



Universidad de León

Departamento de Ecología, Genética y Microbiología



**Caracterización de la expresión de los genes
implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción
enzimática catalizada por el producto del último gen
(*penDE*) de la ruta de biosíntesis de penicilina**

**Francisco José Fernández Ferrino
León, 1997**

D. JUAN FRANCISCO MARTÍN MARTÍN
CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE LEÓN y

D. SANTIAGO GUTIÉRREZ MARTÍN
PROFESOR ASOCIADO DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA
DE LA UNIVERSIDAD DE LEÓN

CERTIFICAN:

Que el licenciado **D. Francisco José Fernández Perrino** ha realizado en el Departamento de Ecología, Genética y Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de León, bajo su dirección, el trabajo:

Caracterización de la expresión de los genes
implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción
enzimática catalizada por el producto del último gen
(*penDE*) de la ruta de biosíntesis de penicilina

Para que así conste, se extiende el presente certificado en León a cinco de noviembre de mil novecientos noventa y siete.

Dedicado a mi familia y a todos aquellos que me quieren bien

No quiero empezar el desarrollo de la Memoria sin antes agradecer su colaboración a todas aquellas personas que me han ayudado a llevar a buen puerto este trabajo. Me resulta un poco difícil redactar esta página, y muy posiblemente sea ésta la causa de que sea lo último que estoy escribiendo. ¿La razón?: creo que tengo miedo de olvidarme de alguien. Pero empezemos ...

Quiero agradecer al Prof. Juan Francisco Martín Martín, por su orientación y estímulo durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral y por haberme aceptado en su laboratorio. Al Dr. Santiago Gutiérrez Martín le debo su ayuda constante y el crear las condiciones adecuadas para que este trabajo fuera llevado a cabo. Mis compañeros de grupo también han contribuido en gran manera a este respecto y merecen un lugar destacado en esta página. Son unos cuantos, y los pongo por orden alfabético para que no haya “mal rollo”: Clara Arenós, Oscar Bañuelos (alias “chavalín”), José Luis Barredo, Sonia Campoy, Xavier Casqueiro, Nancy Castillo, Bruno Díez, Francisco Fierro, María José Hijarrubia, Katarina Kosalkova, Ana Teresa Marcos, Eduardo Montenegro, Jorge Riaño y Javier Velasco (poca cosa habría hecho sin él).

Quiero agradecer a la Universidad de León la concesión de una beca para la realización de la Tesis Doctoral.

Mi novia Margarita ha sido una de las personas que más ha influido para que acabara con lo que empecé hace ya tanto tiempo. No es lo único que le debo, también ha compartido mis penas y mis alegrías. Se va a enfadar conmigo por esto, pero creo que es justo que esté aquí.

Todos mis compañeros de Departamento son unas personas excelentes, que no han dudado en ofrecerme su ayuda cuando ha sido necesario: gracias Pili, Ana Belén, Rosma, Mila, Rosa Elena, Victor, José Ramón, Eladio,... No quiero olvidarme de los integrantes del equipo de baloncesto del Departamento (no pongo nombres, mejor ¿no?) ni de los que han aguantado conmigo las comidas del Comedor Universitario durante estos años (gracias Antoñito, Álvaro y Agustín). Tampoco de Rosa, que oye mis consejos, ni de Rafa que me dejó usar la impresora en momentos de apuro. Ni de Carol e Isa. Ni de Marite. Ni de Rosario, Maribel, Geli o María, tan buenas conmigo.

Hay tanta gente pendiente de mi Tesis que tengo que pensar en que para mí fue un acierto venir a León. Gracias a todos por ser amigos míos.

Índice	VII
Índice de figuras	XIV
Índice de tablas	XV
Abreviaturas	XVI
Abreviaturas para aminoácidos	XVII
Prefijos utilizados en los Sistemas de Unidades Internacionales	XVII
1. Introducción	1
1.1. Primeros estudios sobre la penicilina y la cefalosporina	1
1.1.1. Desarrollo histórico del concepto de antibiosis y primeras descripciones de sustancias con carácter antibiótico.....	1
1.1.2. Descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming.....	2
1.1.3. Primeras reacciones al descubrimiento de Fleming.....	3
1.1.4. El trabajo del grupo de investigación de Oxford.....	3
1.1.5. Inicios de la producción de penicilina en Estados Unidos.....	4
1.1.6. Inicios de la producción de penicilina en Europa.....	6
1.1.6.1. Inicios de la producción de penicilina en Gran Bretaña.....	6
1.1.6.2. Inicios de la producción de penicilina en Alemania.....	7
1.1.6.3. Inicios de la producción de penicilina en Holanda.....	7
1.1.7. Descubrimiento de la cefalosporina C.....	8
1.1.8. Estructura química de la penicilina y de la cefalosporina.....	9
1.1.9. Estructura general de los antibióticos β -lactámicos.....	11
1.2. Producción industrial de la penicilina	12
1.2.1. Productividad en la obtención de penicilina por fermentación.....	12
1.2.2. Mejora de cepas.....	13
1.2.2.1. Agentes mutagénicos empleados y su efecto sobre los microorganismos.....	13
1.2.2.2. Selección de los mutantes.....	15
1.3. Enzimas y genes que intervienen en la biosíntesis de antibióticos β-lactámicos	17
1.3.1. Ruta de biosíntesis de las penicilinas.....	18
1.3.2. Ruta de biosíntesis de las cefalosporinas y cefamicinas.....	18
1.3.3. Pasos implicados en la biosíntesis de las penicilinas.....	20
1.3.3.1. Biosíntesis del tripéptido δ (L- α -aminoadipil)- L-cisteinil-D-valina.....	20
1.3.3.2. Ciclación del tripéptido ACV y formación de la isopenicilina N.....	22
1.3.3.3. Conversión de la isopenicilina N en penicilina G.....	24
1.3.3.4. Aplicaciones de la isopenicilina N aciltransferasa.....	29
1.3.4. Mutantes afectados en la biosíntesis de penicilina.....	30

1.4. Evolución de los genes biosintéticos de penicilina y posible papel de la biosíntesis de antibióticos en los hongos filamentosos.....	32
1.4.1. Aspectos evolutivos relacionados con los genes de biosíntesis de penicilina.....	32
1.4.1.1. Origen del gen <i>penDE</i>	34
1.4.2. Posible papel de la biosíntesis de antibióticos en los hongos filamentosos.....	35
1.5. Regulación de la biosíntesis de antibióticos β-lactámicos.....	36
1.5.1. Regulación por la fuente de carbono.....	36
1.5.2. Regulación mediada por el pH externo.....	38
1.5.3. Regulación por la adición de líquido de maceración del maíz.....	39
1.5.4. Regulación por la fuente de nitrógeno.....	39
1.5.5. Regulación por la lisina.....	39
1.5.6. Regulación mediada por la fuente de fósforo del medio.....	40
1.6. Incidencia de la Ingeniería Genética en la producción de antibióticos β-lactámicos.....	40
1.6.1 Aumento del número de copias de los genes de producción de antibióticos β -lactámicos.....	41
1.6.2 Análisis de la cepas industriales.....	42
1.6.3. Posibilidades de aplicación de la técnicas de Ingeniería Genética a la mejora en la biosíntesis de penicilina.....	43
1.6.3.1. Expresión heteróloga de genes en hongos filamentosos.....	43
1.6.3.2. Expresión heteróloga de genes fúngicos en <i>E. coli</i>	44
1.6.3.3. Mutagénesis dirigida.....	46
1.6.3.4. Modificación de la regulación.....	46
1.6.3.5. Utilización de vectores con capacidad de replicarse de modo independiente a los cromosomas fúngicos.....	46
1.6.3.6. Bioseguridad de los microorganismos modificados genéticamente.....	48
1.7. Entorno histórico y objetivos del presente trabajo.....	48
2. Materiales y Métodos.....	51
2.1. Microorganismos utilizados.....	51
2.1.1. Cepas bacterianas.....	51
2.1.2. Cepas fúngicas.....	52
2.2. Vectores.....	53
2.2.1. Vectores fágicos.....	53

2.2.2. Vectores plasmídicos.....	55
2.3. Productos y reactivos.....	61
2.3.1. Proveedores.....	61
2.3.2. Reactivos específicos para biología molecular.....	61
2.3.2.1. Ácidos nucleicos.....	61
2.3.2.2. Antibióticos.....	61
2.3.2.3. Enzimas.....	62
2.3.2.4. Isótopos radiactivos.....	62
2.3.2.5. Otros sistemas para manipulación de ADN y proteínas.....	62
2.3.2.6. Marcadores de tamaño para electroforesis de proteínas.....	62
2.3.3. Instrumental.....	63
2.4. Medios de cultivo.....	64
2.4.1. Medios de cultivo para bacterias y bacteriófagos.....	64
2.4.2. Medios de cultivo para hongos.....	65
2.4.2.1. <i>Penicillium chrysogenum</i>	65
2.4.2.2. <i>Aspergillus nidulans</i>	66
2.5. Crecimiento de los microorganismos.....	67
2.5.1. Crecimiento de las cepas bacterianas.....	67
2.5.2. Crecimiento de las cepas fúngicas.....	67
2.5.2.1. Condiciones para la esporulación.....	67
2.5.2.2. Condiciones para la producción de antibióticos.....	67
2.5.2.3. Determinación del crecimiento de los microorganismo utilizados.....	68
2.6. Mantenimiento de los microorganismos.....	68
2.7. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>.....	69
2.7.1. Lisis alcalina.....	69
2.7.2. Minipreparaciones.....	70
2.7.3. Midipreparaciones.....	70
2.7.4. Megapreparaciones.....	70
2.7.5. Ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio.....	71
2.8. Obtención de ADN del bacteriófago λ y sus derivados.....	72
2.8.1. Infección de células de <i>E. coli</i> con el bacteriófago lambda y sus derivados.....	72
2.8.2. Amplificación del bacteriófago en medio sólido.....	72
2.8.3. Amplificación del bacteriófago M13K07.....	73
2.8.4. Amplificación del bacteriófago en medio líquido y obtención de ADN de bacteriófagos.....	74
2.8.5. Obtención de ADN del bacteriófago λ -GEM-12.....	74
2.9. Obtención de ADN total de <i>Aspergillus nidulans</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i>.....	75
2.9.1. Obtención de ADN total a gran escala.....	75

2.9.2. Obtención de ADN total a pequeña escala.....	76
2.10. Manipulación del ADN.....	77
2.10.1. Eliminación del ARN y desproteización del ADN.....	77
2.10.2. Reacción en cadena de la ADN polimerasa.....	77
2.10.2.1. Desnaturalización.....	77
2.10.2.2. Hibridación de los cebadores.....	77
2.10.2.3. Elongación a partir de los cebadores.....	78
2.10.2.4. Procedimiento experimental.....	79
2.10.3. Digestión y modificación del ADN.....	79
2.10.3.1. Esquema general de la digestión de ADN con una endonucleasa de restricción.....	79
2.10.3.2. Esquema general de reacción de las enzimas de modificación de ADN más usadas.....	80
2.11. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	81
2.12. Extracción de ADN a partir de geles de agarosa.....	82
2.12.1. Extracción por congelación y centrifugación a través de lana de vidrio.....	82
2.12.2. Extracción mediante el uso de Quiaex.....	82
2.13. Fraccionamiento del ADN en gradientes de sacarosa.....	83
2.14. Encapsidación “in vitro” de ADN del fago lambda y sus derivados.....	85
2.14.1. Ventajas de la encapsidación.....	85
2.14.2. Requisitos de la encapsidación.....	85
2.14.3. Procedimiento de encapsidación.....	85
2.15. Obtención de ARN total de <i>Penicillium chrysogenum</i>.....	86
2.15.1. Obtención de ARN total a gran escala.....	87
2.15.2. Obtención de ARN total a pequeña escala.....	88
2.16. Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes (agarosa-formaldehído).....	88
2.17. Purificación de ARNm de <i>Penicillium chrysogenum</i>.....	89
2.18. Construcción de bibliotecas de ADN complementario.....	90
2.18.1. Síntesis de la primera cadena de ADNc.....	90
2.18.2. Síntesis de la segunda cadena de ADN.....	91
2.18.3. Rellenado de los extremos del ADNc bicatenario sintetizado.....	92
2.18.4. Ensamblaje del ADNc a los adaptadores <i>EcoRI</i>	92
2.18.5. Fosforilación de los extremos del ADNc.....	93
2.18.6. Digestión con la endonucleasa de restricción <i>XhoI</i>	93
2.18.7. Selección del tamaño del ADNc por cromatografía a través de una columna de Sephacryl S-400.....	93
2.18.7.1. Preparación de la columna.....	93
2.18.7.2. Fraccionamiento.....	93
2.18.8. Ensamblaje del ADNc al vector.....	94
2.19. Escisión “in vivo” del plásmido pBluescript® SK- y sus insertos a partir de bacteriófagos derivados del vector λ ZAP II.....	94

2.20. Transferencia, marcaje de sondas específicas e hibridación de ácidos nucleicos	96
2.20.1. Transferencia de Southern y de Northern.....	96
2.20.1.1. Transferencia de Southern.....	96
2.20.1.2. Transferencia de Northern.....	97
2.20.2. Transferencia de ADN de bacteriófagos a un soporte sólido.....	97
2.20.3. Marcaje de las sondas.....	98
2.20.4. Hibridación y autorradiografía.....	99
2.20.4.1. Prehibridación.....	99
2.20.4.2. Hibridación.....	99
2.20.4.3. Lavados y autorradiografía.....	100
2.20.5. Reutilización de los filtros.....	100
2.21. Generación de deleciones unidireccionales	100
2.22. Análisis de la secuencia de nucleótidos del ADN	103
2.22.1. Preparación de ADN plasmídico monocatenario.....	103
2.22.2. Realización de las reacciones para el análisis de la secuencia de nucleótidos de ADN.....	104
2.22.2.1. Hibridación.....	105
2.22.2.2. Marcaje.....	105
2.22.2.3. Terminación.....	105
2.22.2.4. Parada de la reacción.....	105
2.22.3. Electroforesis de las reacciones de secuencia.....	105
2.22.4. Análisis de las secuencias obtenidas.....	106
2.23. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	106
2.23.1. Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> por el método del TSS.....	106
2.23.2. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> por el método del cloruro de rubidio.....	107
2.23.3. Procedimiento de transformación.....	108
2.24. Transformación de hongos	108
2.24.1. Transformación de <i>Penicillium chrysogenum</i>	109
2.24.1.1. Crecimiento del micelio.....	109
2.24.1.2. Obtención de los protoplastos.....	109
2.24.1.3. Transformación.....	110
2.24.1.4. Extensión en placa.....	110
2.24.2. Transformación de <i>Aspergillus nidulans</i>	111
2.24.1.1. Crecimiento del micelio.....	111
2.24.1.2. Obtención de los protoplastos.....	111
2.24.1.3. Transformación.....	111
2.24.1.4. Extensión en placa.....	111
2.25. Ensayo de las actividades enzimáticas	112
2.25.1. Obtención de extractos acelulares a partir del micelio.....	112

2.25.2. Eliminación de las moléculas de pequeño tamaño del medio mediante cromatografía de filtración en gel.....	112
2.25.3. Ensayo de la actividad enzimática de la IPN aciltransferasa.....	113
2.25.4. Ensayo de la actividad enzimática de la β -galactosidasa.....	113
2.25.5. Cuantificación de las proteínas totales en la muestra.....	114
2.25.6. Unidades enzimáticas.....	115
2.26. Determinación del tamaño molecular por cromatografía de filtración en gel.....	115
2.27. Expresión de los genes fúngicos en <i>Escherichia coli</i>.....	117
2.27.1. Expresión de los genes en <i>E. coli</i>	117
2.27.2. Marcaje radiactivo de proteínas por pulsos.....	117
2.27.3. Análisis de la expresión heteróloga.....	118
2.27.4. Preparación de extractos acelulares de <i>E. coli</i> y purificación de cuerpos de inclusión.....	118
2.27.5. Renaturalización de proteínas presentes en cuerpos de inclusión.....	118
2.28. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	119
2.29. Ensayos de inmunodetección de la IPN aciltransferasa.....	120
3. Resultados y Discusión.....	123
3.1. Caracterización de mutantes no productores de penicilina G afectados en el último paso de la ruta de biosíntesis del antibiótico.....	123
3.1.1. Análisis de los transcritos de los genes biosintéticos de penicilina en los mutantes <i>npe6</i> , <i>npe7</i> y <i>npe8</i>	124
3.1.2. Existencia de proteína IPN aciltransferasa en los mutantes <i>npe6</i> , <i>npe7</i> y <i>npe8</i>	125
3.1.3. Construcción de bibliotecas génicas de los mutantes <i>npe6</i> , <i>npe7</i> y <i>npe8</i> en el vector de reemplazamiento λ -GEM-12.....	126
3.1.4. Clonaje y secuenciación de fragmentos de ADN que contienen los genes <i>penDE</i> de los mutantes <i>npe6</i> , <i>npe7</i> y <i>npe8</i>	129
3.1.5. Caracterización de las mutaciones.....	130
3.1.6. Complementación de las mutaciones.....	136
3.1.7. Discusión.....	138
3.2. Expresión heteróloga del gen <i>penDE</i> de <i>P. chrysogenum</i> y <i>A. nidulans</i>: distinta capacidad de procesamiento en las proteínas codificadas por ellos.....	140
3.2.1. Estimación del tamaño molecular de las proteínas IPN aciltransferasa de <i>P. chrysogenum</i> y <i>A. nidulans</i>	140
3.2.2. Expresión heteróloga de los genes <i>penDE</i> de <i>P. chrysogenum</i> y <i>A. nidulans</i> en otros hongos filamentosos.....	141
3.2.3. Expresión heteróloga de los genes <i>penDE</i> de	

<i>P. chrysogenum</i> y <i>A. nidulans</i> en <i>Escherichia coli</i>	144
3.2.3.1 Clonaje del ADN complementario correspondiente al gen <i>penDE</i> de <i>P. chrysogenum</i> y construcción de los vectores necesarios para la expresión en <i>E. coli</i>	144
3.2.3.2. Sobreexpresión de los genes <i>penDE</i> de <i>P. chrysogenum</i> y <i>A. nidulans</i> en <i>Escherichia coli</i>	148
3.2.3.3. Ensayo de autoprosamiento de la IPN aciltransferasa de <i>A. nidulans</i>	151
3.2.4. Discusión.....	151
3.3. Localización subcelular de las IAT aciltransferasas de <i>P. chrysogenum</i> y <i>A. nidulans</i>	153
3.3.1. Modificación del extremo carboxilo terminal de la IPN aciltransferasa de <i>A. nidulans</i>	154
3.3.2. Transformación de los plásmidos pULJL43EM y pULJL43PP en <i>P. chrysogenum npe6</i> y en <i>A. nidulans</i> ATCC 28901 y GH79.....	156
3.3.3. Análisis de la producción de penicilina de los transformantes.....	158
3.3.4. Discusión.....	159
3.4. Sustitución del promotor del gen <i>penDE</i> de <i>P. chrysogenum</i> por el promotor de un gen del metabolismo primario	162
3.4.1. Sustitución del promotor del gen <i>penDE</i> de <i>P. chrysogenum</i> por el promotor del gen <i>gpdA</i> de <i>A. nidulans</i>	162
3.4.2. Transformación de los plásmidos pULPP510, pULPP510.N, pULPP510A y pULPP510.NA en <i>P. chrysogenum</i>	164
3.4.3. Discusión.....	168
3.5. Influencia de las regiones de ADN físicamente próximas sobre la expresión del gen <i>penDE</i> de <i>P. chrysogenum</i>	170
3.5.1. Construcción del plásmido pSB*G*DE y obtención de transformantes con una única copia del mismo integrada en el locus <i>pyrG</i>	170
3.5.2. Construcción de los plásmidos pCT1 y pCT2 e integración en el locus <i>pyrG</i> de <i>P. chrysogenum npe10 pyrG</i>	173
3.5.3. Construcción del plásmido pCT2N e integración en el locus <i>pyrG</i> de <i>P. chrysogenum npe10 pyrG</i>	178

3.5.4. Discusión.....	181
4. Conclusiones.....	183
5. Bibliografía.....	185

Índice de Figuras

Figura 1.1.....	pág 10	Figura 3.13.....	pág 133
Figura 1.2.....	pág 19	Figura 3.14.....	pág 133
Figura 1.3.....	pág 22	Figura 3.15.....	pág 135
Figura 1.4.....	pág 23	Figura 3.16.....	pág 139
Figura 1.5.....	pág 28	Figura 3.17.....	pág 140
Figura 1.6.....	pág 31	Figura 3.18.....	pág 141
		Figura 3.19.....	pág 142
		Figura 3.20.....	pág 143
Figura 2.1.....	pág 53	Figura 3.21.....	pág 144
Figura 2.2.....	pág 54	<u>Figura 3.22.....</u>	<u>pág 145</u>
Figura 2.3.....	pág 54	Figura 3.23.....	pág 146
Figura 2.4.....	pág 55	Figura 3.24.....	pág 147
Figura 2.5.....	pág 56	Figura 3.25.....	pág 147
Figura 2.6.....	pág 56	Figura 3.26.....	pág 148
Figura 2.7.....	pág 56	Figura 3.27.....	pág 148
Figura 2.8.....	pág 57	Figura 3.28.....	pág 151
Figura 2.9.....	pág 57	Figura 3.29.....	pág 152
Figura 2.10.....	pág 58	Figura 3.30.....	pág 152
Figura 2.11.....	pág 58	Figura 3.31.....	pág 153
Figura 2.12.....	pág 59	Figura 3.32.....	pág 154
Figura 2.13.....	pág 59	Figura 3.33.....	pág 155
Figura 2.14.....	pág 60	Figura 3.34.....	pág 155
Figura 2.15.....	pág 60	Figura 3.35.....	pág 156
Figura 2.16.....	pág 77	Figura 3.36.....	pág 161
Figura 2.17.....	pág 81	Figura 3.37.....	pág 162
Figura 2.18.....	pág 90	Figura 3.38A.....	pág 162
Figura 2.19.....	pág 100	Figura 3.38B.....	pág 163
Figura 2.20.....	pág 115	Figura 3.39.....	pág 166
Figura 3.1.....	pág 122	Figura 3.40.....	pág 169
Figura 3.2.....	pág 123	Figura 3.41.....	pág 170
Figura 3.3.....	pág 124	Figura 3.42.....	pág 171
Figura 3.4.....	pág 125	Figura 3.43.....	pág 172
Figura 3.5.....	pág 125	Figura 3.44.....	pág 173
Figura 3.6.....	pág 126	Figura 3.45.....	pág 174
Figura 3.7.....	pág 127	Figura 3.46.....	pág 175
Figura 3.8.....	pág 128	Figura 3.47.....	pág 176
Figura 3.9.....	pág 129	Figura 3.48.....	pág 177
Figura 3.10.....	pág 130	Figura 3.49.....	pág 178
Figura 3.11.....	pág 131		
Figura 3.12.....	pág 132		

Ilustración de la portada: Detalle de un mural de Diego Rivera acerca de la historia de la medicina (Hospital de la Raza, México D.F.). Una persona raspa los hongos que crecen sobre el pan (en la izquierda de la imagen). Con ellos se elaborarán preparados con propiedades curativas.

Índice de Tablas

Tabla 1.I.....pág 11	—————	Tabla 3.I.....pág 135
Tabla 2.I.....pág 80		Tabla 3.II.....pág 155
Tabla 2.II.....pág 84		Tabla 3.III.....pág 156
Tabla 2.III.....pág 101		Tabla 3.IV.....pág 157
Tabla 2.IV.....pág 118		Tabla 3.V.....pág 157
		Tabla 3.VI.....pág 165
		Tabla 3.VII.....pág 170
		Tabla 3.VIII.....pág 175
		Tabla 3.IX.....pág 178

ABREVIATURAS

°C: grado centígrado

6-APA: ácido 6-aminopenicilánico

7-ACA: ácido 7-aminocefalosporánico

7-ADCA: ácido 7-amino-desacetoxicefalosporánico

8-MOP: 8 metoxipsoraleno

A: adenosina

AAT: actividad acil-CoA:6-APA aciltransferásica

ACV: δ-(L-α-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina

ACVS: ACV sintetasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNasa: desoxirribonucleasa

ADNc: ADN complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNasa: ribonucleasa

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN de transferencia

ARNr: ARN ribosómico

ARS: secuencia de replicación autónoma

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: adenosina 5' trifosfato

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

Bq: Becquerelio

BrET: bromuro de etidio

C: citidina

Ci: curio

CIA: cloroformo-alcohol isoamílico

CIAP: fosfatasa alcalina de intestino de ternera

CoA: coenzima A

col.: colaboradores

CRE: "carbon regulatory element"

CSL: "corn step liquor", líquido de maceración del maíz

Da: Dalton

DAC: desacetilcefalosporina C

DAOC: desacetoxicefalosporina C

dATP: desoxiadenosina 5' trifosfato

dCTP: desoxicitidina 5' trifosfato

ddATP: didesoxiadenosina 5' trifosfato

ddCTP: didesoxicitidina 5' trifosfato

ddGTP: didesoxiguanosina 5' trifosfato

ddTTP: didesoxitimidina 5' trifosfato

DEPC: dietilpirocarbonato

DMSO: dimetilsulfóxido

D.O.: densidad óptica

dTTP: desoxitimidina 5' trifosfato

DTT: ditioneitol

ed.: editor

eds.: editores

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EMS: etil metanosulfonato

E.U.A.: Estados Unidos de América

ExoIII: exonucleasa III

fig.: figura

g: gramo

G: guanosina

H₂O_d: agua destilada

IAT: isopenicilina N aciltransferasa

IPN: isopenicilina N

IPNS: isopenicilina N sintasa

IPTG: isopropil β-D-galactopiranosido

K_{AV}: Constante de proporcionalidad de filtración en gel

kat: katal

L: litro

L-α-AA: ácido L-α-aminoadípico

ln: logaritmo neperiano

m: metro

M: molar

MOPS: ácido morfolinopropanosulfónico

NBT: Azul de nitrotetrazolio

NRRL: Northern Regional Research Laboratory

NTG: N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

OCDAC: O-carbamoil-DAC

ONPG: orto-nitrofenil β-D-galactopiranosido

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

pb: pares de bases

PCR: "polymerase chain reaction", reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonato

p/v: relación peso/volumen

pp.: páginas

rATP: riboATP

rbs: secuencia de unión al ribosoma
rpm: revoluciones por minuto
SAB: Seroalbúmina bovina
SDS: laurilsulfato sódico
T: Timidina
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tris: tris(hidroximetil)aminometano
U: unidades

V: voltio
W: vatio
v/v: relación volumen/volumen
X-gal: 5-bromo 4-cloro 3-indol-β-D-galactopiranosido

Abreviaturas para aminoácidos

Ala	Alanina	A
Arg	Arginina	R
Asn	Asparagina	N
Asp	Ácido aspártico	D
Cys	Cisteína	C
Gln	Glutamina	Q
Glu	Ácido glutámico	E
Gly	Glicina	G
His	Histidina	H
Ile	Isoleucina	I
Leu	Leucina	L
Lys	Lisina	K
Met	Metionina	M
Phe	Fenilalanina	F
Pro	Prolina	P
Ser	Serina	S
Thr	Treonina	T
Trp	Triptófano	W
Tyr	Tirosina	Y
Val	Valina	V

Prefijos utilizados en los Sistemas de Unidades Internacionales

Abreviatura	Prefijo	Múltiplo
T	tera	10 ¹²
G	giga	10 ⁹
M	mega	10 ⁶
k	kilo	10 ³
d	deci	10 ⁻¹
c	centi	10 ⁻²
m	mili	10 ⁻³
μ	micro	10 ⁻⁶
n	nano	10 ⁻⁹
p	pico	10 ⁻¹²
f	femto	10 ⁻¹⁵
a	atto	10 ⁻¹⁸

u.f.p.: unidades formadoras de placas
UV: ultravioleta

Índice	VII
Índice de figuras	XIV
Índice de tablas	XV
Abreviaturas	XVI
Abreviaturas para aminoácidos	XVII
Prefijos utilizados en los Sistemas de Unidades Internacionales	XVII
Introducción	1
1.1. Primeros estudios sobre la penicilina y la cefalosporina	1
1.2. Producción industrial de la penicilina	12
1.3. Enzimas y genes que intervienen en la biosíntesis de antibióticos β-lactámicos	17
1.4. Evolución de los genes biosintéticos de penicilina y posible papel de la biosíntesis de antibióticos en los hongos filamentosos	32
1.5. Regulación de la biosíntesis de antibióticos β-lactámicos	36
1.6. Incidencia de la Ingeniería Genética en la producción de antibióticos β-lactámicos	40
1.7. Entorno histórico y objetivos del presente trabajo	48
2. Materiales y Métodos	51
3. Resultados y Discusión	123

3.1. Caracterización de mutantes no productores de penicilina G afectados en el último paso de la ruta de biosíntesis del antibiótico	123
3.2. Expresión heteróloga del gen <i>penDE</i> de <i>P. chrysogenum</i> y <i>A. nidulans</i>: distinta capacidad de procesamiento en las proteínas codificadas por ellos	140
3.3. Localización subcelular de las IAT aciltransferasas de <i>P. chrysogenum</i> y <i>A. nidulans</i>	153
3.4. Sustitución del promotor del gen <i>penDE</i> de <i>P. chrysogenum</i> por el promotor de un gen del metabolismo primario	162
3.5. Influencia de las regiones de ADN físicamente próximas sobre la expresión del gen <i>penDE</i> de <i>P. chrysogenum</i>	170
4. Conclusiones	183
5. Bibliografía	185

Los genes estructurales de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos se encuentran asociados en el genoma de los microorganismos productores de dichos antibióticos formando conjuntos o agrupaciones. En *P. chrysogenum* AS-P-78 y P2, cepas de alto nivel de producción, los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE* se encuentran localizados dentro de un fragmento de 106'5 kpb amplificado mediante repeticiones en tandem.

El gen *penDE* codifica para la enzima IPN aciltransferasa, que cataliza la sustitución de la cadena de α -aminoadipilo de la isopenicilina N por una de fenilacetilo, originándose penicilina G. El gen *penDE* consta de aproximadamente 1300 nucleótidos y contiene tres intrones, localizados en la mitad más próxima al extremo 5' del gen. Se transcribe en un ARNm de 1'15 kpb que es traducido en una proteína de 347 aminoácidos. El gen *penDE* de *A. nidulans* tiene un tamaño similar y presenta tres intrones en la misma disposición que el gen de *P. chrysogenum*. La similitud entre las secuencias de nucleótidos de los dos genes es del 75'7 % y la similitud entre las IPN aciltransferasas de las dos fuentes es del 81 %.

La IPN aciltransferasa de *P. chrysogenum* se sintetiza como una pre-proteína inactiva de 40 kDa, que es procesada de forma autocatalítica originándose dos subunidades: una de ellas tiene un tamaño de 11 kDa e incluye la región amino terminal de la pre-proteína y la otra tiene un tamaño de 29 kDa e incluye el extremo carboxilo terminal de la proteína precursora. El procesamiento se produce entre una Gly y una Cys localizadas en las posiciones 102 y 103

de la pre-proteína, encontrándose conservados en las IPN aciltransferasas de *P. chrysogenum* y *A. nidulans* tanto el sitio de corte como su entorno más inmediato.

Müller y col., han descrito en 1991 la presencia de la IPN aciltransferasa activa en orgánulos subcelulares rodeados de membrana sencilla y denominados microcuerpos. En el extremo carboxilo terminal de la proteína de *P. chrysogenum* se ha encontrado una secuencia ARL (Ala-Arg-Leu) similar a la definida como consenso por Gould y col. (1989) para la localización de proteínas en peroxisomas y orgánulos similares. La secuencia ANI (Ala-Asn-Ile) que aparece en el extremo carboxilo terminal de la proteína de *A. nidulans* no se ajusta a dicha secuencia consenso.

En nuestro laboratorio se han obtenido mutantes de *P. chrysogenum* que presentan alterada su capacidad de biosíntesis de penicilina. Los mutantes *npe2* y *npe3* presentan disminuidos sus niveles de producción de penicilina, así como las tres actividades enzimáticas implicadas en la biosíntesis de dicho antibiótico. Ello ha llevado a pensar en una posible alteración en estos mutantes de un mecanismo regulador común para la biosíntesis de penicilina.

Los mutantes *npe1*, 4, 6, 7 y 8 carecen de actividad IPN aciltransferásica y no producen penicilina. Tampoco la produce el mutante *npe5*, que carece de la actividad ACV

sintetásica. El mutante *npe10*, por último, presenta una delección de un fragmento de ADN de 57'9 kpb que incluye los tres genes de la ruta de biosíntesis de penicilina.

En la presente Tesis Doctoral se pretendía la determinación a nivel molecular de características esenciales para la actividad isopenicilina N aciltransferásica, responsable del último paso de la ruta de biosíntesis de penicilina. Para ello se realizó el abordaje de cinco objetivos básicos:

1. El conocimiento de aminoácidos esenciales para la actividad IPN aciltransferásica.
2. El estudio de la capacidad de procesamiento de la proteína IPN aciltransferasa en *P. chrysogenum* y *A. nidulans*.
3. El análisis de secuencias importantes para la localización subcelular correcta de esta proteína.
4. La sustitución de la región promotora del gen *penDE* de *P. chrysogenum* por el promotor de un gen del metabolismo primario.
5. El estudio de la regulación ejercida por regiones de ADN físicamente próximas sobre la expresión del gen *penDE* de *P. chrysogenum*.

Como resultado del desarrollo de estos objetivos se ha determinado la importancia de los aminoácidos situados en las posiciones Gly¹⁵⁰ y Glu²⁵⁸ de la IPN aciltransferasa de *P. chrysogenum*. La sustitución de la Gly¹⁵⁰ por una Val en la IPN aciltransferasa del mutante

npe6 o del Glu²⁵⁸ por una Lys en la IPN aciltransferasa de los mutantes *npe7* y 8 es la responsable de la pérdida de la actividad enzimática y la rehabilitación del aminoácido original conduce a la recuperación de dicha actividad.

En segundo lugar se ha observado la existencia de un distinto procesamiento entre las IPN aciltransferasas de *P. chrysogenum* y *A. nidulans*, diferencia que puede ser interesante a la hora de comprender la menor producción de antibiótico por parte de este último microorganismo.

Se ha observado, asimismo, un comportamiento similar de la secuencia Ala-Asn-Ile del extremo C-terminal de la proteína de *A. nidulans*, en cuanto a la producción de penicilina, si se compara con la secuencia Ala-Arg-Leu característica del extremo C-terminal de la proteína de *P. chrysogenum*. También se ha comprobado la ausencia de incrementos en la producción de penicilina al amplificarse en cepas de *P. chrysogenum* con alta producción de antibiótico el gen *penDE* de dicho microorganismos bajo el control de un promotor más eficiente del metabolismo primario.

Por último, se ha detectado la necesidad de la presencia de regiones de ADN físicamente próximas en el genoma para la expresión del gen *penDE* de *P. chrysogenum*.

In this PhD Thesis we are looking for determination at molecular level of several essentials characteristics for the isopenicillin N aciltransferase (IPN) activity, responsible of the last step in penicillin biosynthetic pathway. For that we planed five basic objectives:

1. Knowledge of essentials amino acids for IPN aciltransferase activity.
2. Study of processing capacity for IPN aciltransferase from *P. chrysogenum* y *A. nidulans*.
3. Analysis of important sequences for correct subcellular location of this protein.
4. Replacement of the *penDE* gene promoter region from *P. chrysogenum* by a gene promoter from primary metabolism.
5. Study of regulation made from DNA regions close to penicillin biosynthetic cluster over expression of *penDE* gene from *P. chrysogenum*.

As a results of this work, we determined that the amino acids placed in positions Gly¹⁵⁰ and Glu²⁵⁸ of IPN aciltransferase from *P. chrysogenum* are essential to maintain enzyme activity.

It was found that *P. chrysogenum* and *A. nidulans* displayed different IPN acyltransferases processing.

On the other hand, the C-terminal IPN acyltransferase sequence Ala-Asn-Ile from *A. nidulans* showed the same function as the consensus sequence Ala-Arg-Leu existing in the IPN acyltransferase terminus of *P. chrysogenum*.

When *penDE* gene from *P. chrysogenum* was put under the control of a more efficient promoter (from primary metabolism), and amplified in a high-producing strain of the same micro-organism, no significant production increase was observed.

Finally, it was determined that there is a need for the presence of some DNA regions, physically located close to *penDE* gene from *P. chrysogenum*, for the expression of this gene.

1. Introducción

1.1. Primeros estudios sobre la penicilina y la cefalosporina.

1.1.1. Desarrollo histórico del concepto de antibiosis y primeras descripciones de sustancias con carácter antibiótico.

Comúnmente se admite que el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming se debió a un hecho fortuito ocurrido en el mes de septiembre de 1928. Sin embargo, ya a finales del siglo XIX existen estudios que sugieren la posibilidad de aprovechamiento de las interferencias producidas por el desarrollo de determinados microorganismos sobre el crecimiento de otros (y aquí se está definiendo ya el concepto de antibiosis) y que empiezan a demostrar las propiedades antibacterianas de determinadas especies del género *Penicillium*. Así, John Burdon Sanderson (un bacteriólogo) y William Roberts (un profesor de medicina) observaron de forma independiente en 1871 y 1874, respectivamente, que la presencia de alguna especie de este género fúngico en un medio de cultivo suprimía el crecimiento bacteriano. En 1876 John Tyndall hizo una observación similar, pero su conclusión fue que los hongos consumían el oxígeno requerido por las bacterias para su crecimiento.

Los primeros en asociar estos estudios acerca del antagonismo microbiano producido por el hongo

Penicillium con su uso terapéutico fueron Joseph Lister y Ernst Duchesne. El primero de ellos describía en una carta dirigida a su hermano su esfuerzo en la búsqueda de un antibiótico no tóxico, efectivo contra las bacterias pero no lesivo para el cuerpo humano. En 1872 observó que el hongo *Penicillium glaucum* era capaz de inhibir el crecimiento de bacterias en la orina humana. Parece ser que en 1884 Lister utilizó un extracto de este microorganismo para aplicarlo localmente sobre una herida infectada de una enfermera del Kings College londinense. De ser así, y aunque no ha quedado constancia del procedimiento empleado ni del éxito o fracaso del tratamiento, la hermana Ellen Jones fue el primer paciente tratado con penicilina (más concretamente, con un extracto que contenía dicha sustancia).

Por su parte, Duchesne (que era médico militar) estudió el efecto antibiótico del hongo *Penicillium* sobre bacterias en organismos íntegros (no solamente en líquidos corporales). En un experimento utilizó conejillos de Indias para infectarlos con suspensiones bacterianas de *Escherichia coli* o de *Bacterium typhosus* y con las mismas suspensiones bacterianas mezcladas con un cultivo de *Penicillium glaucum*. Los animales inoculados con la mezcla de bacterias y hongos fueron los únicos supervivientes, mientras que los que habían recibido solamente la suspensión bacteriana murieron en un periodo máximo de 24 horas. El experimento de Duchesne (recogido en su Tesis Doctoral “Contribution à l'Etude de la Concurrence

vitale chez les Microorganismes”, presentada en Lyon en 1897) permanecería en el olvido hasta casi 40 años después. Alexander Fleming no conocía estos estudios en el momento en que se considera “oficialmente descubierta” la penicilina.

Pero no cabe restringirse en este tipo de estudios al género *Penicillium*. En la segunda mitad del siglo XIX la posibilidad de que un microorganismo interfiriera con el crecimiento de otro fue un tema de activa investigación: así, en 1877 Pasteur y Joubert mencionan también las posibilidades terapéuticas de este tipo de fenómeno. Cornil y Babes realizan en 1885 experimentos sobre antagonismo microbiano “in vitro”, sugiriendo que una sustancia química producida por uno de los microorganismos actuaba como inhibidor del crecimiento del otro. Garre, en 1887, demuestra que una sustancia de *Bacillus fluorescens* inhibe el crecimiento de *Staphylococcus pyrogenes*. En 1889 Vuillemin le asigna a este fenómeno el nombre de **antibiosis**: vida contra vida.

A finales del siglo XIX el concepto de antibiosis se encontraba, pues, perfectamente definido: el antagonismo microbiano podía estar causado por una sustancia específica liberada por uno de los microorganismos presentes. La idea adquirió una forma mucho más nítida cuando en 1896 Gosio consiguió cristalizar una sustancia (posteriormente denominada ácido micofenólico) con una poderosa acción antiséptica frente a *Bacillus anthracis*, a partir de caldos de cultivo de *Penicillium*.

1.1.2. Descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming.

En los tiempos previos al “descubrimiento” de la penicilina, Alexander Fleming se encontraba investigando sobre el crecimiento y las propiedades de los estafilococos en el hospital Saint Mary de Londres. Para ello cultivaba *Staphylococcus aureus* sobre agar en placas de Petri y frecuentemente dejaba las placas descubiertas para permitir que los posibles contaminantes del aire crecieran sobre el

agar. En septiembre de 1928 Fleming descubrió que una de las placas se había contaminado con una espora fúngica y que en las proximidades del micelio del hongo habían desaparecido prácticamente todos los estafilococos. Fleming fue capaz de interpretar correctamente este hecho (y en esta explicación radicó buena parte del enorme esfuerzo que posteriormente se aplicaría a la producción de antibióticos con fines terapéuticos), concluyendo que probablemente el hongo produce una sustancia bacteriolítica que difundiría a través del agar (Fleming, 1929). Si se cultivaba el hongo en medio líquido y a continuación se retiraba el micelio por filtración conseguía detectarse la presencia de la sustancia activa en el medio de cultivo. Fleming identificó el hongo contaminante como *Penicillium rubrum* y por ello denominó **penicilina** al caldo de cultivo obtenido tras el crecimiento del hongo y la filtración del micelio. En 1932, el micólogo americano Charles Thom identificó la “cepa de Fleming” como *Penicillium notatum* Westling (Clutterbuck y col., 1932). A continuación, Fleming estudió la sensibilidad de varias cepas bacterianas incubadas sobre placas con agar a la nueva sustancia, encontrando que un buen número de especies patógenas para el hombre eran sensibles a este filtrado: estafilococos, estreptococos, neumococos y gonococos entre ellas. Determinó, asimismo, que diluciones 1:800 del filtrado eran suficientes para inhibir el crecimiento de los cultivos bacterianos y que no era irritante ni tóxico en tejidos animales (de conejo o ratón) o humanos (incluso utilizó a dos colaboradores suyos para comprobar el efecto terapéutico del filtrado). La penicilina era el primer producto conocido más dañino para las bacterias que para los leucocitos.

Basándose en la actividad antibiótica del filtrado, Fleming lo utilizó para el aislamiento de bacterias no sensibles a penicilina (como por ejemplo *Bacillus influenzae*), a partir de cultivos mixtos.

También estudió la estabilidad del compuesto y llegó a tres conclusiones importantes:

❶ Es muy lábil: la actividad se perdía casi completamente en 10-14 días si se mantenía el

filtrado a temperatura ambiente (en solución alcalina era un poco más estable).

② El calentamiento del filtrado a 100°C condujo a una disminución o pérdida de la actividad, en un grado que dependía del tiempo durante el que se aplicaba este tratamiento (la disminución era más acusada cuando se utilizaban soluciones alcalinas). Sin embargo, temperaturas de alrededor de 80°C aplicadas durante una hora no tenían efecto negativo sobre la actividad.

③ Tampoco tiene ninguna influencia sobre la capacidad antibacteriana de la mezcla la esterilización por filtración.

Los intentos posteriores de Fleming y sus colaboradores Ridley y Craddock para aislar el compuesto químico responsable de la actividad biológica resultaron bastante desalentadores: consiguieron extraer la sustancia activa en etanol, a pH bajo, pero la inestabilidad del compuesto en medio ácido hizo que el procedimiento fuera tedioso y con un rendimiento muy bajo (Fleming, 1929; Hare, 1982). Como consecuencia de ello los experimentos realizados por Fleming y sus colaboradores se basaron en la utilización de caldos de cultivo crudos.

1.1.3. Primeras reacciones al descubrimiento de Fleming.

En 1930-31 C.G. Paine (en la Royal Infirmary de Sheffield) usó un filtrado obtenido a partir de la cepa original de Fleming para tratar infecciones oculares y cutáneas, con resultado dispar: cuatro pacientes con infecciones oculares producidas por neumococos y gonococos fueron curados mientras que en otros casos, especialmente aquellos que presentaban infecciones en la piel, no se obtuvo respuesta positiva. Sin embargo, Paine nunca publicó estos resultados.

En 1930, R.R. Reid (en el Pennsylvania State College) empieza a trabajar en el campo de la

penicilina, estimulado por la publicación de Fleming. En 1935 publica que la penicilina se destruye por destilación y diálisis y no se forma o se destruye cuando el cultivo fúngico es expuesto al efecto de la luz ultravioleta o del oxígeno.

H. Raistrick, P.W. Clutterbuck y R. Lovell (de la Royal School of Hygiene and Tropical Medicine, en Londres) comenzaron en 1932 sus estudios con la cepa productora de penicilina descrita por Fleming y demostraron que la penicilina podía ser sintetizada por el hongo cuando este crecía sobre medios sintéticos (el hongo podía crecer en 16-20 días en medio Czapeck-Dox modificado). El filtrado que contenía la sustancia activa se mantuvo estable a pH 5-6 durante más de tres semanas. Asimismo, al igual que Fleming y sus colaboradores, consiguieron la extracción en éter de la sustancia activa a partir de un medio de cultivo acidificado. Los intentos para reaislar dicha sustancia a partir del éter condujeron, sin embargo, a la inactivación de la misma. La presencia de agentes oxidantes y de contaminantes bacterianos conducía también a la rápida destrucción de la penicilina.

1.1.4. El trabajo del grupo de investigación de Oxford.

El grupo de Oxford (fundamentalmente Howard W. Florey, Ernst Chain y Edward P. Abraham, en la Sir William Dunn School of Pathology) realizó un prodigioso progreso en poco tiempo. Su trabajo comenzó al final de 1939 y en ese momento la penicilina no podía ser obtenida en cantidades suficientes como para satisfacer la futura demanda (fundamentalmente debido al comienzo de la 2ª Guerra Mundial).

El primer gran logro del grupo consistió en la introducción de un nuevo elemento en los medios de cultivo utilizados: se basaron en el medio desarrollado por Raistrick y sus colaboradores y lo suplementaron con extracto de levadura hervido. Con ello consiguieron acortar el tiempo de creci-

miento del hongo desde las dos o tres semanas habituales a unos diez días.

A continuación optimizaron la superficie útil del medio de cultivo para el crecimiento del microorganismo mediante el empleo de vasos de cultivo de cerámica especialmente fabricados para este uso. También definieron una unidad que sirvió como patrón cuantitativo (la denominada unidad de Oxford, que equivale a aproximadamente 0'6 microgramos de penicilina G, tanto en forma de sal sódica como en su forma de sal potásica).

Tras esto elaboraron un procedimiento de separación de la penicilina del filtrado: el filtrado se extraía con éter o acetato de amilo a pH 2 en frío y la reextracción de la penicilina se conseguía con un tampón de fosfato o agua a pH 6-7. Los contaminantes que daban color a la preparación se eliminaban por adsorción sobre carbón activo seguida de cromatografía en una columna de óxido de aluminio. Tras lavar la columna con éter, el compuesto activo se eluía con tampón de fosfato, se reextraía con éter y se transformaba en su sal sódica. El resultado de liofilizar esta solución era un polvo pardo bastante higroscópico. Estos trabajos se simplificaron mucho con el desarrollo del primer aparato de extracción continuada, capaz de manejar 12 litros de cultivo filtrado por hora. La disponibilidad de penicilina en forma de polvo (aunque todavía con una pureza del 1-2%) resultaría fundamental para el desarrollo de los estudios químicos, bacteriológicos y terapéuticos que permitieron la utilización del compuesto en el campo sanitario. Las cantidades producidas, sin embargo, todavía eran insuficientes ya que se requerían mayores cantidades para su aplicación en humanos. Por ello, uno de los trabajos del grupo consistió en la elaboración de un método de reaislamiento de la penicilina a partir de la orina de los pacientes.

Por último, procedieron a la aplicación a pacientes de dosis periódicas de penicilina, observando su eficacia contra infecciones de tipo bacteriano (aunque las pequeñas cantidades dispo-

nibles no permitieron la obtención de resultados espectaculares). En algunos casos aislados se encontraron fenómenos de alergia.

Estos experimentos demostraban la gran capacidad terapéutica del antibiótico en estudio, pero quedaba un problema por resolver: ¿cómo producir penicilina en mayores cantidades?.

1.1.5. Inicios de la producción de penicilina en Estados Unidos.

Florey y sus colaboradores decidieron buscar financiación para solventar este tema y así, en Junio de 1941, Florey y Heatley viajaron a Estados Unidos. Allí previamente se habían reproducido (en la Universidad de Columbia y en el Columbia Presbyterian Hospital) varias de las experiencias realizadas en tierras europeas por el grupo de Oxford. A su llegada a Estados Unidos los científicos ingleses visitaron, tras varios contactos, a algunos expertos en fermentación del Northern Regional Research Laboratory (NRRL) situado en Peoria (Illinois). Florey visitó posteriormente varias compañías farmacéuticas de Estados Unidos y Canadá. A partir de ese momento en Estados Unidos se desarrolló un enorme esfuerzo, perfectamente coordinado por el Gobierno (no debemos olvidar que en esos momentos se desarrollaba una gran guerra y que los requerimientos de penicilina eran cada vez mayores), por parte de los Institutos Nacionales de Investigación, de las Universidades, de los Hospitales y de las industrias farmacéuticas con el fin de obtener suficientes cantidades de penicilina (en principio para usos militares y ensayos clínicos y, posteriormente, para el suministro a la población civil).

Tras la visita de Florey, el NRRL se constituyó en el centro de desarrollo en Estados Unidos de las investigaciones relacionadas con la penicilina. Norman Heatley, que había llegado acompañando a Florey, permaneció allí durante seis meses con el objetivo de transmitir los conocimientos previamente adquiridos en Oxford. Como consecuencia

de los trabajos de R. Coghill y A. Moyer, en el NRRL se consiguieron importantes progresos y se sentaron las bases de la futura producción de penicilina a gran escala. Cabe destacar los siguientes resultados:

❶ La adición al medio de cultivo de “corn steep liquor”, un subproducto en la producción de almidón de maíz que en Peoria se encontraba en grandes cantidades y a bajos costes, conducía a un incremento de unas diez veces en la producción de penicilina. Tras este cambio el hongo ya no producía penicilina F (posteriormente se describió que era éste el tipo de penicilina que se había estudiado en Oxford), sino fundamentalmente penicilina G.

❷ El cambio en el medio de fermentación de glucosa por lactosa también incrementaba la formación del producto de interés.

❸ Se comprobó que *Penicillium* es capaz de crecer sumergido en tanques de fermentación, lo que permitió unas mayores posibilidades para el crecimiento a gran escala que las que proporcionaba el crecimiento tradicional en superficie.

❹ Finalmente, se probaron nuevos hongos con el fin de encontrar microorganismos con una mayor capacidad de producción. Así se encontró una nueva cepa (*Penicillium chrysogenum* NRRL 1951) en un melón mohoso localizado en el mercado de Peoria (Illinois). Esta cepa producía mayores cantidades de penicilina (0.07 g/L, en comparación con los 0.0012 g/L producidos por la cepa de *P. notatum* aislada por Fleming) y era más adecuada para la realización de cultivos sumergidos. Algunos mutantes de esta cepa producían incluso más, lo que en cierta medida estaba marcando el camino que se ha seguido hasta nuestros días en el proceso de mejora de cepas de microorganismos productores de metabolitos de interés industrial.

En 1941 (cuando Florey y Heatley viajaron a Estados Unidos) sólo tres compañías farmacéuticas norteamericanas (Merck, Squibb y Pfizer, esta última con experiencia en técnicas de fermentación microbiana debido a la utilización de *Aspergillus niger* para la producción de ácido cítrico) se comprometieron seriamente en la investigación de este nuevo producto. La disponibilidad de protocolos para una producción eficiente y, sobre todo, rentable de penicilina y el llamamiento por parte del Gobierno atrajeron a nuevas compañías. Así, rápidamente se incorporaron a la producción las compañías Abbott y Winthrop y a mediados de 1943 el número de compañías productoras de penicilina era de veintidós, fundamentalmente debido a la enorme demanda de penicilina por parte del ejército.

