se utilizó, además de cromatografía en columna de Q-Sepharosa, un paso de purificación mediante isoelectroenfoque preparativo en un Rotofor PreparativeTM IEF Cell de Bio-Rad desde el cual se colectó fracciones enriquecidas en actividad lacasa.

En ambos casos, las enzimas fueron colocadas y desarrolladas en un sistema de IEF preparativo diseñado en este estudio, el que tenía las siguientes características: 16-20 µg de proteína total fueron aplicados a un gel de poliacrilamida al 5% (12 x 8 x 0,5 cm) que también contenía 5% glicerol, 2% de anfolitos Byo-Lyte 3/5 (Bio-Rad), 300 µl de 0,1% riboflavina-5'-fosfato, 180 µl de 10% persulfato de amonio y 20 µl de TEMED. Para facilitar la polimerización se dispuso la cámara que contenía la mezcla bajo una lámpara fluorescente a una

distancia de 5 cm. El amortiguador anódico (pH 3,0) contenía, por litro de solución, 3,3 g de ácido aspártico y 3,7 g de ácido glutámico, mientras que el amortiguador catódico contenía, por litro, 4 g de lisina, 4 g de arginina y 120 ml de etiléndiamina. Después de aplicar la muestra de proteína en un bolsillo previamente construido, el gel fue desarrollado a 4°C durante: 180 min a 200 V, 60 min a 400 V y 20 min a 600 V. Las bandas de actividad MnP fueron detectadas usando 4-cloro-1-naftol como sustrato en presencia de MnSO_4 y H_2O_2 . Las isoformas de lacasa fueron fácilmente identificadas en el gel debido a su intenso color azul. Bandas correspondientes a ambas actividades fueron cortadas desde el gel usando un bisturí y electroeluidas a 4°C por toda la noche en una bolsa de diálisis de corte 3.500 kDa, que contenía 2 ml de acetato de sodio 50 mM pH 4,8. La recuperación de ambas actividades fue analizada mediante IEF analítico en el rango de pH 3-6, usando tinción para actividad y tinción para proteína.

9.- Electrotransferencia de proteínas y secuenciación amino-terminal.

Para este efecto, luego del IEF preparativo las bandas de MnP fueron cortadas y homogeneizadas hasta un volumen final de 0,2 ml con un amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,5 que contenía NaCl 200 mM. Las suspensiones que contenían aproximadamente 20 μg de proteína, fueron colocadas en un gel de poliacrilamida-SDS al 8% (p/v), el que fue desarrollado a una corriente constante de 20 mA. Las isoenzimas fueron electro-transferidas a membranas de poliviniliden-di-fluoruro (PVDF) según procedimiento descrito por Matsudaira (Matsudaira, 1987) y secuenciadas en un secuenciador de proteínas automático

Applied Biosystem 475, en fase gaseosa, en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin.

10.- Determinación del punto isoeléctrico y masa molecular de la MnP y lacasa.

10.1.- Determinación del punto isoeléctrico. Para determinar el punto isoeléctrico de cada isoforma de MnP y lacasa se utilizó estándares de punto isoeléctrico (IEF Mix Sigma) en el rango de pI 3,6-6,6 con los siguientes componentes:

<u>Proteína</u>	<u>pI</u>
Amiloglucosidasa de <i>Aspergillus niger</i>	3,6
Glucosa Oxidasa de <i>Aspergillus niger</i>	4,2
Inhibidor de Tripsina de poroto de soya	4,6
β -Lactoglobulina A de leche de bovino	5,1
Anhidrasa Carbónica II de eritrocitos de bovino	5,4
Anhidrasa Carbónica II de eritrocitos de bovino	5,9
Anhidrasa Carbónica I de eritrocitos humanos	6,6

Varios IEF analíticos fueron desarrollados en el rango de pI 3-6, en los que se incluyeron tanto sobrenadantes concentrados del hongo de diferentes días de crecimiento en medio líquido salino, como también los estándares de pI antes mencionados. Las condiciones de IEF fueron las que se describen en el punto 4 de esta sección. Al término del IEF, la línea del gel que contenía la mezcla de estándares fue teñida con Azul de Coomasie y se midió la distancia en cm de migración de cada banda de proteína desde el ánodo. La porción del gel que contenía las muestras a determinar se tiñó por actividad, como se describe en el

punto 4 de esta sección, y se calculó también su distancia de migración desde el ánodo, en cm. Con los valores obtenidos a partir de la migración de los estándares de pI se contruyó una curva de calibración pI v/s distancia de migración (cm), la cual fue ajustada utilizando el método de los mínimos cuadrados. La curva de calibración realizada tuvo un coeficiente de correlación $r = 0,96$ con $N = 7$ y se ajustó a la ecuación $Y = 0,610 X + 0,32$. La ecuación anterior fue utilizada para interpolar los valores obtenidos para las distintas isoformas de MnP y lacasa. Siempre que se quiso determinar pIs para isoformas secretadas por el hongo crecido en otros medios de cultivo, se realizó una nueva curva de calibración como la antes mencionada, obteniéndose correlaciones similares.

10.2.- Determinación de masas moleculares. La determinación de las masas moleculares se hizo por comparación de la migración electroforética de la MnP y lacasa de *C. subvermispora* con proteínas de masa molecular conocida. Muestras de MnP y lacasa purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico en columna de Q-Sepharosa y posteriormente por isoelectroenfoque preparativo, como se describió anteriormente, fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturantes (vease el punto 5 de esta sección). Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomasie y la masa molecular se calculó a partir de un gráfico de logaritmo de los pesos moleculares de proteínas con masa molecular conocida versus el Rf de cada una de estas proteínas. El Rf se definió como la distancia del origen del gel a la banda dividido por la distancia del origen a un punto de referencia.

11.- Tratamiento con endoglicosidasa. Se realizó según lo descrito por Pedemonte y cols., (1990). 50 μ g de proteína en 30 μ l se mezclaron con: 2 μ l de SDS al 10%,

25 μ l de una solución que contenía 200 mM EDTA (pH 8,0), 4% (v/v) de β -mercaptoetanol y 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Se calentó por 5 minutos a 100°C y luego de enfriar se adicionó una unidad (20 μ l) de endoglicosidasa F (Sigma Chem. Co.), y se incubó por 24 hrs a 37°C.

12.- Purificación de ácidos nucleicos.

12.1.- Aislamiento de DNA genómico de *C. subvermispora*. Cultivos del hongo de 500 ml de medio salino o YMPG fueron crecidos por 10 días a 30°C. El micelio fue filtrado a través de gasa estéril y congelado inmediatamente en nitrógeno líquido. Esta biomasa fue utilizada inmediatamente o guardada a -80°C hasta su uso. El micelio fue molido en estado congelado, utilizando un molinillo de café o un mortero que contenía pedazos de hielo seco para evitar su descongelamiento. El micelio molido fue transferido a un tubo de centrifuga estéril de 50 ml en el que fue suspendido y homogeneizado con 5 ml de 20% SDS, para luego elevar el volumen hasta 25 ml con amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) estéril. La suspensión fue incubada por 15 min a temperatura ambiente con agitación ocasional. La mezcla de lisis fue separada en dos tubos estériles de 30 ml y extraída con un igual volumen de una mezcla fenol (saturado en TE) : cloroformo : alcohol isoamílico (24:23:1 en volumen). Después de centrifugar por 10 min a 12.000 x g, la fase superior acuosa fue transferida a otro tubo donde se repitió el procedimiento de extracción. Posteriormente, la fase acuosa fue tratada con 1 mg de proteinasa K por 30 min a 50°C con agitación ocasional suave. Luego de desproteinizar la mezcla mediante extracción fenólica, el DNA en la fase acuosa fue precipitado por adición de 2 volúmenes de etanol 95% en presencia de acetato de sodio 0,3 M pH 5,2. El DNA se incubó a -20°C

por 30 min y posteriormente fue sedimentado por centrifugación a 12.000 x g por 45 min. A continuación, el DNA fue resuspendido en 2 ml de TE y tratado con 1 mg de RNasa (libre de DNasa) por 30 min a 37°C. La mezcla fue tratada con 0,5 mg de proteinasa K a 50°C por 30 min y nuevamente desproteinizada por extracción fenólica, como se indicó anteriormente. Finalmente, el DNA fue precipitado con 2 volúmenes de etanol 95% y acetato de sodio 0,3 M pH 5,2, por 30 min a -20°C, y resuspendido en 500 µl de TE.

12.2.- Aislamiento de RNA total de *C. subvermispora*. El RNA total fue preparado a partir de micelio del hongo crecido por 10 días en medio líquido salino. El micelio fue aislado pasando los cultivos a través de gasa estéril, seguido por rápido congelamiento en nitrógeno líquido. En caso de que el RNA no fuera aislado inmediatamente el micelio fue guardado a -70°C. El micelio congelado fue molido en una Waring Blender conteniendo pedazos de hielo seco para evitar su descongelamiento. El micelio molido fue traspasado a tubos de 30 ml y se agregó 12,5 ml de solución de homogenización y 12,5 ml de fenol (saturado en H₂O). La solución de homogenización, preparada en H₂O previamente tratada con 0,1% DEPC, contenía Tris-HCl 200 mM pH 8,5, EGTA 50 mM, NaCl 250 mM, PAS 6% (p/v) (ácido p-aminosalicílico) y TNS 1% (ácido triisopropilnaftalensulfónico). A esta mezcla se agregó aproximadamente 1g de vidrio molido de 106 micrones (Glass Beads Sigma), el que había previamente lavado con HNO₃ concentrado, luego lavado con abundante H₂O y esterilizado en horno a 100°C. La mezcla, incubada en hielo por 60 min, se sometió a agitación ocasional usando el vortex cada 10 min. Posteriormente se centrifugó por 15 min a 4°C a 10.000 rpm en una centrífuga Beckman equipada con rotor JA-20. El sobrenadante recuperado fue extraído dos veces con un volumen de

fenol (sat. en H₂O) : cloroformo (1 : 1) y centrifugado a 12.000 x g. La fase acuosa fue traspasada a tubos limpios y extraída con 1 volúmen de cloroformo. Después de centrifugación, la fase acuosa fue precipitada por 2 hrs a -20°C con dos volúmenes de etanol 95% y acetato de sodio 0,3 M pH 5,2. La pella de RNA fue obtenida por centrifugación a 12.000 x g por 45 min a 4°C, lavado con 70% etanol y resuspendido en 4 ml de TE. El RNA en TE fue utilizado inmediatamente para preparar mRNA poli(A)⁺, o bien fue almacenado hasta su uso precipitándolo a -70°C con un volúmen de isopropanol y 0,3 M acetato de sodio pH 5,2.

13.- Análisis de los ácidos nucleicos.

13.1.- DNA. Los ácidos desoxiribonucleicos, como el DNA genómico, plasmidios, fragmentos de restricción y productos de PCR, fueron siempre analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, usando como amortiguador 0,5x TBE (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0), siguiendo métodos estandarizados (Maniatis y cols., 1982). La visualización de los ácidos nucleicos fue realizada utilizando tinción con bromuro de etidio y por exposición a luz UV. La concentración del DNA fue determinada espectrofotométricamente a 260 nm. Su pureza fue determinada por la relación 260/280 nm.

13.2.- RNA. El RNA también se cuantificó por su absorbancia a 260 nm y su pureza por la relación 260/280 nm (Maniatis y cols., 1982). La integridad del RNA total se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en presencia de formaldehído, utilizando MOPS (ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico 20 mM, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM pH 7,0,

formaldehído 2,2 M) como amortiguador. Los RNAs fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio y exposición a la luz UV, apreciándose las bandas correspondientes de RNA ribosomal 23S y 18S.

14.- Hibridación de tipo Southern de DNA genómico.

El DNA genómico (10 µg) fue digerido con las enzimas de restricción EcoR I y Hind III, por separado y en combinación, por 90 min a 37°C, en los amortiguadores adecuados. En cada oportunidad, la especificidad de los fragmentos liberados fue comprobada, para lo cual se incubó el DNA con el amortiguador pero en ausencia de la enzima. Los fragmentos de DNA fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 0,6% en amortiguador 0,5x TBE por toda la noche a 18 volts. El gel fue medido y fotografiado, para ser luego incubado con solución desnaturante (NaOH 1,0 M, NaCl 1,5 M) por 20 min. Luego el gel fue transferido a una solución neutralizadora (Tris-HCl 1 M pH 7,5, NaCl 1,5 M), donde se mantuvo por 20 min adicionales. El gel fue posteriormente inmerso en solución 20X SSC (NaCl 3M, citrato de sodio 0,3 M pH 7,0) por 5 min y el DNA del gel fue transferido a una membrana de nylon Nytran (previamente humedecida en 20X SSC) por capilaridad por toda la noche. Al otro día, el blot fue desensamblado y la membrana fue secada al aire y sometida a luz UV directamente sobre el transiluminador durante 30 seg, con el fin de lograr la fijación del DNA a la membrana.

La membrana fue analizada por hibridación Southern en condiciones de baja estrictez con una sonda cDNA MnP15-2 de todo el largo del gen correspondiente a la MnP-1(isoenzima H4) (Pease y cols., 1989) de *P. chrysosporium* BKM-F-1767 (donada por el Dr. Dan Cullen, Wisconsin) marcada

con [α - 32 P]-dCTP por "nick translation" usando un kit de Gibco BRL. Las condiciones de la prehibridación e hibridación fueron: SDS 7%, Na₂HPO₄ 0,25 M, EDTA 1 mM, formamida desionizada 35%, a una temperatura de 42°C. Se lavó la membrana tres veces con una solución que contenía SDS 2%, Na₂HPO₄ 0,25 M y EDTA 1mM a 45°C con agitación. La membrana fue secada al aire y expuesta por algunas horas o durante toda la noche a un film Kodak XAR-5. El film fue revelado y las bandas de hibridación positiva fueron medidas desde el comienzo del gel para poder identificar la zona donde se encontraría el fragmento de DNA de interés en un gel preparativo.

De esta manera, se decidió usar la enzima EcoRI para digerir 20 μ g de DNA genómico y fraccionarlo en un gel como el anterior, donde además se desarrollaron estándares de peso molecular (λ /Hind III y ϕ X174/Hae III). Se cortaron tres zonas contiguas del gel preparativo, donde supuestamente se encontraba contenido el gen de MnP, desde las cuales el DNA fue electroeluido. Luego el DNA fue limpiado mediante columnas Elutips-D (Schleicher&Schuell) y vuelto a desarrollar en un gel de agarosa al 0,7%, para ser transferido a una membrana Nytran e hibridado con la sonda heteróloga. El DNA que dió la mejor hibridación en condiciones de baja estrictez fue ligado al vector Bluescript KSII+ (Stratagene Cloning System) (Figura 1A), previamente digerido con EcoRI y desfosforilado mediante CIAP, con el cual se transformó la cepa *E. coli* DH5 α como se describe en el punto 16 de esta sección.

15.- Clonamiento de DNA genómico.

15.1.- Preparación de células competentes. La cepa de *E. coli* DH5 α fue crecida en 3 ml de LB toda la noche a 37°C con agitación. Al otro día, un cultivo de 50

ml de medio LB fue inoculado con el preinóculo y crecido a 37°C con vigorosa agitación hasta alcanzar una OD₅₆₀ de 0,4. El cultivo fue cosechado por centrifugación a 3.000 x g por 5 min a 4°C en tubos estériles. La pella bacteriana correspondiente a los 50 ml fue resuspendida en 20 ml de CaCl₂ 0,1 M estéril y frío, mediante rápida agitación en vortex. Las células resuspendidas fueron incubadas en hielo por 3 a 4 hrs en cámara fría, después de lo cual se centrifugaron a 1.800 x g por 10 min a 4°C. La pella resultante fue resuspendida muy suavemente en 2 ml de CaCl₂ 0,1 M estéril que contenía glicerol 15% e incubado toda la noche en hielo, en la cámara fría. Al otro día, las células competentes fueron separadas en alícuotas de a 100 µl en tubos Eppendorf estériles, para ser usadas de inmediato o almacenadas a -70°C hasta su uso.

15.2.- Transformación de células competentes. Las reacciones de ligación de insertos de DNA al vector Bluescript KSII+ se realizaron usando 50 a 100 ng de vector digerido y desfosforilado mediante CIAP. Los insertos de DNA se usaron en razones molares de 1:1 y 1:3 con respecto al vector. Las reacciones de ligación se realizaron a 12°C por toda la noche en un volúmen final de 10 µl. Las células competentes (100 µl) fueron transformadas con toda la mezcla de ligación. La mezcla de transformación fue incubada en hielo por 45 min y posteriormente sometida a 43°C por 1 min, para finalmente ser incubada sobre hielo por 2 min adicionales. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas con medio LB con ágar que contenían 100 µg/ml de ampicilina y 40 µg/ml de X-gal (Sigma Chem.), e incubadas a 37°C por 24 horas.

Para el análisis de los transformantes, las colonias blancas fueron crecidas en duplicado en placas de agar LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina, por toda la noche a 37°C. Las colonias que volvieron a dar reacción positiva con la

sonda MnP15-2 marcada radiactivamente, fueron sembradas en tubos que contenían 2 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina. Los plasmidios de estas transformantes fueron purificados según la técnica descrita por Holmes (Holmes, 1984). Los plasmidios fueron digeridos con EcoRI y los productos de la digestión fueron analizados en geles de agarosa.

16.- Secuenciación de DNA.

La secuenciación del DNA de todos los clones y subclones, tanto de productos PCR, fragmentos de DNA genómico y cDNAs obtenidos en este estudio, fueron realizados utilizando el kit Sequenase 2.0 de USB. Entre 5 y 10 µg de DNA plasmidial de doble hebra, fueron disueltos en 20 µl de H₂O_{dd} estéril. El DNA plasmidial fue desnaturado por 15 min a 37°C con 2 µl de una solución fresca de NaOH 2 N y EDTA 2 mM. El DNA desnaturado se trató con 8 µl de Tris-HCl 1 M pH 4,5 y 3 µl de acetato de sodio 3 M pH 5,2, y fue precipitado por 30 min a -20°C con 80 µl de etanol 95%. Después de centrifugación por 10 min a 24.000 x g, la pella de DNA fue lavada con 200 µl de etanol 70% frío y centrifugado por 5 min adicionales. El sobrenadante fue aspirado y el DNA se secó a 65°C y al vacío por 5 min. El DNA resuspendido en 7 µl de H₂O, fue incubado con 1-2 pmoles del oligonucleótido complementario (ya sea M13/pUC reverse sequencing primer o M13/pUC forward sequencing primer) y 2 µl de amortiguador 5X Sequenase (Tris-HCl 200 mM pH 7,5, MgCl₂ 100 mM y NaCl 250 mM) a 80°C por 2 min, 37°C por 15 min y finalmente a temperatura ambiente por 10 min. Luego se adicionó 1 µl de DTT 0,1 M, 2 µl de mezcla de dNTPs Sequenase (mezcla de marcación dG: 1,5 µM de dCTP, dGTP, y dTTP), 1 µl de [α -³⁵S]-dATP (1.500 Ci/mmol) y 2 µl de DNA polimerasa de fago T7

(Sequenase) diluída hasta 8 veces en su amortiguador y se le dejó 2 a 5 min a temperatura ambiente. Paralelamente, fueron agregados 2,5 μ l de cada uno de los 4 didesoxinucleótidos terminadores (8 μ M final) en 4 tubos Eppendorf etiquetados y se incubaron a 37°C por al menos 5 min. Desde la solución de marcación inicial se extrajeron 4 alícuotas de 3,5 μ l, las que fueron agregadas a cada uno de los 4 tubos que contenían los ddNTPs. Después de incubar las reacciones de terminación por 5 min a 37°C se agregaron 4 μ l de mezcla stop-Sequenase (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05% y xilencianol 0,05%). Las reacciones de secuencia fueron almacenadas a -20°C hasta su uso o analizadas inmediatamente por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (acrilamida:bis-acrilamida = 38% : 2%) que contenía urea 8 M. Las muestras fueron calentadas a 82°C por 2 min y 4 μ l de ellas fueron colocadas inmediatamente en el gel precalentado a 50°C. La electroforesis fue desarrollada en amortiguador 1X TBE (10,8 g/l de Trizma base, 5,5 g/l de ácido bórico y 5 ml de EDTA 0,5 M) a una potencia de entre 50 y 60 watts, procurando mantener el gel a 50°C durante toda la electroforesis. Cuando el azul de bromofenol se encontraba en el tercio final del gel, se agregó acetato de sodio (pH 8,8) 1 M final al reservorio anódico de la cámara, con el fin de lograr una contracorriente de iones y agua hacia el polo negativo, comprimiendo las bandas cerca de los oligos partidores, logrando bandas menos difusas y extendiendo la secuencia lejos de los partidores. Los geles fueron secados a 80°C por 15 a 30 min al vacío y expuestos a temperatura ambiente por toda la noche usando films X OMAT AR-5 de Kodak.

17.- Transcripción reversa y amplificación por PCR.

Para la detección y amplificación de los mRNAs que codifican para MnP se utilizó el protocolo RACE (amplificación rápida de los terminales de cDNA) (Frohman y cols., 1988) y un protocolo de amplificación en dos etapas descrito por Barnard (Barnard y cols., 1994).

La técnica RACE amplifica cDNAs, los que son obtenidos a partir de un mRNA. En esta técnica se emplean tres partidores. El primero es utilizado como sustrato para la transcriptasa reversa. Este partidor consiste en un adaptador-oligo(dT), el cual contiene sitios de corte para enzimas de restricción y una cola(dT), lo que permite hibridar con la cola poli(A) de los mRNAs. La secuencia de este partidor es la siguiente:

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Un segundo partidor es el adaptador 5', que es homólogo a la porción 5' del adaptador-oligo(dT). La secuencia de este partidor es la siguiente:

5'-GACTCGAGTCGACATCGA-3'

Por último, el tercer partidor, denominado partidor 3'-amp, es específico para el cDNA que se desea amplificar. En este estudio, se sintetizaron tres partidores 3'-amp a partir de la secuencia aminoacídica amino-terminal de consenso de las diferentes isoenzimas de MnP aisladas en este estudio, por lo que se trató de partidores con diferentes grados de degeneración. Para el diseño de éstos, se consideró la preferencia codogénica para los genes de MnP de *P.*

chryso sporium. Dos partidores fueron sintetizados por el Dr. Dan Cullen del IMBT, Forest Products Laboratory, Madison, WI, EEUU y un tercero por Isabel Gómez en este laboratorio.

17.1.- Síntesis del cDNA. La reacción enzimática se realizó en un volumen final de 20 μ l. La mezcla de reacción contenía: 1 μ g de RNA total, amortiguador 5X primera hebra (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM y MgCl₂ 3 mM), 1mM de cada uno de los dNTPs, DTT 10 mM, 50-100 pmoles del partidador adaptador-oligo(dT) y 100 U de transcriptasa reversa M-MLV (Gibco BRL). La mezcla de reacción se cubrió con dos gotas de aceite mineral (Sigma) y se utilizaron las siguientes condiciones: 10 min a 23°C, 60 min a 37°C - 42°C, 5 min a 95°C y luego enfriado a 5°C. La incubación fue realizada en un mini termociclador M. J. Research Inc.

17.2.- Amplificación del cDNA. La etapa de amplificación se realizó agregando bajo la capa de aceite mineral, los siguientes componentes: 2 μ l de MgCl₂ 50 mM, 10 μ l de tampón 10X PCR [KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 9,0 y Tritón X-100 0,1% (concentraciones finales)], 0,2 mM final de cada uno de los dNTPs, entre 25 y 100 pmoles de los partidores 3'-amp y adaptador 5', respectivamente y 5 U de DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*. El volumen final de la reacción fue de 100 μ l. Se utilizaron las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo de 6 min a 94°C, 2 min a temperaturas entre 50°C y 56°C y 40 min a 72°C, 36 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 50°C-56°C y 5 min a 72°C; la reacción se finalizó con un ciclo de 15 min a 72°C y se enfrió a 20°C. Las temperaturas mínimas (t_m -5°C) de apareamiento utilizadas fueron calculadas [$t_m = 4(G+C) + 2(A+T)$] para cada partidador 3'-amp degenerado, considerando el contenido G+C como el mínimo posible. La incubación fue realizada en un termociclador M. J. Research Inc.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 0,8%-1,5% (alícuotas de 10 μ l) en amortiguador 0,5X TBE, utilizando marcadores de tamaño como λ /HindIII o DNA Ladder de 1Kb (Gibco BRL).

17.3.- Clonamiento de productos amplificados por PCR. Para el clonamiento de productos PCR se utilizó el vector PCR II de Invitrogen (Figura 1B). Este vector lineal tiene dos residuos dTMP en los extremos 3'. La estrategia de clonamiento se basa en el hecho que la DNA polimerasa de *T. aquaticus* adiciona gratuitamente un residuo dAMP de una molécula de DNA generando un terminal cohesivo, lo que permite la ligación directa de los productos PCR al vector. Otra de las características de este vector es que tiene el gen *lacZ* de la β -galactosidasa, por lo tanto sólo las colonias transformantes que contengan el inserto serán de color blanco en placas de agar que contengan el marcador X-gal.

