



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis *in silico*, clonación, expresión
heteróloga y purificación parcial de
CYP745C2**

Tesis que presenta

Gustavo Martínez Barrales

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Guillermo Pastor Palacios

Dr. Samuel Lara González

San Luis Potosí, S.L.P., 30 de Noviembre de 2020



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Análisis *in silico*, clonación, expresión heteróloga y purificación parcial de CYP745C2**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Gustavo Martínez Barrales** y aprobada el **30 de Noviembre de 2020** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Guillermo Pastor Palacios
Codirector de la tesis

Dr. Samuel Lara González
Codirector de Tesis

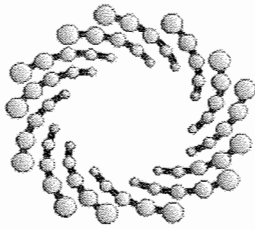
Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Asesor Interno



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales del Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas (CIIDZA) y el Laboratorio de Biología Estructural de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Guillermo Pastor Palacios y el Dr. Samuel Lara González

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 591422) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Este trabajo fue financiado a través del proyecto: FORDECYT No. 296354



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 208 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 30 días del mes de noviembre del año 2020, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Guillermo Pastor Palacios	Secretario	IPICYT
Dr. Samuel Lara González	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Gustavo Martínez Barrales

sobre la Tesis intitulada:

Análisis in silico, clonación, expresión heteróloga y purificación parcial de CYP745C2

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Guillermo Pastor Palacios
Dr. Samuel Lara González

El Jurado, después de deliberar, determinó

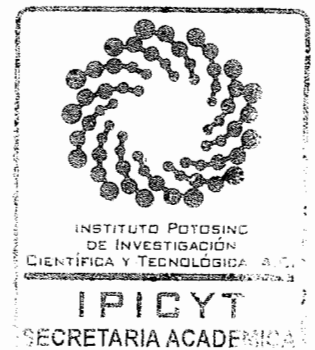
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:25 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 30 días del mes de noviembre de 2020.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizetta Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

Con todo mi cariño y amor para mi Papá, mi Mamá y mi hermano Manolo, por siempre estar junto a mí y apoyarme incondicionalmente en todos mis proyectos y sueños en estos años.

Para Tere y Lola, saben lo mucho que las quiero.

Mi respeto y admiración para el Dr. Guillermo, por siempre guiarme dentro del laboratorio.

Para todas las personas que conocí en esta etapa y me hicieron ser mejor.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Al Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas
(CIIDZA)

Al Dr. Guillermo Pastor Palacios y al Dr. Samuel Lara González por la codirección
y apoyo en este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Rubén López Revilla por las aportaciones
en la tesis.

Al Mtro. Aarón Avalos Calleros y al Mtro. Edgar Daniel Páez Pérez por el apoyo
brindado.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	viii
Resumen	ix
Abstract	x
1. Introducción	1
2. Material y métodos	4
2.1. Análisis <i>in silico</i> y selección de la secuencia <i>CYP745c2</i>	4
2.2. Clonación del gBlock <i>CYP745c2</i> en el vector pET28pps	4
2.3. Evaluación de las condiciones de expresión heteróloga de <i>CYP745c2</i>	5
2.4. Purificación por cromatografía de afinidad a níquel	6
2.5. Purificación por cromatografía de intercambio iónico	7
2.6. Ensayo de caracterización espectral para Citocromo P450	7
3. Resultados y discusión	8
3.1 Selección y análisis de la secuencia <i>CYP745c2</i>	8
3.2 Optimización de la secuencia nucleotídica y clonación en pET28pps	11
3.3. Expresión heteróloga y purificación de la proteína recombinante <i>CYP745c2</i>	14
3.4 Purificación de la proteína recombinante	16
3.5. Caracterización espectral de Citocromo P450	17
5. Conclusiones	20
6. Referencias	21

Lista de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para el gen CYP742c2	5
Tabla 2. Parámetros de optimización de la secuencia CYP745c2	12

Lista de figuras

Figura 1. Árbol filogenético de Citocromos P450	10
Figura 2. Esquema general de la construcción pET28pps/CYP745c2	13
Figura 3. Estandarización del protocolo de expresión de la proteína CYP745c2	15
Figura 4. Expresión y purificación de la proteína CYP745c2	17
Figura 5. Caracterización espectral de Citocromo P450	19

Resumen

Análisis *in silico*, clonación, expresión heteróloga y purificación parcial de CYP745C2

Citocromo P450 (CYP) es el nombre distintivo que recibe una amplia familia de hemoproteínas. La mayoría de estas enzimas tienen actividad de monooxigenasa, que catalizan o transfieren un sólo átomo de oxígeno al sustrato. Estas enzimas están involucradas en el metabolismo de muchos xenobióticos como medicamentos, pesticidas, agentes cancerígenos y productos químicos contaminantes del medio ambiente. Las CYP de microalgas son un campo sin explorar, considerando que se ha caracterizado bioquímicamente un sólo citocromo P450 de microalgas (Cook et al., 2016; Gong et al., 2018). En el presente trabajo se analizó la secuencia de aminoácidos de CYP745c2 reportada en la base de datos de genomas de microalgas. Este análisis *in silico* se realizó utilizando las herramientas PFAM, InterPro, MycoCosm, TMHMM, NCBI y MEGA X. La secuencia nucleotídica correspondiente fue optimizada para el uso de codones y expresión heteróloga en *Escherichia coli*. Los datos obtenidos del análisis *in silico* sugieren que es una secuencia relacionada a la familia de enzimas citocromo P450. Hasta el momento se ha clonado el gen *CYP745c2* y la construcción pET28pps-CYP745c2 se ha verificado por secuenciación; de igual forma se han establecido las condiciones de expresión de la proteína recombinante CYP745c2 usando la cepa BL21 (DE3) Arctic de *E. coli* y su purificación parcial por cromatografía de afinidad a níquel. Finalmente, un experimento de caracterización espectral de monóxido de carbono sugiere la presencia de un citocromo P450.

PALABRAS CLAVE: CYP745c2, hemoproteína, microalgas.

Abstract

***In silico* analysis, cloning, heterologous expression and partial purification of CYP745C2**

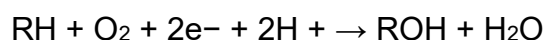
Cytochrome P450 (CYP) is the distinctive name for a large family of hemoproteins. Most of these enzymes have monooxygenase activity, which catalyzes or transfers a single oxygen atom to the substrate. These enzymes are involved in the metabolism of many xenobiotics such as drugs, pesticides, carcinogens, and chemicals that pollute the environment. Microalgal CYPs are an unexplored field, considering that only a single microalgal CYP has been biochemically characterized (Cook et al., 2016; Gong et al., 2018). The present research focuses on the *CYP745c2* annotated in the database of microalgae genomes. An *in silico* analysis of the nucleotide sequence of *CYP745c2* was carried out, using tools such as PFAM, InterPro, MycoCosm, TMHMM, NCBI and MEGA X. The corresponding nucleotide sequence was optimized for codon usage and heterologous expression in *Escherichia coli*. The data obtained from the *in silico* analysis suggests that it is a sequence related to the cytochrome P450 enzyme family. To date the *CYP745c2* gene has been cloned and the construct pET28pps-CYP745c2 has been verified by sequencing; conditions for the expression of the recombinant CYP745c2 protein have been established using the *E. coli* strain BL21 (DE3) Arctic and the protein has been partially purified by nickel affinity chromatography. Finally, a carbon monoxide spectral assay suggests the presence of a P450 cytochrome.

KEY WORDS: CYP745c2, hemoprotein, microalgae.

1. Introducción

Citocromo P450 (CYP450) es el nombre de una amplia familia de hemoproteínas, con actividad de monooxigenasa. Los CYP450 se han diversificado desde un solo ancestro común hasta encontrarse actualmente tanto en microorganismos como en organismos superiores como los seres humanos. Estas enzimas comenzaron a estudiarse a inicios de la década de 1950, al detectar un sistema enzimático desconocido con actividad oxidativa. Sin embargo, fue hasta la década de 1980 cuando se comenzó a elucidar sus funciones biológicas. Las enzimas CYP450 están involucradas en el metabolismo de compuestos xenobióticos como medicamentos, pesticidas y agentes químicos contaminantes presentes en el medio ambiente (Estabrook, 2003). La designación del nombre CYP450 se basa en que estas enzimas contienen un grupo hemo (ion hierro) que es típicamente férrico, pero puede ser ferroso *in vivo*. El hierro está coordinado proximalmente por un residuo de cisteína en su forma de tiolato (desprotonado), y este estado de ligación se considera una forma activa de la enzima. La CYP férrica coordinada con el tiolato de cisteína tiene absorción máxima (banda de Soret) a ~418 nm. En su estado ferroso se une al monóxido de carbono (CO) para generar un complejo FeI-CO en el que la banda de absorbancia principal (Soret) se encuentra a ~450 nm. Este cambio espectral proporciona la base para la denominación de estas enzimas (Johnston *et al.*, 2011).