Toda la producción se destinaba a fines militares (salvo un pequeña parte destinada a ensayos clínicos) y hubo que esperar hasta mediados de 1945 para que comenzase una distribución regular en los hospitales. Al mismo tiempo, y coincidiendo aproximadamente con el final de la guerra, el precio de la penicilina se redujo unas veinte veces. Este hecho no cabe ser explicado únicamente por medio de la clásica confrontación entre las leyes de la oferta y la demanda o en función de movimientos económicos de tipo especulativo; debemos darnos cuenta de que, por ejemplo, Pfizer (la mayor productora americana de penicilina hasta 1948) produjo 6.800 Megaunidades de penicilina en 1943 y 723.000 Megaunidades en 1944, una producción más de 100 veces superior (la entrada en funcionamiento de una nueva planta de fermentación con 14 tanques de 7.000 litros de capacidad cada uno fue la responsable de este incremento).

En 1943 el proceso de extracción a partir del filtrado de la fermentación se basaba en la adsorción de la penicilina en carbón, elución, extracción con cloroformo y reextracción con una solución de bicarbonato. Esta técnica también fue mejorada y así en 1946 se desarrolló un sistema para la extracción continua de la penicilina

producida: se trataba de un aparato de extracción a contracorriente en el cual se aplicaba el filtrado del cultivo acidificado en forma de una fina capa sobre una corriente de solvente orgánico. La penicilina se disolvía en la fase orgánica y después se reextraía a una fase acuosa. La solución se liofilizaba y la penicilina se obtenía en forma de un polvo amorfo. A partir de 1947 se consiguió obtener la penicilina en forma cristalina tras precipitarla desde la fase orgánica con soluciones concentradas de acetato sódico o potásico.

1.1.6. Inicios de la producción de penicilina en Europa.

1.1.6.1. Inicios de la producción de penicilina en Gran Bretaña.

En Gran Bretaña, la publicación en 1940 del primer trabajo de Florey, Chain y colaboradores acerca de la penicilina despertó el interés por esta sustancia de algunas compañías farmacéuticas británicas. A pesar de las difíciles condiciones impuestas por la guerra (en cuanto a las disponibilidades económicas e incluso en cuanto a la disponibilidad de la mano de obra adecuada), a finales de 1941 ya había cinco empresas implicadas en la producción de penicilina. Fueron estas compañías británicas (aparte de la producción propia en Oxford y de un pequeño aporte de las industrias norteamericanas) las que permitieron al grupo de Florey disponer de la penicilina suficiente para poder desarrollar ensayos clínicos y continuar con la investigación de las características de la sustancia. La conexión entre las compañías farmacéuticas y los investigadores no fue unidireccional sino que éstos colaboraron con las industrias en labores de asesoría y en la transferencia de los resultados de la investigación: Norman Heatley se encargó de la iniciación en la producción de penicilina y de la mejora de los procesos en la Imperial Chemical Industries, Ltd. y posteriormente en Kembell, Bishop & Co. (empresa con experiencia en las técnicas de fermentación) y Harold Raistrick (de la London

School of Hygiene and Tropical Medicine) se convirtió en asesor científico de Glaxo.

Durante la guerra, Glaxo fue la compañía productora de la mayor parte de la penicilina británica. Tras la adopción de los medios de cultivo desarrollados en el NRRL y la utilización de una cepa mejorada de *P. chrysogenum* la producción de penicilina alcanzó las 2.570 Megaunidades en 1943 y las 7.500 en 1944. La producción británica de penicilina durante la guerra se consiguió mediante las técnicas de cultivo en superficie, teniendo que esperar la aplicación de las técnicas de cultivo sumergido hasta el final de la misma (una vez que la maquinaria y los materiales fueron más fácilmente disponibles). Glaxo desarrolló estas técnicas en colaboración con Merck y Squibb (la colaboración entre compañías y laboratorios británicos y estadounidenses siempre fue muy estrecha en el campo de la producción de penicilina, y no sólo a nivel de aplicaciones prácticas sino también en lo concerniente a los conocimientos teóricos, uso de cepas mejoradas, etc.). Al igual que en Estados Unidos, la penicilina producida en Gran Bretaña fue distribuida exclusivamente por instituciones públicas (y esto se mantuvo así hasta el año 1946).

1.1.6.2. Inicios de la producción de penicilina en Alemania.

En Alemania, contrariamente a lo ocurrido en Estados Unidos y Gran Bretaña, la penicilina fue considerada durante mucho tiempo como una curiosidad de laboratorio y no hubo un esfuerzo masivo para potenciar su investigación y producción. Ello fue debido al importante papel jugado en esos momentos por otro tipo de agentes quimioterapéuticos: las sulfamidas (mundialmente aceptadas entonces para el tratamiento de infecciones de tipo bacteriano y producidas por síntesis química, lo que suponía una mayor facilidad de obtención en comparación con la de la

penicilina). Por ello se desarrollaron solamente pequeños grupos de investigación en algunas compañías farmacéuticas, destacando por sus avances los de las factorías Bayer y, fundamentalmente, Hoechst y Schering (también hubo grupos de investigación en las compañías Merck y Knoll, pero no se mantuvieron activos durante mucho tiempo).

Hasta el final de la guerra las fermentaciones aún se realizaban en superficie y la penicilina obtenida por reislamiento a partir de la orina de los pacientes suponía todavía un porcentaje muy alto del total de la penicilina producida. Con la colaboración de los países vencedores en la guerra se estimuló mucho la producción de penicilina: se favoreció el conocimiento de trabajos anteriores que durante la guerra habían sido tratados como secretos de Estado, se suministraron cepas mejoradas en cuanto a la producción y el crecimiento en condiciones sumergidas y se colaboró en la construcción de plantas de fermentación sumergida. Así, en 1948, la compañía Chemie Grünenthal KG (surgida tras la guerra) comienza las pruebas de fermentación en tanques de 30 litros utilizando una cepa de *P. chrysogenum* proporcionada por los americanos y un medio de cultivo que contiene líquido de maceración del maíz. En diciembre de 1950 esta empresa es capaz de producir 10.600 Megaunidades de penicilina G pura en estado cristalino. A finales de 1948 Hoechst produce, usando también una cepa suministrada por los americanos, 500 Megaunidades por mes; es en ese momento cuando las autoridades militares aliadas le permiten firmar un acuerdo de colaboración con la compañía americana Merck & Co. en la construcción de una gran planta de fermentación. La nueva planta se inauguró en agosto de 1950 e incluía varios tanques de fermentación con capacidad para 40.000 litros, con un potencial de producción de alrededor de 400 billones de unidades por mes. De esta forma, cinco años después de la guerra y con el apoyo de los países aliados (ayuda tanto técnica como económica, ya que las obras de construcción de la nueva planta fueron parcialmente sufragadas con fondos del Plan

Marshall), Alemania era capaz de cubrir su propia demanda.

1.1.6.3. Inicios de la producción de penicilina en Holanda.

En Holanda la investigación y desarrollo de la producción de penicilina corrió a cargo de la compañía Royal Gist-Brocades, a partir del año 1944 (durante la guerra) y desconociendo, debido a la ocupación alemana de Holanda, muchos de los avances obtenidos anteriormente por otros investigadores en el mismo tema. Sin embargo, la capacidad de asociar el nombre “penicilina” con el artículo publicado por Fleming en 1929 permitió desarrollar procesos de fermentación con la cepa original, que Fleming había depositado previamente en una colección de microorganismos de Holanda, y que llevaron a la obtención de un producto activo que fue probado con excelentes resultados (posteriormente se compararía con una muestra de la penicilina fabricada en Estados Unidos, llegándose a la conclusión de que ambas sustancias eran idénticas).

Al final de la guerra, algunos investigadores de esta compañía se desplazaron a Estados Unidos, donde aprendieron de los progresos conseguidos en este campo por norteamericanos y británicos. Como resultado de ello empezaron a desarrollar las técnicas de fermentación sumergida y a añadir a los medios de cultivo utilizados ácido fenilacético y líquido de maceración del maíz. En enero de 1946 la producción mensual en Delft (Holanda), sede de la compañía, era de unas 10 Megaunidades usando fermentadores de 1.500 litros. A principios de 1948 la producción se había incrementado hasta los 100 millones de unidades diarios, debido al incremento en la capacidad de los tanques (se utilizaban ahora seis fermentadores de 10.000 litros) y al aumento de la concentración de penicilina en el caldo de cultivo.

1.1.7. Descubrimiento de la cefalosporina C.

Una vez descubiertas las propiedades terapéuticas de la penicilina, un profesor de bacteriología de Cagliari (Cerdeña) llamado Giuseppe Brotzu intentó descubrir otros microorganismos con capacidad para producir antibióticos. Su trabajo comenzó a finales de la Segunda Guerra Mundial, examinando la flora microbiana del agua marina en las proximidades de la zona de salida de una parte de las aguas residuales de Cagliari. Brotzu supuso que el proceso de autopurificación del agua podía ser debido al antagonismo microbiano y consiguió aislar un hongo (con el paso del tiempo denominado *Acremonium chrysogenum*) que, cuando era cultivado sobre agar, era capaz de secretar un producto que inhibía el crecimiento de una gran variedad de bacterias gram-positivas y gram-negativas (Brotzu, 1948), incluidas algunas que habían demostrado ser resistentes a penicilina (compuesto con un espectro antibacteriano específico contra bacterias gram-positivas). A pesar del éxito obtenido por este científico, las investigaciones a desarrollar posteriormente escapaban a su experiencia práctica y no consiguió interesar a ninguna compañía farmacéutica italiana en la continuación del proyecto, por lo que se puso en contacto con el Dr. Blyth Brooke que le remitió a Sir Howard Florey. Florey respondió favorablemente a la propuesta de Brotzu, continuándose a partir de ese momento los estudios sobre este nuevo compuesto en la Dunn School of Pathology de Oxford.

Los primeros estudios demostraron la presencia de un antibiótico ácido fácilmente extraíble en solventes orgánicos (se le denominó cefalosporina P), pero no era éste el compuesto descrito originalmente por Brotzu puesto que sólo presentaba actividad frente a ciertas bacterias gram-positivas. En 1949 se encontró un segundo antibiótico en los cultivos líquidos de *Acremonium*. Esta nueva sustancia permanecía en la fase acuosa tras la extracción de la cefalosporina P y era activa frente a bacterias gram-negativas y gram-positivas (Burton y Abraham, 1951). Se le denominó cefalosporina N y se comprobó que su actividad era

eliminada tras el tratamiento con una preparación de penicilinas obtenida a partir de *Bacillus subtilis*. En 1952 Abraham y Newton demostraron que la cefalosporina N era realmente un nuevo tipo de penicilina cuando vieron que a partir de una muestra parcialmente purificada se liberaba el aminoácido penicilamina (β,β -dimetilcisteína) tras la hidrólisis ácida (Abraham y col., 1953).

En septiembre de 1953, durante los estudios desarrollados acerca de la naturaleza química de la cefalosporina N, Newton y Abraham descubrieron un segundo antibiótico hidrofílico en los caldos de cultivo de *Acremonium* y lo denominaron cefalosporina C (Newton y Abraham, 1955). El nuevo antibiótico se obtenía fácilmente en su forma de sal sódica y mostraba actividad antibiótica frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, aunque su actividad específica frente a estos microorganismos era tan sólo un 10% de la demostrada por la penicilina N. Sin embargo, y a pesar de este desesperanzador principio, algunas otras propiedades del nuevo antibiótico resultaron ser interesantes: el hecho de ser estable en medio ácido diluido o el de ser resistente a la acción de la penicilinas de *B. subtilis*, por ejemplo. Estas propiedades sugerían la posibilidad de que la estructura química de la cefalosporina C difiriera de la estructura que por aquellos momentos se postulaba para la penicilina.

A principios de 1955 se demostró que la cefalosporina C presentaba un amplio rango de actividad, incluyendo una gran cantidad de cepas de *Staphylococcus aureus*, tanto sensibles como resistentes a penicilina. Este antibiótico se mostraba inocuo cuando se administraba de forma intravenosa en grandes dosis y era capaz de proteger a ratones de experimentación de infecciones causadas por estreptococos. Posteriormente se demostraría que era también capaz de proteger a los ratones de las infecciones causadas por estafilococos resistentes a la penicilina (Florey y col., 1956).

1.1.8. Estructura química de la penicilina y de la cefalosporina.

En 1941, cuando comenzaron los primeros ensayos clínicos con la penicilina, prácticamente no se conocía nada acerca de la naturaleza química de este compuesto, excepto que se trataba de una molécula relativamente pequeña, que se extraía en su forma ácida con solventes orgánicos y que podía reextraerse en forma de sal en soluciones acuosas. Dos años después, Edward Abraham y Ernst Chain consiguieron cristalizar la penicilina obtenida en Oxford en forma de sal sódica y fueron capaces de compararla con el compuesto producido en Estados Unidos. La penicilina “americana” (a partir de entonces conocida como penicilina G) difería de la “británica” (denominada penicilina F) en que poseía un grupo bencilo en lugar de un grupo 2-pentenilo, lo que se debía a que el medio usado en las fermentaciones por las compañías americanas contenía líquido de maceración del maíz (este componente del medio de cultivo aportaba un precursor de la cadena de fenilacetilo que aparece unida al núcleo central en el caso de la penicilina G). Posteriormente consiguieron degradar la molécula en tres componentes: un aminoácido (la penicilamina), un aldehído y CO₂. En octubre de 1943 ya se empezaba a valorar la posibilidad de que la estructura química de la penicilina contuviera una β-lactama, lo que fue motivo de una seria polémica entre tres de los miembros del grupo investigador (E. Abraham, E. Chain y Wilson Baker, que defendían esta estructura) y el otro miembro principal (Sir Robert Robinson, que encontraba esta estructura como inaceptable y sugería una estructura bicíclica tiazolidina-oxazolona). Dos años más tarde la polémica quedó resuelta a favor de los primeros, tras el análisis de cristalografía de rayos X de la molécula (Abraham y *col.*, 1949).

Más de diez años después se conseguiría la primera síntesis racional de penicilina por métodos químicos, en el Massachusetts Institute of Technology (Sheehan y Henery-Logan, 1959). Este proceso se basaba en el uso de un nuevo reactivo

para conseguir el cierre del heterociclo y prestaba especial atención a la estereoquímica de la reacción. Sin embargo, este sistema (de indudable valor académico) y otros desarrollados posteriormente no han resultado ser lo suficientemente rentables desde el punto de vista económico como para ser capaces de competir con las técnicas de fermentación en la producción de penicilina a escala comercial.

Tras la hidrólisis ácida de la cefalosporina N obtenida en forma prácticamente pura se observó la aparición de penicilamina y de ácido D-α-aminoadípico, lo que permitía deducir una estructura química consistente en un núcleo de penicilina al que se une un resto de D-α-aminoadipilo por su grupo δ-carboxilo (Newton y Abraham, 1954). A partir de entonces este compuesto fue denominado penicilina N.

Las investigaciones acerca de la estructura química de la cefalosporina C experimentaron un gran impulso cuando pudo disponerse de cantidades relativamente grandes de este compuesto. Para ello fue decisivo el disponer de un mutante superproductor de cefalosporina C, obtenido en 1957 en la Antibiotics Research Station de Clevedon (Reino Unido) y denominado con el número 8650 y que sería utilizado a partir de esos momentos en las fermentaciones. Una vez que se demostró que la cefalosporina C tenía la misma cadena lateral de D-α-aminoadipilo que la penicilina N parecía claro que la resistencia a la penicilinasasa estafilococal tendría que venir determinada por un sistema de anillos distinto. Finalmente, en 1956, como resultado de la colaboración entre miembros de la empresa Glaxo e investigadores de los grupos de Oxford y Clevedon se postuló la estructura probable de la cefalosporina

C (Newton y Abraham, 1956). En 1961, como culminación de los trabajos realizados con espectroscopía de resonancia magnética nuclear y de análisis cristalográficos con rayos X (Hodgkin y Maslen, 1961), se confirmó la estructura propuesta para la cefalosporina: un sistema heterocíclico β -lactámico-dihidrotiazínico en lugar del sistema β -lactámico-tiazolidínico de las penicilinas (Abraham y Newton, 1961).

La síntesis química completa de la cefalosporina C (Woodward, 1966) fue parte del trabajo que le valió a R.B. Woodward la concesión del Premio Nobel en 1965.

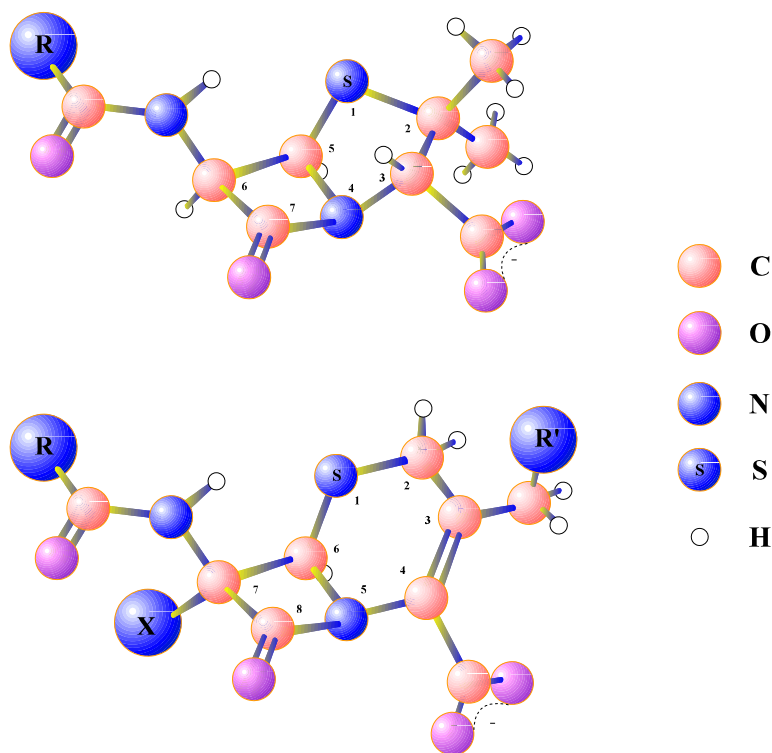


Figura 1.1. Estructura química básica de penicilinas (figura superior) y cefalosporinas (figura inferior)

1.1.9. Estructura general de los antibióticos β -lactámicos.

Una vez conocida la estructura química de las penicilinas y cefalosporinas se observó la presencia

de un denominador común entre ellas. La presencia del anillo β -lactámico daría lugar a la creación del denominado, desde entonces, grupo de los antibióticos β -lactámicos.






Núcleo β -lactámico	Estructura	Hongos	Bacterias	
			Gram-positivas	Gram-negativas
Penam		<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Trichophyton</i> <i>Polypaecilum</i> <i>Malbranchea</i> <i>Sartorya</i> <i>Pleurophormopsis</i>		
Cefem		<i>Cephalosporium</i> <i>Anixiopsis</i> <i>Arachnomyces</i> <i>Spiroidium</i> <i>Scopulariopsis</i> <i>Diheterospora</i> <i>Paecilomyces</i>	<i>Streptomyces</i> <i>Nocardia</i>	<i>Flavobacterium</i> <i>Xanthomonas</i> <i>Lysobacter</i>
Clavam			<i>Streptomyces</i>	
Carbapenem			<i>Streptomyces</i>	<i>Serratia</i> <i>Erwinia</i>
Monobactam			<i>Nocardia</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Gluconobacter</i> <i>Chromobacter</i> <i>Agrobacter</i> <i>Acetobacter</i>

Tabla 1.1. Especies productoras de los principales grupos de antibióticos β -lactámicos.

El núcleo central de las penicilinas es el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), formado por el anillo β -lactámico asociado a un anillo tiazolidínico. En las cefalosporinas y cefamicinas, el anillo β -lactámico aparece asociado a un anillo dihidrotiazínico, formando un núcleo central denominado ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA). Es la naturaleza de la cadena lateral que se une al núcleo central la responsable de conferir a estos antibióticos características hidrofílicas o hidrofóbicas: algunas penicilinas son de carácter

hidrofóbico porque sus cadenas laterales las constituyen el ácido fenilacético (penicilina G) o el ácido fenoxiacético (penicilina V), de características hidrofóbicas, mientras que otras presentan una cadena lateral hidrofílica de ácido L- α -aminoadípico (isopenicilina N). Las cefalosporinas y cefamicinas poseen siempre una cadena lateral de ácido D- α -aminoadípico, por lo que siempre presentan características hidrofílicas.

Las penicilinas con cadena lateral hidrofóbica son exclusivamente sintetizadas por ciertas especies de hongos filamentosos (Elander y Aoki, 1982) y las cefalosporinas y cefamicinas pueden ser producidas, como se puede observar en la tabla 1.1, por diferentes especies de hongos filamentosos, muchos actinomicetos (microorganismos gram-positivos) y unas pocas especies de bacterias unicelulares gram-negativas (Nagarajan y col., 1971; Jensen, 1986; Aharonowitz y col., 1992).

La búsqueda intensiva de nuevos antibióticos llevó a partir de ese momento al descubrimiento de otros compuestos β -lactámicos con actividad antibacteriana: se descubrieron las carbapenemas (producidas por algunas especies de *Streptomyces*), las cefamicinas (producidas por varios actinomicetos) y las monobactamas (producidas por algunas especies de *Pseudomonas*, *Gluconobacter* y *Chromobacterium*). Estos compuestos están adquiriendo cada vez mayor importancia en el mercado farmacéutico.

1.2. Producción industrial de la penicilina.

1.2.1. Productividad en la obtención de penicilina por fermentación.

Hay varios factores que determinan la eficacia, y por lo tanto la rentabilidad o viabilidad económica, del proceso de fermentación encaminado a la obtención de penicilina:

① Uno de ellos es la productividad media por unidad de volumen de fermentador y unidad de tiempo.

② Otro, no menos importante por los elevados costes que suponen las materias primas para el proceso, es la eficiencia media de conversión de los sustratos en productos.

③ El tercer factor afecta a la eficiencia de los procesos de separación y de purificación del compuesto de interés.

Los dos primeros factores dependen de la capacidad de producción de penicilina, determinada de forma genética por la cepa industrial utilizada, y por la composición del medio de cultivo (la presencia de compuestos que aumenten, limiten o inhiban el crecimiento del microorganismo o la capacidad de producción de penicilina del hongo afectan de forma negativa al proceso) o ciertos parámetros de desarrollo de la fermentación (el valor del pH o la temperatura, por ejemplo). Además hay otras variables importantes, en principio de carácter técnico, que influyen en la productividad de la fermentación: la transferencia de oxígeno al medio o la refrigeración del tanque, por ejemplo. Estas características contribuyen al control de la cantidad de biomasa productiva que puede crecer y ser mantenida en el tanque.

El tercero de los factores ha sido muy mejorado, desde los antiguos procesos de recuperación de penicilina, en los que se utilizaba la adsorción sobre carbón activo, hasta los modernos métodos en los que se alcanzan rendimientos superiores al 90% con una duración del proceso de aproximadamente 15 horas. Los nuevos métodos se basan en la extracción con solventes orgánicos, que posteriormente son reciclados en unidades de destilación y reutilizados para nuevos procesos de extracción.

La mejora en la productividad total se puede conseguir mejorando cada uno de los factores mencionados. La investigación sobre la optimización de los procesos de fermentación y el desarrollo de programas de mejora de cepas por parte de las compañías farmacéuticas ha permitido un espectacular crecimiento de la rentabilidad de tales procesos.

1.2.2. Mejora de cepas.

La obtención de cepas con mejores características en lo referente a la producción de penicilina ha sido fundamental para un progresivo aumento de la productividad de la fermentación. Pirt (1983) ha estimado que esta variable multiplicó la productividad por 16 entre 1950 y 1975. Sin embargo, la optimización simultánea de otros aspectos de la fermentación no favorece una cuantificación precisa de la influencia de este factor sobre el proceso completo.

Las cepas mejoradas no sólo producen mayor cantidad de penicilina por unidad de tiempo y fuente de energía, sino que también pueden presentar diferentes características que afectan al proceso de fermentación (por ejemplo el hecho de que el microorganismo posea un tipo de crecimiento que no favorezca el aumento en la viscosidad del medio, lo que permitiría una mejor aireación del micelio y un menor consumo de energía eléctrica).

En un principio, la mejora de cepas se realizó de forma prácticamente artesanal, por medio de operarios encargados de procedimientos tediosos y con un rendimiento relativamente bajo. En la actualidad este proceso se lleva a cabo por medio de sofisticados “robots” que realizan en una semana el análisis que haría un empleado en varios meses.

1.2.2.1. Agentes mutagénicos empleados y su efecto sobre los microorganismos.

La aparición de mutaciones es un fenómeno que ocurre cotidianamente en la Naturaleza. Este suceso, básico en el proceso evolutivo, es lento y da frutos apreciables solamente con el paso de un gran número de años. Para ello, la mutación aparecida debe conferir alguna característica favorable para la supervivencia o el predominio del organismo en el que aparece (esto es lo que se denomina selección natural). Desde que el hombre se hizo sedentario este proceso de selección natural empezó a modificarse ligeramente, sobre todo en lo referente a las especies de utilidad (animales domésticos para

el consumo y transporte o vegetales con valor alimenticio), seleccionándose variantes de mayor interés y favoreciéndose su supremacía. Esta misma filosofía es la que se ha aplicado a la selección de cepas mejoradas de microorganismos productores de compuestos de interés, con la pequeña diferencia de que mediante los procesos de mutagénesis se induce la aparición de mutaciones que sólo aparecerían en la Naturaleza en el transcurso de millones de años. Además, hay que considerar que las mutaciones que pueden tener interés industrial para el hombre podrían no conferir ninguna ventaja evolutiva a sus portadores, por lo que, con casi total seguridad, no perdurarían.

Clásicamente se han empleado en estos procesos dos tipos de agentes mutagénicos: agentes físicos como la radiación ultravioleta, los rayos gamma o los rayos X y agentes químicos como el etil metanosulfonato (EMS), la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), las mostazas nitrogenadas o el ácido nitroso. Las características de las mutaciones generadas van a depender tanto del tipo de daño causado por el agente mutagénico sobre el ADN del microorganismo tratado como de la acción de los sistemas de reparación del microorganismo sobre la mutación aparecida. La mayor parte de los mutágenos empleados puede producir más de un tipo de daño sobre el ADN, pero en distinto grado. La radiación ultravioleta generalmente induce la formación de dímeros de pirimidina (aunque la radiación ultravioleta lejana es capaz de originar también la aparición de bases hidroxiladas y el entrecruzamiento de las cadenas de ADN), la radiación ionizante produce un alto grado de ruptura en el cromosoma y el EMS y la NTG son agentes alquilantes. Cada mutágeno, pues, provoca la aparición de un espectro de mutantes característico (Auerbach, 1976) y tradicionalmente se han utilizado varios de ellos, de forma alternativa, en los procesos de mejora de cepas de interés industrial.

A la hora de realizar la mutagénesis de una cepa es prácticamente imposible predecir con exactitud qué tipo de mutación es requerido para mejorar la

producción. Por ello se usan combinaciones de varios agentes mutagénicos con la finalidad de generar un amplio rango de mutantes sobre los que realizar una posterior selección. Las dosis mutagénicas a aplicar también deben tenerse en consideración: una dosis de mutágeno óptima es aquella capaz de originar la mayor proporción de mutantes deseados entre la población de microorganismos supervivientes, mientras que la utilización de una dosis mutagénica demasiado elevada conducirá normalmente a la obtención de un bajo número de mutantes por superviviente e incrementará la posibilidad de aparición de más de una mutación en cada uno de ellos.

La mutabilidad (o capacidad de un organismo para ser mutado) está determinada genéticamente, aunque puede estar afectada por el ambiente celular. Ciertas alteraciones génicas pueden incidir sobre la capacidad de mutabilidad y por ello su efecto es denominado “mutador” o “antimutador”, dependiendo de si favorecen o dificultan la mutabilidad, respectivamente. Existen agentes y técnicas que amplifican la mutabilidad de una cepa antes, durante o después del proceso de mutagénesis:

- El crecimiento del microorganismo en un medio rico en nutrientes, inmediatamente después de la mutagénesis, incrementa el rendimiento total de mutantes obtenidos.

- El mantenimiento de las suspensiones de esporas mutadas sin ser extendidas sobre el medio de selección puede facilitar el proceso de reparación, disminuyendo el rendimiento total.

- Determinados agentes químicos, como el 8-metoxipsoraleno (8-MOP) y la acriflavina, reducen el efecto letal y mutagénico de la radiación ultravioleta lejana si están presentes antes de la irradiación o durante la misma, pero inducen el efecto contrario si se añaden después de la irradiación.

- La cafeína es un agente inhibidor de la reparación por escisión, por lo que amplifica la mutabilidad celular.

No hay que olvidar un tipo de obtención de mutantes en los que no influye la incidencia de un agente mutagénico: la fusión de protoplastos. Para aplicarla se requiere de la obtención de los protoplastos, mediante el uso de enzimas líticas que degraden la pared del microorganismo, su fusión con concentraciones de entre el 40 y el 60% de polietilenglicol y la posterior regeneración en un medio suplementado con un estabilizador osmótico (Anné y Peberdy, 1976). Es posible, utilizando esta técnica, realizar cruces entre cepas de alta producción que tengan un crecimiento lento y cepas de baja producción con crecimiento vigoroso, obteniéndose cepas que aúnen las mejores características de los dos microorganismos parentales.

Por ejemplo, se ha conseguido la biosíntesis de penicilina mediante la fusión de los protoplastos obtenidos a partir de cepas de *A. nidulans* mutadas en distintos puntos de la ruta biosintética (Makins y col., 1980). En 1979 ya se había realizado la primera fusión con éxito de protoplastos de *A. chrysogenum* (Hamlyn y Ball, 1979). Esta técnica también ha sido usada para la recombinación entre especies distintas del género *Penicillium* (Anné, 1983):

- En algunos casos se obtenían cepas con características híbridas. Por ejemplo, la fusión de protoplastos de *P. chrysogenum* y *P. baarnense* llevó a la obtención de transformantes capaces de sintetizar penicilina y de presentar recombinación de tipo sexual.

- En otros casos la fusión de los protoplastos traía consigo la aparición de características fenotípicas de las que carecían los microorganismos parentales (Anné, 1977) o alteraciones en la regulación génica (Mellon y col., 1983). Por ejemplo, los híbridos interespecíficos de *P. chrysogenum* y *P. roqueforti* producían un

pigmento de color rojo que no aparecía en ninguna de estas dos especies.

En cualquiera de los casos, estas modificaciones pueden provocar la aparición de características provechosas desde el punto de vista de la explotación industrial de los microorganismos (López-Nieto y col., 1981).

Existen otros métodos capaces de producir mutaciones en localizaciones concretas de los genes, las denominadas técnicas de mutagénesis dirigida. Estas técnicas requieren el conocimiento de la secuencia de nucleótidos del gen de interés y en muchas ocasiones, además, el conocimiento de las regiones esenciales para la actividad de las enzimas. El efecto que se busca con la modificación de la secuencia nucleotídica es el mismo que se persigue con las técnicas de mutagénesis al azar: aumentar la expresión de los genes de interés o disminuir la expresión de los genes indeseables.

1.2.2.2. Selección de los mutantes.

Tras la mutagénesis se efectúa un proceso de preselección de los mutantes, como paso previo a la evaluación de su producción. Esta preselección se consigue con una serie de distintos procedimientos (Ditchburn y col., 1974; Chang y Elander, 1979), basados en algún tipo de mecanismo relacionado con la producción de antibiótico (o bien de carácter puramente empírico), y encaminado a eliminar la necesidad de probar en medio líquido la enorme cantidad de células mutadas obtenidas tras el proceso de mutagénesis. A continuación se describirán algunos de estos procedimientos.

a) Selección basada en la actividad antibacteriana de los mutantes. Consiste en la colocación de cilindros de agar (en los que se han sembrado las colonias mutantes) sobre placas de agar inoculadas con cepas de bacterias sensibles a la acción del producto que se quiere detectar (en el caso de la penicilina estas cepas sensibles serían *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis*

ATCC 6633 o *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750, por ejemplo, y en el caso de la cefalosporina y la cefamicina suele utilizarse *E. coli* ESS 22-31). Los cilindros de agar que producen halos de inhibición del crecimiento del microorganismo sensible mayores que los originados por un cilindro control son seleccionados para el posterior análisis de la colonia mutante en medio líquido. Este método sirve para eliminar la mayor parte de las colonias no productoras o de baja producción.

b) Selección de mutantes resistentes a análogos de aminoácidos. Existen aminoácidos estrechamente relacionados con la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos. A este respecto cabe señalar la implicación de los tres aminoácidos implicados como precursores directos en la formación de penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas (ácido α -aminoadípico, cisteína y valina), de la metionina como compuesto inductor en la producción de cefalosporina C por *Acremonium chrysogenum* (Velasco y col., 1994) o de la lisina como compuesto represor de la biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas (Luengo y col., 1979 y 1980). Chang y Elander aislaron en 1979 una serie de mutantes de *A. chrysogenum* resistentes a análogos de cisteína (selenocisteína y allilglicina), de valina (norvalina y ácido DL- α -amino-n-butírico), de lisina (S-2-aminoetilcisteína), de metionina (selenometionina, trifluorometionina y selenoetionina), de serina (α -metilserina) y de leucina (trifluoro-leucina). Los mutantes resistentes a ciertos análogos de metionina o lisina proporcionaban una mayor frecuencia de cepas superproductoras de cefalosporina C que la mera selección al azar.

c) Selección de mutantes resistentes a antibióticos poliénicos. En 1975, una patente japonesa de Takeda Chemical Industries (Patente Japonesa JA 11723, 1975) describió que determinadas cepas del hongo *A. chrysogenum* y de *Acremonium polyaleurum* resistentes a la acción de ciertos antibióticos poliénicos como la nistatina, la kabicidina o la tricomicina producían mayor cantidad de cefalosporina C, debido probablemente a la aparición de alteraciones en la permeabilidad

de la membrana celular. En nuestro laboratorio se ha descrito un mecanismo similar para la selección de mutantes de *P. chrysogenum* con mayor capacidad de producción de penicilina (Luengo y col., 1977).

d) Selección de mutantes resistentes al ácido fenilacético. Este ácido es un conocido precursor en la biosíntesis de penicilina G, pero en concentraciones elevadas se convierte en un inhibidor del crecimiento fúngico. Podría pensarse que aquellas cepas capaces de resistir concentraciones más elevadas de dicho ácido serían capaces de producir más penicilina G (Barrios-González y col., 1993).

e) Selección de mutantes sensibles a la acción de antimetabolitos o inhibidores del crecimiento. Esta técnica se basa en un fenómeno detectado tras años de mutación y selección de determinadas cepas de *A. chrysogenum* que presentaban una producción incrementada de cefalosporina C. Se comprobó que estas cepas eran normalmente más sensibles a ciertos inhibidores del crecimiento, como la acriflavina y la p-fluorofenilalanina, que las cepas originales (Chang y Elander, 1979). Se han descrito incluso otros ejemplos: Nuesch y col. describieron en 1976 la existencia de una cepa de *A. chrysogenum* sensible a selenometionina que presentaba una elevada producción de cefalosporina C (debido a una capacidad incrementada de transporte de metionina) y Skatrud y col. describieron en 1989 una cepa de *A. chrysogenum* superproductora de cefalosporina C que presentaba una mayor sensibilidad a higromicina.

f) Selección de mutantes resistentes a iones metálicos pesados. Este método se basa en que algunos metales pesados, como el Hg^{2+} , el Cu^{2+} y algunos iones organometálicos relacionados, se acomplejan con antibióticos β -lactámicos (Chang y Elander, 1979). Podría pensarse que alguno de los mutantes resistentes a concentraciones elevadas de dichos iones metálicos podría adquirir esta capacidad al producirse un aumento en la

producción de antibióticos que detoxificaran los iones. También se han descrito ejemplos de este tipo de selección: Godfrey describió en 1973 la obtención de mutantes de *Streptomyces lipmanii* resistentes a acetato fenilmercúrico y con capacidad mejorada de biosíntesis de cefamicina y Chang y Elander describieron en 1979 una mayor frecuencia de aislamiento de mutantes de *A. chrysogenum* superproductores de cefalosporina cuando se recurría a la selección por resistencia a acetato fenilmercúrico, Cu^{2+} , cromato, Mn^{2+} y Hg^{2+} que cuando se realizaba selección al azar.

g) Selección de auxótrofos seguida de reversión. En esta estrategia se pretende bloquear parte de una ruta biosintética ramificada para canalizar el flujo metabólico hacia la parte remanente. Este método se ha utilizado con éxito para aumentar la producción de cefamicina por *Streptomyces lipmanii* (Godfrey, 1973), de cefalosporina en *A. chrysogenum* (Treichler y col., 1979), de clorotetraciclina por *Streptomyces viridifaciens* (Dulaney y Dulaney, 1967), de penicilina en *P. chrysogenum* (Casqueiro, comunicación personal) o para obtener mutantes de *Streptomyces kasugaensis* superproductores de kasugamicina (Ichikawa y col., 1971).

h) Aislamiento de segregantes espontáneos o inducidos. Como resultado de los repetidos tratamientos mutagénicos, los microorganismos industriales han acumulado un gran número de aberraciones cromosómicas, llegando a encontrarse en las cepas de *P. chrysogenum* AS-P-78 y P2 más de cinco copias repetidas en tandem de una región que contiene los tres genes biosintéticos de penicilina (Fierro y col., 1995) y presentan un alto grado de inestabilidad cromosómica, como ocurre en otras cepas industriales (Künkel y col., 1992).

Puede pensarse que el aislamiento de sectores de colonias con diferente morfología, color, capacidad de esporulación o velocidad de crecimiento, ya sean obtenidos de forma espontánea o tras la inducción mediante el tratamiento con p-fluorofenilalanina o acriflavina, podría ser una forma eficaz de eliminar la inestabilidad

cromosómica de las cepas fúngicas utilizadas industrialmente.

i) Aislamiento de presuntas cepas poliploides.

La selección de cepas poliploides tiene por objeto incrementar la dosis génica, y por lo tanto el número de genes dedicados (entre otras funciones) a la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos. Se han descrito varios agentes inductores de poliploidía: colchicina, acenafteno o alcanfor, entre otros, y métodos de selección de cepas diploides basados en la mayor sensibilidad a p-fluorofenilalanina (Roper, 1966), nistatina (Imshenetskii y Kondrateva, 1977) o benomilo (Upshall y col., 1977).

De cualquier forma, e independientemente del procedimiento utilizado en la selección, hay que tener en cuenta que la correlación entre la capacidad de producción de antibiótico en placa, matraz y tanque de fermentación puede ser muy baja. En un estudio realizado por Ball y McGonagle en 1978 se demostró que solamente el 10% de las cepas de *P. chrysogenum* seleccionadas por su mejor producción en placa mostraron dicha capacidad en matraz. Por otro lado, hay que tener en cuenta que los mutantes seleccionados poseen un genotipo nuevo y que normalmente requerirán de la reoptimización de las condiciones del proceso de fermentación con la finalidad de conseguir su máximo rendimiento. Para ello se emplean las llamadas “plantas piloto”, una aproximación a pequeña escala de las condiciones utilizadas en el proceso de producción industrial.

1.3. Enzimas y genes que intervienen en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos.

Tanto las penicilinas como las cefalosporinas son miembros del grupo de los antibióticos de tipo β -lactámico y contienen modificaciones estructurales de los antibióticos de tipo peptídico, con los que se podrían relacionar (Aharonowitz y col., 1992;

Martín y Gutiérrez, 1992). Todos estos antibióticos (con excepción de las monobactamas) contienen un anillo β -lactámico unido a un segundo anillo de cinco ó seis miembros. La presencia de un átomo de azufre en este segundo anillo proporciona características diferenciales a penicilinas y cefalosporinas con respecto a las otras clases de antibióticos β -lactámicos.

La biosíntesis de antibióticos β -lactámicos es un proceso que requiere de una serie de precursores (aminoácidos o compuestos que van a dar lugar a la cadena lateral de estos antibióticos, por ejemplo) y cofactores. El estudio de las “rutas accesorias” o “rutas adicionales” de los mecanismos básicos de biosíntesis de β -lactamas es muy importante en la actualidad, encuadrándose dentro del objetivo de la mejora global en la producción de tales antibióticos. Sin embargo, a lo largo de esta Introducción se va a hacer referencia únicamente a los pasos directamente implicados en la biosíntesis (y se llamará, desde ahora, *genes estructurales* de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos a aquellos genes que codifiquen para proteínas directamente implicadas en la ruta biosintética. Los genes cuyos productos, aun estando relacionados con la biosíntesis de tales antibióticos, no presenten una implicación directa en la ruta no recibirán dicho calificativo).

1.3.1. Ruta de biosíntesis de las penicilinas.

La mayoría de los pasos implicados en la biosíntesis de las penicilinas y cefalosporinas han sido caracterizados a nivel bioquímico (se encuentran descritos en las revisiones realizadas por Queener y Neuss, 1982; Demain, 1983; Martín y Aharonowitz, 1983; Baldwin y Abraham, 1988; Martín y Liras, 1989a y 1989b; Luengo y Peñalva, 1993), si bien los mecanismos relacionados con las reacciones llevadas a cabo por las diferentes enzimas se mantienen dentro del campo de las

hipótesis. Y ello a pesar de su gran interés desde los puntos de vista médico e industrial.

Los primeros estudios realizados acerca de la biosíntesis de β -lactamas fúngicas en los que se utilizaron extractos acelulares condujeron a la observación de un tripéptido que contiene cisteína (el δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina o ACV) como el precursor directo menos evolucionado en la biosíntesis de penicilina por parte de *P. chrysogenum* (Arnstein y Morris, 1960) y por bacterias productoras de β -lactamas (Jensen y col., 1982). El tripéptido ACV es posteriormente ciclado para formar isopenicilina N (primer intermediario de la ruta con actividad antibiótica y que posee una cadena lateral de α -aminoadipilo unida al anillo β -lactámico) en una reacción que fue descrita por primera vez en *P. chrysogenum* (Fawcett y col., 1976). En este microorganismo, y también en *A. nidulans*, la isopenicilina N es convertida en penicilina tras el intercambio de la cadena lateral de α -aminoadipilo por otra de fenilacetilo (penicilina G) o fenoxiacetilo (penicilina V). Esta reacción de transacilación es característica de los microorganismos productores de penicilina, no teniendo lugar en aquellos otros que producen cefalosporinas.

1.3.2. Ruta de biosíntesis de las cefalosporinas y cefamicinas.

Las rutas biosintéticas de las cefalosporinas y cefamicinas son, en sus primeros pasos, idénticas a la de la penicilina. De hecho, el tripéptido ACV y la isopenicilina N son intermediarios en la biosíntesis de estos tres grupos de antibióticos β -lactámicos y en los tres casos la isopenicilina N es el resultado de la ciclación del tripéptido. A partir de este punto las rutas divergen y en los microorganismos productores de cefalosporinas y cefamicinas la isopenicilina N es convertida en penicilina N por la acción de la isopenicilina N epimerasa (no existe en los microorganismos que producen penicilina). Esta enzima isomeriza la cadena lateral de L- α -

aminoadipilo a su configuración D (Jayatilake y col., 1981). La penicilina N es transformada en desacetoxicefalosporina C por medio de la desacetoxicefalosporina C sintasa, que convierte el anillo tiazolidínico de cinco miembros característico de las penicilinas en un anillo dihidrotiazínico de seis miembros (típico de cefalosporinas y cefamicinas). La desacetoxicefalosporina C es posteriormente hidroxilada, formándose desacetilcefalosporina C por la intervención de la desacetoxicefalosporina C hidroxilasa, una dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato. En *A. chrysogenum* las actividades de expansión del anillo y posterior hidroxilación se detectan en una única proteína (Scheidegger y col., 1984; Baldwin y col., 1987; Dotzla y Yeh, 1987), mientras que en los microorganismos productores de cefamicina se localizan en enzimas separadas (Jensen y col., 1985; Cortés y col., 1987). El último paso de la ruta de biosíntesis de cefalosporina es la acetilación de la desacetilcefalosporina C a cefalosporina C, llevada a cabo por la desacetilcefalosporina C acetiltransferasa (Fujisawa y col., 1973 y 1975; Gutiérrez y col., 1992).

En el caso de los actinomicetos productores de cefamicina, la desacetilcefalosporina C es modificada con la introducción de un grupo metoxilo en la posición C-7 y de un grupo carbamoilo en la posición C-3' (Jensen, 1986; Martín y Liras, 1989a; Martín y col., 1991; Xiao y col., 1991).

En resumen, tanto procariotas como eucariotas sintetizan antibióticos β -lactámicos siguiendo una ruta inicial común (Fig. 1.2). A continuación haremos un pequeño análisis de cada uno de los pasos que se siguen en la formación de las penicilinas.

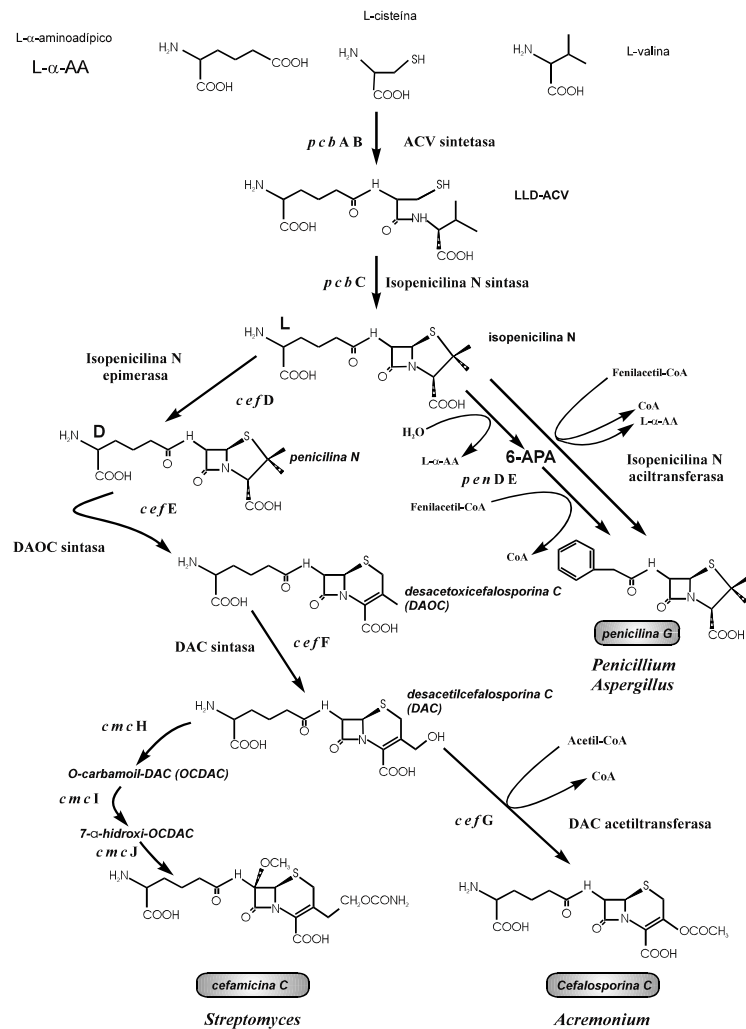


Figura 1.2. Ruta de biosíntesis de penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas.

1.3.3. Pasos implicados en la biosíntesis de las penicilinas.

1.3.3.1. Biosíntesis del tripéptido δ (L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina.

El tripéptido ACV constituye el primero de los pasos comunes en la biosíntesis de penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas. Este compuesto, cuya formación aún no se conoce en todos sus detalles, ha sido aislado a partir de caldos de cultivo de *P. chrysogenum*, *A. chrysogenum*, *Streptomyces clavuligerus*, *Nocardia lactamdurans* y también de *Paecilomyces persicinus*, un microorganismo productor de cefalosporinas (Enriquez y Pisano, 1979).

La formación del tripéptido ACV se ve claramente estimulada cuando se inhibe la síntesis proteica con cicloheximida o anisomicina (López-Nieto y col., 1985), lo que confirma la hipótesis de que el péptido se forma por condensación no ribosómica de los tres aminoácidos que lo componen (Fawcett y Abraham, 1975). Parece ser que la condensación comienza con la activación del grupo δ -carboxilo del ácido α -aminoadípico, seguida de la reacción con el grupo α -amino de la cisteína (o una forma activada de ésta) para constituir el dipéptido L- α -aminoadipil-L-cisteína (o una forma activada de éste). Esta teoría, propuesta por Queener y Neuss en 1982, podría explicar la existencia del dipéptido δ (L- α -aminoadipil)-L-cisteína (AC) aislado a partir de caldos de cultivo de *A. chrysogenum* (Ramos y col., 1985). El dipéptido LL-AC es convertido en el tripéptido LLD-ACV al reaccionar el grupo α -amino de la valina con una forma activada del dipéptido (la valina es epimerizada a su configuración D mientras está unida a la enzima responsable de la condensación). Existen estudios que demuestran la aparición de un intermediario enzima-valina durante la incorporación de la L-valina al tripéptido ACV (Delderfield y col., 1981).

El orden en que se incorporan los tres aminoácidos fue examinado en primer lugar por Fawcett y col., en 1976: este grupo de investigación observó que extractos acelulares de *P. chrysogenum* eran capaces de convertir una mezcla de δ (L- α -aminoadipil)-L-cisteína y valina en ACV radiactivo, en presencia de ATP. Los mismos extractos no eran capaces de formar el tripéptido a partir de ácido α -aminoadípico marcado con ^{14}C y de cisteinil-valina. Adlington y col. demostraron en 1983 un comportamiento similar cuando se utilizaban extractos acelulares de *A. chrysogenum*. Posteriormente se describió que la velocidad de formación del tripéptido ACV era mucho mayor cuando se añadían los tres precursores por separado que cuando se utilizaba LL-AC y L-valina, lo que sugería que era una única enzima la que llevaba a cabo la síntesis de ACV, que esta enzima requería la unión de los tres aminoácidos para su máxima actividad y que el intermediario LL-AC permanecía unido a la enzima durante este proceso (Banko y col., 1987). La sustitución de la L-valina por la D-valina no permitía la formación del tripéptido.

La enzima encargada de la formación del tripéptido ACV se denomina **δ (L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa** (ACV sintetasa, ACVS o tripéptido sintetasa), requiere para su actividad ATP e iones Mg^{2+} o Mn^{2+} y agrupa un buen número de actividades distintas (Banko y col., 1986 y 1987). Entre ellas cabe destacar el reconocimiento de los sustratos, la activación de los mismos por adenilación, la condensación de los precursores activados, la epimerización de la L-valina a su configuración D y la liberación del tripéptido, siendo el tamaño de la enzima lo suficientemente grande como para englobar todas las actividades descritas. En *A. nidulans*, primer microorganismo del que se consiguió purificar la enzima, se propuso una masa molecular de 230 kDa tras el análisis en electroforesis desnaturante (van Liempt y col., 1989). Posteriormente se demostró que el cálculo era erróneo y, mediante el empleo de otras técnicas, se estimó el tamaño molecular en unos 420-460 kDa, valor mucho más acorde con la capacidad

codificante del gen *pcbAB* (Díez y col., 1990; MacCabe y col., 1991). En *A. chrysogenum* esta proteína ha sido purificada hasta su homogeneidad electroforética y ha demostrado ser un dímero, con una masa molecular por subunidad de 360 kDa (Baldwin y col., 1990).

La ACV sintetasa posee tres dominios distintos, con secuencias muy conservadas entre sí, separados por regiones de baja similitud. Estos dominios conservados, de más de 500 aminoácidos, parecen corresponder a los centros de activación de cada uno de los aminoácidos precursores del tripéptido (MacCabe y col., 1991), sugiriéndose un tipo de organización similar al que aparece en otras enzimas formadoras de adenilatos (Davis y col., 1990) y en otras multienzimas formadoras de péptidos (Kleinkauf y von Döhren, 1990). Al igual que se ha observado en las poliquétido sintetetas, en la ACV sintetasa se han detectado regiones similares a la secuencia definida como consenso para la unión de fosfopanteteína. Por ello se postula la existencia de “brazos” de fosfopanteteína que estarían encargados del mantenimiento de la unión de los intermediarios a la enzima y de la translocación de éstos a los distintos dominios (MacCabe y col., 1991). También se ha detectado en esta enzima la existencia de una secuencia consenso típica de tioesterasas, secuencia que en la ACV sintetasa podría ser responsable de la hidrólisis de la unión enzima-producto y de la posterior liberación del tripéptido. La similitud de este dominio con secuencias presentes en diferentes sintetetas de ácidos grasos y la aparición, en los dos tipos de proteína, de lugares de unión de fosfopanteteína sugieren una posible evolución a partir de un ancestro común para los genes que codifican las sintetetas de polipéptidos (como la ACV sintetasa) y las poliquétido sintetetas o las sintetetas de ácidos grasos (Gutiérrez y col., 1991a).