Los productos PCR de interés fueron siempre aislados desde geles de agarosa preparativos, utilizando el kit para purificación de DNA GlassMax (Gibco BRL) y ligados al vector. La reacción de ligación fue realizada en un volumen de 10 μ l como recomienda Invitrogene. Siempre se usó una proporción 1:1 y 1:3 de vector con respecto al inserto. La reacción de ligación fue realizada a 12°C toda la noche.

Las células competentes proporcionadas con el kit One Shot Cells, fueron transformadas con 5 μ l o toda la mezcla de ligación como recomienda Invitrogene. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas de agar Luria conteniendo 100 μ g/ml de ampicilina y 40 μ g/ml de X-gal.

18.- Construcción de una genoteca de cDNA y clonamiento en el vector λ ZipLox.

Siempre que se crecieron cultivos del hongo *C. subvermispora* en medio líquido salino, el nivel de actividad MnP aparece con un máximo alrededor del día 10 de crecimiento. En consecuencia, la genoteca cDNA fue construida con mRNA aislado el día 10 de cultivo del hongo. Se aisló 1,74 mg de RNA total mediante el método descrito en el punto 13.2 de esta sección, el que se sometió a cromatografía a través de columnas oligo(dT) para obtener 16,8 μ g de mRNA poli(A)+, lo que representa un rendimiento de 0,92%. Para inactivar las RNasas, todo el material y las soluciones utilizadas fueron pretratadas con DEPC 0,1% y posteriormente esterilizadas mediante autoclave.

Cuatro μ g de mRNA poli(A)+ aislado fueron secados 5 min a 65°C y al vacío en una Automatic Environmental Speed Vac AES 1000 (Savant) y la síntesis de cDNA fue realizada usando el Kit SuperscriptTM Lambda System de Gibco BRL, de manera de construir una genoteca direccional, es decir, introduciendo asimetría en los terminales de los cDNAs. El procedimiento que se describirá detalladamente a continuación, también se puede observar en el diagrama de flujo de la Figura 2. Para la síntesis de la primera hebra de cDNA a partir de la cola del mRNA poli(A)+ y mediante transcripción reversa, se utilizó un partidador-adaptador Not I, cuya secuencia se muestra a continuación:

5' -pGACTAGT TCTAGA TCGCGA GCGGCCGC CC (T)₁₅- 3'

Spe I Xba I Nru I Not I

Este partidador-adaptador Not I de 44 pb de largo y que contiene 15 residuos dT posee además 4 sitios para endonucleasas de restricción, los cuales

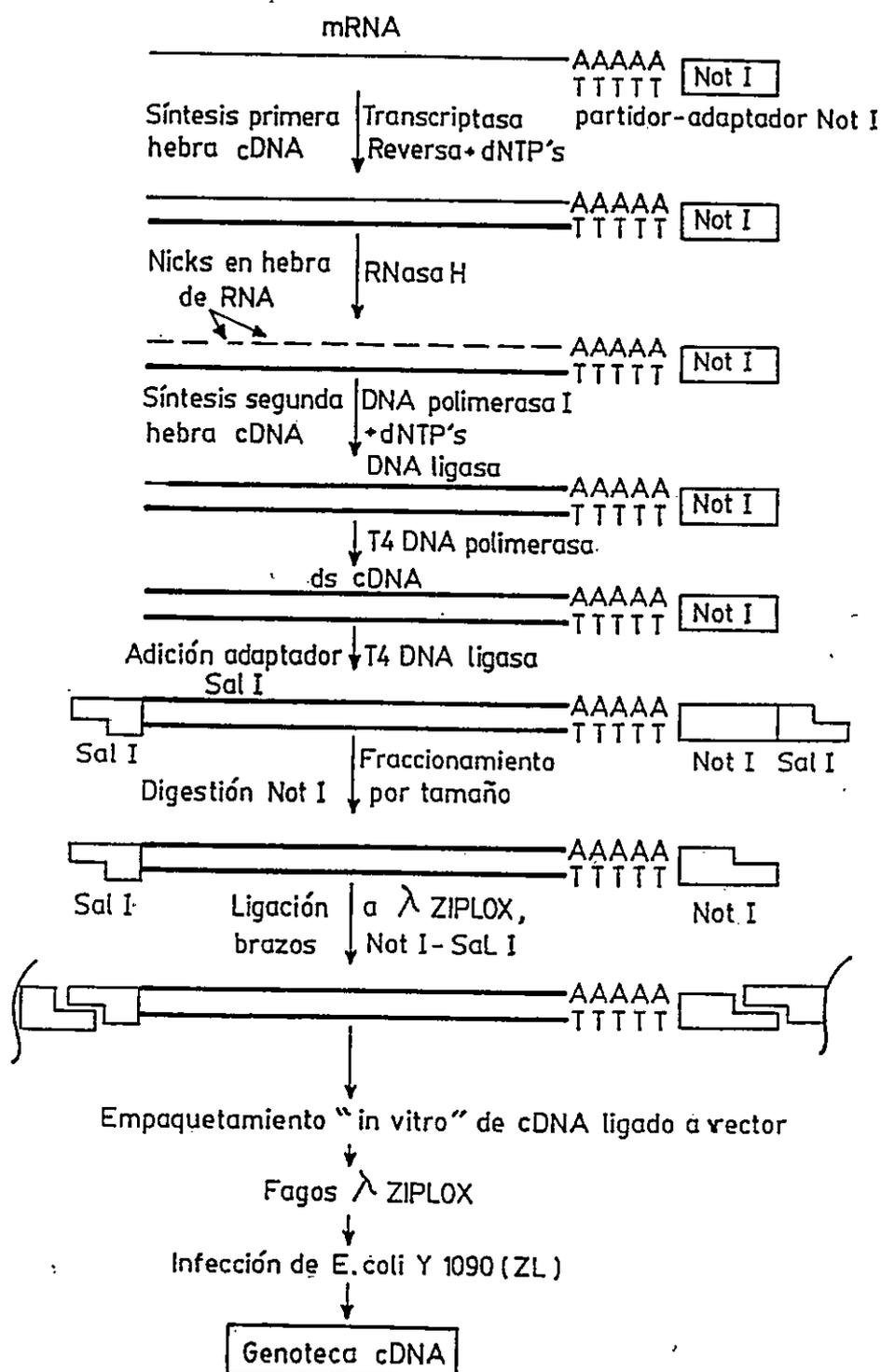


Figura 2. Esquema simplificado del procedimiento para construir una genoteca cDNA en el vector λ /ZIPLOX.

representan los adaptadores, los cuales pueden impedir la ligación del cDNA al vector predigerido con Sal I/Not I y contaminar la genoteca con clones vacíos. Además, este fraccionamiento reduce la posibilidad de que insertos pequeños, menores de 500 pb, predominen en la genoteca.

El cDNA fraccionado por tamaño y con terminales Not I-Sal I fue ligado al vector λ /ZipLox previamente digerido con las mismas enzimas. El vector λ /ZipLox, cuyo mapa se muestra en la Figura 3, contiene el plasmidio pZL1, flanqueado por la secuencia *loxP* entre los brazos izquierdo y derecho de λ gt10 y λ gt11. Cuando pZL1 se escinde desde λ /ZipLox, se convierte en una versión modificada del plasmidio pSPORT1 (Catálogo de Productos Gibco BRL, 1994), pero mantiene un sitio *loxP* y la secuencia *incA* para un alto rendimiento plasmidial. Los insertos cDNA en el sitio de múltiple clonamiento de λ /ZipLox residen en el gen *lacZ'*, cuyo promotor puede ser inducido con IPTG, expresando el gen clonado como una proteína de fusión con el amino-terminal de la β -galactosidasa. Después del clonamiento y selección de los clones usando una sonda cDNA heteróloga marcada radiactivamente, los clones cDNA fueron recuperados mediante un protocolo de escisión y subclonamiento automático, en el plasmidio de replicación autónoma pZL1.

Los plasmidios pZL1 que contenían los insertos de cDNA seleccionados, fueron escindidos *in vivo*, infectando la cepa *E. coli* DH10B(ZIP) con el fago λ /ZipLox, la que contiene el plasmidio pZIP con el gen *Cre*. Como se muestra en la Figura 4, cuando el plasmidio pZL1 (y cualquier cDNA clonado en él) infecta la bacteria *E. coli* DH10B(ZIP) se escinde y circulariza desde el genoma de λ /ZipLox mediante recombinación *Cre-loxP*. Un profago de λ residente en DH10B(ZIP) reprime la expresión de las funciones del fago, evitando así la

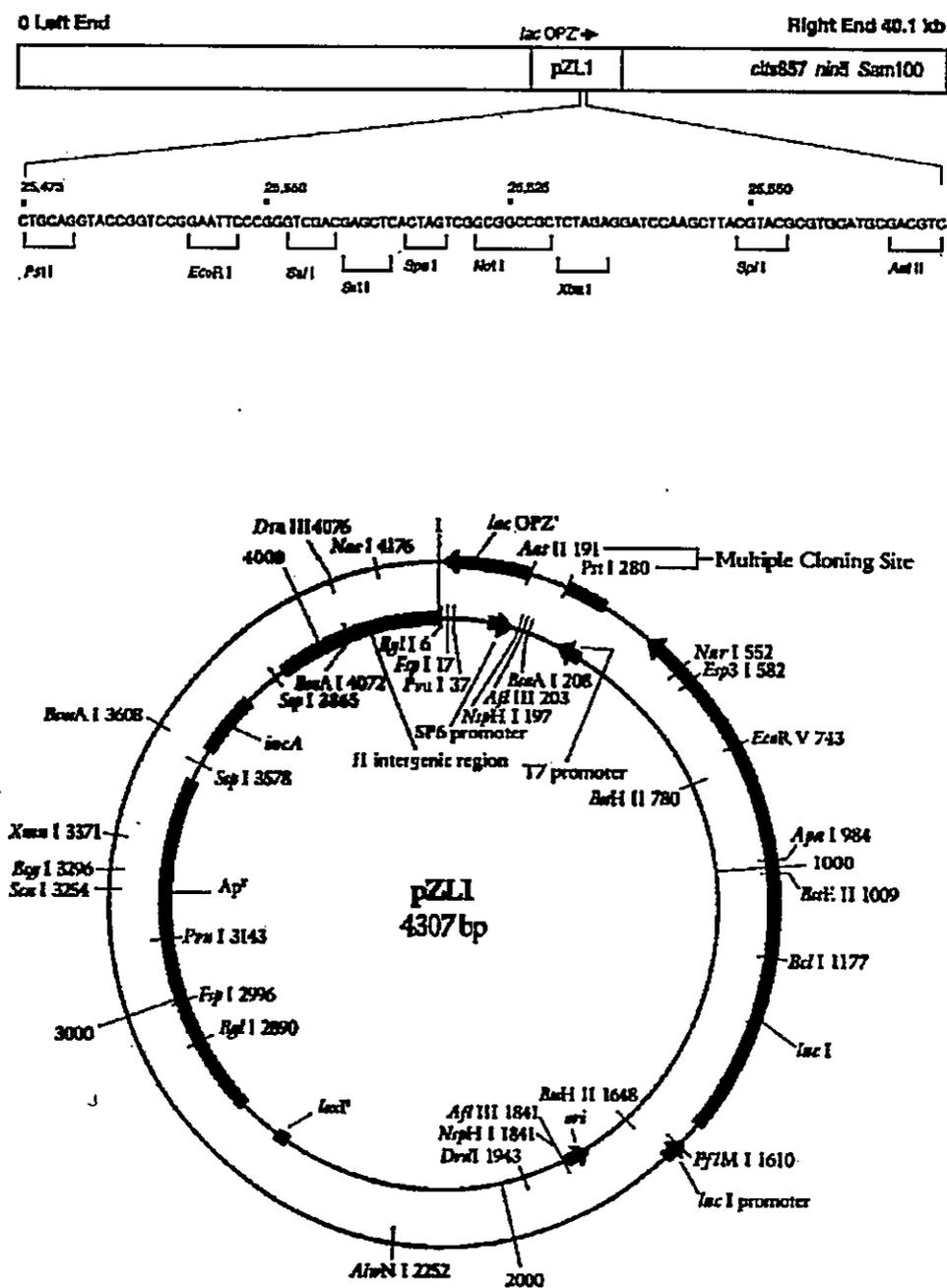


Figura 3. Mapa del vector λ ZIPLOX y plasmidio pZL1. Secuencia de la región de múltiple clonamiento.

iniciación de la replicación lítica. A medida que el número de copias de pZL1 aumenta, el locus *incA* de pZL1 inhibe la replicación de pZIP mediante interacción con su *ori* P1, causando la rápida pérdida de pZIP y a medida que la célula se divide disminuye el nivel de la recombinasa Cre endógena, dando como resultado un alto rendimiento en el DNA plasmidial de los clones seleccionados.

18.1.- Síntesis de la primera hebra de cDNA. El mRNA poli(A)+ fue resuspendido en 5 μ l de H₂O_{depc}, mezclado con 2 μ l (1 μ g) del partidador-adaptador Not I y tratado a 75°C por 10 min, para romper la estructura secundaria en los mRNAs. Después de enfriar en hielo se adicionó lo siguiente: 4 μ l de 5X amortiguador primera hebra, 2 μ l de DTT 0,1 M, 1 μ l de mezcla de dNTPs 10 mM, 1 μ l [α -³²P]-dCTP(10 mCi/ml) en un volúmen total de 16 μ l. Después de mezclar suavemente y colectar por breve centrifugación, la mezcla fue incubada por 2 min a 37°C, para luego agregar 4 μ l (800U) de transcriptasa reversa (Superscript II RT). La mezcla fue homogenizada suavemente e incubada a 37°C por 1 hora. El volúmen total de la reacción fue de 20 μ l y su composición final fue la siguiente: Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM, 500 mM de cada uno de los dNTPs, 50 mg/ml del partidador-adaptador Not I, 4 μ g de mRNA poli(A)+ (200 μ g/ml) y 40.000 U/ml de transcriptasa reversa Superscript II RT. Al término de la incubación, la reacción se detuvo en hielo y se tomaron 2 μ l de la mezcla con el objeto de calcular el rendimiento en la síntesis de la primera hebra. Esta alícuota fue diluída a 50 μ l con 43 μ l de EDTA 20 mM (pH 7.5) y 5 μ l de tRNA (1 mg/ml) de levadura. Dos alícuotas de 10 μ l cada una de la dilución anterior fueron agregadas sobre filtros de fibra de vidrio, secados y usados para determinar la actividad específica del dCTP. Los filtros fueron lavados tres veces con TCA 10% (p/v) que contenía pirofosfato de sodio 1% (p/v)

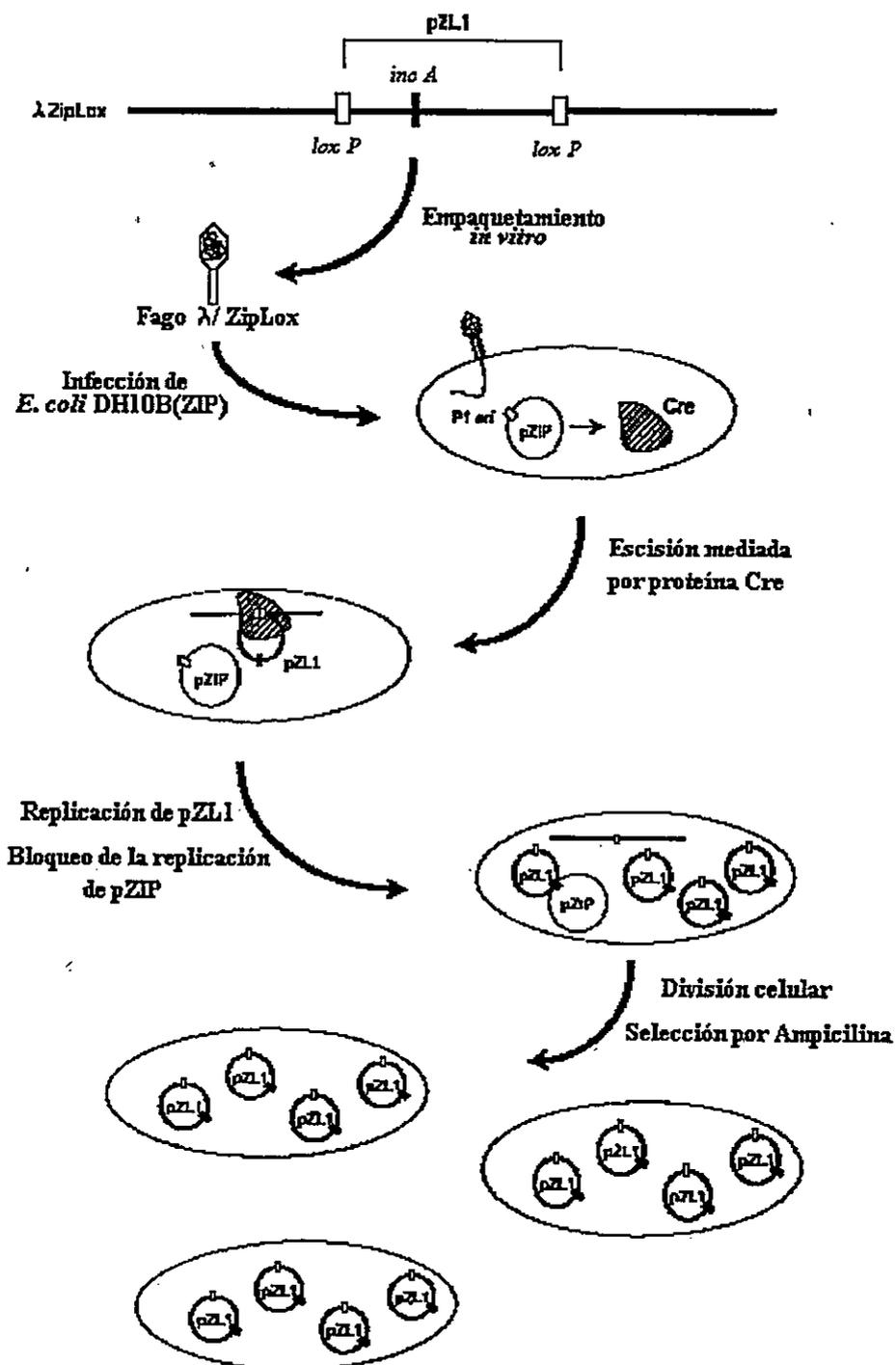


Figura 4. Esquema del proceso de subclonamiento automático de λ ZIPLOX en *E. coli* DH10B(ZIP). Recuperación del cDNA en el plasmidio pZL1.

y una vez con etanol 95% a temperatura ambiente. Los filtros fueron secados y se determinó la cantidad de ^{32}P incorporado en contador de centelleo, mediante la siguiente formula:

$$\text{Cantidad de cDNA } (\mu\text{g}) = \frac{(\text{cpm}) \times (50\mu\text{l} / 10\mu\text{l}) \times (20\mu\text{l} / 2\mu\text{l}) \times (4\text{pmol dNTP} / \text{pmol dCTP})}{(\text{cpm} / \text{pmol dCTP}) \times (3.030\text{pmol dNTP} / \mu\text{g cDNA})}$$

Para este cálculo se utilizó la actividad específica del $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ calculada de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Act. específica (cpm / pmol dCTP)} &= \frac{\text{cpm} / 10\mu\text{l}}{200\text{pmol dCTP} / 10\mu\text{l}} \\ &= \frac{235.000 / 10\mu\text{l}}{200} = 1.177 \text{ cpm} / \text{pmol dCTP} \end{aligned}$$

Así, la cantidad de cDNA de una hebra sintetizado fue de 0,46 μg , lo cual significa un rendimiento de 11,5% tomando en cuenta que se partió de 4 μg de mRNA poli(A)+.

18.2.- Síntesis de la segunda hebra de cDNA. Paralelamente al cálculo de rendimiento de la primera hebra, a los 18 μl restantes se les agregó los siguientes componentes: 93 μl de H_2O , 30 μl de 5X amortiguador segunda hebra, 3 μl de dNTPs 10 mM (c/u), 1 μl de DNA ligasa de *E. coli* (10 U), 4 μl de DNA polimerasa de *E. coli* (40 U) y 1 μl de RNasa H de *E. coli* (2 U), en un volumen total de 150 μl .

Después de 2 hrs de incubación a 16°C, se agregó 2 μl (10 U) de T4 DNA polimerasa y se continuó la incubación a 16°C por 5 min adicionales. La reacción fue detenida por adición de 10 μl de EDTA 0,5 M pH 8,0. La mezcla fue extraída

con 1 volúmen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:23:1) y la fase acuosa fue precipitada con 2 volúmenes de etanol 95% (-20°C) y 1/2 volúmen de acetato de amonio 7,5 M. Después de centrifugación por 20 min en microcentrífuga, la pella fue lavada con 0,5 ml de etanol 70% y secado a 43°C centrifugando por 10 min al vacío.

La pella de cDNA fue resuspendido en 25 μ l de H₂O y se le agregó 10 μ l de 5X amortiguador para T4 DNA Ligasa, 10 μ l del adaptador Sal I (10 μ g) y 5 μ l (5U) de T4 DNA ligasa. Luego de 20 hrs de incubación a 16°C se agregó 2,5 U más de enzima y se continuó la incubación a temperatura ambiente por 4 hrs. Posteriormente, la mezcla fue extraída con fenol:cloroformo:alc. isoamílico, precipitada con etanol 95% en medio de acetato de amonio 2M, lavada con etanol 70% y secada a 43°C por 10 min. La pella de cDNA fue resuspendido en 41 μ l de H₂O y se adicionó 5 μ l de amortiguador de reacción para Not I y 4 μ l (60 U) de Not I. La digestión fue incubada 2 hrs a 37°C. Al término de la incubación el cDNA fue limpiado, precipitado y secado, como se describió anteriormente.

Después de la digestión con Not I, el conjunto de cDNAs fue disuelto en amortiguador TEN (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM, NaCl 25 mM) y sujeto a cromatografía en columna de exclusión molecular equilibrada en el mismo amortiguador. Se colectaron 18 fracciones de aproximadamente 36 μ l en tubos eppendorf y se midió el volúmen acumulativo para descartar las fracciones colectadas después de 550 μ l. Las fracciones restantes se colocaron directamente en un contador de centelleo, en el canal de tritio, para determinar las cuentas Cerenkov superiores al background (>100 cpm). Para aquellas fracciones cuyas cuentas exceden el background se determinó la cantidad de cDNA de doble hebra contenida utilizando la ecuación siguiente:

$$\text{Cantidad cDNA (ng)} = \frac{\text{Cerenkov cpm} \times 2 \times (4 \text{ pmol dNTP} / \text{pmol dCTP}) \times (1.000 \text{ ng} / \mu\text{g cDNA})}{\text{Act. esp. (cpm} / \text{pmol dCTP)} \times (1.515 \text{ pmol dNTP} / \mu\text{g cDNA})}$$

Los valores calculados fueron divididos por el volúmen de cada fracción para obtener la concentración de cDNA de doble hebra. Aproximadamente 81 ng de cDNA, contenido en 191 μl , fue precipitado a -20°C con 2 volúmenes de etanol 95% en presencia de acetato de amonio 2M y de 5 μg de tRNA de levadura. Después de centrifugación la pella fue lavada con etanol 70% y secado a 43°C por 10 min antes de proceder a la ligación al vector λ/ZipLox .

El cDNA seco fue resuspendido directamente en los siguientes componentes: 1 μl de 5X amortiguador ligasa, 2 μl de vector λ/ZipLox (500 ng), brazos Not I-Sal I, 1 μl de H_2O y 2 μl de T4 DNA Ligasa (2U). La mezcla se incubó a 22°C por 3 hrs para posteriormente proceder al empaquetamiento de toda ella usando un kit Packagene^R Lambda DNA Packaging System de Promega. Una alícuota del extracto (50 μl) fue descongelada en hielo, mezclada con toda la reacción de ligación e incubada a 22°C por 3 hrs. Luego, 445 μl de amortiguador-fago (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 100 mM y MgSO_4 10 mM) y 25 μl de cloroformo fueron agregados sobre la mezcla y homogenizados por inversión. El fago empaquetado fue almacenado a 4°C hasta su uso.

18.3.- Infección de *E. coli* Y1090(ZL) con el DNA empaquetado. El día anterior a la ligación del cDNA al vector, una colonia de la cepa *E. coli* Y1090(ZL) fue crecida a 37°C toda la noche en 10 ml de medio LB conteniendo maltosa 0,2% (p/v) y MgSO_4 10 mM. Este precultivo fue utilizado para inocular 50 ml de

medio LB suplementado con maltosa 0,2% y $MgSO_4$ 10 mM, el que fue crecido hasta una OD_{600} de 0,6-0,8, previo a la infección.