La reacción redox catalizada por CYP450 es:



En dicha reacción, la transferencia de electrones de una molécula donadora, como NADPH, a CYP450 se puede llevar a cabo por dos sistemas diferentes. La primera es por medio de dos moléculas, una ferredoxina y una ferredoxina reductasa; mientras que en el otro sistema se transfieren los electrones a través de citocromo P450 reductasa (CPR) (Cook *et al.*, 2016; Córdova *et al.*, 2017; Gong *et al.*, 2018). La estructura secundaria general de las enzimas CYP450 se divide en dominio α y dominio β . El dominio β a menudo se asocia con el reconocimiento del sustrato y el canal de acceso al sitio catalítico. Mientras que el dominio α presenta los

aminoácidos catalíticos (Werck-reichhart y Feyereisen, 2000). Las enzimas CYP450 se clasifican en familias y subfamilias, siguiendo las recomendaciones de un comité de nomenclatura en función de la identidad de aminoácidos. Las familias se conforman de citocromos que tienen 40 % o más de identidad en su secuencia de aminoácidos; mientras que las subfamilias son los conjuntos de citocromos que poseen al menos 55 % de identidad en su secuencia de aminoácidos. Cada familia recibe un número, cada subfamilia una letra, y cada gen dentro de una subfamilia un segundo número. Este código siempre tiene el prefijo "CYP", que lo denota como un citocromo P450.

Desde 1970, se han identificado nuevas isoformas de CYP450 presentes en diferentes organismos. En este sentido, las bases de datos han permitido anotar, curar y clasificar nuevas secuencias reportadas de CYP450. En el 2009, Nelson D. R. publicó una base de datos la cual incluye secuencias reportadas hasta ese momento en genomas de eucariotes y procariontes (Nelson, 2009). Sin embargo, esta base de datos ha sido actualizada y cuenta con un total de 347,755 secuencias agrupadas en 2,252 familias (Urlacher y Girhard, 2019).

Las plantas, en comparación con otros eucariotes, tienen un número excepcionalmente alto de genes CYP450. Varios CYP450 están involucrados en la biosíntesis e inactivación de las hormonas de crecimiento de las plantas, incidiendo en la formación de flores, tallos, hojas, el desprendimiento de las hojas, el desarrollo y maduración del fruto. Por ejemplo, CYP79B2 / B3 regulan la biosíntesis de auxinas en *Arabidopsis* (Vadassery *et al.*, 2008). Adicionalmente, se sabe que las CYP450 de plantas juegan un papel fundamental en la respuesta a agentes externos, incluyendo a un amplio abanico de agentes patógenos. Tal es el caso de CYP82G1 de *Arabidopsis* que cataliza el paso final en la biosíntesis de los volátiles vegetales denominados homoterpenos (E,E)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (TMTT) y (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nononario (DMNT), que participan tanto en la atracción de vectores polinizadores y en el proceso de defensa contra insectos invasores como el pulgón (Lee *et al.*, 2010).

Por otro lado, los hongos filamentosos producen una amplia gama de metabolitos secundarios de importancia biomédica, agrícola e industrial, muchos de los cuales se sintetizan con la participación de varios CYP450 (Chen *et al.*, 2014). Por lo que cepas de hongos, así como sus CYP450 aisladas, han sido investigadas ampliamente en el área de la biotransformación de metabolitos secundarios con la finalidad de obtener compuestos bioactivos de interés (Palmer-Brown *et al.*, 2019).

En lo que refiere a CYP450 en algas, se han identificado, anotado y analizado filogenéticamente secuencias de dos microalgas modelo, *Coccomyxa sp.* y *Chlorella sp.* Los datos obtenidos sugieren la presencia de 68 secuencias CYP450 entre ambos genomas. Estas secuencias se agrupan en 32 familias, de las cuales 27 son nuevas familias (designadas como CYP745 a CYP747, CYP845 a CYP863, y CYP904 a CYP908) y probablemente exclusivas de microalgas (Mthakathi *et al.*, 2015). Recientemente se ha buscado dilucidar la actividad catalítica de las CYP450 microalgales. Tal es caso de CYP55B1 de *Chlamydomonas reinhardtii* que muestra una actividad de óxido nítrico reductasa, con posible aplicación como biosensor del gas óxido nítrico (Gong *et al.*, 2017).

Las propiedades bioquímicas de las enzimas CYP450 de microalgas son poco conocidas. En este trabajo nos enfocamos en el citocromo P450 CYP745c2 presente en genomas de microalgas. Inicialmente, realizamos una selección y análisis de la secuencia, así como la optimización en uso de codones para expresión heteróloga en células de *Escherichia coli*. La secuencia nucleotídica fue clonada en el vector pET28pps obteniendo la construcción CYP745c2-pET28pps. Además, realizamos una purificación parcial de la proteína recombinante y el resultado del ensayo espectral para citocromo P450 sugiere que la proteína parcialmente purificada interactúa con el monóxido de carbono CO formando un complejo con absorbancia a 450 nm, consistente con una enzima citocromo P450.

2. Material y métodos

2.1. Análisis *in silico* y selección de la secuencia *CYP745c2*

La búsqueda e identificación de secuencias nucleotídicas codificantes para enzimas citocromo P450 en los genomas de *Chlorella sp.* y *Coccomyxa sp.*, se realizó considerando las secuencias anotadas y depositadas en la plataforma “The cytochrome P450 homepage” (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>) (Nelson, 2009), que es una base de datos exclusiva para secuencias de citocromos. En relación a microalgas, cuenta con aproximadamente 190 secuencias reportadas. Estas secuencias de aminoácidos fueron comparadas mediante un alineamiento múltiple con el programa Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). En el análisis de secuencias se consideraron los siguientes criterios: Secuencia reportada en las bases de datos de los genomas de *Chlorella sp.*, *Coccomyxa sp.* y *Chlamydomonas reinhardtii*, debido a que están mejor anotados (Holm-Hansen, 1964; Higashivama y Yamada, 1991; Sabeeha S. *et.al.*, 2007). El análisis en las plataformas PFAM (<https://pfam.xfam.org/>) e interPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) resultara en la clasificación de la secuencia como CYP450. Adicionalmente, las secuencias fueron analizadas y comparadas con la herramienta Blastp en la base de datos GenBank de NCBI. Mediante el procedimiento anterior, seleccionamos la secuencia anotada en genomas de microalga como *CYP745c2*. Esta secuencia también fue analizada con el servidor TMHMM de la Universidad Técnica de Dinamarca para la identificación de posibles dominios transmembranales.

La secuencia nucleotídica correspondiente a *CYP745c2*, fue analizada con los servidores GenScript (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>) y IDTdna (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>), con la finalidad de realizar una optimización de uso de codones para células de *Escherichia coli*, dado que es el sistema de expresión heteróloga contemplado en este trabajo.

2.2. Clonación del gBlock *CYP745c2* en el vector pET28pps

La secuencia nucleotídica optimizada de *CYP745c2* fue sintetizada por la compañía Integrated DNA Technologies (IDT) como gBlock, el cual es un segmento de ADN de doble cadena. El gBlock fue clonado en el vector de expresión pET28pps entre los

sitios de las enzimas de restricción NdeI y HindIII. Para esto, tanto el vector como el gBlock (inserto) fueron tratados con las enzimas correspondientes. El siguiente paso fue una reacción de ligación con una relación molar 3:1 (inserto:vector) y la ADN ligasa T4 de New England Biolabs. La mezcla se incubó a 16 °C durante 16 horas. Posteriormente, la cepa *E. coli* TOP10 fue transformada con 5µL de la mezcla de ligación. Las colonias obtenidas se evaluaron por PCR de colonia con oligonucleótidos específicos para el gen (Tabla 1). La colonia positiva fue inoculada en medio LB suplementado con 50µg/mL kanamicina, y de este cultivo se extrajo ADN plasmídico. La clona fue verificada mediante corte con las enzimas de restricción NdeI y HindIII y resuelta por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Adicionalmente, la clona fue secuenciada en el LANBAMA por el método de Sanger utilizando oligos T7 universales. La construcción obtenida fue designada como CYP742c2 – pET28pps.