En la presente memoria usaremos la nomenclatura que precede a los genes comunes de penicilina y cefalosporina/cefamicina con *pcb*, a los específicos de penicilina con *pen* y a los específicos

de cefalosporina con *cef*, por la facilidad que supone para la ubicación correcta de los genes a lo largo de la ruta (Martín y col., 1991).

El gen *pcbAB* de *P. chrysogenum* codifica para la ACV sintetasa y fue clonado por complementación de dos mutantes de este microorganismo defectivos en la actividad ACV sintetásica (Díez y col., 1990). Los estudios transcripcionales realizados con este gen llevaron a la observación de un gran transcrito, de aproximadamente 11'5 kpb y se determinó la secuencia de la región codificante (11.376 pares de bases, que codificarían para una proteína de 3.792 aminoácidos y una masa molecular de 425.971 Da). Los resultados de Smith y col. (1990a y 1990b), en cuanto a las características del gen *pcbAB* en una cepa diferente de *P. chrysogenum*, fueron similares a los obtenidos en nuestro laboratorio.

En la proteína deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *pcbAB* se encontraron tres dominios con una amplia similitud entre sí y con un gran parecido con péptido sintetetas de *Bacillus brevis* (como la gramicidina sintetasa I y la tirocidina sintetasa I) y con otras enzimas en las que se dan procesos de activación con requerimiento de ATP (Turgay y col., 1992; Aharonowitz y col., 1993). El gen, a pesar de su gran tamaño, no poseía intrones (esta característica es común a todos los genes *pcbAB* conocidos hasta el momento).

Al mismo tiempo, se determinó que el gen se encontraba, como se puede apreciar en la figura 1.3, formando parte de un grupo (“cluster”) en el que se incluían también los otros dos genes estructurales implicados en la biosíntesis de penicilina (Barredo y col., 1989a; Díez y col., 1989 y 1990; Smith y col., 1990a y 1990b).

Se han clonado los genes *pcbAB* de *Lysobacter lactamgenus* (Kimura, H., descrito en la Patente Japonesa 2-291274, 1989), *Flavobacterium sp.* 12154 (Smith y col., 1990a) *A. chrysogenum* (Gutiérrez y col., 1991a), *A. nidulans* (MacCabe y col., 1991) y *N. lactamdurans* (Coque y col., 1991)

y se ha descrito parcialmente la secuencia de ADN del de *S. clavuligerus* (Doran y col., 1991),

encontrándose en todos ellos una disposición agrupada de los genes biosintéticos. Algunas de estas organizaciones se muestran en la figura 1.3.

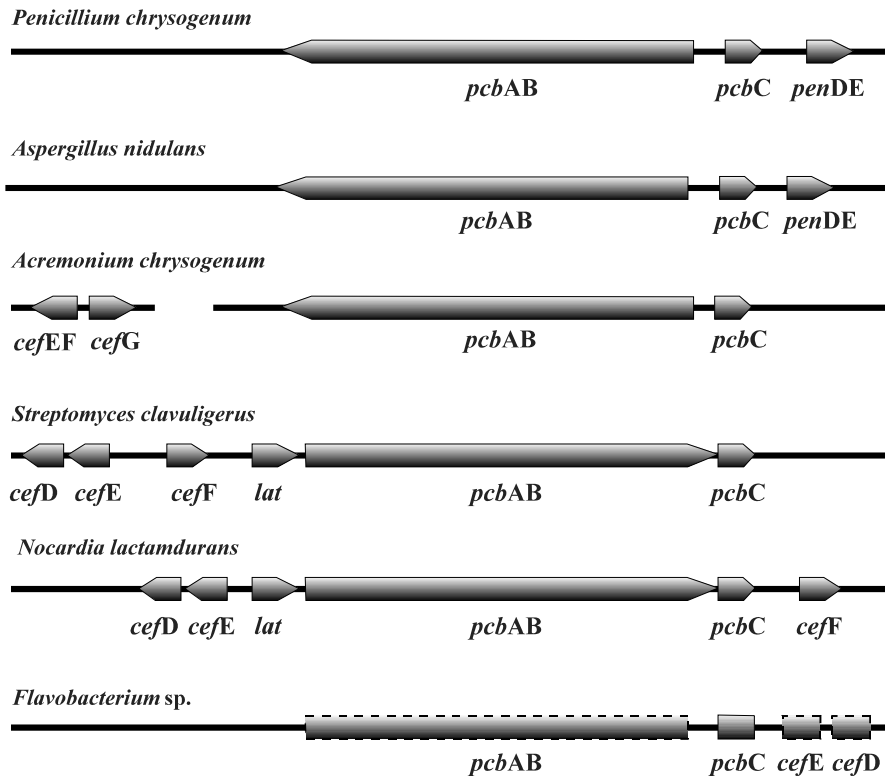


Figura 1.3. Agrupamientos de genes implicados en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos en varios organismos fúngicos y en procariontes. Las líneas de trazos indican una caracterización parcial de los genes.

1.3.3.2. Ciclación del tripéptido ACV y formación de la isopenicilina N.

La enzima que cataliza este paso se denomina **isopenicilina N sintasa (IPNS)**. Fue detectada por primera vez en *A. chrysogenum* (Konomi y col., 1979) y ha sido purificada a partir de extractos de *A. chrysogenum* (Hollander y col., 1984; Pang y col., 1984), *P. chrysogenum* (Ramos y col., 1985; Carr y col., 1986), *S. clavuligerus* (Jensen y col.,

1986), *N. lactamdurans* (Castro y col., 1988) y *Flavobacterium sp.* (Palissa y col., 1989). Mahro y Demain (1987) y Romero y col. (1988) describieron la existencia de mutantes de *S. clavuligerus* que poseían una actividad isopenicilina N sintásica disminuida o carecían completamente de ella y que, respectivamente, presentaban un bajo nivel en la producción o no eran productores de cefamicina. En *A. chrysogenum* se ha descrito la existencia de un mutante (denominado N2) que acumula el

tripéptido ACV y posee una isopenicilina N sintasa inactiva, siendo incapaz de producir cefalosporina (Shirafuji y col., 1979; Ramos y col., 1986).

La enzima de *P. chrysogenum* presenta una masa molecular, estimada por cromatografía de filtración en gel y por electroforesis en gel de poliacrilamida, de aproximadamente 39.000 Da, similar a la descrita para las enzimas de los demás microorganismos analizados (a excepción del caso de *N. lactamdurans* donde se detectó una isopenicilina N sintasa de 26.5 kDa). Requiere ditioneitol (DTT) para su actividad y es estimulada por ascorbato e iones Fe^{2+} (cofactores habituales de las oxigenasas). La reacción enzimática requiere oxígeno y es estimulada por la concentración de oxígeno disuelta en la mezcla de reacción (Ramos y col., 1985). De hecho, la ciclación tiene lugar mediante la eliminación, mediada por oxígeno, de cuatro átomos de hidrógeno de la molécula del tripéptido.

El gen que codifica para la síntesis de la isopenicilina N sintasa se denomina *pcbC*. El gen *pcbC* de *A. chrysogenum* fue el primero de los genes biosintéticos de antibióticos β -lactámicos estudiado a nivel molecular (Samson y col., 1985). Desde entonces, el gen *pcbC* ha sido clonado a partir de otros muchos microorganismos productores de antibióticos β -lactámicos: como *P. chrysogenum* (Carr y col., 1986; Barredo y col., 1989b), *A. nidulans* (Ramón y col., 1987), *S. clavuligerus* (Leskiw y col., 1988), *S. jumojinensis* (Shiffman y col., 1988), *S. lipmanii* (Weigel y col., 1988), *Flavobacterium* sp. (Shiffman y col., 1990), *N. lactamdurans* (Coque y col., 1991) y *S. griseus* (García-Domínguez y col., 1991). Los genes que codifican para la isopenicilina N sintasa en procariontes son muy parecidos entre ellos y también lo son a los genes fúngicos (el porcentaje de similitud a nivel de nucleótidos oscila entre el 62 y el 80% y a nivel de aminoácidos entre el 54 y el 79%). Esto ha servido de base para la construcción de un árbol filogenético basado en la secuencia de nucleótidos del gen *pcbC* de distintos orígenes (Fig. 1.4)

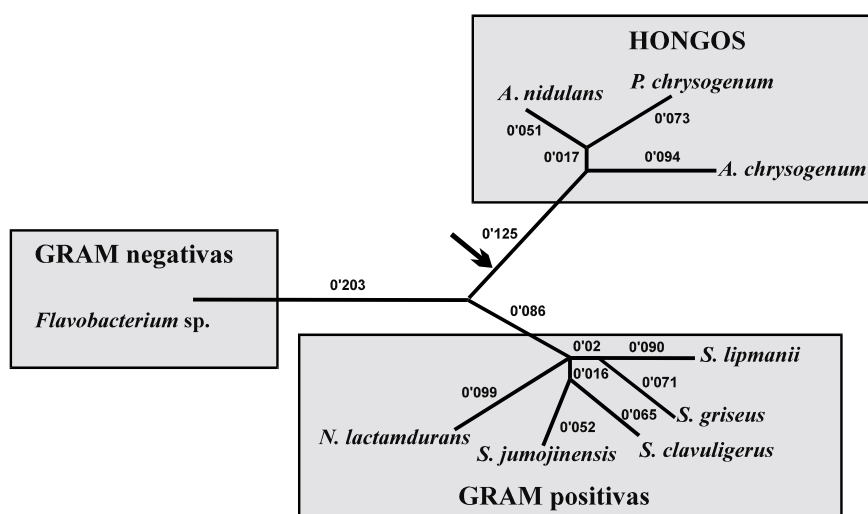


Figura 1.4. Árbol filogenético elaborado a partir del análisis de la secuencia de nucleótidos de nueve genes *pcbC* de distinto origen. La longitud de cada rama es proporcional al número de sustituciones no sinónimas por sitio. La flecha indica la posición de la raíz obtenida al dividir en partes iguales las ramificaciones más largas del árbol (modificado de Landan y col., 1990)

El gen *pcbC* de *P. chrysogenum* carece de intrones, se transcribe en un ARNm de 1'1 kpb y codifica para un polipéptido de 37.900 Da de masa molecular (lo que se aproxima bastante al tamaño de la proteína purificada). Se encuentra localizado aguas arriba del gen *pcbAB*, encontrándose sus respectivas regiones promotoras en una región intergénica de 1.160 pares de bases de longitud (876 pares de bases en *A. nidulans*). Esta misma orientación es la que aparece en los demás hongos filamentosos productores de β -lactamas, pero es diferente de la que se encuentra en los productores de tipo bacteriano (Fig. 1.3), donde el gen *pcbC* se localiza aguas abajo del gen *pcbAB* (Coque y col., 1991).

Chapman y col. (1987) y Ramsden y col. (1989) fueron capaces de complementar la mutación de la cepa N2 de *A. chrysogenum*, y los primeros identificaron la mutación existente en esta cepa como una sustitución puntual de una citidina por una timidina en la posición 854 del gen *pcbC* (que hace cambiar la prolina de la posición 285 de la enzima por una leucina).

La mutación puntual del gen *pcbC* del mutante N2 no explica por sí misma el hecho de que en este mutante no se hayan detectado tampoco, o sean muy inferiores a sus valores normales, las actividades enzimáticas isopenicilina N epimerásica y desacetoxicefalosporina C sintetásica (las dos primeras actividades de la ruta específica de cefalosporinas y cefamicinas) (Ramos y col., 1986). Queda por resolver, por lo tanto, una posible implicación de la isopenicilina N, la propia IPN sintasa, el gen *pcbC* o sus regiones flanqueantes en la regulación de los genes posteriores de la ruta de biosíntesis.

1.3.3.3. Conversión de la isopenicilina N en penicilina G.

Se trata del único paso específico en aquellos hongos con capacidad para originar penicilinas de carácter hidrofóbico, como es el caso de *P. chrysogenum* y *A. nidulans*. Estos microorganismos

son capaces de sintetizar penicilinas con cadenas laterales procedentes de una gran variedad de ácidos carboxílicos presentes en el interior de la célula o aportados de forma exógena. La biosíntesis de las penicilinas ocurre por la sustitución de la cadena lateral de α -aminoadipilo de la isopenicilina N por un radical fenilacetilo (o fenoxiacetilo, en el caso de la penicilina V) procedente del fenilacetil-CoA. Esta reacción es llevada a cabo por la **acil-CoA:isopenicilina N aciltransferasa** (también denominada IPN aciltransferasa, transacilasa e IAT, en forma abreviada). La ausencia de isopenicilina N aciltransferasa, debida a la carencia del correspondiente gen (Gutiérrez y col., 1991b), en microorganismos productores de penicilinas hidrofílicas y cefalosporinas (Luengo y col., 1986; Alvarez y col., 1987) y en actinomicetos es la responsable de la incapacidad de estos microorganismos para producir penicilina G o cualquier otra penicilina con cadena lateral hidrofóbica.

La naturaleza del último paso enzimático de la vía biosintética de penicilina ha sido objeto de un amplio estudio (ver revisiones de Queener y Neuss, 1982; Demain, 1983; Martín y Liras, 1989a), aunque aún hoy sigue siendo conflictiva en ciertos puntos. Queener y Neuss propusieron en 1982 un modelo para la reacción que seguiría dos pasos y requeriría dos actividades enzimáticas:

❶ Una de ellas sería responsable de la formación de 6-APA a partir de la isopenicilina N, liberándose ácido α -aminoadípico (actividad isopenicilina N amidohidrolásica).

❷ La otra sería capaz de transferir la cadena lateral desde un precursor en forma activada (actividad acil-CoA:6-APA aciltransferásica).

La presencia de estas dos actividades fue demostrada posteriormente (Alvarez y col., 1993), encontrándose asociadas en el mismo polipéptido junto con otras tres actividades:

❸ Actividad acil CoA:isopenicilina N aciltransferásica (realiza la operación de sustitución

de la cadena lateral sin liberar 6-APA como intermediario. Esta actividad es mucho mayor en *P. chrysogenum* que la actividad amidohidrolásica lo que sugiere que en la reacción normalmente no hay liberación de 6-APA y que éste es directamente convertido en penicilina).

④ Actividad penicilina amidásica (que convierte la penicilina en 6-APA y probablemente sea la actividad reversa de la acil-CoA:6-APA aciltransferásica).

⑤ Actividad penicilina transacilásica (capaz de intercambiar cadenas laterales entre dos moléculas de penicilinas hidrofóbicas o entre una molécula de penicilina y 6-APA).

Otros autores han añadido a las anteriormente descritas la presencia de una actividad fenilacetil-CoA hidrolásica, que permite la utilización del ácido fenilacético en la construcción de la cadena lateral (Spencer y Maung, 1970; Martín-Villacorta y col., 1991a) y que puede estar relacionada con la actividad amidásica.

La isopenicilina N aciltransferasa de *P. chrysogenum* ha sido purificada hasta su homogeneidad electroforética (Luengo y col., 1986; Alvarez y col., 1987; Martín-Villacorta y col., 1989). La enzima pura presenta un pH óptimo de entre 8 y 8'2 y una temperatura óptima de 25°C (acorde con la temperatura óptima en la producción de penicilina). Muestra una mayor especificidad de sustrato (K_m aparente de 9'3 μM) frente a 6-APA que frente a isopenicilina N (K_m aparente de 21 μM). La K_m aparente para el fenilacetil-CoA es de 6 μM , similar a la del fenoxiacetil-CoA. Los ácidos fenilacético y fenoxiacético libres no son usados como sustratos por la enzima. La penicilina N es pobremente usada como sustrato y la penicilina G, el ácido 7-aminocefalosporánico, la cefalosporina C y la isocefalosporina C (con una cadena lateral de L- α -aminoadipilo) no son sustratos para la enzima. En la mezcla de reacción de la enzima, y también en las soluciones de conservación, se requiere la

existencia de compuestos reductores, como el ditiotritol.

La preparación purificada mostraba, tras su análisis electroforético, tres bandas proteicas de 40, 29 y 11 kDa de masa molecular. La proteína mayor (40 kDa) era realmente un heterodímero formado por las subunidades de 11 y 29 kDa (Whiteman y col., 1990). La separación de las dos subunidades por medio de la modificación de la secuencia de nucleótidos del gen llevaba consigo la pérdida casi completa de la actividad acil CoA:isopenicilina N aciltransferásica y la mezcla de las subunidades estimulaba unas 15 veces la actividad residual, lo que sugería que la forma activa era el heterodímero (29 + 11 kDa) o que una de las subunidades aportaba información necesaria para que la otra fuese activa (Aplin y col., 1993; Tobin y col., 1993). Estas subunidades de 11 y 29 kDa se formarían mediante el procesamiento de la proteína precursora de 40 kDa codificada por el gen *penDE* (Barredo y col., 1989c; Tobin y col., 1993), correspondiendo la subunidad pequeña al extremo amino terminal de dicha proteína precursora. Esta disposición es similar a la que aparece en el caso de las acilasas de *E. coli* (Bruns y col., 1985), *Proteus rettgeri* (Daumy y col., 1986) y *Pseudomonas sp.* (Matsuda y Komatsu, 1985; Matsuda y col., 1987a y 1987b), todas ellas formadas por dos subunidades de distinto tamaño derivadas de un precursor común que es codificado por una única región de lectura abierta.

Se desconoce la naturaleza exacta de los centros catalíticos que pudieran existir en cada una de las subunidades, aunque existe un modelo propuesto (Martín y col., 1991) en el que se supone la existencia de tres sitios de unión dentro de la enzima:

① Un sitio de unión de grupos acilo, que permitiría la interacción con las formas activadas de fenilacetilo, fenoxiacetilo y otros grupos acilo susceptibles de ser aprovechados en la formación de penicilinas.

② Un sitio de unión para la isopenicilina N y un sitio de unión para el 6-APA (podría ser el mismo).

③ Un grupo sulfidrilo de la enzima que sería el encargado de recibir los grupos acilo desde sus precursores activados, tras la hidrólisis del enlace tioéster. Entre la isopenicilina N aciltransferasa de *A. nidulans* y la de *P. chrysogenum* existen cuatro restos de cisteína conservados (Montenegro y col., 1990) que podrían ser candidatos a este papel. El requerimiento de estos grupos sulfidrilo podría explicar la necesidad de la presencia de agentes reductores en la mezcla de reacción y en las soluciones de conservación de la enzima.

Tobin y col. comprobaron en 1993, mediante técnicas de transcripción y traducción “in vitro” de la proteína de *P. chrysogenum* expresada en *E. coli*, que el procesamiento de la enzima es probablemente autocatalítico. El procesamiento del polipéptido precursor se da en la enzima de *P. chrysogenum* entre el aminoácido glicina situado en la posición 102 de la enzima y el aminoácido cisteína localizado en la posición 103, dentro de una secuencia ácido aspártico-glicina-cisteína similar al enlace amido que es roto por la enzima activa durante la transformación de la isopenicilina N en 6-APA (Tobin y col., 1990), lo que podría dar una pista sobre el posible mecanismo de autoprosesamiento. Con el fin de delimitar la importancia relativa de cada uno de esos aminoácidos, este mismo grupo de investigación realizó una serie de experimentos basados en la sustitución de varios de los aminoácidos situados en el sitio de procesamiento de la isopenicilina N aciltransferasa (Tobin y col., 1995). Las sustituciones en la cisteína de la posición 103 (a serina, alanina o triptófano) conducen a la aparición de proteínas no procesadas e inactivas, las sustituciones en el ácido aspártico o la glicina de las posiciones 101 y 102, respectivamente (cambios de ácido aspártico a glicina, glicina a alanina, glicina a valina, glicina a metionina y ácido aspártico-glicina a glicina-fenilalanina), no alteraban el procesamiento normal

de la enzima ni su actividad y las sustituciones producidas en la treonina de la posición 105 provocaban en algunos casos la inhibición del procesamiento (cambio de treonina a valina y de treonina a arginina, aunque este último dato pertenece a un trabajo de 1993), mientras que en otros (cambios de treonina a serina y de treonina a alanina) no impedían el procesamiento ni la actividad enzimática.

En 1994 se abordó el estudio de la importancia relativa de las serinas localizadas en las posiciones 227, 230 y 309 de la proteína de *P. chrysogenum* y su incidencia sobre el procesamiento de la proteína precursora y sobre la actividad enzimática (Tobin y col., 1994). La sustitución de la serina localizada en la posición 230 (siendo cambiada por una cisteína o por una alanina) no suponía la alteración de ninguna característica de la enzima normal. El cambio en la serina de la posición 227 por una cisteína tampoco provocaba ninguna alteración, mientras que su intercambio por una alanina originaba una proteína no procesada carente de actividad (lo que sugería que se requiere una cadena lateral nucleofílica en el aminoácido que ocupa esta posición para que se desarrollasen correctamente tanto procesamiento como actividad enzimática). Por último, la sustitución de la serina de la posición 309 por una cisteína no produjo cambios apreciables y su cambio por una alanina provocaba la aparición de una proteína procesada, pero carente de actividad enzimática (los autores sugirieron que este aminoácido estaba involucrado en el proceso de acilación del sustrato).

Otro aspecto curioso de esta enzima es su peculiar localización subcelular. Mientras que la ACV sintetasa de *P. chrysogenum* se encuentra asociada con membranas de pequeños orgánulos (Müller y col., 1991) o, más específicamente, con vesículas del aparato de Golgi (Kurylowick y col., 1987) y la isopenicilina N sintasa se encuentra probablemente en forma soluble en el citoplasma (Müller y col., 1991), la isopenicilina N aciltransferasa ha sido localizada por inmunodetección con microscopía electrónica en

orgánulos de 200-800 nm de diámetro rodeados de una membrana sencilla, de morfología similar a la de los microcuerpos que aparecen en levaduras y hongos (Müller y col., 1991 y 1992). La disposición de la enzima dentro del orgánulo era aleatoria.

En los microcuerpos normalmente se localizan enzimas que se hallan involucradas en una gran variedad de reacciones de tipo oxidativo, incluida la β -oxidación de ácidos grasos. Para otros autores tales orgánulos no serían realmente microcuerpos, sino más bien vesículas derivadas también del aparato de Golgi (Kurylowick y col., 1987).

El confinamiento de la isopenicilina N aciltransferasa dentro de vesículas, independientemente del origen de éstas, fue confirmado mediante experimentos de fraccionamiento celular (Müller y col., 1991), si bien en algunos casos la aciltransferasa también se encontró en forma soluble en el citoplasma (los autores sugieren que la enzima se encuentra soluble en su estado compartimentalizado, y que durante el proceso de fraccionamiento parte de esta enzima es liberada al sobrenadante debido a la rotura de los orgánulos que la contienen). Estos autores encontraron, además, una correlación positiva entre la capacidad de producción de penicilina y el número de estos orgánulos por célula cuando comparaban cepas de *P. chrysogenum* de diferente nivel de producción.

Sobre este aspecto incide, asimismo, la detección en el extremo carboxilo terminal de la proteína (Barredo y col., 1989c) de la secuencia de aminoácidos alanina-arginina-leucina, idéntica a una de las secuencias guía encargadas de la dirección hacia microcuerpos descritas por Gould y col. en 1989. La eliminación de esta secuencia por mutagénesis dirigida del gen *penDE* y su posterior transformación en *P. chrysogenum* (Müller y col., 1992) condujo a la aparición de un mutante en el que la enzima se expresaba, pero no se localizaba en los microcuerpos ni era activa. En este mismo trabajo se afirma que el mutante no productivo *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 *npe6* (Cantoral y

col., 1993) no expresa la isopenicilina N aciltransferasa, razón por la cual no se detectaría en los microcuerpos. Como veremos posteriormente en el apartado de Resultados y Discusión esta afirmación no es correcta.

El gen que codifica para la isopenicilina N aciltransferasa se denomina *penDE* (se supuso que este paso biosintético requeriría la presencia de dos enzimas: una con actividad amidohidrolásica y otra con actividad aciltransferásica y que cada una de las enzimas estaría codificada por un gen) y fue clonado en 1989 por Barredo y col. a partir de la cepa *P. chrysogenum* AS-P-78. El clonaje se consiguió tras la hibridación de una librería genómica de este microorganismo con una sonda nucleotídica basada en la secuencia amino terminal de la subunidad de 29 kDa de la enzima purificada (Alvarez y col., 1987). La confirmación de que este gen era el responsable de la aparición de la actividad enzimática IPN aciltransferásica se consiguió mediante la complementación de los mutantes *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 *npe6* y *npe8*, carentes de dicha actividad (Cantoral y col., 1993; Fernández y col., 1994). Tras la complementación, algunos de los transformantes obtenidos presentaban una mayor actividad 6-APA aciltransferásica, incluso más del doble, que el microorganismo parental de los mutantes (posiblemente debido a un aumento en el número de copias del gen).

El gen *penDE* se localiza en el cromosoma I en *P. chrysogenum* y en el II en *P. notatum* (Fierro y col., 1993), aguas abajo del gen *pcbC*. Se expresa en la misma dirección que este y existe una región de 1.483 pares de bases entre ambos (en ella estaría incluida la región promotora de la transcripción del gen *penDE*). El gen contiene tres intrones, más próximos al extremo 5' del gen, y una región

Discusión). Conserva también las serinas localizadas en las posiciones 227, 230 y 309 y, sin embargo, tiene una secuencia de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal distinta de la encontrada en *P. chrysogenum* y que presumiblemente sirve a la proteína para su localización correcta en microcuerpos (posee una secuencia alanina-asparragina-isoleucina en lugar de la ya descrita alanina-arginina-leucina). La similitud que presenta con el gen de *Penicillium* es del 75.7% a nivel de nucleótidos y del 81% a nivel de aminoácidos, siendo mucho menor la conservación existente entre las regiones intergénicas *pcbC-penDE* de los dos microorganismos (tan alto porcentaje de similitud apoya la hipótesis de Chen y col., 1984, en la que se afirma que *A. nidulans* y *P. chrysogenum* derivan de un ancestro común tomando como base el estudio sobre los ARN ribosómicos 5 S de los ascomicetos).

1.3.3.4. Aplicaciones de la isopenicilina N aciltransferasa.

La isopenicilina N aciltransferasa puede utilizarse para la obtención de un gran número de nuevas penicilinas. La enzima, como ya hemos visto, incorpora una cadena lateral (activada en forma de tioéster con la coenzima A, el glutatión u otro compuesto) al núcleo central de 6-APA.

❶ En función de su naturaleza, las cadenas laterales que se ha conseguido incorporar en nuevas moléculas se pueden adscribir a dos grupos distintos:

a) Precursores de la cadena lateral análogos al fenilacetil-CoA.

La enzima acepta como sustrato los derivados hidroxilados, metilados, metoxilados y aminados del ácido fenilacético, y también algunos derivados fluorados de dicho compuesto, para originar las correspondientes penicilinas (Alonso y col., 1988; Luengo, 1989; Martín-Villacorta y col., 1989).

La longitud del grupo acetilo debe ser conservada: así, la enzima no es capaz de aceptar

como sustratos el benzoil-CoA, el fenilpropionil-CoA o el fenilbutiril-CoA y la única modificación permitida a este respecto (que da origen a la aparición de la ya conocida penicilina V) es la inclusión de un átomo de oxígeno entre el anillo aromático y el resto acetilo (Martín-Villacorta y col., 1989 y 1991b; Martínez-Blanco y col., 1991).

Algunas sustituciones dentro de la cadena lineal del resto acetilo (como por ejemplo el intercambio de un átomo de hidrógeno por un grupo hidroxilo, metilo o etilo) permiten la síntesis de las correspondientes penicilinas, mientras que otras (como la introducción de grupos amino y nitro o de elementos halógenos) no son toleradas por la enzima (Martínez-Blanco y col., 1991).

Cuando lo que se cambia es el anillo bencénico (por otros anillos, como el tiofénico, furílico o piridílico) sin modificar el grupo acetilo, la enzima también es capaz de utilizar estos compuestos para incorporarlos como cadenas laterales de nuevas moléculas de antibiótico. Sin embargo, si un hidrógeno del anillo bencénico es sustituido por Cl ó Br la actividad de la enzima se ve fuertemente inhibida (Martínez-Blanco y col., 1991).

La IPN aciltransferasa también puede aceptar como sustrato, de forma excepcional, algunos precursores que presentan modificaciones tanto del resto acetilo como del anillo bencénico. Por ejemplo, es capaz de incorporar a la molécula de 6-APA el 3-tiofeno-malonil-CoA para formar ticarcilina (Martínez-Blanco y col., 1991). Hasta entonces esta molécula sólo había podido ser obtenida por medio de la síntesis química.

b) Moléculas alifáticas como precursores de la cadena lateral.

La isopenicilina N aciltransferasa reconoce como sustrato diferentes cadenas lineales, tanto saturadas como insaturadas, con la única condición de que su longitud esté comprendida entre los seis y los ocho átomos de carbono. Por encima o por debajo de estos límites (nonanoil-CoA y valeril-CoA,

respectivamente), estas moléculas son muy pobremente incorporadas (o no lo son en absoluto) al núcleo de 6-APA. La presencia de un doble enlace entre el carbono de la posición 2 y el de la posición 3 es capaz de disminuir notablemente el nivel de la incorporación, aunque sí se permitía la aparición de un doble enlace en otras posiciones (Martín-Villacorta y *col.*, 1990; Martínez-Blanco y *col.*, 1991). Alguno de los posibles dobles enlaces introducidos pueden ser sustituidos por el correspondiente grupo cetónico en la molécula del sustrato (constituyéndose, así, un cetoacil-CoA) sin que se pierda la cualidad de estos compuestos de ser incorporados en moléculas de penicilina por la enzima (Ferrero y *col.*, 1991).

Algunos derivados cíclicos o ramificados pueden ser usados como sustratos por la IPN aciltransferasa aunque la formación de las penicilinas correspondientes requiere de tiempos de incubación superiores a lo normal (Martínez-Blanco y *col.*, 1991). Las moléculas de adipil-CoA o de dipimelil-CoA son usadas con muy baja eficiencia como sustratos y tanto el L-aminoadipil-CoA como el D-aminoadipil-CoA no son utilizados por la enzima (Luengo y *col.*, 1986; Alonso y *col.*, 1988).

② Por otro lado, se ha estudiado la especificidad de la isopenicilina N aciltransferasa por el otro sustrato de la reacción (el 6-APA), mediante la utilización de compuestos análogos que carezcan de anillo tiazolidínico. La enzima no es capaz de utilizar como sustratos el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) o el ácido 7-amino-desacetoxicefalosporánico (7-ADCA). Lo mismo ocurre con el ácido 3-aminomonobactámico. Estos resultados sugieren que el anillo tiazolidínico podría jugar un papel importante en el reconocimiento del sustrato o en la formación del complejo enzima-sustrato.

1.3.4. Mutantes afectados en la biosíntesis de penicilina.

Los mutantes afectados en la biosíntesis de la penicilina han permitido la confirmación de las relaciones gen-proteína en varios de estos pasos biosintéticos.

Ya en 1956, Sermonti analizó nueve mutantes no productores de penicilina y llegó a la conclusión, mediante la utilización de técnicas de formación de heterocigotos diploides a partir de los mutantes y posterior haploidización, de que existían al menos dos grupos de complementación (Sermonti, 1956). Normansell y colaboradores obtuvieron, a partir de la cepa *P. chrysogenum* NRRL 1951, un total de 78 mutantes no productores (o con niveles de producción inferiores al 10% respecto del valor alcanzado por la cepa parental) como consecuencia de la aplicación de un tratamiento con etil metano sulfonato (EMS), radiación ultravioleta de 254 nm de longitud de onda o radiación ultravioleta de 365 nm de longitud de onda y después de sensibilizar las células con 8-metoxipsoraleno. Mediante el análisis de formación de heterocigotos diploides entre los mutantes seguido de haploidización llegaron a la conclusión de la existencia de cinco grupos de complementación, denominados V, W, X, Y y Z (Normansell y *col.*, 1979).

Cantoral y *col.* (1993) consiguieron varios mutantes, denominados con el prefijo *npe* seguido de un número del 1 al 10, después de realizar un tratamiento mutagénico con nitrosoguanidina de una suspensión de esporas de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Los mutantes *npe1*, *npe4*, *npe5*, *npe6*, *npe7*, *npe8* y *npe10* no eran capaces de producir niveles detectables de penicilina, mientras que los mutantes *npe2* y *npe3* sintetizaban alrededor del 20% del nivel de producción encontrado en la cepa parental (Cantoral y *col.*, 1993).

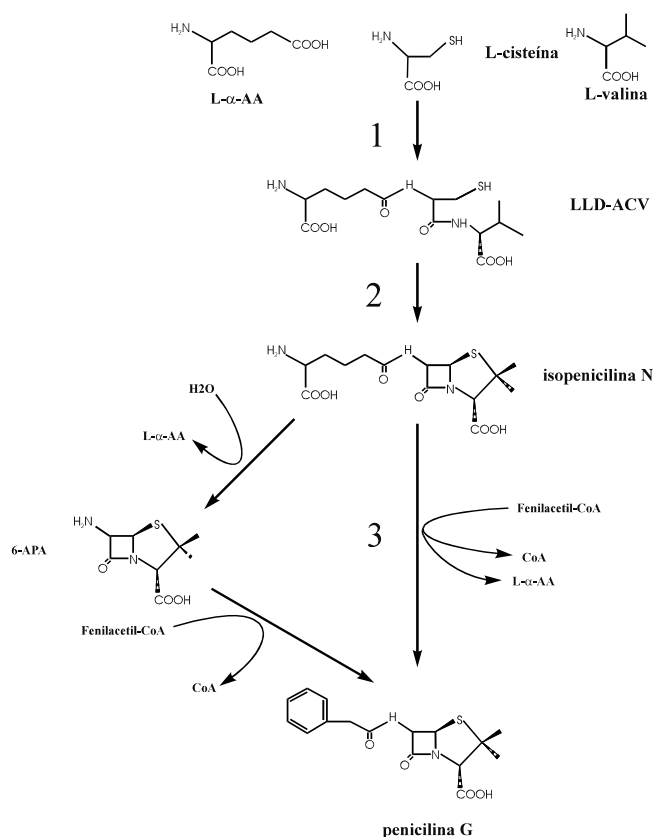


Figura 1.6. Localización de las mutaciones en los distintos mutantes *npe*. El mutante *npe5* está afectado en el paso 1. Los mutantes *npe1*, *npe4*, *npe6*, *npe7* y *npe8* poseen alterada la enzima que cataliza el paso 3. El mutante *npe10* carece de todos los genes de la ruta de biosíntesis, mientras que los mutantes *npe2* y *npe3* muestran disminución de todas las actividades enzimáticas. Nótese que no existen mutantes bloqueados en el paso 2.

Los mutantes *npe5* y *npe10* no presentaban actividad ACV sintética “in vitro” y no formaban el tripéptido ACV “in vivo”. Si se realizaban experimentos de inmunodetección de los distintos mutantes con anticuerpos generados contra la ACV sintetasa de *A. nidulans* se observaba que los mutantes *npe5* y *npe10* no presentaban esta proteína y los mutantes *npe2* y *npe3* presentaban niveles reducidos.

Todos los mutantes mostraban niveles normales de isopenicilina N sintasa cuando se realizaban experimentos de inmunodetección, con la excepción de los mutantes *npe10* que carece de la enzima y de *npe2* y *npe3* que también presentaban un nivel disminuido de esta proteína. Los ensayos de la actividad enzimática confirmaron este resultado.

Los mutantes *npe1*, *npe4*, *npe6*, *npe7*, *npe8* y *npe10* no presentaban actividad isopenicilina N aciltransferásica.

La hibridación del ADN total de la cepa parental y de los mutantes *npe5*, *npe6*, *npe8* y *npe10* con sondas internas a los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE* demostró que los mutantes *npe5*, *npe6* y *npe8* mantienen la misma organización del grupo de genes estructurales de biosíntesis de penicilina que la cepa parental. El mutante *npe10*, por el contrario, carece de los tres genes biosintéticos, habiendo sufrido una delección de 579 kpb que incluye todo el agrupamiento de genes estructurales de biosíntesis de penicilina (Fierro y col., 1995).

Dada la naturaleza del agente mutagénico empleado y de sus consecuencias habituales (generalmente se producen transiciones, creándose mutaciones puntuales) se creyó conveniente confirmar que este mutante era, efectivamente, un derivado de *P. chrysogenum* que ha perdido por delección una amplia zona del genoma y no una contaminación procedente de otro microorganismo (Cantoral y col., 1993).

Unos mutantes similares al *npe10* son los aislados en los laboratorios daneses Leo Pharmaceuticals, derivados de la cepa de baja producción *P. chrysogenum* Bb-1 y que reciben el nombre de Bb-1/125, Bb-1/168 y Bb-1/759 (Fredericksen y Emborg, 1984). Estos tres mutantes tampoco poseen los tres genes biosintéticos de penicilina (Fierro y col., 1996a).

1.4. Evolución de los genes biosintéticos de penicilina y posible papel de la biosíntesis de

antibióticos en los hongos filamentosos.

1.4.1. Aspectos evolutivos relacionados con los genes de biosíntesis de penicilina.

La gran similitud que existe entre los genes *pcbAB* y *pcbC* de procariontes y hongos (similitud estructural, similitud en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos codificados por ellos, ausencia de intrones) ha llevado a sugerir una posible transferencia horizontal de la ruta biosintética de antibióticos β -lactámicos, o de varios genes de esta ruta, desde los organismos procarióticos hasta los eucariotas ((Carlson y Chelm, 1986; Carr y col., 1986). Estos procesos no son inusuales en la Naturaleza y ocurren con bastante frecuencia entre procariontes.

Sin embargo, la existencia de esta teórica transferencia deja sin resolver cómo los genes de *Streptomyces* se han podido adaptar a la maquinaria biosintética fúngica y éste es un problema importante si se quiere entender el control de la expresión de estos genes en hongos filamentosos. La solución puede estar en que las secuencias sin capacidad codificante localizadas “en cis” (las regiones de ADN más cercanas a los genes) han sufrido un grado de evolución mucho mayor que las secuencias codificantes, lo que por otro lado podría conducir a la aparición de circuitos de regulación diferentes para el control de estos genes en organismos relacionados como *P. chrysogenum* y *A. nidulans*.

Los argumentos que apoyan a esta teoría son de dos tipos:

- Weigel y col. estimaron en 1988 que el grado de similitud de las secuencias de aminoácidos de las isopenicilina N sintetas

bacterianas y fúngicas era mayor del encontrado para proteínas normalmente muy conservadas (como la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa o la triosa fosfato isomerasa). Estos autores estimaron que dicha transferencia debió ocurrir hace unos 370 millones de años. Se ha intentado explicar este mismo fenómeno mediante la comparación a nivel nucleotídico de los distintos genes *pcbC* y de los genes para el ARN ribosómico 5S (Peñalva y col., 1990): los cálculos revelaron que la similitud entre los distintos genes *pcbC*, bacterianos y fúngicos, es mucho mayor que la esperada si la herencia hubiera sido de tipo vertical, es decir si los genes bacterianos y fúngicos descendieran de un ancestro común y la divergencia fuera únicamente debida al fenómeno evolutivo. Otros genes estructurales de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos presentaban este mismo comportamiento (Skatrud y col., 1991).

② El otro argumento se basa en la peculiar distribución del gen *pcbC* en la Naturaleza, dentro de grupos específicos (Peñalva y col., 1990). Si la herencia del gen *pcbC* fuese vertical dicho gen debería haberse perdido selectivamente o no ser funcional en una gran cantidad de organismos no productores de β -lactamas. La segunda de las posibilidades se ha desechado puesto que el análisis molecular del ADN de un buen grupo de organismos no productores de antibióticos β -lactámicos no ha permitido la localización de secuencias no funcionales relacionadas con el gen *pcbC*. La primera opción tampoco es muy probable.

El parecido (estructural y funcional) de la ACV sintetasa con otras péptido sintetasa procarióticas también avalaría la hipótesis de la transferencia horizontal. Otro dato a favor de esta teoría es la funcionalidad de las secuencias promotoras de los genes *pcbAB* de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* en un organismo procariótico como *E. coli* (S. Gutiérrez, comunicación personal).

Esta teoría se complica un poco más cuando debe suponerse que, en función de los distintos genes biosintéticos y de su organización agrupada, se tendrían que haber producido al menos dos fenó-

menos independientes de transferencia horizontal. Uno de ellos se produciría desde *Streptomyces* hasta los hongos productores de penicilina (como *Penicillium* y *Aspergillus*) y otro desde *Streptomyces* hasta los microorganismos productores de cefalosporina (como *Acremonium*). En el primer suceso se transmitirían los genes *pcbAB* y *pcbC* (quedaría por resolver, asimismo, cómo y por qué se originó la expresión de los dos genes en sentido contrario, orientación que no es la que aparece en procariotas), mientras que en el segundo suceso lo harían estos dos genes junto con los genes comunes para la biosíntesis de cefalosporina y cefamicina.

La hipótesis de la doble transferencia podría ser planteada también en forma de transferencia de bloques génicos. Así, un primer paso lo constituiría la transferencia de los genes *pcbAB* y *pcbC* tanto a los microorganismos productores de penicilina como a los productores de cefalosporina y el segundo paso consistiría en la transferencia de los genes de cefalosporina-cefamicina (y se daría exclusivamente hacia los microorganismos productores de cefalosporina). Esta segunda interpretación de la doble transferencia explicaría mejor la aparición de dos agrupaciones distintas de genes biosintéticos en *Acremonium*.

Sin embargo, y aún valorando las explicaciones que la hipótesis de la transferencia horizontal aporta a la presencia específica de un determinado grupo de genes con mucha similitud incluso entre microorganismos muy alejados en la escala evolutiva, nos quedaría por definir un mecanismo que explicara estos fenómenos. Para ello se han propuesto modelos basados en el descubrimiento de la transferencia de información genética desde *E. coli* hasta *Saccharomyces cerevisiae* a través de los denominados episomas sexuales (similares a los descritos por Heinemann y Sprague, 1989).

1.4.1.1. Origen del gen *penDE*.

El gen *penDE* merece consideraciones aparte dentro de este estudio evolutivo:

❶ Aparece agrupado junto a los genes *pcbAB* y *pcbC* en *P. chrysogenum* y *A. nidulans*, genes que presuntamente han sido objeto de un mecanismo de transferencia horizontal a lo largo de la evolución, como ya se indicó anteriormente. En los dos microorganismos se conserva la disposición relativa de los tres genes.

❷ El gen *penDE* no aparece en *A. chrysogenum*.

❸ El gen *penDE* es muy probablemente de origen eucariótico (contiene tres intrones), por lo que no estaría incluido en los fenómenos de transmisión horizontal. Además, parece improbable que sea transmitido un gen que no se ha detectado en ninguno de los conjuntos de genes estructurales para la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos encontrados en procariotas.

Si el gen *penDE* tiene un origen eucariótico el producto por él codificado muy probablemente debió de poseer una función diferente a la que actualmente desempeña en la biosíntesis de penicilina y el microorganismo habría sido capaz de adaptar una proteína existente para el desarrollo de una nueva función. Con ello se evitaría la construcción de una molécula completamente nueva. Según esta teoría cabría exigir alguna de las siguientes condiciones a la proteína IPN aciltransferasa:

❶ La proteína ancestral debería asumir una función adicional (implicada en la biosíntesis de penicilina) o abandonar su antigua función. La primera de estas dos opciones puede ser analizada en función de la posibilidad de la existencia de actividades no relacionadas con la biosíntesis de penicilina en la actual IPN aciltransferasa. El estudio de las alteraciones fenotípicas que acarrea la eliminación o inactivación del gen *penDE* no nos ha proporcionado demasiada información a este respecto, aunque el hecho de que este gen sea absolutamente dispensable (Aramayo y col., 1989) es suficiente para afirmar que si la isopenicilina N aciltransferasa posee un papel distinto al de

participar en la biosíntesis de penicilina éste no es muy importante para la célula.

Müller y col. (1991) sugieren que la localización de la enzima en el interior de los microcuerpos podría indicar la evolución a partir de una enzima presente en esa localización, por ejemplo una enzima involucrada en el metabolismo de los ácidos grasos. Esta hipótesis de evolución a partir de una enzima preexistente presupone que, forzosamente, la enzima ancestral debe tener un papel prescindible para el hongo (y no parece ser éste el caso de las enzimas involucradas en la síntesis de los ácidos grasos) o una actividad que pueda ser asumida por la misma molécula (convirtiéndose así en un complejo multienzimático) o bien por una molécula distinta.

❷ Otra de las posibilidades implicaría que el actual gen *penDE* debería ser el producto de una duplicación génica primitiva que originase dos genes homólogos con distinto grado de evolución posterior (lo que daría lugar al desarrollo de distintas funciones).

Esta segunda posibilidad se demostraría mediante la hibridación del ADN total con una sonda para el gen *penDE*. En *P. chrysogenum*, no se ha apreciado ninguna señal adicional a la correspondiente al gen *penDE*, lo que parece indicar que esta vía tampoco es la correcta.

❸ Para otros autores, por último, el gen podría haberse originado tras la fusión de un gen procariótico con un gen eucariótico en un ancestro común a *P. chrysogenum* y *A. nidulans* (Skatrud y col., 1991). La base de esta explicación se encontraría en la conservación de los tres intrones localizados en la primera mitad del gen (posible parte del gen de origen eucariótico) y en un contenido mayor en la cantidad de guanidina y citidina de la segunda mitad del gen (posible parte del gen de origen procariótico). La presencia de una señal de hibridación positiva en *A. chrysogenum* cuando su ADN es hibridado con una sonda correspondiente a la primera parte del gen

penDE sugeriría que al menos una parte de dicho gen (la de supuesto origen eucariótico) estaría presente en este microorganismo (Barredo, 1990).

Si el gen *penDE* (o al menos parte de él) tiene un origen fúngico no se podría describir el ligamiento existente entre los tres genes estructurales de la biosíntesis de penicilina como el reflejo de unos presuntos ancestros procarióticos, con lo que hay que pensar que tras la transferencia los genes *pcbAB* y *pcbC* se integraron selectivamente en la proximidad del gen *penDE*. Este fenómeno podría explicarse por medio de dos nuevas hipótesis: la primera habla de la existencia de una “región caliente para la recombinación” (una región que es afectada preferentemente por procesos de recombinación) en las proximidades del gen *penDE* y la segunda se refiere a la existencia de mecanismos de recombinación al azar (en cualquier lugar del genoma), seguidos de una selección de la disposición óptima capaz de proporcionar una ventaja evolutiva al hongo.

La localización conjunta de los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE* permitiría, por ejemplo, un control coordinado de su expresión. En *A. nidulans* ya se han descrito casos de estrategias para una regulación génica conjunta dependiente de la posición de los genes (Miller y col., 1987).

1.4.2. Posible papel de la biosíntesis de antibióticos en los hongos filamentosos.

La adquisición, posiblemente debida a un mecanismo de transferencia horizontal, de la capacidad de síntesis de penicilina proporcionaría a los hongos filamentosos una ventaja evolutiva muy clara. A partir de ese momento podrían competir con las bacterias de su entorno usando un arma a la que ellos mismos no eran sensibles. La incorporación del gen *penDE* al conjunto de genes biosintéticos haría que este efecto se viera

amplificado, debido a que el nuevo producto final (la penicilina) posee una actividad antibacteriana mucho mayor que la isopenicilina N. Sin embargo, si tenemos en cuenta la impresionante versatilidad metabólica que presentan estos hongos y el amplio rango de pH que toleran (sobre todo los representantes del género *Aspergillus*) es difícil imaginar que las bacterias del suelo pudieran representar un serio competidor ecológico para ellos. En este punto, sería más lógico pensar que los hongos usarían estas nuevas armas en condiciones que no fueran las idóneas para su crecimiento (en condiciones de ausencia de nutrientes, por ejemplo). En ausencia de nutrientes, los antibióticos podrían ser utilizados para lisar las bacterias del entorno y los productos derivados de la lisis bacteriana podrían ser incorporados al metabolismo fúngico (Luengo y Peñalva, 1993).

Otra ventaja adicional de la adquisición de la capacidad de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos podría derivarse de su posible utilización en la detoxificación de ciertos metabolitos nocivos para el hongo. El ácido fenilacético podría ser uno de ellos y la detoxificación consistiría en su incorporación a la molécula de penicilina G, molécula que posteriormente sería excretada. El ácido fenilacético es un compuesto tóxico cuando su concentración es elevada, pero su incorporación a la célula no parece depender de ningún proceso relacionado con la síntesis de antibióticos (ya sea esta incorporación debida a la existencia de un sistema específico de transporte (Fernández-Cañón y col., 1989a y 1989b; Martínez-Blanco y col., 1989) o sea debida a un simple mecanismo de difusión pasiva (Eriksen y col., 1995), en virtud de un gradiente de pH).

Otro compuesto que podría ser un posible sustrato para los mecanismos de detoxificación es el ácido L- α -aminoadípico, cuya acumulación intracelular es altamente tóxica para microorganismos del género *Saccharomyces* (Cooper, 1982). En hongos filamentosos se sabe que hay una relación directa entre la concentración

de este compuesto y la síntesis de penicilina, pero se desconoce si el efecto de unas concentraciones excesivas de ácido L- α -aminoadípico es nocivo para dichos microorganismos. En este caso la detoxificación se realizaría también mediante la incorporación del compuesto a la molécula de antibiótico β -lactámico.

1.5. Regulación de la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos.

La producción de penicilina G es un proceso relativamente ineficiente incluso en las fermentaciones de las cepas industriales de *P. chrysogenum* (Hersbach y col., 1984). Aproximadamente sólo el 10% de la fuente de carbono consumida durante la fermentación termina incorporándose a la molécula de penicilina (el 65% se emplearía en el mantenimiento del metabolismo y el 25% restante en el crecimiento del microorganismo), y muy probablemente este cálculo pueda ser también aplicado a la producción de cefalosporina C por las cepas industriales de *A. chrysogenum*. La mejora en la producción y en el porcentaje de rendimiento de las cepas que actualmente se emplean se ha conseguido por medio de la utilización de técnicas que en muchos casos no han afectado solamente a los genes estructurales sino que también han mostrado su efecto sobre los mecanismos que el microorganismo poseía para la regulación de tales procesos.

La producción de antibióticos β -lactámicos tiene lugar preferentemente en condiciones de desequilibrio de nutrientes y a velocidades de crecimiento bajas. El desequilibrio nutricional puede alcanzarse por la limitación en las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. Además de estos factores, aminoácidos como la lisina ejercen un marcado efecto sobre la producción de penicilina por parte de determinados microorganismos. Otros componentes (el líquido de maceración del maíz, por

ejemplo) y características del medio de cultivo (el valor de pH, por ejemplo) parecen jugar también un papel importante en este proceso.

1.5.1. Regulación por la fuente de carbono.

En 1953 Soltero y Johnson describieron que la glucosa era una fuente de carbono que permitía un crecimiento muy bueno de *P. chrysogenum* y que sin embargo ejercía un importante efecto represor sobre la producción de penicilina. La lactosa se comportaba de forma contraria y por ello el medio clásico para la producción de penicilina contiene los dos compuestos: la glucosa (o sacarosa) interviene en el rápido crecimiento inicial del hongo, pero cuando ésta es consumida y el micelio se ha desarrollado comienza la biosíntesis de penicilina a expensas de la lactosa. El mismo resultado puede conseguirse con la adición intermitente o continuada de glucosa, siempre y cuando la concentración de este azúcar no sea lo suficientemente alta como para interferir en la formación del antibiótico. Además de la glucosa, la fructosa, la galactosa y la sacarosa también reprimen la biosíntesis de penicilina (Revilla y col., 1984). El mecanismo molecular de este fenómeno empezó a descubrirse cuando Revilla y colaboradores encontraron en 1986 que la glucosa reprimía la actividad de la isopenicilina N sintasa y provocaba la disminución del nivel intracelular del tripéptido ACV.

La represión de determinadas actividades enzimáticas ejercida por la glucosa se realiza a nivel de la transcripción génica: Feng y colaboradores demostraron en 1994, mediante la utilización de un "gen testigo" acoplado a los promotores de los genes biosintéticos, que la glucosa ejerce un efecto represor sobre la transcripción de los genes *pcbAB* y *pcbC*. En la actualidad se están llevando a cabo estudios acerca de determinadas proteínas que se unen a la región intergénica de estos dos genes en *P. chrysogenum* y se han identificado ya algunos de sus sitios de

unión, aunque se desconoce todavía en qué tipo de regulación participan (Chu y *col.*, 1995; Feng y *col.*, 1995; A.T. Marcos y K. Kosalková, comunicación personal).