Con el fin de calcular el título de la genoteca, varias diluciones de la reacción de empaquetamiento (1/10, 1/100, 1/1.000 y 1/10.000) fueron preparadas en amortiguador-fago (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 100 mM y $MgSO_4$ 10 mM). Alícuotas de 100 μ l del fago diluido fueron adsorbidas por 30 min a 37°C (sin agitación) sobre 100 ml de células *E. coli* Y1090(ZL) preparadas previamente. Luego, 3 ml de agar-blando (45°C) fueron agregados sobre las reacciones de infección, mezcladas por inversión y depositadas sobre placas agar-base LB precalentadas a 37°C. Una vez endurecido el agar-blando las placas fueron invertidas e incubadas a 37°C toda la noche. Placas de lisis de alrededor de 2 mm fueron contadas y se calculó el título del fago y la eficiencia de empaquetamiento, de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Título del fago}}{(\text{pfu / ml})} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de placas de lisis} \times \text{factor de dilución}}{\text{Volúmen del extracto plaqueado}}$$

El título resultante de este cálculo fue de $0,5 \times 10^5$ pfu/ml. La eficiencia de empaquetamiento fue calculada como sigue:

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{pfu / ml}}{\text{conc. del DNA vector empaquetado}} = \frac{\text{recombinantes}}{\mu\text{g DNA}}$$

El título calculado para el fago fue de 1×10^5 recombinantes/mg de DNA, lo que está 100 veces bajo el óptimo y la eficiencia es alrededor de 10 veces la ideal. Así, la dilución 1/10 del fago fue utilizada para infectar la cepa

Y1090(ZL), obteniéndose alrededor de 25.000 placas de lisis, las cuales fueron utilizadas para una primera búsqueda de los cDNA de MnP.

18.4.- Búsqueda de cDNA de MnP en la genoteca preparada en λ /ZipLox. Las placas que contenían halos de lisis fueron incubadas hasta obtener placas de lisis de por lo menos 2 mm de diámetro, pero no confluentes. Después de almacenar las placas a 4°C por al menos 30 min, los fagos fueron transferidos a membranas de nylon Nytran de 82 mm de diámetro por 10 min a temperatura ambiente. Las membranas de nylon fueron posteriormente dispuestas sobre papel filtro humedecido en NaOH 0,5 M-NaCl 1,5 M por 10 min, para desnaturar los ácidos nucleicos, y luego sobre filtros saturados en Tris-HCl 1 M pH 8,0-NaCl 1,5 M por 10 min adicionales, para su neutralización. Posteriormente, las membranas fueron puestas sobre papel filtro saturado en 2X SSC por 10 min, para luego ser secadas al aire. El DNA fue inmobilizado a las membranas disponiendo estas directamente sobre un transiluminador UV de onda corta por espacio de 30 seg.

Los ácidos nucleicos fueron prehibridados incubando las membranas Nytran por 1 hora a 42°C, con suave agitación, en una solución que contenía formamida desionizada 35%, SSPE 5%, 3X solución Denhardt's, SDS 0,1% y 50 mg/ml de DNA de espermio de salmón denaturado. La hibridación fue llevada a cabo toda la noche, en las mismas condiciones de estrictez anteriores, pero la solución contenía además 1 μ g de la sonda MnP15-2 marcada por "nick translation" con [α -³²P]-dCTP. Después de la hibridación las membranas fueron lavadas dos veces por 15 min con 5X SSC-SDS 0,5%, dos veces por 15 min con 1X SSC-SDS 0,5% y una vez por 15 min con 0,1X SSC-SDS 1,0%. Todos los lavados fueron realizados a 42°C-45°C con agitación. Las membranas fueron

secadas al aire y expuestas toda la noche a -70°C , usando films XAR-5 de Kodak y pantalla intensificadora.

18.5.- Escisión del cDNA de los clones en el plasmidio pZL1 desde λ /ZipLox.

La cepa *E. coli* DH10B(ZIP) fue crecida a 37°C toda la noche en medio LB que contenía $10\ \mu\text{g/ml}$ de kanamicina, para ser infectada con los fagos recombinantes. Las placas de lisis seleccionadas fueron succionadas con una punta de pipeta automática de $200\ \mu\text{l}$ cortada y estéril, y luego transferidas a tubos Eppendorf de $1,5\ \text{ml}$ estériles que contenían $250\ \mu\text{l}$ de amortiguador de dilución del fago [Tris-HCl $50\ \text{mM}$ pH 7,9, NaCl $100\ \text{mM}$, MgCl_2 $10\ \text{mM}$, gelatina $0,01\%$ (p/v)]. La mezcla fue agitada vigorosamente en vortex por 10 seg e incubada a temperatura ambiente por 5 min. Luego, $25\ \mu\text{l}$ del sobrenadante de lavado fueron mezclados con $100\ \mu\text{l}$ de la cepa *E. coli* DH10B(ZIP) en un tubo Eppendorf estéril e incubado por al menos 5 min a temperatura ambiente, luego de lo cual toda la mezcla fue colocada sobre agar LB que contenía $100\ \mu\text{g/ml}$ de ampicilina y de MgCl_2 $10\ \text{mM}$. Las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C . En todos los experimentos la escisión fue muy eficiente, rindiendo más de 200 colonias con la célula huésped.

19.- Métodos misceláneos.

La concentración de proteínas se determinó por el método colorimétrico de Bradford (1976), que se basa en la unión del azul de Coomassie G-250 a la proteína produciéndose un máximo de absorbancia a $595\ \text{nm}$.

La medición de la conductividad se realizó en un conductímetro Radiometer (Copenhague), interpolando las lecturas en una curva de calibración de NaCl, determinándose así la concentración de sal presente en la muestra.

La concentración de oligonucleótidos sintéticos fue determinada a 260 nm. Una unidad de $A_{260} = 30 \mu\text{g/ml}$. Un oligonucleótido de 17 mer corresponde a 5 ng/pmol.

Las secuencias aminoacídicas N-terminales fueron realizadas en un Applied Biosystem Gas Phase 475, en el Biotechnology Center de la Universidad de Wisconsin, USA. Las secuencias fueron alineadas mediante el método de Lipman y Pearson (1985) utilizando el programa DNASTar.

Los análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas fueron realizados mediante los programas PCGENE de Intelligenetics, DNASTar (DNASTAR, Inc.) y BLAST (NCBI).

RESULTADOS

I.- Estudios enzimológicos.

Investigaciones preliminares de este grupo indicaban que *C. subvermispora* secreta al medio MnP y lacasa (Rüttimann-Johnson y cols., 1993). Estas actividades se presentan como múltiples bandas en un isoelectroenfoque analítico revelado por actividad usando diferentes sustratos que generan color al ser oxidados por estas enzimas. Por lo tanto, fue necesario desarrollar y establecer un ensayo general, que permitiera en principio, determinar la presencia o ausencia de una u otra actividad en diferentes tiempos de cultivo o condiciones de crecimiento del hongo. Además, este ensayo general permitiría aislar y luego caracterizar en cuanto a su pI, masas moleculares y secuencia aminoacídica amino-terminal, cada una de éstas bandas de actividad de MnP y lacasa, como también afirmar o descartar la existencia de otras actividades oxidativas extracelulares del hongo. La secuenciación aminoacídica amino-terminal constituiría al mismo tiempo una primera aproximación sobre el número de genes codificantes para estas enzimas en este organismo.

1.- Establecimiento de un ensayo general de actividad en geles analíticos de IEF.

Un extracto extracelular del hongo crecido 15 días en medio salino líquido fue sometido a IEF en el rango de pH 3-6 como se indica en Materiales y Métodos. El gel fue cortado en cuatro secciones, las cuales fueron reveladas bajo diferentes condiciones (Fig. 5). Cuando la solución de revelado contenía solamente el sustrato, esto es 4-cloro-1-naftol, varias bandas fueron observadas entre pH 3,45 y 3,65. Estas bandas también fueron observadas cuando la catalasa estaba presente en la solución de revelado, sugiriendo fuertemente que ellas

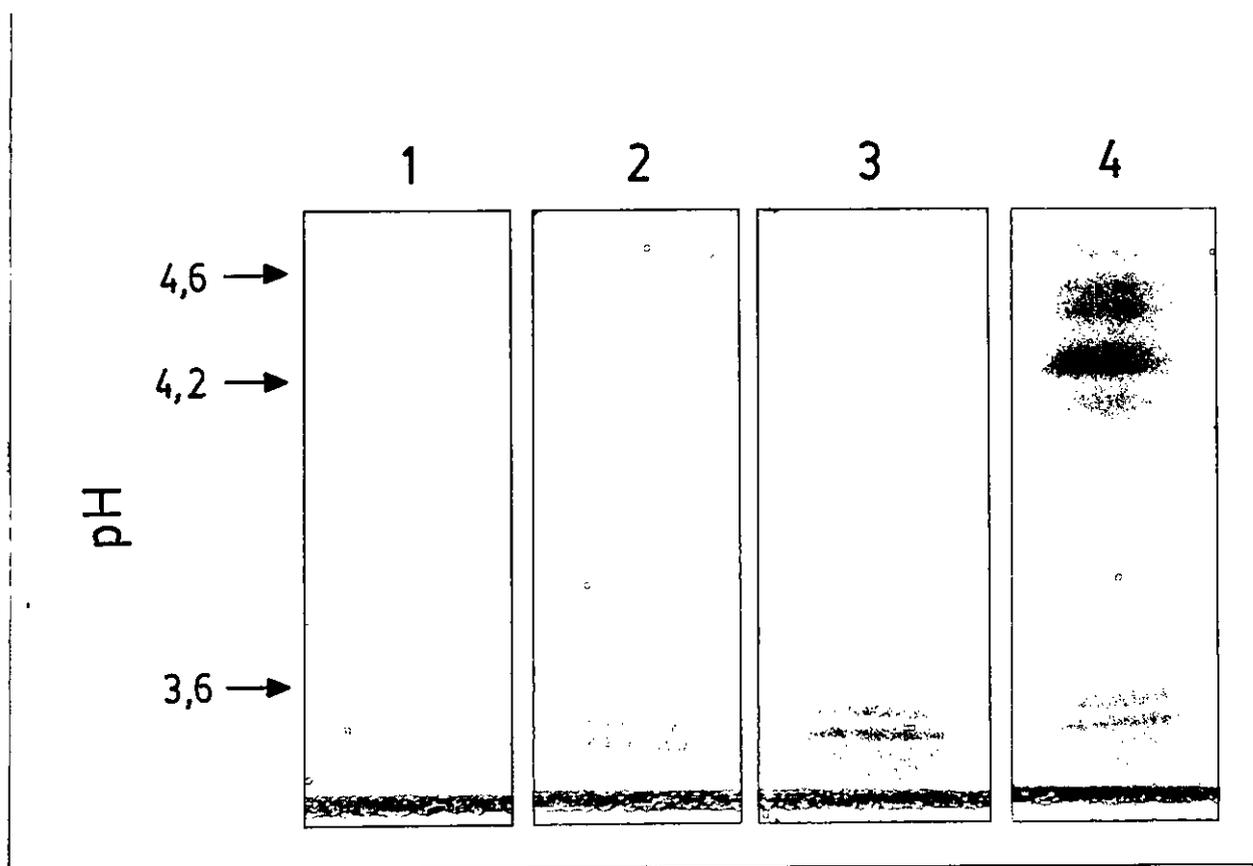


Figura 5. Análisis por IEF de enzimas ligninolíticas producidas por *C. subvermispora* en cultivos de composición definida. Cada gel fue desarrollado en una solución que contenía 4-cloro-1-naftol como sustrato, en las siguientes condiciones: en ausencia de H_2O_2 y Mn^{+2} (línea 1); con H_2O_2 (línea 2); con Mn^{+2} (línea 3); y en presencia de H_2O_2 y Mn^{+2} (línea 4).

corresponden a isoformas de lacasa. La adición por separado de peróxido de hidrógeno o de Mn^{+2} a la solución de revelado no alteró significativamente el patrón de bandas (Fig. 5, líneas 2 y 3). En este punto es importante hacer notar que de existir bandas con actividad lignina peroxidasa, estas serían detectadas con solución de revelado que contiene peróxido de hidrógeno (Fig. 5, línea 2), por lo que se puede afirmar que *C. subvermispora* no presenta esta actividad en estas condiciones de cultivo. Sin embargo, cuando peróxido de hidrógeno y Mn^{+2} fueron agregados simultáneamente, varias bandas aparecieron entre pH 4,1 y 4,6, indicando que corresponden a isoformas de MnP (Fig. 5, línea 4). Cuando este ensayo de revelado se realizó utilizando rojo de fenol, ABTS o guaiacol como sustratos, se obtuvo el mismo patrón de bandas, pero estas tinciones son técnicamente difíciles de fijar por lo cual se prefirió siempre utilizar el 4-cloro-1-naftol como sustrato. Este hecho absolutamente inusual en hongos ligninolíticos, que por lo general poseen dos o tres isoenzimas de MnP, determinó la necesidad de estudiar la aparición de las diferentes isoformas de MnP y lacasa en diversas condiciones de cultivo del hongo. Así, se podría determinar si estas actividades eran diferencialmente expresadas en el tiempo o en una condición especial de cultivo del hongo, de manera de encontrar una condición que simplificara el perfil isoenzimático. Esta multiplicidad podría tener su origen en una paulatina degradación por proteólisis o en una distinta modificación post-traducciona de una misma proteína, o bien deberse a la aparición de productos génicos diferentes.

2.- Isoenzimas producidas en cultivos líquidos de composición definida.

Se hicieron varios intentos por simplificar el patrón observado para obtener en lo posible una aparición preferencial de alguna isoforma particular de cada

actividad. En primer lugar, se estudió el efecto de la concentración de Mn^{+2} en el medio de cultivo. Los cultivos estándares de *C. subvermispora* contienen 11 ppm de Mn^{+2} , debido a que a esta concentración los títulos de actividad MnP y lacasa son los más altos (Rüttiman y cols., 1992). Por lo tanto, para propósitos comparativos, el hongo fue crecido en un medio salino conteniendo 0,3, 11, 25, y 40 ppm de Mn^{+2} y las isoenzimas fueron analizadas mediante IEF (Fig. 6). Con 11 ppm de Mn^{+2} en el medio de cultivo se obtuvo el patrón de bandas de MnP que se esperaba (comparar Fig. 6a, línea 2 con Fig. 5, línea 4). En cambio a concentraciones de Mn^{+2} de 25 y 40 ppm, se producen preferencialmente las isoformas de MnP de mayor pI (Fig. 6, líneas 3, 4 y 5). En el caso de la lacasa, una isoforma de pI 4,7 se encontró presente en los cultivos que contenían 0,3, 25 y 40 ppm de Mn^{+2} , pero no en el cultivo con 11 ppm de Mn^{+2} (Fig. 6a y 6b, líneas 1, 3, 4 y 5). Esta isoforma de lacasa fue ocasionalmente detectada en varios cultivos del hongo realizados en este estudio, incluso en aquellos que contenían 11 ppm de Mn^{+2} . Hasta el momento ha sido imposible determinar las condiciones que determinan la aparición de esta isoforma de lacasa de alto pI, así como su relación con las isoformas de bajo pI.

Con el objeto de ver si las diferentes isoformas de MnP y lacasa eran diferencialmente detectadas con el tiempo de cultivo, extractos extracelulares del hongo fueron cosechados a diferentes tiempos, concentrados y analizados mediante IEF en el rango de pH 3-6. Se pudo apreciar que a partir del octavo día de crecimiento del hongo en medio salino, las diferentes isoformas de MnP aparecen simultáneamente, no observándose la presencia de bandas correspondientes a lacasa. Las bandas correspondientes a esta última enzima fueron recién detectadas a partir del día 13 de crecimiento. Estos resultados

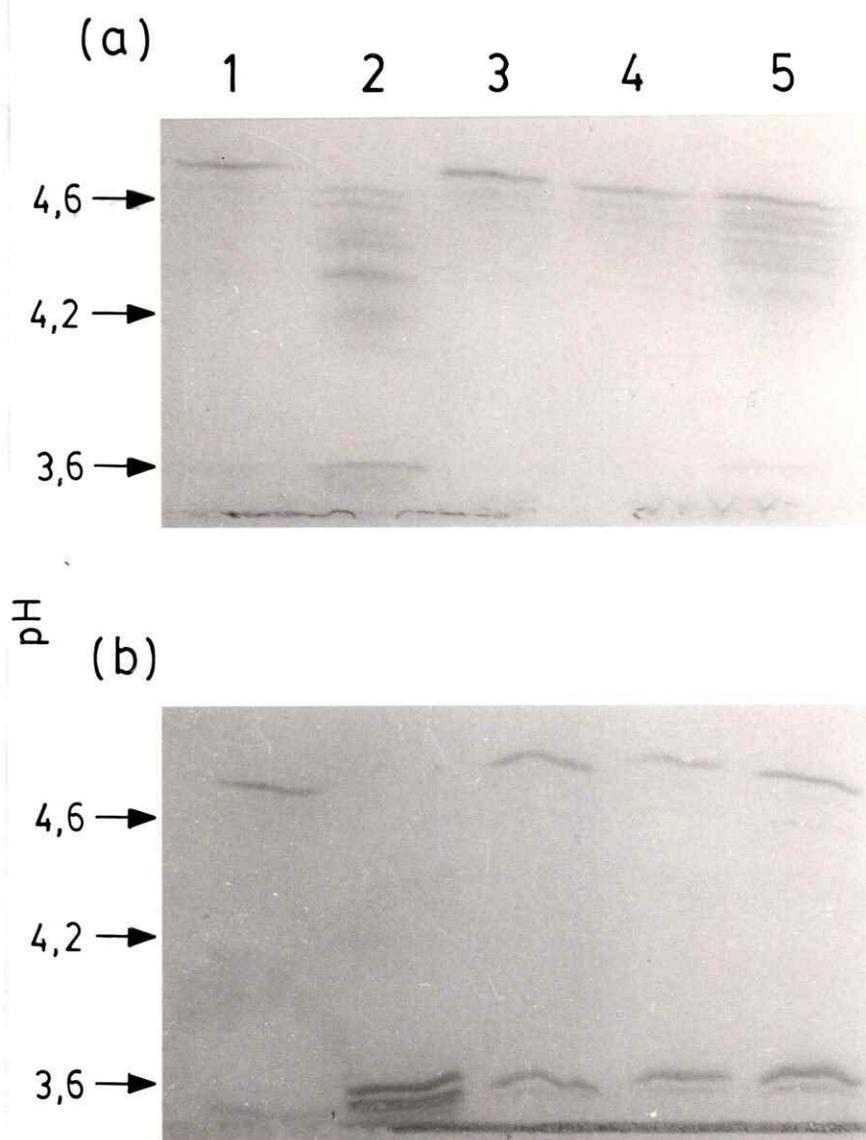


Figura 6. Perfil isoenzimático de MnP (a) y lacasa (b) de *C. subvermispora* en cultivos líquidos salinos con diferentes concentraciones de Mn^{+2} . Líneas: (1) 0,3 ppm, (2) 11 ppm, (3) 25 ppm, (4 y 5) 40 ppm. Las líneas 1-4 contiene 3 μ g de proteína total. La línea 5 en ambos geles fue cargada con la misma cantidad en unidades de actividad de MnP y lacasa que la línea 4. Las actividades de MnP (U/ μ g de proteína) en las muestras cargadas en las líneas 1-4 fueron 15,5, 24,1, 11,4 y 11,0 respectivamente. Las actividades de lacasa (U/ μ g de proteína) fueron 3,4, 31,8, 3,4 y 2,9 respectivamente.

preliminares (no mostrados en esta tesis) sirvieron para planear los siguientes experimentos.

3.- Isoenzimas de MnP producidas en otros medios de cultivo.

Cuando *C. subvermispora* fue crecido en un medio mucho más rico en nitrógeno y carbono que el medio salino normal, como lo es el medio YMPG, la expresión de MnP se vió reprimida (Fig. 7a). Sin embargo, una isoforma de MnP fue inducida en el medio YMPG cuando a éste se le agregó 11 ppm de Mn^{+2} (Figura 7b). Paralelamente, en este laboratorio se realizó el mismo estudio pero creciendo el hongo sobre astillas de madera de pino (Lobos y cols, 1994; Larraín, 1994). El análisis mediante IEF de extraídos de diferentes períodos de cultivo mostró que el patrón de isoformas de MnP es muy diferente al obtenido desde cultivos líquidos. Por su parte, ensayos enzimáticos cuantitativos mostraron dos picos de actividad MnP, los que aparecen en los días 8 y 25. Hasta el día 4 se observaron muy pocas bandas de MnP. Dos de ellas mostraron valores de pI de 4,40 y 4,17, los cuales están en el mismo rango de las MnPs observadas en medio líquido. Sin embargo, también fue posible observar dos isoformas de MnP adicionales cuyos valores de pI de 4,04 y 3,53 no habían sido detectados anteriormente. A partir del día 8 en adelante, cuatro isoformas con valores de pI de 3,53, 3,40, 3,30 y 3,20 fueron observadas. Estos valores de pI están en el rango de los determinados para las isoformas de lacasas aisladas desde medio de cultivos líquidos. Sin embargo, las bandas observadas corresponden a una auténtica actividad MnP, ya que la actividad lacasa no fue detectada mediante IEF después de la segunda semana de cultivo (Larraín, 1994).

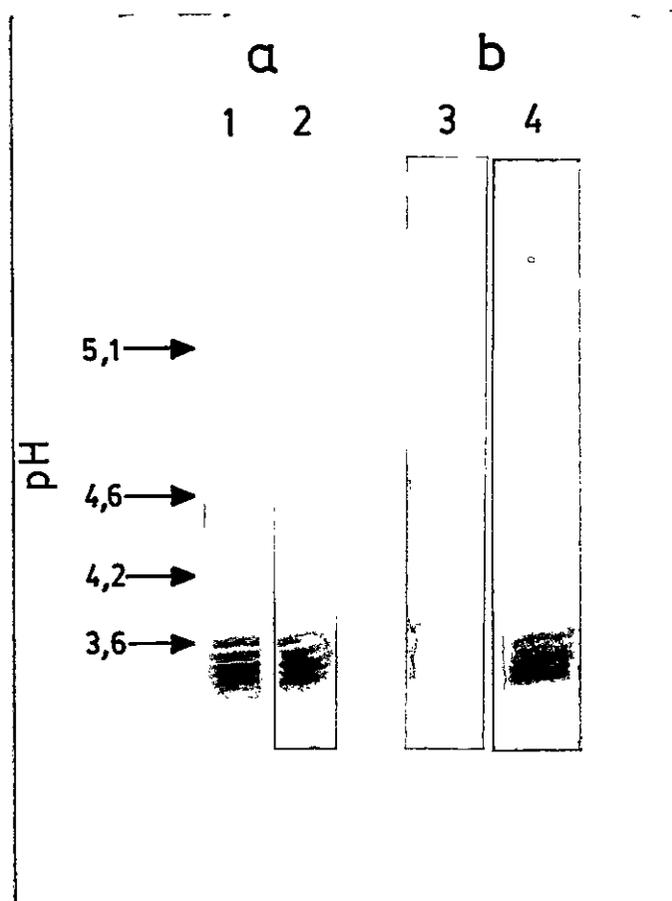


Figura 7. IEF analítico en el rango de pH 3-6 de sobrenadantes de cultivo de *C. subvermispora* creciendo en YMPG. Los sobrenadantes provenían de cultivos en medio rico YMPG en ausencia a) o en presencia b) de 11ppm de Mn^{+2} . Para cada cultivo se determinó por IEF el perfil de isoformas de MnP (líneas 1 y 3) y de lacasa (líneas 2 y 4).

4.- Purificación de las isoformas de MnP de *C. subvermispora* crecido en medio líquido salino.

Para aislar las diferentes isoformas de MnP, el fluido extracelular de cultivos de *C. subvermispora* crecido en medio líquido salino fue fraccionado por cromatografía a través de una columna Q-Sepharosa de intercambio aniónico como se describe en Materiales y Métodos. La Figura 8 muestra el perfil de actividad obtenido después de eluir esta columna con un gradiente lineal de 10 a 600 mM de acetato de sodio pH 6,0. Varias fracciones de esta columna fueron dializadas contra acetato de sodio 10 mM pH 6,0 para disminuir la concentración de sal y proceder a su posterior análisis mediante IEF. En la Figura 9 se puede ver el resultado de este análisis al revelar los geles con ensayos para MnP (Fig. 9A) y lacasa (Fig. 9B). Se puede notar que existen fracciones enriquecidas en MnP y otras en lacasa, las cuales fueron colectadas por separado, concentradas contra 40% PEG en acetato de sodio pH 6,0 y ensayadas mediante IEF analítico. En la Figura 10 se muestra el resultado de este análisis, el que fue aprovechado para calcular el pI de cada una de las bandas correspondientes a MnP y lacasa.

El grupo de MnP aislado desde medio líquido salino obtenido de la cromatografía en Q-Sepharosa, fue sometido a un IEF preparativo en el rango de pH de 3 a 10 en una cámara especialmente diseñada para este propósito, como se describe en Materiales y Métodos. Las distintas bandas correspondientes a isoformas de MnP fueron cortadas del gel y electroeluidas separadamente. La pureza de cada banda de MnP aislada se demostró por IEF analítico teñido mediante oxidación de 4-cloro-1-naftol y subsecuentemente con tinción para proteínas, observándose el mismo patrón de bandas con ambas tinciones. La Figura 11A muestra el gel IEF teñido por actividad.