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para el gen CYP742c2

Nombre	Secuencia
cypFw	5' GGGATCCATATGCTTGAGTGG 3'
cypRv	5' CGCGGATCCAAGCTTTTA 3'

2.3. Evaluación de las condiciones de expresión heteróloga de CYP745c2

La expresión heteróloga de CYP745c2 se realizó considerando los trabajos publicados sobre enzimas citocromo P450 expresadas y purificadas a partir de células de *E. coli*. Los factores que evaluamos en este trabajo para determinar las condiciones óptimas fueron: medio de cultivo, cepa bacteriana, tiempo y temperatura de inducción. En este sentido, se probaron dos medios de cultivo, el caldo de Luria Bertani (LB) y el caldo Terrific Broth (TB), ambos fueron suplementados con elementos traza (TES), como ZnCl₂, CoCl₂, Na₂MoO₄, CaCl₂ y CuCl₂; y el antibiótico correspondiente (50µg/mL de kanamicina; 50µg/mL de cloranfenicol; 20µg/mL de gentamicina). Las cepas de *E. coli* evaluadas en los ensayos fueron BL21 (DE3) Star, BL21(DE3) pLysS y BL21(DE3) Arctic. La expresión de la proteína se indujo con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a

concentración final de 0.5 mM. Las temperaturas a las cuales se incubaron los cultivos después de la adición de IPTG fueron 16 °C, 28 °C y 37 °C por tiempos de 4, 6, 8, 16 y 24 horas.

De manera general, primero las células bacterianas fueron transformadas por choque térmico con la construcción CYP742c2 – pET28pps. Posteriormente, una colonia de cada cepa fue inoculada en medio LB suplementado con 50µg/mL de kanamicina; 50µg/mL de cloranfenicol; 20µg/mL de gentamicina dependiendo de la cepa, e incubada toda la noche en agitación a 37 °C. Estos cultivos se utilizaron para inocular medio fresco LB y TB suplementados con TES y el antibiótico correspondiente. Los cultivos crecieron a 37 °C hasta una densidad óptica de 0.5 a 600nm y en seguida se procedió a la inducción de la expresión de proteína en las temperaturas y tiempos mencionados anteriormente. Muestras de cada cultivo fueron tomadas y analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

2.4. Purificación por cromatografía de afinidad a níquel

La purificación de la proteína recombinante se llevó a cabo a partir de un cultivo de la cepa BL21(DE3) Arctic transformada con la construcción CYP745c2-pET28pps. La inducción fue a una densidad óptica de 0.5 a 600nm, temperatura de 16 °C durante 24 horas. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado y la pastilla celular resuspendida en 30mL de amortiguador de lisis (NaH₂PO₄ 50mM pH 8.0, NaCl 300mM, PMSF 1mM). La suspensión celular fue lisada por sonicación (10 minutos a 40% amplitud, ciclos 15sON/45sOFF). El lisado celular fue centrifugado a 12,000rpm durante 20 minutos a 4 °C; el sobrenadante fue recuperado y una muestra de la pastilla fue tomada para ser analizada por SDS-PAGE posteriormente.

El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana Millipore con poros de 0.45µm y se transfirió a una columna de agarosa Ni-NTA de Jena Bioscience (1.5mL), previamente estabilizada con 30mL de amortiguador de lisis. Seguido de esto, la columna se lavó con 3 volúmenes de columna con amortiguador de lavado 1 (NaH₂PO₄ 50mM pH 8.0, NaCl 300mM, DTT 1mM), y posteriormente lavado 2 (NaH₂PO₄ 50mM pH 8.0, NaCl 300mM, DTT 1mM, Imidazol 20mM). La elución se

realizó con amortiguador de elución (NaH_2PO_4 50mM pH 8.0, NaCl 300mM, DTT 1mM, Imidazol 500mM). Una muestra de cada paso del proceso fue tomada y analizada por SDS-PAGE.

2.5. Purificación por cromatografía de intercambio iónico

La elución con proteína parcialmente purificada, obtenida en el paso anterior, se filtró por una columna PD10 (GE HealthCare) con la finalidad hacer cambio de amortiguador de elución (NaH_2PO_4 50mM, NaCl 300mM, DTT 1m, Imidazol 500mM) a amortiguador A (Tris 100mM pH 7, DTT 1mM, EDTA 0.5mM). Posteriormente, se realizó una cromatografía de intercambio iónico usando la columna catiónica HiTrap SP y el equipo FPLC AKTA (GE HealthCare). Una vez que la proteína fue inyectada a la columna, previamente equilibrada con el amortiguador A, se aplicó un gradiente con los amortiguadores A (Tris 100mM pH 7, DTT 1mM, EDTA 0.5mM) y B (Tris 100mM pH7, NaCl 1M, DTT 1mM, EDTA 0.5 mM), desde 0 a 100% de B en 20 volúmenes de columna con un flujo de inyección de 2mL/min.

2.6. Ensayo de caracterización espectral para Citocromo P450

La proteína parcialmente purificada por cromatografía de afinidad a níquel fue empleada para realiza un ensayo de caracterización espectral reportado por Omura y Sato (1964). Para este ensayo, utilizamos dos muestras de 1mL de volumen (aproximadamente 0.25 mg/mL de proteína total), correspondientes a la elución de la cromatografía por afinidad níquel (NaH_2PO_4 50mM pH 8.0, NaCl 300mM, DTT 1mM, Imidazol 500mM). El equipo utilizado fue el espectrómetro Biorad Smartspec Plus y celdas de 1mL de capacidad. La muestra 1 correspondió a la proteína en solución, mientras que la muestra 2 fue proteína en solución más monóxido de carbono (bombeado a la solución) y 1.5 mg de diotinito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). La absorbancia de ambas muestras fue medida por triplicado a las longitudes de onda de 420nm, 450nm y 500nm.

3. Resultados y discusión

3.1 Selección y análisis de la secuencia CYP745c2

Inicialmente realizamos una búsqueda en la base de datos de NCBI de proteínas anotadas como citocromo P450 y encontramos más de 890 000 registros. Con la finalidad de realizar un análisis de las secuencias relacionadas exclusivamente a genomas de microalgas, revisamos la plataforma “The cytochrome P450 homepage” (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>) (Nelson, 2009). En esta base de datos hay secuencias de citocromos P450 anotados en genomas de animales, plantas, eucariontes inferiores, bacterias y arqueobacterias. En el caso de microalgas hay aproximadamente 190 registros de enzimas anotadas como citocromos P450 en los genomas de microalgas de los géneros *Chlamydomonas*, *Volvox*, *Chlorella*, *Ostreococcus* y *Micromonas*. Comparamos las secuencias de microalgas entre sí mediante un alineamiento múltiple utilizando Clustal Omega. Agrupamos las secuencias idénticas en longitud y con 50% o más de identidad en aminoácidos y de cada grupo consideramos una secuencia. Posteriormente, realizamos un filtrado con los siguientes criterios: 1) Secuencias reportadas en las bases de datos de los genomas de *Chlorella sp.*, *Coccomyxa sp.* y *Chlamydomonas reinhardtii*, debido a que están mejor anotados (Holm-Hansen, 1964; Higashivama y Yamada, 1991; Sabeeha S. *et.al*, 2007), 2) Análisis mediante *protein BLAST* de NCBI, que mostrara la relación de la secuencia con enzimas CYP450 de microalgas y otros organismos, 3) Así como, la identificación de posibles motivos conservados de la familia CYP450 mediante las plataformas PFAM (<https://pfam.xfam.org/>) e InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Con los datos obtenidos y los criterios mencionados anteriormente, seleccionamos la secuencia anotada en el genoma de *Chlorella variabilis* NC64A como CYP745c2. Esta es una secuencia de 519 aminoácidos, correspondiente a 1560 nucleótidos. En los genomas de *Coccomyxa sp.* y *Chlamydomonas reinhardtii* encontramos secuencias homólogas con 56 y 54% de identidad, respectivamente. El análisis de la secuencia de aminoácidos en las plataformas Pfam e InterPro predice que CYP745c2 es una secuencia relacionada con enzimas de la familia citocromo P450. Con la plataforma PFAM obtuvimos un “bit score” de 208.5 que relacionó a la

secuencia en estudio con una citocromo P450 y en el caso de InterPro predijo que es una enzima CYP450 clase II; al hacer un alineamiento de secuencias con el software MEGAX identificamos algunos aminoácidos conservados en la secuencia que localizan en las hélices B', I, β 3 y β 5 conservadas en las estructuras de citocromos P450 clase II (Figura 1B).