En 1988, Barredo y colaboradores. aislaron un mutante de *P. chrysogenum* que se encontraba desregulado en la represión ejercida por la glucosa sobre la biosíntesis de penicilina y sobre la producción de β -galactosidasa. Este mutante era incapaz de fosforilar la D-glucosa, lo que sugiere que podría carecer de la actividad glucoquinásica (y que ésta estaría relacionada con la regulación provocada por el catabolismo de la glucosa). En relación con esta hipótesis, se ha demostrado que la hexoquinasa II de *Saccharomyces cerevisiae* posee un importante papel en la represión catabólica ejercida por la glucosa en levaduras (Entian y *col.*, 1984). Otros autores (Luengo y Peñalva, 1993) opinan que la deficiencia de hexoquinasa provoca realmente una disminución en la tasa de toma de glucosa, con lo que su efecto sobre la biosíntesis de penicilina podría explicarse en términos de una reducida captación del compuesto represor (Bailey y Arst, 1975).

En *A. nidulans* se ha observado el mismo fenómeno de represión catabólica mediada por la fuente de carbono, conociéndose un poco mejor los mecanismos moleculares subyacentes (hasta ahora, todos los descubrimientos importantes realizados en este campo se han conseguido en *A. nidulans*, procediéndose a continuación a su confirmación en *P. chrysogenum*). La utilización de glucosa o sacarosa en el medio de cultivo también provocaba en este microorganismo la aparición de niveles muy bajos de transcripción del gen *pcbC* (Espeso y Peñalva, 1992). Estos autores indicaban también que la fuente de carbono utilizada no parecía afectar a la transcripción del gen *pcbAB*, a diferencia de lo que se ha descrito para el mismo gen de *P. chrysogenum*. Otros investigadores han descrito que la formación de la isopenicilina N aciltransferasa también se encuentra regulada por la fuente de carbono (Brakhage y *col.*, 1992), aunque

se desconoce si el control ocurre a nivel transcripcional.

Pérez-Esteban y *col.* localizaron en 1993 algunas regiones del promotor del gen *pcbC* de *A. nidulans* que actúan como reguladores negativos “en cis” (es decir, sobre la misma molécula de ADN). Una de estas regiones estaba involucrada en la regulación catabólica ejercida por la sacarosa y se denominó CRE, por “carbon regulatory element” (curiosamente esta región se encuentra localizada dentro del gen *pcbAB* que, como ya se ha señalado antes, se encuentra adyacente al gen *pcbC*).

El gen responsable de la regulación catabólica por carbono en *A. nidulans* se denomina *creA* y se encuentra clonado y caracterizado (Dowzer y Kelly, 1989 y 1991; Espeso y Peñalva, 1994). Este gen codifica para una proteína denominada CreA que se une a determinadas regiones del ADN con el propósito de modular la expresión génica. Y la región CRE localizada en las proximidades del gen *pcbC* contenía un sitio de unión para esta proteína CreA. Sin embargo, la delección específica de la región CRE no causó ningún tipo de efecto sobre la transcripción de un “gen testigo” acoplado a la región promotora del gen *pcbC* (Espeso y *col.*, 1993).

Por si fuera poco, el crecimiento de *A. nidulans* en un medio que contiene como fuente de carbono el glicerol (fuente no represora para el circuito del gen *creA*) o el acetato (fuente represora para el circuito del gen *creA*) provoca una fuerte reducción en los niveles de ARNm del gen *pcbC* (Espeso y *col.*, 1993). Los efectos del glicerol y el acetato sobre los niveles de transcripción del segundo gen de la ruta biosintética y el hecho de no observar variaciones en dicho nivel de transcripción al deleccionarse la región del ADN que contiene el sitio de unión para la proteína CreA son, pues, observaciones que no apoyarían la existencia de un posible control, ya sea directo o indirecto, del gen *pcbC* por parte del gen *creA*. Se podría concluir que un segundo mecanismo, independiente del gen *creA*, estaría implicado en la regulación mediada por la fuente de carbono del gen *pcbC*.

1.5.2. Regulación mediada por el pH externo.

La acumulación de penicilina es cinco veces mayor en cultivos de *A. nidulans* incubados con valores de pH de 8'1 que en cultivos incubados con valores de pH próximos a la neutralidad. En contraste, la acumulación de penicilina es mayor en cultivos incubados con un valor de pH neutro que en otros desarrollados en valores de pH ácido (Shah y col., 1991). Si se generan mutaciones en el gen regulador *pacC* (Tilburn y col., 1995) se reproducen los efectos causados por un ambiente alcalino, apareciendo con valores de pH neutros del medio niveles de penicilina semejantes a los que se detectan cuando los cultivos se desarrollan en valores de pH del medio alcalinos. La biosíntesis de penicilina estaría, por lo tanto, controlada por el producto del gen *pacC*. Por otro lado, se encontró que mutaciones hipofuncionales de los genes *palA*, *palB*, *palC*, *palE* y *palF* eran capaces de reproducir los efectos causados por el crecimiento del microorganismo en valores de pH ácidos. Los mutantes que las presentaban se comportaban como mutantes no productores de penicilina (Shah y col., 1991).

Con ello se demostraba la importancia de la regulación por los valores de pH del medio en la producción de penicilina.

Se ha estudiado el efecto del valor de pH del medio sobre la transcripción del gen *pcbC* de *A. nidulans* y se ha visto que el crecimiento de microorganismos en valores de pH del medio alcalinos o las mutaciones que afectan al gen *pacC* suprimen la regulación producida por la fuente de carbono, originándose un considerable aumento de los niveles de transcripción de este gen cuando el micelio es incubado en un medio con sacarosa (Espeso y col., 1993). En contraste, ni un pH externo ácido ni las mutaciones producidas en los genes *pal* eran capaces de prevenir la desrepresión causada en la regulación sobre la transcripción del

gen *pcbC* cuando el medio de cultivo contenía lactosa. Estos dos resultados podrían indicar la existencia de mecanismos de regulación independientes para la fuente de carbono y el valor de pH externo. Sin embargo, los dos factores parecen estar muy relacionados puesto que todas las fuentes de carbono que provocan la desaparición de la regulación negativa originan una alcalinización del pH externo cuando son consumidas, mientras que todas las fuentes de carbono que desencadenan la aparición de dicha regulación causan la acidificación del medio al ser utilizadas.

En *P. chrysogenum* las investigaciones están menos avanzadas, aunque los trabajos están progresando en base a la comparación con los resultados obtenidos en *A. nidulans*. Se puede adelantar, no obstante, que los mecanismos de regulación no son comparables entre *A. nidulans* y *P. chrysogenum* (S. Gutiérrez y A.T. Marcos, comunicación personal).

1.5.3. Regulación por la adición de líquido de maceración del maíz.

A finales de los años 40 se encontró que el líquido de maceración del maíz ("corn steep liquor" o CSL) añadido al medio de producción de *Penicillium* estimulaba mucho el nivel de penicilina obtenido (Liggett y Koffler, 1948). En *A. nidulans* la producción es indetectable a no ser que esta mezcla de sustancias sea añadida al medio de fermentación y la adición de otros compuestos (Cove, 1966) provoca la aparición de menores niveles de producción de antibiótico (Shah y col., 1991).

Una posible explicación de las propiedades básicas del CSL sería que en su composición hay un muy alto contenido de aminoácidos y oligopéptidos, aunque la gran complejidad de la mezcla puede dificultar mucho la identificación de los compuestos auténticamente responsables del efecto estimulador (J. Velasco, comunicación

personal). Hay que considerar, además, que el CSL utilizado en microbiología ha sufrido procesos de transformación microbiana durante la maceración del maíz (principalmente debidos a la acción de bacterias lácticas termofílicas), por lo que habría que valorar también el grado de variabilidad que se puede producir con el uso de diferentes lotes del producto.

Cualquiera que sea el compuesto responsable del efecto del CSL, el resultado más importante que parece producirse en *A. nidulans* es un gran incremento en la transcripción de los genes estructurales de biosíntesis de penicilina (MacCabe y col., 1990; Peñalva y col., 1991a y 1991b). La estimulación del CSL sigue produciéndose de forma significativa incluso en presencia de una fuente de carbono represora de la biosíntesis de penicilina (Peñalva y col., 1991b; Espeso y Peñalva, 1992). No se conoce nada, sin embargo, de los mecanismos moleculares que permiten la conexión entre el CSL del medio y sus efectos a nivel de la transcripción génica.

1.5.4. Regulación por la fuente de nitrógeno.

La formación de antibióticos β -lactámicos está fuertemente regulada por la fuente de nitrógeno del medio en *P. chrysogenum* (Sánchez y col., 1981) y *A. chrysogenum* (Shen y col., 1984), siendo los iones amonio los que muestran un efecto negativo más potente (Sánchez y col., 1988).

La toma de fenilacético por las células de *P. chrysogenum* se ve afectada de modo negativo por la adición de determinados aminoácidos, habiéndose comprobado que este efecto no es debido a la parte de su molécula correspondiente al esqueleto carbonado. Los aminoácidos con efecto negativo más marcado a este respecto son la tirosina, ácido α -aminoadípico, triptófano, fenilalanina y metionina. Las sales de amonio también tienen un carácter represor sobre este mecanismo (Martínez-Blanco y col., 1989).

Kudla y col. clonaron en 1990 el gen *areA*, responsable de la represión metabólica por nitrógeno en *A. nidulans*. En 1995 fue clonado el gen homólogo de *P. chrysogenum*, denominado en este microorganismo como *nre* (Haas y col., 1995) y presuntamente responsable de la regulación llevada a cabo por la fuente de nitrógeno presente en el medio. Este gen codifica para una proteína que es capaz de unirse a un fragmento de ADN localizado en la región intergénica situada entre los genes *pcbAB* y *pcbC* (Haas y Marzluf, 1995), aunque de momento se desconoce si este suceso es el responsable de la represión de la biosíntesis de penicilina mediada por la fuente de nitrógeno del medio.

1.5.5. Regulación por la lisina.

La lisina es un potente inhibidor de la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* (Demain, 1957). Demain y Masurekar, describieron en 1974 que la primera enzima de la ruta biosintética de la lisina en *P. chrysogenum*, la homocitrato sintasa, era inhibida por la lisina (mutantes bloqueados en los primeros pasos de esta ruta y que acumulaban en condiciones normales homocitrato veían disminuir los niveles de este compuesto cuando se añadía lisina al medio). Circunstancias similares fueron descritas por otros investigadores (Friedrich y Demain, 1977; Luengo y col., 1979) mientras que Jaklitsch y col. describieron en 1987 la ausencia de represión por lisina y en 1990 (Jaklitsch y Kubicek, 1990) la presencia de inhibición por lisina de la homocitrato sintasa. Las diferencias observadas entre los distintos grupos pueden deberse a las cepas de *P. chrysogenum* utilizadas. Así, Affenzeller y col. demostraron en 1989 que la lisina, en este microorganismo, también inhibía la actividad de otra de las enzimas de la ruta de biosíntesis de lisina (la α -aminoadipato reductasa) y que esta inhibición se producía en mayor o menor intensidad según la cepa estudiada. Se ha descrito, incluso, que la lisina en bajas concentraciones era capaz de estimular la formación de penicilina en

cepas de bajos niveles de producción (Lu y col., 1991).

El ácido α -aminoadípico, un intermediario en la biosíntesis de lisina en hongos, no sólo es capaz de revertir este efecto represor sino que consigue estimular la síntesis de penicilina en ausencia de lisina exógena (Friedrich y Demain, 1978).

El efecto regulador de la lisina parece ser, pues, muy complejo y variable según las concentraciones de lisina y las cepas empleadas y podría ocurrir a través de un compuesto intermediario (el ácido α -aminoadípico, por ejemplo). El bloqueo de determinadas enzimas de la ruta de biosíntesis de lisina puede hacer variar los niveles intracelulares de ácido α -aminoadípico (X. Casqueiro, comunicación personal), habiéndose descrito previamente la existencia de una relación directa entre estos niveles y la cantidad de penicilina producida (Jaklitsch y col., 1986) o entre los niveles intracelulares de ácido α -aminoadípico y la producción de tripéptido ACV e isopenicilina N (Hönlinger y Kubicek, 1989)

1.5.6. Regulación mediada por la fuente de fósforo del medio.

Se ha demostrado que la biosíntesis de β -lactamas en hongos filamentosos también está regulada en función de la fuente de fósforo con la que se suplemente el medio de crecimiento (Martín y col., 1982). Estos investigadores encontraron que el fosfato disminuía la biosíntesis de cefalosporina C y penicilina N en la cepa *A. chrysogenum* CW19. El fosfato no ejercía un papel indirecto, mediante el incremento de la tasa de consumo de glucosa (fuente de carbono represora), sino que interfería con la biosíntesis de β -lactamas incluso cuando el medio no era suplementado con glucosa. Kuenzi realizó en 1988 experimentos con *A. chrysogenum* W 53253 y concluyó que el efecto regulatorio podría ser indirecto, por medio de la variación en los niveles de glucosa. Esta hipótesis ha quedado descartada definitivamente con los trabajos de

Zhang y colaboradores. (Zhang y col., 1988). En ellos se demostró que la presencia de elevadas concentraciones de fosfato no provocaban un incremento en el nivel de consumo de la glucosa sino que reprimían la formación de la ACV sintetasa, la IPN sintasa y la expandasa (sobre todo esta última). La actividad enzimática de las tres enzimas se veía también inhibida por el fosfato (la expandasa era de nuevo la enzima más afectada).

1.6. Incidencia de la Ingeniería Genética en la producción de antibióticos β -lactámicos.

La utilización de las técnicas de Ingeniería Genética ha permitido dar un nuevo impulso al desarrollo de cepas con mayor producción de antibióticos, pero también ha servido para conocer en detalle la naturaleza de los cambios ocurridos durante los procesos de mutagénesis al azar (tanto en los casos en los que se consigue aumentar la producción como en los que ésta resulta disminuida) y la localización específica de tales cambios en el genoma del microorganismo.

Una vez clonados los genes responsables de la biosíntesis de antibióticos (o alguno de ellos) los primeros intentos de mejora de las cepas de producción se basaron en la idea de que, si la producción dependía de la expresión de unos genes, todo cambio capaz de afectar positivamente a dicha expresión podría traducirse en un incremento en la cantidad de antibiótico obtenido.

La forma más sencilla de aumentar la producción en estas fases iniciales de aplicación de las técnicas del ADN recombinante consistió en el incremento de la dosis génica (el aumento del número de copias de los genes que codifican para una proteína determinada dentro del microorganismo). A ello contribuyó el desarrollo de técnicas más eficientes para la transformación de los hongos: primero en *A.*

nidulans (Yelton y col., 1984) y posteriormente en *A. chrysogenum* (Peñalva y col., 1985; Queener y col., 1985; Skatrud y col., 1987; Gutiérrez y col., 1991b) y *P. chrysogenum* (Beri y Turner, 1987; Cantoral y col., 1987; Sánchez y col., 1987). En todos los casos, los métodos utilizados se basaban en modificaciones del método desarrollado para *Saccharomyces cerevisiae* (Hinnen y col., 1978) y constaban de tres pasos fundamentales: obtención de protoplastos a partir del micelio, transformación de los protoplastos y regeneración de los mismos.

1.6.1 Aumento del número de copias de los genes de producción de antibióticos β -lactámicos.

Muy pronto, con la utilización de esta técnica, pudo observarse el efecto que originaba sobre la producción de antibióticos la integración en el genoma fúngico de un mayor número de copias de los genes estructurales de biosíntesis de penicilina.

La primera aplicación de esta técnica con éxito fue la que tuvo lugar con el gen *cefEF* en *A. chrysogenum* (Skatrud y col., 1989). La amplificación del gen que codifica para la expandasa-hidroxilasa provocaba un aumento en la actividad enzimática debida a esta enzima, una disminución en la cantidad de penicilina N acumulada y un incremento en la producción de cefalosporina C de la cepa estudiada. Resultados aún más espectaculares se han obtenido en nuestro laboratorio al amplificar el gen *cefG* que codifica para la desacetilcefalosporina C acetiltransferasa, última enzima de la ruta de biosíntesis de cefalosporina C (Gutiérrez y col., 1997)

En cuanto a los genes de biosíntesis de penicilina, la sobreexpresión del gen *pcbAB* en *A. nidulans* han llevado a la aparición de producciones de penicilina 30 veces superiores a las normales (Kennedy y Turner, 1996).

La introducción de copias adicionales del gen *pcbC* en la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 no era capaz de originar un incremento notable en la producción de penicilina G, si bien aceleraba ligeramente su biosíntesis entre las 30 y las 80 horas de la fermentación (Barredo, 1990). Este autor justifica tal resultado argumentando que posiblemente la actividad isopenicilina N sintásica no constituya un “cuello de botella” en la producción de penicilina y que el aumento observado para esta actividad enzimática no sea suficiente para favorecer la biosíntesis de este compuesto. En cualquier caso, la utilización en la transformación de un plásmido integrativo hace que los resultados de este tipo deban ser tomados con precaución

La realización de un experimento similar con el gen *pcbC* en una cepa silvestre de *A. chrysogenum* y en la cepa mutante N2 (Skatrud y col., 1987) condujo a la aparición de resultados similares. La mayoría de los transformantes de la cepa N2 recuperaban la actividad isopenicilina N sintásica. En ningún caso, sin embargo, se superaban los niveles de producción que se conseguían mediante la utilización de microorganismos obtenidos a partir de la cepa silvestre por selección al azar (Chapman y col., 1987).

El gen *penDE* de *P. chrysogenum* también ha sido utilizado en este tipo de experimentos (Veenstra y col., 1991). En este caso no se ha usado sólo este gen en la transformación, sino que se ha utilizado un fragmento de ADN, de 5'1 kpb de longitud y delimitado por sitios de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *SalI*, fragmento que contiene los genes *pcbC* y *penDE*. El valor medio de la producción de penicilina G obtenida por 26 transformantes de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 en los que se había integrado el fragmento de ADN descrito resultó ser significativamente mayor que el valor de producción de aquellos transformantes en los que se había integrado solamente el plásmido sin inserto. Los dos transformantes de mayor

producción alcanzaban un incremento del 40% con respecto a la producción de los transformantes utilizados como control, aunque la variabilidad existente entre los distintos transformantes era bastante elevada. Las diferencias encontradas a nivel individual podrían ser explicadas por la integración de los plásmidos en diferentes localizaciones cromosómicas o por la existencia de un número diferente de copias integradas del plásmido. Pero este último paso de biosíntesis de penicilina sí parecería ser limitante en el desarrollo de la ruta (al menos en la cepa utilizada). Veenstra y *col.* sugieren finalmente que tal vez fuese necesario incrementar de forma homogénea la expresión de los genes *pcbC* y *penDE* para conseguir una mejora en la producción de penicilina.

1.6.2 Análisis de la cepas industriales.

Los fenómenos de amplificación han ocurrido en un buen número de cepas industriales (Barredo y *col.*, 1989a; Smith y *col.*, 1989), aunque en estos casos son el resultado de la aplicación de las técnicas de mutagénesis clásica. En *P. chrysogenum* NRRL 1951, *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y *P. notatum* ATCC 9478 (la cepa aislada por Fleming) sólo existe una copia de los genes biosintéticos (Barredo y *col.*, 1989a; Fierro, 1996), mientras que en cepas industriales de *P. chrysogenum*, como AS-P-78 ó P2, se ha encontrado amplificada una región de 106'5 kpb que contiene los tres genes estructurales para la biosíntesis de penicilina. Esta amplificación supone la aparición de múltiples copias de esta región (de cinco a seis copias en el caso de la cepas AS-P-78 y de seis a siete en el caso de la cepa P2) repetidas en tandem (Fierro y *col.*, 1995). Tanto en los extremos de la región amplificada como en la unión entre las distintas copias se encuentra una misma secuencia de seis nucleótidos: TTTACA (que también aparece rodeando la única copia de esta región presente en las cepas *P. chrysogenum* NRRL 1951 y *P. notatum* ATCC 9478).

En otras cepas industriales de mayor producción como puede ser *P. chrysogenum* E1 existe también amplificación, aunque el tamaño de la región amplificada es sólo de 57'9 kpb (también en esta región se encontraban comprendidos los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE*, habiéndose descrito la presencia de al menos cinco genes adicionales que se transcriben. Tres de ellos estaban localizados corriente abajo del gen *penDE* y dos se situaban corriente abajo del gen *pcbAB*). La amplificación en esta cepa consiste en la repetición en tandem de 12 a 14 copias de la región que incluye los genes biosintéticos. Los extremos de la región amplificada y las uniones entre las distintas copias presentan en sus extremos la misma secuencia TTTACA descrita anteriormente o su complementaria reversa (TGTA AAA).

El mutante no productor *P. chrysogenum* *npe10* (que, como se ha descrito en un apartado anterior, carece de los tres genes estructurales de biosíntesis de penicilina) mostró una delección de 57'9 kpb que correspondía exactamente con el fragmento de ADN que se encuentra amplificado en la cepa E1. Además, en el sitio de delección se reconstruía la misma secuencia TTTACA. Lo mismo puede apreciarse tras el análisis de los mutantes Bb-1/125, Bb-1/168 y Bb-1/759 (Fierro y *col.*, 1996a).

Según Lein (1986), los poderosos tratamientos mutagénicos de los que han sido objeto las cepas de uso industrial en muchas ocasiones se traducen en fenómenos de inestabilidad cromosómica. Esta inestabilidad puede dar lugar en *A. nidulans* a la aparición de duplicaciones cromosómicas (Sexton y Roper, 1984) o de fenómenos de amplificación génica (Parag y Roper, 1975; Burr y *col.*, 1982). En *Neurospora crassa* se ha descrito también la existencia de duplicaciones génicas (Newmeyer y Galeazzi, 1977). La amplificación génica de las cepas industriales se da en *P. chrysogenum* en el cromosoma I (en la localización normal de los genes amplificados), mientras que en *A. nidulans* se ha descrito la duplicación de una gran parte del cromosoma I_R seguida de la unión del fragmento

duplicado al extremo del cromosoma II_R (Sexton y Roper, 1984). La amplificación en tandem observada en *P. chrysogenum* es similar a la que se ha descrito en algunos casos en *Saccharomyces cerevisiae* (Fogel y Welch, 1982; Walton y col., 1986), aunque en este microorganismo se ha descrito que la amplificación puede dar lugar a la aparición de grandes moléculas de ADN lineal extracromosómico (Walton y col., 1986) y en *P. chrysogenum* la amplificación siempre se mantiene en el cromosoma.

Estos resultados pueden empezar a dar una idea acerca del mecanismo de amplificación génica producida en las cepas utilizadas industrialmente. La recombinación ocurrida a nivel de la secuencia de hexanucleótidos conservada en los extremos de las regiones amplificadas de las cepas industriales podría constituir un modelo para explicar la formación de las repeticiones en tandem aparecidas tras la mutagénesis de la cepa inicial de *P. chrysogenum*. Esta secuencia TTTACA, y su complementaria reversa, constituirían según este modelo lugares de alta frecuencia de recombinación específica tras el tratamiento con nitrosoguanidina. Los procesos de recombinación observados podrían ser parte de un sistema de reparación similar al que existe en *E. coli* para restaurar fragmentos dañados de ADN (Walker, 1985). Tales sistemas parecen estar presentes en levaduras y hongos filamentosos (Bainbridge, 1981) y su expresión se induciría después de la aplicación de los tratamientos mutagénicos.

1.6.3. Posibilidades de aplicación de las técnicas de Ingeniería Genética a la mejora en la biosíntesis de penicilina.

1.6.3.1. Expresión heteróloga de genes en hongos filamentosos.

En muchas ocasiones interesa expresar un gen clonado a partir de un microorganismo en microorganismos distintos que se muestren más eficientes que el portador original. Esta técnica es útil para producir una enzima en grandes cantidades

o bien para conseguir que el microorganismo traduzca la incorporación de una nueva actividad enzimática en la formación de nuevos productos de interés industrial (productos que, en algunos casos, sólo se podrían obtener a través de una larga y costosa síntesis química). La producción de enzimas puede conseguirse de forma más sencilla mediante la expresión de los genes en bacterias. Sin embargo, en muchos casos las proteínas eucarióticas deben sufrir modificaciones postraduccionales (glicosilación, acetilación, etc.) para alcanzar su correcta funcionalidad y los organismos procarióticos no son capaces de realizarlas.

A continuación se describen cuatro ejemplos de la aplicación de estas técnicas al campo de la producción de antibióticos β-lactámicos:

❶ La introducción del gen *penDE* de *P. chrysogenum* en *A. chrysogenum* permitió la producción de penicilina G en este último microorganismo (Gutiérrez y col., 1991b).

❷ La introducción en *A. chrysogenum* del ADN complementario para una D-aminoácido oxidasa de *Fusarium solani* y del ADN genómico que codifica para una cefalosporina acilasa de *Pseudomonas diminuta* provoca la aparición de transformantes capaces de producir directamente 7-ACA (Isogai y col., 1991).

❸ La introducción en *A. chrysogenum* de un gen de la bacteria *Vitreoscilla* que codifica para una proteína similar a la hemoglobina (proteína hémica capaz de captar oxígeno) permitió la obtención de mejoras en la producción de cefalosporina C por parte de los transformantes (DeModena y col., 1993).

❹ La introducción en *P. chrysogenum* del gen *cefE* de *S. clavuligerus* o de los genes *cefEF* y *cefG* de *A. chrysogenum* y el crecimiento de este nuevo microorganismo en presencia de ácido adípico provocaban la aparición de adipil-7-ADCA y adipil-7-ACA, respectivamente (Crawford y col., 1995). Las cadenas laterales de estas cefalosporinas

pueden ser fácilmente eliminadas mediante la utilización de amidasas derivadas de *Pseudomonas* obteniéndose los intermediarios de alto interés 7-ADCA y 7-ACA.

La expresión heteróloga de genes en los hongos filamentosos requerirá la existencia de una cepa hospedadora apropiada para una óptima producción del metabolito de interés (a veces es conveniente, por ejemplo, la eliminación de actividades enzimáticas que podrían interferir) y de un sistema de expresión que contenga toda la información transcripcional y traduccional necesaria para la formación de la proteína transgénica. Los dos requerimientos deben ser complementados, lógicamente, con un sistema eficiente de transformación o transferencia génica.

La expresión heteróloga funcional de un gran número de genes fúngicos con sus propios promotores (Fincham, 1989; Goosen y col., 1990; van den Hondel y Punt, 1990; Gutiérrez y col., 1991a, 1991b y 1992; resultados del presente trabajo) hace suponer que, en principio, las secuencias que sirven para el control de la transcripción en una determinada especie pueden ser funcionales en otras especies fúngicas. Pero si la introducción del gen con sus propias regiones de control no conduce a una expresión correcta del mismo o si lo que se pretende es mejorar la expresión o modificar su regulación no quedará entonces más remedio que sustituir las secuencias promotoras propias por otras más adecuadas.

1.6.3.2. Expresión heteróloga de genes fúngicos en *E. coli*.

La sobreexpresión de un gen en *E. coli* persigue la obtención en grandes cantidades del producto proteico codificado por dicho gen y la posibilidad de facilitar su purificación.

El esquema general de un sistema de expresión para *E. coli* no se aleja mucho del modelo básico para la expresión en los hongos filamentosos, pero

en este caso hay que tener en cuenta una serie de circunstancias:

❶ Las señales para la regulación de la expresión génica de los hongos filamentosos no son reconocidas por *E. coli*, salvo excepciones. Por ello el primer paso necesario sería poner el gen de interés bajo el control de señales de inicio de la transcripción y la traducción bien reconocidas por la bacteria. Se pueden mencionar cuatro grandes grupos de promotores muy eficientemente reconocidos por *E. coli*:

a) El promotor pL del bacteriófago lambda, controlado por el represor cI, es uno de los más activos "in vivo". Presenta una secuencia operadora (*OLI*) que permite la represión de este promotor por el producto del gen cI. Este gen se encuentra en el cromosoma de la cepa hospedadora utilizada y su expresión es sensible a la temperatura. Un choque térmico impediría la formación del represor y la ARN polimerasa comenzaría la expresión a partir del promotor pL. Este tipo de estrategia ha sido utilizado para la expresión del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* AS-P-78 en *E. coli* (Barredo, 1990).

b) El promotor del bacteriófago T7 permite la expresión cuando en la célula existe una ARN polimerasa específica de dicho bacteriófago. Para conseguir esto se pueden seguir dos caminos:

- Cotransformación del sistema de expresión junto con el plásmido pGP1. Este plásmido posee el gen para la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor pL (y por lo tanto su expresión está controlada por la temperatura).

- Transformación del sistema de expresión en una cepa de *E. coli* lisógena del bacteriófago recombinante DE3. Este bacteriófago contiene la ARN polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control del promotor-operador *lac*. Esta estrategia permite la expresión de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 tras la adición al

medio de cultivo de IPTG (el represor *lac* se inactiva y se expresa la polimerasa del bacteriófago T7, permitiéndose la expresión de los genes que se encuentran bajo el control del promotor del bacteriófago T7). Este método ha sido empleado para la expresión del gen *penDE* de *P. chrysogenum* (Tobin y col., 1993; resultados del presente trabajo), del mismo gen de *A. nidulans* (Montenegro, 1996) y del gen *cefG* de *A. chrysogenum* (Gutiérrez, 1994).

c) El promotor *lac*, que puede ser controlado por medio de dos vías distintas:

- Mediante la ya mencionada inducción por IPTG, de manera que se inactive el represor *lac*.

- En los denominados mutantes *cya* no existe síntesis de AMP cíclico y no se da transcripción de genes sensibles a la regulación catabólica por carbono (y entre ellos el gen *lac*). La transcripción de los genes clonados bajo el control de este promotor puede ser inducida, en estos casos, mediante la adición al medio de crecimiento de AMP cíclico.

d) El promotor *tac* es un híbrido de los promotores *trp* y *lac*: la secuencia localizada en la posición -35 deriva del primero de ellos y la localizada en la posición -10 deriva del segundo. Posee la secuencia operadora del promotor *lac* y por lo tanto permite la regulación negativa por parte del represor codificado por el gen *lacI* (y la expresión controlada del gen mediante la adición de IPTG al medio de cultivo). En este caso, sin embargo, el promotor no es dependiente del efecto del AMP cíclico.

② Los genes fúngicos pueden poseer intrones, como ya hemos visto, y los microorganismos procarióticos carecen de los sistemas necesarios para el procesamiento de los mismos. Esto hace necesaria la obtención previa de la secuencia de ADN complementario a partir del

ARNm y su utilización en la construcción del sistema de expresión.

③ Es posible que las proteínas producidas en *E. coli* sean tóxicas para la bacteria, o bien que estas proteínas sean precipitadas en cuerpos de inclusión por el hospedador, con lo que la purificación se dificulta y es necesario modificar las condiciones de expresión (mediante, por ejemplo, el cambio en la temperatura de incubación de la bacteria o el cambio en las concentraciones del compuesto inductor añadido al medio).

La utilización industrial de las enzimas de la ruta de biosíntesis de los antibióticos β -lactámicos para la obtención de antibióticos semisintéticos requería el que su disponibilidad fuera muy grande. Se necesitaban cantidades muy elevadas para satisfacer su demanda, cantidades que no podían ser obtenidas con la aplicación de las técnicas de purificación clásicas. Por ello se han desarrollado nuevas técnicas (basadas en la cromatografía de afinidad, por ejemplo) que han reducido mucho la duración total del proceso y permitido la expresión de los genes de biosíntesis en *E. coli* (de forma que la proteína de interés aparezca de forma mayoritaria en la célula). La expresión en *E. coli* de los genes *pcbC* (Normansell y col., 1979; Carr y col., 1986; Weigel y col., 1988), *penDE* (Tobin y col., 1990; resultados del presente trabajo), *cefEF* (Samson y col., 1987) y *cefG* (Gutiérrez, 1994) ha permitido disponer de una cantidad suficiente de estas enzimas para fines de investigación.

1.6.3.3. Mutagénesis dirigida.

La mutagénesis dirigida consiste en la introducción específica de modificaciones dentro de secuencias de ADN de interés (independientemente de que éstas tengan carácter codificante o no).

La aplicación de estas técnicas a las enzimas de biosíntesis de β -lactamas podría aportar las siguientes posibilidades de interés industrial:

- La mutagénesis dirigida del gen *pcbC* podría ser usada para modificar la IPN sintasa y obtener una molécula que conserve la actividad durante más tiempo y sea menos sensible a la destrucción autocatalítica.

- En el caso del gen *penDE* sería interesante la modificación en el sentido de que la IPN aciltransferasa reconociera núcleos distintos al 6-APA como sustrato. También sería interesante que reconociera la cefalosporina C como sustrato y que fuera capaz de eliminar la cadena lateral de α -aminoadipilo por medio de su actividad amidohidrolásica (se obtendría 7-ACA en un solo paso).

- El producto del gen *cefEF* modificado también podría aceptar compuestos distintos de la penicilina N como sustrato, pudiéndose obtener las cefalosporinas correspondientes a cualquier tipo de penicilina en un solo paso enzimático.

1.6.3.4. Modificación de la regulación.

La existencia dentro de la ruta de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos de genes cuya expresión parece disminuida respecto del resto, como por ejemplo el gen *cefG* de *A. chrysogenum* (Gutiérrez y col., 1997) o el gen *penDE* de *P. chrysogenum* (S. Gutiérrez, comunicación personal) proporciona una base para pensar que el cambio de sus regiones promotoras por otras más eficientes (por ejemplo, las regiones promotoras de genes del metabolismo primario con un alto nivel de expresión) o menos reguladas puede dar lugar a un aumento en la producción del compuesto de interés (Gutiérrez y col., 1997).

1.6.3.5. Utilización de vectores con capacidad de replicarse de modo independiente a los cromosomas fúngicos.

Este es otro avance que favorece el estudio (si se quiere a nivel básico, aunque con muchas posibilidades de aplicación práctica) de la influencia sobre la producción de una secuencia de ADN

determinada, sin interferencias de una posible integración en distintos lugares del cromosoma. En un principio este tipo de vectores solamente se habían obtenido en *Saccharomyces cerevisiae*, mediante la utilización del origen de replicación del plásmido 2 μ m (Beggs, 1978; Som y col., 1988) o la secuencia de replicación autónoma (ARS, en su abreviatura anglosajona) de los cromosomas de la propia *S. cerevisiae* (Struhl y col., 1979; Williamson, 1985). Estos vectores, sin embargo, no eran funcionales en hongos filamentosos,

En 1983 se describieron plásmidos capaces de replicarse de forma autónoma tanto en *E. coli* como en *Neurospora crassa* (Hughes y col., 1983). Una secuencia ARS que permitía la replicación autónoma se aisló a partir del zigomiceto *Mucor circinelloides* (Van Heeswijck y Roncero, 1984) y otras secuencias similares, pero que no eran capaces de conferir la característica de replicación autónoma en hongos filamentosos, fueron clonadas a partir de librerías genómicas de *N. crassa* (Case, 1982) y *A. nidulans* (Tilburn y col., 1983). Skatrud y Queener describieron en 1984 el aislamiento de secuencias de ADN mitocondrial de *A. chrysogenum* que funcionaban como secuencias de regulación autónoma en *S. cerevisiae*. También se han intentado obtener vectores de replicación autónoma en *Ustilago violacea* (Perlin y col., 1990; Bej y Perlin, 1991), *Phanerochaete chrysosporium* (Randall y col., 1989 y 1991) y *Pleurotus ostreatus* (Peng y col., 1992 y 1993).

En 1991, Gems y col. aislaron un fragmento de ADN, llamado *AMA1*, a partir de colonias inestables de *A. nidulans* que habían sido transformadas con una librería genómica (construida sobre un plásmido) de este microorganismo. La secuencia *AMA1* consiste en una región central flanqueada por dos secuencias palindrómicas (secuencias repetidas invertidas) y tiene un tamaño de 6'1 kpb (Fierro y col., 1996b). Se ha comprobado que determinados plásmidos que contienen esta secuencia podían alcanzar eficiencias de transformación en *A. nidulans* 250 veces superiores a las habituales con vectores integrativos (Gems y

col., 1991), aunque los transformantes obtenidos eran inestables mitóticamente. Se ha visto que el fragmento de ADN *AMAI* funciona además como origen de replicación extracromosómico en *Aspergillus niger* (Gems y col., 1991), *Gibberella fujikuroi* (Brückner y col., 1992) y *P. chrysogenum* (Fierro y col., 1996b). En *P. chrysogenum* también se consigue un incremento espectacular de la eficiencia de transformación, comprobándose que es suficiente la presencia de tan sólo una de las secuencias palindrómicas para conferir tanto la mayor eficiencia de transformación como la capacidad de replicación autónoma (Fierro y col., 1996b). Estos autores sugieren, asimismo, que la región *AMAI* podría ser un origen de replicación bidireccional (donde cada repetición serviría como origen de replicación unidireccional) y que la pequeña región central no repetida (0'6 kpb) no afectaría a las características que confiere la secuencia *AMAI* a su plásmido portador y sí a la estabilidad mitótica y al número de copias del plásmido por célula. Los plásmidos en la célula no sufrían, normalmente, reorganizaciones y en varios casos se describió la formación de multímeros.

La región *AMAI*, curiosamente, no confiere las mismas características cuando los plásmidos son transformados en *A. chrysogenum* (Fierro y col., 1996b), lo que sugiere un posible requerimiento de factores aportados por el microorganismo receptor de los plásmidos para el establecimiento de la replicación autónoma (factores que no estarían presentes en *A. chrysogenum* y sí en los otros microorganismos donde se aprecia esta capacidad). La búsqueda de vectores similares para *A. chrysogenum* (basándose en las técnicas descritas para otros hongos filamentosos o en técnicas por desarrollar) presenta también mucho interés, así como el desarrollo de vectores que permitan la integración estable en los hongos de grandes fragmentos de ADN (los llamados "cromosomas artificiales"). Mayor interés tiene aún la combinación de todas estas posibilidades: sólo hay que imaginarse por un momento la expresión en un microorganismo sencillo y de rápido crecimiento (una levadura o una bacteria) de los genes

necesarios para la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos, modificados para ser adaptados a una circunstancia productiva concreta, carentes de cualquier tipo de regulación negativa e incluidos en forma de múltiples copias repetidas en tandem en un cromosoma artificial.

1.6.3.6. Bioseguridad de los microorganismos modificados genéticamente.

Una vez que se han obtenido microorganismos capaces de desarrollar más eficientemente los procesos industriales de interés hay que tener en cuenta que estos microorganismos no existen en el medio ambiente. Esta ausencia, sin embargo, no presupone (como a veces se piensa) que los microorganismos modificados genéticamente no van a ser capaces de adaptarse al medio (aunque bien es cierto que la mayor parte de las cepas superproductoras de antibióticos presentan un metabolismo primario descompensado y son de crecimiento muy lento, por lo que probablemente no serían competitivas en ambientes naturales). La adquisición de una característica nueva podría conferir a estos microorganismos ventajas evolutivas respecto de la microfauna habitual y su liberación incontrolada al medio ambiente podría acarrear riesgos para la salud humana y para el medio ambiente. En este sentido han surgido leyes, tanto comunitarias (90/219/CEE y 90/220/CEE) como españolas (Ley 15/1994), que regulan la utilización de los organismos modificados genéticamente.

Las empresas farmacéuticas están obligadas a cumplir estas normativas y también están interesadas en cumplirlas (la liberación fortuita al medio ambiente de un microorganismo modificado de utilidad supone la posibilidad de que una investigación de muchos años, y muy costosa, pueda ser aprovechada por agentes ajenos a dicha compañía). Puede que la propia biotecnología sea capaz de resolver tanto obligaciones como deseos: la utilización de vectores o genes capaces de inducir "tácticas suicidas" (ocasionar la muerte del microorganismo cuando las condiciones de

crecimiento del mismo no sean las correctas) es una de las posibilidades que muy probablemente se abordará en un futuro no muy lejano.

1.7. Entorno histórico y objetivos del presente trabajo.

El proyecto de Tesis Doctoral que recoge esta memoria se inscribe dentro de la línea de investigación del Área de Microbiología de la Universidad de León que estudia la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos por parte de los hongos filamentosos, mediante la utilización de técnicas de Biología Molecular. Trabajos previos realizados por nuestro grupo permitieron la purificación de la isopenicilina N sintasa (Ramos y col., 1985) e isopenicilina N aciltransferasa (Alvarez y col., 1987) de *P. chrysogenum*. Esta última fue caracterizada mediante técnicas bioquímicas (Alvarez y col., 1993). Las técnicas bioquímicas fueron pronto complementadas con el clonaje y el análisis de la secuencia de ADN correspondiente a los genes *pcbAB* (Díez y col., 1990), *pcbC* (Barredo y col., 1989b) y *penDE* (Barredo y col., 1989c) de *P. chrysogenum*. Estas técnicas permitieron, asimismo, comprobar la existencia de ligamiento entre los genes de la ruta de biosíntesis de penicilina (Díez y col., 1989) y la aparición de fenómenos de amplificación de la región que los contiene en cepas de alta producción (Barredo y col., 1989a; Fierro y col., 1995). Paralelamente se pusieron a punto sistemas de transformación en *P. chrysogenum* (Cantoral y col., 1987; Díez y col., 1987) y se obtuvieron mutantes de *P. chrysogenum* bloqueados en la biosíntesis de penicilina (Cantoral y col., 1993).

Posteriormente se consiguió la resolución de los cromosomas de *P. chrysogenum* (Fierro y col., 1993), la caracterización molecular de mutantes deficientes en la isopenicilina N aciltransferasa (Fernández y col., 1994), la detección de actividades enzimáticas implicadas en el catabolismo de la lisina y su relación con la biosíntesis de penicilina

(Esmahan y col., 1994) y el reconocimiento de las secuencias que flanquean la región amplificada que contiene el agrupamiento *pen* (Fierro y col., 1995).

La ruta de biosíntesis de penicilina también ha sido estudiada en otros hongos filamentosos capaces de sintetizar este antibiótico. Así, se clonó y secuenció el gen *penDE* de *A. nidulans* (Montenegro y col., 1990) y se comprobó la relación de ligamiento con los genes *pcbAB* y *pcbC* tras la resolución de sus cromosomas (Montenegro y col., 1992).

La experiencia acumulada con *P. chrysogenum* y *A. nidulans* facilitó el clonaje y el análisis de la secuencia de ADN de los genes *pcbAB* (Gutiérrez y col., 1991a) y *cefG* de *A. chrysogenum* (Gutiérrez y col., 1992) y la observación del agrupamiento con los genes *pcbC* y *cefEF*, respectivamente. En los últimos tiempos se han caracterizado de forma bioquímica determinadas acetilhidrolasas que podrían desempeñar un papel activo en la degradación de la cefalosporina en los caldos de cultivo (Velasco, 1997).

La expresión del gen *penDE* de *P. chrysogenum* en *A. chrysogenum* (Gutiérrez y col., 1991b) permitió la producción de penicilina G en este último microorganismo y la expresión del gen de la hemoglobina de *Vitreoscilla sp.* permitió aumentar la producción de cefalosporina al facilitar el intercambio de oxígeno (DeModena y col., 1993). También se consiguieron aumentos en la producción de cefalosporina mediante la sustitución de la región

promotora del gen *cefG* por otras secuencias correspondientes a genes del metabolismo primario (Gutiérrez y col., 1997; Velasco, 1997).

El objetivo del presente trabajo se centró en el **análisis en profundidad del gen *penDE* de *P. chrysogenum* y la proteína por él codificada (IPN aciltransferasa)**, labor que se ha visto facilitada por la disponibilidad de los genes *penDE* de *P. chrysogenum* y *A. nidulans* en nuestro laboratorio.

Este análisis se ha centrado fundamentalmente en cinco apartados:

① **El conocimiento de aminoácidos esenciales para la actividad IPN aciltransferásica.**

② **El estudio de la capacidad de procesamiento de la proteína IPN aciltransferasa en *P. chrysogenum* y *A. nidulans*.**

③ **El análisis de secuencias importantes para la localización subcelular correcta de esta proteína.**

④ **La sustitución de la región promotora del gen *penDE* de *P. chrysogenum* por el promotor de un gen del metabolismo primario.**

⑤ **El estudio de la regulación ejercida por regiones de ADN físicamente próximas sobre la expresión del gen *penDE* de *P. chrysogenum*.**

2. Materiales y Métodos.

2.1. Microorganismos utilizados.

2.1.1. Cepas bacterianas.

Bacillus subtilis ATCC 6633 (Lode y col., 1974): Cepa sensible a la acción de antibióticos β -lactámicos utilizada para la valoración de la penicilina G mediante bioensayo.

Escherichia coli DH5 α (Hanahan, 1983): Cepa utilizada normalmente en experimentos de transformación debido a la alta eficiencia que puede conseguirse con ella (hasta 5×10^8 transformantes por microgramo de ADN). Entre sus características más útiles está la de poseer una delección en el gen Z del operón *lac*, que hace que se puedan seleccionar fácilmente con ella aquellos transformantes que posean un plásmido capaz de originar la α -complementación de dicha mutación (el pBluescript[®], por ejemplo). Adquirida a Clontech (Ref. C1021-1).

GENOTIPO: *deoR endA1 gyrA96 recA1 hsdR17(rk₊mk₊) relA1 supE44 thi-1 Δ (lacZYA-argFV169) f80 δ lacZ Δ M15 F⁻ λ ⁻.*

Escherichia coli JM109(DE3) (Yanisch-Perron y col., 1985): Cepa que contiene integrado de forma estable en su cromosoma el gen que codifica para la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (gen 1), expresado bajo el control del promotor *lac UV5* (inducible por medio de IPTG). Se utilizó para la expresión de genes exógenos en *E. coli*. Fue adquirida a Promega (Ref. P9801).

GENOTIPO: *endA1 recA1 gyrA96 thi relA1 hsdR17(rk₊mk₊) supE44 Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZ Δ M15] λ (DE3).*

Escherichia coli LE392 (Maniatis y col., 1982): Cepa susceptible de infección por el bacteriófago lambda y sus derivados. Fue utilizada para la amplificación de bibliotecas genómicas de ADN realizadas en vectores de sustitución derivados del fago lambda. Adquirida a Promega (Ref. K9981)

GENOTIPO: *e14⁻(McrA⁻) hsdR514 supE44 supF58 lacY1 (o Δ (lacIZY)6) galK2 galT22 metB1 tnp55.*

Escherichia coli NM539 (Frischauf y col., 1983): Cepa lisógena para el fago P2, utilizada para detectar recombinantes Spi⁻ derivados de vectores fágicos. Adquirida a Promega (Ref. D1581).

GENOTIPO: *hsdRk⁻ hsdMk⁺ supF ϕ 80 P2.*

Escherichia coli SOLRTM (Greener, 1990): Cepa utilizada para la escisión “in vivo” del plásmido pBluescript SK- durante el proceso de clonaje a partir de bibliotecas de ADNc realizadas en el vector λ ZAP II. Fue adquirida a Stratagene, como parte del sistema Uni-ZAPTM XR (Ref. 237211).

GENOTIPO: *e14⁻(McrA⁻) sbcC recB recJ uvrC Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 umuC::Tn5(kan^R) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ ^R [F' proAB lacI^qZ Δ M15]^c Su⁻.*

Escherichia coli SURE[®] (Greener, 1990): Cepa utilizada en la construcción y análisis de bibliotecas de ADNc. Fue adquirida a Stratagene, como parte del sistema Uni-ZAPTM XR (Ref. 237211).

GENOTIPO: *e14⁻(McrA⁻) sbcC recB recJ uvrC Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 umuC::Tn5(kan^R) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (tet^R)]^c supE44.* Esta cepa contiene una mutación no caracterizada que favorece la α -complementación para dar un color azul más intenso en placas con X-gal e IPTG.

Escherichia coli WK6 mutS: Cepa utilizada para

la conversión de plásmidos bicatenarios portadores del origen de replicación del fago M13 en ADN circular de cadena sencilla. Cedida por R. Zeil.

GENOTIPO: F' *lacI^qZAM15 proA⁺B⁺ galE strA* Δ (*lac-proAB*) *mutS215::Tn10*.

***Escherichia coli* XL1-Blue** (Bullock y col., 1987): Cepa utilizada durante el proceso de clonaje a partir de bibliotecas de ADNc realizadas en el vector λ ZAP II. Fue adquirida a Stratagene, como parte del sistema Uni-ZAP™ XR (Ref. 237211).

GENOTIPO: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZAM15 Tn10*(*tet^R*)]. Una mutación no caracterizada favorece la α -complementación para dar un color azul más intenso en placas con X-gal e IPTG.

***Micrococcus luteus* ATCC 9341:** Cepa supersensible a la penicilina G. Se utilizó para la valoración de penicilina G mediante bioensayo (Alvarez y col., 1987).

2.1.2. Cepas fúngicas.

***Aspergillus nidulans* ATCC 28901** (Ditchburn y col., 1974): Mutante auxotrófico de biotina, seleccionado por su capacidad mejorada de biosíntesis de penicilinas. Produce 4 μ g/mL, como máximo.

GENOTIPO: *bioA1 penA*.

***Aspergillus nidulans* GH79:** Mutante defectivo en la biosíntesis de penicilina, es una cepa auxótrofa de piridoxina y nitrito. Cedida por G. Saunders (Universidad de Westminster, Reino Unido).

GENOTIPO: *ya2 pyroA4 cnxA5 npeA*

***Penicillium chrysogenum* Wisconsin 49-408:** Cepa no productora de penicilina G. Caracterizada en principio como cepa superproductora de penicilina V acilasa (B. Meeschaert, comunicación personal), posiblemente padece una mutación a nivel transcripcional en el primer gen de la ruta de biosíntesis de penicilina (F. Fierro, comunicación personal).

Cepa de baja producción de penicilina (alrededor de 600 μ g/mL). Entre los estudios realizados con esta cepa pueden citarse los de Luengo y col., 1979 y 1980; López-Nieto y col., 1985; Cantoral y col., 1987 y 1993; Díez y col., 1987. Cedida por el Prof. A. L. Demain (M.I.T., Cambridge, MA, E.U.A.).

***Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 *aza^R npe6, npe7 y npe8*:** Cepas obtenidas a partir de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 por mutación con nitrosoguanidina y posterior selección (Cantoral, 1983; Martín y col., 1987; Gutiérrez, 1988; Cantoral y col., 1993; Fernández y col., 1994). Carecen de la capacidad de producción de penicilina, al haber sufrido alteraciones a nivel del último paso de la ruta biosintética de penicilina.

***Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 *aza^R npe10*:** Al igual que las cepas precedentes, se originó por mutagénesis con nitrosoguanidina y no es capaz de producir penicilina. Sin embargo, en este caso no se encuentra alterado un solo gen o producto génico sino que se ha producido la deleción de un gran fragmento de ADN, incluyendo toda la agrupación de genes biosintéticos de penicilina (Gutiérrez, 1988; Cantoral y col., 1993; Fierro y col., 1995).

***Penicillium chrysogenum* AS-P-78:** Cepa de "alta" producción de penicilina (2-3 mg/mL). Obtenida por mutación a partir de cepas derivadas de *P. chrysogenum* NRRL 1951. Entre los trabajos realizados con esta cepa caben destacarse los de Revilla y col., 1986; Barredo y col., 1988 y 1989 (a, b y c) y Fierro y col., 1995. Cedida por Antibióticos S.A. (León, España)

***Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255:**

2.2. Vectores.

2.2.1. Vectores fágicos.

ExAssist™: Fago ayudante derivado del M13, con un tamaño de 5 kpb y usado en el proceso de escisión “in vivo” de clones recombinantes de ADNc. Fue adquirido a Stratagene, como parte del sistema Uni-ZAP™ XR (Ref. 237211)

λ-GEM-12: Vector de sustitución derivado del bacteriófago lambda. Posee la capacidad de aceptar grandes fragmentos de ADN exógeno (entre 9 y 23 kpb). Está formado por tres regiones: brazo derecho (9'2 kpb), brazo izquierdo (20'3 kpb) y zona central dispensable (13'7 kpb). Entre los brazos, que contienen los extremos cohesivos, y la región central dispensable este vector posee dos regiones repetidas invertidas que poseen secuencias de reconocimiento y corte para las endonucleasas de restricción *SacI*, *NotI*, *BamHI*, *EcoRI*, *XhoI* y *XbaI*. Estos sitios de corte son utilizados para el reemplazamiento de la región central por fragmentos de ADN. Fue adquirido a Promega (Ref. B 1530). Normalmente, este vector se introduce en bacterias con genotipo *recBC+* y que por tanto poseen exonucleasa V (responsable de la inhibición de la replicación vírica por el mecanismo del círculo rodante, al degradar los concatémeros formados). En la región central dispensable del fago existe un gen que codifica para una proteína

llamada *gam*, capaz de unirse a la exonucleasa V impidiendo su actividad, por lo que el fago λ-GEM-12 es un vector *gam+* y sus derivados, en los que la región central ha sido sustituida por un fragmento de ADN “extraño”, son *gam-* (en este caso los concatémeros serían degradados por la exonucleasa V). En las circunstancias generadas por la existencia de derivados *gam-*, las únicas moléculas de ADN aptas para la encapsidación son los dímeros circulares cerrados (resistentes a la exonucleasa V) generados por replicación en forma de θ y posterior recombinación. Para favorecer esta recombinación el vector λ-GEM-12 incluye, dentro del brazo derecho, varias copias de un octanucleótido sintético (denominado *chi*) que constituyen “sitios calientes” de recombinación.