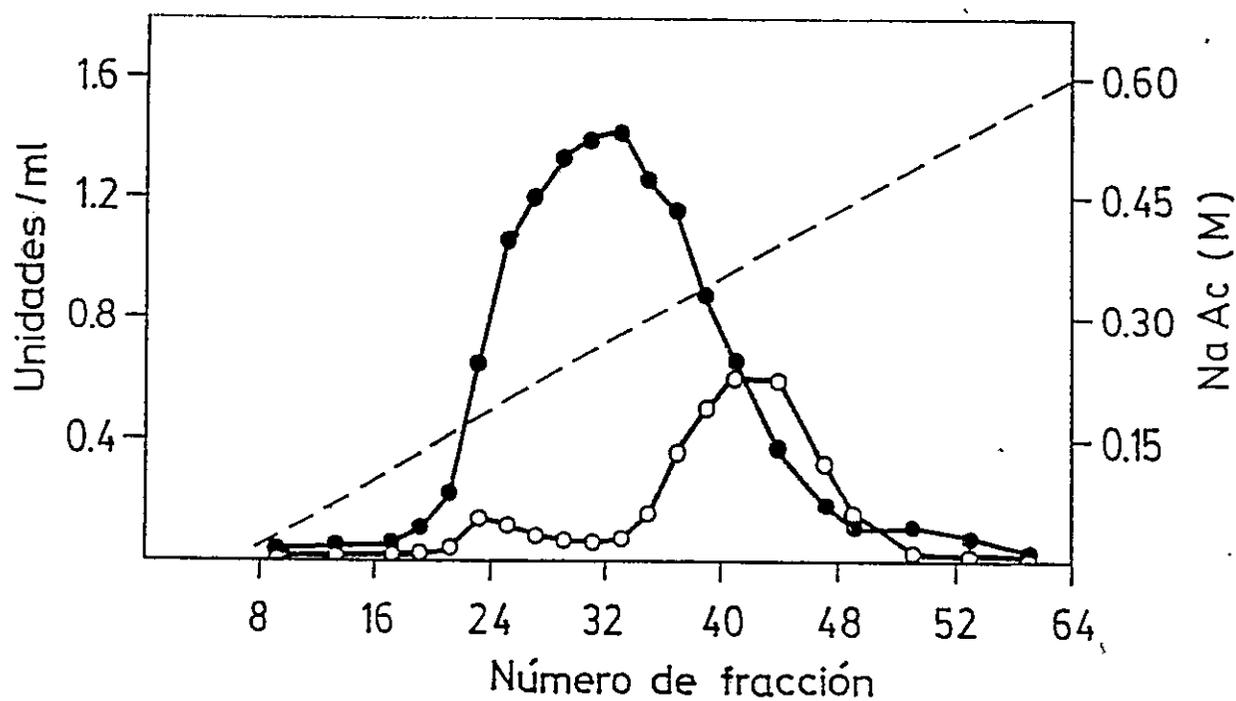


Figura 8. Cromatografía en Q-Sepharose del sobrenadante de un cultivo de *C. subvermispora*. Se creció el hongo por 15 días en medio salino estándar. Se muestran los perfiles de actividad para MnP (●) y lacasa (○), además de los valores de conductividad para el gradiente de NaOAc.

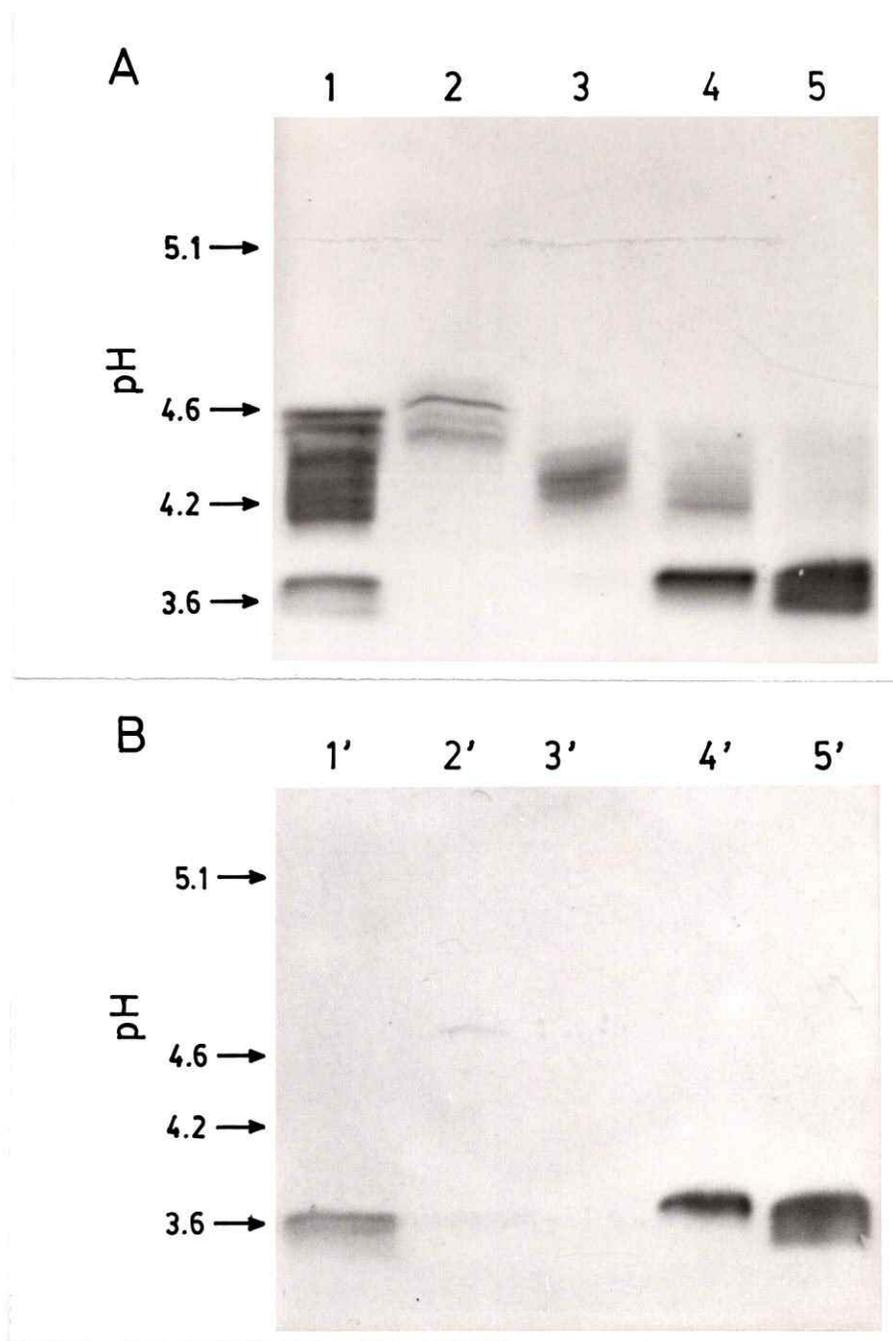


Figura 9. Análisis por IEF de MnP y lacasa en fracciones obtenidas mediante cromatografía Q-Sepharose de un sobrenadante de cultivo de *C. subvermispora*. (A): MnP; (B): lacasa. Los ensayos en geles de IEF fueron realizados utilizando guaiacol como sustrato. Además, los ensayos correspondientes a las líneas 1 a 5 también contienen H_2O_2 y Mn^{+2} . Las

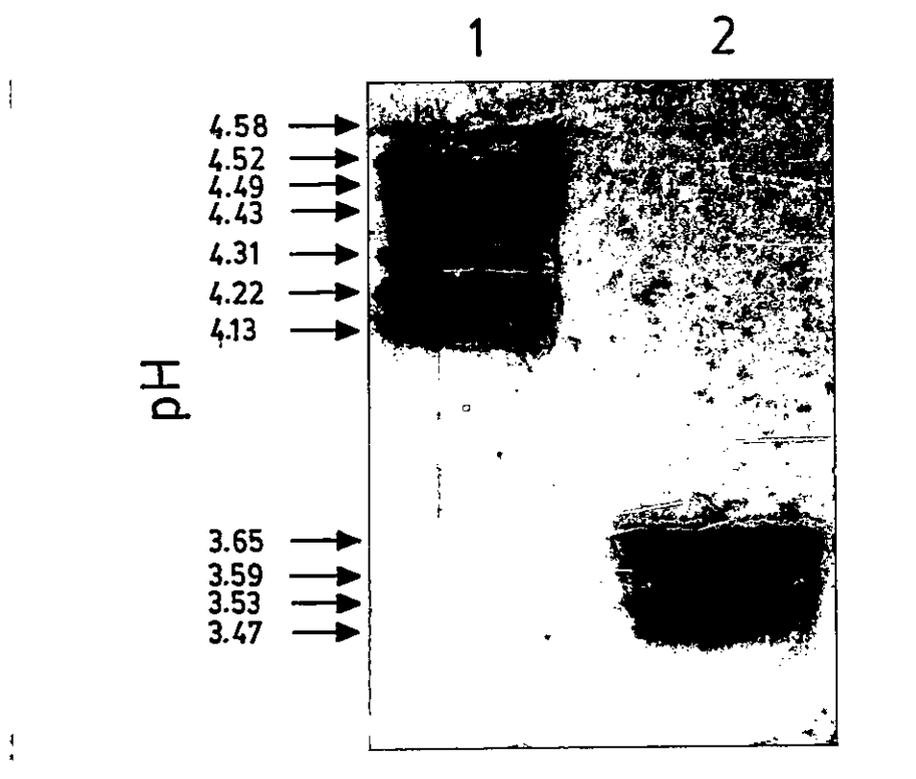


Figura 10. IEF analítico de isoformas de MnP (1) y lacasa (2) de *C. subvermispora* después de fraccionamiento a través de cromatografía en columna de Q-Sepharose. La lacasa de pI 4,7 no se observa en esta muestra.

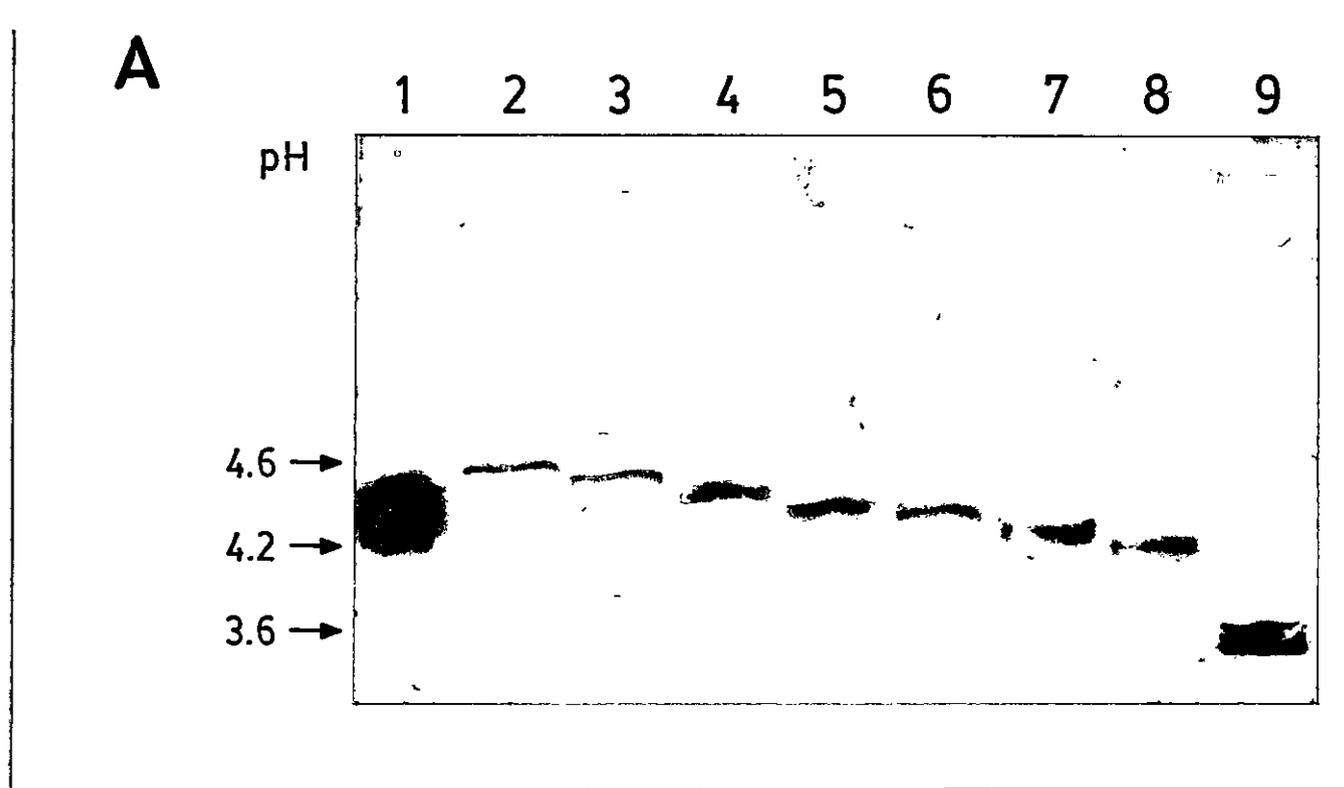


Figura 11. (A) IEF de MnPs de *C. subvermispora*. Línea 1: fracción combinada de MnPs producidas en medio de cultivo líquido salino; líneas 2-8: isoenzimas separadas desde cultivos líquidos (pIs 4,58, 4,52, 4,49, 4,43, 4,31, 4,22, y 4,13, respectivamente); línea 9: fracción combinada de MnPs producidas en cultivos sobre madera.

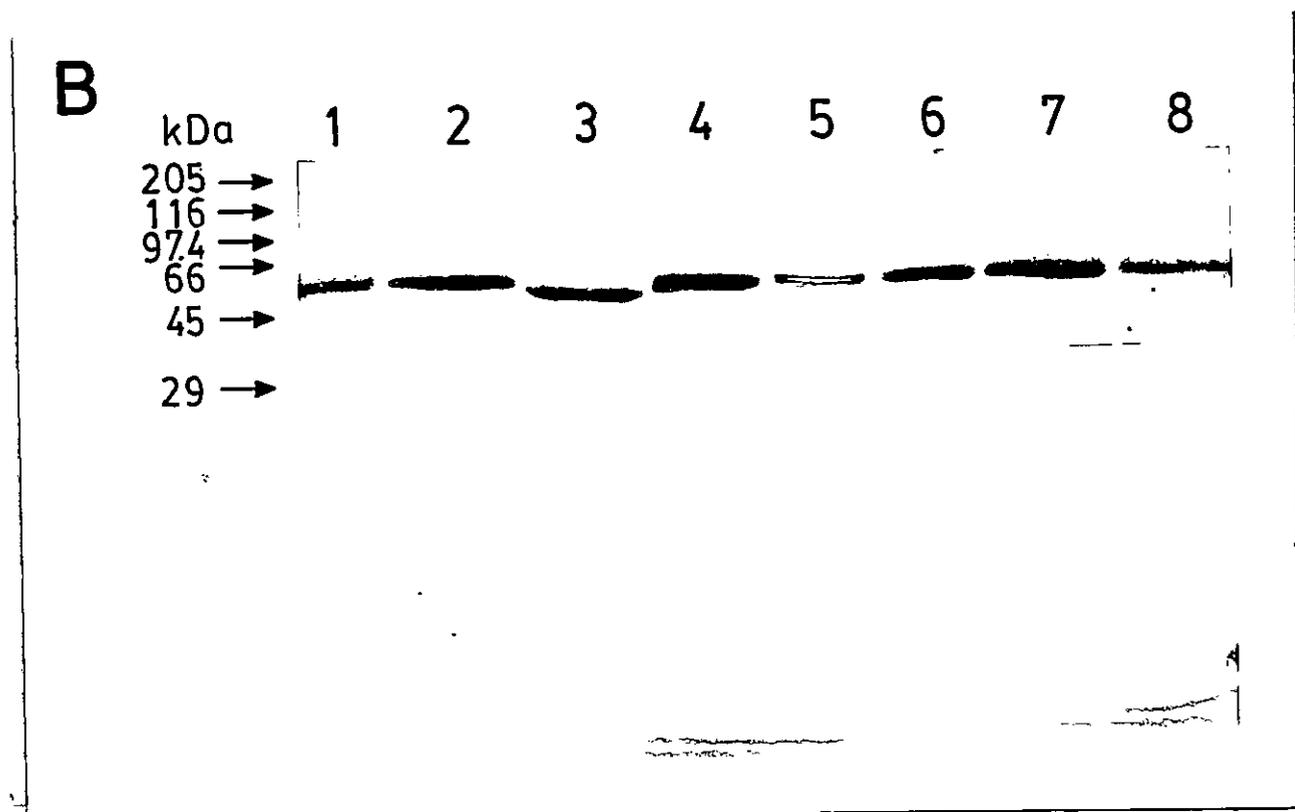


Figura 11. (B) SDS-PAGE al 12% de las MnPs de cultivo líquido aisladas por IEF preparativo. Línea 1: fracción combinada de MnPs; líneas 2-8: MnP₁ a MnP₇ respectivamente. En este experimento, 0,5 µg de proteína fueron aplicados en cada línea. Los números a la izquierda corresponden a los marcadores de masas moleculares (Sigma 6-H, Sigma Chem.). Las bandas de proteína fueron teñidas con nitrato de plata usando un kit "silver stain" de Sigma.

5.- Masas moleculares de las MnPs de *C. subvermispora*.

Paralelamente, cada banda fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% con el objeto de calcular su masa molecular comparando con estándares. La masa molecular así determinada resultó ser de 52.000 daltons para todas las isoenzimas analizadas (Fig.11B). A diferencia de las isoenzimas de medio líquido, las isoenzimas extraídas desde astillas de pino con valores de pI de 3,20, 3,30, y 3,40 mostraron una banda principal correspondiente a una masa molecular de 62,5 kDa, mientras que la isoforma de pI 3,53 mostró bandas de 62,5 y 56 kDa (Larraín, 1994; Lobos y cols., 1994).

6.- Determinación de la secuencia amino-terminal de algunas isoformas de MnP aisladas desde medio líquido salino.

Aproximadamente 20 µg de cada una de las siete bandas de MnP obtenidas fueron desarrolladas en un gel de poliacrilamida SDS al 8% para luego ser transferidas a una membrana Inmobilon la que fue teñida con azul de Coomasie como fue descrito por Matsudaira (1987). La membrana de Inmobilon fue enviada al Biotechnology Center de la Universidad de Wisconsin con el fin de secuenciar el extremo amino-terminal de cada isoforma. La Figura 12a muestra la secuencia N-terminal de las MnPs de pIs 4,21, 4,31, 4,43 y 4,58 producidas en medio de cultivo líquido salino. Estas cuatro secuencias resultaron ser homólogas, aunque claramente distintas, donde los residuos diferentes muestran tener propiedades similares (cambios conservativos). La secuencia N-terminal de otras tres isoformas fue obtenida con alto grado de ambigüedad, por lo que no fueron incluidas en el análisis comparativo.

a		
A I F P A G T R V S N F V R		MnP1-C.s.
G I f P A a T R V S N d V i S D p i p X a H		MnP2-C.s.
G I f P A G T R V S N H V X R X F I P		MnP3-C.s.
A I P P d G T R V S N h v d X d F I S P A q S L		MnP4-C.s.
A I F P A G T R V S N H V . . D F I P . A		consensus 1
<hr/>		
b		
V T X S d G T A v P X a M X X d F I P L X X d l q s m v l q		MnP5-C.s.
V T X S D G T A V P D A M X X D F I P L A Q X l q g x v l q		MnP6-C.s.
V T X S D G T A V P d A M X X d F I P L X X d d		MnP7-C.s.
V T X S D G T A V P D A M X X D F I P L X X D L Q . . V L Q		consensus 2
<hr/>		
c		
A I F P A G T R V S N H V . . D F I P . A		consensus 1
V T X S D G T A V P D A M X X D F I P L X X D L Q . . V L Q		consensus 2
A V X S Q G T R V S N A A X X A F I P L A Q D L Q - T L F M		MnPI-P.s.
A V X P D G T X V N N E A X X A F I P L A Q D L Q E T I F M		MnPII-P.s.
A V X P D G T A V P S T V X X D F I P L A L		MnPIII-P.s.
A T C P D G T K V N N A A C C A F I P L A Q D L Q E T I F Q		MnPH3-P.c.
A V C P D G T R V T N A A C C A F I P L A Q D L Q E T L F Q		MnPH4-P.c.
A V X H P G T X V S X A A X X X F I P L		MnPH5-P.c.
A V C P D G T R V S H A A C C A F I P L A Q D L Q E T I F Q		MnP1-P.c.
A V X P D G T R V X N A A X X A E X P L		MnPP-P.c.
A V G S D G T V V P D S V Q Y D F I P L A Q D L T A X L F E		MnP1-L.e.

Figura 12. Alineamiento de secuencias N-terminales de MnPs. (a, b) Isoenzimas aisladas desde cultivos líquidos y sólidos, respectivamente. Los valores de pI para cada isoenzima fueron: MnP1-C.s., 4,2; MnP2-C.s., 4,3; MnP3-C.s., 4,4; MnP4-C.s., 4,6; MnP5-C.s., 3,4; MnP6-C.s., 3,3; MnP7-C.s., 3,2. Los residuos aminoacídicos en letras minúsculas indican menor seguridad en la determinación y las X residuos desconocidos. c) Las secuencias de consenso para *C. subvermispora* fueron comparadas con las secuencias experimentalmente determinadas de *Phanerochaete sordida*: isoenzimas MnPI-P.s., MnPII-P.s., MnPIII-P.s. (Rüttimann-Johnson y cols., 1994); *P. chrysosporium*: isoenzima H5, MnPH5-P.c. (Pease y Tien, 1992); *P. chrysosporium*: isoenzima purificada de pulpa de madera, MnPP-P.c. (Datta y cols., 1991); MnP de *Lentinus edodes*, MnP1-L.e. (Forrester y cols., 1990). Las secuencias para las isoenzimas MnPH3-P.c. (Orth y cols., 1994), MnPH4-P.c. (Pease y cols., 1989) y MnP1-P.c.

Al mismo tiempo, en este laboratorio y utilizando el mismo protocolo experimental desarrollado en esta tesis, tres isoformas de MnP aisladas desde medio sólido con valores de pI de 3,20, 3,30 y 3,40 fueron secuenciadas en su extremo N-terminal (Larraín, 1994; Lobos y cols., 1994). En contraste a las MnP aisladas desde medio líquido, las secuencias N-terminales de las MnPs extraídas desde astillas de pino no mostraron diferencias significativas, aunque la secuencia de consenso obtenida es claramente diferente a cualquiera de las MnP aisladas desde medio líquido (Fig. 12b).

Al comparar las secuencias N-terminales de las MnP de *C. subvermispora* con las secuencias de todas las MnP publicadas hasta el momento, fue posible determinar que ellas están relacionadas con aquellas de otros hongos de pudrición blanca (Figura 12c). La búsqueda en un banco de datos (SwissProt y PIR release 77) también permitió mostrar que no existe homología significativa de las MnP de *C. subvermispora* con ninguna otra proteína, incluyendo a las lignina peroxidasas.

7.- Producción de lacasa en diferentes medios.

Los niveles de actividad lacasa alcanzados en cultivos de *C. subvermispora* que crecen en medio salino estándar están en el rango de 0,3 a 0,35 U/ml. Para cumplir con el objetivo de purificar esta actividad se exploraron condiciones que enriquecieran su producción. Cuando p-anisidina fue agregada a los cultivos a los 6 días después de la inoculación, se obtuvo un aumento de dos veces en la actividad de la enzima (Tabla 1). Los niveles de lacasa también fueron incrementados cuando el tartrato de amonio fue remplazado por Casaminoácidos (Difco) como fuente de nitrógeno, mientras que la actividad de la enzima fue muy baja cuando el medio salino estándar careció de Mn^{+2} o de Cu^{+2} (Tabla 1).

Tabla 1. Producción de lacasa extracelular por *C. subvermispora* en diferentes medios. Los valores que se muestran corresponden a la actividad a los 15 días de cultivo.

Medio	Actividad (U/ml)
Medio salino	0,32
+ 1mM p-anisidina	0,68
- tartrato de amonio,	
+ 0,3% casaminoácidos	0,67
- Cu+2	0,05
- Mn+2	0,03
Medio YMPG	2,12
+ Mn+2	1,90
+ 1 mM p-anisidina	2,11
Medio salvado de trigo	3,85

Niveles muy altos de lacasa fueron obtenidos al crecer el hongo en medio YMPG, condición que como se dijo anteriormente, causa una desaparición de casi todas las isoformas de MnP en IEF. En contraste a los resultados obtenidos en medio de composición definida, la omisión de Mn^{+2} o la adición de p-anisidina a los cultivos en YMPG tiene solo una menor influencia sobre la producción de lacasa. Sin embargo, los mayores niveles de lacasa fueron obtenidos al crecer el hongo sobre medio salvado de trigo (Tabla 1).