Con el servidor TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) predijo en la secuencia CYP745c2 una sección considerada como una zona transmembranal, comprendida del aminoácido 1 al 90, conformada mayoritariamente por aminoácidos hidrofóbicos. En este sentido, los datos obtenidos sugieren que la secuencia CYP745c2 corresponde a un enzima citocromo P450 de clase II, como las que están presentes principalmente en eucariontes y asociadas a la membrana del retículo endoplásmico (Cook *et al.*, 2016, Schenkman y Jansson, 2003; Waskell y Kim, 2015; Parage *et al.*, 2016; Córdova *et al.*, 2017).

Por otro lado, protein *BLAST* de NCBI mostró que la secuencia CYP745c2 tiene una identidad entre 60 y 70% con secuencias anotadas en genomas de otras microalgas como *Micractinium conductrix*, *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus sp.*, *Dunaliella salina*, *Monoraphidium neglectum* y *Gonium pectorale*, además de ser homóloga a secuencias reportadas en genomas de hongos, plantas y protozoarios.

Algunas de estas secuencias fueron utilizadas para la elaboración de un árbol filogenético mediante el software Mega X (Kumar *et al.*, 2018), utilizando un alineamiento MUSCLE y el método Maxima verosimilitud. El árbol filogenético muestra que las secuencias CYP450 de microalgas se agrupan en un clado cercano al grupo de CYP450 de hongos y relativamente distante de los de plantas. Este clado de CYP450 de microalgas observado en el árbol y considerando el porcentaje de identidad entre las secuencias sugiere que es una subfamilia exclusiva de microalgas (Figura 1A). De este modo también se podría hipotetizar alguna actividad potencial de interés, por su cercanía con las CYP450 de hongos, como el caso del CYP5145A3 del hongo *Phanerochaete chrysosporium* que mostró una posible actividad de biorremediación hacia dos compuestos del tipo dibenzo-p-dioxinas, que son compuestos contaminantes del ambiente y altamente perjudiciales para la salud pública (Chen *et al.*, 2014; Notonier, Alexander y Jayakody, 2016).

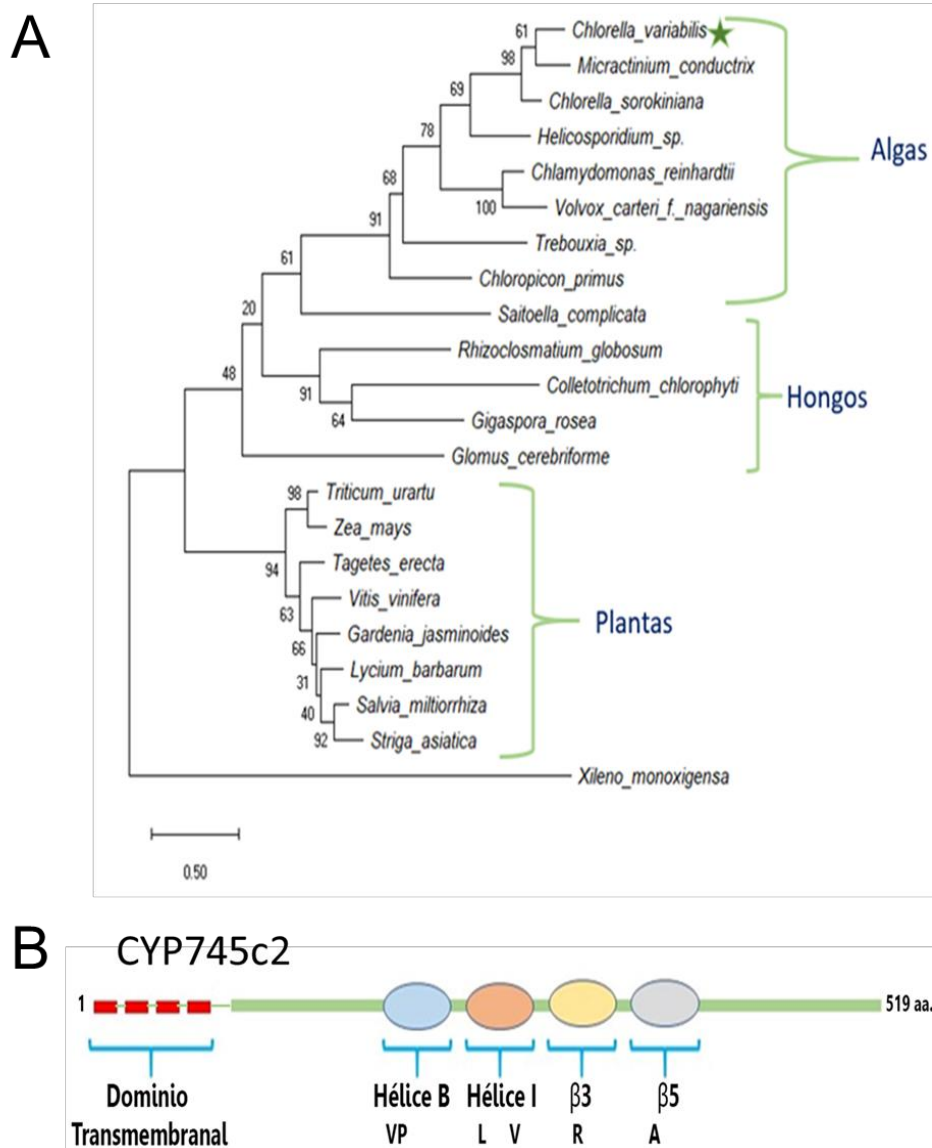


Figura 1. Árbol filogenético de Citocromos P450

El árbol filogenético se construyó usando CYP450 de algas, hongos y plantas con el software de Mega, alineamiento con Muscle y el método de máxima verosimilitud. (A) En el árbol se observa que las CYP450 de microalgas se encuentran más relacionadas con los hongos. Se usó como grupo externo una xileno monoxigenasa. (B) Diagrama general de la secuencia CYP745c2 donde se muestran sus características, en rojo una línea punteada señala la zona dominio de transmembrana en la secuencia; en óvalos color verde los dominios conservados de una secuencia de CYP450, la hélice B', la hélice I, $\beta 3$ y $\beta 5$. Se muestran los aminoácidos conservados de cada dominio.

3.2 Optimización de la secuencia nucleotídica y clonación en pET28pps

La secuencia nucleotídica de CYP745c2 proviene de la base de datos del genoma de *C. variabilis* NC64A con código de acceso ChINC64A_1_139264 (GenBank XM_005844091). Inicialmente, la secuencia nucleotídica fue usada para un alineamiento mediante Blastn y Blastx en la base de datos de GenBank, con la finalidad de corroborar que correspondiera a CYP745c2 de *C. variabilis*. Posteriormente, las plataformas de las compañías Integrated DNA Technology (IDT) y GenScript fueron utilizadas para la optimización de la secuencia nucleotídica en uso de codones para *E. coli*. Los siguientes parámetros son considerados en ambas plataformas: índice de adaptación de codones (CAI), el cual debe estar entre 0.8 y 1.0; porcentaje del contenido de Guaninas y Citosinas entre 30% y 70%; Distribución de la Frecuencia de Codones (CFD), con un porcentaje menor al 30%. Los parámetros anteriores permiten predecir, de manera general, una adecuada expresión de la proteína en el organismo huésped, en este caso *E. coli*. Por ejemplo, el índice de adaptación de codones (CAI) es la distribución de la frecuencia de uso de codones a lo largo de la región codificante del gen y se relaciona con probabilidad de un alto nivel de expresión. Un valor de CAI entre 0.8 a 1.0 se considera ideal, y predice una mayor probabilidad de que el gen se exprese de manera eficiente (Galehdari *et al.*, 2013). El contenido de Guaninas y Citosinas, y la Distribución de Frecuencia de Codones (CFD), permiten estimar una eficiente transcripción y traducción de la secuencia (Galehdari *et al.*, 2013). Los datos revisados en las plataformas Integrated DNA Technology (IDT) y GenScript, nos permitieron diseñar y seleccionar la secuencia con los mejores valores y favorecer una óptima expresión heteróloga en células de *E. coli* (Tabla 2). En relación a la región transmembranal predicha por el servidor TMHMM en la secuencia de aminoácidos de CYP745c2, decidimos eliminar los nucleótidos correspondientes a estos aminoácidos. Esta decisión se basó en trabajos publicados sobre expresión heteróloga de CYP450 eucarióticos en *E. coli* los cuales refieren que se puede eliminar esta región debido a que no afecta la actividad catalítica del enzima, y puede favorecer la solubilidad de la proteína (Hausjell, Halbwirth y Spadiut, 2018; Li, Li y Smolke, 2018; Fürst *et al.*, 2019; Mustafa *et al.*, 2019).