La selección de aquellas moléculas en las que la sustitución de la región central ha sido efectiva se consigue por medio de la utilización de bacterias hospedadoras lisógenas del fago P2 (*E. coli* NM539, por ejemplo). En estas cepas no son capaces de formar placas de lisis aquellos fagos con fenotipo *Spi+* (genotipo *red+gam+*), como por ejemplo el fago λ-GEM-12, y sí son capaces de hacerlo fagos con fenotipo *Spi-* (con genotipo *red-gam-*). En este último grupo se incluyen todos los fagos que formarán la biblioteca genómica.

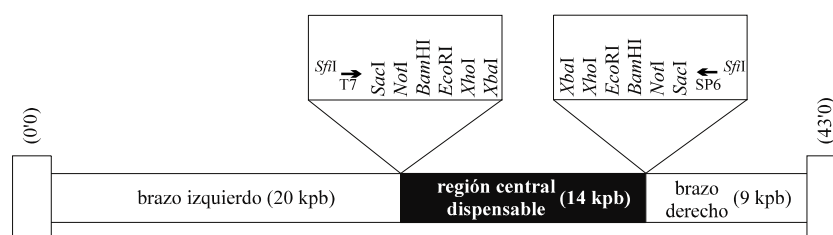


Figura 2.1. Esquema del vector λ-GEM-12.

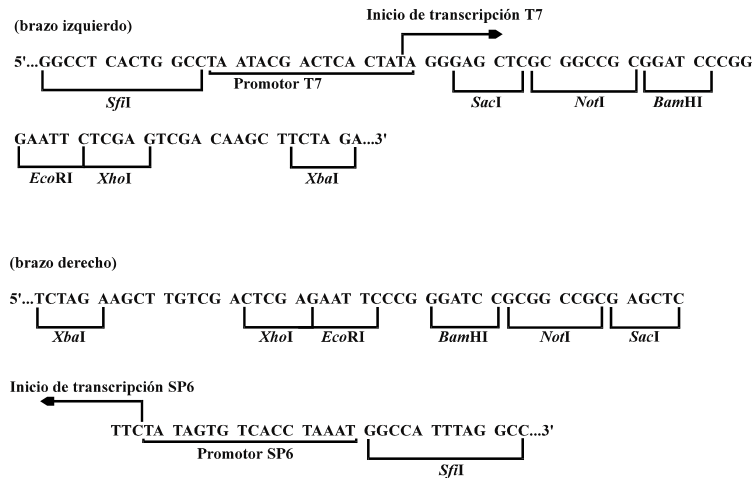


Figura 2.2. Esquema detallado de las regiones de clonaje del vector λ-GEM-12.

λ ZAP II: Es un vector también derivado del bacteriófago λ, utilizado para la construcción de bibliotecas de ADNc. Incluye en su zona central la secuencia completa del plásmido pBluescript® SK-, en cuya región múltiple de clonaje se introducen las secuencias de interés. Este plásmido (circular en condiciones normales) se dispone en el vector en

forma lineal y abierto por el punto de iniciación/terminación de la replicación del fago f1, siendo estas secuencias de ADN responsables de la escisión “in vivo” del pBluescript® SK- y de los insertos correspondientes. Fue adquirido a Stratagene, como parte del sistema Uni-ZAP™ XR (Ref. 237211).

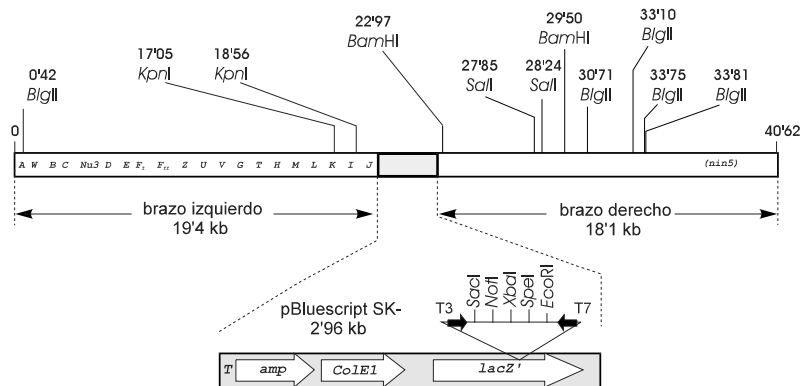


Figura 2.3. Esquema del vector λ ZAP II.

M13K07: Es un derivado del bacteriófago M13. Se caracteriza por la sustitución de G por T en la posición 6.125 (lo que lleva consigo la aparición de isoleucina en vez de metionina en la posición 40 de

la proteína codificada por el gen II) y por la inserción del origen de replicación de p15A y del gen de resistencia a kanamicina del Tn903 en el sitio *AvaI* (posición 5.825). La resistencia a kanamicina es muy útil a la hora de seleccionar las

células infectadas por este fago.

VCSM13: Es un bacteriófago derivado del f1, con un tamaño de 6 kpb y usado para el rescate de ADN de cadena sencilla en el proceso de escisión “in vivo” de clones a partir de bibliotecas de ADNc construidas sobre el vector λ ZAP II. Fue adquirido a Stratagene, como parte del sistema Uni-ZAP™ XR (Ref. 237211).

2.2.2. Vectores plasmídicos.

pBLUESCRIPT® (KS/SK) (+/-): Son plásmidos derivados del pUC19 y comercializados por Stratagene (KS+: Ref. 212207, KS-: Ref. 212208, SK+: Ref. 212205, SK-: Ref. 212206). Sus características principales son las siguientes:

- tienen un tamaño aproximado de 3 kpb.
- contienen un fragmento del gen *lacZ* (subunidad α) capaz de complementar la mutación presente en la β -galactosidasa de algunas cepas de *E. coli* (la denominada α -complementación) y que permite la selección de los transformantes en los que se ha integrado el plásmido por la aparición de

color azul al incubarlos en presencia de IPTG (fuerte inductor del gen *lacZ*) y de X-gal (responsable de la aparición del color al ser utilizado como sustrato por la β -galactosidasa codificada por dicho gen). La inserción de un fragmento de ADN dentro de la región múltiple de clonaje provoca la desaparición de la coloración azul.

- KS indica un sitio múltiple de clonaje orientado 5'-*KpnI*...*SacI*-3' con respecto al extremo 5' del gen *lacZ* y SK la orientación contraria (5'-*SacI*...*KpnI*-3').

- (+) significa que la cadena rescatada al obtener ADN de cadena sencilla es la codificante para el fragmento del gen *lacZ* y (-) que la rescatada es la cadena complementaria. Para conseguir el rescate estos vectores disponen del origen de replicación monocatenaria del fago f1.

- poseen un gen de resistencia a ampicilina (*ap^R*, *bla*).

- contienen el origen de replicación *colE1* para *E. coli* del plásmido pBR322.

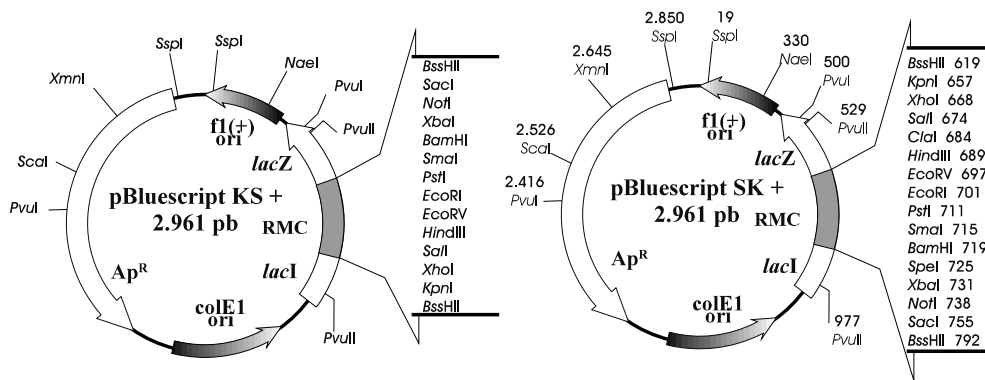


Figura 2.4. Esquemas de los vectores de clonaje pBluescript® KS+ y SK+.

pBC KS+: Plásmido de 3'4 kpb que presenta como marcador de selección para *E. coli* el gen de resistencia a cloranfenicol. Todas sus demás características son idénticas al pBluescript®. También fue adquirido a Stratagene (Ref. 212217).

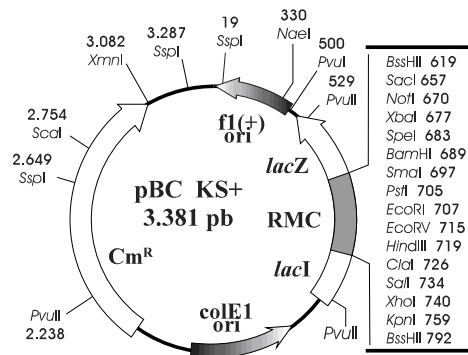


Figura 2.5. Esquema del vector de clonaje pBC KS+.

pT7.7 (Tabor y Richardson, 1985): Vector desarrollado para expresar genes exógenos en *E. coli* bajo el control de un promotor del bacteriófago T7. Posee, como marcador de selección, el gen de resistencia a ampicilina.

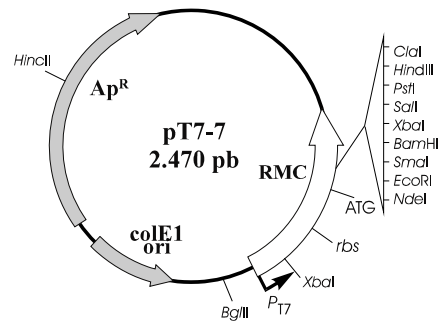


Figura 2.6. Esquema del vector de expresión pT7.7.

pAN52.1 (Punt y col., 1990): Plásmido derivado del pUC19, con el promotor del gen *gpd* (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa) de *Aspergillus nidulans* como inserto. Este promotor ha sido usado por su alto nivel de expresión en hongos.

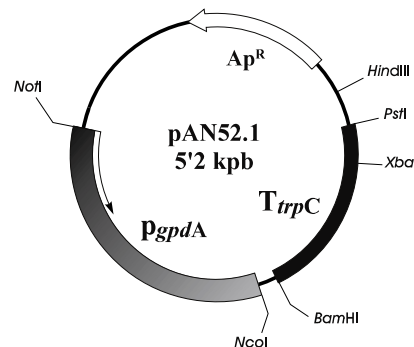


Figura 2.7. Esquema del plásmido pAN52.1.

pB*G* (S. Gutiérrez, no publicado): Plásmido de aproximadamente 4'5 kpb derivado del pBluescript® KS+. Contiene mutado el sitio de reconocimiento para la enducleasa de restricción *Bam*HI en su región múltiple de clonaje. En el sitio de reconocimiento para la enzima *Hind*III incluye un inserto de 1'5 kpb que contiene el gen *pyrG* de *Penicillium chrysogenum* (mutado, asimismo, en un sitio de reconocimiento para la endonucleasa *Bam*HI).

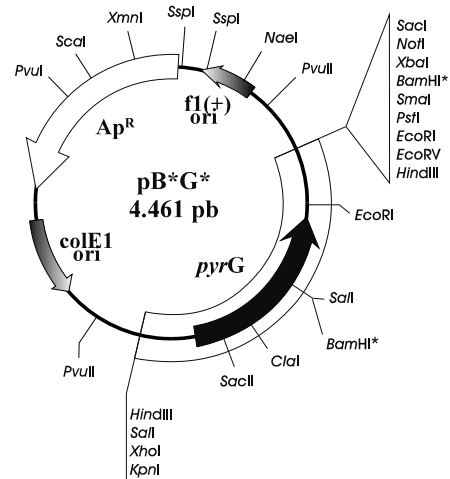


Figura 2.8. Esquema del plásmido pB*G*.

pULAC43 (S. Gutiérrez, no publicado): Plásmido de 4'5 kpb. Contiene el gen de resistencia a fleomicina de *Streptoalloteichus hindustanus* expresado bajo el control de las regiones promotoras del gen *pcbC* de *A. chrysogenum*. Contiene, asimismo la región de terminación de la transcripción del gen *cyc1* de *S. cerevisiae*.

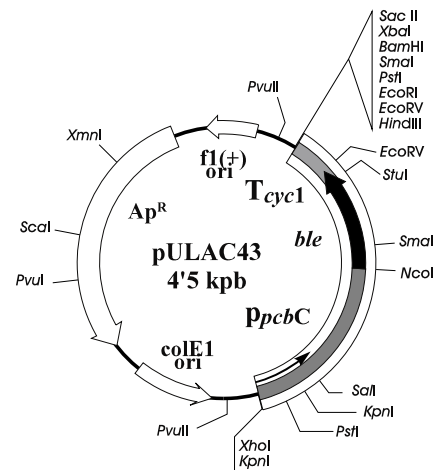


Figura 2.9. Esquema del plásmido pULAC43.

pULC43 (S. Gutiérrez, no publicado): Plásmido de 4'9 kpb. Contiene el gen de resistencia a fleomicina de *Streptoalloteichus hindustanus* expresado bajo el control de las regiones promotoras del gen *pcbC* de *P. chrysogenum*. Contiene, asimismo la región de terminación de la transcripción del gen *cyc1* de *S. cerevisiae* y un gen de resistencia a cloranfenicol.

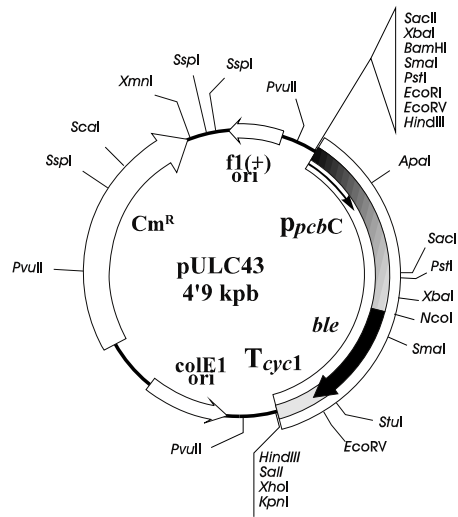


Figura 2.10. Esquema del plásmido pULC43.

pULEM1 (Montenegro, 1996): Plásmido de 5 kpb. Contiene el gen *penDE* de *A. nidulans*.

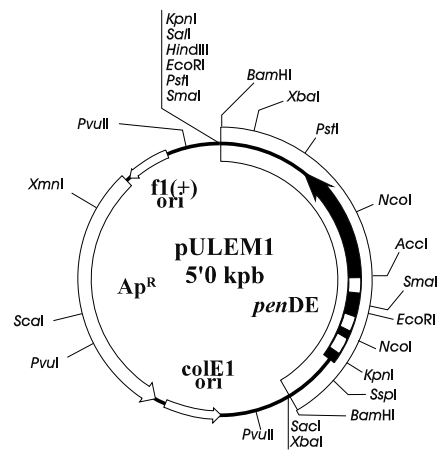


Figura 2.11. Esquema del plásmido pULEM1.

pULJL33 (Barredo, 1990): Plásmido de 8 kpb derivado de pBluescript® KS+, con un inserto compuesto por los genes *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum* con sus respectivas regiones promotoras y la secuencia de ADN comprendida entre dichos genes. El inserto se encuentra en forma de un fragmento de 5'1 kpb con sitios de reconocimiento y corte para la endonucleasa *Sall* en sus extremos.

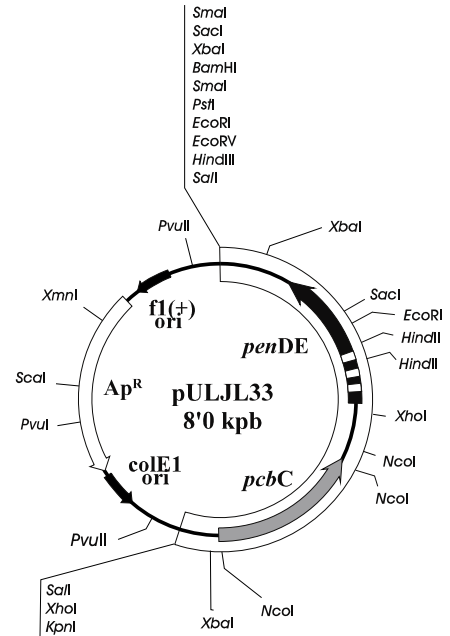


Figura 2.12. Esquema del plásmido pULJL33.

pULJL36 (Barredo, 1990): Plásmido de 5'2 kpb derivado de pBluescript® KS+. Contiene el gen *penDE* de *Penicillium chrysogenum* con su región promotora.

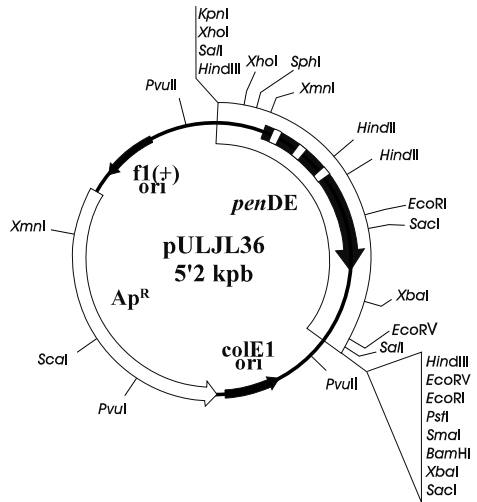


Figura 2.13. Esquema del plásmido pULJL36.

pULJL43 (Barredo, 1990): Plásmido de 4'6 kpb derivado de pBluescript® KS+ con un inserto compuesto por el promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* (0'8 kpb) acoplado al gen de resistencia a fleomicina (*ble*) de *S. hindustanus* (0'4 kpb) y con el terminador del gen *CYC1* de *S. cerevisiae*.

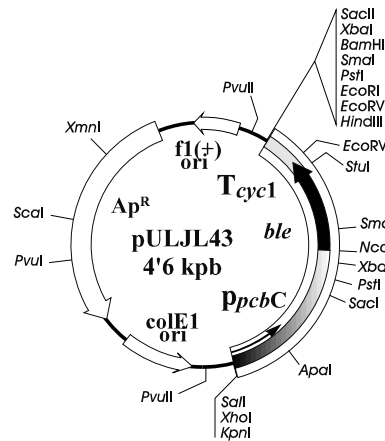


Figura 2.14. Esquema del plásmido pULJL43.

pZ3bDE (Arenós, 1993): Plásmido de 9'7 kpb que contiene la β-galactosidasa de *E. coli* expresada bajo el control de la región promotora del gen *penDE* de *P. chrysogenum*.

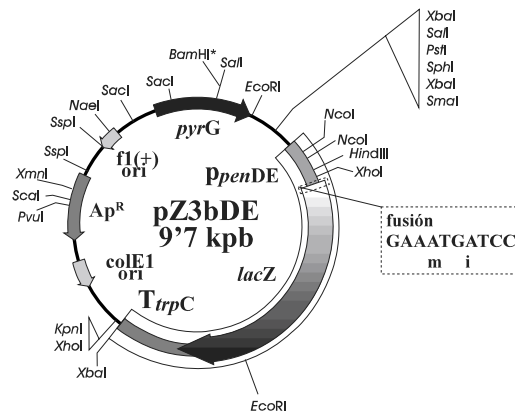


Figura 2.15. Esquema del plásmido pZ3bDE.

2.3. Reactivos y aparatos.

2.3.1. Proveedores.

Los productos utilizados fueron suministrados, en su mayor parte, por alguna de las siguientes casas comerciales:

Aldrich Chemie GmbH & Co. (Steinheim, Alemania)
 Amersham International (Buckinghamshire, Reino Unido)
 Antibióticos S.A. (León, España)
 BDH Chemicals (Poole, Reino Unido)
 Beecham S.A. (Toledo, España)
 Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania)
 Carlo Erba (Milán, Italia)
 Cayla (Toulouse, Francia)
 Clontech (Palo Alto, CA, E.U.A.)
 Difco Laboratories Inc. (Detroit, MI, E.U.A.)
 Gibco BRL (Eggenstein, Alemania)
 Gist Brocades (Delft, Holanda)
 ICN Biomedicals Inc. (Irvine, CA, E.U.A.)
 Merck (Darmstadt, Alemania)
 New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, E.U.A.)
 Panreac (Barcelona, España)
 Pharmacia Inc. (Uppsala, Suecia)
 Probus (Badalona, España)
 Promega Biotec (Madison, WI, E.U.A.)
 Quiagen (Crawley, Reino Unido)
 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, E.U.A.)
 Stratagene (La Jolla, CA, E.U.A.)

2.3.2. Reactivos específicos para biología molecular.

2.3.2.1. Ácidos nucleicos.

El ADN del bacteriófago lambda (usado como marcador de tamaños en los geles de electroforesis tras su digestión con las endonucleasas *HindIII* o *PstI*) fue adquirido a la casa comercial Promega.

El ADN de espermatozoos de salmón se obtuvo de la compañía Sigma Chemical Co.

Los oligonucleótidos sintéticos

(1) 5' -AAG AAA GCT TGG TCA AAG CCT GGC TTG GAT CGC GGA - 3'

(2) 5' -ACT CGT ACG GAA TTC GCG TAC- 3'

utilizados en la mutagénesis de la secuencia de aminoácidos Ala-Asn-Ile del extremo carboxilo terminal de la IPN aciltransferasa de *A. nidulans* fueron sintetizados por Pharmacia Inc.

Otros oligonucleótidos, empleados como cebadores ("primers") en los experimentos de análisis de las secuencias de ADN se describen a continuación:

Cebador KS: 5'-TCG AGG TCG ACG GTA TC-3'

Cebador SK: 5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3'

Cebador T3: 5'- AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'

Cebador T7: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'

2.3.2.2. Antibióticos.

La penicilina G y el ácido 6-aminopenicilánico fueron suministrados por Antibióticos S.A.

La ampicilina se adquirió en forma del preparado farmacéutico Britapen (Beecham S.A.). La tetraciclina, la kanamicina y el cloranfenicol fueron adquiridos a la compañía Sigma Chemical Co.

Finalmente, la fleomicina fue adquirida a la empresa Cayla.

2.3.2.3. Enzimas.

Las enzimas de restricción *AccI*, *AvaI*, *BamHI*, *BglII*, *BglIII*, *BstXI*, *BstEII*, *ClaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HindII*, *HindIII*, *HpaI*, *KpnI*, *NaeI*, *NcoI*, *NdeI*, *PstI*, *PvuI*, *PvuII*, *RsaI*, *SacI*, *SacII*, *Sall*, *Sau3AI*, *ScaI*, *SmaI*, *SphI*, *TaqI*, *XbaI*, *XhoI*, *XmaI* y *XmnI* fueron suministradas por las casas comerciales Gibco BRL, New England Biolabs Inc., Amersham International, Promega Biotec y Boehringer Mannheim.

Las enzimas ADNasa I de páncreas bovino, ARNasa A de páncreas bovino, fosfatasa alcalina de intestino de ternera y ADN ligasa del fago T4 fueron adquiridos a Boehringer Mannheim. La ADN polimerasa I de *E. coli* se obtuvo a partir de Amersham International.

La enzima AmpliTaq[®] ADN polimerasa fue adquirida a Perkin-Elmer.

Las enzimas líticas usadas en la obtención de protoplastos se adquirieron a la compañía Sigma Chemical Co.

2.3.2.4. Isótopos radiactivos.

Amersham International fue la empresa suministradora de la mayoría de los productos radiactivos utilizados, que se detallan a continuación:

[α -³²P]dCTP (>3.000 Ci/mmol; 10 mCi/mL; 370 MBq/mL) para el marcaje por desplazamiento de mella de fragmentos de ADN de doble cadena.

[α -³⁵S]dATP (>600 Ci/mmol; 8 mCi/mL; 296 MBq/mL) para los experimentos de análisis de las secuencias de ADN.

La mezcla [³⁵S]Metionina/Cisteína, Tran³⁵S-Label[™], (1.080 Ci/mmol; 39'96 TBq/mmol) para la detección de la biosíntesis de proteínas en cultivos de *E. coli* fue adquirida a la empresa ICN

Biomedicals Inc.

2.3.2.5. Otros sistemas para la manipulación de ADN y proteínas.

Varios de los procesos descritos en este Capítulo de la Memoria se realizaron mediante el uso de sistemas comerciales que incluyen los componentes necesarios para las reacciones. Estos sistemas comerciales fueron suministrados por Amersham International (sistema Sequenase[™], para el análisis de las secuencias de ADN por el método de los didesoxinucleótidos), Bio-Rad Laboratories (sistema Protein Assay para la cuantificación de muestras proteicas), Promega Biotec (sistemas para el marcaje radiactivo de ADN por medio de la técnica del desplazamiento de mella, sistema Magic[™] DNA Clean-Up para la purificación del ADN marcado y sistema para la detección inmunológica de proteínas inmovilizadas sobre soportes sólidos), Quiagen (Lambda Midi Kit, para la purificación del ADN del fago λ -GEM-12 y sistema Quiaex, para la recuperación del ADN a partir de geles de agarosa) y Stratagene (sistema Uni-ZAP[™] XR para la síntesis de bibliotecas de ADNc y sistema Gigapack II Plus para la encapsidación "in vitro").

2.3.2.6. Marcadores de tamaño para electroforesis de proteínas.

Los juegos de marcadores de tamaño molecular para electroforesis de proteínas fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (MW-SDS-200, con tamaños de 29, 45, 66, 97'4, 116 y 205 kDa) Los marcadores de peso molecular para cromatografía de filtración en gel de proteínas son de Pharmacia Inc. (Gel Filtration LMW Calibration Kit, con tamaños descritos en el apartado 2.26)

2.3.3. Instrumental.

Para llevar a cabo la investigación detallada en la presente memoria se hizo uso, fundamen-

talmente, del instrumental suministrado por las siguientes casas comerciales:

- Afora (Madrid, España): Tubos de vidrio Corex
- American National Can (Greenwich, CT, E.U.A.): Parafilm®.
- Amersham International (Buckinghamshire, Reino Unido): Filtros de nilón Hybond y películas de autorradiografía del tipo Hyperfilm-MP.
- Beckman Instruments Inc. (Palo Alto, CA, E.U.A.): Ultracentrífuga del modelo LB-70.
- Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, E.U.A.): Cubetas de electroforesis, modelos Mini-Protean II y Sequi-Gen.
- Branson Sonic Power Co. (Danbury, CO, E.U.A.): Sonicador Sonifier B-12.
- Crison (Barcelona, España): pHmetro del modelo pH 2000.
- Du Pont Instruments (Wilmington, DE, E.U.A.): Estuches para la exposición de filmes de autorradiografía con pantallas amplificadoras.
- Eppendorf (Hamburgo, Alemania): Microcentrífugas del modelo 5415 y agitador del modelo 5432.
- Gallenkamp (Leicester, Reino Unido): Incubadores orbitales, modelo IMR 250.
- Gilson Medical Electronics Inc. (Middletown, WI, E.U.A.): Bombas peristálticas del modelo Minipuls 2 y pipetas automáticas de los tipos P20, P200 y P1000.
- Hamilton Co. (Reno, NV, E.U.A.): Jeringas de carga para geles de electroforesis de proteínas.
- Hitachi (Tokio, Japón): Espectrofotómetro del modelo U-2000.
- LKB Instruments Inc. (Gaithersburg, MD, E.U.A.): Colector de fracciones del modelo UltraRac II LKB 207 y unidad de electrotransferencia del modelo NovaBlot LKB 2117-005 Multiphor II.
- MAISSA (Barcelona, España): Filtros de nilón Nytal.
- Millipore Corp. (Bedford, MA, E.U.A.): Membranas de filtración, unidades de ultrafiltración Ultrafree, membranas de electrotrans-
- ferencia Inmobilon PVDF y equipo de filtración de agua MilliRo y MilliQ.
- Moulinex: Microondas M41.
- Perkin Elmer (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, E.U.A.): ciclador térmico DNA Thermal Cycler 480.
- Pharmacia Inc. (Uppsala, Suecia): Fuentes de electroforesis del modelo ECPS M3000/150, geles y columnas para cromatografía de filtración en gel y equipo UV-1 para la detección de proteínas.
- Polaroid (Cambridge, MA, E.U.A.): Cámara fotográfica del modelo CV-5 y películas de fotografía de los tipos 667 y 655.
- Sartorius GmbH (Weinheim, Alemania): Balanzas de precisión, modelos 2442 y 1216MP.
- Savant Instruments Inc. (Hicksville, NY, E.U.A.): Centrífuga de vacío modelo SVC-100H.
- Selecta (Barcelona, España): Autoclave del modelo Autester-G, baños con termostato del modelo 320 OR, centrífugas de mesa del modelo S-549, estufas de incubación de los modelos 207, 207A y 237, estufa del modelo 372A para el secado de vidrio y horno de vacío del modelo Vacio-Term 571.
- Schleicher & Schuell Inc. (Keene, NH, E.U.A.): Filtros de nitrocelulosa.
- Sorvall (Newtown, CO, E.U.A.): Centrífugas refrigeradas, modelo RC-5B.
- Spectrum Medical Industries Inc. (Los Angeles, CA, E.U.A.): transiluminador de luz UV Spectroline TR-302.
- Stratagene (La Jolla, CA, E.U.A.): Fijador de ADN UV Stratalinker® 2400
- VirTis (Gardiner, NY, E.U.A.): Liofilizador, modelo BenchTop 3.
- Whatman Laboratory Products Inc. (Clifton, NJ, E.U.A.): Papel 3 MM.

2.4. Medios de cultivo.

2.4.1. Medios de cultivo para bacterias y bacteriófagos.

- **Medio Luria-Bertani (LB)** (Miller, 1972): Medio de cultivo para *E. coli*.

Bacto-triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g

Se ajustó el pH a 7.5 con NaOH y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Para su utilización como medio sólido (**Medio LA**) se añadieron 20 gramos de agar por litro. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 120°C.

- **Medio NZY** (Miller, 1972): Medio para el crecimiento de bacteriófagos.

NZ amina tipo A	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
MgCl ₂ .7H ₂ O	2 g

Se ajustó a pH 7.5 con NaOH y se completó el medio con H₂O hasta 1 litro. Para obtener un medio sólido se añadieron 20 gramos de agar por litro y para su utilización como cobertera se añadieron 7 gramos de agar o agarosa por litro. Se esterilizó en una olla a presión durante 20 minutos.

- **Medio SOB** (Hanahan, 1983): Medio de cultivo para la obtención de células competentes de *E. coli*.

Bacto-triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0.5 g

Se ajustó el pH a 7.5 con KOH y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Para su utilización como medio sólido se añadieron 20 gramos de agar por litro. Se esterilizó en una olla a presión durante 20 minutos. Inmediatamente antes de ser utilizado se añadieron 20 mL de una solución de MgSO₄ 1M esterilizada a través de un filtro estéril de 0.22 µm de diámetro de poro.

- **Medio TB** (Maniatis y col., 1982): Medio utilizado para el crecimiento de *E. coli*, con el fin de obtener el ADN plasmídico.

Extracto de levadura	24 g
Bacto-triptona	12 g
Glicerol	4 mL

Se añadió agua destilada hasta 900 mL y, después de esterilizar en autoclave, se añadieron 100 mL de una solución estéril de KH₂PO₄ 170 mM y K₂HPO₄ 720 mM.

- **Medio TSB** (Maniatis y col., 1982): Medio para el crecimiento de bacterias y para la valoración de antibióticos por bioensayo.

Peptona de caseína	16 g
NaCl	6 g
Peptona de soja	3 g
Glucosa	2.5 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g

Se ajustó a pH 7.0 y se completó con agua destilada hasta 1 litro. Para su uso como medio sólido (**Medio TSA**) se añadieron 20 gramos de agar por litro y cuando se utilizó para la realización de bioensayos se añadieron 10 g de agar por litro. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos.

- **Medio TY 2x** (Maniatis y col., 1982): Medio utilizado para la propagación de bacteriófagos de cadena sencilla.

Bacto-triptona	20 g
Extracto de levadura	10 g

Se ajustó a pH 7.2 con KOH y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos.

2.4.2. Medios de cultivo para hongos.

2.4.2.1. *Penicillium chrysogenum*.

- **MCFP** (Somerson y col., 1961): Medio Complejo de Fermentación de *Penicillium*.

Lactosa	55 g
---------	------

Sólidos de maceración de maíz	35 g
CaCO ₃	10 g
KH ₂ PO ₄	7 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	3 g
Fenilacetato potásico al 40% (p/v)	10 mL

Se ajustó el pH a 6'8 y se completó con agua destilada hasta 1 litro. Se distribuyó en matraces de 500 mL de volumen con 100 mL de medio y se esterilizó en autoclave. Puede utilizarse como medio sólido añadiéndose 25 gramos de agar por litro.

Fenilacetato potásico al 40% (p/v):

Ácido fenilacético	20 g
KOH al 40%	25 mL
Agua destilada hasta	50 mL
pH resultante:	8'0-8'2.

- **MCFP-A:** Medio Complejo de Fermentación para *P. chrysogenum* AS-P-78.

Lactosa	50 g
Pharmamedia	20 g
CaCO ₃	5 g
SO ₄ (NH ₄) ₂	4 g
Fenilacetato potásico al 40% (p/v)	10 mL

Se ajustó el pH a 6'8 y se completó con agua destilada hasta 1 litro. Se distribuyó en matraces de 500 mL de volumen con 100 mL de medio y se esterilizó en autoclave.

- **MCIP** (Somerson y col., 1961): Medio Complejo de Inóculo de *Penicillium*.

Sacarosa	20 g
Sólidos de maceración de maíz	20 g
Extracto de levadura	10 g
CaCO ₃	5 g

Se ajustó a pH 5'7 con NaOH y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Se distribuyó en matraces de 500 mL de volumen con 100 mL de

medio y se esterilizó en autoclave.

- **Medio Czapek:** Medio de esporulación y mantenimiento.

Sacarosa	30 g
NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	0'5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0'5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0'01 g

Se añadió agua destilada hasta 1 litro y agar al 2'5% (p/v). Cuando se usó este medio para la regeneración de protoplastos de *P. chrysogenum* se añadieron sorbitol en una concentración de 1 M o KCl a una concentración de 0'7 M como estabilizadores osmóticos. Se esterilizó en una olla a presión durante 20 minutos. El medio con sorbitol fue usado en transformaciones en las que se integraba el gen de resistencia a fleomicina, debido a la interferencia de las altas concentraciones de sales con el patrón de sensibilidad del hongo receptor a la fleomicina. Para el resto de transformaciones se usó el medio con KCl como estabilizador osmótico.

- **Medio PMI** (López-Nieto y col., 1985): Medio de esporulación y mantenimiento.

Bacto-peptona	5 g
Lactosa	5 g
NaCl	4 g
Sólidos de maceración de maíz	1 g
KH ₂ PO ₄	60 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	50 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	3 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	1 mg

Se ajustó el pH a 5'5 con H₃PO₄ y se añadió agua destilada hasta 1 litro y agar al 2% (p/v). Se esterilizó en autoclave.

- **Medio PMY** (modificado a partir de Anné, 1977): Medio de crecimiento y esporulación.

Glucosa	40 g
NaNO ₃	3 g
Extracto de levadura	2 g
KCl	0'5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0'5 g

FeSO₄.7H₂O 0'01 g (véase Solución SSA) 1 mL

Se ajustó a pH 6'0 y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Se esterilizó en autoclave.

- **Medio PW:** Medio de esporulación y mantenimiento.

Medio PM1 500 mL
Medio Czapek-KCl 0'7 M 500 mL

Se añade agar al 2% (p/v).

2.4.2.2. *Aspergillus nidulans*.

- **Medio ACM** (Cove, 1966): Medio completo de *Aspergillus*.

Glucosa 20 g
Extracto de malta 20 g
Bacto-peptona 1 g
Solución SSA 20 mL
Solución SVA 10 mL

Se ajustó a pH 6'8 y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Para su utilización como medio sólido se añadieron 20 gramos de agar. Se esterilizó en autoclave.

- **Medio MFA** (Ditchburn y col., 1974; Ramón y col., 1987): Medio de fermentación de *Aspergillus*.

Lactosa 70 g
Harina de algodón (Pharmamedia) 20 g
CaCO₃ 10 g
(NH₄)₂SO₄ 7'5 g
Fenilacetato potásico al 40% (p/v) 10mL

Se ajustó a pH 7'2 con NaOH y se añadió H₂O hasta 1 litro. Se esterilizó en autoclave.

- **Medio MMA** (Cove, 1966): Medio mínimo de *Aspergillus*.

NaNO₃ 6 g
KH₂PO₄ 1'52 g
KCl 0'52 g
Solución de elementos traza

Se ajustó a pH 6'5 con KOH 10 N y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Se esterilizó en autoclave. Posteriormente se añadieron 25 mL de glucosa preparada al 40% en agua y 2'5 mL de MgSO₄.7H₂O preparado al 20% en agua y esterilizados por separado. Para su utilización como medio sólido se añadieron 15 gramos de agar por litro. En caso de necesidad el medio puede ser suplementado para complementar los requerimientos nutricionales de determinadas cepas.

- **Medio MSA** (Yelton y col., 1984): Medio de selección de *Aspergillus*.

Agar 15g
NaNO₃ 6 g
KCl 4'76 g
KH₂PO₄ 1'52 g
Solución de elementos traza (véase Solución SSA) 1 mL

Se ajustó a pH 6'5 con KOH 10 N y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Se esterilizó en autoclave. Posteriormente se añadieron 25 mL de glucosa preparada al 40% en agua y 2'5 mL de MgSO₄.7H₂O preparado al 20% en agua y esterilizados por separado. En caso de necesidad el medio puede ser suplementado para complementar los requerimientos nutricionales de determinadas cepas.

- **Solución SSA:** Solución de sales de *Aspergillus*.

KCl 26 g
K₂HPO₄.3H₂O 76 g
Solución de elementos traza 50 mL

Se añadió agua destilada hasta 1 litro y se esterilizó en autoclave. Una vez estéril se añadieron 2'5 mL de una solución de MgSO₄.7H₂O preparada al 20% en agua.

La composición de la solución de elementos traza es la siguiente, en gramos por litro:

ZnSO₄.7H₂O 8'8 g

FeSO ₄ .7H ₂ O	1 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0'4 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0'15 g
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0'1 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0'05 g

Se añadieron las sales a 250 mL de agua destilada. Lentamente y con agitación suave se añadieron 0'2 mL de HCl (37'5%) hasta la completa disolución de los cristales de sales. Finalmente se completó con agua destilada hasta 1 litro y la solución se guardó a 4°C.

- **Solución SVA:** Solución de vitaminas de *Aspergillus*.

Pantotenato cálcico	0'20 g
Ácido nicotínico	0'10 g
Riboflavina	0'10 g
Piridoxina HCl	0'05 g
Tiamina	0'05 g
Ácido p-aminobenzoico	0'01 g
Biotina	0'01 g

Se añadió agua destilada hasta 1 litro y se esterilizó a través de un filtro estéril de 0'22 µm de diámetro de poro. Se conserva a 4°C protegido de la luz.

2.5. Crecimiento de los microorganismos.

2.5.1. Crecimiento de las cepas bacterianas.

Como medios sólidos para el crecimiento de las bacterias se utilizaron normalmente los medios LA o TSA con una concentración de agar del 2% (p/v), mientras que para su uso como medio líquido se utilizaron LB o TSB. Esta regla general se respetó siempre y cuando el microorganismo utilizado o el experimento a realizar no hicieran necesaria una variación (que se indicará en cada caso concreto).

2.5.2. Crecimiento de las cepas fúngicas.

2.5.2.1. Condiciones para la esporulación.

Para la obtención de esporas fúngicas se sembraron los distintos microorganismos en medio sólido y se incubaron en las siguientes condiciones:

Aspergillus nidulans fue sembrado en medio ACM e incubado a 37°C durante 3 días.

Penicillium chrysogenum fue sembrado en medio PW e incubado a 28°C durante 5 días.

2.5.2.2. Condiciones para la producción de antibióticos.

Producción de penicilina G por *Penicillium chrysogenum*.

1. Se inocula un matraz de 500 mL que contiene 100 mL de medio MCIP con 5×10^8 esporas procedentes de una placa de medio PW sembrada e incubada en las condiciones mencionadas anteriormente. Las esporas se recogen con H₂O_d estéril, raspando la superficie de la placa con una pipeta invertida. La suspensión se homogeneiza y se filtra a través de una gasa estéril, cuantificándose la concentración de esporas por recuento en una cámara Thoma. El volumen de la suspensión necesario para alcanzar el número de esporas requerido en la fermentación se centrifuga en un tubo de 10 mL a 4.000 r.p.m., durante 10 minutos. Se desecha el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 3 mL de MCIP, añadiéndose la suspensión de esporas al matraz. Se incuba a 25°C con agitación de 200 r.p.m. durante 36 horas.

2. Una vez transcurrido este tiempo se inocula un matraz de 500 mL que contiene 100 mL de medio MCFP con 5 mL del microorganismo crecido en medio MCIP. Se incuba durante el tiempo que se estime conveniente a 25°C con agitación de 200 r.p.m.. Normalmente se recogen muestras de 1 mL cada 24 horas para controlar la

evolución de la producción de penicilina a lo largo de la fermentación. La producción de penicilina se valoró por bioensayo frente a *Micrococcus luteus* ATCC 9341 o *Bacillus subtilis* ATCC 6633 siguiendo el método descrito previamente (Alvarez y col., 1987). Este método se explica en el apartado 2.2.5.3.

Producción de penicilina G por *Aspergillus nidulans*.

Se utiliza un protocolo similar al de *P. chrysogenum*:

1. Se inocula un matraz de 500 mL que contiene 100 mL de medio MFA con 1×10^8 esporas procedentes de una placa de medio ACM sembrada e incubada en las condiciones mencionadas anteriormente. Las esporas se recogen con H₂O_d estéril, raspando la superficie de la placa con una pipeta invertida. La suspensión se homogeneiza y se filtra a través de una gasa estéril, cuantificándose la concentración de esporas por recuento en una cámara Thoma. El volumen de la suspensión necesario para alcanzar el número de esporas requeridas en la fermentación se centrifuga en un tubo de 10 mL a 4.000 r.p.m., durante 10 minutos. Se desecha el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 3 mL de MFA, añadiéndose la suspensión de esporas al matraz. Se incuba a 25°C con agitación de 200 r.p.m. durante el tiempo requerido (como se puede observar no es necesaria la incubación de un preinóculo en este microorganismo). Se recogen muestras de 1 mL cada 24 horas para controlar la evolución de la producción de penicilina a lo largo de la fermentación, valorándose ésta en la forma descrita en el apartado anterior.

2.5.2.3. Determinación del crecimiento de los microorganismo utilizados.

El crecimiento de las bacterias se determinó calculando la turbidez del cultivo, valorándose la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro.

La determinación del crecimiento de los hongos presenta una problemática mayor: la determinación del peso seco es la mejor opción, pero la

composición del medio complejo de fermentación (con partículas insolubles en suspensión) distorsiona en gran manera los resultados. En los casos en que este parámetro se determinó fue utilizada una variante de la técnica habitual para la valoración del peso seco. Este método consiste en tomar muestras de 5 mL del micelio incubado y recogerlo sobre filtros de nilón Nyltal de 30 µm de diámetro de poro.

El micelio se lava tres veces con 10 mL de ClNa al 0.9% (p/v) y una vez con 10 mL de acetona. Se recoge el micelio y se seca a 80°C en cestillos de peso conocido, durante dos días.

2.6. Mantenimiento de los microorganismos.

Bacterias: Las cepas bacterianas se conservaron a 4°C en placas de Petri selladas con Parafilm® (como máximo durante un mes) o congeladas a -20°C en suspensiones con una concentración final de glicerol del 20% (v/v) o liofilizadas para periodos más largos de tiempo.

Bacteriófagos: Los bacteriófagos se mantuvieron en tampón SM¹ con un 0.1% (v/v) de cloroformo a 4°C o en tampón SM con una concentración del 7% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) a una temperatura de -70°C.

Hongos: Se utilizaron básicamente los dos métodos descritos para el mantenimiento de bacterias. En este caso la concentración final de glicerol en las suspensiones es del 40% (v/v). Hay un método adicional, característico para el mantenimiento de las cepas fúngicas, que consiste en la liofilización de suspensiones de esporas y el mantenimiento de estos liófilos a 4°C.

¹ **Tampón SM:** Gelatina al 0.01% (p/v), MgSO₄ 10 mM, NaCl 100 mM y Tris-HCl 50 mM pH 7.5.

2.7. Aislamiento de ADN plasmídico de *Escherichia coli*

2.7.1. Lisis alcalina

Este procedimiento fue seguido para la obtención de ADN plasmídico a gran escala. El método fue esencialmente el descrito por Maniatis y *col.* (1982).

El proceso detallado es el siguiente:

1. Se inoculan 100 mL de medio TB con células de *E. coli* portadoras del plásmido que se pretende amplificar y se cultivan las células bacterianas durante 12-16 horas a 37°C, con agitación orbital (250 r.p.m.). El medio TB debe suplementarse con un antibiótico que permita el mantenimiento del plásmido dentro de *E. coli*. La concentración final de estos antibióticos en el medio de cultivo fue la descrita por Sambrook y *col.* (1989): 100 µg/mL en el caso de la ampicilina, 50 µg/mL para la kanamicina, 30 µg/mL para el cloranfenicol y 12'5 µg/mL para el caso de la tetraciclina.

2. Se recogen las células por centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos en un rotor Sorvall GSA y se resuspenden en 3 mL de solución GTE² con una concentración de lisozima de 10 mg/mL. Se mezcla bien y se mantiene durante 5 minutos a temperatura ambiente.

3. Se añaden 6 mL de la solución NS³, preparada en el momento. Se mezcla suavemente (una agitación vigorosa origina la ruptura mecánica del ADN genómico de la bacteria hospedadora, lo que se traduciría en una contaminación del ADN plasmídico con el ADN genómico de la bacteria) y se mantiene en hielo durante 10 minutos.

4. Posteriormente se añaden 4'5 mL de una solución, previamente enfriada a 4°C, de

acetato potásico⁴. Se mezcla vigorosamente y se mantiene a 4°C durante 10 minutos.

5. Se centrifuga a 15.000 r.p.m. en un rotor Sorvall SS34 y a 4°C durante 20 minutos. Se recupera el sobrenadante y se pasa a través de un filtro de nilón Nyltal de 25 µm de diámetro de poro. Se recoge el filtrado en un tubo de vidrio Corex[®] y el ADN plasmídico se precipita añadiendo 0'6 volúmenes de isopropanol y manteniendo la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos.

6. Finalmente, se centrifuga a 8.000 r.p.m. en un rotor Sorvall SS34 y a temperatura ambiente durante 10 minutos, lavándose el precipitado con etanol al 70% (v/v). Tras secarlo se resuspenderá en 1 mL de TE⁵.

2.7.2. Minipreparaciones

El método seguido para obtener ADN plasmídico a pequeña escala fue una modificación del descrito por Holmes y Quigley (1981).

1. En primer lugar se pica una colonia con un palillo estéril y se inocula en un tubo Eppendorf estéril con 1 mL de medio TB al que se le añade el antibiótico adecuado para el mantenimiento del plásmido dentro de la bacteria. Se incuba el tubo a 37°C con agitación (250 r.p.m.) durante un mínimo de 6 horas, con el fin de permitir el crecimiento de la bacteria. Este tiempo será mayor (al menos diez horas) cuando se usa cloranfenicol como marcador de selección.

2. Tras este tiempo se recogen las células mediante centrifugación a 5.000 r.p.m. en un rotor Sorvall GSA, durante 3 minutos. El precipitado

² **Solución GTE:** EDTA 10 mM pH 8'0 (ajustado a pH 8'0 con NaOH sólido), Glucosa 50 mM y Tris-HCl 25 mM pH 8'0.

³ **Solución NS:** NaOH 0'2 N y SDS al 1% (p/v).

⁴ **Acetato potásico para lisis alcalina:** Se mezclan 60 mL de acetato potásico, 11'5 mL de ácido acético glacial y 28'5 mL de agua destilada. La solución resultante tiene un valor de pH de 4'8.

⁵ **TE:** EDTA 1 mM pH 8'0 y Tris-HCl 10 mM pH 8'0.

obtenido se resuspende en 350 μ L de STET⁶ y se añaden 10 μ L de una solución de lisozima preparada a una concentración de 10 mg/mL en agua.

3. Se mezcla durante 30 segundos y se hierve durante 45 segundos. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitan por centrifugación a 14.000 r.p.m. durante 10 minutos y se eliminan con la ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipita tras añadir 40 μ L de acetato sódico 3M pH 5'2 y 600 μ L de isopropanol, mezclar y mantener a temperatura ambiente durante 15 minutos.

4. El ADN plasmídico se centrifuga a 14.000 r.p.m. durante 5 minutos y el precipitado se lava con etanol al 70% (v/v). Posteriormente se seca y se resuspende en 30 μ L de TE. Dos microlitros de esta solución son suficientes para llevar a cabo cada uno de los ensayos de digestión con endonucleasas de restricción necesarios para el análisis de los plásmidos recuperados.

2.7.3. Midipreparaciones.

Esta variante de la técnica descrita en el apartado anterior permite el análisis de un mayor número de colonias candidatas a poseer integrado un plásmido de interés. Consiste en inocular el medio con tres colonias distintas y realizar el proceso normal seguido con las minipreparaciones, con lo que el número de colonias analizadas es el triple que en el proceso normal. Una vez detectado el plásmido de interés, la mezcla de ADN que lo comprende es transformada de nuevo en *E. coli*. Aproximadamente la tercera parte de los nuevos transformantes obtenidos incorporarán el plásmido buscado, pudiéndose purificar de forma aislada.

Esta variante es muy útil cuando se debe analizar un gran número de transformantes susceptibles de contener un plásmido de interés y cuando no podemos beneficiarnos de procedimientos de selección basados en cambios de color o resistencia

a un antibiótico. No es válida cuando el tamaño de los plásmidos a analizar supera las 10 kpb, puesto que la cantidad de ADN que se obtiene en estos casos es menor de lo habitual (y puede que no seamos capaces de visualizar correctamente el plásmido de interés tras la electroforesis)

2.7.4. Megapreparaciones.

En algunos casos el ADN plasmídico obtenido por lisis alcalina ofrece problemas a la hora de realizar digestiones con endonucleasas de restricción, apareciendo fragmentos resultantes de la digestión parcial del plásmido. La gran cantidad de sales que acompañan al ADN aislado por esta técnica es la responsable del mal funcionamiento de las enzimas, pudiendo afectar también a la actividad de otras nucleasas (como por ejemplo la exonucleasa III o la ADN ligasa). El ADN de plásmidos obtenido por medio de minipreparaciones no presenta este problema y por ello se ha diseñado una variante de esta técnica que permita el procesamiento de volúmenes de cultivo bacteriano mayores de lo habitual.

Esta técnica se utilizó normalmente, pues, para aquellos experimentos en los que se requería una gran cantidad de ADN fácilmente digerible (fundamentalmente en la generación de delecciones unidireccionales previa al análisis de la secuencia de nucleótidos de los genes, sobre todo en aquellos casos en los que el ADN no fue purificado a través de un gradiente de cloruro de cesio). Los pasos necesarios son los siguientes:

1. Se inoculan 100 mL de medio TB con la colonia que porta el plásmido que queremos amplificar, de la misma forma descrita en el apartado 2.7.1.

2. Tras este tiempo se recogen las células mediante centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 3 minutos. El precipitado obtenido se resuspende en 6 mL de STET y la suspensión de bacterias se reparte en alícuotas de 350 μ L. Los pasos que se siguen a continuación son ligeras modificaciones de los realizados en las minipreparaciones. A cada

⁶ STET: EDTA 50 mM pH 8'0, Sacarosa al 8% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 8'0 y Tritón X-100 al 0'5% (v/v).

tubo se le añaden 20 μ L de una solución de lisozima preparada a una concentración de 10 mg/mL en agua.