El análisis mediante IEF de las muestras extraídas desde los cultivos llevó al hallazgo que los pIs de las isoenzimas difieren con la composición del medio de crecimiento. A los 15 días de cultivo en medio de composición definida, principalmente dos isoformas con pIs de 3,65 y 3,59 fueron observadas (Fig. 13A), mientras que en YMPG fueron identificadas cuatro lacasas con pIs de 3,76, 3,71, 3,65, y 3,60 (Fig. 13B). En el medio basado en salvado de trigo, cuatro isoformas con pIs de 3,63, 3,57, 3,52 y 3,46 (Fig. 13C y D), y una quinta isoforma con un pI mayor de 4,82, de irreproducible aparición en cultivos de composición definida, fue claramente distinguida (Fig. 13D). En medio sólido, la lacasa alcanzó su máxima actividad durante la primera semana de crecimiento, entre los días 4 y 5, después de lo cual sus niveles comenzaron a disminuir alcanzando niveles muy bajos después de la segunda semana de crecimiento (Lobos y cols., 1994; Larraín, 1994).

8.- Purificación de las lacasas producidas en medio YMPG.

El procedimiento descrito en Materiales y Métodos permitió la purificación de las cuatro isoenzimas detectadas en el medio YMPG (Tabla 2). Previo al IEF, el espectro de absorción del conjunto de las cuatro isoenzimas fue determinado

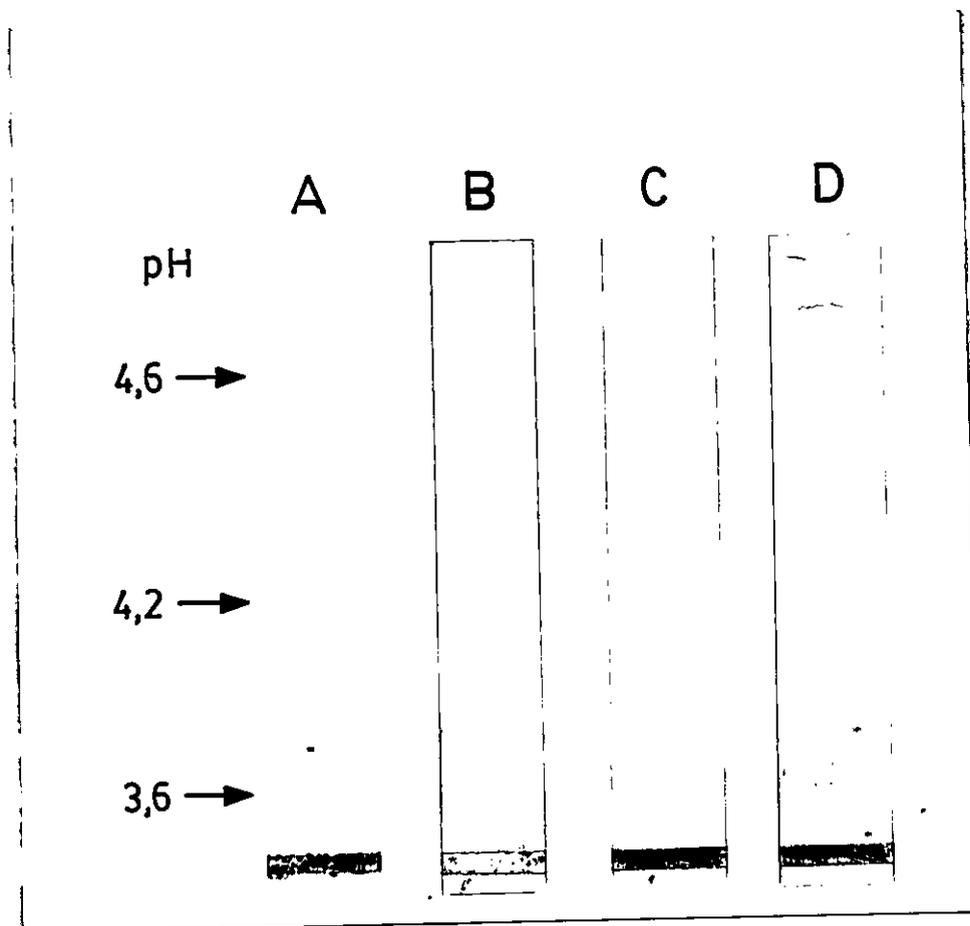


Figura 13. IEF de lacasas secretadas por *C. subvermispora* en medios de cultivo: líquido salino (A), YMPG (B) y salvado de trigo de día 8 (C) y 15 (D).

Tabla 2. Purificación de lacasas desde cultivos de *C. subvermispora* en medio YMPG.

Etapa de purificación	Volúmen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad total (Unidades)	Actividad específica (U/mg de proteína)
Filtrado del cultivo	830	124,5	1.320	10,6
Sulfato de amonio Cromatografía Q-Sepharose	71	27,7	1.115	40,3
	7	17,4	1.547	88,9
IEF				
lacasa pI 3,76	2	0,44	48,6	109,0
lacasa pI 3,71	1,8	0,79	55,4	70,0
lacasa pI 3,65	1,5	0,42	64,3	151,0
lacasa pI 3,60	0,3	0,15	20,4	135,0

(Fig. 14). Se observó un pico de absorción a 600 nm, típico de las proteínas que contienen cobre, revelando un átomo de cobre azul o de tipo I, mientras que un hombro cercano a los 300 nm podría indicar un cobre de tipo III (Reinhammar, 1984). Después del IEF preparativo, la pureza de cada banda de lacasa fue confirmada en geles de IEF analíticos que fueron desarrollados en duplicado, de manera que uno de ellos fue revelado por actividad enzimática y el otro mediante tinción con azul de Coomassie. En cada par de geles bandas únicas fueron observadas con los pIs esperados (datos no mostrados).

Una de las isoenzimas de lacasa, la de pI 3,60, fue seleccionada para determinación del contenido de carbohidratos. Esta isoforma migra en geles de poliacrilamida-SDS como una sola banda con una masa molecular de 79.000 (Fig. 15, línea A). Después de tratamiento con la endoglicosidasa F, la proteína migró en el gel a una posición correspondiente a una masa molecular de 63.000 (Fig. 15, línea B). También es posible observar una banda menor, correspondiente a una masa molecular de 32.000 (Fig. 15, línea B), la cual coincide con lo reportado para la endoglicosidasa F (Tarentino y cols., 1985).

9.- Secuenciación amino terminal de las tres isoformas de lacasa.

Las secuencias amino terminales de las isoenzimas con valores de pI de 3,71, 3,65 y 3,60 fueron determinadas de igual manera que para las MnP. Estas secuencias fueron comparadas con las reportadas para lacasas de otros hongos ligninolíticos (Fig. 16). Como se puede observar, las secuencias lacasa de *C. subvermispora* comparten una identidad significativa entre ellas, y también con las secuencias de lacasas de otros basidiomicetes, existiendo algunas diferencias

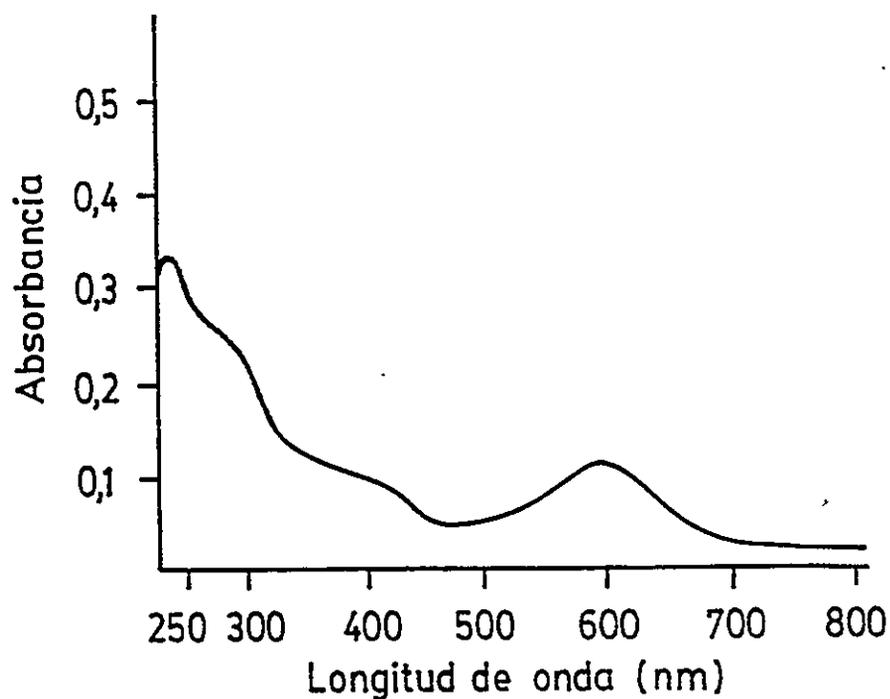


Figura 14. Espectro de absorción de una fracción combinada de cuatro isoformas de lacasa secretadas por *C. subvermispora* creciendo en medio YMPG, obtenidas como se describe en Materiales y Métodos. El espectro fue registrado a 30°C, entre 200 y 800 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160.

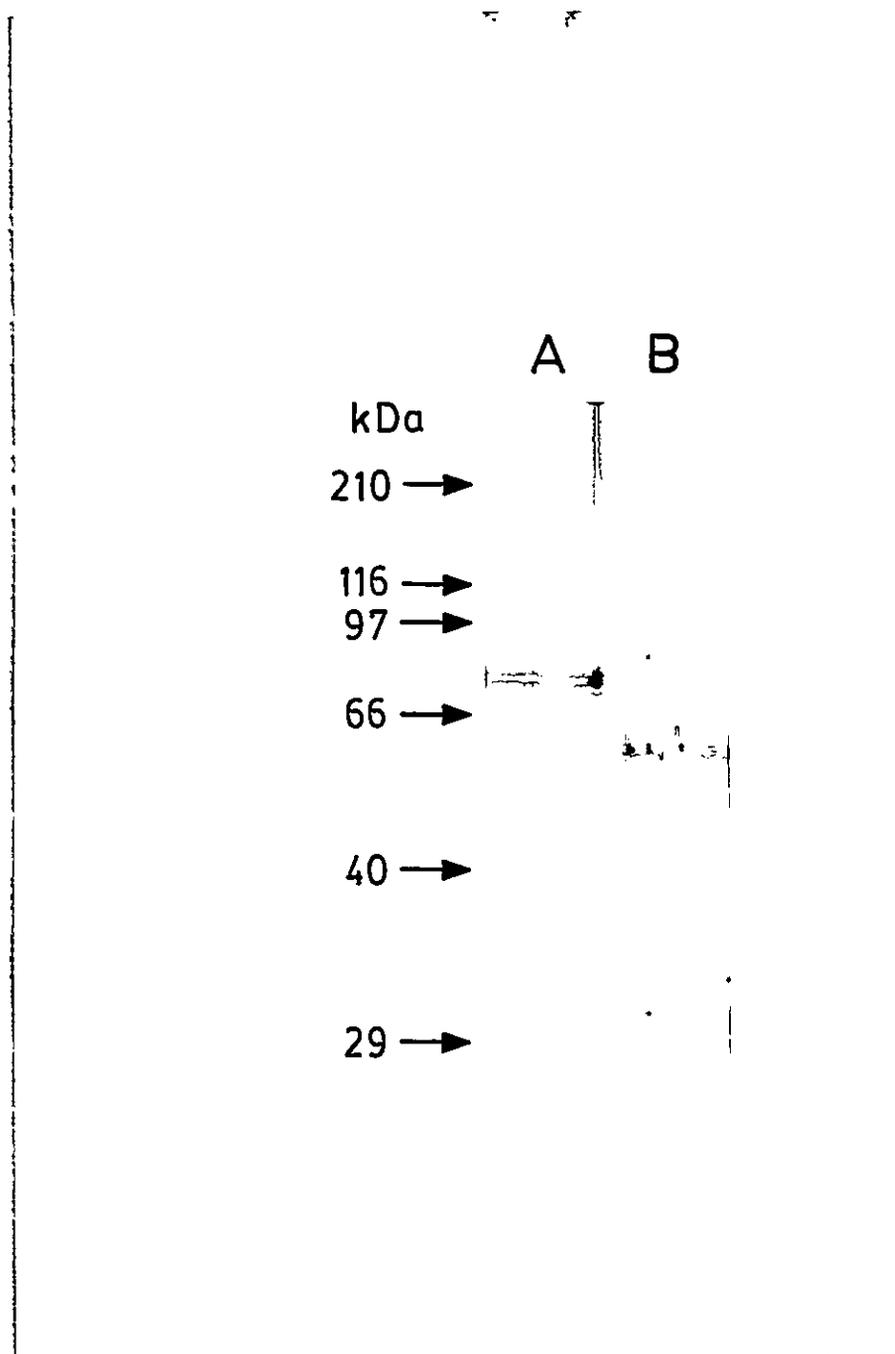


Figura 15. SDS-PAGE al 12% de una de las isoformas de lacasa de *C. subvermispora* (pI 3,6) antes (A) y después (B) de tratamiento con una mezcla de endoglicosidasa F y N-endoglicosidasa F. Cada línea contiene 30 ng de proteína. Los números a la izquierda corresponden a los estándares de masas moleculares (Sigma 6-H, Sigma Chem). Las bandas de proteína fueron teñidas con nitrato de plata usando el kit "silver stain" (Sigma Chem).

	A I G P V T D L T I T N A F V S P D G F S R Q A
C.s. (pI 3.71)	A I G P V T D I E I T D A F V S P D G P G L L K
C.s. (pI 3.65)	A I G P V T D I E I T D A F V S P D G P G L L
C.s. (pI 3.60)	A I G P V T D I E I T D A E V S P P H P P L L R
P.r.	S I G P V T D E H I V N A A V S P D G F S R Q A
PM-1	S I G P V A D L T I S N G A V S P D G F S R Q A
C.v.	G I G P Y A D L T I T N A E V S P D G L S R Q A
C.h.	A I G P T A D L T I S N A E V S P D G F A R Q A
P.o.	A I G P T G D M Y I V N E D V S P D G F T R S A
A.b.	A K T R T F D E F D L V N T R L A P D G F E R D T

Figura 16. Alineamiento de secuencias N-terminales de lacasas de hongos basidiomicetes. Las secuencias aminoacídicas de las isoformas de lacasa de *C. subvermispora* (pIs 3,71, 3, 65 y 3,60) son las únicas determinadas experimentalmente. En las otras especies las secuencias aminoacídicas fueron deducidas de las secuencias nucleotídicas. En la parte superior de la figura se indica la secuencia de consenso. Las abreviaciones usadas y el código de acceso a GenBank son los siguientes: P.r., *P. radiata* (X52134); PM-1, clon de un basidiomicete no identificado (Z12156); C.v., *C. versicolor* (sin código de acceso a base de datos, Iimura y cols., 1992); C.h., *Coriolus hirsutus* (M60561); P.o., *Pleurotus ostreatus* (Z22591); A.b., *Agaricus bisporus* (L10664).

aminoacídicas con cambios conservativos, como por ejemplo I por L, D por E y G por A.

II.- Estudios Genéticos.

La segunda etapa de esta tesis se centró en el estudio genético del sistema ligninolítico del hongo. El clonamiento de los genes codificantes para MnP permitiría confirmar que la multiplicidad enzimática responde a la presencia de varios genes, como lo sugiere la secuenciación aminoacídica N-terminal de las isoformas de MnP. A la vez, la caracterización de al menos un gen de MnP permitiría en el futuro un estudio sobre la regulación en la expresión de esta enzima en diferentes condiciones de crecimiento del hongo, ya que éste podría ser utilizado como sonda homóloga. De ahí que se destinaran amplios esfuerzos al aislamiento de un gen de MnP de *C. subvermispora*. Para lograr lo anterior se utilizaron diferentes estrategias. En primer lugar se intentó, infructuosamente, clonar un gen genómico de MnP. Posteriormente se utilizó RT/PCR con el objeto de amplificar algún cDNA de MnP utilizando oligonucleótidos degenerados contruidos a partir de la secuencia aminoacídica N-terminal, lo que también condujo a resultados negativos. Finalmente, se construyó una genoteca cDNA de *C. subvermispora* en el vector λ ZipLox. Las diferentes estrategias y sus resultados se muestran a continuación.

1.- Análisis mediante Southern blot de DNA genómico aislado de *C.*

subvermispora usando una sonda heteróloga.

Como primera estrategia para el aislamiento de los genes que codifican para MnP de *C. subvermispora*, se intentó el clonamiento de fragmentos de DNA que hibridaran con la sonda MnP15-2 correspondiente al cDNA completo de la MnP-1 de *P. chrysosporium*, en condiciones de baja estrictez. El DNA total del hongo fue aislado y digerido por separado con Hind III y Eco RI y en combinación, como se describe en la sección Materiales y Métodos. El DNA digerido fue hibridado con la sonda MnP 15-2. Uno de los fragmentos de la digestión con EcoRI que dio hibridación positiva contenía un sitio Hind III, razón por la cual se prefirió Eco RI para digerir en forma preparativa el DNA del hongo. Después de la digestión con Eco RI se cortaron tres pedazos del gel de agarosa cubriendo la región que debía contener fragmentos de tamaño semejante a los que fueron positivos en la hibridación. El DNA de tamaño entre 3,5 kpb y 5,5 kpb fue ligado al vector Bluescript KS II y clonado en la cepa *E. coli* DH5 α , como se describe en Materiales y Métodos. 500 colonias transformantes fueron picadas en duplicado en placas LB conteniendo 100 μ g/ml de ampicilina y el indicador Xgal. La búsqueda de clones positivos se realizó en similares condiciones al Southern, utilizando la misma sonda MnP 15-2. 28 clones que dieron reacción positiva fueron analizados mediante minipreparación de sus DNAs plasmidiales y posterior digestión con Eco RI. Todos los insertos de DNA liberados por Eco RI mostraron tamaños aparentemente iguales de aproximadamente 5 kpb. Uno de estos clones denominado 18-5 fue elegido para su posterior secuenciación de DNA.

Con el fin de determinar la región del inserto de DNA del clon 18-5 que podría contener la región N-terminal de la MnP de *C. subvermispora*, se realizó una digestión con la enzima Sau 3AI. Los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa e hibridados en condiciones de baja estrictez, usando el fragmento Sma I que contiene el N-terminal de la sonda MnP15-2 de *P. chrysosporium*. Cuatro fragmentos que dieron reacción positiva con la sonda MnP15-2/SmaI fueron subclonados en *E. coli* DH5 α usando el mismo vector Bluescript KSII. Todos los clones con tamaños entre 600 y 900 pb fueron secuenciados y sus secuencias de DNA fueron alineadas con las existentes para MnP-1 y MnP-2 de *P. chrysosporium*, mediante el programa de manejo de secuencias DNA Star. No se obtuvo ningún valor de homología significativo. Las secuencias obtenidas con el clon 18-5 y sus correspondientes subclones abarcaron cerca de 1kpb, no encontrándose homologías significativas a ninguna secuencia de MnP descrita. Por lo tanto, esta estrategia fue desestimada por considerarse muy artefactual debido a la baja estrictez en las condiciones de hibridación y a que la sonda MnP15-2 posee un contenido de G + C extremadamente alto en su región codificante, permitiendo así un alto número de hibridaciones inespecíficas.

2.- Amplificación de cDNAs que codifican para MnP de *C. subvermispora* mediante el protocolo RACE (Rapid Amplification of cDNA ends).

Después de obtenidas las secuencias aminoacídicas N-terminales para las diferentes isoenzimas de MnP aisladas desde *C. subvermispora*, se diseñaron oligonucleótidos sintéticos degenerados para ser usados como partidores para la amplificación por PCR de cDNAs que codifican para MnP de *C. subvermispora*. Tres diferentes oligonucleótidos partidores 3'amp degenerados fueron diseñados a

partir de la secuencia aminoacídica N-terminal obtenida para las MnP aisladas. El diseño se realizó utilizando el programa DNA Star y considerando los codones de mayor uso en el basidiomicete *P. chrysosporium*. El RNA total del hongo fue aislado en el día 10 de cultivo como se describe en Materiales y Métodos. Un µg de RNA total fue transcrito mediante transcriptasa reversa usando como partidor un oligo(dT)-adaptador, para obtener los cDNAs de hebra simple. Posteriormente se utilizaron dos partidores para la amplificación por PCR, uno de los cuales siempre fue la secuencia adaptadora, sin oligo(dT), y el segundo correspondió al partidor degenerado diseñado a partir del N-terminal de la proteína (3'amp). Se variaron las concentraciones de los partidores hasta obtener inmejorables reacciones RT/PCR, lo que se revelaba por la aparición de amplificadores cDNA discretos cuando las reacciones RT/PCR eran analizadas por electroforesis en geles de agarosa. Además, siempre se introdujeron controles en cada reacción RT/PCR, los que consistían en excluir de la reacción de amplificación ya sea al partidor adaptador o al partidor específico 3'amp. Si al excluir el partidor específico algún determinado fragmento cDNA amplificado desaparecía comparado con la reacción completa, se daba por entendido que se trataba de un fragmento cDNA específico de interés. Estos cDNAs fueron clonados directamente usando el kit PCR II de Invitrogen y posteriormente secuenciados. Las secuencias amino terminales obtenidas fueron alineadas con las correspondientes a MnP de *P. chrysosporium* mediante el programa DNASTar y también fueron enviadas a una base de datos de secuencias nucleotídicas usando el servidor NCBI BLAST. Uno de estos clones mostró homología con una región del gen de la manganeso superóxido dismutasa de *Hevea brasiliensis*. Ningún otro cDNA mostró más de un 40% de homología con los cDNA completos de las

MnPs de *P. chrysosporium*, en circunstancias de que era esperable una homología de al menos un 60% a nivel nucleotídico debido a la similitud entre las secuencias aminoacídicas N-terminales.

De los resultados anteriores se deduce que el protocolo RACE puede ser una eficiente herramienta cuando se trata de amplificar usando partidores poco degenerados. En este caso solo se lograron innumerables fragmentos cDNA sin la homología esperable con las secuencias MnP existentes, probablemente debido al alto grado de degeneración de los oligonucleotídos diseñados.

3.- Amplificación de cDNAs de MnP mediante un protocolo PCR de dos etapas que utiliza oligo(dT) y un partidor específico.

Debido a que los partidores diseñados a partir de las secuencias amino-terminales de las MnP aisladas desde *C. subvermispora* no se aparearon en forma específica, se recurrió a la estrategia de llevar a cabo un PCR asimétrico con nuevos partidores. En una primera etapa el RNA total aislado desde el hongo crecido hasta el día 10, fue transcrito utilizando oligo(dT)₁₅₋₁₈ como partidor. Posteriormente, en la primera amplificación por PCR se agregó solamente el partidor específico, y se amplificó por 20 o hasta 35 ciclos. Luego en el segundo paso del PCR se amplificó utilizando solo oligo(dT) por 35 ciclos extras. Este protocolo rindió un patrón de amplificados muy discreto con tamaños cercanos al esperado, considerando la masa molecular de las MnPs. Uno de estos amplificados fue secuenciado sin lograrse los resultados esperados.

4.- Construcción de una genoteca cDNA de *C. subvermispora* en el vector λ ZipLox.

Paralelamente a los intentos por amplificar cDNAs correspondientes a MnP de *C. subvermispora* a partir de RNA total del hongo, se procedió a la construcción de una genoteca cDNA. Para ello se purificó el mRNA poli(A) aislado el día 10 de cultivo del hongo en medio líquido salino, como se describe en Materiales y Métodos. El rendimiento obtenido en la síntesis de la primera hebra fue superior al 11% con respecto a la cantidad de mRNA de partida, lo cual está 2 a 3 veces bajo un rendimiento óptimo de 25 a 35%. Este menor rendimiento probablemente refleja algún grado de contaminación con RNasa en la etapa anterior a la síntesis de la primera hebra.

Luego de la síntesis de la segunda hebra, cuyo rendimiento no fue calculado, una secuencia adaptadora-Sal I (véase Materiales y Métodos) fue ligada a los terminales de los cDNA de doble hebra sintetizados previamente. El tiempo de ligación del adaptador-Sal I fue de 20 hrs en presencia de un exceso de ligasa, de manera de asegurar la ligación de los terminales romos del adaptador Sal I a los terminales cDNA. Después de la digestión de la población de cDNAs con la enzima Not I, se realizó un fraccionamiento por tamaño mediante columna de exclusión molecular, de manera de seleccionar una población de cDNAs de tamaño adecuado y excluir de ésta a los fragmentos liberados por la digestión con Not I. La radiactividad asociada a la primera hebra de los cDNAs fue utilizada para calcular la cantidad de cDNA en cada fracción. El cDNA contenido en un grupo de fracciones fue concentrado por precipitación en etanol, ligado al vector λ ZipLox por 3 hrs a temperatura ambiente y toda la reacción fue empaquetada en el bacteriofago lambda.