El diseño final del gBlock correspondió a una secuencia nucleotídica de 1326 pares de bases que codifican 442 aminoácidos de CYP745c2, con un peso molecular teórico de 50.8 kilodaltones (kDa). A esta secuencia nucleotídica se agregaron los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción NdeI y HindIII, los cuales flanquean la secuencia en los extremos 5' y 3', respectivamente. El gBlock con la secuencia correspondiente a CYP745c2 fue clonado en el vector de expresión pET28pps, para obtener la construcción denominada pET28pps/CYP745c2 (Figura 2). La secuencia del gen localizada entre los sitios de corte HindIII y NdeI del plásmido se comprobó por medio de PCR de colonia y digestión con las enzimas HindIII y NdeI. En la Figura 2 se puede observar el análisis de PCR de colonia y el patrón de digestión de la construcción. Finalmente, la clona se verificó por secuenciación.

Tabla 2. Parámetros de optimización de la secuencia CYP745c2

Secuencia No optimizada (Genoma <i>Chlorella variabilis</i>)	Secuencia Optimizada (gBlock)
Nucleótidos 1557 pb CAI: 0.70 GC%: 64.44% CFD: 9% Proteína 519 residuos de aminoácidos Peso molecular de 58.52kDa Punto Isoeléctrico: 8.58	Nucleótidos 1326 pares de bases CAI: 0.81 GC%: 51.10% CFD: 5% Proteína 442 residuos de aminoácidos Peso molecular de 50.8kDa Punto Isoeléctrico: 8.44
Parámetros considerados como óptimos: Índice de adaptación de codones (CAI): 0.8 -1.0 Porcentaje del contenido de G y C (GC%): 30 - 70% Distribución de la Frecuencia de Codones (CFD): < 30%.	

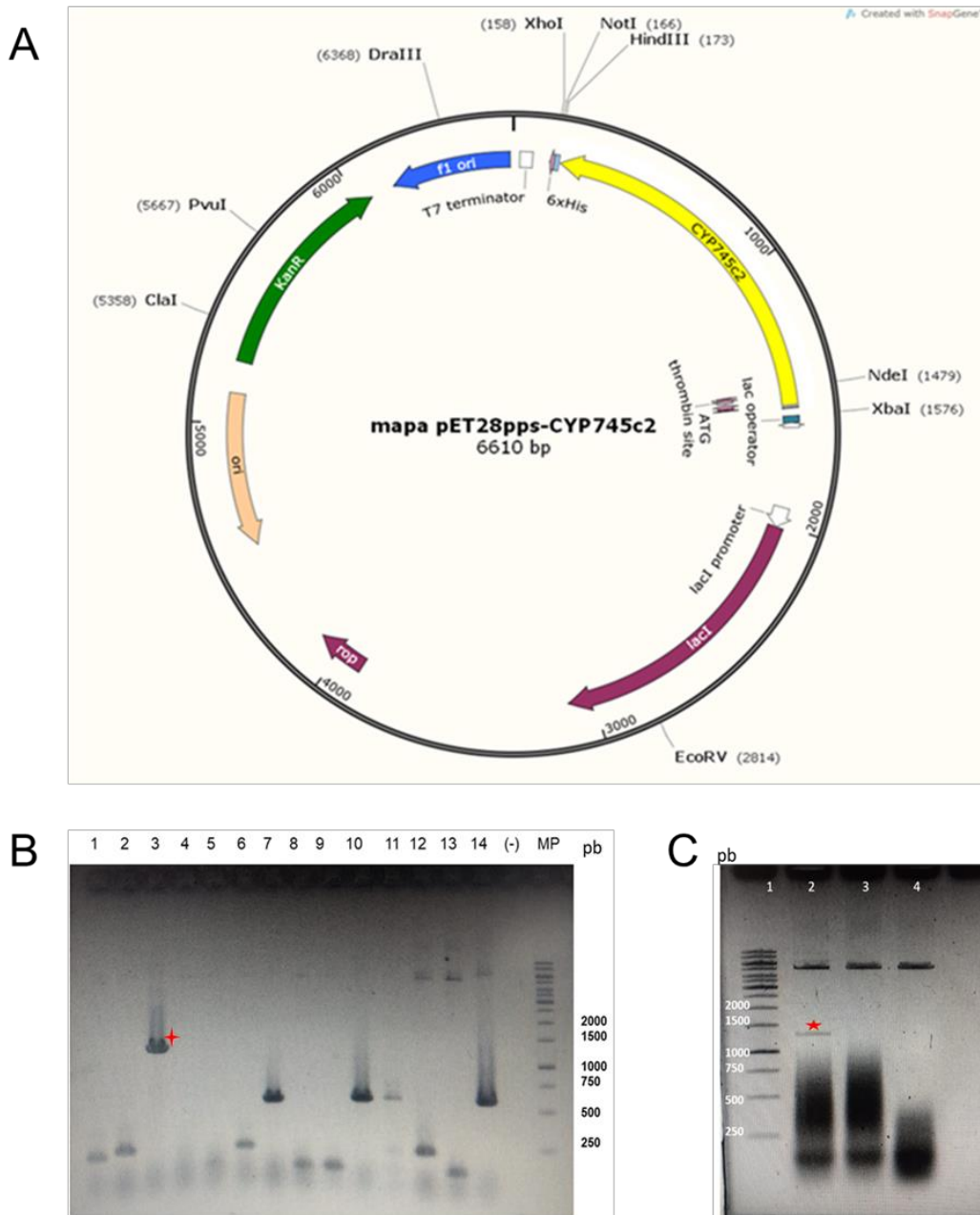


Figura 2. Esquema general de la construcción pET28pps/CYP745c2

(A) La secuencia *CYP745c2* fue clonada entre los sitios de corte de NdeI y HindIII del vector de expresión pET28pps. Las clonas fueron verificadas por PCR de colonia. (B) La construcción en el carril 3 de izquierda a derecha tiene aproximadamente 1340pb, indicado en rojo. (C) La construcción fue verificada por corte con NdeI y HindIII. Carril 1, marcadores de tamaño. Carril 2, construcción CYP745c2. Carril 3, construcción obtenida por ligación sin inserto. Carril 4, pET28pps vacío. Se puede observar en la digestión de CYP745c2 la liberación de un fragmento de alrededor de 1340 pb, esperado para el gen de CYP745c2.

3.3. Expresión heteróloga y purificación de la proteína recombinante CYP745c2

La estandarización de las condiciones de expresión de la proteína en células de *E. coli* se basó en las reportadas en trabajos publicados. En este sentido, se probaron los medios de cultivo Luria Broth (LB) y Terrific Broth (TB), ambos suplementados con elementos traza (TES), que favorecen la expresión de CYP450 (Lau *et al.*, 2019). Por otro lado, también se pusieron a prueba diferentes cepas de *E. coli*, las cuales fueron BL21 (DE3) Star, BL21(DE3) pLysS y BL21(DE3) Arctic. Estas cepas tienen en común la característica fenotípica de ausencia de las proteasas *OmpT* e *lon*, así como la presencia de un profago DE3 derivado del bacteriófago T7 que contiene el gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5 (Haeyoung Jeong, 2018). Adicionalmente, la cepa BL21 (DE3) Star presenta una mutación del gen RNasa E (*rne131*) que reduce los niveles de RNasa y previene la degradación del ARNm, lo que permite mayor estabilidad al ARNm del gen introducido. La cepa BL21 (DE3) pLysS, expresa de manera constitutiva bajos niveles de lisozima T7, reduciendo así la expresión basal de genes recombinantes que podrían ser tóxicos para la cepa (Lara, 2011). Finalmente, la cepa BL21 (DE3) Arctic expresa las chaperonas Cpn10 y Cpn60 de *Oleispira antarctica*, que favorecen el correcto plegado de proteínas heterólogas (Silaban *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos con las cepas BL21 (DE3) Star y BL21(DE3) pLysS no fueron convincentes en las condiciones probadas, debido a que no se observó un cambio significativo entre la muestra sin inducir e inducida (Figura 3). Sin embargo, los resultados con la cepa BL21 (DE3) Arctic crecida en medio TB suplementado con TES, y a 16 °C durante 24 horas, mostraron una banda diferencial en la muestra inducida (Figura 4A). En la misma figura se puede observar una banda más intensa alrededor de 50 kDa que sugiere la presencia de la proteína recombinante.