3. Se mezcla durante 30 segundos y se hierve durante 45 segundos. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitan por centrifugación a 14.000 r.p.m. durante 15 minutos y se eliminan con la ayuda de un palillo estéril. El precipitado blando que se obtiene en este caso ocupa gran parte del tubo y es muy importante eliminarlo completamente. El ADN plasmídico se precipita tras añadir 40 μ L de acetato sódico 3M pH 5.2 y 600 μ L de isopropanol, mezclar y mantener a temperatura ambiente durante 15 minutos. Este tiempo puede reducirse debido a la gran cantidad de ADN obtenido por este método.

4. El ADN se centrifuga a 14.000 r.p.m. durante 5 minutos y el precipitado se lava con etanol al 70% (v/v). Posteriormente se seca y el precipitado correspondiente a cada alícuota se resuspende en 100 μ L de TE. Tras la resuspensión del ADN se reúnen todas las fracciones en un mismo tubo y se limpia la solución de ADN mediante fenolización. Posteriormente se precipitará de acuerdo a los métodos habituales y se resuspenderá en un volumen adecuado de TE.

2.7.5. Ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio.

En determinados casos se recurrió a esta técnica para obtener preparaciones de ADN plasmídico muy puro. Esto ocurrió fundamentalmente cuando se requería ADN para generar las delecciones unidireccionales que posteriormente se utilizarían en el análisis de su secuencia de nucleótidos. Con el desarrollo de la técnica de las megapreparaciones, que genera ADN de una calidad suficiente para ese proceso, este método (mucho más complicado de realizar y menos económico) fue siendo progresivamente abandonado. El protocolo se describe a continuación:

1. El ADN plasmídico obtenido por la técnica de la lisis alcalina (descrita en el apartado 2.7.1) se resuspende en 8 mL de tampón TE. Se le

añaden 8 gramos de cloruro de cesio, se mezcla bien y se transfiere la solución a un tubo plástico de ultracentrífuga adaptable al rotor Beckman 70.1 Ti (Beckman Instruments Inc.). A continuación se añadió a la solución bromuro de etidio hasta una concentración final de 300 μ g/mL, rellenando el resto del tubo con aceite mineral y evitando la presencia de burbujas.

2. Se sometió la muestra a una centrifugación a 20°C y 45.000 r.p.m. durante 36 horas en una ultracentrífuga Beckman L8-70. Transcurrido este tiempo, se extrajo el tubo y se comprobó bajo luz ultravioleta la presencia en el gradiente de tres bandas definidas y un sedimento. La banda inferior, correspondiente al plásmido circular en su forma covalentemente cerrada se recuperó del tubo mediante punción con una jeringuilla de un mililitro.

3. A continuación se llevaron a cabo 7-8 extracciones con un volumen igual de alcohol isoamílico, para retirar el bromuro de etidio, centrifugándose en cada paso a 1.500 r.p.m. en una centrífuga Eppendorf durante 3 minutos y recogiendo la fase inferior. Tras la última extracción se añadió etanol absoluto frío y se precipitó el ADN. Posteriormente se centrifugó a 4°C y 14.000 r.p.m. en una centrífuga Eppendorf durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y se lavó tres veces el precipitado con 1 mL de etanol al 70% (v/v), para eliminar las sales (desechándose el líquido en cada paso tras centrifugar los tubos a 14.000 r.p.m. durante cinco minutos). Finalmente se resuspendió el ADN en 500 μ L de tampón TE.

2.8. Obtención de ADN del bacteriófago λ y sus derivados.

Este método se utilizó para la obtención de ADN de todos aquellos fagos que mostraron hibridación positiva con las sondas empleadas en el análisis de las distintas bibliotecas genómicas. El análisis del ADN de estos bacteriófagos nos permitirá la posterior identificación y subclonaje de las secuencias de interés.

2.8.1. Infección de células de *E. coli* con el bacteriófago lambda y sus derivados.

Se utiliza la infección en medio sólido para todos aquellos casos en los que se pretende mantener identificado un bacteriófago (o un grupo de ellos), como es el caso de los distintos pasos de la hibridación de bibliotecas genómicas con sondas específicas o como cuando se requiere conseguir la amplificación o aumento en el título de bacteriófagos (unidades formadoras de placas por mililitro). La infección en medio líquido se utiliza casi exclusivamente para la obtención de ADN de bacteriófagos (a diferencia de la infección en medio sólido, al final del proceso se pierde la integridad del bacteriófago por lo que no puede utilizarse para su propagación en *E. coli* a no ser que el ADN obtenido sea sometido a una nueva encapsidación).

1. El primer paso consistiría en la preparación de la cepa de *E. coli* escogida para que pueda ser infectada de modo efectivo por el bacteriófago. Para ello se inoculan 100 mL de medio NZY, suplementado con maltosa al 0.2% (p/v) de concentración final, con una colonia de la cepa de *E. coli* (dependiendo del caso se usaron las cepas LE392, NM539 y SURE) y se incuba a 37°C con una agitación de 200 r.p.m. hasta que el cultivo alcance una densidad óptica a 600 nm de entre 0.5 y 0.8 unidades (entre 4×10^8 y 6.4×10^8 células por mililitro). Se sedimentan las células por centrifugación a 4°C y 5.000 r.p.m. durante 10 minutos y se resuspenden en 1/4 del volumen inicial de MgSO₄ 10 mM (células 4x), cuando se requieren para infección en medio sólido, o en la décima parte del volumen inicial de MgSO₄ 10 mM (células 10x), cuando se utilizarán para la infección en medio líquido. El requerimiento de maltosa en el medio se debe al hecho de que la proteína que actúa como receptora del bacteriófago en la membrana celular está codificada por el gen *lamB*, integrado en el operón que contiene los genes para el aprovechamiento de la maltosa.

2. En el proceso de infección se ponen en contacto las células de *E. coli* anteriormente

preparadas (en una concentración u otra, en función de que se realice infección en medio sólido o líquido) y la suspensión de bacteriófagos (o diluciones de esa suspensión realizadas en tampón SM) y se incuba a 37°C durante 30 minutos. La cantidad de células de *E. coli* y el volumen de la suspensión de bacteriófago utilizados varían en función de que se use un método u otro y se explicará convenientemente en los siguientes apartados.

2.8.2. Amplificación del bacteriófago en medio sólido.

1. Con una punta de pipeta estéril cortada por su extremo más estrecho se recoge la placa de lisis formada por el fago que se quiere amplificar y se introduce en un tubo Eppendorf con 500 µL de tampón SM y 10 µL de cloroformo. Se deja durante 30 minutos en un mezclador y se mantiene a 4°C durante 2-4 horas para permitir la difusión del fago.

2. A continuación se infectan 100 µL de la solución de células 4x de *E. coli* con 10 µL de la suspensión del fago en SM, o con diluciones sucesivas de esta suspensión, y se realiza el proceso de incubación descrito en el apartado anterior. Si se pretende utilizar las placas para la hibridación con sondas específicas es conveniente mantener la mezcla de infección 10 minutos a temperatura ambiente antes de la incubación a 37°C. Con ello se consigue un tamaño homogéneo de los halos de lisis obtenidos tras la infección.

3. Tras la incubación se añaden 3 mL de medio NZY con un 0.7% (p/v) de agar (precalentado a 40-45°C) al tubo con la infección, se mezcla bien y se extiende sobre una base de medio NZY con un 2% (p/v) de agar. Es preciso no mover las placas durante diez minutos para facilitar el que la cobertera se solidifique de forma conveniente. Si el destino de las placas fuese la transferencia a filtros de nitrocelulosa para su posterior hibridación con sondas específicas se usaría además una plataforma niveladora que asegurase una distribución homogénea de los bacteriófagos por toda la superficie de la placa. A veces es conveniente sustituir el agar por agarosa en el medio utilizado

como cobertera.

4. Se incuban las placas a 37°C hasta que aparezcan los halos de lisis o calvas (normalmente a las seis horas se empiezan a ver, en forma de pequeños círculos transparentes sobre el fondo opaco que da a la placa el crecimiento de la bacteria). Para la amplificación se seleccionan aquellas placas en las que la lisis provocada por los bacteriófagos es confluyente (en algunas ocasiones la concentración de la suspensión de bacteriófagos inicial no es suficiente para conseguir este efecto y debe realizarse una amplificación previa). Para la transferencia a filtros se requieren halos de lisis separados y las placas deben ser mantenidas a 4°C durante al menos una hora, continuándose con ellas el protocolo que se describirá en el apartado 2.20.2.

5. Sobre las placas destinadas a la amplificación del bacteriófago se añaden 5 mL de tampón SM y se agita suavemente durante cinco horas a 4°C, con el fin de permitir la difusión del fago desde el medio sólido al líquido añadido.

6. En un tubo de 10 mL se recoge la cobertera y el tampón SM con los bacteriófagos en suspensión, con ayuda de una cucharilla o una espátula estériles. Se añade un 2% (v/v) de cloroformo, se mezcla bien y se centrifuga a 4°C y 10.000 r.p.m. durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante y se procede a la titulación del bacteriófago amplificado por medio de la infección de células 4x de *E. coli* con diluciones seriadas de la suspensión de fagos recién obtenida. A tal efecto se sigue el procedimiento descrito en los pasos 2 a 4 del presente protocolo, teniéndose en cuenta para el cálculo del título del bacteriófago el volumen de la dilución utilizado en la infección, el factor de dilución y el número de placas de lisis que aparece para cada dilución.

2.8.3. Amplificación del bacteriófago M13K07.

El bacteriófago M13K07 se utilizó como adyuvante en los procesos de obtención de ADN de cadena sencilla (apartado 2.22.1) y se amplificó de modo similar al resto de bacteriófagos:

1. La cepa hospedadora es *E. coli* WK6 *mutS* y fue preparada de la forma habitual (apartado 2.8.1). Se infecta la bacteria con diluciones de la suspensión del bacteriófago y se seleccionan las placas en las que se observan halos de lisis aislados (esta cepa suele provocar la aparición de halos de lisis algo turbios).

2. Se pica con una punta cortada estéril uno de los halos de lisis y se resuspende en 500 µL de tampón SM, dejándose que difundan las partículas de bacteriófago al tampón durante 2-3 horas a 4°C.

3. A continuación se infecta 1 mL de las células bacterianas (concentradas 4 veces) con 100 µL de la nueva suspensión de bacteriófagos y la mezcla se incuba 30 minutos a 37°C. Tras este tiempo, la infección se añade a un matraz de 500 mL con 100 mL de medio TY 2x suplementado con kanamicina y se deja durante 12-16 horas a 37°C, con agitación de 200 r.p.m..

4. El cultivo se centrifuga durante 15 minutos a 8.000 r.p.m. y 4°C en un tubo estéril para el rotor Sorvall GSA y el sobrenadante, que es nuestra nueva suspensión de bacteriófago adyuvante, se recoge en una botella estéril.

2.8.4. Amplificación del bacteriófago en medio líquido y obtención de ADN de bacteriófagos.

1. Para la obtención de ADN de bacteriófago se requiere una infección en medio líquido y para ello se mezclan 200-300 µL de las células de *E. coli* concentradas diez veces (10^9 células) con un número 100 veces menor de bacteriófagos (10^7 u.f.p.), incubándose a 37°C durante 30 minutos sin agitación.

2. Transcurrido el periodo de incubación se inocula la infección en un matraz de 500 mL de volumen con 100 mL de medio LB (precalentado a 37°C durante el transcurso de la infección) y se mantiene a 37°C con agitación de 250 r.p.m.

durante el tiempo necesario para que se produzca la lisis total del cultivo bacteriano (entre 5 y 6 horas). Es importante parar la incubación en el momento en que el grado de lisis conseguido es máximo, pues si la incubación se continúa se producirá la aparición en el cultivo de células de *E. coli* resistentes a la acción de los bacteriófagos.

3. El lisado obtenido en el paso anterior se incuba a 37°C durante 30 minutos con 200 µL de la solución L1⁷.

4. Se filtra a través de un filtro de nilón Nyltal de 30 µm de diámetro de poro para eliminar los restos celulares. El filtrado se recoge en un tubo de centrifuga SS34 y se le añaden 20 mL de la solución L2⁸ previamente enfriada. La mezcla se incuba en hielo durante 60 minutos.

5. Se centrifuga a 4°C y 8.000 r.p.m., durante 10 minutos, para precipitar las partículas de bacteriófagos y se desecha el sobrenadante tras el final de la centrifugación.

6. El precipitado obtenido en el paso anterior, distribuido normalmente a lo largo de la pared del tubo, se resuspende suavemente en 6 mL de la solución L3⁹, añadiéndose a continuación 6 mL de la solución L4¹⁰. Se mezcla con cuidado y se incuba a 65°C durante 20 minutos, enfriándose posteriormente la mezcla en un baño de hielo y agua.

7. El paso siguiente consiste en la adición de 6 mL de la solución L5¹¹. La mezcla se agita vigorosamente y se mantiene en hielo durante 15 minutos. Se centrifuga a 4°C y 15.000 r.p.m. durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante en un tubo de vidrio Corex[®], precipitándose el ADN a continuación con 0'7 volúmenes de isopropanol.

8. Se centrifuga a temperatura ambiente y 8.000 r.p.m. durante 20 minutos en un rotor Sorvall SS34 y el precipitado se lava con etanol al 70% (v/v). Se centrifuga a temperatura ambiente y 8.000 r.p.m. durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante y se seca el precipitado. Una vez seco, el ADN se resuspende en 50 µL de TE.

2.8.5. Obtención de ADN del bacteriófago λ-GEM-12.

Cuando se requiere un ADN de bacteriófago de la mayor calidad posible, como es el caso del ADN que servirá de base para la construcción de las bibliotecas genómicas, el método de extracción varía sustancialmente. En esta variante se sigue el mismo protocolo descrito en el apartado anterior hasta el punto 6 (inclusive). A partir de aquí el protocolo se modifica de la siguiente manera:

7. Se añaden 6 mL de la solución L5 y la mezcla se agita vigorosamente, manteniéndose en hielo durante 15 minutos. Se centrifuga a 4°C y 15.000 r.p.m. en un rotor SS-34, durante 30 minutos. El sobrenadante se recoge a través de un filtro de nilón.

8. Se equilibra una columna del sistema Lambda Midi Kit (Quiagen, Ref. 12543) con 3 mL de tampón QBT¹² y se aplica la mitad del sobrenadante obtenido anteriormente, permitiéndose que fluya por la resina contenida en la columna por acción de la fuerza de gravedad.

9. Se lava la columna con 10 mL de tampón QC¹³ y el ADN se eluye con 5 mL del tampón QF¹⁴ en un tubo de vidrio Corex[®].

10. Se repiten los pasos 8 y 9, aplicando el sobrenadante restante y se recoge el ADN en el mismo tubo de vidrio. El ADN se precipita con 0'7

⁷ Solución L1: ARNasa A/ADNasa I 20/1 mg/mL, BSA 0'2 mg/mL, EDTA 10 mM, NaCl 300 mM y Tris-HCl 100 mM pH 7'5.

⁸ Solución L2: NaCl 3 M y PEG 6.000 al 30% (p/v).

⁹ Solución L3: EDTA 25 mM, NaCl 100 mM y Tris-HCl 100 mM pH 7'5.

¹⁰ Solución L4: SDS al 4% (p/v).

¹¹ Solución L5: Acetato potásico 2'55 M pH 4'8.

¹² Tampón QBT: MOPS 50 mM pH 7'0, Etanol al 15% (v/v), NaCl 750 mM y Triton X-100 al 0'15 % (v/v).

¹³ Tampón QC: MOPS 50 mM pH 7'0, Etanol al 15% (v/v) y NaCl 1M.

¹⁴ Tampón QF: MOPS 50 mM pH 8'2, Etanol al 15% (v/v) y NaCl 1'25M.

volúmenes de isopropanol y se centrifuga a 4°C y 8.000 r.p.m. en un rotor SS34, durante 30 minutos.

11. El ADN precipitado se lava con etanol al 70% (v/v) y se deja secar durante 5. Finalmente se resuspende en agua destilada o en TE.

2.9. Obtención de ADN total de *Aspergillus nidulans* y *Penicillium chrysogenum*.

2.9.1. Obtención de ADN total a gran escala.

El método usado para obtener ADN total de hongos a gran escala fue esencialmente el descrito por Specht y col. (1982). Es un método que supone la generación de una alta cantidad de residuos tóxicos y solamente se utilizó para obtener ADN total de aquellas cepas de las que fue necesaria la construcción de una biblioteca genómica. Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Se inocula un matraz de 500 mL con 100 mL del medio líquido adecuado (medio ACM en el caso de *A. nidulans* y medio PMY en el de *P. chrysogenum*) con esporas procedentes de una placa de los medios ACM o PW, respectivamente, con un 2% (p/v) de agar y se incuba a 25°C y 200 r.p.m. en un agitador orbital durante 24 horas (*A. nidulans*) ó 48 horas (*P. chrysogenum*).

2. El micelio resultante del crecimiento del hongo se recoge por filtración a través de un filtro de nilón Nytal estéril de 30 µm de diámetro de poro. El micelio retenido es lavado con 100 mL de NaCl al 0.9% (p/v), con el objetivo de eliminar los componentes del medio de cultivo que pudieran

haber quedado retenidos en el filtro junto con el micelio, y posteriormente con 100 mL de tampón A¹⁵. Se recoge el micelio, se seca con papel de filtro, se congela y se liofiliza.

3. Con la ayuda de un mortero se reducen a polvo 5 gramos del micelio liofilizado y se mezclan con 100 mL de tampón de extracción de ADN¹⁶ al que se le incorpora un 10% (v/v) de tolueno. Se homogeneiza la mezcla y se incuba a 25°C y 100 r.p.m. en un agitador orbital durante 48 horas con el fin de extraer los ácidos nucleicos (es importante que la agitación no sea muy vigorosa porque llevaría consigo la rotura de los ácidos nucleicos de gran tamaño liberados al tampón).

4. Transcurridas las 48 horas se trata la mezcla en un tubo de centrifuga GSA con un volumen de fenol neutro¹⁷. Se mezcla bien, pero muy suavemente, y se centrifuga a temperatura ambiente y 8.000 r.p.m. durante 5 minutos. Se recupera la fase acuosa (superior) y se desproteiniza mediante extracciones sucesivas con fenol-CIA¹⁸ hasta que se obtiene una interfase limpia (normalmente son requeridas al menos 5 ó 6 extracciones). Por último, se efectúa una nueva extracción con un volumen de CIA¹⁹ para eliminar los restos de fenol que puedan interferir con el uso posterior del ADN purificado.

5. Tras esta última extracción se precipita el ADN (fase acuosa) en un tubo de vidrio Corex[®]

¹⁵ **Tampón A:** EDTA 100 mM pH 8.0, NaCl 150 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8.

¹⁶ **Tampón de extracción de ADN:** Tampón A con SDS al 2% (p/v).

¹⁷ **Fenol neutro:** Se mezclan por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con 1 volumen de Tris-HCl 1 M pH 8.0. Se mantiene la mezcla en reposo hasta que se separen la fase superior acuosa y la inferior fenólica. El fenol así preparado se conserva a 4°C en un recipiente opaco, manteniéndose durante al menos un mes. Para la preparación de **fenol ácido** se mezclan 500 mL de fenol sólido con 500 mL de H₂O, se agita, se deja reposar y se retira parte de la fase superior acuosa. Se burbujea con N₂ gaseoso durante 15 minutos y se guarda a 4°C en un recipiente oscuro. En este estado se puede mantener hasta 3 meses.

¹⁸ **Fenol-CIA:** Se prepara mezclando volúmenes iguales de fenol neutro y de CIA.

¹⁹ **CIA:** Se prepara mezclando 24 volúmenes de cloroformo con un volumen de alcohol isoamílico.

a 4°C durante 2-4 horas con 0,7 volúmenes de isopropanol. Se centrifuga a 4°C y 8.000 r.p.m. durante 20 minutos, se desecha el sobrenadante y se lava el precipitado con 5 mL de etanol al 70% (v/v). Se seca el precipitado y se resuspende en 0,5 mL de TE.

2.9.2. Obtención de ADN total a pequeña escala.

Este método se utilizó cuando se requería ADN total de los distintos hongos, normalmente para hibridación con sondas específicas o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es una modificación del autor del presente trabajo de los métodos descritos por Ausubel y *col.* (1987) y Chomczynski y *col.* (1987) para la extracción de ARN total. En esencia, consiste en lo siguiente:

1. Los pasos previos (crecimiento del hongo, recogida, lavado, congelación y liofilización) son idénticos a los descritos en los pasos 1 y 2 del método seguido para la obtención de ADN a gran escala (descrito en el apartado 2.9.1).

2. Se machaca con ayuda de un mortero un gramo de micelio liofilizado y se recoge parte del polvo obtenido en un tubo Eppendorf de 2,2 mL (sin que se superen los 0,5 mL de volumen por tubo, aproximadamente 100 mg de micelio pulverizado). A continuación se añaden 0,5 mL de tampón de rotura I²⁰, se homogeneiza la mezcla y se añaden 0,5 mL de fenol y 0,5 mL de CIA. Se mezcla bien, pero con suavidad, y se incuba a 50°C durante 20 minutos (a los diez minutos de incubación debe mezclarse de nuevo).

3. Transcurrido este tiempo se centrifuga la mezcla a temperatura ambiente y 14.000 r.p.m. durante 5 minutos y se recupera la fase acuosa. La mezcla se desproteiniza mediante extracciones sucesivas con fenol-CIA hasta que se obtiene una interfase limpia (son necesarias 6 ó 7 extracciones).

²⁰ **Tampón de rotura I:** EDTA 100 mM pH 8,0, SDS al 1% (p/v) y Tris-HCl 0,2 M. Se ajusta el pH a 8,2 con HCl.

A continuación se hace una nueva extracción con un volumen de CIA y se precipita el ADN a 4°C durante 2-4 h con 0,7 volúmenes de isopropanol. Se centrifuga a 4°C y 14.000 r.p.m. durante 20 minutos; se desecha el sobrenadante y se lava el precipitado con 1 mL de etanol al 70% (v/v). Finalmente el precipitado se seca y se resuspende en 20 µL de TE.

Este proceso genera una cantidad mucho menor de residuos tóxicos y es mucho más rápido que el método desarrollado para la obtención de ADN a gran escala. La cantidad obtenida (30-50 µg) permite realizar varios experimentos de hibridación (suficientes, por ejemplo, para determinar la existencia de integración de los plásmidos en los transformantes). Esta preparación de ADN es también perfectamente válida para la realización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

2.10. Manipulación del ADN.

2.10.1. Eliminación del ARN y desproteinización del ADN.

Una vez extraído el ADN por cualquiera de los métodos que se han descrito anteriormente es necesario someterlo a un proceso de limpieza antes de que pueda ser utilizado en otros ensayos.

1. El ADN obtenido se trata con ARNasa²¹ (a una concentración final de 100 µg/mL), incubándose a 37°C durante 90 minutos.

2. Una vez transcurrido este tiempo se añade un volumen de fenol neutro, mezclándose bien y centrifugándose a temperatura ambiente y 14.000 r.p.m. durante 5 minutos.

²¹ **ARNasa:** Se disuelve la ARNasa, a una concentración de 10 mg/mL, en una solución con NaCl 15 mM y tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5. La mezcla se hierve durante 15 minutos y se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente. Posteriormente se reparte en alícuotas y se conserva a -20°C.

3. Se recoge la fase acuosa (superior) y se homogeneiza con un volumen de fenol-CIA, centrifugándose en las mismas condiciones citadas en el paso anterior. Se repite este paso hasta obtener una interfase limpia. Normalmente no son necesarias más de dos extracciones en este paso.

4. Llegados a este punto se hace un último tratamiento con un volumen de CIA y se precipita a una temperatura de -20°C con 1/10 del volumen de acetato sódico 3M pH 5'2 y 2'5 volúmenes de etanol absoluto frío.

2.10.2. Reacción en cadena de la ADN polimerasa.

Esta técnica es, conceptualmente, un método muy simple para la amplificación de ácidos nucleicos (Saiki y *col.*, 1985; Mullis y Faloona, 1987). Su fundamento es el proceso natural de la replicación del ADN y, como en él, tras cada paso el número de moléculas de ADN formadas es el doble que las presentes en el paso anterior. Partiendo de una molécula de "ADN diana" podremos amplificar una secuencia específica contenida en ella, mediante la utilización de unos oligonucleótidos o cebadores diseñados al efecto.

El método se basa en la repetición de un conjunto de tres pasos, efectuados de forma sucesiva en unas condiciones determinadas y controladas de temperatura.

2.10.2.1. Desnaturalización.

Las dos cadenas del ADN utilizado como diana en la técnica son separadas mediante la incubación a una temperatura elevada ($92-96^{\circ}\text{C}$). Las hebras disociadas permanecerán en esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la hibridación de los cebadores.

2.10.2.2. Hibridación de los cebadores.

Los cebadores utilizados son un par de oligonucleótidos sintéticos capaces de unirse a secuencias de ADN que limitan físicamente con la

región que se pretende amplificar. Cada uno de ellos es una réplica de una de las dos cadenas del ADN y su diseño es tal que quedan enfrentados por sus extremos 3' tras la unión a la molécula de "ADN diana". La distancia entre ellos en el conjunto ADN-cebadores determinará la longitud de la secuencia de ADN amplificada.

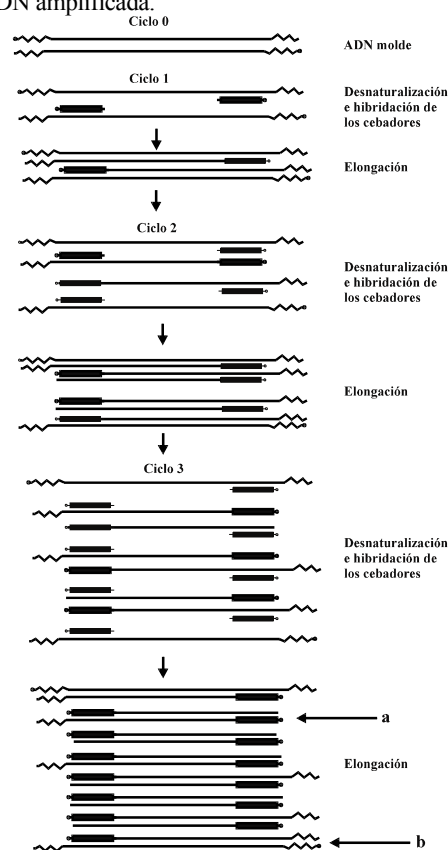


Figura 2.16. Esquema de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Los detalles se indican en el texto.

La asociación de los cebadores a la cadena de "ADN diana" se ve favorecida sobre la renaturalización de la doble cadena de ADN en el momento del descenso de la temperatura por la mucho mayor concentración de los dos oligonucleótidos. La temperatura óptima para la hibridación de estas moléculas al "ADN diana" debe

ser estimada de forma empírica y viene determinada por la composición de nucleótidos de los dos cebadores (es importante, pues, un equilibrio porcentual en la composición de nucleótidos de ambos).

2.10.2.3. Elongación a partir de los cebadores.

El tercer paso en el procedimiento consiste en la elongación de los cebadores en el conjunto ADN-cebadores por la acción de una ADN polimerasa. Las condiciones bajo las cuales se desarrolla este paso dependen directamente del tipo de ADN polimerasa utilizada y el resultado del proceso es la formación de unas cadenas de ADN copiadas de las moléculas diana y que han incorporado en el extremo 5' de su secuencia la del respectivo cebador.

Inicialmente, esta técnica usaba en este paso el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y, por ello, la elongación se desarrollaba a una temperatura de 37°C. Sin embargo, esta enzima no es resistente a una temperatura elevada y debía añadirse enzima nueva tras cada paso de desnaturalización (lo que hacía de la técnica un proceso tedioso y hacía que se acumulase rápidamente enzima desnaturalizada en la muestra). El uso de una ADN polimerasa purificada a partir de un microorganismo termófilo, la Taq ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Saiki y col., 1988), elimina esta necesidad.

En la técnica de reacción en cadena de la ADN polimerasa cada conjunto de estos tres pasos (desnaturalización, hibridación y elongación) constituye un ciclo. A partir del tercer ciclo (Fig. 2.16) se empieza a acumular el producto de interés (**a** en la figura), delimitado por los extremos 5' de los cebadores. A medida que aumenta el número de ciclos este producto pasa a ser la molécula diana a la que se unirán preferentemente las moléculas de cebador presentes en la mezcla, conduciendo a una acumulación teóricamente exponencial del producto. En la mezcla se obtienen también otros productos distintos del de interés (los llamados “productos largos”, **b** en la figura), una de cuyas cadenas deriva de las moléculas originales de “ADN

diana”. Sin embargo, la concentración de estos productos en la mezcla queda diluida en cada paso respecto a las moléculas de interés, siendo prácticamente despreciable cuando se sobrepasan los 20 ciclos en la técnica.

2.10.2.4. Procedimiento experimental.

1. Se prepara en un tubo Eppendorf de 500 µL la siguiente mezcla de reacción, en un baño de hielo y agua:

H ₂ O estéril	53.5 µL
Tampón 10x para la Taq polimerasa ²²	10 µL
Mezcla de nucleótidos I ²³	16 µL
Cebador 1 (20 µM)	5 µL
Cebador 2 (20 µM)	5 µL
ADN molde (1:200)	10 µL
AmpliTaq™ ADN polimerasa (5 U/µL)	0.5 µL

2. Se añaden 75 µL de aceite mineral estéril y se introduce el tubo en un ciclador térmico DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer), incubándose a 94°C, durante 10 minutos.

3. A continuación se aplican 30 ciclos como el que se describirá a continuación:

- ①. Desnaturalización: 94°C, 1 minuto
- ②. Hibridación: 55°C, 1 minuto
- ③. Elongación: 72°C, 1 minuto*

* Depende de la longitud del fragmento a amplificar.

La temperatura a la que se realiza el paso de la hibridación de los cebadores y la duración del paso de la elongación, así como la adición de determinados compuestos químicos a la mezcla de reacción, son parámetros modificables en función de la especificidad de los cebadores y permiten la

²² **Tampón de reacción 10x para la Taq polimerasa:** KCl 0.5 M y Tris-HCl 0.1 M pH 8.3.

²³ **Mezcla de nucleótidos I:** Mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, en una concentración de 10mM cada uno de ellos.

amplificación de moléculas de “ADN diana” que no compartan una identidad del 100% con las secuencias de los cebadores.

2.10.3. Digestión y modificación del ADN.

Las enzimas de restricción y modificación fueron usadas siguiendo las recomendaciones de los distintos proveedores. Cada enzima tiene unas condiciones óptimas de funcionamiento, en cuanto a temperatura, concentración de sales y condiciones de pH (estas dos últimas características las proporciona el tampón de reacción). Como norma general el volumen de la enzima no debe superar 1/10 del volumen total de la mezcla de reacción, debido a la alta concentración de glicerol presente en las soluciones de almacenamiento de las enzimas utilizadas (concentraciones que incluso podrían inhibir por completo la actividad enzimática).

2.10.3.1. Esquema general de la digestión de ADN con una endonucleasa de restricción:

1. En un tubo Eppendorf de 1,5 mL se mezclan, en el orden mencionado, los siguientes componentes de la reacción :

- ⇒ agua destilada estéril hasta completar el volumen final de la mezcla de digestión.
- ⇒ tampón de digestión en la concentración óptima descrita (normalmente se requiere un volumen que sea la décima parte del volumen final de la mezcla, debido a que el tampón se distribuye con una concentración 10 veces mayor de la recomendada para su uso).
- ⇒ n μ g de ADN disuelto en H₂O o en tampón TE (si el ADN está disuelto en tampón TE es recomendable que el volumen utilizado en la mezcla no supere la décima parte del total de la reacción, para evitar modificar las características del tampón de digestión).
- ⇒ $2n$ unidades de enzima.

2. Posteriormente se incuba a la

temperatura adecuada durante 2-3 horas. El ADN digerido se utiliza para su análisis por migración electroforética en geles de agarosa o se limpia mediante fenolización para un posterior uso.

2.10.3.2. Esquema general de reacción de las enzimas de modificación de ADN más usadas.

① Rellenado de los extremos protuberantes del ADN con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*:

1. Se disuelve el precipitado de ADN obtenido tras su purificación y limpieza en 13 μ L de H₂O y se añaden 2 μ L de tampón de reacción 10x para el fragmento Klenow de la ADN polimerasa²⁴.

2. Se añade 1 μ L de cada uno de los nucleósidos trifosfato (la concentración final es de 0,1 mM en cada caso) y 1 μ L (2 unidades) del fragmento Klenow de la polimerasa (Boehringer Mannheim, Ref. 1 008 404) y se incuba a 37°C durante 20 minutos.

3. Una vez finalizada la reacción se inactiva la enzima y se limpia el ADN mediante fenolización. El ADN se precipita a -20°C con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y con 2,5 volúmenes de etanol frío y posteriormente se recupera por centrifugación a 14.000 r.p.m. y 4°C durante 30 minutos.

② Desfosforilación de los extremos 5' del ADN con la fosfatasa alcalina de intestino de ternera:

1. Se disuelve el ADN (0,5 μ g, aproximadamente) en 40 μ L de H₂O y se añaden 5 μ L de tampón de reacción 10x para la fosfatasa alcalina de intestino de ternera²⁵. Se calienta a 65°C durante 10 minutos para asegurar una buena

²⁴ **Tampón de reacción 10x para el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I:** MgCl₂ 0,2 M, NaCl 0,5 M y Tris-HCl 0,4 M pH 7,5.

²⁵ **Tampón de reacción 10x para la fosfatasa alcalina de intestino de ternera:** EDTA 1 mM pH 8,0 y Tris-HCl 0,5 M pH 8,0.

disolución del ADN y se deja enfriar a temperatura ambiente durante 3 minutos.

2. Se añaden 5 μL (5 unidades) de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP, Boehringer Mannheim, Ref. 713 023)) y se incuba una hora a 37°C.

3. Se inactiva la enzima por calentamiento de la mezcla a 65°C durante 10 minutos y se limpia el ADN por fenolización. Se precipita a -20°C con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5'2 y con 2'5 volúmenes de etanol frío.

③ Ensamblaje de fragmentos de ADN con la ADN ligasa del bacteriófago T4:

1. A una cantidad de ADN vector de entre 10 y 40 ng se le añade una cantidad equimolar de ADN inserto (aunque normalmente la ligación se favorece si la relación inserto/vector se duplica).

2. Se añade el H₂O necesaria para alcanzar un volumen final de reacción de 10 μL y se calienta la mezcla a 65°C durante 15 segundos con el fin de relajar los fragmentos de ADN presentes en la mezcla.

3. Se enfría en hielo y se añade 1 μL de tampón de reacción 10x para la ADN ligasa²⁶ y 1 μL (5 unidades) de ADN ligasa del fago T4. (Boehringer Mannheim, Ref. 799 009)

4. Se incuba la reacción a 37°C durante una hora o a 14°C durante 12 horas (la primera de las condiciones se utiliza cuando el ADN a ligar posee extremos cohesivos y la segunda cuando los fragmentos de ADN poseen extremos romos). Las nuevas moléculas generadas durante este proceso son posteriormente transformadas en la cepa de *E. coli* adecuada.

④ Otras reacciones:

Las reacciones con otras enzimas de modificación de uso menos general se describirán con poste-

²⁶ **Tampón de reacción 10x para la ADN ligasa del bacteriófago T4:** ATP 10 mM, BSA 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DTT 200 mM, MgCl₂ 100 mM y Tris-HCl 500 mM pH 7'8.

rioridad en apartados específicos.

2.11. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Se siguieron, básicamente, los métodos descritos por Maniatis y col. (1982) y Sambrook y col. (1989). Se utilizó agarosa SeaKem LE (FMC, Ref. 50004) en concentraciones de entre el 0'3 y el 2% (p/v) y disuelta por calentamiento con microondas en tampón TAE²⁷. La concentración de agarosa utilizada depende del rango de tamaño de los fragmentos de ADN a separar (tabla 2.I).

Concentración de agarosa	Tamaño de los fragmentos de ADN separados
0'3%	5-60 kpb
0'5%	1-30 kpb
0'7%	0'8-12 kpb
1'0%	0'5-10 kpb
1'2%	0'4-7 kpb
1'5%	0'2-3 kpb
2'0%	0'05-2 kpb

Tabla 2.I. Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de los distintos tamaños de fragmentos de ADN.

Las muestras de ADN se mezclaron con un décimo del volumen final de tampón de carga²⁸

²⁷ **TAE 50x:** 57'1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0'5 M pH 8'0, 242 g de Tris base y agua destilada hasta completar un litro.

²⁸ **Tampón de carga 6x:** Azul de bromofenol al 0'25% (p/v), Sacarosa al 40% (p/v) y Xileno cianol al 0'25% (p/v). Se esteriliza en una olla a presión durante 20 minutos. Se conserva a

concentrado y se calentaron durante 5-10 minutos a 65°C, enfriándose posteriormente en un baño de hielo y agua durante 2-3 minutos. El ADN se carga en el gel y la electroforesis se desarrolla en tampón TAE mediante la aplicación de una diferencia de potencial de entre 1 y 5 voltios/cm. La tinción del ADN se realizó con una solución de bromuro de etidio²⁹ (BrEt) en una concentración final de 0'5 µg/mL (el BrEt se intercala en la doble cadena de ADN y permite su visualización tras iluminarse el gel con luz ultravioleta). Los geles se fotografiaron sobre un transiluminador Spectroline TR-302 (emite luz con longitud de onda de 302 nm) con una máquina Polaroid CU-5, utilizándose película 667 de Polaroid.

Los marcadores de tamaño usados y la longitud (en pares de bases) de los fragmentos de ADN generados tras la digestión con determinadas endonucleasas de restricción se muestran a continuación:

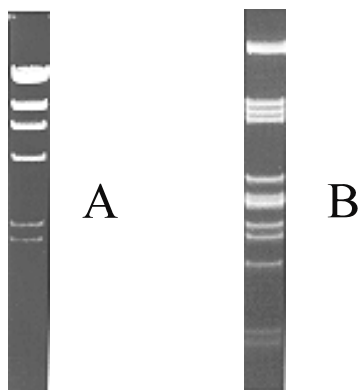


Figura 2.17. A: λ /HindIII y B: λ /PstI.

a.- ADN del fago λ digerido con HindIII (λ /HindIII): 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564 y 125 pb.

b.- ADN del fago λ digerido con PstI (λ /PstI):

11.509, 5.080, 4.649, 4.505, 2.840, 2.577, 2.454, 2.443, 2.140, 1.980, 1.700, 805,516, 467, 448, 339, 265, 247 y 210 pb.

2.12. Extracción de ADN a partir de geles de agarosa.

Se usaron fundamentalmente dos métodos: la extracción por congelación y centrifugación a través de lana de vidrio y la extracción mediante el uso del sistema Quiaex (Quiagen, Ref. 20021).

2.12.1. Extracción por congelación y centrifugación a través de lana de vidrio.

Este método es rápido y sencillo y no requiere del uso de agarosa de bajo punto de fusión, aunque el porcentaje de recuperación no supera el 70% del ADN cargado en el gel (Polman y Larkin, 1989). En esencia, los pasos a seguir son los siguientes:

1. Se practica un orificio en el fondo de un tubo Eppendorf y se bloquea desde el interior con lana de vidrio estéril. Una vez realizada la electroforesis se tiñe el gel por el procedimiento habitual y se corta el trozo de agarosa en el que se encuentra el fragmento de ADN de interés, introduciéndose en el tubo preparado de antemano.

2. Se mantiene el tubo con el trozo de agarosa en su interior a -20°C durante aproximadamente 30 minutos y se centrifuga a 14.000 r.p.m. durante 5 minutos, colocando debajo del tubo Eppendorf perforado uno sin perforar. El tampón que atraviesa la lana de vidrio lleva el ADN disuelto y será recogido en el tubo inferior, mientras que la agarosa queda retenida en la lana de vidrio que obtura el orificio del tubo superior. Tras la centrifugación se añaden 100 µL adicionales de tampón TE y se vuelve a centrifugar a 14.000 r.p.m. durante 1 minuto.

3. La solución obtenida se limpia con fenol-CIA y CIA y el ADN se precipita a -20°C con 1/10 del volumen final de acetato sódico 3M pH 5'2 y 2'5 volúmenes de etanol frío.

4°C para evitar el crecimiento de microorganismos.

²⁹ **Bromuro de etidio:** Se prepara una solución 10 mg/mL en agua y se conserva a 4°C. Para un litro de agua destilada se requieren 50 µL de esta solución.

2.12.2. Extracción mediante el uso de Quiaex.

Es un método más rápido que el anterior, aunque menos económico y sólo se usó cuando el tamaño de los fragmentos de ADN que se querían purificar a partir de los geles de agarosa era inferior a las 300 pb o cuando los requerimientos de tiempo lo hicieron conveniente. Se basa en la unión, específica y reversible, del ADN a partículas de sílica-gel. El protocolo a seguir se detalla a continuación:

1. Una vez realizada la electroforesis y teñido el gel se corta el trozo de agarosa donde se encuentra el ADN de interés y se deposita en un tubo de peso conocido, pesándose a continuación el conjunto tubo-agarosa.

2. Se añade tampón QX1³⁰ al tubo:

a.- Si el fragmento de ADN tiene un tamaño menor de 100 pb se añaden 6 volúmenes de este tampón por volumen de gel (por ejemplo, 600 µL de tampón para cada 100 mg de gel). El mismo volumen de tampón se añade cuando el gel contiene una concentración de agarosa superior al 2%.

b.- Para fragmentos con tamaños comprendidos entre 100 pb y 4 kpb se añaden 3 volúmenes de tampón QX1 por volumen de gel.

c.- Para fragmentos con tamaño superior a las 4 kpb se requieren 3 volúmenes del tampón QX1 y dos volúmenes de agua destilada estéril por volumen de gel.

3. Posteriormente se añaden 10 µL de acetato sódico 3 M con un valor de pH de 5.0

³⁰ **Tampones QX1 y PE:** La composición de estas dos soluciones no es conocida, puesto que no es aportada por los proveedores. Si se sabe que el tampón QX1 contiene una alta concentración de una sal caotrópica, que rompe los puentes de hidrógeno formados entre los monómeros de azúcar que constituyen la agarosa y permite la solubilización del trozo de agarosa. El siguiente lavado con este tampón eliminaría la agarosa restante. El tampón PE contiene etanol y elimina eficientemente las sales contaminantes.

(debido a que la adsorción del ADN a las partículas de sílica-gel es eficiente sólo cuando las condiciones de pH de la mezcla son inferiores a 7.5). Se resuspende la emulsión Quiaex II mediante la mezcla en un agitador durante 30 segundos. Al tubo con el trozo de agarosa y el tampón QX1 se le añaden 10 µL de esta suspensión (para cantidades de ADN superiores a los 2 µg se añadirían 30 µL).

4. Se mezcla bien y se incuba a 50°C durante 10 minutos. Las partículas se mantienen en suspensión mezclando el tubo cada dos minutos.

5. A continuación se centrifuga la muestra durante 30 segundos a 14.000 r.p.m., eliminándose cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta. El precipitado se lava con 500 µL del tampón QX1 para eliminar los contaminantes de agarosa que queden en el tubo.

6. Se centrifuga a 14.000 r.p.m. durante 30 segundos y se desecha el sobrenadante. El precipitado se lava con 500 µL de tampón PE²⁷. Se repite la centrifugación y el lavado con este tampón y el precipitado obtenido al final se deja secar, tras eliminar el sobrenadante con una pipeta, durante 10-15 minutos (o hasta que adquiere un color blanco). Si se usan 30 µL de la suspensión Quiaex II el tiempo de secado aumenta hasta aproximadamente 30 minutos. Los proveedores recomiendan no usar durante el proceso de secado una centrifuga de vacío ni superar en mucho tiempo el periodo de secado para conseguir una máxima eficiencia de elución.

7. El ADN se eluye añadiendo 20 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8.5 o H₂O_d estériles e incubando la solución, tras mezclarla en un agitador, en las siguientes condiciones:

- fragmentos de ADN ≤ 4 kpb: se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos.

- fragmentos de ADN de entre 4 y 10 kpb: se incuba a 50°C durante 5 minutos.

- fragmentos de ADN > 10 kpb: se incuba a 50°C durante 10 minutos.

8. Se centrifuga a 14.000 r.p.m. durante

30 segundos y se recoge el sobrenadante en un tubo limpio estéril. Este sobrenadante contiene el ADN de interés, listo para su uso.

2.13. Fraccionamiento del ADN en gradientes de sacarosa.

Esta técnica se utilizó para seleccionar fragmentos de ADN de un tamaño adecuado para la construcción de bibliotecas genómicas a partir de digestiones parciales del ADN total de distintos hongos. El método seguido fue el descrito por Ausubel y col. (1987):

1. Se preparan 10 mL de un gradiente lineal de sacarosa entre el 10% y el 40% en un tubo de centrifuga Ultra Clear™ (14 x 89 mm, Beckman Instruments). Para ello se depositan 5 mL de la solución de sacarosa al 40%³¹ en el fondo del tubo, añadiéndose por encima con sumo cuidado 5 mL de la solución de sacarosa al 10%. El tubo se sella con Parafilm® y se mantiene en posición horizontal durante cinco horas, en total reposo.

2. Se realizan digestiones parciales a pequeña escala del ADN de *P. chrysogenum* con la endonucleasa de restricción *Sau3A*I. La condición óptima (aquella en la que la mayor cantidad de ADN se encuentra fragmentado en segmentos de aproximadamente 15 kpb) es seleccionada, repitiéndose la digestión parcial de una muestra mayor de ADN para obtener una mayor cantidad de fragmentos del tamaño requerido. Una vez digerido el ADN, la mezcla se calienta 5 minutos a 65°C antes de cargarlo en el gradiente (así se disocian las uniones transitorias entre extremos cohesivos del ADN que se hubieran podido formar y que podrían interferir en el fraccionamiento correcto de las moléculas a lo largo del gradiente).

3. Se carga muy cuidadosamente el ADN en la parte superior del gradiente y se centrifuga a

22°C y 35.000 r.p.m. en un rotor SW41 TI, durante 16 horas.

4. Concluido el proceso se introduce con cuidado en el fondo del tubo un capilar estéril al que se le ha acoplado una goma limpia de bomba peristáltica (para limpiarla se pasan a través de ella 50 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, 50 mL de etanol absoluto y 50 mL de H₂O estéril, por este orden). Con la ayuda de una bomba peristáltica que proporcione un flujo lento y constante se recogen fracciones de 0.5 mL del gradiente. Las primeras fracciones recogidas poseen una concentración de sacarosa cercana al 40%, decreciendo ésta de modo gradual a medida que aumenta el número de fracciones recogidas.

5. Se mezclan 10 µL de cada fracción con 40 µL de agua destilada estéril y 5 µL de tampón de carga concentrado. Se calientan las muestras du-

³¹ Solución de sacarosa al 10%/sacarosa al 40%: EDTA 5 mM, NaCl 1 M, Sacarosa al 10%/40% (p/v) y Tris-HCl 20 mM pH 8.0. Se esteriliza en una olla a presión durante 20 minutos.

rante 5 minutos a 65°C, se enfrían 2 minutos en un baño de hielo y agua y se analizan por electroforesis en un gel de agarosa al 0.3% (p/v) en tampón TAE (éste es también el tampón utilizado durante la electroforesis).

6. A continuación, una vez seleccionadas las fracciones útiles, se diluye cada una de ellas con TE hasta que la sacarosa quede en la muestra en una concentración final aproximada del 10% (tabla 2.II) y se precipita el ADN con 1/10 del volumen de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol frío (si no se diluye la concentración de

sacarosa de la muestra se dificulta la precipitación del ADN, perdiéndose la mayor parte en este paso).

7. Se recupera el ADN por centrifugación; el precipitado se lava con etanol al 70% (v/v), se seca y se resuspende en el volumen adecuado de agua destilada estéril (normalmente 10 µL).

n° de fracción	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
% de sacarosa	40	38.4	36.8	35.2	33.6	32.1	30.5	28.9	27.3	25.7
Volumen de TE (µL)	1.500	1.420	1.340	1.260	1.180	1.105	1.025	945	865	785
Acetato sódico 3M (µL)	200	192	184	176	168	160	152	144	136	128
Etanol absoluto frío (µL)	4.400	4.224	4.048	3.872	3.696	3.530	3.354	3.178	3.002	2.826

n° de fracción	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
% de sacarosa	24.2	22.6	21.0	19.4	17.8	16.3	14.7	13.1	11.57	10
Volumen de TE (µL)	710	630	550	470	390	315	235	155	75	0
Acetato sódico 3M (µL)	121	113	105	97	89	81	73	65	57	50
Etanol absoluto frío (µL)	2.662	2.486	2.310	2.134	1.958	1.792	1.616	1.440	1.264	1.100

Tabla 2.II. Fracciones colectadas a partir del gradiente de sacarosa y volúmenes utilizados en los procesos posteriores de purificación.

2.14. Encapsidación “in vitro” de ADN del fago lambda y sus derivados.

La encapsidación “in vitro”, o integración de fragmentos de ADN dentro de partículas de bacteriófagos, es el método más eficiente para la amplificación y el mantenimiento en *E. coli* del ADN recombinante clonado en los vectores de sustitución derivados del fago lambda. Este procedimiento (Hohn y Murray, 1977) ofrece una serie de ventajas y exige el cumplimiento de varias

condiciones.

2.14.1. Ventajas de la encapsidación.

- La primera de ellas es la obtención de una eficiencia de hasta 10⁹ u.f.p. por µg de ADN, superior en casi dos órdenes de magnitud a las conseguidas habitualmente en los procesos de transformación de los plásmidos en células competentes bacterianas.

- Debido al tamaño de los fragmentos de ADN insertados en el vector, el número de clones que hay que analizar para tener la seguridad de abarcar el genoma completo es mucho menor (lo que facilita enormemente el proceso).

2.14.2. Requisitos de la encapsidación.

Para que la encapsidación “in vitro” sea eficiente se deben cumplir varios requisitos:

- La longitud de cada monómero formado (conjunto de vector e inserto) debe situarse entre las 38'5 y las 52 kpb, es decir debe estar comprendida entre el 78% y el 107% del tamaño del fago lambda silvestre.

- Cada unidad monomérica debe tener dos sitios λcos , uno en cada extremo.

- El ADN debe estar en una conformación física correcta: los multímeros lineales (concatémeros) y circulares resultan adecuados para la encapsidación, mientras que los monómeros circulares son encapsidados con muy baja eficiencia.

2.14.3. Procedimiento de encapsidación.

Durante el proceso de infección la proteína D fágica reconoce las formas multiméricas o concatémeros y las divide en monómeros. El ADN es posteriormente introducido en la cabeza del fago, constituida por la proteína E.

En el proceso se utilizaron extractos con cabezas de fago preformadas (procedentes de la cepa *E. coli* AI89B, la cual no puede encapsidar ADN por sí sola ya que posee una mutación ámbar en el gen D) y colas de fago preformadas (obtenidas a partir de la cepa *E. coli* AI88A, la cual posee una mutación ámbar en el gen E). Estos dos componentes están incluidos en el sistema Gigapack II Gold (Stratagene, Ref. 200215).

La reacción de encapsidación se realizó de la siguiente forma:

1. Se sacan del congelador (es muy importante que los componentes de la reacción de encapsidación se conserven a -70°C) un tubo con el extracto de la cepa AI88A (colas preformadas) y otro con el extracto de la cepa AI89B (cabezas preformadas) y se deja que se descongelen lentamente en hielo.

2. Se añade el ADN (4-7 μL) que se quiere encapsidar al tubo que contiene el extracto de la cepa AI88A e inmediatamente se transfieren a este mismo tubo 15 μL del extracto de la cepa AI89B. Se mezcla suavemente con la micropipeta, sin introducir burbujas de aire.

3. Se centrifuga durante 5 segundos para que todo el contenido se sitúe en el fondo del tubo y se mantiene durante dos horas a 20°C .

4. Transcurrido este tiempo se añaden 500 μL de tampón SM y 10 μL de cloroformo. Se mezcla y se centrifuga brevemente para eliminar los residuos celulares. La suspensión de fagos obtenida se infecta en la cepa de *E. coli* apropiada para el tipo de fago que se va a encapsidar. Los derivados del fago λ del tipo λ -GEM-12 (vectores Spi^{-} , como se mencionó anteriormente) pueden ser propagados en una cepa lisógena de P2, como por ejemplo la cepa NM539 de *E. coli*. El resultado de esta infección determinará si el número de bacteriófagos obtenido es significativamente representativo del genoma completo del hongo.