Diluciones de la reacción de empaquetamiento fueron utilizadas para infectar la cepa *E. coli* Y(1090)ZL y calcular el título de los fagos y la eficiencia del empaquetamiento. El título calculado fue de 5×10^4 pfu/ml de fago empaquetado, con una eficiencia de 5×10^5 recombinantes/ μ g de cDNA. El título de la genoteca construída fue considerado aceptable, a pesar que está alrededor de 10 veces bajo lo ideal. En general se acepta que 1 a 5 μ g de RNA poli(A) son suficientes para construir una genoteca de cDNA que contenga 10^6 a 10^7 clones en *E. coli*, ya que que en el caso de un cDNA escaso se puede requerir de la exploración de hasta 10^6 clones.

5.- Búsqueda de los cDNAs de MnP en la genoteca.

La primera búsqueda se efectuó sobre aproximadamente 20.000 clones utilizando la sonda heteróloga MnP 15-2, como se describe en Materiales y Métodos. 40 clones, es decir un 0,2%, dieron reacción positiva. El DNA de los fagos que contienen cDNA que dieron hibridación positiva fue recuperado en el plasmidio pZL1 de replicación autónoma, usando un protocolo de escisión muy simple que se describe en Materiales y Métodos. El plasmidio pZL1 es idéntico al plasmidio pSPORT1 (véase Catálogo Productos Gibco BRL, 1994), salvo que contiene un sitio *loxP* y la secuencia *incA* que permite un alto rendimiento plasmidial. Los insertos cDNA clonados en el sitio de múltiple clonamiento de λ /ZipLox residen dentro del gen *lacZ'*. Los cDNAs escogidos fueron recuperados mediante un proceso de subclonamiento automático, usando la cepa de *E. coli* DH10B(ZIP) como se describe en Materiales y Métodos.

El DNA plasmidial preparado desde los clones positivos después de la escisión se presentó en forma de dímero y el tamaño de los insertos fue analizado

mediante digestión con Sal I y Not I. Cinco de estos tenían insertos con tamaños superiores a 1Kpb. Solo fueron secuenciados cuatro de ellos que poseían más de 1,2 Kpb, los que fueron denominados λ 4-1, λ 13-1 y λ 18-1 y λ 2-1. La secuencia parcial de DNA de los clones mencionados, aproximadamente 200 pb desde cada extremo del gen, fue enviada a un banco de secuencias nucleotídicas mediante el servidor BLASTn y todos ellos mostraron homologías superiores a un 60% con genes que codifican para MnPs de *P. chrysosporium*. A pesar que los clones λ 4-1 y λ 18-1 mostraron corresponder a genes de MnP de *C. subvermispora*, sus cDNAs se encontraron truncados en su región N-terminal, lo que impidió determinar de cual isoenzima se trataba. Este resultado se debió probablemente a un término temprano en la reacción de transcripción reversa, lo que sugiere la presencia de estructuras secundarias en el extremo N-terminal de los mRNAs.

Los clones cDNA λ 13-1 y λ 2-1, en adelante MnP13-1 y MnP2-1 respectivamente, mostraron tener una gran homología en el extremo amino-terminal (82,9%) (Fig. 17A). Sin embargo, tienen también claras diferencias, lo que denota que se trata de productos de alelos o genes diferentes. Además, siguen manteniendo gran homología en su secuencia aminoacídica amino-terminal deducida con la determinada experimentalmente para las isoenzimas de MnP secretadas por el hongo creciendo sobre madera (véanse Fig. 12b y Fig. 17B).

Los clones MnP13-1 y MnP2-1 mostraron poseer un tamaño de aproximadamente 1,4 Kpb. Sus mapas de restricción parciales denotan claramente que se trata de dos cDNAs diferentes de MnP (Fig. 18A y B). El clon cDNA MnP13-1 fue dividido en cinco subclones en el plasmidio Bluescript KSII (Fig. 18A). En aquellas regiones de abundante estructura secundaria que producían gran cantidad de compresiones por alto contenido G/C, se diseñaron

A

```

GTCGACCCACGCGTCCGCTCACTCTCATCTTCTACACTCGTTGTTGGCAC -50
IIIIIIIIIIIIIIII I II II II
GTCGACCCACGCGTCCGGGC-----GTCGGTAC -28

CCTAGCAATGGCCTTTGCATCACTCCTCGCTCTTGTGCGGCTTGCTGCCA -100
I I IIIIIIIII III IIIIIIII IIIIIIIIIIIIIIIII I
TTTCGAAATGGCCTTTACATCGCTCCTCGCTATTGTGCGGCTTGCTGCTA -78

CTGTGCGAGCTGCGCCGCTCCTCGTCTGTCACTTGCTCAGACGGTACT -150
I IIIII I III III I IIIIIIIIIIIIIIIIIIIII II II
CCGTGCGGGTGCACCGCATCGTCTGTCACTTGCTCAGATGGCACC -128

GTCGTCCCGACTCGATGTGCTGCGACTTCATTCTCTCGCGCAAGACCT -200
I III IIIII IIIIIIII IIIIIIII IIIIIIII II III I
GCCGTACCCGACGCGATGTGCTGTGACTTCATCCCTCTCGCACAGGAC-T -177

ACAGTCTATGGTTCTGCAAAATGAGTGTGGTGAAGATGCTCACGAGATCA -250 MnP13-1Cs
IIIII IIIII IIIIIIII II
TCAGTCCATGGTCTGCAAAACCAG -202 MnP2-1Cs

```

B

```

MAFTSLLAIVALAATVRGAPASSSVTCS DGTAVPDAMCCDFIPLAQDLQS 47
:: :::: ::::: :: ::::: ::::: ::::: :::::
MAFASLLALVALAATVRAAPSSSVTCS DGTAVPDSMCCDFIPLAQDLQS 50

MVLQN 52 MnP2-1Cs
:::::
MVLQNECGEDAHEIIRLTFHDAIAISQSLPPSAGTGADGSMLLFPLVEPE 100 MnP13-1Cs

```

Figura 17. Alineamiento de secuencias nucleotídicas (A) y aminoácidas deducidas (B) en la región 5' de los cDNAs MnP13-1 y MnP2-1 de *C. subvermispora*. Las secuencias parciales fueron enviadas al GenBank usando el servidor NCBI BLAST en busca de homologías con otras MnPs y posteriormente alineadas entre sí usando el programa PCGENE de Intelligenetics. El alineamiento aminoácido corresponde a la secuencia deducida desde el primer codón para Met, incluyendo la región del péptido señal. Los espacios en las secuencias son introducidos para optimizar los alineamientos. Los signos I y : indican identidad nucleotídica y aminoácida, respectivamente.

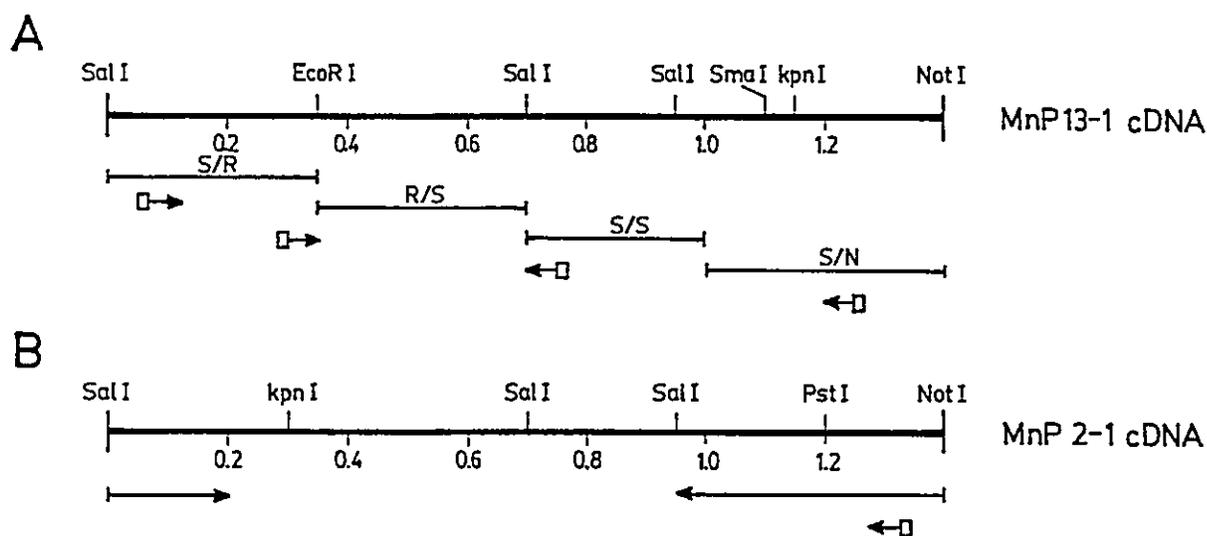


Figura 18. Estrategia de subclonamiento y secuenciación de los clones cDNA MnP13-1 (A) y MnP2-1 (B) de *C. subvermispora*. El fragmento Sal I-Not I de MnP13-1 (1371-pb) fue mapeado parcialmente y los siguientes fragmentos fueron subclonados en Bluescript KSII: Sal I-Eco RI (S/R), Eco RI-Sal I (R/S), Sal I-Sal I (S/S) y Sal I- Not I (S/N). Los clones y subclones fueron secuenciados por ambas hebras mediante el método del dideoxi (Sanger, 1977), usando el kit Sequenase 2.0 (U. S. Biochemical) y (³⁵S)deoxi-adenosina-5'-(α -tio)trifosfato. Con el objeto de resolver compresiones se utilizó el análogo dITP proporcionado con el kit o geles conteniendo 30% formamida además de urea (véase Materiales y Métodos). Las flechas que contienen cajas representan oligonucleótidos sintéticos diseñados como partidores. El fragmento Sal I-Not I de MnP2-1 esta siendo secuenciado mediante "walking primer".

oligonucleotidos partidores para secuenciación, lo que fue especialmente necesario en la regiones de la histidina proximal y en el extremo 3' terminal del cDNA MnP13-1. La secuenciación del clon MnP2-1, que aún no se ha completado, se está realizando mediante la técnica "walking primer", es decir, diseñando diferentes oligonucleotidos partidores que permiten avanzar en la secuencia por ambas hebras del cDNA desde sus extremos (Fig. 18B).

6.- Caracterización de los cDNAs MnP13-1 y MnP2-1 de *C. subvermispora*.

Las secuencias que rodean el primer codón ATG, en los cDNAs MnP13-1 y MnP2-1, **GCAATGG** y **GAAATGG** respectivamente, siguen el consenso eucariótico (A/G)NNATGG (Fig. 17 y Fig. 19). Los clones cDNA MnP13-1 y MnP2-1 poseen 51 y 28 pb de secuencias no traducible en el extremo 5' terminal, respectivamente (Fig. 17A y Fig. 19). La traducción de ambos cDNAs, que comienza en el codón ATG, permite apreciar secuencias líderes o péptidos señales diferentes, aunque predominantemente hidrofóbicos, de 24 aminoácidos que terminan en los residuos V-T (Fig. 17B y Fig. 19).

Los clones cDNA MnP13-1 y MnP2-1 poseen 147 y 151 pb de secuencias no traducibles en el 3' terminal, respectivamente (Fig. 19). Ninguno de los cDNAs muestran secuencias de consenso eucariótica para poliadenilación (AATAAA) (Proudfoot y Brownlee, 1976).

La secuencia completa del clon MnP13-1 tiene 1371pb, predice una preproteína de 388 aminoácidos, con una masa molecular deducida de la secuencia nucleotídica de 40.414 daltons (Fig. 19). El procesamiento del péptido líder permite calcular que el tamaño de la proteína madura sería de 38.126 daltons. Esta masa molecular deducida es mucho menor que la determinada

experimentalmente mediante SDS-PAGE para las isoenzimas de medio sólido, calculada en 62,5 kDa (Lobos y cols., 1994; Larraín 1994), probablemente debido a su gran contenido glicosídico. Seis sitios potenciales para N-glicosilación, que siguen la regla N-Xaa-T/S (Neuberger y cols., 1972), fueron encontrados en la secuencia. Además, 62 residuos S/T (16% del total de aminoácidos) son potenciales sitios para O-glicosilación. Este potencialmente alto contenido glicosídico de la MnP13-1 puede causar un comportamiento anómalo en electroforesis SDS-PAGE, debido a una reducción en la unión del detergente SDS, lo que sumado a la masa glicosídica efectiva puede dar origen a una migración electroforética artefactual. Además, el análisis de la estructura primaria de MnP13-1 predice un sitio probable de fosforilación por proteína quinasa C (VALAA T¹⁵ VRAAP) y cinco sitios potenciales de fosforilación por caseína quinasa II (SSSSV T²⁶CSDGT, EIIRL T⁶⁸FHDAI, PPSAG T⁸⁵GADGS, SHPNI T¹²⁵AGDLV y DAGNF S¹⁸⁵PFEVV).

En la Figura 20 se compara la secuencia aminoacídica deducida del cDNA MnP13-1 y secuencia parcial del cDNA MnP2-1 con las de otras MnP de *P. chryso sporium*. En primer lugar resalta el hecho que todas las secuencias líderes son diferentes aunque claramente hidrofóbicas. Esta variabilidad ha sido informada anteriormente al comparar secuencias de cDNAs de isoenzimas de MnP de *P. chryso sporium* (Orth y cols., 1994). Se sabe que las secuencias líderes y los sitios de hidrólisis proteolítica de los péptidos señales son altamente variables entre procariotes y eucariotes (von Heijne, 1985). Los alineamientos y comparación de la secuencia aminoacídica de MnP13-1 con las otras MnPs de *P. chryso sporium* (cepa BKM-F-1767) mostraron las identidades y porcentajes de homologías siguientes: 260aa (69,1%) con MnP1, 262aa (68,9%) con MnP

isoenzima H4, 266aa (70,4%) con la MnP1 de la cepa OGC101 y 273aa (72%) con la MnP isoenzima H3. La Figura 20 también muestra que ambos genes cDNA de *C. subvermispora* tienen entre 8 a 12 residuos aminoacídicos extra a las MnPs de *P. chrysosporium*.

MAFA-SLLALVALAATVRAAPSSSVTCSDGTVPDSDHCCDFIPLAQDLQ	49	
MAF-KSLIAFVALAAVRAAPTA-VCPDGTTRVSHAACCAFIPLAGDLQ	46	
MAF-KSLIAFVALAAVRAAPTA-VCPDGTTRVSHAACCAFIPLAGDLQ	46	
MAF-GSLL-FVALAAITRAAPTAESAVCPDGTTRVSHAACCAFIPLAGDLQ	48	
MAFASLLALVALAAVTSAAPATTDATCPDGTKVNAACCAFIPLAGDLQ	50	
MAFT-SLLAIVALAATVIRGAPASSSVTCSDGTAVPDHCCDFIPLAQDLQ		
*** * .. ***** .. ** .. * .. *****		
SMVLQNECCGEDAHEIIRLTFHDAIAISQSLPPSAGTGAAGSMLLFPLVEP	99	
ETIFQNECCGEDAHEVIRLQFHDAIAISRSQGPAGGSGADGSMLLFPTVEP	96	
ETIFQNECCGEDAHEVIRLTFHDAIAISRSQGPAGGSGADGSMLLFPTVEP	96	
ETLFGDCCGEDAHEVIELTFHDAIAISQSIGPAGGSGADGSMLLHFTTIEP	98	
ETIFQNECCGEDAHEVIRLTFHDAIA-SQSKGPSAGG-ADGSMLLFPTIEP	98	
SMVLQN-		
.. * .. ***** .. * .. ***** .. * .. *****		
EFQASNGIDDSVNNLIPFLSSHPNITAGDLVQFAGAVALTNCPGAPR-E	147	
NFSANNGIDDSVNNLIPFMQKHNTISAADLVQFAGAVALSNCPGAPRLE	146	
NFSANNGIDDSVNNLIPFMQKHNTISAADLVQFAGAVALSNCPGAP-RLE	145	
NFSANNGIDDSVNNLIPFMQKHNTISAADLVQFAGAVALSNCPGAP-RLE	147	
NFSANNGIDDSVNNLIPFMQKHNTISAGDIVQFTGAVALTNCPGAPG-LE	147	
.. * .. ***** .. * .. ***** .. * .. *****		
LLAGRKNVAPAIIDELIPVQDQNVSTILARFADAGNFSFFEVSLLASHS	197	
FLAGRPNKTIAAVDGLIPEPQDSVTIKILDRFEDAGGFRFFEVSLLASHS	196	
FLAGRPNKTIAAVDGLIPEPQDSVTIKILDRFEDAGGFRFFEVSLLASHS	195	
FHAGRPNMTIIPAVEGLIPEPQDSVTIKILDRFEDAGNFSFFEVSLLASHS	197	
FLARRPNKTIIPADGLIPEPQDSVTSIILERFKDAGNFSFFEVSLLASHS	197	
.. * .. ***** .. * .. ***** .. * .. *****		
VARADKVDPTLDAAPFDITPFTFDQIFLEVLLKGVGFPGLDNNITGEVAS	247	
VARADKVDQTIIDAAPFDSTPFTEDTQVLEVLLKGVSEPGSANNTGEVAS	246	
VARADKVDQTIIDAAPFDSTPFTFDQVLEVLLKGVGFPGSANNTGEVAS	245	
VARADKVDQTIIDAAPEDSTPFTFDQVLEVLLKGTGFPGSANNTGEVMS	247	
VARADKVDQTIIDAAPFDITPFTFDQIFLEVLLKGVGFPGRTRTRGEVAS	247	
***** * .. ***** .. * .. *****		
PLPFGDSTGGNDTGMRLQSDFALARDERTACFWQSFVDDQDFMAQSFQ	297	
PLPLG-SGSDTGMERLQSDFALANDPRTACIWEQFVDEQAFMAASFQ	292	
PLPLG-SGSDTGMERLQSDFALAADPRTACTTQGFVNEQAFMAASFQ	291	
PLPLG-SGSDTGMERLQSDFALARDERTACFWQSFVNEDEFMAASFQ	293	
PLPLT-SGSDTGMERLQSDFALARDERTACIWEQFVNEQALMA-SFK	292	
*** .. * .. ***** .. * .. *****		
AAFEXMAILGSNAADLINCNAVVPQSVGPVTPATFPATTGPDQLDNLCT	347	
AAMSKLAVLGRMRNS-IDCSVVVPV-KPATGGPAMFPASTGPDLELSCP	340	
AAMSKLAVLGHNRNSLIDCSVVVPV-KPATGGPAMFPASTGPDLELSCP	341	
AAMAKLAILGHSRSSLIDCSVVVPV-KPAVINKPATFPATGKDLDTLCTK	343	
AAMRKLAVLGHNRNTLIDCSVVVPV-KPAVINKPATFPATTGPDLELSCP	342	
VVPQSVGPVTPATFPATTGPDQLDNLCT		
*** .. * .. ***** .. * .. *****		
SETFPFLSIDPGATELIPHCPSGTEDCPSLQFSGPATDSP	388	MnP13-1Cs
SERFPTLTTQPGASQSLIAHCPDGSMSCPGVQ-NGPA	376	MnP1Pc (BKM-1767)
SERFPTLTTQPGASQSLIAHCPDGSMSCPGVQ-NGPA	378	MnP1Pc (OGC101)
ALKFPILTSDPGATELIPHCPSGTEDCPSLQFSGPATDSP	380	MnP4Pc
TKPFPFLSIDPGATELIPHCPSGTEDCPSLQFSGPATDSP	379	MnP3Pc
TETFPFLSIDPGATELIPHCPSGTEDCPSLQFSGPATDSP		MnP2-1Cs
.. * .. ***** .. * .. *****		

Figura 20. Comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas de los cDNA : MnP1Pc (Bkm-1767) (Godfrey y cols., 1990), MnP1Pc (OGC101) (Pribnow y cols., 1989), MnPH4Pc (Pease y cols., 1989) y MnPH3Pc (Orth y cols., 1994) de *P. chrysosporium*; MnP13-1Cs y MnP2-1Cs (parcial) de *C. subvermispora*. El alineamiento múltiple se realizó usando el método Clustal Genalign del programa PCGENE de Intelligenetics. Los aminoácidos idénticos se denotan por un asterisco. Los espacios son introducidos para optimizar los alineamientos, excepto para MnP2-1 cuya secuencia es solo parcial.

DISCUSION

El basidiomicete *C. subvermispora* secreta varias isoenzimas de MnP y lacasa cuando crece ya sea en medio líquido o sobre madera. Esta observación se convierte en una evidencia adicional de que la multiplicidad de las enzimas ligninolíticas es una característica común entre los hongos de pudrición blanca, aunque el significado fisiológico de este fenómeno no es del todo comprendido. Las MnPs aisladas desde cultivos del hongo en estado sólido son claramente diferentes de aquellas producidas en medio líquido salino (Lobos y cols., 1994; Larraín, 1994; Urzúa y cols., 1995), aunque es todavía prematuro especular acerca de cuales isoformas son mas importantes en la degradación de lignina en los ambientes naturales.

En el transcurso de esta investigación fue posible observar que la composición del medio tiene una influencia sobre la producción de enzimas por este hongo. Por ejemplo, variaciones en la concentración de Mn^{+2} en el medio salino o su crecimiento sobre madera producen un perfil diferente en el patrón isoenzimático (Lobos y cols., 1994; Larraín, 1994). Además, el perfil isoenzimático del hongo que crece sobre madera cambia con la edad del cultivo, a diferencia de los cultivos en medio líquido en los cuales se mantiene inalterable a partir del octavo día de crecimiento. En cultivos tempranos del hongo en medio sólido, mientras aún permanecen los nutrientes agregados externamente, las MnPs que se producen son similares en cuanto a su masa molecular y pI a aquellas producidas en medio líquido (Lobos y cols., 1994; Larraín, 1994). Más tarde, cuando la composición del sustrato de crecimiento cambia a medida que el hongo prolifera sobre la madera, se secretan MnPs con valores de pI menores y masas moleculares mayores a las de las MnPs producidas en medio líquido.

Frente a los resultados obtenidos cabe preguntarse si ellos representan lo que realmente ocurre cuando el hongo degrada la lignina en la madera, o sólo representan aproximaciones válidas en las condiciones del laboratorio. En la naturaleza los hongos crecen como un micelio que se extiende sobre la fase sólida, que para lograr acceder a su fuente energética debe superar la barrera que corresponde a la lignina. Por el contrario, en un sistema líquido y en presencia de abundantes fuentes energéticas, de fácil acceso, el hongo crece como pellas y obviamente no requiere degradar lignina. En este sentido, es posible que los resultados obtenidos cuando el hongo crece sobre madera en el laboratorio, se aproximen más a lo que ocurriría en la naturaleza. En *P. chrysosporium*, el hongo ligninolítico mejor estudiado, la expresión de los genes que codifican para LiP y MnP es finamente regulada. Estas enzimas son producidas solamente durante el metabolismo secundario. Además, diferentes perfiles isoenzimáticos son observados tanto con la edad del cultivo (Pease y Tien, 1992), como con los cambios en la composición del medio (Leisola y cols., 1987; Pease y Tien, 1992; Das y Reddy, 1990), como también a diferentes concentraciones de Mn^{+2} (Bonnarne y Jeffries, 1990; Pease y Tien, 1992). Además, *P. chrysosporium* produce una específica isoforma de MnP durante la degradación del sustrato sólido (Datta y cols., 1991). Por lo tanto, es probable que a lo menos algunas de las características de los mecanismos regulatorios del sistema ligninolítico de *P. chrysosporium* y *C. subvermispora* sean similares.

Sin embargo, está claro que los sistemas ligninolíticos de estos dos hongos son diferentes, ya que *P. chrysosporium* produce LiP y MnP, pero no lacasa. La búsqueda sistemática de la actividad LiP de *C. subvermispora*, informada en otras publicaciones de nuestro grupo dio resultados negativos

(Rüttimann y cols., 1992; Rüttimann-Johnson y cols., 1993; Larraín, 1994; Lobos y cols., 1994), incluso utilizando dos tipos de ensayos espectrofotométricos y la tinción por actividad de geles de IEF desarrollada en este estudio.

Con respecto a la lacasa, cuatro isoformas de esta actividad fueron aisladas desde cultivos líquidos de *C. subvermispora* y parecen ser similares a aquellas extraídas desde madera, aunque esta actividad fue limitada a los primeros días de crecimiento del hongo en medio sólido. Esta actividad también resultó dependiente de la presencia de Mn^{+2} en el medio de cultivo. Esta dependencia ya fue descrita para los genes que codifican para MnP de *P. chrysosporium* (Pease y cols., 1989; Brown y cols., 1991), pero la influencia de este metal sobre la transcripción de los genes que codifican para lacasa en *C. subvermispora* necesita ser investigada a futuro. Por otra parte, la omisión de Cu^{+2} en el medio de cultivo líquido también lleva a una reducción de la actividad de la enzima hasta niveles apenas detectables, pero concentraciones de este metal 10 veces mayores a las normales no tienen efecto sobre el nivel de actividad enzimática. Se podría especular que la apoproteína de la lacasa puede estar presente en los cultivos en ausencia de Cu^{+2} , aunque en una forma inactiva, de la misma manera como fue mostrado por Huber y Lerch con *Neurospora crassa* (Huber y Lerch, 1987). De la misma forma, experimentos Northern podrían entregar información acerca del modo de acción de la p-anisidina, un inductor que ha resultado muy potente con otros hongos (Shuttleworth y cols., 1986).