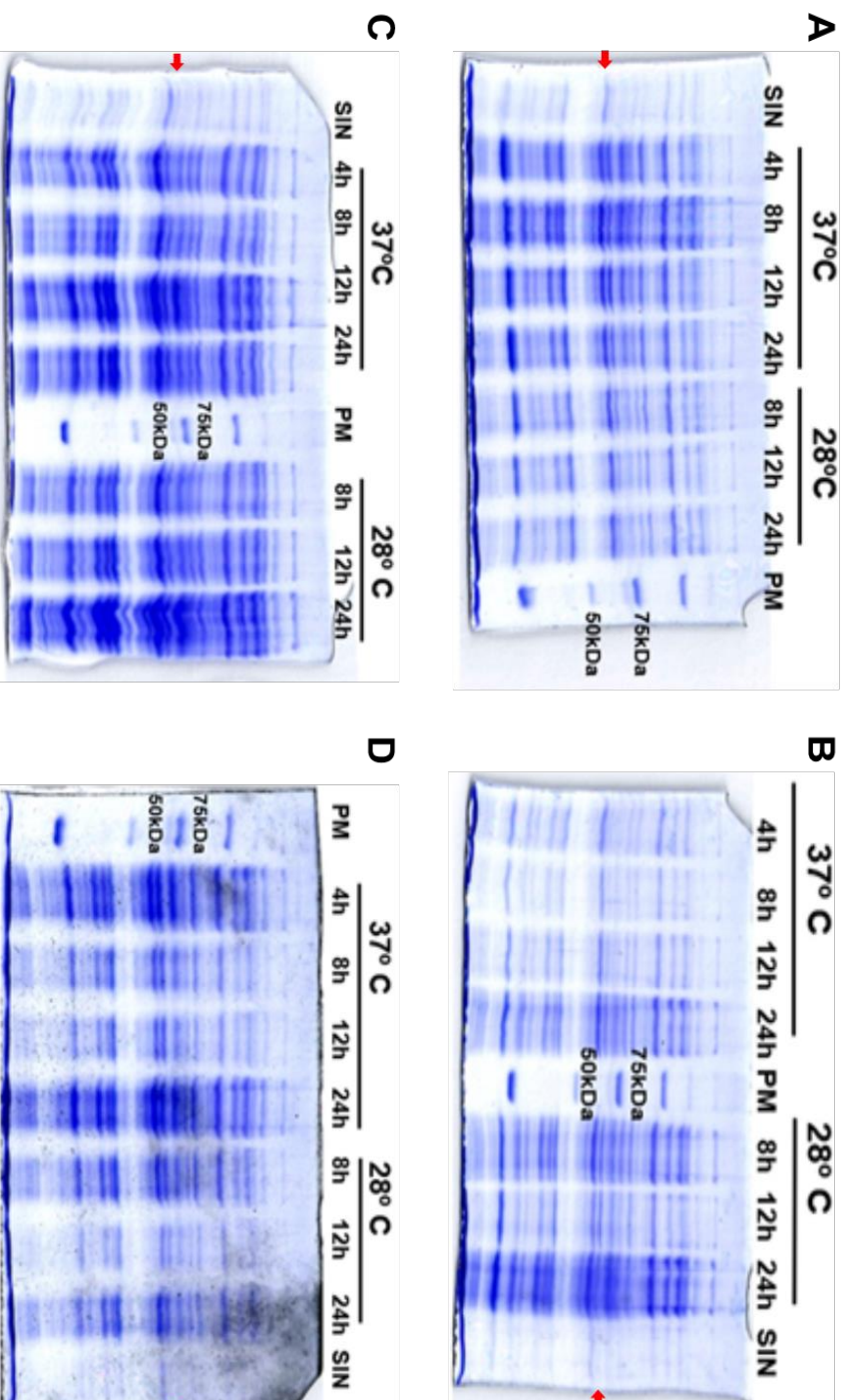


Figura 3. Estandarización del protocolo de expresión de la proteína CYP745c2

Electroferogramas de proteínas de las cepas de *E. coli* transformantes incubadas en caldo LB o TB a 37 °C y 28 °C por 4 a 24 horas. (A) BL21 (DE3) Star en caldo LB. (B) BL21 (DE3) Star en caldo TB. (C) BL21(DE3) pLysS en caldo LB. (D) BL21(DE3) pLysS en caldo TB.

3.4 Purificación de la proteína recombinante

La purificación de la proteína recombinante CYP745c2 se realizó primero por cromatografía de afinidad a níquel y posteriormente se intentó un segundo paso de purificación por cromatografía de intercambio iónico. En la purificación por afinidad a níquel la proteína CYP745c2 eluyó con a una concentración de Imidazol 500 mM en tres fracciones de 1 mL cada una. En la figura 4B se puede observar un gel de SDS-PAGE que muestra el proceso de purificación. En la imagen, se puede observar una banda alrededor de 50kDa (indicada con una flecha), correspondiente a la proteína recombinante parcialmente purificada. La concentración de proteína por mililitro determinada por el método de Bradford en esta fracción fue de aproximadamente 0.25 mg/mL. El rendimiento en la purificación por afinidad a níquel fue de 0.75mg/mL de proteína en 3mL.

En la purificación por intercambio iónico se utilizó una columna catiónica y amortiguador Tris-HCl pH 7.0. El resultado obtenido no fue el esperado, ya que se observó que la proteína CYP745c2 eluyó en las primeras 3 fracciones que corresponden al frente de lavado de la inyección, previo al inicio del gradiente de elución (Figura 4C). Este dato indica que la proteína no se unió de manera eficiente a la matriz de la columna y, por lo tanto, será necesario estandarizar las condiciones de este segundo paso de purificación. Para esto debemos considerar el amortiguador recomendado para el tipo de columna utilizada, el pH del amortiguador, la fuerza iónica inicial y el punto isoeléctrico teórico de la proteína que es 8.4.

En el caso de la columna HiTrap SP utilizada en el ensayo, debemos considerar cambiar de Tris a otro amortiguador como Hepes, MES o fosfatos, esto debido a que el rango de amortiguamiento de este último es 5.8-8.0, mientras que el amortiguador del Tris es 7.5-9.0 y por tener una carga opuesta a la carga de la resina puede participar en el proceso de intercambio iónico, es decir, que se puede unir a la resina y desplazar a la proteína de interés (Ritchie, 2012).