Para ello se utiliza la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

Esta ecuación fue descrita en 1976 por Clarke y Carbon y relaciona el número de clones recombinantes obtenidos (**N**) con la probabilidad de que un determinado gen se encuentre integrado dentro de alguno de esos clones (**P**) y con la fracción del genoma contenido en cada unidad de recombinación (se define como **f** al cociente entre el tamaño medio de los insertos integrados en el

vector y el tamaño total del genoma que se pretende clonar). El tamaño del genoma de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 es de 33'5 Mpb (Fierro, 1996), por lo que el número de unidades formadoras de placas necesario para tener representado todo el genoma de este microorganismo (con una probabilidad del 99'99% y suponiendo un tamaño de inserto medio de 15 kpb) es de aproximadamente 20.000.

5. La biblioteca genómica encapsidada es estable durante largos periodos de tiempo, pudiéndose conservar a 4°C durante varios meses (en tampón SM con un 1% (v/v) de cloroformo) o durante varios años a -70°C (añadiendo un 7% (v/v) de DMSO a la solución de mantenimiento).

2.15. Obtención de ARN total de *Penicillium chrysogenum*.

La mayor dificultad que se presenta en la obtención de ARN es debida, en general, a la existencia de ARNasas, enzimas muy activas y que no necesitan cofactores en el desarrollo de su actividad. Cualquier método que pretenda ser válido para la extracción de ARN debe cumplir una serie de premisas:

❶ La extracción del ARN ha de realizarse en una solución que contenga algún agente capaz de inactivar las ARNasas (como el fenol o el isotiocianato de guanidina).

❷ Debe ser un método rápido y realizado en condiciones que no favorezcan la actuación de las ARNasas. Esto puede conseguirse, por ejemplo, efectuando el proceso de rotura del micelio en presencia de nitrógeno líquido (proporciona una temperatura de -170°C que no permite la actividad de estas enzimas).

❸ El método no debe ser tan brusco como para que se provoque la pérdida de la integridad física del ARN.

❹ Independientemente del método utilizado, es muy importante el uso de guantes a lo largo de todo el proceso así como el aumento en el nivel de exigencia en cuanto al grado de limpieza del material utilizado y del lugar de trabajo.

Las moléculas de ARN más representadas en la célula son las de ARN ribosómico (ARNr) y las de ARN de transferencia (ARNt), siendo minoritarias las moléculas de ARN mensajero (ARNm). Estos últimos, sin embargo, presentan como característica diferencial la presencia de una cola de poliadenosina en su extremo 3', lo que puede ser aprovechado para su separación de los otros dos tipos de ARN mediante la utilización de técnicas de cromatografía de afinidad con una matriz de oligo(dT)-celulosa.

2.15.1. Obtención de ARN total a gran escala.

Este método sólo fue usado cuando se requirió una alta cantidad de ARN con vistas a la purificación de ARNm. Básicamente se siguió el método descrito por Ausubel y col. (1987) para la purificación de ARN a partir de tejidos vegetales, con alguna modificación:

1. Se incuba el hongo en el medio, condiciones y tiempo determinados como óptimos para la realización de los estudios con el ARN.

2. Una vez incubado durante el tiempo adecuado, el micelio es recogido por filtración a través de filtros de nilón Nylal estériles de 30 µm de diámetro de poro y es lavado con un volumen de NaCl al 0'9% (p/v) estéril. Inmediatamente se congela el micelio con nitrógeno líquido y se guarda a -20°C ó -70°C hasta su uso. El micelio congelado se machaca en un mortero de porcelana (previamente lavado con etanol y cloroformo y conservado en todo momento muy frío con nitrógeno líquido) hasta que se convierte en polvo.

3. Se mezclan 5 gramos de polvo de micelio machacado con 50 mL de tampón de rotura

I para ARN³² y con 16'6 mL de fenol equilibrado con TLE (fenol-TLE³³) en un tubo de centrifuga GSA. Se homogeneiza agitando suavemente durante 10 minutos y se añaden 16'6 mL adicionales de cloroformo. Se mezcla suavemente durante 10 minutos y se incuba a 50°C durante 20 minutos, mezclándose de nuevo cada 5 minutos.

4. Se centrifuga durante 20 minutos a 8.000 r.p.m. y 4°C. Se recoge la fase acuosa y se repiten las extracciones con 100 mL de fenol-TLE/cloroformo hasta que se obtenga una interfase limpia. Se extrae una última vez con 100 mL de cloroformo para eliminar los restos de fenol y se recupera la fase superior acuosa en un tubo limpio y estéril.

5. El ARN se precipita selectivamente añadiendo 1/3 del volumen final de LiCl 8 M-DEPC³⁴ (la concentración final de LiCl en la solución es de 2 M) y manteniéndose la mezcla a 4°C durante 10-12 horas. Posteriormente se centrifuga durante 20 minutos a 8.000 r.p.m. y 4°C y el precipitado se lava con 3 mL de LiCl 2 M-DEPC, resuspendiéndolo finalmente en 6 mL de agua-DEPC (normalmente es preciso calentar un poco el ARN a 65°C) y pasándose la suspensión a un tubo de vidrio Corex[®] limpio y estéril.

6. Se precipita nuevamente el ARN tras añadir 2 mL de LiCl 8 M-DEPC, mezclar y mante-

ner la mezcla a 4°C durante 2-4 horas. Se centrifuga de la misma forma descrita en el paso anterior y se lava el precipitado con 5 mL de LiCl 2 M-DEPC, resuspendiéndolo finalmente en 2 mL de agua-DEPC.

7. Por último, el ARN se precipita a -20°C con 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M-DEPC pH 4'8 y 2'5 volúmenes de etanol absoluto frío. En estas condiciones el ARN se puede conservar durante años.

2.15.2. Obtención de ARN total a pequeña escala.

El método usado para obtener ARN a pequeña escala fue una variante del descrito por Chomczynski y *col.* (1987) y se utilizó preferentemente cuando no se requería una alta cantidad de ARN o para experimentos en los que fuera necesaria la extracción y análisis de un gran número de muestras de ARN. El desarrollo del proceso fue el siguiente:

1. Se incuba el hongo en las condiciones determinadas previamente y se recoge el micelio por filtración (o por centrifugación si el volumen es pequeño), congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido. En este estado puede conservarse a -20 ó -70°C hasta que se necesite.

2. El micelio se reduce a polvo de la misma forma descrita en el paso 2 del apartado anterior y se introduce en uno o más tubos Eppendorf de 2'2 mL sin que se superen los 0'5 mL de volumen por tubo. A continuación se añaden 0'5 mL del tampón de rotura II³⁵, se homogeneiza y se añaden 0'5 mL de fenol-TLE y 0'5 mL de cloroformo. Se mezcla bien y se incuba a 50°C

³² **Tampón de rotura I para ARN:** TLE con SDS al 1% (p/v). El **tampón TLE** es una mezcla de EDTA 4'5 mM pH 8'0, LiCl 0'1 M y Tris-HCl 0'2 M y el valor del pH se ajusta a 8'2 con HCl.

³³ **Fenol equilibrado con TLE (Fenol-TLE):** Se mezclan 250 mL de fenol ácido, 0'5 mL de NaOH 15 M y 250 mL de TLE. Se agita, se elimina la fase acuosa y se extrae una vez más con 250 mL de TLE. Finalmente se elimina la fase acuosa y se conserva a 4°C en un recipiente opaco hasta su uso (no es recomendable usar una mezcla que tenga más de dos semanas de antigüedad).

³⁴ **Tratamiento de soluciones con dietilpircarbonato (DEPC).** Es importante que todas las soluciones que se usen en el proceso de extracción de ARN, excepto aquellas que lleven en su composición Tris-HCl, sean tratadas con DEPC con el fin de inactivar las ARNasas. Para ello se añade un 0'2% (v/v) de DEPC a la solución que se desea tratar, se mezcla por agitación con una barra magnética durante 2-4 horas y se esteriliza en autoclave.

³⁵ **Tampón de rotura II:** Se disuelven en fenol equilibrado con TLE los siguientes compuestos: EDTA 4'5 mM, isotiocianato de guanidina 4M, LiCl 0'1 M, SDS al 1% (p/v) y Tris-HCl 0'2 M. El pH final es de 7'0 y se conserva a 4°C en un recipiente opaco.

durante 20 minutos, con una suave agitación a los 10 minutos.

3. A partir de este punto el proceso es idéntico al del protocolo anterior con la salvedad de que hay que tener en cuenta que el volumen de la fase acuosa (superior) con el ARN disuelto es sólo de 1 mL, por lo que los volúmenes utilizados a partir de este momento deberán ser escalados a esta cantidad.

2.16. Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes (agaro-sa-formaldehido).

Esta modalidad de electroforesis se utiliza para conseguir separar las moléculas de ARN en función de su tamaño. Para ello se añade formaldehido como agente desnaturalizante, con el fin de evitar la formación de estructuras secundarias. Para el desarrollo de esta técnica se siguió el método descrito por Sambrook y col. (1989).

1. En la preparación de un gel de 14 x 11 cm (100 mL de volumen de gel) se mezcla una solución compuesta por 1'2 gramos de agarosa, 10 mL de MOPS 10x³⁶ y 70'8 mL de H₂O₂-DEPC, se introduce en una botella y se esteriliza en una olla a presión durante 20-30 minutos. Se deja enfriar hasta 60°C y se añaden 18 mL de formaldehido al 37% (v/v). Se mezcla bien y se extiende sobre una bandeja de electroforesis nivelada, donde se deja enfriar durante 30 minutos. Todo el material de electroforesis que vaya a estar en contacto con el gel debe ser lavado previamente con H₂O₂ y etanol absoluto.

2. Se preconditiona el gel en tampón MOPS (1 litro) con una diferencia de potencial de

60 voltios durante 30 minutos, mientras se completa la preparación de las muestras a cargar en el gel.

3. Se preparan las muestras:

- a.- 5-10 µg de ARN
- b.- 2 µL de MOPS 10x
- c.- 3'5 µL de formaldehido al 37% (v/v)
- d.- 10 µL de formamida
- e.- H₂O₂-DEPC hasta 20 µL

La mezcla se calienta a 65°C durante 10 minutos e inmediatamente se enfría en un baño de hielo y agua durante 3-5 minutos. Tras este tiempo se le añaden 2'2 µL de tampón de carga concentrado para ARN³⁷.

4. Se cargan las muestras en el gel, preferentemente dentro de una campana de extracción de gases (manteniéndose nivelado el conjunto de gel y cubeta de electroforesis) y se aplica una diferencia de potencial de 80 voltios durante 3-4 horas.

2.17. Purificación de ARNm de *Penicillium chrysogenum*.

La purificación del ARNm procedente de células eucarióticas se basa, como ya se ha mencionado, en la cromatografía de afinidad. Mediante esta técnica se aprovecha la existencia de una cola de poliadenosina en estas moléculas y su capacidad de unión a un oligonucleótido sintético de politimidina, acoplado a una matriz (normalmente celulosa). La oligo(dT)-celulosa puede ser adquirida comercialmente (Boehringer Mannheim), con lo que podríamos elaborar nuestras propias columnas, o pueden adquirirse directamente las columnas preparadas (Stratagene).

³⁶ **MOPS 10x:** Acetato sódico 0'05 M, Ácido 3-(N-morfolino)propano-sulfónico (MOPS) 0'2 M y EDTA 0'01 M. Se ajusta el pH a 7'0 con NaOH 10 N y se esteriliza en autoclave (después de esterilizada la solución adquiere color amarillento).

³⁷ **Tampón de carga concentrado para ARN:** Azul de bromofenol al 4% (p/v), EDTA 1 mM, Glicerol al 50% (v/v) y Xileno cianol al 4% (p/v).

El protocolo de preparación de la columna a partir de la resina comercial es el siguiente:

1. Se resuspenden 0'5 gramos de oligo(dT)-celulosa en 10 mL de tampón de elución, se mezcla bien y se introduce la suspensión en una jeringa de 1 mL con lana de vidrio estéril en el fondo.

2. Se lava la columna con 2-3 volúmenes de:

- ①- H₂Od-DEPC,
- ②- NaOH 0'1 M y EDTA 5 mM,
- ③- H₂Od-DEPC, de nuevo, y
- ④- Tampón de muestra 1x. Se repite este último paso hasta que el pH del líquido eluído sea de 7'5.

El proceso de purificación del ARNm a partir del ARN purificado es el siguiente:

1. Se disuelve el ARN en 0'9 mL de H₂Od-DEPC y se calienta durante 5 minutos a 65°C. A continuación se pone la muestra en un baño de hielo y agua y se mezcla con 0'1 mL del tampón de muestra 10x³⁸.

2. Se añaden a la columna 200 µL de tampón de alta concentración salina³⁹ y se presiona con el émbolo de la jeringa para que pase a través de la resina de oligo(dT)-celulosa, con un flujo aproximado de una gota cada dos segundos. Se repite el lavado de la resina con tampón de alta concentración salina.

3. A continuación se carga en la columna la muestra con el ARN y se fuerza el flujo a través de la columna de la misma forma descrita en el paso anterior. Se recoge el líquido eluído en un tubo estéril y se vuelve a aplicar dos veces más en

la columna con el fin de facilitar la unión del ARNm presente en la muestra.

4. Se lava la columna dos veces consecutivas con 200 µL de tampón de alta concentración salina y tres veces con 200 µL de tampón de baja concentración salina⁴⁰.

5. El ARNm se eluye con cuatro aplicaciones sucesivas de 200 µL del tampón de elución⁴¹ precalentado a 65°C.

6. Se evalúa la cantidad y limpieza del ARNm obtenido midiendo la densidad óptica a 260 nm y 280 nm. Una densidad óptica a 260 nm igual a 1 es la asignada a una solución acuosa con una concentración de 40 µg/mL de ARN y un cociente D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ igual a 2 es característico de una preparación de ARN pura.

7. Si el ARNm está demasiado diluido para nuestros fines (por ejemplo si se pretende sintetizar el ADN complementario) se precipita a una temperatura de -20°C durante 10-12 horas añadiendo a la solución de ARNm 1/10 del volumen final de acetato sódico 3 M pH 5'2 y 2'5 volúmenes de etanol frío. Posteriormente se resuspendería en un menor volumen de H₂Od-DEPC.

2.18. Construcción de bibliotecas de ADN complementario.

Una biblioteca de ADN complementario (ADNc) representa la información genética capaz de codificar para el ARNm de una población celular en un momento puntual de su crecimiento, por lo tanto sólo contiene secuencias de ADN que se transcriben y no están representadas en ella

³⁸ **Tampón de muestra 10x:** EDTA 1 mM, NaCl 5 M y Tris-HCl 10 mM pH 7'5.

³⁹ **Tampón de alta concentración salina:** EDTA 1 mM, NaCl 0'5 M y Tris-HCl 10 mM pH 7'5.

⁴⁰ **Tampón de baja concentración salina:** EDTA 1 mM, NaCl 0'1 M y Tris-HCl 10 mM pH 7'5.

⁴¹ **Tampón de elución:** EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM pH 7'5.

aquellas secuencias sin capacidad codificante. Las moléculas de ARNm son extremadamente lábiles por lo que es de gran interés su conversión en una molécula bicatenaria de ADNc, mucho más estable y fácil de manipular.

La utilización del ADNc se ve además reforzada por el hecho de que en los eucariotas los genes pueden presentar intrones en su secuencia, intrones que no están representados en el ARNm maduro y que, por lo tanto, tampoco lo estarán en el ADNc. El uso del ADNc nos permitirá, por ejemplo, la expresión en organismos procarióticos de genes que normalmente poseen intrones.

Para la construcción de estas bibliotecas se ha utilizado el sistema ZAP-cDNA[®] diseñado por Stratagene (Ref. 200400). El bacteriófago utilizado como vector en este sistema, denominado Uni-ZAP XR, contiene dentro de su secuencia de nucleótidos la del plásmido pBluescript[®] SK-, y es precisamente entre los sitios de reconocimiento y corte para las endonucleasas *EcoRI* y *XhoI* de la región múltiple de clonaje de este plásmido donde se integran los insertos de ADNc. Una vez seleccionados los clones que portan fragmentos de interés para nosotros es posible la liberación de las moléculas de plásmido con su inserto por un mecanismo de escisión “in vivo”, realizándose los

análisis posteriores ya con moléculas plasmídicas.

2.18.1. Síntesis de la primera cadena de ADNc.

La transcriptasa reversa es una enzima capaz de generar una cadena de ADN complementaria al ARNm, usando como cebador una secuencia de poli-dT (que hibrida con la secuencia de poli-dA del ARNm) que contiene, además, una secuencia de reconocimiento y corte para la endonucleasa de restricción *XhoI* (importante para el desarrollo del posterior proceso de clonaje). El uso de ARN hace que las precauciones que deban tomarse sean las mismas que se describieron en el apartado 2.15.

En la síntesis de esta primera cadena se utiliza una mezcla de nucleótidos que contiene 5-metil-dCTP con lo que el ADNc sintetizado queda protegido de la posible acción de las endonucleasas de restricción que se utilizarán en los pasos posteriores.

El protocolo seguido (Fig. 2.18) se describe a continuación, numerándose de modo correlativo todos los pasos englobados en el proceso de obtención de la biblioteca.

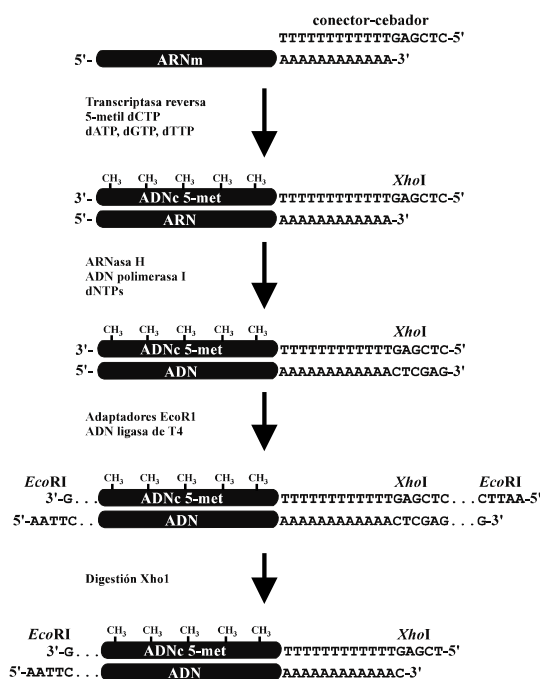


Figura 2.18. Esquema de obtención del ADNc, utilizado en la construcción de una biblioteca de ese material, y de su adaptación para el clonaje en el interior del vector λ ZAP II. Los pasos seguidos se describen en el texto.

1. En primer lugar, se mezclan suavemente en un agitador los siguientes componentes, añadidos a un tubo Eppendorf en el orden indicado:

Tampón 10x para la transcriptasa reversa ⁴²	5 μ L
DTT 0'1 M	3 μ L
Mezcla de nucleótidos II ⁴³	3 μ L
Conector-cebador (1'4 μ g/ μ L)	2 μ L
ARNm en H ₂ Od-DEPC	31'5 μ L
Bloqueante de la ARNasa I	1 μ L

Una vez mezclados, se añaden 2'5 μ L de

transcriptasa reversa M-MuLV (el volumen final de la reacción es, por lo tanto, de 50 μ L) y se incubaba a 37°C durante 1 hora, enfriándose a continuación la reacción en un baño de hielo y agua.

2.18.2. Síntesis de la segunda cadena de ADN.

2. Se añaden nuevos componentes al tubo de reacción precedente del paso anterior, en el orden siguiente:

⁴² **Tampón 10x para la transcriptasa reversa:** KCl 0'4 M, MgCl₂ 60 mM y Tris-HCl 0'5 M pH 8'3.

⁴³ **Mezcla de nucleótidos II:** dATP 10 mM, dGTP 10 mM, dTTP 10 mM y 5-metil-dCTP 5 mM.

Tampón 10x para la

segunda cadena ⁴⁴	40 µL
DTT 0'1 M	15 µL
Mezcla de nucleótidos III ⁴⁵	6 µL
H ₂ Od estéril	277'6 µL

Se mezclan mediante agitación moderada y se añaden las siguientes enzimas:

ARNasa H (1U/ µL)	4'9 µL
ADN polimerasa I (14'5 U/ µL)	6'9 µL

Se vuelve a mezclar suavemente y se incuba a 16^oC durante 2'5 horas. La ARNasa H rompe la cadena de ARNm unida a la primera hebra de ADNc sintetizada. Los huecos creados por la ARNasa H sirven a la ADN polimerasa I para la síntesis de la segunda cadena de ADNc. Transcurrido el tiempo se introduce inmediatamente el tubo con la reacción en un baño de hielo y agua.

3. Se añaden 400 µL de fenol neutro-CIA y se mezcla vigorosamente durante 5 minutos, centrifugándose a 14.000 r.p.m. durante 3 minutos.

4. Se recoge la fase superior acuosa y se precipitan las moléculas, de doble cadena ya, del ADNc a -20^oC durante 12 horas añadiendo 33'3 µL de acetato sódico 3M pH 5'2 y 867 µL de etanol absoluto frío.

5. El ADNc se recupera por centrifugación a 4^oC y 14.000 r.p.m. durante 20 minutos. El precipitado se lava con etanol al 70% (v/v), se seca y se resuspende en 39 µL de agua destilada estéril.

2.18.3. Rellenado de los extremos

⁴⁴ **Tampón 10x para la segunda cadena:** MgCl₂ 70 mM y Tris-HCl 0'5 M pH 7'5.

⁴⁵ **Mezcla de nucleótidos III:** dATP 10 mM, dGTP 10 mM, dTTP 10 mM y dCTP 26 mM.

del ADNc bicatenario sintetizado.

6. Se mezclan los siguientes componentes:

ADNc	39 µL
Tampón 10x para la ADN polimerasa del fago T4 ⁴⁶	5 µL
Mezcla de desoxinucleótidos 2'5 mM	2'5 µL
ADN polimerasa del bacteriófago T4 (3'2 U/µL)	3 µL

7. Se incuba la reacción a 37^oC durante 30 minutos y se mezcla con 50 µL de H₂Od estéril, realizándose una extracción con un volumen de fenol-CIA y otra con un volumen de CIA.

8. La fase superior acuosa se transfiere a otro tubo y se precipita a -20^oC durante una hora con 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M pH 5'2 y 2'5 volúmenes de etanol frío.

9. A continuación se precipita el ADNc, que ahora posee extremos romos, y se lava con etanol al 70% (v/v) y se seca.

2.18.4. Ensamblaje del ADNc a los adaptadores *EcoRI*.

10. Se disuelve durante 1 hora a 4^oC el ADNc precipitado procedente del paso anterior en 7 µL de una solución comercial de adaptadores *EcoRI*, preparándose la siguiente mezcla:

ADNc + adaptadores	7 µL
Tampón 10x para la ADN ligasa del bacteriófago T4 ⁴⁷	1 µL
rATP 10 mM	1 µL
ADN ligasa del bacteriófago T4 (4 Unidades/ µL)	1 µL

Se mezcla bien y se incuba a 8^oC durante 12 horas.

⁴⁶ **Tampón 10x para la ADN polimerasa del fago T4s:** MgCl₂ 70 mM y Tris-HCl 0'5 M pH 7'5.

⁴⁷ **Tampón 10x para la ADN ligasa del bacteriófago T4:** DTT 10 mM, MgCl₂ 70 mM y Tris-HCl 0'5 M pH 7'5.

11. Transcurrido este tiempo se inactiva la enzima mediante calentamiento a 70°C durante 30 minutos.

2.18.5. Fosforilación de los extremos del ADNc.

12. Se añaden los siguientes ingredientes a la mezcla anterior:

Tampón 10x para la ADN ligasa del bacteriófago T4	1 µL
rATP 10 mM	2 µL
Agua destilada estéril	6 µL
Polinucleótido quinasa del bacteriófago T4 (10 U/µL)	1 µL

Se mezcla bien y se incuba a 37°C durante 30 minutos.

13. Se inactiva la enzima por calentamiento a 70°C durante 30 minutos.

2.18.6. Digestión con la endonucleasa de restricción *Xho*I.

14. La reacción se completa con:

Tampón suplementario para la endonucleasa <i>Xho</i> I ⁴⁸	28 µL
<i>Xho</i> I (40 U/µL)	3 µL

Se mezcla bien y se incuba a 37°C durante 1'5 horas.

2.18.7. Selección del tamaño del ADNc por cromatografía a través de

una columna de Sephacryl S-400.

2.18.7.1. Preparación de la columna.

Se rellena una jeringa de 1 mL cuyo fondo ha sido obturado con un trozo de algodón o lana de vidrio estériles con Sephacryl S-400 y se centrifuga a 2.500 r.p.m. durante 2 minutos. Se llena de nuevo la jeringa hasta las 3/4 partes de su volumen con la matriz y se centrifuga en las mismas condiciones. Se equilibra con 100 µL de STE.

2.18.7.2. Fraccionamiento.

15. Se añaden 5 µL de STE 10x a la mezcla de digestión obtenida en el paso anterior y se aplica toda la muestra a la columna de Sephacryl S-400 previamente equilibrada. Se acopla la columna a un tubo Eppendorf con la tapa cortada y se introduce el conjunto en un tubo de 10 mL, centrifugándose a continuación a 2.500 r.p.m. en una centrifuga de mesa durante 2 minutos. Se recoge el tubo Eppendorf con la primera fracción de ADNc y se cambia por un nuevo tubo. Se añaden 60 µL de STE a la columna y se centrifuga del mismo modo descrito anteriormente obteniendo en el tubo Eppendorf la segunda fracción de ADNc. Del mismo modo se recogen las fracciones tercera y cuarta. A continuación se utiliza la décima parte de cada fracción para realizar una electroforesis en un gel de agarosa del 1% (p/v).

16. Se trata cada una de las fracciones con fenol-CIA y con CIA y se precipitan a -20°C durante 12 horas añadiendo un volumen de etanol absoluto frío. Se recupera el ADNc centrifugándolo a 4°C y 14.000 r.p.m. durante 30 minutos. Se lava el precipitado con etanol al 70% (v/v), se seca y se resuspende cada fracción en 10 µL de agua destilada estéril. Por último se determina la concentración de ADN en cada una de las fracciones (en la reacción posterior de ensamblaje con el vector es importante mantener una relación de 100 ng de ADNc por microgramo de vector). En nuestro caso se utilizó la primera de las fracciones recogidas, debido a su mayor concentración.

⁴⁸ Tampón suplementario para la endonucleasa *Xho*I:
Acetato potásico 0'2 M pH 7'5 y β-mercaptoetanol 1 mM.

2.18.8. Ensamblaje del ADNc al

vector.

17. Se mezclan los siguientes componentes en un tubo Eppendorf, en el orden indicado:

ADNc	100 ng
Tampón 10x para la ADN ligasa del fago T4	0'5 µL
rATP 10 mM	0'5 µL
Vector λ ZAP II digerido con las endonucleasas <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> y tratado con fosfatasa alcalina	1 µL
Agua destilada estéril hasta 4'5 µL	
ADN ligasa del bacteriófago T4 (4 U/µL)	0'5 µL

Se incuba durante 12 horas a 12°C.

18. A continuación se realiza una encapsidación “in vitro”, de la forma descrita en el apartado 2.16, de la mezcla de ensamblaje. Es conveniente usar en la encapsidación extractos procedentes de cepas de *E. coli* con un genotipo *mcrA*⁻, *mcrB*⁻ y *mrr*⁻ para evitar la destrucción del ADN hemimetilado.

19. Se calcula el título de la biblioteca de ADNc sintetizada utilizando la cepa *E. coli* SURE como cepa hospedadora (esta cepa posee un genotipo *recA*⁻, *mcrA*⁻, *mcrCB*⁻ y *mrr*⁻ y no destruye el ADN metilado, lo que ocurre en la mayor parte de las cepas de *E. coli*). El porcentaje de fagos recombinantes obtenidos se determina mediante la infección de distintas diluciones de la suspensión de fagos en la cepa de *E. coli* hospedadora y la extensión sobre placas con coberteras preparadas de acuerdo a la siguiente composición:

- ①.- 3 mL de medio NZY con un 0'7% (p/v) de agar purificado +
- ②.- 15 µL de IPTG 0'5 M +
- ③.- 50 µL de X-gal en una concentración

de 250 mg/mL (preparado en dimetilformamida).

Las placas se incuban a 39°C durante aproximadamente 6 horas.

El vector λ ZAP II (con una molécula de pBluescript® SK- en su interior) posee la capacidad de desarrollar la α-complementación de la mutación presente en la β-galactosidasa de determinadas cepas de *E. coli* (la cepa SURE incluida). Por ello, los halos de lisis formados por los bacteriófagos que no hayan incluido ningún inserto tendrán un fondo de color azul, mientras que los correspondientes a bacteriófagos recombinantes no tendrán esta coloración.

20. Finalmente se amplifica la biblioteca de ADNc en la cepa *E. coli* SURE en la forma habitual y se conserva a 4 y -70°C, siguiendo las técnicas ya descritas.

2.19. Escisión “in vivo” del plásmido pBluescript® SK- y sus insertos a partir de bacteriófagos derivados del vector λ ZAP II.

El vector λ ZAP II ha sido diseñado para permitir la escisión “in vivo” y la recircularización de una parte de su molécula (la correspondiente al pBluescript® SK-), incluyendo los fragmentos de ADNc que han sido clonados dentro de ella. Esta escisión “in vivo” depende de ciertas secuencias de ADN presentes en el genoma del fago λ ZAP II y de la existencia de varias proteínas, entre las que destacan algunas pertenecientes a un bacteriófago adyuvante.

Las proteínas mencionadas reconocen secuencias de nucleótidos localizadas normalmente en el genoma del bacteriófago adyuvante y definidas como “origen de replicación” para la síntesis de la hebra positiva de su ADN. En el vector λ ZAP II se encuentran integradas, de forma separada, las regiones correspondientes a las secuencias de inicio y de terminación de la síntesis de dicho “origen de

replicación”.

El sistema utilizado incluye un fago adyuvante diseñado para prevenir los problemas asociados a la coinfección con este fago. Para ello el bacteriófago ExAssist contiene una mutación ámbar que impide la replicación de su genoma en el interior de una cepa de *E. coli* que no sea supresora para esa mutación (y la cepa *E. coli* SOLR no lo es). Esta característica permitirá que sólo se replique en el hospedador la molécula escindida a partir del vector λ ZAP II o sus derivados.

En el interior de la cepa de *E. coli* utilizada las proteínas del fago adyuvante reconocen la región de ADN de inicio de la replicación localizada dentro del vector λ ZAP II o sus derivados, rompen una de las dos hebras de ADN y comienzan en ese punto la síntesis de ADN. La síntesis se extiende en dirección 3' desde el sitio de rotura a lo largo del vector y continuará a través del inserto (si existe) hasta encontrar la secuencia de ADN responsable de la terminación de la replicación. El ADN de cadena sencilla sintetizado es posteriormente circularizado por la acción del producto del gen II del fago adyuvante, formándose finalmente una molécula circular de ADN que contiene todas las regiones situadas en el vector λ ZAP II (o sus derivados) entre las regiones iniciadora y terminadora de la replicación (es decir, toda la secuencia del plásmido pBluescript® SK- y el inserto clonado, en el caso de bacteriófagos recombinantes, o sólo la secuencia del plásmido en el caso del vector λ ZAP II).

En la secuencia terminadora de la replicación existen también señales específicas para la encapsidación del ADN circularizado y para su secreción al exterior de la célula bacteriana. Las células de *E. coli* se eliminarían posteriormente de la suspensión por calentamiento a 70°C y posterior centrifugación.

En el último paso, se recuperan los plásmidos (con sus insertos) en forma de moléculas de ADN bicatenario después de transformar el ADN monocatenario circular en una nueva cepa de *E. coli* y extender la mezcla de transformación en placas con medio LA suplementado con ampicilina.

Las moléculas de ADN bicatenario pueden ser analizadas en la forma acostumbrada.

El procedimiento experimental a seguir es el siguiente:

1. Se coge con una pipeta Pasteur estéril el halo de lisis que contiene los fagos seleccionados tras la realización de los experimentos de hibridación con la sonda específica y se introduce el trozo de agar en un tubo Eppendorf con 500 μ L de tampón SM y 10 μ L de cloroformo. Se deja difundir a 4°C durante 2 horas.

2. Se mezclan en un tubo los siguientes componentes:

- ①.- 1 μ L del fago ayudante ExAssist ($\pm 1 \times 10^6$ u.f.p./mL),
- ②.- 100 μ L de la solución del bacteriófago de interés ($\pm 1 \times 10^5$ u.f.p.) y
- ③.- 200 μ L de una suspensión de células de la cepa *E. coli* XL1-Blue en una solución de MgSO₄ 10 mM, con una densidad óptica a 600 nm de 1.

Se incuba durante 15 minutos a 37°C.

3. Se añaden 3 mL de TY 2x y se incuba 2,5 horas a 37°C, con agitación.

4. A continuación se calienta el tubo a 70°C durante 20 minutos y se centrifuga durante 15 minutos a 6.000 r.p.m. para eliminar los restos celulares. El sobrenadante contiene las moléculas de plásmido escindidas a partir de las partículas de bacteriófago, en forma de ADN circular de cadena sencilla.

5. Se mezclan 10 μ L del sobrenadante obtenido en el paso anterior con 200 μ L de una suspensión de células de la cepa *E. coli* SOLR en MgSO₄ 10 mM con una D.O.₆₀₀ de 1. Esta infección es incubada durante 15 minutos a 37°C.

6. Se extienden 100 μ L de la mezcla en placas de medio LA con ampicilina y se incuban las placas durante 12 horas a 37°C. Las colonias que aparecen sobre las placas son portadoras del

plásmido pBluescript® SK- con el inserto clonado en su interior.

2.20. Transferencia, marcaje de sondas específicas e hibridación de ácidos nucleicos.

Los métodos empleados, tanto para los pasos previos como para la hibridación, han sido fundamentalmente los descritos por Maniatis y *col.* (1982) y Sambrook y *col.* (1989).

2.20.1. Transferencia de Southern y de Northern.

Los soportes más comúnmente usados en la transferencia de los ácidos nucleicos son las membranas de nitrocelulosa o de nilón (las de este último tipo son más utilizadas en la actualidad, debido fundamentalmente a su mayor resistencia). La transferencia a un soporte sólido de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción y sometidos a migración electroforética en un gel de agarosa se denomina “Southern blotting” o “transferencia de Southern” (Southern, 1975) mientras que la transferencia de moléculas de ARN separadas en un gel de agarosa-formaldehído recibe el nombre de “Northern blotting” (Alwine y *col.*, 1977; Thomas, 1980). La denominación anglosajona de esta última técnica obedece a un juego de palabras de difícil traducción al castellano, por lo que emplearemos el término “transferencia de Northern” para referirnos a la transferencia de moléculas de ARN a soportes sólidos manejables, a pesar de que no sea estrictamente correcto.

2.20.1.1. Transferencia de Southern.

1. Una vez realizada la electroforesis se tiñe el gel con bromuro de etidio y se fotografía por los procedimientos habituales.

2. A continuación se trata el gel con una solución de HCl 0.25 N durante 15 minutos, manteniéndose con una agitación moderada.

Transcurrido este tiempo se lava el gel varias veces con agua destilada.

3. Se sumerge el gel en solución desnaturizante⁴⁹ y se mantiene durante 30 minutos con agitación moderada. Se lava de nuevo con agua destilada y se sumerge el gel en solución neutralizante⁵⁰ durante 30 minutos más (siempre manteniéndose la agitación). Se lava con agua destilada para eliminar los restos de solución neutralizante y se prepara el material necesario para la transferencia.

4. Se coloca un taco de papeles de filtro de las mismas dimensiones que el gel y de unos 5 centímetros de grosor sobre una bandeja limpia y sobre él se disponen dos láminas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño que el gel, previamente humedecidas en el tampón de transferencia⁵¹.

5. A continuación se coloca el gel, tratado con las distintas soluciones, sobre las dos láminas de papel Whatman 3MM y sobre él se dispone el filtro de nilón (Hybond N, Amersham) de un tamaño un centímetro mayor en anchura y longitud que el del gel. Los filtros se humedecen antes de ser colocados sobre el gel, sumergiéndolos en agua destilada y después en el tampón de transferencia.

6. Sobre el filtro se colocan dos láminas, humedecidas en el tampón de transferencia, de papel Whatman 3MM de las mismas dimensiones que el gel y sobre ellas un nuevo taco de papeles de filtro (de unos 10 cm de grosor). En la parte superior del sistema de transferencia se coloca un objeto de unos 500 gramos de peso. Se añade tampón de transferencia a la bandeja hasta que alcance casi el límite superior del taco de papeles de filtro depositados en la parte inferior del

⁴⁹ Solución desnaturizante: NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M.

⁵⁰ Solución neutralizante: NaCl 3 M y Tris-HCl 1 M pH 7.5.

⁵¹ Tampón de transferencia: SSC 10x. El tampón SSC 20x está compuesto por Citrato trisódico 0.3 M y NaCl 3 M. El pH se ajusta a un valor de 7.0 con NaOH. Para utilizarlo en experimentos con ARN se trata la solución con un 0.2% (v/v) de DEPC y se esteriliza en autoclave.

conjunto y se mantiene en reposo durante un mínimo de 12 horas. Es muy importante que durante todo el proceso eliminemos las posibles burbujas que se puedan formar al superponer las distintas capas de papel, el gel y el filtro ya que interfieren en el normal desarrollo de la transferencia.

7. Transcurrido el tiempo se marca la situación de los pocillos en el filtro y éste se lava con cuidado (el ADN aún no está fijado al filtro) en una solución de SSC 5x. Posteriormente se deja secar el filtro y se fijan covalentemente los ácidos nucleicos mediante irradiación con luz ultravioleta (UV Stratallinker 2400, Stratagene).

8. Una variante de esta técnica permite la transferencia del ADN presente en un gel a dos filtros distintos. Para ello el gel procedente del paso 3 se sumerge durante una hora en tampón SSC 20x. A continuación se procede a la elaboración del sistema de transferencia normal, siguiéndose los pasos 4 y 5 del proceso recién descrito. Una vez depositado el gel sobre la membrana de nilón se dispone sobre él una nueva membrana de nilón y sobre ésta dos láminas de papel Whatman 3MM humedecidas en tampón de transferencia. A continuación se dispone un nuevo taco de papeles de filtro y sobre él se coloca un objeto de unos 500 gramos de peso. El conjunto formado se mantiene en reposo durante un mínimo de 12 horas. En este caso no se añade tampón de transferencia a la bandeja y el ADN es arrastrado a los filtros al difundir el tampón en el que está empapado el gel hacia los tacos de papel de filtro situados en los extremos del sistema de transferencia. Como resultado del proceso se obtienen dos filtros (imágenes especulares entre sí) que son procesados de la manera habitual.

2.20.1.2. Transferencia de Northern.

1. Una vez realizada la electroforesis en el gel de agarosa-formaldehído, se corta una porción de gel con controles y se tiñe en la oscuridad con bromuro de etidio (concentración final 5 µg/mL) durante 15 minutos. Posteriormente se destiñe en agua destilada estéril de 2 a 4 horas y se fotografía. El resto del gel se introduce en solución SSC 20x

(tratada con DEPC) durante 1 hora, pudiéndose transferir a continuación a un filtro de nilón.

2. A partir de este punto, el proceso es idéntico al seguido para la transferencia de Southern con la salvedad de que los filtros con ARN no se lavan con SSC 5x tras concluir la transferencia.

2.20.2. Transferencia de ADN de bacteriófagos a un soporte sólido.

1. Una vez obtenidos los halos de lisis provocados por los bacteriófagos (apartado 2.8.2), se mantienen las placas de Petri a 4°C durante al menos una hora para que la capa de cobertera adquiera mayor consistencia.

2. Tras este tiempo se coloca un filtro de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) sobre la superficie de la placa, con cuidado de no dejar burbujas entre el medio y el filtro. Se permite la transferencia durante 1 minuto y durante este tiempo se hacen marcas asimétricas en el filtro y el medio con una aguja impregnada en tinta azul, de tal forma que nos permitan orientar posteriormente el filtro sobre la placa.

3. A continuación se levanta el filtro muy cuidadosamente con unas pinzas romas, se marca con un rotulador en la cara opuesta a la que ha estado en contacto con el medio y se deja sobre un papel de filtro (apoyado por la cara marcada con rotulador). Se puede hacer una réplica con un nuevo filtro de nitrocelulosa, permitiendo la transferencia durante 3 minutos.

4. Tras este proceso, las partículas de bacteriófagos presentes en los halos de lisis se encuentran depositadas sobre los filtros y debe realizarse un tratamiento para liberar el ADN de la envoltura proteica. Para ello se colocan los filtros durante 3 minutos, con la cara marcada con rotulador hacia abajo, sobre una lámina de papel Whatman 3MM empapada en solución desnaturante. Seguidamente se hacen dos tratamientos de 5 minutos sobre una lámina del mismo papel impregnada en solución neutralizante y finalmente los filtros se colocan durante 10 minutos sobre una

lámina de papel humedecida en SSC 2x.

5. Se dejan secar los filtros de nitrocelulosa al aire y el ADN se fija en un horno de vacío a 80°C durante 2 horas.

2.20.3. Marcaje de las sondas.

El ADN usado como sonda en las hibridaciones debe ser marcado de forma que sea posible su detección. Con este fin se utilizaron técnicas de marcaje con isótopos radiactivos, concretamente con el isótopo ³²P. Este isótopo emite partículas β y posee una vida media de 14 días y una elevada actividad específica, que permite una rápida detección. Además, las enzimas utilizadas en el marcaje de sondas de ADN no resultan inhibidas por la utilización de nucleósidos trifosfato marcados con ³²P.

Para el marcaje de las sondas se empleó la técnica del desplazamiento de mellas ("nick translation"). En este método (Rigby y col., 1977) se aprovecha la acción combinada de la ADNasa I y la ADN polimerasa I de *E. coli*. La ADNasa I rompe de modo inespecífico las dos cadenas de la molécula de ADN generando extremos 3'-OH libres y la ADN polimerasa I puede desplazar esas roturas o mellas ("nicks") debido a las dos actividades enzimáticas que presenta: una exonucleásica en dirección 5'-3' y una polimerásica en dirección 3'-5' (en virtud de esta última la ADN polimerasa I introduce en la cadena de ADN el nucleótido marcado radiactivamente añadido en la mezcla de reacción).

1. Se incuba a 15°C durante 30 minutos la mezcla de marcaje y posteriormente se enfría en un baño de hielo y agua. En esquema, los componentes de la mezcla de marcaje son los siguientes:

ADN bicatenario	100-500 ng
dATP 0'4 mM	1 μL
dGTP 0'4 mM	1 μL
dTTP 0'4 mM	1 μL
Tampón de marcaje 10x ⁵²	2 μL

⁵² **Tampón de marcaje 10x:** DTT 5 mM, Gelatina 500 μg/mL, MgCl₂ 50 mM y Tris-HCl 0'5 M pH 8'0.

Mezcla de enzimas ⁵³	2 μL
[α ³² P]dCTP (3.000 Ci/mmol)	2 μL
Agua destilada estéril hasta	20 μL

2. El paso siguiente es la separación de la sonda de ADN marcada del exceso de isótopo radiactivo utilizado en la reacción. La purificación se realizó con el sistema "Magic-clean" (Promega). En primer lugar se añade a la reacción de marcaje 1 mL de la resina "Clean-Up", cargándose la mezcla en una columna comercial con la ayuda de una jeringa de 5 mL. El líquido se desecha en una botella reservada para el almacenamiento de compuestos radiactivos y la resina queda retenida en la columna, lavándose a continuación con 2 mL de isopropanol al 80% (v/v). A continuación se encaja la columna en la parte superior de un tubo Eppendorf y se centrifuga a 14.000 r.p.m. durante 10 segundos para eliminar el isopropanol que haya podido quedar retenido en la resina. Se cambia el tubo Eppendorf por uno nuevo y se añaden 100 μL de H₂O estéril (previamente calentada a 80°C), manteniéndose en reposo durante 30 segundos y centrifugándose de la misma forma que se ha descrito anteriormente.

3. Una vez purificada la sonda se añade 1 mL de agua destilada estéril y se hierve durante 10 minutos, con el fin de separar las dos cadenas de ADN de la sonda, enfriándose a continuación durante cinco minutos en un baño de hielo y agua. Tras este paso la sonda ya está en disposición de ser utilizada.

2.20.4. Hibridación y autorradiografía.

La hibridación incluye tres procesos distintos:

● La prehibridación tiene como finalidad bloquear los sitios activos del filtro donde no se han unido ácidos nucleicos (ADN o ARN) durante la transferencia. Si no se bloquean estos sitios podrían unir de forma inespecífica los fragmentos de ADN utilizados como sonda. La prehibridación sirve además para equilibrar el filtro con el tampón de hibridación.

⁵³ **Mezcla de enzimas:** ADNasa I (0'5 pg/μL) y ADN polimerasa I (0'025 U/μL).

② La hibridación en sentido estricto permite la unión de la sonda marcada radiactivamente con los ácidos nucleicos fijados en el filtro. La especificidad de esta unión depende, sin embargo, tanto de las condiciones utilizadas durante la incubación (la temperatura a la que se desarrolla la hibridación o la concentración de formamida, sales y detergentes en el tampón de hibridación) como de las utilizadas en los lavados posteriores.

③ Por último, los lavados permiten la eliminación selectiva de la unión inespecífica que haya podido producirse entre sonda marcada y ácidos nucleicos. La disminución de la unión inespecífica durante los lavados puede conseguirse mediante la modificación de varios factores:

⇒ disminuyendo la concentración de sales en el tampón de lavado.

⇒ aumentando la concentración de detergentes en el tampón de lavado.

⇒ aumentando la temperatura y la duración del lavado.

2.20.4.1. Prehibridación.

1. Se introduce el filtro en una bolsa de plástico resistente y se añade el tampón de hibridación suplementado con ADN de esperma de salmón desnaturalizado⁵⁴ en una concentración final de 150 µg/mL. Es importante no superar un volumen de 100 µL de tampón de hibridación por cm² de filtro para favorecer el contacto de sonda y ácidos nucleicos. El tampón de hibridación es distinto dependiendo de que los ácidos nucleicos fijados al filtro sean ADN (tampón de hibridación

I⁵⁵) o ARN (tampón de hibridación II⁵⁶). A continuación se sella de modo hermético la bolsa de plástico.

2. Se incuba la bolsa con el filtro a la misma temperatura a la que se realizará posteriormente la hibridación, durante 4-12 horas.

2.20.4.2. Hibridación.

1. Se abre la bolsa con la prehibridación y se desecha el tampón utilizado.

2. A continuación se añade nuevo tampón de hibridación, suplementado en este caso con ADN de esperma de salmón desnaturalizado en una concentración final de 30 µg/mL. A este nuevo tampón se le añade la sonda de ADN marcada, purificada y desnaturalizada.

3. Posteriormente se sella la bolsa herméticamente y se incuba a 42°C durante 12-24 horas. Si los experimentos de hibridación se hicieran con sondas de ADN cuya similitud con la secuencia “diana” fuese menor al 100% es recomendable disminuir la temperatura de hibridación (a 37 °C, por ejemplo) y la concentración de formamida en el tampón de hibridación (al 30% (v/v), por ejemplo). No debe modificarse la concentración de formamida en el tampón para la hibridación de filtros con ARN.

2.20.4.3. Lavados y autorradiografía.

1. Se abre la bolsa con la hibridación y se vierte el tampón radiactivo en una botella reservada para el almacenamiento de residuos radiactivos (o se conserva a -20°C para una nueva utilización).

2. Se realiza un primer lavado

⁵⁴ **ADN de esperma de salmón:** Se disuelve 1 gramo de ADN de esperma de salmón tipo III (Sigma Chemical Co.) en 50 mL de NaOH 0.3 N, agitando durante 2-3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se calienta la solución a 80°C durante 2 horas para disminuir su viscosidad y se añaden 0.5 mL de Tris-HCl 1 M pH 8.0, 1 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0 y 50 mL de TE y se ajusta el pH a 7.0 con HCl concentrado. Se fenoliza y se precipita con etanol enfriado a -20°C. Se centrifuga y se resuspende el precipitado en el volumen de TE necesario para conseguir una concentración final del ADN de 10 mg/mL.

⁵⁵ **Tampón de hibridación I:** Denhardt's 1x, Formamida al 40% (v/v), Glicina al 1% (p/v), SSC 5x y Tampón fosfato sódico 50 mM pH 6.5. **Denhardt's 100x:** BSA (fracción V) al 2% (p/v), Ficoll al 2% (p/v) y Polivinilpirrolidona al 2% (p/v). Se disuelven en este orden en agua destilada estéril, sin calentar. Se conserva en alícuotas a -20°C ó -70°C.

⁵⁶ **Tampón de hibridación II:** Denhardt's 5x, Formamida al 50% (v/v), SDS al 0.1% (p/v), SSC 5x y Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.3.

sumergiendo el filtro en 500 mL de tampón de lavado I⁵⁷, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se desecha el líquido y se realiza un segundo lavado con el tampón de lavado II⁵⁸, durante 15 minutos a la temperatura de hibridación. Por último, si es necesario, se realizan uno o más lavados con el tampón de lavado II, utilizando temperaturas y tiempos de lavado crecientes.

3. Se expone el filtro frente a un film Hyperfilm-MP (Amersham) en un estuche con pantallas intensificadoras (Du Pont) a -70°C, durante un tiempo que deberá ser determinado empíricamente.

2.20.5. Reutilización de los filtros.

Mediante la aplicación del siguiente protocolo se consigue eliminar la sonda unida a los ácidos nucleicos fijados en el filtro, pudiéndose volver a utilizar en un nuevo experimento de hibridación.

1. Se agita el filtro en una solución de NaOH 0'1 N durante 15 minutos.

2. A continuación se lava el filtro con agua destilada y se trata con SSC 2x durante otros 15 minutos.

2.21. Generación de deleciones unidireccionales.

Este sistema está basado en el procedimiento desarrollado por Henikoff (1984), en el cual se utiliza la capacidad de la enzima exonucleasa III (ExoIII) de digerir exonucleolíticamente una cadena del ADN a partir de moléculas de ADN de doble cadena con extremos 5' protuberantes o romos, no reconociendo como sustrato el ADN de doble cadena con extremos 3' protuberantes o rellenados con nucleótidos modificados (con un grupo α -fosforotioato, por ejemplo). La amplitud en el tiempo de reacción con esta enzima determina la extensión de la deleción generada en el ADN

sometido a este tratamiento. La velocidad media de digestión a 37°C y con una concentración de enzima de 80 unidades por μ g de ADN es de aproximadamente 450 bases por minuto, por lo que la toma de muestras a distintos tiempos (a partir de una reacción inicial) nos permitirá conseguir moléculas de ADN en las que la longitud de la deleción sea progresivamente mayor. Las variaciones que se introducen en la temperatura de incubación y en la concentración de la enzima afectan de forma directamente proporcional a la velocidad de actuación de la ExoIII, pudiéndose conseguir la aparición de deleciones de mayor o menor tamaño en función de nuestros intereses.

Estas propiedades de la exonucleasa III han sido aprovechadas en el sistema "Erase-a-Base[®]" (Promega) y se han utilizado sobre todo para la obtención de clones para la determinación de la secuencia nucleotídica de fragmentos de ADN insertados en plásmidos de la serie pBluescript[®]. Para que sea posible la realización de esta técnica es necesario que el inserto de ADN de interés se integre en la región múltiple de clonaje del plásmido de manera que se cumplan una serie de condiciones:

a.- En la región múltiple de clonaje del plásmido, entre el lugar de comienzo del inserto (denominado sitio A) y el final de la región donde se producirá la hibridación del cebador en el proceso de análisis de la secuencia de ADN (denominado sitio B), deben existir al menos dos sitios de reconocimiento para enzimas de restricción únicos.

b.- Si es posible, la endonucleasa de restricción que digiera el ADN en las proximidades del sitio B debe originar un fragmento de ADN con extremos 3' de cuatro bases protuberantes, para que la región de hibridación del "ADN diana" con el cebador quede protegida de la digestión con la enzima ExoIII. En caso de que la endonucleasa de restricción elegida para digerir en las proximidades

⁵⁷ Tampón de lavado I: SDS al 0'1% (p/v) y SSC 2x.