Con respecto a la influencia de la concentración de Mn y Cu sobre los niveles de actividad enzimática, es importante mencionar que los resultados del análisis del contenido de Mn en madera de pino (*Pinus sylvestris*) varían dependiendo de su origen. Los valores para Mn se encuentran entre 51-112 ppm

en madera seca, en tanto que los de Cu son algo más variables, llegando a no más de 50 ppm en madera seca (Fengel y Wegener, 1989). En otras palabras, ambos elementos inorgánicos no se encuentran en concentraciones limitantes, lo que puede explicar la dependencia que tienen los niveles de actividad de MnP y lacasa de la presencia de estos elementos inorgánicos, lo que sin duda merece ser más estudiado, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional.

Los pIs de las isoenzimas de lacasa parecen variar con la composición del medio y con el tiempo del cultivo, aunque siguen estando en el rango informado en la literatura para las lacasas de otros hongos (Galliano y cols., 1991; Maltseva y cols., 1991; Vares y cols., 1992). Dos isoformas principales con pIs de 3,65 y 3,59 fueron observadas en medio líquido salino. Otras dos isoformas con valores de pI menores de 3,53 y 3,47 también fueron detectadas en menor nivel. Sin embargo, las cuatro isoformas de lacasa son igualmente expresadas cuando el hongo se crece en medio YMPG, aunque con valores de pI ligeramente mayores a los de medio salino, mientras que en medio salvado de trigo aparecen isoformas con valores de pI aún mayores, lo que sugiere un menor grado de glicosilación. Una quinta isoforma de lacasa con un valor de pI de 4,82 también ha sido detectada en cultivos en medio salino (Lobos y cols., 1994). Aunque las condiciones que favorecen su producción no son aún reproducibles, no se descarta que se trate de un producto génico diferente, pero se requiere de mayor evidencia. Esta se puede obtener ya sea secuenciando el extremo amino-terminal de la proteína purificada, mediante la metodología diseñada en esta tesis, como también a partir de estudios a nivel genético molecular. Así también, a medida que avanza el tiempo de cultivo en medio salino aparecen bandas de lacasa con mayores valores de pI a los determinados a partir del día 13 y que dan una intensa

reacción de oxidación del sustrato utilizado para su detección en geles de IEF. Una hipótesis que se puede barajar es que algunas de estas isoformas que aparecen a tiempos largos de cultivo, asignadas en principio como lacasas, sean en realidad mezclas de isoformas de lacasas y MnPs, estas últimas como las observadas en medio sólido, ya que sus valores de pI son muy similares. El requerimiento de familias de isoenzimas en la biodegradación de lignina no está claro y se requiere de mayor evidencia experimental para responder a esto.

Con respecto a la influencia del grado de glicosilación sobre el punto isoeléctrico, resultados preliminares no presentados en esta tesis, demuestran que el grupo de isoenzimas de MnP aisladas desde medio líquido salino sufre un aumento importante del pI después de desglicosilación. Este efecto se podría deber a cargas negativas extras aportadas por los grupos azúcares o a un cambio en la conformación de la cadena polipeptídica. Sin embargo, la naturaleza de la glicosilación en este hongo es desconocida y la existencia de enlaces N y O-glicosídicos sólo es sugerida a partir de la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia nucleotídica. Lamentablemente, no fue posible determinar el papel que juega la glicosilación en la actividad enzimática, debido a que el amortiguador de la endoglicosidasa F utilizada contiene un potente inhibidor de la actividad peroxidásica, como es la azida de sodio. De esta manera no fue posible relacionar un cambio en la conformación de la proteína con alteración en la actividad enzimática.

La gran proximidad en los pIs de las distintas isoformas de MnP y lacasa secretadas por *C. subvermispora* en distintos medios de cultivo hizo necesario el diseño de una estrategia de purificación que combinó principalmente la cromatografía de intercambio aniónico a través de una columna de Q-Sepharosa,

seguida por IEF preparativo en aparatos especialmente diseñados en este estudio. Las distintas isoenzimas de MnP con valores muy cercanos de pIs, pudieron ser aisladas tanto desde el medio líquido salino como también desde el medio sólido, para su posterior estudio y secuenciación amino-terminal. Así mismo, las isoformas individuales de lacasa con valores de pI muy similares pudieron ser aisladas desde medio YMPG, debido a la gran producción de lacasa cuando el hongo crece en este medio. Anteriormente fue descrito que otros métodos de purificación, incluyendo FPLC (cromatografía líquida de alta resolución para proteínas), no son capaces de resolver las isoenzimas de MnP ni de lacasa producidas por este hongo (Rüttimann y cols., 1992).

La masa molecular aparente de la isoenzima de lacasa con pI 3,6 fue estimada en 79 kDa, el que resulta sorprendentemente alto si se compara con las masas moleculares determinadas para otras lacasas de basidiomicetes de pudrición blanca, las cuales están en el rango 55-65 kDa (Galliano y cols., 1991; Maltseva y cols., 1991; Niku-Paavola y cols., 1988; Vares y cols., 1992). Si suponemos que el tratamiento con endoglicosidasa F de la lacasa de *C. subvermispora* fue cuantitativo, se puede estimar que esta isoenzima contiene alrededor de un 20% de carbohidrato. Sin embargo, la movilidad electroforética no es un criterio muy exacto para estas determinaciones, ya que al menos en SDS-PAGE no está claro como estos parámetros son influenciados por el contenido en carbohidratos de la proteína. Se debe considerar que la determinación de masas moleculares a través de electroforesis en SDS-PAGE requiere la unión de aproximadamente una molécula del detergente por cada dos residuos aminoácidos, lo que confiere una carga neta negativa a la cadena polipeptídica. En consecuencia, la razón carga/tamaño en la cadena polipeptídica será

virtualmente idéntica para todas las proteínas, y la separación de diferentes proteínas será el resultado del impedimento a la migración del complejo SDS-proteína a través del tamiz molecular o porosidad del gel, migrando hacia el ánodo en forma inversamente proporcional al tamaño de la proteína. De esta manera se puede esperar que el contenido de carbohidratos de la cadena polipeptídica afecte severamente la migración de la proteína ya sea impidiendo la unión de la cantidad adecuada de SDS, modificando la forma de la proteína o aumentando su masa molecular.

La masa molecular de las distintas isoenzimas de MnP secretadas por *C. subvermispora* en medio líquido fue de alrededor de 52,5 kDa, mientras que las masas moleculares de las isoenzimas extraídas desde madera fue de 52,5 kDa y 62,5 kDa dependiendo de la edad del cultivo sólido (Lobos y cols., 1994; Larraín, 1994). En un principio, en este estudio se manejaban varias hipótesis que podían explicar la multiplicidad de isoformas de MnP y lacasa observadas. El fenómeno se podría deber a un grado diferencial de glicosilación debido a un procesamiento post-traduccionaI diferente, como también a la expresión de diferentes genes o de alelos del mismo gen. Un ejemplo de esto último es lo reportado para las LiPs de *P. chrysosporium* (Cullen y Kersten, 1992). En cuanto a la presencia de variantes alélicas codificantes para isoenzimas con valores de pI diferentes, esto ya ha sido mostrado para glioxal oxidasa en *P. chrysosporium* (Kersten y Cullen, comunicación personal). Con respecto a un procesamiento post-traduccionaI diferente, ciertamente un grado diferencial de glicosilación de un mismo producto génico puede dar enzimas con diferentes valores de pI, aumentando fuertemente la masa molecular aparente determinada mediante SDS-PAGE. Por ejemplo, la desglicosilación de las isoenzimas producidas en medio sólido por *C.*

subvermispora produce una disminución de la masa molecular desde 62,5 kDa hasta cerca de 52 kDa (Larraín, 1994) lo que representa un porcentaje de glicosilación del 16,8 % en función de la masa molecular.

Como primera aproximación a determinar el número de los genes correspondientes, se realizó la secuenciación amino-terminal de las tres isoenzimas de medio sólido (Larraín, 1994) y de al menos cuatro isoformas aisladas desde cultivos líquidos de *C. subvermispora*. Las secuencias amino-terminales de cuatro isoenzimas de MnP producidas por *C. subvermispora* en cultivos líquidos fueron similares, pero claramente diferentes. Este resultado sugiere fuertemente que estas isoenzimas pueden representar los productos de genes separados, aunque no se puede excluir la posibilidad de que ellas representen variaciones alélicas en un basidiomicete como *C. subvermispora*. Por el contrario, las secuencias amino-terminales de las tres isoenzimas de MnP aisladas desde madera parecieran ser iguales, por lo que sus diferentes valores de pI podrían reflejar variaciones en sus contenidos en carbohidratos. Por otra parte, sus mayores masas moleculares comparadas a las MnPs de cultivos líquidos también sugieren la presencia de más de un gen. Hasta la fecha, semejante multiplicidad en genes que codifican para MnP solamente ha sido demostrada en *P. chrysosporium* (Pease y Tien, 1992; Pease y cols., 1989; Pribnow y cols., 1989). Los resultados de este estudio arrojan una pregunta inevitable acerca del papel que cumplen estos genes en la degradación de lignina.

En el mismo contexto anterior, este estudio se enfocó posteriormente hacia las lacasas de *C. subvermispora*. Los datos proporcionados por la secuenciación amino-terminal de las tres isoenzimas de lacasa producidas por el hongo en medio YMPG, sugieren que las isoformas de pI 3,71 y pI 3,65 son

productos de un mismo gen y que las diferencias podrían deberse a diferentes grados de glicosilación. En cambio, la isoforma de pI 3,60, que posee una secuencia amino-terminal diferente, debe corresponder al producto de otro gen. Para determinar si las diferencias en los valores de pI de las isoformas de pI 3,71 y 3,65 representan solamente modificaciones post-traduccionales de una misma proteína se requiere de mayor estudio, ya sea realizando un mapeo peptídico o secuenciando los genes codificantes. Si se comprobara que sólo corresponden a modificaciones post-traduccionales podríamos estar ante un caso que contrasta con los numerosos precedentes para familias de genes en basidiomicetes como en *A. bisporus* (Perry y cols., 1993), *C. hirsutus* (Kojima y cols., 1990) y *Polyporus pinsiti* (Yaver y cols., 1994).

Para estudiar la regulación de la expresión génica de las enzimas involucradas en la degradación de lignina, se hace indispensable contar con auténticos clones cDNA de MnP y lacasa, para ser usados como sondas en experimentos tipo Northern. Además, estos clones proporcionarían la información necesaria para deducir su secuencia aminoacídica y estructura primaria, al mismo tiempo que confirmaría su homología con genes de MnP y lacasa ya clonados en *P. chrysosporium* y en otros hongos ligninolíticos. Por este motivo, el DNA genómico de *C. subvermispora* fue utilizado para un aislamiento directo de fragmentos con homología a una sonda correspondiente al cDNA de todo el largo del gen MnP de *P. chrysosporium*. Esta primera estrategia fue llevada a cabo en un par de ocasiones con resultados negativos, y los fragmentos de DNA clonados mediante este protocolo hasta ahora no han sido identificados, pero después de su secuenciación parcial resulta claro que ellos no corresponden a genes de MnP.

Los intentos por clonar algún miembro de la familia de genes codificantes de MnP mediante transcripción reversa y PCR también dieron resultados negativos. Varios oligonucleotidos partidores para la amplificación de cDNAs por PCR fueron diseñados a partir de las secuencias amino-terminales obtenidas tanto de las isoenzimas secretadas por *C. subvermispora* en medio líquido salino como también creciendo sobre madera. Estos partidores poseían diferentes grados de degeneración, aún después de seleccionar los codones de mayor uso en *P. chrysosporium*. Como no se disponía de información respecto a secuencias internas hacia el carboxilo-terminal de estas isoenzimas de MnP, no se pudo utilizar partidores antisentido, por lo cual los protocolos siempre incluyeron el uso de oligo(dT) para la síntesis de los cDNA de una hebra por transcripción reversa. Diversos ensayos de transcripción reversa y PCR arrojaron productos cDNAs inespecíficos, siendo posible pensar que el error estuvo en el diseño de los oligos partidores o en su alto grado de degeneración, ya que la transcripción del mRNA no parece haber sido el problema. Ha sido descrito anteriormente que para una amplificación exitosa de cDNAs no es necesario un perfecto apareo de los oligonucleotidos partidores (Lee y Caskey, 1990; Frohman y cols., 1988), siendo entonces posible la obtención de productos de PCR auténticos con hasta un 20% de apareo imperfecto entre el partidor y el templado. En la puesta en práctica de esta estrategia se consideraron numerosos parámetros, tales como las temperaturas de apareamiento, concentración de oligonucleótidos y de Mg²⁺, etc., invirtiendo una apreciable cantidad de tiempo y esfuerzo hasta la verificación final de los productos de PCR mediante secuenciación del DNA. Habiéndose obtenido resultados negativos, finalmente se optó por una estrategia diferente

consistente en la preparación de un banco cDNA del hongo en condiciones donde los transcriptos de MnP fueran abundantes.

La genoteca de cDNA realizada el día 10 de cultivo de *C. subvermispora* en medio líquido salino tomó dos semanas en ser construída y un mes en ser analizada, utilizando en primera instancia la sonda de cDNA MnP15-2 de *P. chrysosporium*. El DNA plasmidial preparado desde los clones positivos subclonados en pZL1 se presentó en forma de dímero y el tamaño de los insertos de cDNA fue estimado mediante digestión con Sal I y Not I. Este procedimiento de análisis también resultó útil para caracterizar en forma preliminar los cDNAs, ya que algunos de ellos contenían sitios internos para Sal I, liberando varios fragmentos de DNA visualizados por electroforesis en geles de agarosa. Los clones con tamaños menores a 1 Kb fueron descartados para el análisis. Cuatro clones de cDNA de MnP fueron obtenidos con tamaños entre 1,2 Kb y 1,5 Kb. Estos mostraron gran homología pero fueron claramente distintos en cuanto a su mapa de restricción parcial, ya que liberaron fragmentos de tamaño diferente después de digestión con Sal I y Not I. Dos de estos clones ($\lambda/4-1$ y $\lambda/18-1$) fueron secuenciados parcialmente y resultaron truncados en diferente extensión en su extremo amino terminal, por lo que no fueron analizados para los objetivos de esta tesis. Sin embargo, la secuencia de estos clones truncados también mostró corresponder a cDNAs de MnP, cuando fueron enviadas a un banco de secuencias nucleotídicas mediante el servidor BLASTn. Las homologías superiores a un 60% se obtuvieron en la región de la histidina distal al grupo hemo y regiones flanqueantes. Lamentablemente los clones $\lambda/4-1$ y $\lambda/18-1$ se encontraban truncados en diferente extensión en la zona anterior a la histidina distal, hacia el amino-terminal, lo que impidió determinar de cual isoenzima se trataba.

Los clones MnP2-1 y MnP13-1 corresponden a los cDNA de todo el largo del gen de la MnP de *C. subvermispora*, y presentan una homología nucleotídica de 82,9% y aminoacídica de 85,1% en el amino terminal incluyendo la región correspondiente al péptido señal. Estos cDNAs presentan un mapa de restricción parcial claramente distinto, por lo que se puede concluir que provienen de diferentes genes. La secuencia aminoacídica N-terminal deducida de la secuencia nucleotídica del clon MnP13-1 es muy similar a la determinada experimentalmente para las MnP aisladas de cultivos sólidos y para el caso de MnP2-1 su secuencia aminoacídica es idéntica (comparar Fig. 12b con Fig. 17B). Este resultado demuestra claramente la presencia de mensajeros para la MnP de medio sólido cuando el hongo crece en medio líquido salino, lo que podría significar que éstos no son traducidos en una proteína madura o bien que sus isoenzimas se encuentran en un nivel muy bajo como para ser detectadas el día 10 de cultivo en medio líquido. Hay que recordar que sólo a partir del día 13 es posible apreciar isoformas de bajo pI correspondientes a lacasa, las que podrían enmascarar alguna isoforma de MnP de medio sólido debido a su similar pI. Si los mRNAs de MnP de medio sólido no son traducidos o procesados eficientemente en el hongo que crece en medio líquido es una cuestión que debe estudiarse a futuro, ya que podría resultar en un mecanismo de regulación de la expresión muy interesante.

El cDNA MnP13-1 tiene 1285 nucleótidos excluyendo la cola poli(A), con un contenido G+C del 63,1% solamente en la región codificadora. Un alto contenido G+C ha sido también encontrado en todos los cDNA de MnP de *P. chrysosporium*. Esta característica codogénica podría reflejar un rápido recambio y una alta velocidad de síntesis de la enzima. Similar contenido G+C ha sido

encontrado en genes de levadura altamente expresados (de Boer y Kastelein, 1986) como también en genes de otros hongos filamentosos (Pribnow y cols., 1989; de Boer y cols., 1987). La proteína MnP13-1 madura deducida tiene 364 aminoácidos, los cuales son precedidos por una secuencia aminoacídica líder de 24 aminoácidos. La masa molecular deducida de la secuencia nucleotídica para MnP13-1 es de 38.126 daltons, o sea el 72,6% de la masa molecular aparente determinada por SDS-PAGE. Esta gran diferencia no solo puede ser debida a modificación postraduccional por glicosilación, sino también a una migración anómala en SDS-PAGE. Diferencias levemente menores han sido descritas con las masas moleculares deducidas y observadas de las MnPs de *P. chrysosporium*, ya que comparativamente, MnP13-1 de *C. subvermispora* tiene dos sitios adicionales para N-glicosilación potencial y 15 adicionales sitios potenciales para O-glicosilación.

Una comparación de las secuencias aminoacídicas de MnP13-1 con las de LiP y otras peroxidasas muestra un alto grado de homología en las regiones cercanas al sitio activo (Figura 21A). Además de las His distal y proximal (H^{46} y H^{172} en la MnP13-1 madura), una Arg cercana a la His distal (R^{42}) es bien conservada en MnP (H3: Orth y cols., 1994; H4: Pease y cols., 1989; MnP1: Pribnow y cols., 1989), LiP (H2: de Boer y cols., 1987; H6: Andrawis y cols., 1989; H8: Tien y Tu, 1987; TvLipI: Black y Reddy, 1991), peroxidasa de rábano (HRP: Welinder, 1977), citocromo-c-peroxidasa (CCP: Kaput y cols., 1982) y peroxidasa de nabo (Welinder y Mazza, 1977). En todas las peroxidasas, excepto citocromo-c, los residuos F y D que se encuentran inmediatamente vecinos a la His distal están muy bien conservados. En LiP (Kuila y cols., 1985), MnP (Mino y cols., 1988) y otras peroxidasas se ha propuesto que la His proximal, ligando

A

<u>Peroxidasa</u>	<u>aa</u>	<u>His distal</u>	<u>His proximal</u>	<u>aa</u>
Turnip	35	SILRLFFHDCF	-----RDMVALSGAHTIG	177
HRP	35	SILRLHTHDCF	-----SDLVALSGGHTFG	173
CCP	45	VLVRLAWHTSG	-----REVVALMGAAHALG	177
LiP(H2)	41	EALRMVRHDSI	-----IETVWLLSAHSIA	181
LiP(H6)	40	ESIRLVRHDSI	-----LELVWMLSAHSVA	179
LiP(H8)	40	ESIRLVRHDSI	-----LELVWMLSAHSVA	179
LiPH(10)	40	ESIRLVRHDSI	-----LELVWMLSAHSVA	178
TVLiP1	48	ESLRLTFHDAI	-----ILTVWLLTAHTVA	183
MnPH3	39	EVIRLTRHDAI	-----FEVVSLLASHSVA	176
MnPH4	39	EVIRLTRHDAI	-----FEVVSLLASHSVA	176
MnP1Pc (BKM-1767)	37	EVIRLGFHDAI	-----FEVVSLLASHSVA	175
MnP1Pc (OGC101)	37	EVIRLGFHDAI	-----FEVVSLLASHSVA	174
MnP13CS	39	EIIRLTFHDAI	-----FEVVSLLASHSVA	175

*. * . . * . . *

B

<u>Peroxidasa</u>			
TOPA		I P S P F E	
HRP		L P A P F F	
MnP-Pc	141	I P E P Q D	146
LiP		V P E P F H	
CiP		I P G P G N	
MnP13Cs	140	I P V P Q D	145

Figura 21. Comparación de la secuencia aminoacídica de MnP13-1 de *C. subvermispora* con otras peroxidasa en las regiones cercanas a la His proximal y distal (A), y en el sitio de unión aromático (B). Los aminoácidos de las peroxidasa fueron alineados suponiendo localizaciones similares de los residuos His y del motivo L/V/I-P-X-P. Los alineamientos de subsecuencias fueron realizados mediante el programa PCGENE de intellignetics.

axial del grupo hemo, participa en la hidrólisis del peróxido como un catalizador ácido-base (Poulos y Kraut, 1980). Además, en las MnPs es posible apreciar claramente el sitio de unión del ión Mn, E³⁵ y E³⁹ (Sundaramoorthy y cols., 1994).

Otro motivo de cuatro aminoácidos conservados, L/V/I-P-X-P, es compartido por las peroxidasa de hongos y plantas (Fig. 21B). En HRP, la cual oxida directamente sustratos fenólicos, los residuos F¹⁴² y F¹⁴³ siguen inmediatamente este motivo. Se piensa que el segmento peptídico que contiene estos residuos es la entrada al canal del sitio activo, sobre el lado distal del grupo hemo. Mediante NMR se evidencia que estos residuos F están involucrados en la unión del sustrato (Veitch y Williams, 1990). Modelos de la unión de alcohol veratrílico a LiP indican que F¹⁴⁸ de LiP, que alinea con F¹⁴² de HRP, estaría en contacto con alcohol veratrílico (Poulos y cols., 1993). La secuencia homóloga correspondiente al motivo L/V/I-P-X-P en MnP1, MnPH3 y MnPH4 de *P. chrysosporium* es IPEPQD. En cambio en MnP13-1 de *C. subvermispora* la secuencia homóloga, IPVPQD, es menos hidrofílica habiendo un cambio de Asp por Val (Fig. 21B). Se ha supuesto que la secuencia hidrofílica QD podría facilitar la entrada del ión Mn y al mismo tiempo inhibir la unión de sustancias aromáticas. De esta manera se podría pensar que la enzima MnP de *C. subvermispora* tendría la potencialidad de unir y oxidar sustratos aromáticos en ausencia de Mn. Lo anterior es reafirmado por los resultados obtenidos recientemente en este grupo con otras isoenzimas de MnP de *C. subvermispora* (Urzúa y cols., 1995). En el referido trabajo se demuestra que el requerimiento de Mn⁺² varía de acuerdo al sustrato agregado a la mezcla de reacción y es diferente para cada una de las isoenzimas, las cuales son capaces incluso de oxidar ácido

kojico, un metabolito secundario aromático, comportándose como oxidasas (Urzúa y cols., 1995).

La composición aminoacídica para MnP13-1 madura se muestra en la Tabla 3. Particularmente, los residuos **A**(10,7%), **L**(9,1%), **P**(8,8%) y **D**(8,5%), son los más abundantes. Al comparar el contenido **D+E** (12,4%) con **K+R** (3,3%) en la proteína madura se encuentra una diferencia que es consistente con el pI ácido observado para isoenzimas de medio sólido (pIs entre 3,20 a 3,53; véase Lobos y cols., 1994; pI teórico calculado para MnP13-1 fue 3,63, esta tesis). Al igual que las MnP de *P. chryso sporium*, MnP13-1 posee 10 residuos **C** por lo que probablemente forma cinco puentes disulfuro en la proteína madura. Finalmente, solo residuos **Y** están ausentes en la proteína.