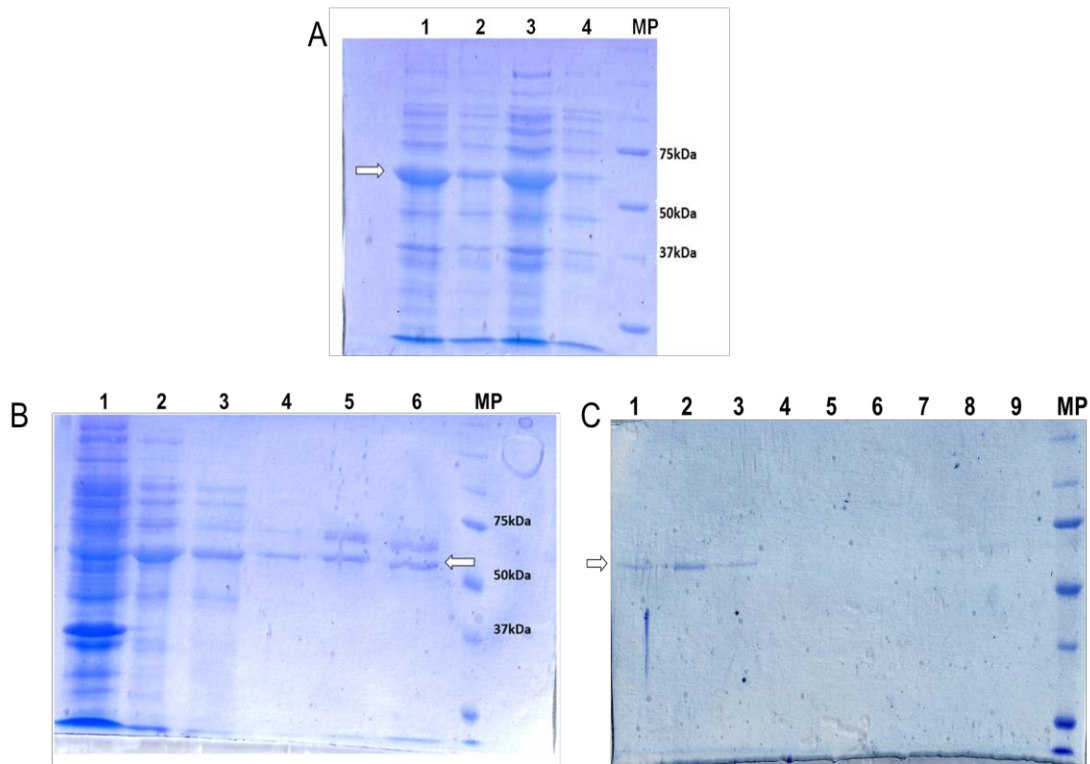


Figura 4. Expresión y purificación de la proteína CYP745c2

(A) Inducción de expresión de la proteína recombinante CYP745c2 en células de *E. coli* BL21 (DE3) Arctic. Las condiciones de expresión de la proteína CYP745c2 en medio TB suplementado con TES y kanamicina, IPTG 0.5 mM y 24 horas de incubación a 16°. Carriles 1 a 4 muestras de dos colonias independientes, de izquierda a derecha; carril 1, cepa inducida; carril 2, cepa no inducida; carril 3, cepa inducida; carril 4, no inducida; MP, marcador de peso. La proteína posee un peso aproximado de 53kDa. (B) SDS-PAGE donde de izquierda a derecha se observan las diferentes fracciones obtenidas en el proceso experimental de purificación por afinidad a níquel: carril 1, pastilla; carril 2, frente; carril 3; lavado 1; carril 4, lavado 2; carriles 5 y 6, fracciones 1 y 2 de amortiguador de elución (imidazol 500Mm); carril 7, marcador de peso molecular, en todas las fracciones se puede apreciar la banda referida como CYP745c2. (C) Fracciones de cromatografía de intercambio iónico, de izquierda a derecha se observan los carriles 1, 2 y 3 de las primeras tres fracciones correspondientes al frente de lavado, con una única banda asociada a la proteína CYP745c2 (53kDa), posterior a pasar por la columna de intercambio catiónico, y en el extremo derecho las proteínas marcadoras de peso molecular.

3.5. Caracterización espectral de Citocromo P450

La proteína parcialmente purificada por cromatografía de afinidad a níquel fue analizada mediante el ensayo de caracterización espectral para citocromos P450 reportado de Omura y Sato (1964). El principio de este ensayo es que la forma ferrosa de la hemoproteína reacciona con el monóxido de carbono (CO) para formar

un complejo que tiene un espectro de absorción máximo a 450 nm. Este ensayo es uno de las primeras pruebas que se realizan en la caracterización bioquímica de citocromos P450. En el experimento, el eluido de la cromatografía de afinidad a níquel (aproximadamente 0.252mg/mL de proteína total), fue dividido en muestra 1, sólo proteína en solución, y muestra 2, proteína en solución más monóxido de carbono y ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Cada muestra fue colocada en celdas de 1mL y la absorbancia medida a 420nm, 450nm y 500nm. Al comparar los datos de absorbancia, observamos un cambio entre las muestras evaluadas. En la muestra 2, con CO, se observó un pico de absorbancia a 450nm en comparación con la muestra sin alteración (Figura 5). Los cambios en la absorbancia se pueden comparar con resultados reportados con otras enzimas CYP450 (Gong *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2019). Esta variación en la absorbancia se atribuye al cambio de estado reducido que sufre la enzima CYP450 en presencia de ditionito de sodio, ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), lo que permite la formación de un complejo con el monóxido de carbono y un aumento en la absorbancia a 450nm. El resultado obtenido en este ensayo sugiere que la proteína recombinante CYP745c2 es capaz de interactuar con el CO y, por lo tanto, que es una proteína CYP450. Para una mejor caracterización bioquímica es necesario mejorar el rendimiento de la purificación de la proteína recombinante. Esto, además de mejorar la calidad de los ensayos bioquímicos, podrá ayudarnos a conocer la posible función biológica de la proteína en microalgas.

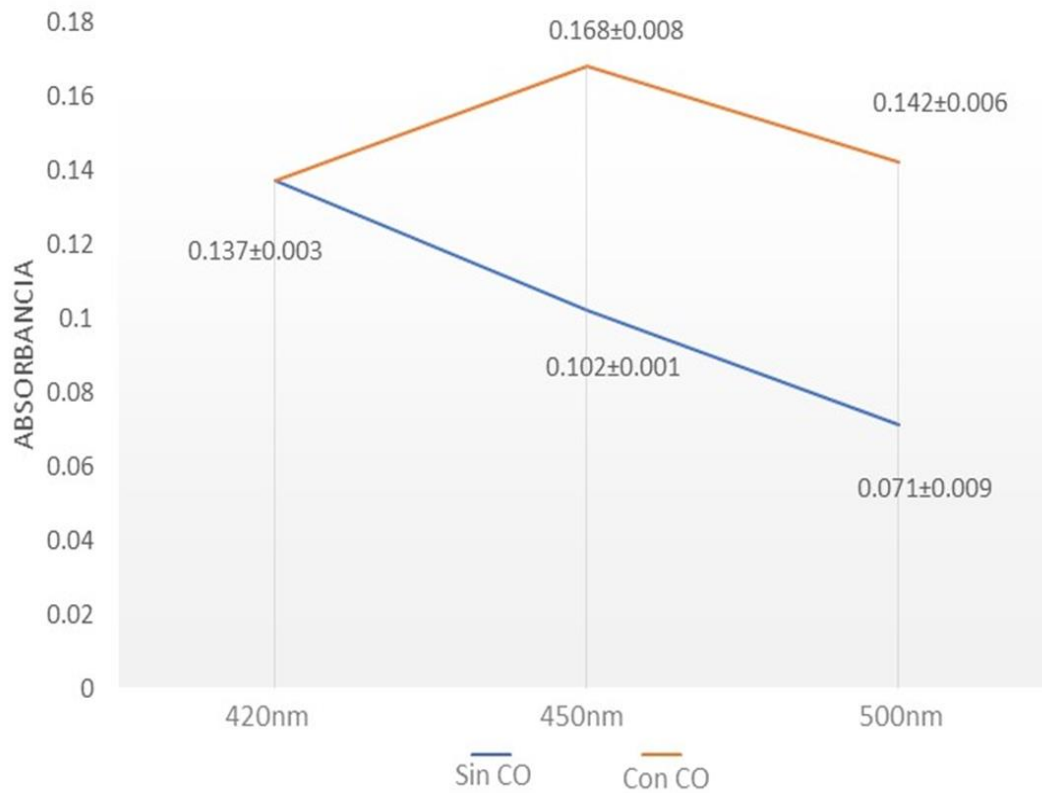


Figura 5. Ensayo de Caracterización Espectral de Citocromo P450

Gráfica que corresponde al ensayo de monóxido de carbono medido a diferentes longitudes de onda de 420nm, 450nm y 500nm, con la muestra sin modificaciones (línea azul), y la muestra dos que contiene monóxido de carbono más diotinito de sodio (línea naranja).

5. Conclusiones

El análisis *in silico* nos permitió identificar la secuencia CYP745c2 como el gen de un citocromo P450 probablemente exclusivo de microalgas. La construcción pET28pps/CYP745c2 permitió llevar a cabo los ensayos de expresión heteróloga de CYP745c2 y determinar las condiciones óptimas de inducción. Además, fue posible la purificación parcial por cromatografía de afinidad a níquel con un rendimiento de 250mg de proteína por litro de cultivo. Los datos del ensayo de caracterización espectral indican que la proteína recombinante CYP745c2 interactúa con el CO, como otros citocromos P450.

6. Referencias

- Chen, W. *et al.* (2014) 'Fungal cytochrome P450 monooxygenases: Their distribution, structure, functions, family expansion, and evolutionary origin', *Genome Biology and Evolution*, 6(7), pp. 1620–1634. doi: 10.1093/gbe/evu132.
- Cook, D. J. *et al.* (2016) *Cytochromes P450: History, Classes, Catalytic Mechanism, and Industrial Application*. 1st edn, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.apcsb.2016.07.003.
- Córdova, P. *et al.* (2017) 'Characterization of the cytochrome P450 monooxygenase genes (P450ome) from the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*', *BMC Genomics*. BMC Genomics, 18(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s12864-017-3942-9.
- Durairaj, P., Hur, J. S. y Yun, H. (2016) 'Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases', *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, 15(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s12934-016-0523-6.
- Estabrook, R. W. (2003) 'A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450)', *Drug Metabolism and Disposition*, 31(12), pp. 1461–1473. doi: 10.1124/dmd.31.12.1461.
- Fürst, M. J. L. J. *et al.* (2019) 'Exploring the Biocatalytic Potential of a Self-Sufficient Cytochrome P450 from *Thermothelomyces thermophila*', *Advanced Synthesis and Catalysis*, 361(11), pp. 2487–2496. doi: 10.1002/adsc.201900076.
- Galehdari, H. *et al.* (2013) 'Codon optimization, Cloning and expression of the human leukemia inhibitory factor (hLIF) in *E. coli*', *Iranian Journal of Biotechnology*, 11(1), pp. 47–53. doi: 10.5812/ijb.9229.
- Gamenara, D. *et al.* (2012) 'Enzymes Involved in Redox Reactions: Natural Sources and Mechanistic Overview', *Redox Biocatalysis*, pp. 1–85. doi: 10.1002/9781118409343.ch1.
- Gong, B. *et al.* (2018) 'Expression and Purification of Cytochrome P450 55B1 from *Chlamydomonas reinhardtii* and Its Application in Nitric Oxide Biosensing', *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 184(1), pp. 102–112. doi: 10.1007/s12010-017-2535-z.
- Haeyoung Jeong, H. J. K. y S. J. L. (2018) 'Complete genome sequence of *Escherichia coli* strain WG5', *Genome Announcements*, 6(2), p. 2015. doi: 10.1128/genomeA.01403-17.
- Hausjell, J., Halbwirth, H. y Spadiut, O. (2018) 'Recombinant production of eukaryotic cytochrome P450s in microbial cell factories', *Bioscience Reports*, 38(2), pp. 1–13. doi: 10.1042/BSR20171290.
- Hawkes, D. B. *et al.* (2002) 'Cytochrome P450cin (CYP176A), isolation, expression, and characterization', *Journal of Biological Chemistry*, 277(31), pp. 27725–27732. doi: 10.1074/jbc.M203382200.
- Higashivama, T. y Yamada, T. (1991) 'Electrophoretic karyotyping and chromosomal gene mapping of *Chlorella*', *Nucleic Acids Research*, 19(22), pp. 6191–6195. doi: 10.1093/nar/19.22.6191.