Tabla 3
Composición aminoacídica de MnP13-1

Aminoácido	Número	Porcentaje
A	47	12,0
R	9	2,3
N	15	3,9
D	31	8,0
C	10	2,6
Q	18	4,6
E	14	3,6
G	27	7,0
H	5	1,3
I	16	4,1
L	37	9,5
K	4	1,0
M	8	2,1
F	25	6,4
P	33	8,5
S	34	8,8
T	28	7,2
W	1	0,3
Y	0	0
V	26	6,7
Total	388	

PROYECCIONES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo de tesis dan lugar a varias proyecciones a corto plazo. Una que resalta claramente es la búsqueda de nuevos cDNAs de MnP distintos a los ya analizados, como también cDNAs para lacasa, utilizando para ello la misma genoteca cDNA ya construída. Especialmente interesante se torna la búsqueda de cDNAs de MnP producidas por el hongo en medio líquido salino, puesto que probables cDNA para estas MnP se encontraron truncados en su amino-terminal. Esto permitiría comparar su secuencia nucleotídica y aminoacídica con las de cDNAs de medio sólido analizadas en esta tesis. En segundo lugar, resulta obvio que la disponibilidad de sondas homólogas para las MnPs de *C. subvermispora* no solamente facilitará el entendimiento de su regulación a nivel transcripcional a través de análisis Northern, sino también la búsqueda de genes de MnP usando DNA genómico del hongo. En estos últimos se podrán identificar regiones reguladoras e identificar el número y disposición de intrones, comparándolos con genes de MnP ya descritos en otros hongos. También resulta interesante, a la luz de los resultados, comprender a cabalidad cuál es el mecanismo que regula la diferencial expresión de los genes de MnP producidas en medio sólido, porque si bien es cierto en medio líquido no ha quedado descartada la presencia de isoenzimas detectadas en medio sólido, no es menos cierto que en cultivos en fase sólida sólo isoenzimas específicas de medio predominan a tiempos tardíos. Basado en este tipo de experimentos se puede llegar a una importante conclusión en cuanto a correlacionar la presencia de mRNAs para alguna de las isoenzimas de MnPs con la mineralización de lignina *in vitro*.

Varias estrategias pueden ser concebidas para aproximarse a comprender el significado de la multiplicidad enzimática de MnP en *C. subvermispora* y extrapolarla a lo que también ocurre en otros hongos ligninolíticos. Una de éstas es el estudio genético molecular ya mencionado. Sin embargo, una vía más directa para este análisis podría consistir en la caracterización enzimológica de cada una de las isoformas aisladas, utilizando los métodos de purificación aquí desarrollados, esperando que posean diferencias de importancia para el proceso ligninolítico. De hecho, este trabajo ya se ha iniciado en el laboratorio (Urzúa y cols, 1995).

La identificación de regiones genómicas reguladas por manganeso en los genes de MnP, como ha sido revelado en *P. chrysosporium*, requiere a futuro la caracterización de los factores de transcripción y genes que están involucrados. También se hace muy interesante el tratar de lograr una eficiente expresión de los genes de MnP en otros hongos filamentosos, lo que permitiría también aportar a la generación de sistemas de expresión heteróloga en hongos filamentosos.

BIBLIOGRAFIA

- Akhtar, M. (1994) Biomechanical pulping of aspen wood chips with three strains of *Ceriporiopsis subvermispora*. *Holzforschung* 48, 199-202.
- Akhtar, M., Attridge, M. C., Myers, G. C. and Blanchette, R. A. (1992) Biomechanical pulping of loblolly pine chips with selected white-rot fungi. *Holzforschung* 47, 36-40.
- Akhtar, M., Attridge, M. C., Myers, G. C., Kirk, T. K. and Blanchette, R. A. (1992) Biochemical pulping of loblolly pine with different strains of the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *Tappi J.* 75, 105-109.
- Andrawis, A., Pease, E. A., Kuan, I., Holzbaur, E. L. and Tien, M. (1989) Characterization of two lignin peroxidase clones from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 673-680.
- Archibald, F. and Roy, B. (1992) Production of manganic chelates by laccase from the lignin-degrading fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1496-1499.
- Archibald, F. S. (1992) A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3110-3116.
- Barnard, R., Southard, J. N. and Talamantes, F. (1994) Two-step PCR amplification of multiple specific products from cDNA using one specific primer and oligo dT. *BioTechniques* 16, 251-252.
- Black, A. K. and 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. (1984) Manganese accumulation in wood decayed by white rot fungi. *Phytopathology* 74, 725-730.
- Bollag, J. -M., Shuttleworth, K. L. and Anderson, D. H. (1988) Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3086-3091.
- Bollag, J. and Leonowicz, A. (1984) Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 849-854.
- Bonnarme, P. and Jeffries, T. (1990) Mn(II) regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase from lignin-degrading white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 210-217.
- Boominathan, K., Balachandra, D., Randall, R., Kelley, R. and Reddy, C. (1990) Lignin peroxidase-negative mutant of the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol* 172, 260-265.
- Bourbonnais, R. and Paice, M. (1990) Oxidation of non-phenolic substrates: and expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267, 99-102.

- Bourbonnais, R. and Paice, M. G. (1992) Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 823-827.
- Bradford, 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**, 248-253.
- Brown, A., Sims, P. F. G., Raeder, U. and Broda, P. (1988) Multiple ligninase-related genes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* **73**, 77-85.
- Brown, J. A., Li, D., Alic, M. and Gold, M. H. (1993) Heat shock induction of manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4295-4299.
- Brown, J., Alic, M. and Gold, M. (1991) Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: Activation by manganese. *J. Bacteriol.* **173**, 4101-4106.
- Coll, P., Fernández-Abalos, J., Villanueva, J., Santamaría, R. and Perez, P. (1993a) Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2607-2613.
- Coll, P., Tabernero C., Santamaría, R. and Pérez, P. (1993b) Characterization and structural analysis of the laccase I gene from the newsley isolated ligninolytic basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4129-4135.
- Cullen, D. and Kersten, P. (1992) Fungal enzymes for lignocellulase degradation. In *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi*. Kinghorn, J. R. and Turner, G., eds. London: Chapman and Hall, pp. 100-131.
- Das, S. B. and Reddy, C. A. (1990) Characterization of extracellular peroxidases produced by acetate-buffered cultures of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **69**, 221-224.
- Datta, A., Bettermann, A. and Kirk, T. K. (1991) Identification of a specific manganese peroxidase among ligninolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1453-1460.
- De Boer, H. A. and Kastelein, R. (1986) In *Maximizing Gene Expression* (Reznikoff, W. and Gold, L., eds. Butterworth Publishers, Woburn, MA. pp. 225-286.
- De Boer, H. A., Zhang, Y. Z., Collins, C. and Reddy, C. A. (1987) Analysis of nucleotide sequences of two ligninase cDNAs from a white-rot filamentous fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* **60**, 93-102.
- De Jong, E., Field, J. A. and de Bont, J. A. M. (1992) Evidence for a new extracellular peroxidase: manganese-inhibited peroxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera sp* BOS 55. *Febs Lett.* **299**, 107-110.

- Dey, S., Maitim, T. K. and Bhattacharyya, B. C. (1991) Lignin peroxidase production by a brown-rot fungus, *Polyporus osteiformis*. *J. Ferment. Bioeng.* **72**, 402-404.
- Dutton, M., Evans, Ch., Atkey, P. and Wood, D. (1993) Oxalate production by basidiomycetes, including the white-rot species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 5-10.
- Eriksson, K., Blanchette, R. and Ander, P. (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Ed. Springer-Verlag, pp. 20-43.
- Eriksson, K., Blanchette, R., Ander, P. (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Ed. Springer-Verlag, pp. 20-43.
- Evans, C., Gallagner, I. and Atkey, P. (1991) Localization of degradative enzymes in white-rot fungus decay lignicellulose. *Biodegradation* **2**, 93-106.
- Faison, B. D., Kirk, T. K. and Farrel, R. L. (1986) Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 251-254.
- Farrel, R., Murtagh, K., Tien, M., Mozuch, M. and Kirk, K. (1989) Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 322-328.
- Fengel, D. and Wegener, G. (1989) Extractives. Inorganic components. In Wood, Chemistry and Reactions, W. De Gruyter Ed., New York, pp. 182-226.
- Finazzi, A. and Rossi, A. (1992) Copper-containing plant oxidases. *Biochemical Society Transactions.* **20**, 369-373.
- Forrester, I., Grabsky, A., Mishra, Ch., Kelley, B., Strickland, W., Leathman, G. and Burgess, R. (1990) Characteristic and N-terminal amino acid sequence of a manganese peroxidase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial wood substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 359-365.
- Frohman, M. A., Dush, M. K. and Martin, G. R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene specific primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8998-9002.
- Galliano, H., Gas, G., Seris, J. and Boudet, A. (1991) Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 478-482.
- Gaskell, J., Vanden Wymelenberg, A., Stewart, P and Cullen, D. (1992) Method to identify specific alleles of a *Phanerochaete chrysosporium* gene encoding lignin peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1379-1381.
- Geiger, J., Huguenin, B., Nicole, M. and Nandris, D. (1986) Laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* **13**, 97-110.

- Glenn, J. and Gold, M. (1985) Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **242**, 329-341.
- Glenn, J. K. and Gold, M. H. (1985) Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **242**, 329-341.
- Glenn, J., Morgan, M., Mayfield, M., Kuwahara, M. and Gold, M. (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.
- Glumoff, T., Harvey, P., Molinari, S., Goble, M., Frank, G., Palmer, J., Smit, J. and Leisola, M. (1990) Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Molecular and kinetic characterization of isoenzymes. *Eur. J. Biochem.* **187**, 515-520.
- Godfrey, B. J., Mayfield, M. B., Brown, J. A. and Gold, M. H. (1990) Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* **93**, 119-124.
- Gold, M., Brown, J., Godfrey, M., Mayfield, M., Wariishi, H. and Valli, K. (1991) In enzymes in Biomass Conversion. Leatham, G. and Himmel, M., eds.; ACS Symposium Series 460, pp. 188-199.
- Gold, M., Brown, J., Godfrey, M., Mayfield, M., Wariishi, H. and Valli, K. (1991) In enzymes Biomass Conversion; Leatham, G. and Himmel, M. eds.; ACS Symposium Series 460, pp. 188-189.
- Haars, A and Hüttermann, A. (1980) Function of laccase in the white-rot fungus *Fomes annosus*. *Arch. Microbiol.* **125**: 233-237.
- Hammel, K. and Moen, M. (1991) Depolymerization of a synthetic lignin in vitro by lignin peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 15-18.
- Harvey, P. J. and Palmer, J. M. (1990) Oxidation of phenolic compounds by ligninase. *J. Biotech.* **13**, 169-179.
- Harvey, P. J., Schoemaker, H. E. and Palmer, J. M. (1986) Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* **195**, 242-246.
- Holmes, D. S. (1984) Improved rapid heating technique for screening recombinant DNA plasmid in *E. coli*. *BioTechniques* **2**, 68-69.
- Holzbaumer, E. L. F. and Tien, M. (1988) Structure and regulation of a lignin peroxidase gene from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 626-633.

- Huber, M. and Lerch, K. (1987) The influence of copper on the induction of tyrosinase and laccase in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* **219**, 335-338.
- Iimura, Y., Takenouchi, K., Nakamura, M., Kawai, S., Katayama, Y. and Morohoshi, N. (1992) Cloning and sequence analysis of laccase genes and its use for a expression vector in *Coriolus versicolor*. In *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* (Kuwahara, M. and Shimada, M., eds.) UNI Publishers, Tokyo, pp. 427-431.
- Johansson, T. and Nyman, O. (1993) Isoenzymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. I. Isolation of enzymes forms and characterization of physical and catalytic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 49-56.
- Johansson, T., Nyman, P., Stoffer, B. and Welinder, K. (1990) In *Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture*. Kirk, K. and Chang, H-m., eds., Butterworth-Heinemann, Londres, pp. 429-438.
- Johansson, T., Welinder, K. and Nyman, O. (1993) Isoenzymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. II. Partial sequence, peptide maps, and amino acid and carbohydrate composition. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 57-62.
- Jönsson, L. and Nyman, P. O. (1994) Tandem lignin peroxidase genes of the fungus *Trametes versicolor*. *Biochim Biophys. Acta* **1218**, 408-412.
- Jonsson, L., Johansson, T., Sjostrom, K. and Nyman, P. O. (1987) Purification of ligninase isoenzymes from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Acta Chem. Scand. Ser. B41*: 766-769.
- Kaput, J., Goltz, S. and Blobel, G. (1982) Nucleotide sequence of the yeast nuclear gene for cytochrome c peroxidase precursor. *J. Biol. Mol.* **257**, 15054-15058.
- Karhunen, E., Kantelinen, A. and Niku-Paavola, M-J. (1990) MnP- peroxidase from the lignin-degrading white rot fungus *Phlebia radiata*. *Arch. Biochem. Biophys.* **279**, 25-31.
- Kawai, S., Higuchi, T., Nabeta, K. and Okuyama, H. (1989) Degradation mechanisms of b-o-4 lignin substructures model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. In T. K. Kirk and H. M. Chang (ed), *Biotechnology in pulp and paper manufacture. Applications and fundamental investigations*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 359-365.
- Kawai, S., Umezawa, T. and Higuchi, T. (1988) Degradation mechanisms of phenolic β -1 lignin substructures model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. *Arch. Biochem. Biophys.* **262**, 99-110.
- Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M. and Higuchi, T. (1988) Aromatic ring cleavage of 4,6-di(ter-butyl)guaicol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus versicolor*. *FEBS Lett.* **236**, 309-311.

- Kay, L., Postie, L. and Bollag, J. M. (1986) Production of induced laccase by the fungus *Rhizoctonia praticola*. *Can. J. Microbiol.* **32**, 867-870.
- Kersten, P. (1990) Glioxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterizations and activation by lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2936-2940.
- Kersten, P. and Kirk, K. (1987) Involvement of a new enzyme, glioxal oxidase, in extracelular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **169**, 2195-2201.
- Kersten, P. (1990) Glioxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2936-2940.
- Kirk, K. and Farrel, R. (1987) Enzymatic Combustion: The Microbiological Degradation of Lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**, 465-505.
- Kirk, T. K. (1988) In Biochemistry and genetics of cellulose degradation: Proceedings of the Microbial Societies Symposium. N°43; Aubert, J., Beguin, P., Millet, J. eds. Academic Press Inc. pp. 315-332.
- Kirk, T. K., Croan, S., Tien, M. Murtagh, K. E. and Farrel, R. L. (1986) Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 27-32.
- Kojima, Y., Tsukuda, Y., Kawai, Y., Tsukamoto, A., Sugiura, J., Sakaimo, M. and Kita, Y. (1990) Cloning, sequences analysis, and expresion of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *J. Biol. Chem.* **265**, 15224-15230.
- Kosman, D. (1984) Galactosa oxidasa. Copper proteins and copper enzymes Chapter 1, Vol II, CRC Press, Lontie, R., Ed., pp. 1-26.
- Kuan, I. and Tien, M. (1993) Stimulation of Mn peroxidase activity: A posible role for oxalate in lignin biodegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1242-1246.
- Kuila, D., Tien, M., Free, J. A. and Ondrias, M. R. (1985) Resonance raman spectra of extracellular ligninase: evidence for a heme active site similar to those of peroxidases. *Biochemistry* **24**, 3394-3397.
- Laemli, U. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Larraín, J. (1993) Variación de isoformas de managaneso peroxidasa de *Ceriporiopsis subvermispora* crecido en fase sólida. Tesis Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile. Diciembre, 1993.
- Leatham, G. F. (1983) A chemically defined medium for the fruiting of *Lentinus edodes*. *Mycologia* **75**(5), 905-908.

- Lee, C. C. and Caskey, C. T. (1990) cDNA cloning using degenerate primers. In *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J.J. and White, T. J., eds. Academic Press Inc. pp. 46-53.
- Leisola, M. S. A., Kozulic, B., Meussdoerffer, F. and Fiechter, A. (1987) Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **262**, 419-424.
- Lobos, S. and Mora, G. Alteration in the electrophoretic mobility of OmpC due to variations in the ammonium persulfate concentration in SDS-PAGE. *Electrophoresis* **12**, 448-450.
- Lobos, S., Larrain, J., Salas, L., Cullen, D. and Vicuña, R. (1994) Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiology* **140**, 2691-2698.
- Maltseva, O., Niku-Paavola, M., Leontevskii, L., Myasoedova, N. and Golovleva, L. (1991) Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Panus tigrinis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**, 291-302.
- Maltseva, O., Niku-Paavola, M., Leontevskii, L., Myasoedova, N. and Golovleva, L. (1991) Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Panus tigrinis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**, 291-302, 1991.
- Maniatis, T., Fritsch E. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- Martínez, A. T., Camarero, S., Guillén, F., Gutiérrez, A., Muñoz, C., Varela, E., Martínez, M. J., Barrasa, J. M., Ruel, K. and Pelayo, J. 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.
- Matsudaira, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoruro membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038.
- Mayfield, M. B., Godfrey, B. J. and Gold, M. H. (1994) Characterization of the *mnp2* gene encoding manganese peroxidase isoenzyme 2 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* **142**, 231-235.
- Milstein, O., Nicklas, B. and Hüttermann (1989) Oxidation of aromatic compounds in organic solvents with laccase from *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 70-74.
- Mino, Y., Wariishi, H., Blackburn, N. J., Loehr, T. M. and Gold, M. H. (1988) Spectral characterization of manganese peroxidase, an extracellular heme enzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **263**, 3394-3397.

- Morohoshi, N. (1991) Laccase of ligninolytic fungus *Coriolus versicolor*. In Enzymes in Biomass Conversion. Leatham, G. F. and Himmel, M. E., eds., pp 207-224. ACS Symp. Ser. 460, ACS, Washington DC.
- Morohoshi, N. (1991) Laccase of ligninolytic fungus *Coriolus versicolor*. In Enzymes in Biomass Conversion (Leatham, G. F. and Himmel, M. E., eds.), ACS Symp. Ser. 460, Washington DC, pp. 207-224.
- Muheim, A., Fietcher, A., Harvey, P. J. and Schoemaker, H. E. (1992) On the mechanism of oxidation of non-phenolic lignin model compounds by the laccase-ABTS couple. *Holzforschung* 46, 121-126.
- Nicole, M., Chamberland, J., Geiger, J., Lecourus, N., Valero, J., Rio, B. and Oullette, G. (1992) Immunocytochemical localization of laccase L1 in wood decay by *Rigidoporus lignosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1727-1739.
- Niku-Paavola, M. L., Karhunen, E., Salola, P. and Raunio, V. (1988). Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem. J.* 254, 877-884.
- Orth, A. B., Rzhetskaya, M., Cullen, D. Tien, M. (1994) Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: genomic organization of lignin and manganese peroxidase-encoding genes. *Gene* 148, 161-165.
- Orth, A., Royse, D., and Tien, M. (1993) Ubiquity of lignin degrading peroxidase among various wood-degrading fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4017-4023.
- Otjen, L., Blanchette, R., Effland, M. and Leatham, G. (1987) Assessment of 30 white-rot basidiomycetes for a selective lignin degradation. *Holzforschung* 41, 343-349.
- Paice, M., Jurasek, C., Bourbonnais, R. and Archibald, F. (1989) Direct biological bleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor*. Tappi, J., May, pp. 217-221.
- Paszczynski, A., Huynh, V., Crawford, R. (1985) Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 27, 37-41.
- Pease, E. A., Andrawis, A. and Tien, M. (1989) Manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: primary structure deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.* 264, 13531-13535.
- Pease, E. and Tien, M. (1992) Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol* 174, 3532-3540.
- Pérez, J. and Jeffries, T. (1990) Mineralization of ¹⁴C-ring-labeled correlates with the production of lignin peroxidase, not of manganese peroxidase or laccase. *App. Env. Microb.* 56, 1806-1812.

- Perié, F. and Gold, M. (1991) Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white-rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2240-2245.
- Perry, C. R., Smith, M., Britnel, C. H., Wood, D. A. and Thurston, C. F. (1993b) Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1209-1218.
- Popp, J. L., Kalyanaraman, B. and Kirk, T. K. (1990) Lignin peroxidase oxidation of Mn⁺² in the presence of veratryl alcohol, malonic or oxalic acid, and oxygen. *Biochemistry* **29**, 10475-10480.
- Poulos, T. L. and Kraut, J. (1980) The stereochemistry of peroxidase catalysis. *J. Biol. Chem.* **255**, 8199-8205.
- Pribnow, D., Mayfield, M. B., Nipper, V. J., Brown, J. A. and 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.
- Proudfoot, N. J. and Brownlee, G. G. (1976) 3' noncoding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **263**, 211-214.
- Reinhammar, B. (1984) Laccase. In copper protein and copper enzymes, Vol. 3, (Lontie, L., ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 1-35.
- Rigling, D. and Van Alfen, N. (1993) Extra and intracellular laccases of chesnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3634-3639.
- Rüttimann, C., Schwember, E., Salas, L., Cullen, D. and Vicuña, R. (1992) Ligninolytic enzymes of the white-rot basidiomycete *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **16**, 64-76.
- Rüttimann-Johnson, C., Cullen, D. and Lamar, R. T. (1994) Manganese peroxidases of the white rot fungus *Phanerochaete sordida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 599-605.
- Rüttimann-Johnson, C., Salas, L., Cullen, D. and Vicuña, R. (1993) Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1792-1797.
- Saloheimo, M., Barajas, V., Niku-Paavola, M.-L. and Knowles, 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.
- Saloheimo, M., Nikku-Paavola, M.-L. and Knowles, J. K. C. (1991) Isolation and structural analysis of the laccase gene from the lignin-degrading fungus *Phlebia radiata*. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1537-1544.
- Schalch, H., Gaskell, J., Smit, T. and Cullen, D. (1989) Molecular cloning and sequences of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2743-2747.

- Shuttleworth, K., Postie, L. and Bollag, J. M. (1986) Production of induced by the fungus *Rhizoctonia praticola*. *Can. J. Microbiol.* **32**, 867-870.
- Specht, C., Di Russo, C., Novotny, C. and Ulrich, R. (1992) *Anal. Biochem.* **119**, 158-163.
- Srebotnik, E., Messner, K. and Foisner, R. (1988) Penetrability of white-rot degraded pine wood by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Env. Microb.* **54**, 2608-2614.
- Stewart, P., Kersten, P., Vanden, A., Gaskell, J. and Cullen, D. (1992) Lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*: Complex regulation by carbon and nitrogen limitation and identification of a second dimorphic chromosome. *J. Bacteriol.* **17**, 5036-5042.
- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M. H. and Poulos, T. L. (1994) The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **269**, 32579-32767.
- Tarentino, A., Gómez, C. and Plummer, T. (1985) Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glicosidase F. *Biochemistry* **24**, 4665-4671.
- Thurston, C. F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**, 19-26.
- Tien, M and Kirk, K. (1983) Lignin degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science* **221**, 661-663.
- Tien, M. and Kirk, K. (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete Chrysosporium*: Purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂- requiring oxigenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2280-2284.
- Tien, M. and Myer, S. B. (1990) Selection and characterization of mutants of *Phanerochaete chrysosporium* exhibiting ligninolytic activity under nutrient-rich conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2540-2544.
- Tien, M. and Tu, C.-P.D. (1987) Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Nature* **326**, 520-523.
- Tollin, G., Meyer, T., Cusanovich, M., Curir, P. and Marchesini, A. (1993) Oxidative turnover increases the rate constant and extent of intramolecular electron transfer in the multicopper enzymes, ascorbate oxidase and laccase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1183**, 309-314.
- Tonon, F. and Odier, E. (1988) Influence of vertryl alcohol and hydrogen peroxide on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 466-472.
- Tuor, U., Wariishi, H., Schoemaker, H. E. and Gold, M. H. (1992) Oxidation of phenolic arylglycerol-β-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an α-carbonyl model compound. *Biochemistry* **31**, 4986-4995.

- Urzúa, U., Larrondo, L. F., Lobos, S., Larraín, J. and Vicuña, R. (1995) Oxidation reactions catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispota*. *FEBS Lett.* **371**, 132-136.
- Valmaseda, M., Jesus-Martinez, M. and Martinez, A. T. (1991) Kinetics of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* and *Plerotus ostreatus*: lignin and polysaccharides alteration and production of related enzymatic activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 817-823.
- Vares, T., Lundell, T. K. and Hatakka, A. Y. (1992) Novel heme-containing enzyme possibly involved in lignin degradation by the white-rot fungus *Junghuhni separabilima*. *FEMS Microbiol. Lett.* **99**, 53-58.
- Vares, T., Niemenmaa, O. and Hatakka, A. (1994) Secretion of ligninolytic enzymes and mineralization of ¹⁴C-ring-labeled synthetic lignin by three *Phlebia tremellosa* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 569-575.
- von Heijne, G. (1985) Signal sequences, the limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**, 99-105.
- Wariishi, H., Akileswaran, L. and 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., Valli, K. and Gold, M. H. (1989) Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* **28**, 6017-6023.
- Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1991) In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 269-275.
- Welinder, K. G. and Mazza, G. (1977) Amino acid sequences of heme-linked histidine-containing peptides of five peroxidases from horseradish and turnip. *Eur. J. Biochem.* **73**, 353-358.
- Williamson, P. (1994) Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: Identification as a laccase. *J. Bacteriol.* **176**, 656-664.
- Yaber, D., Xu, F., Golightly, E., Brown, S., Rey, M., Schneider, P. and Dalboge, H. (1994) In *Proceedings of the Second International Symposium: Applications of Biotechnology to Tree Culture, Protection and Utilization*. Bloomington, Minnesota, US Technical Report NC-175, pp. 115-118.
- Zhang, Y. Z., Zylstra, G. J., Olsen, R. H. and Reddy, C. A. (1986) Identification of cDNA clones for ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* using synthetic oligonucleotide probes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**, 649-656.