- Holm-Hansen, O. (1964) 'Isolation and Culture of Terrestrial and Fresh-water Algae of Antarctica', *Phycologia*, 4(1), pp. 43–51. doi: 10.2216/i0031-8884-4-1-43.1.
- Jackson, C. J. *et al.* (2002) 'A novel sterol 14 α -demethylase/ferredoxin fusion protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily', *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), pp. 46959–46965. doi: 10.1074/jbc.M203523200.
- Johnston, W. A. *et al.* (2011) 'Cytochrome P450 is present in both ferrous and ferric forms in the resting state within intact *Escherichia coli* and hepatocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 286(47), pp. 40750–40759. doi: 10.1074/jbc.M111.300871.
- Kumar, S. *et al.* (2018) 'MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms', *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), pp. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Lara, A. R. (2011) 'Recombinant protein production in *Escherichia coli*', *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, 10(2), pp. 209–223.
- Lau, I. C. K. *et al.* (2019) 'Analysis and preliminary characterisation of the cytochrome P450 monooxygenases from *Frankia* sp. Eul1c (*Frankia inefficax* sp.)', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Elsevier, 669(May), pp. 11–21. doi: 10.1016/j.abb.2019.05.007.
- Lee, S. *et al.* (2010) 'Herbivore-induced and floral homoterpene volatiles are biosynthesized by a single P450 enzyme (CYP82G1) in *Arabidopsis*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49), pp. 21205–21210. doi: 10.1073/pnas.1009975107.
- Li, S., Li, Y. y Smolke, C. D. (2018) 'Strategies for microbial synthesis of high-value phytochemicals', *Nature Chemistry*. Springer US, 10(4), pp. 395–404. doi: 10.1038/s41557-018-0013-z.
- Minerdi, D. *et al.* (2015) 'CYP116B5: A new class VII catalytically self-sufficient cytochrome P450 from *Acinetobacter radioresistens* that enables growth on alkanes', *Molecular Microbiology*, 95(3), pp. 539–554. doi: 10.1111/mmi.12883.
- Mthakathi, N. T. *et al.* (2015) 'Cytochrome P450 monooxygenase analysis in free-living and symbiotic microalgae *Coccomyxa* sp. C-169 and *Chlorella* sp. NC64A', *Algae*, 30(3), pp. 233–239. doi: 10.4490/algae.2015.30.3.233.
- Mustafa, G. *et al.* (2019) 'Influence of Transmembrane Helix Mutations on Cytochrome P450-Membrane Interactions and Function', *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 116(3), pp. 419–432. doi: 10.1016/j.bpj.2018.12.014.
- Nelson, D. R. (2009) 'The cytochrome P450 homepage', *Human Genomics*, 4(1), pp. 59–65.
- Notonier, S., Alexander, M. and Jayakody, L. N. (2016) 'An Overview of P450 Enzymes: Opportunity and Challenges in Industrial Applications', *Enzyme Engineering*, 05(03). doi: 10.4172/2329-6674.1000152.
- Omura Tsuneo and Sato, Ryo (1964) 'The Carbon of Liver', *Journal of Biological Chemistry*, 239(7).
- Palmer-Brown, W. *et al.* (2019) 'The CYPome of the model xenobiotic-biotransforming fungus *Cunninghamella elegans*', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-019-45706-x.
- Parage, C. *et al.* (2016) 'Class II cytochrome P450 reductase governs the

- biosynthesis of alkaloids', *Plant Physiology*, 172(3), pp. 1563–1577. doi: 10.1104/pp.16.00801.
- Park, H. G. *et al.* (2019) 'CYP52A23 from *Candida albicans* and its Substrate Preference for Fatty Acid Hydroxylation', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Elsevier, 671(May), pp. 27–34. doi: 10.1016/j.abb.2019.06.002.
- Roberts, G. A. *et al.* (2002) 'Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp.', *Journal of Bacteriology*, 184(14), pp. 3898–3908. doi: 10.1128/JB.184.14.3898-3908.2002.
- Sabeeha S. Merchant, Simon E. Prochnik, Olivier Vallon, Elizabeth H. Harris, Steven A. Sanderfoot, Martin H. Spalding, Vladimir V. Kapitonov, Qinghu Ren, Patrick Laurence Maréchal-Drouard, Wallace F. Marshall, Liang-Hu Qu, David R. Nelson, Anton J. Karpow, D. S. R. y A. R. G. (2007) 'The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions', *Science*, 318, pp. 245–250. doi: 10.1126/science.1143609.
- Sakai, K. *et al.* (2018) 'Biochemical Characterization of CYP505D6, a Self-Sufficient Cytochrome P450 from the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* Kiyota', *Applied and Environmental Microbiology*, 84(22), pp. 1–15.
- Sasaki, M. *et al.* (2005) 'Purification of cytochrome P450 and ferredoxin, involved in bisphenol A degradation, from *Sphingomonas* sp. strain AO1', *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), pp. 8024–8030. doi: 10.1128/AEM.71.12.8024-8030.2005.
- Schenkman, J. B. y Jansson, I. (2003) 'The many roles of cytochrome b5', *Pharmacology and Therapeutics*, 97(2), pp. 139–152. doi: 10.1016/S0163-7258(02)00327-3.
- Seth-smith, H. M. B. *et al.* (2002) 'Cloning , Sequencing , and Characterization of the Gene Cluster from *Rhodococcus rhodochrous*', *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), pp. 4764–4771. doi: 10.1128/AEM.68.10.4764.
- Sievers, F. *et al.* (2011) 'Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega', *Molecular Systems Biology*, 7(539). doi: 10.1038/msb.2011.75.
- Silaban, S. *et al.* (2019) 'Effect of IPTG Concentration on Recombinant Human Prethrombin-2 Expression in *Escherichia coli* BL21(DE3) ArcticExpress', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 217(1). doi: 10.1088/1755-1315/217/1/012039.
- Urlacher, V. B. y Girhard, M. (2012) 'Cytochrome P450 monooxygenases: An update on perspectives for synthetic application', *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 30(1), pp. 26–36. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.06.012.
- Urlacher, V. B. y Girhard, M. (2019) 'Cytochrome P450 Monooxygenases in Biotechnology and Synthetic Biology', *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 37(8), pp. 882–897. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.01.001.
- Vadassery, J. *et al.* (2008) 'The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(10), pp. 1371–1383. doi: 10.1094/MPMI-21-10-1371.
- Waskell, L. and Kim, J. J. P. (2015) 'Electron transfer partners of cytochrome P450', *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, Fourth Edition*, pp. 33–68. doi: 10.1007/978-3-319-12108-6_2.

- Wedde, S. *et al.* (2019) 'The Recent Developments of Enzymatic Oxidation', *Green Oxidation in Organic Synthesis*, pp. 439–496. doi: 10.1002/9781119304197.ch16.
- Werck-reichhart, D. and Feyereisen, R. (2000) 'Protein family review Cytochromes P450 : a success story', *Genome Biology*, 1(6), pp. 1–9.
- Yang, W. *et al.* (2010) 'Molecular characterization of a class I P450 electron transfer system from *Novosphingobium aromaticivorans* DSM12444', *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), pp. 27372–27384. doi: 10.1074/jbc.M110.118349.