⁵⁸ Tampón de lavado II: SDS al 0'1% (p/v) y SSC 0'1x.

del sitio B deje extremos 5' protuberantes, éstos deberán ser rellenados con nucleótidos modificados, consiguiéndose el mismo efecto de protección contra la digestión exonucleolítica de la región de hibridación del cebador.

digiera en las proximidades del sitio A (el más cercano al inicio del inserto) debe, por el contrario, dejar extremos 5' protuberantes o romos, para permitir la acción de la ExoIII desde ese punto.

c.- La endonucleasa de restricción que

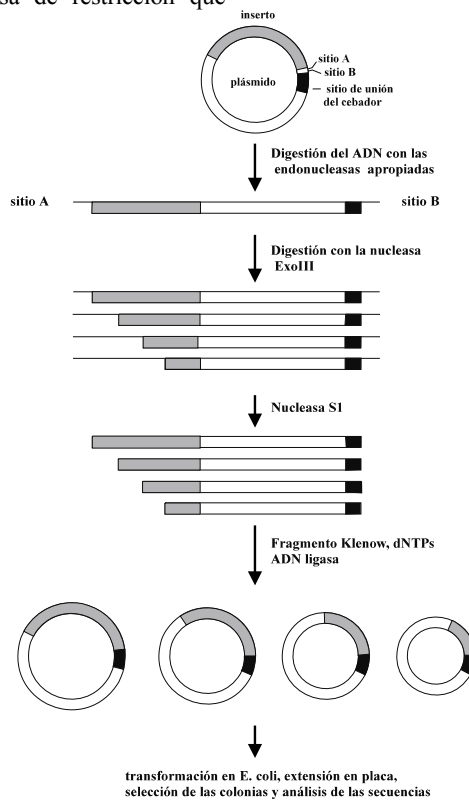


Figura 2.19. Esquema de obtención de deleciones unidireccionales a partir de un plásmido con un inserto cuya secuencia de ADN se quiere determinar. La explicación de la figura se encuentra detallada en el texto.

Enzima	Secuencia de reconocimiento	Enzima	Secuencia de reconocimiento
<i>AatII</i>	5'...GACGTC...3' 3'...CTGCAG...5'	<i>BamHI</i>	5'...GGATCC...3' 3'...CCTAGG...5'
<i>BanII</i>	5'...GPaGCPiC...3' 3'...CPiCGPuG...5'	<i>ClaI</i>	5'...ATCGAT...3' 3'...TAGCTA...5'
<i>BglI</i>	5'...GCCNNNNNGGC...3' 3'...CGNNNNNCCG...5'	<i>Csp45I</i>	5'...TTCGAA...3' 3'...AAGCTT...5'
<i>BstXI</i>	5'...CCANNNNNNTGG...3' 3'...GGTNNNNNACC...5'	<i>EcoRI</i>	5'...GAATTC...3' 3'...CTTAAG...5'
<i>HaeII</i>	5'...PuGCGCi...3' 3'...PiCGCGPu...5'	<i>EcoRV</i>	5'...GATATC...3' 3'...CTATAG...5'
<i>HhaI</i>	5'...GCGC...3' 3'...CCGC...5'	<i>HindIII</i>	5'...AAGCTT...3' 3'...TTCGAA...5'
<i>KpnI</i>	5'...GGTACC...3' 3'...CCATGG...5'	<i>NcoI</i>	5'...CCATGG...3' 3'...GGTACC...5'
<i>NsiI</i>	5'...ATGCAT...3' 3'...TACGTA...5'	<i>NdeI</i>	5'...CATATG...3' 3'...GTATAC...5'
<i>PvuI</i>	5'...CGATCG...3' 3'...GCTAGC...5'	<i>NotI</i>	5'...GCGGCCGC...3' 3'...CGCCGGCG...5'
<i>SacI</i>	5'...GAGCTC...3' 3'...CTCGAG...5'	<i>SalI</i>	5'...GTCGAC...3' 3'...CAGCTG...5'
<i>SphI</i>	5'...GCATGC...3' 3'...CGTACG...5'	<i>SmaI</i>	5'...CCCGGG...3' 3'...GGGCC...5'
		<i>SpeI</i>	5'...ACTAGT...3' 3'...TGATCA...5'
		<i>XbaI</i>	5'...TCTAGA...3' 3'...AGATCT...5'
		<i>XhoI</i>	5'...CTCGAG...3' 3'...GAGCTC...5'

Tabla 2.III. Extremos generados por las endonucleasas de restricción usadas más frecuentemente en los procesos de creación de delecciones unidireccionales. En la parte izquierda se detallan las secuencias de reconocimiento y corte para algunas endonucleasas de restricción que generan extremos 3' protuberantes, mientras que en la parte derecha se indican las secuencias pertenecientes a endonucleasas de uso frecuente que generan extremos 5' protuberantes o romos.

1. En primer lugar se realiza la digestión del plásmido con la endonucleasa con sitio de reconocimiento y corte más próximo a la posición B y se observa en un gel de agarosa el que el grado de digestión sea completo. A continuación se limpia el ADN por fenolización y se precipita de la forma habitual. Se centrifuga, se resuspende en H₂O estéril y el ADN se digiere con la endonucleasa escogida en las proximidades de la posición A. Se limpia y precipita el ADN de nuevo y se resuspende (de forma que se obtenga una concentración aproximada de 100 ng de ADN por µL) en tampón para la ExoIII⁵⁹. Se incuba esta solución a la temperatura de reacción seleccionada

(normalmente 37⁰C) durante 3 minutos y se añaden 40 unidades de ExoIII por µg de ADN. El volumen de la reacción de digestión empleado dependerá del número de muestras que se tomen (así, para 10 muestras se requieren 25 µL de mezcla de reacción).

2. Se retiran alícuotas de 2'5 µL cada 30 segundos y se mezclan con 7'5 µL de mezcla para la nucleasa S1⁶⁰, manteniéndose los tubos en un baño de hielo y agua hasta que se recojan todas las alícuotas previstas. A continuación se dejan los

⁵⁹ **Tampón 10x para la ExoIII:** MgCl₂ 6'6 mM y Tris-HCl 660 mM pH 8'0.

⁶⁰ **Mezcla para la nucleasa S1:** Nucleasa S1 (2'5 U/µg de ADN) y Tampón 1x. para la nucleasa S1 **Tampón 7'4x para la nucleasa S1:** Acetato potásico 0'3 M pH 4'6, Glicerol al 50% (v/v), NaCl 2'5 M y ZnSO₄ 10 mM.

tubos con las muestras a la temperatura ambiental (20-25°C) durante 30 minutos para permitir la acción de la nucleasa S1. Transcurrido este tiempo, se paran las reacciones con 1 µL de tampón de parada para la nucleasa S1⁶¹ y mediante el calentamiento a 65°C durante 10 minutos. La nucleasa S1 degrada todo el ADN que se encuentra en forma monocatenaria, es decir, hace que las deleciones que la enzima ExoIII ha generado en una de las cadenas del ADN se reproduzcan en la otra cadena. En este punto es posible comprobar la extensión de las deleciones producidas analizando 2 µL de cada una de las fracciones en un gel de agarosa.

3. A continuación se incuban las muestras a 37°C y se añade 1 µL de la mezcla para el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I⁶². Transcurridos 3 minutos se añade 1 µL de la mezcla de dNTPs⁶³, dejándose incubar 5 minutos más a 37°C. La acción del fragmento Klenow de la ADN polimerasa permite rellenar los fragmentos de cadena sencilla que pudieran quedar en las moléculas de ADN como consecuencia de la acción de la nucleasa S1 y deja dichas moléculas en condiciones favorables para la ligación.

4. Finalmente las muestras se enfrían hasta la temperatura del ambiente y se añaden 40 µL de la mezcla para la ADN ligasa⁶⁴, incubándose durante 1-2 horas a la temperatura ambiental. Transcurrido este tiempo la mezcla de autoensamblaje de las moléculas de ADN es utilizada para la transformación de células competentes de *E. coli*.

2.22. Análisis de la secuencia

⁶¹ **Tampón de parada para la nucleasa S1:** EDTA 0'05 M y Tris-HCl 0'3 M.

⁶² **Mezcla para el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I:** Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (0'2 U/µg de ADN) y Tampón para el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I 1x. La composición del **tampón 1x para el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I** es MgCl₂ 100 mM y Tris-HCl 20 mM pH 8'0.

⁶³ **Mezcla de dNTPs:** dATP, dCTP, dGTP y dTTP con una concentración final de 0'125 mM cada uno.

⁶⁴ **Mezcla para la ADN ligasa:** ADN ligasa (0'2 U/µg de ADN), DTT 1 mM, PEG al 5% (v/v) y tampón 1x para la ADN ligasa. El **tampón 10x para la ADN ligasa** presenta la siguiente composición: ATP 10 mM, MgCl₂ 100 mM y Tris-HCl 500 mM pH 7'6.

de nucleótidos del ADN.

2.22.1. Preparación de ADN plasmídico monocatenario.

El método de análisis de secuencia utilizado requiere de la utilización de ADN de cadena sencilla como molde para la actuación de la ADN polimerasa. Los plásmidos de la serie pBluescript[®] contienen la región intergénica del fago f1, la cual codifica para funciones relacionadas con la encapsidación y con la replicación del fago, y pueden ser secretados en forma de ADN monocatenario en presencia de un fago adyuvante (como por ejemplo el M13K07) tras ser transformados en una cepa de *E. coli* que posea "pili" sexuales (episoma F) que actúen como receptores del fago (por ejemplo, *E. coli* WK6 *mutS*).

El protocolo para la obtención de ADN de cadena sencilla fue el siguiente:

1. Se transforma la cepa *E. coli* WK6 *mutS* con el plásmido del que se quiere obtener el ADN de cadena sencilla, seleccionándose los transformantes en placas de LA con el antibiótico adecuado (aquel para el que confiera resistencia el plásmido utilizado). Una de las colonias obtenidas es utilizada para inocular 5 mL de medio TY 2x suplementado con el antibiótico para el cual confiere resistencia dicho plásmido (ampicilina o cloranfenicol, normalmente). Se incuba el cultivo a 37°C durante 5 horas, con agitación orbital de 250 r.p.m.

2. Se determina la concentración de células en el cultivo midiendo la densidad óptica a 600 nm y se prepara una mezcla de 8×10^8 células con $1'6 \times 10^{10}$ u.f.p. del fago M13K07 (la relación es de 20 u.f.p. por cada célula bacteriana), depositándose en el fondo de un matraz de 500 mL de volumen e incubándose a 37°C durante 2 horas, sin agitación. Transcurrido este tiempo se añaden 20 mL de medio TY 2x con el antibiótico apropiado y con kanamicina en una concentración final de 30 µg/mL (un gen cuyo producto confiere resistencia a la acción de la kanamicina está

presente en el genoma del fago M13K07 y sólo aquellas células de *E. coli* que resultan infectadas por él y contengan el plásmido transformado serán capaces de crecer en presencia de los dos antibióticos). Se incuba a 37°C durante 15 horas con agitación orbital de 250 r.p.m.

3. Se recoge el cultivo y se centrifuga a 6.000 r.p.m. en una centrifuga de mesa para precipitar las células. El sobrenadante se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones, como precaución. El nuevo sobrenadante obtenido contiene partículas de fagos en cuyo interior se encuentra el ADN plasmídico en su forma monocatenaria. Estas partículas de bacteriófagos son precipitadas añadiendo al sobrenadante 3 mL de una solución de polietilenglicol/NaCl⁶⁵ y manteniendo la mezcla a 4°C durante 2 horas.

4. Las partículas de fago se recuperan por centrifugación a 8.000 r.p.m. y 4°C durante 20 minutos y el precipitado se resuspende en 1 mL de la solución STE⁶⁶. A continuación se realizan dos extracciones con CIA para eliminar los restos de polietilenglicol (PEG).

5. La fase acuosa se extrae sucesivamente con un volumen de fenol (este paso requiere una mezcla de las dos soluciones durante 10 minutos), fenol-CIA y CIA y se precipita a -20°C con 40 µL de NaCl 5 M y 2'5 volúmenes de etanol frío. Se centrifuga y se resuspende el ADN en H₂O estéril, calculándose su concentración tras realizar una electroforesis en un gel de agarosa.

2.2.2.2. Realización de las reacciones para el análisis de la secuencia de nucleótidos de ADN.

⁶⁵ Solución de polietilenglicol/NaCl: NaCl 2'5 M y polietilenglicol 6.000 al 20% (p/v).

⁶⁶ STE: EDTA 1 mM pH 8'0, NaCl 100 mM y Tris-HCl 10 mM pH 8'0.

Este proceso se llevó a cabo siguiendo el método de los didesoxinucleótidos descrito por Sanger y *col.* (1977), mediante el uso del sistema "Sequenase" (Amersham, Ref. US 70770).

La síntesis de una hebra de ADN complementaria a un ADN de cadena sencilla es realizada por una polimerasa a partir de un cebador, mediante la adición de desoxinucleósidos trifosfato (uno de ellos, el dATP, está marcado con ³⁵S en el grupo fosfato localizado en la posición α). Si además de desoxinucleótidos se añaden pequeñas cantidades de didesoxinucleótidos (que carecen del grupo hidroxilo en la posición 3' que permite la unión del siguiente desoxinucleótido) la enzima también podrá incorporar a la cadena sintetizada estos análogos, deteniéndose el proceso de polimerización.

Las reacciones para el análisis de la secuencia de nucleótidos del ADN aprovechan este fenómeno y para ello se realizan ensayos en cuatro tubos distintos con cada uno de los didesoxinucleótidos además de los desoxinucleótidos normales. Como resultado de la acción de la polimerasa los didesoxinucleótidos se incorporan al azar, en diferentes tiempos, dando lugar a la aparición de una población de moléculas de tamaño variable (con diferencias de incluso un nucleótido) en cada una de las cuatro mezclas de reacción. Al sintetizarse a partir de un cebador que se une a la cadena sencilla del ADN de interés las moléculas formadas corresponderán a la cadena complementaria.

El procedimiento de reacción se realizó del siguiente modo:

2.2.2.2.1. Hibridación.

En este paso se produce la unión del cebador a la cadena de ADN cuya secuencia queremos determinar.

Los componentes de la reacción de hibridación son los siguientes:

ADN de cadena sencilla	0'5 µg
Cebador	1 pmol

Tampón 5x de reacción de análisis de secuencia ⁶⁷	2 µL
Agua destilada hasta 10 µL	

Se mezclan todos los componentes y se calientan a 65°C durante 2 minutos. A continuación se introduce la mezcla en un baño con agua a 65°C y se deja enfriar lentamente hasta que el agua alcance unos 35°C (no debe excederse de los 45 minutos, para evitar la formación de estructuras secundarias en el ADN que favorecerían la aparición de compresiones al realizar la electroforesis).

2.22.2.2. Marcaje.

El marcaje se realizó mezclando los siguientes componentes:

Mezcla de hibridación	10 µL
DTT 0'1 M	1 µL
Tampón 5x de marcaje ⁶⁸	2 µL
[α ³⁵ S]dATP	0'5 µL
“Sequenase” (en dilución 1:8 en el tampón de dilución de la enzima ⁶⁹)	2 µL

Tras la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos.

2.22.2.3. Terminación.

Consiste en la incorporación de los distintos ddNTP a la molécula de ADN en formación. Se transfieren 3'5 µL de la reacción de marcaje a cada uno de cuatro tubos que contienen 2'5 µL de las mezclas de terminación (con los didesoxinucleótidos ddATP⁷⁰, ddCTP⁷¹, ddGTP⁷² o ddTTP⁷³).

⁶⁷ **Tampón 5x de reacción de análisis de secuencia:** MgCl₂ 100 mM, NaCl 250 mM y Tris-HCl 200 mM pH 7'5.

⁶⁸ **Tampón 5x de marcaje:** dCTP 7'5 mM, dGTP 7'5 mM y dTTP 7'5 mM.

⁶⁹ **Tampón de dilución de la enzima:** BSA 0'5 mg/mL, DTT 5 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7'5.

⁷⁰ **Mezcla de terminación ddATP:** 80 mM dATP, 80 mM dCTP, 80 mM dGTP, 80 mM dTTP, 8 mM ddATP y NaCl 50 mM.

⁷¹ **Mezcla de terminación ddCTP:** 80 mM dATP, 80 mM dCTP, 80 mM dGTP, 80 mM dTTP, 8 mM ddCTP y NaCl 50

A continuación se incubó la mezcla a 37°C durante 5 minutos.

2.22.2.4. Parada de la reacción.

En este paso se finaliza la polimerización en las cadenas de ADN en las que aún no se había incorporado un didesoxinucleótido y se preparan todas las reacciones para ser posteriormente aplicadas en un gel de electroforesis. Los dos efectos se consiguen con la adición de 4 µL de tampón de carga⁷⁴ a cada uno de los tubos. Posteriormente se congelan las reacciones a -20°C hasta su posterior uso (no es recomendable demorar la electroforesis de estas muestras más de una semana).

2.22.3. Electroforesis de las reacciones de secuencia.

La población de moléculas de distinto tamaño obtenida en cada una de las reacciones de análisis de la secuencia se separa al realizarse una electroforesis en un gel de poliacrilamida. El sistema utilizado para esta electroforesis fue el “Sequi-GenTM”, comercializado por Bio-Rad (Ref. 165-3604). El proceso requiere una serie de pasos:

1. Se prepara una mezcla de gel y se carga entre los cristales de la cubeta de electroforesis, dejándose polimerizar durante un mínimo de 150 minutos a la temperatura ambiental. A continuación se preconditiona el gel en tampón TBE⁷⁵ con una potencia constante de 60 vatios (≈2.000 voltios, para el caso de las cubetas de electroforesis de 21 x 50 cm) o de 100 vatios (para el caso de las cubetas

mM.

⁷² **Mezcla de terminación ddGTP:** 80 mM dATP, 80 mM dCTP, 80 mM dGTP, 80 mM dTTP, 8 mM ddGTP y NaCl 50 mM.

⁷³ **Mezcla de terminación ddTTP:** 80 mM dATP, 80 mM dCTP, 80 mM dGTP, 80 mM dTTP, 8 mM ddTTP y NaCl 50 mM.

⁷⁴ **Tampón de carga:** Azul de bromofenol 0'05% (p/v), EDTA 20 mM, Formamida al 95% (v/v) y Xileno cianol 0'05% (p/v).

⁷⁵ **Tampón TBE 10x:** 27'5 g de Ácido bórico, 20 mL de EDTA 0'5 M pH 8'0 y 854 g de Tris-HCl. Se añade agua destilada hasta 1 litro.

de 38 x 50 cm), hasta que la temperatura del gel alcance aproximadamente los 45°C (entre 30 y 60 minutos). En función del tamaño de las cubetas anteriormente citado, la electroforesis debe realizarse con una potencia constante de 45 u 80 W, respectivamente. El tiempo de aplicación del campo eléctrico varía dependiendo de la distancia entre el sitio de hibridación del cebador y la región de ADN cuya secuencia queremos conocer. Así, cuanto mayor es esa distancia se requerirán tiempos de electroforesis mayores (la utilización de geles con una menor concentración de acrilamida favorece también la electroforesis encaminada al conocimiento de secuencias alejadas del cebador por lo que los experimentos de electroforesis de reacciones de análisis de la secuencia se hicieron siempre por duplicado, utilizando un gel con una concentración de acrilamida del 6%⁷⁶ (p/v) y otro con una concentración del 8%⁷⁶ (p/v), solapándose las secuencias de nucleótidos determinadas con cada uno de ellos).

2. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se deposita en una solución de fijación⁷⁷ durante 15 minutos, se pega en un papel Whatman 3MM y se seca a 80°C durante 1 hora en un secador de vacío modelo 583 (Bio-Rad).

3. La exposición de un film Hyperfilm-MP (Amersham) se llevó a cabo a temperatura ambiente usando un estuche sin pantallas intensificadoras. El tiempo de exposición se determinó empíricamente, como en el caso de las hibridaciones de ácidos nucleicos.

2.22.4. Análisis de las secuencias obtenidas.

⁷⁶ Mezcla de gel 6% u 8% (para 100 mL): 40 mL de Agua destilada, 10 mL de Tampón TBE 10x, 48 g de Urea, 5'7 g ó 7'6 g de Acrilamida y 0'3 g ó 0'4 g de Bisacrilamida. Se mezcla por este orden hasta la completa disolución de los componentes (es necesario calentar la mezcla con la urea a 65°C durante 5-10 minutos para favorecer su disolución) y se ajusta el volumen a 100 mL. Posteriormente se filtra a través de un filtro Millipore de 0'45 µm de diámetro de poro y se añaden 360 µL de persulfato amónico al 10% (p/v) y 36 µL de TEMED.

⁷⁷ Solución de fijación: Ácido acético glacial al 10% (v/v) y Metanol al 10% (v/v).

Para el análisis de las secuencias obtenidas se ha utilizado el entorno de programas DNASTAR (Dnastar Inc.).

El programa CLUSTAL se ha utilizado para el alineamiento de múltiples secuencias

Asimismo, se ha utilizado la red informática Internet para acceder a la base de datos EMBL (European Molecular Biology Laboratory; Heidelberg, Alemania; <http://www.ebi.ac.uk>) y a la base de datos GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, E.U.A., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.23. Transformación de *Escherichia coli*.

2.23.1. Preparación de células competentes de *Escherichia coli* por el método del TSS.

A la hora de introducir ADN en *E. coli* por medio de procesos de transformación se requiere una "disponibilidad" de la bacteria, se debe facilitar el paso de las moléculas de ADN a través de las barreras externas de la célula. Este estado es lo que se denomina como "competencia" y las células que lo presentan se denominan "células competentes".

La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado por dos métodos o protocolos básicos.

El primero de ellos, que describimos a continuación, permite la obtención de un número suficientemente elevado de transformantes con una mínima necesidad de material, siguiendo un protocolo más rápido que el que se describirá posteriormente. Normalmente se utilizaron células

competentes obtenidas por este método para transformaciones de plásmidos (y no de mezclas de ligación, que requieren de una mayor eficiencia de transformación). El proceso seguido, descrito por Chung y col. (1989), fue el siguiente:

1. Se siembra una placa de medio LA con la cepa de *E. coli* que vaya a ser utilizada como receptora en la transformación, de tal forma que se obtengan colonias aisladas, y se incuba a 37°C durante 12-14 horas.

2. Se inoculan 100 mL de medio LB con una de las colonias de *E. coli* y se incuba a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0'5 unidades.

3. Se recogen las células por centrifugación a 4.000 r.p.m. en un rotor Sorvall GSA y a 4°C durante 10 minutos.

4. Se resuspende el precipitado de células en 10 mL de TSS⁷⁸ y la suspensión resultante se reparte en alícuotas, congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido o en un baño de hielo seco/etanol y guardándose a -70°C hasta que se necesiten.

2.23.2. Preparación de células competentes de *E. coli* por el método del cloruro de rubidio.

Este método fue descrito por Hanahan (en 1983 y 1985) y se utilizó en todos aquellos casos en los que se requería una eficiencia de transformación elevada (este es el caso de la cepa *E. coli* DH5 α , normalmente utilizada como receptora de mezclas de ligación y que proporciona eficiencias de

transformación de hasta 5 x 10⁸ transformantes por μ g de ADN cuando se prepara siguiendo este protocolo). Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Se siembra una placa de medio SOB sólido con la cepa de *E. coli* que vaya a ser utilizada como receptora en la transformación, de tal forma que se obtengan colonias aisladas, y se incuba a 37°C durante 12-14 horas.

2. Se inocula con una colonia aislada un matraz de 500 mL con 100 mL de medio SOB. Se incuba a 37°C con agitación de 250 r.p.m. hasta que el cultivo alcance una densidad óptica a 600 nm de entre 0'4 y 0'45, manteniéndose posteriormente el matraz a 4°C durante 20 minutos.

3. Se recogen las células por centrifugación a 3.000 r.p.m. en un rotor Sorvall GSA durante 10 minutos, a una temperatura de 4°C.

4. A continuación se resuspenden las células (con suavidad y manteniendo su temperatura alrededor de 4°C) en solución RF1⁷⁹ (un tercio del volumen inicial) y la suspensión se mantiene durante 20 minutos en hielo.

5. Se centrifuga en las mismas condiciones descritas en el paso 3, se resuspenden las células en solución RF2⁸⁰ (1/12'5 del volumen inicial) y la suspensión se mantiene en hielo durante 20 minutos. Finalmente se reparte la suspensión en alícuotas de 200 μ L.

⁷⁸ TSS: Bacto-triptona al 10% (p/v), DMSO al 5% (v/v), Extracto de levadura al 5% (p/v), Mg²⁺ (MgSO₄ ó MgCl₂) * 20-50 mM, NaCl al 10% (p/v) y PEG de peso molecular 3350 u 8000 al 10% (p/v) *. El pH se ajustó a un valor de 6'5 y la solución se esterilizó a través de un filtro estéril de 0'22 μ m de diámetro de poro.

* En nuestro caso se utilizaron MgSO₄ 50 mM y PEG 8.000.

⁷⁹ RF1: Acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 15% (p/v), MnCl₂ 50 mM y RbCl 100 mM. Se ajusta el pH a un valor de 5'8 con ácido acético 0'2 M. Se esteriliza por filtración a través de un filtro estéril de 0'22 μ m de diámetro de poro. Se utiliza agua de calidad MilliQ (Millipore) para preparar todas las soluciones y medios de cultivo, así como para el lavado del material utilizado en la preparación y almacenamiento de soluciones y medios y en el procesamiento de las células.

⁸⁰ RF2: CaCl₂ 75 mM, glicerol al 15% (p/v), MOPS 10 mM pH 7'0 y RbCl 10 mM. Se ajusta el pH a 6'8 con NaOH y se esteriliza por filtración a través de un filtro estéril de 0'22 μ m de diámetro de poro.

6. Las células competentes así preparadas pueden ser usadas inmediatamente o bien se pueden conservar a -70°C , previa congelación en nitrógeno líquido o en un baño de hielo seco/etanol.

2.23.3. Procedimiento de transformación.

El protocolo de transformación de las células competentes de *E. coli* fue básicamente el descrito por Hanahan (1983). Normalmente se siguieron los pasos que se detallan a continuación:

1. Se descongelan las células competentes en un baño de hielo y agua y se mezcla el ADN con 100 μL de la suspensión de bacterias, manteniéndose en hielo durante 20 minutos. El volumen de la solución que contiene el ADN no debe superar el 5% del volumen de células bacterianas utilizadas.

2. A continuación se somete la mezcla a un choque térmico por inmersión en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos, seguida de un rápido enfriamiento en hielo durante unos 3 minutos.

3. Se añaden 800 μL de medio LB y se incuba a 37°C y 250 r.p.m. durante una hora con el fin de que las células que incorporen el plásmido expresen la resistencia al antibiótico utilizado como marcador de selección.

4. Finalmente se siembra una alícuota en placas de LA o se inocula (normalmente la mitad de la transformación) en un matraz de 500 mL con 100 mL de medio TB si se pretende la obtención a gran escala del ADN plasmídico. En ambos casos debe añadirse al medio de cultivo (sólido o líquido, respectivamente) el antibiótico utilizado en la selección de los transformantes.

2.24. Transformación de hongos.

Las transformaciones de las distintas especies de hongos utilizadas en el presente trabajo comparte un gran número de similitudes, entre las que cabe destacar la necesidad de utilización de un marcador para la selección de los transformantes. La selección de los transformantes fúngicos puede conseguirse con la introducción de un marcador que confiera resistencia al efecto de un compuesto tóxico (en nuestro caso suele ser el antibiótico fleomicina) o mediante la complementación de una mutación presente en la cepa receptora de los plásmidos.

La transformación con selección por resistencia a fleomicina no requiere la obtención previa de mutantes específicos pero, sin embargo, requiere un estudio preliminar para determinar el nivel basal de resistencia a fleomicina de la cepa sin transformar. La utilización de la complementación de una auxotrofia proporciona, por su parte, mejores eficiencias de transformación.

En *P. chrysogenum* se han realizado transformaciones de los dos tipos. Así, en unos casos se ha utilizado como marcador selectivo la resistencia al antibiótico fleomicina y en otros se ha complementado la auxotrofia para la uridina de una cepa mutante (Cantoral y col., 1987; Díez y col., 1987). En *A. nidulans* únicamente se han realizado transformaciones del primer tipo.

La fleomicina pertenece al grupo de antibióticos metalo-glicopeptídicos de la familia de la bleomicina (Berdy, 1980). Es un antibiótico de amplio espectro producido por una cepa mutante de *Streptomyces verticillus*, activo sobre la mayor parte de levaduras y hongos y tóxico para células vegetales y animales en concentraciones que van desde 0'1 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Actúa a nivel de ADN originando roturas en la molécula, preferentemente en secuencias repetidas invertidas de ADN monocatenario y en secuencias no metiladas de ADN bicatenario (Hertzberg y col., 1985).

La resistencia se produce por inactivación o bloqueo físico de la fleomicina por parte de una proteína codificada por el gen *ble* (gen de resistencia a bleomicina-fleomicina), localizado en la región central del transposón Tn5 de bacterias

Gram negativas (Genilloud y col., 1984; Collins y Hall, 1985), en el plásmido pUB110 de bacterias Gram positivas (Mckenzie y col., 1986) y en el ADN cromosómico de actinomicetos productores de fleomicina como *Streptoalloteichus hindustanus* (Drocourt y col., 1990).

El gen *ble* de *S. hindustanus* posee las siguientes características principales:

❶ El gen, de 375 pares de bases, comienza en un sitio de reconocimiento y corte para la endonucleasa de restricción *NcoI* (CCATGG) que incluye el triplete inicial de la traducción.

❷ El único sitio de reconocimiento y corte para endonucleasas de restricción que comparte con los vectores normalmente utilizados es una secuencia de reconocimiento y corte para la enzima *SmaI*, lo que es muy útil en el proceso de construcción de los plásmidos que se utilizarán en la transformación.

❸ Los niveles de resistencia al antibiótico están directamente relacionados con el nivel de expresión del gen *ble*. La expresión de este gen viene determinada por dos variables: la fuerza del promotor bajo el que se expresa el gen y el número de copias del gen *ble* integradas en el genoma del transformante.

En nuestros experimentos el gen *ble* se ha integrado en el denominado “módulo de resistencia a fleomicina”, compuesto por el promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* (0'8 kpb), el gen *ble* de *S. hindustanus* (0'4 kpb) y el terminador del gen *cyc1* de levaduras (0'3 kpb). Los dos últimos componentes de esta unidad fueron obtenidos a partir del plásmido pUT713 (Gatignol y col., 1987) y el conjunto se encuentra integrado en el plásmido pULJL43 (Barredo, 1990).

2.24.1. Transformación de *Penicillium chrysogenum*.

Se ha empleado el método descrito previamente por Cantoral y col. (1987) y Díez y col. (1987) con

alguna modificación. El protocolo seguido se describe a continuación, numerándose de modo correlativo todos los pasos englobados en el proceso:

2.24.1.1. Crecimiento del micelio.

1. Se inoculan 100 mL de medio PMY con las esporas procedentes de una placa de medio PW sembrada con la cepa de *P. chrysogenum* a transformar y mantenida a 28°C durante 5 días y se incuba a 25°C durante un tiempo que depende de la cepa utilizada (normalmente en torno a las 16 horas), con agitación de 200 r.p.m.. Si la cepa utilizada es auxótrofa para la uridina el medio PW debe suplementarse con 100 µL de una solución de uridina 1M esterilizada por filtración.

2. Se recupera el micelio por filtración a través de un filtro de nilón Nyltal estéril de 30 µm de diámetro de poro y se lava sobre el filtro con 100 mL de NaCl al 0'9% (p/v). El micelio se seca sobre papel de filtro.

2.24.1.2. Obtención de los protoplastos.

3. Se resuspende 1 gramo de micelio en 10 mL de tampón TPP⁸¹ y se mezcla en un matraz de 250 mL con otros 10 mL de tampón TPP que llevan disueltos 25 mg (la concentración final es de 1'25 mg/mL) de una mezcla de enzimas líticas (Sigma Chemical Co.). La suspensión se incuba a 25°C durante dos horas, con agitación de 100 r.p.m., controlándose la liberación de los protoplastos con un microscopio.

4. La suspensión de protoplastos se filtra a través de un filtro de nilón Nyltal estéril de 30 µm de diámetro de poro. Se centrifuga durante 3 minutos a 2.500 r.p.m. y se lavan los protoplastos sedimentados resuspendiéndose en 10 mL de tampón KCM⁸². Se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones descritas y se repite el lavado dos veces más con el tampón KCM.

⁸¹ **Tampón TPP:** KCl 0'7 M y Tampón de fosfato potásico 50 mM pH 5'8.

⁸² **Tampón KCM:** CaCl₂ 50 mM, KCl 0'7 M y MES 10 mM pH 5'8.

5. Los protoplastos precipitados tras la última centrifugación se resuspenden en KCM en una concentración de aproximadamente 1×10^8 protoplastos/mL (tras añadir 5 veces el volumen del precipitado de tampón KCM) y a continuación se añade 1/10 del volumen total de tampón PCM⁸³. Esta suspensión de protoplastos se mantiene en un baño de hielo y agua hasta el momento de realizar la mezcla de transformación.

2.24.1.3. Transformación.

6. En el fondo de un tubo estéril de 10 mL se depositan los siguientes componentes:

Suspensión de protoplastos	100 µL
ADN (1-10 µg)	1-10 µL
Ácido aurintricarboxílico 0'1 M (opcional)	10 µL

Se mezcla bien con la pipeta, evitando la formación de burbujas, y se mantiene en un baño de hielo y agua durante 20 minutos.

7. Transcurrido este tiempo se añaden 500 µL de tampón PCM, se mezcla bien y se mantiene a la temperatura ambiental (20-25°C) durante otros 20 minutos.

8. Finalmente se diluye el polietilenglicol presente en el tampón PCM con 600 µL de tampón KCM, se mezcla bien y se mantiene a temperatura ambiente hasta el momento de la extensión sobre una placa.

2.24.1.4. Extensión en placa.

En este punto se presentan las mayores diferencias entre los dos tipos de transformación utilizados para *P. chrysogenum*. Si la selección se basa en la resistencia al antibiótico fleomicina el proceso a seguir se describe en el punto 9a, mientras que para el caso de transformaciones que utilizan la complementación de la auxotrofia para la uridina se seguiría el procedimiento descrito en el punto 9b.

⁸³Tampón PCM: CaCl₂ 50 mM, MES 10 mM pH 5'8 y PEG 8.000 al 50% (p/v).

9a. Se prepara la base de las placas de transformación (60 mm de diámetro) extendiendo 5 mL de medio Czapek/sorbitol con fleomicina en una concentración de 30 µg/mL. Una vez solidificado el medio se extiende sobre él la transformación, en forma de cobertera. Para ello se prepara en un tubo estéril de 10 mL la siguiente mezcla:

Mezcla de transformación	300 µL
Fleomicina (10 µg/mL en H ₂ O)	15 µL
Medio Czapek/sorbitol a 48°C	5 mL

Se extiende la mezcla sobre la base anteriormente preparada, se deja solidificar y las placas se incuban a 28°C durante 5 días.

9b. Se prepara la base de las placas de transformación de la misma forma, pero utilizando medio Czapek/KCl sin antibiótico (tampoco se añade en la mezcla de cobertera). La selección de los transformantes se basa únicamente en la capacidad que éstos presentan para crecer en un medio mínimo.

En cualquier caso, se utilice un tipo de transformación u otro se preparan placas con protoplastos transformados con un plásmido control y placas con protoplastos sin transformar (en condiciones de regeneración de los protoplastos y en condiciones de selección de los transformantes). Con ello pretendemos asegurarnos de la viabilidad de los protoplastos y del buen funcionamiento de la transformación, pudiendo también detectarse una posible contaminación de la cepa transformada con otra cepa o microorganismo.

2.24.2. Transformación de *Aspergillus nidulans*.

La transformación de las cepas *A. nidulans* ATCC 28901 y GH79 se realizó siguiendo un método modificado a partir del descrito por Yelton y col. (1984). El protocolo seguido es muy similar al descrito para *P. chrysogenum* y se describe a continuación, numerándose de modo correlativo todos los pasos englobados en el proceso:

2.24.2.1. Crecimiento del micelio.

1. Se inoculan 100 mL de medio ACM con las esporas procedentes de una placa de medio ACM sólido sembrada con la cepa de *A. nidulans* a transformar y mantenida a 28°C durante 4-5 días y se incuba a 25°C durante unas 16 horas, con agitación de 200 r.p.m.

2. Se recupera el micelio en un filtro de nilón Nyltal estéril de 30 µm de diámetro de poro y se lava sobre el filtro dos veces con tampón de lavado⁸⁴. El micelio se seca sobre papel de filtro.

2.24.2.2. Obtención de los protoplastos.

3. Se resuspende 1 gramo de micelio en 10 mL de tampón TPA⁸⁵ y se mezcla en un matraz de 250 mL con otros 10 mL de tampón TPA que llevan disueltos 60 mg (la concentración final es, pues, de 3 mg/mL) de una mezcla de enzimas líticas. La suspensión se incuba a 30°C durante 2-4 horas, con agitación de 100 r.p.m., controlándose la liberación de los protoplastos con un microscopio.

4. Se filtra la suspensión de protoplastos a través de un filtro de nilón Nyltal estéril de 30 µm de diámetro de poro. Se centrifuga durante 3 minutos a 4.000 r.p.m. y se lavan los protoplastos precipitados resuspendiéndolos en 10 mL de tampón STC⁸⁶. Se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones descritas y se repite el lavado dos veces más con el mismo tampón.

5. Los protoplastos precipitados tras la última centrifugación se resuspenden en tampón STC en una concentración de aproximadamente 1×10^8 protoplastos/mL (tras añadir 5 veces el volumen del precipitado de tampón STC) y a continuación se añade 1/10 del volumen total de

tampón PTC⁸⁷. Esta suspensión de protoplastos se mantiene en un baño de hielo y agua hasta el momento de realizar la mezcla de transformación.

2.24.2.3. Transformación.

6. El proceso de transformación es idéntico al descrito para *P. chrysogenum* por lo que no se repetirá aquí.

2.24.2.4. Extensión en placa.

7. Se prepara la base de las placas de transformación (60 mm de diámetro) extendiendo 5 mL de medio MSA con fleomicina en una concentración de 25 y 30 µg/mL. Una vez solidificado el medio se extiende sobre él la transformación, en forma de cobertera. Para ello se prepara en un tubo estéril de 10 mL la siguiente mezcla:

Mezcla de transformación	300 µL
Fleomicina (10 µg/mL en H ₂ O)	12'5/15 µL
Medio MSA a 48°C	5 mL

Se extiende la mezcla sobre la base anteriormente preparada, se deja solidificar y las placas se incuban a 30°C durante dos días.

2.25. Ensayo de las actividades enzimáticas.**2.25.1. Obtención de extractos acelulares a partir del micelio.**

Este método fue desarrollado del mismo modo para *A. nidulans*, *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum*.

1. El micelio incubado en condiciones de producción se recogió a las 48 horas sobre un filtro de nilón Nyltal de 30 µm de diámetro de poro y, tras

⁸⁴ **Tampón de lavado:** Tampón fosfato potásico 10 mM pH 5'8 y MgSO₄ 0'6 M.

⁸⁵ **Tampón TPA:** Tampón fosfato potásico 10 mM pH 5'8 y MgSO₄ 1'2 M.

⁸⁶ **Tampón STC:** CaCl₂ 10 mM, Sorbitol 1M y Tris-HCl 10 mM pH 7'5.

⁸⁷ **Tampón PTC:** CaCl₂ 10 mM, PEG 6.000 al 60% (p/v) y Tris-HCl 10 mM pH 7'5.

lavarse con 100 mL de una solución de NaCl al 0.9% (p/v), se congeló a -20°C.

2. Cuando fue necesario se descongeló el micelio y se resuspendió en un volumen de tampón TD⁸⁸ que triplicase su peso (para un ensayo normal bastaría con un gramo de micelio, mientras que para la realización de experimentos de cromatografía por filtración en gel se partió de al menos 30 gramos de micelio congelado). A partir de este momento la mezcla debe mantenerse en todo momento a una temperatura más o menos estable de 4°C. Para ello se introduce la mezcla en un baño de hielo y agua.

3. La rotura del micelio se consigue mediante la aplicación de ultrasonidos con un sonicador Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Co.), utilizando pulsos de 10-15 segundos y controlando que la temperatura de la muestra se mantuviese entre los 4 y los 6°C. A ello colabora el que cada aplicación de ultrasonidos va seguida de un intervalo de reposo de doble duración. El grado de rotura se comprueba por microscopía y normalmente son necesarios periodos de 30-60 minutos para la obtención de los extractos.

Puede conseguirse un resultado similar si el micelio congelado es reducido a polvo en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. El polvo obtenido se resuspendería en un volumen de tampón TD que sea el triple de su peso. La cantidad de proteína extraída en este caso es, sin embargo, inferior a la conseguida por el método anterior.

4. El extracto conseguido se centrifuga a 4°C y 14.000 r.p.m. durante 15 minutos en una centrifuga Eppendorf (para volúmenes pequeños) o a 4°C y 8.000 r.p.m. durante 15 minutos en un rotor Sorvall GSA (en el caso de volúmenes mayores).

5. El sobrenadante se mantiene a 4°C e inmediatamente será utilizado para otro proceso.

2.25.2. Eliminación de las moléculas de pequeño tamaño del medio

mediante cromatografía de filtración en gel.

Se utilizaron columnas PD-10 (Pharmacia Inc.), columnas rellenas con una matriz de Sephadex G-25 y que nos sirven, entre otras cosas, para eliminar las moléculas de antibiótico que pudieran interferir en el ensayo de la actividad enzimática de la IPN aciltransferasa.

El protocolo seguido se describe a continuación:

1. Se equilibra la columna con aproximadamente 25 mL de tampón TD. Posteriormente, cuando el tampón ha sido eluido, se aplica en la columna el sobrenadante obtenido en el apartado anterior, en un volumen total de 2.5 mL (si tenemos menos volumen deberá completarse con tampón TD).

2. Cuando la muestra ha penetrado completamente en el gel se eluyen las proteínas añadiendo 3.5 mL de tampón de elución (es un método utilizado normalmente para el cambio del tampón en el que se encuentran disueltas las proteínas, en nuestro caso el tampón de elución es también tampón TD).

3. Como resultado de la aplicación de esta técnica la solución de proteínas resulta diluida. A veces es necesario concentrar dicha solución como paso previo a la valoración de la actividad enzimática, por lo que se deposita en una unidad de ultrafiltración "Ultrafree" (Millipore). Este sistema permite el trasvase a un reservorio adicional de las moléculas inferiores a 10 kDa conservándose en la unidad las que superan este tamaño. Tras centrifugar a 4°C y 14.000 r.p.m. se puede ir comprobando a distintos tiempos el volumen de muestra que queda en la unidad, aumentando la concentración de proteína de la muestra a medida que la duración del proceso de centrifugación aumenta. Normalmente son suficientes 30-60 minutos para completar satisfactoriamente el proceso.

2.25.3. Ensayo de la actividad enzimática de la IPN aciltransferasa.

⁸⁸ Tampón TD: DTT 5 mM y Tris-CIH 50 mM pH 8.0.

La presencia de esta enzima se detecta mediante la valoración de una de sus actividades: la fenilacetil-CoA:6-APA aciltransferásica (AAT). El método utilizado a este efecto es una modificación del descrito por Alvarez y col. (1987).

1. La mezcla de reacción utilizada es la siguiente:

Tris-HCl 1M pH 8'0	5 µL
DTT 0'1 M	5 µL
6-APA 200 µg/mL	5 µL
Fenilacetilglutación	40 µL
Extracto enzimático	65 µL

Se incuba la mezcla 15 minutos a 25°C y la reacción se para con 100 µL de metanol.

El compuesto utilizado como donador del grupo lateral en el ensayo es una molécula más barata que la fenilacetil-CoA y fue sintetizada en nuestro laboratorio en base a un protocolo descrito anteriormente (Stadtman, 1957; Alvarez y col., 1993). Este método se fundamenta en la preparación de un anhídrido mixto entre el ácido fenilacético que va a esterificar el glutatión y el cloroformiato de etilo, seguido de una reacción entre dicho anhídrido y el glutatión. La concentración final de fenilacetilglutación en la mezcla de reacción es 10 mM y como resultado de la adición de este compuesto la penicilina formada por la IPN aciltransferasa es la bencilpenicilina o penicilina G.

2. Se centrifuga a 14.000 r.p.m. durante 5 minutos y se recoge el sobrenadante. Parte de este sobrenadante (dos muestras de 70 µL) es utilizado para depositarlo en pocillos hechos en una placa de TSA con un 1% de agar (p/v) y una cepa sensible a penicilina (un mililitro de un cultivo de *M. luteus* ATCC 9341 con una D.O.₆₀₀ de 1 o bien 200 µL de una suspensión de esporas de *B. subtilis* ATCC 6633 por cada 100 mL de medio TSA). Tras este paso se incuba a 4°C durante una hora, para que difunda el antibiótico, y durante 8-12 horas a 37°C. El resultado del bioensayo se traduce en la aparición de halos de inhibición del crecimiento del microorganismo sensible alrededor de los pocillos, halos directamente proporcionales al logaritmo de

la concentración de penicilina de la muestra. El ensayo se cuantifica con la utilización de soluciones de penicilina de concentración conocida que permiten la elaboración de una recta patrón.

2.25.4. Ensayo de la actividad enzimática de la β-galactosidasa.

1. En este caso el procedimiento habitual de rotura del micelio es la utilización de un mortero, en frío (con nitrógeno líquido), hasta obtener un polvo muy fino (van Gorcom y col., 1985). El método de ensayo utilizado es una variante del descrito por Miller (1972).

2. Se añade polvo de micelio a un tubo Eppendorf hasta alcanzar un volumen de 200-300 µL y se añade 1 mL de tampón de rotura⁸⁹ y 2 µL de PMSF 10 mM. Se mezcla, con la ayuda de un agitador, durante 5 minutos.

3. Se centrifuga a 4°C y 4.000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante es recogido en un tubo limpio y sometido a una nueva centrifugación a 4°C y 14.000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante de esta última centrifugación se mantiene a 4°C y será el extracto enzimático utilizado en la reacción de valoración de la actividad β-galactosidásica.

4. En este paso normalmente se realiza una reacción de prueba para determinar el volumen de extracto que añadido a la mezcla de reacción permita obtener valores de absorbancia de aproximadamente 0'4.

5. La reacción enzimática se realiza por triplicado, mediante la mezcla de los siguientes componentes:

Extracto enzimático	50 µL
Tampón Z ⁹⁰	450 µL

⁸⁹ **Tampón de rotura:** EDTA 1 mM y Tampón fosfato sódico 50 mM pH 7'0.

⁹⁰ **Tampón Z:** Para un litro se requieren 21'5 g de Na₂HPO₄·12 H₂O, 5'5 g de NaH₂PO₄·H₂O, 0'75 g de KCl y 0'246 g de MgSO₄·7H₂O.

2-mercaptoetanol	1'215 µL
Solución de ONPG ⁹¹	100 µL

Se incub a 37°C durante 1 hora y se para la reacción mediante la adición de 250 µL de Na₂CO₃ 1M. Con cada una de las muestras se realiza una reacción en la que el sustrato de la β-galactosidasa (ONPG) ha sido sustituido por agua destilada, para determinar la absorbancia debida a cada muestra (esta reacción se denomina BS, por “blanco sustrato”). Se realizan dos reacciones adicionales en las que la muestra es sustituida por agua, manteniéndose el resto de la reacción en sus valores normales. Estas reacciones, denominadas BP (por “blanco problema”), se utilizaron para determinar el valor 0 de absorbancia durante la cuantificación.

6. La cuantificación de la reacción enzimática se hizo mediante la medida del valor de absorbancia de las muestras a 420 nm. El método tradicional indica la necesidad de medir la absorbancia de las muestras a 420 y 550 nm (este último valor sería un indicador de la absorbancia debida a la muestra). En nuestro caso, la utilización de un “blanco sustrato” para cada muestra persigue el mismo efecto.

Los valores de absorbancia obtenidos son llevados a una ecuación para determinar la actividad enzimática de las muestras. La ecuación empleada es la siguiente:

$$A. E. = \frac{(\overline{DO_{420 M}} - DO_{420 BS}) \cdot V_T}{\epsilon \cdot V_{sob} \cdot t \cdot P}$$

En ella, la actividad enzimática (expresada en Unidades por miligramo de proteína) es una función directamente proporcional al valor medio de la absorbancia a 420 nm de las muestras (una vez descontado el valor debido a la propia muestra) y a V_T (volumen total de la reacción después de parada, expresado en mL) e inversamente proporcional a ε (una constante de valor 0'0045

⁹¹ Solución de ONPG (orto-nitrofenil β-D-galactopiranosido): Se disuelven 40 mg de este producto en 10 mL de Tampón fosfato sódico 0'1 M pH 7'0.

que representa el coeficiente de extinción del ONPG), a V_{sob} (volumen del extracto enzimático usado en la reacción, expresado en mL), a t (tiempo de incubación, expresado en minutos) y a P (concentración de proteína, expresada en mg/mL).

2.25.5. Cuantificación de las proteínas totales en la muestra.

La cuantificación de la concentración de proteína en los extractos acelulares se llevó a cabo por el método de Bradford (1976), utilizando el sistema “Protein Assay” (Bio-Rad Laboratories).

1. Se añaden 200 µL del reactivo de Bradford a 800 µL de la muestra a valorar (y a diluciones 1:100, 1:500 y 1:1000 de esta muestra), mezclándose con la ayuda de un agitador y dejándose en reposo durante 5 minutos (y nunca más de una hora).

2. Por último se mide la absorbancia a 595 nm de la reacciones realizadas. La concentración de proteína de la muestra se estima a partir de una recta patrón elaborada con soluciones de concentración conocida de ovoalbúmina.

Este método está basado en el cambio del máximo de absorción de 465 a 595 nm al unirse de modo específico el colorante Azul Brillante Coomassie G-250 a las proteínas.

2.25.6. Unidades enzimáticas.

La actividad enzimática de la IPN aciltransferasa se expresa en picokatales (picomoles de producto formados por segundo de reacción). Los valores de actividad específica para esta enzima se definen en picokatales por miligramo de proteína.

En el caso de la actividad β-galactosidásica las unidades son unidades arbitrarias y con un valor comparativo restringido al ámbito de la presente memoria. La actividad específica se expresa en unidades por miligramo de proteína.

2.26. Determinación del tamaño molecular por cromatografía de filtración en gel.

El tamaño molecular de la IPN aciltransferasa activa se calculó mediante cromatografía de filtración en gel. Esta técnica se basa en el empleo de matrices de cromatografía constituidas por partículas esféricas que presentan en su interior poros de un tamaño definido. Las proteínas incorporadas en la columna tienen dos posibilidades: si tienen un tamaño mayor que los poros de las partículas fluirán a lo largo de la columna mientras que si tienen un tamaño inferior se introducirán dentro de las partículas, por lo que su tiempo de retención será mayor y el volumen necesario para eluir las de la columna también. El uso de patrones proteicos permitirá la conversión de este volumen de elución en un tamaño molecular característico.

Se utilizó una columna de 70 cm de largo y 2,5 cm de diámetro rellena con una matriz de Sephadex G-75 Superfine (Pharmacia Inc.) y como patrones la ribonucleasa A (con un tamaño de 13.700 Da), el quimotripsinógeno (25.000 Da), la ovoalbúmina (43.000 Da) y la seroalbúmina bovina (67.000 Da). La aplicación de estos controles y la de azul de dextrano (2.000.000 Da), que permite la determinación del volumen muerto de la columna, nos permitió elaborar una recta patrón válida para la determinación del tamaño molecular de cualquier muestra aplicada a la columna (siempre que no supere los 75.000 Da, claro está).

Para la elaboración de la recta patrón es necesario introducir una magnitud que relacione el volumen

de elución de la proteína de interés con su tamaño molecular. La magnitud denominada K_{AV} puede servir a estos efectos, pues su valor es inversamente proporcional al logaritmo del tamaño molecular. Esta magnitud viene definida por la siguiente fórmula:

$$K_{AV} = \frac{V_E - V_V}{V_T - V_V}$$

En la ecuación V_E representa el volumen de elución de la proteína analizada (el patrón o la proteína de interés), V_V es el volumen vacío o volumen muerto de la columna (determinado por la aplicación del colorante azul de dextrano, es el volumen de elución de aquellas proteínas que no se retienen en la columna y fluyen directamente o, dicho de otro modo, el volumen de tampón que ocupa el gel y que influye por igual en todas las muestras) y V_T es el volumen total que ocupa el gel.

Los valores de K_{AV} obtenidos para los distintos patrones fueron:

Ribonucleasa A	=	0'528
Quimotripsinógeno	=	0'320
Ovoalbúmina	=	0'138
Seroalbúmina bovina	=	0'016

Con estos resultados se obtuvo la recta patrón que se observa en la figura 2.20.

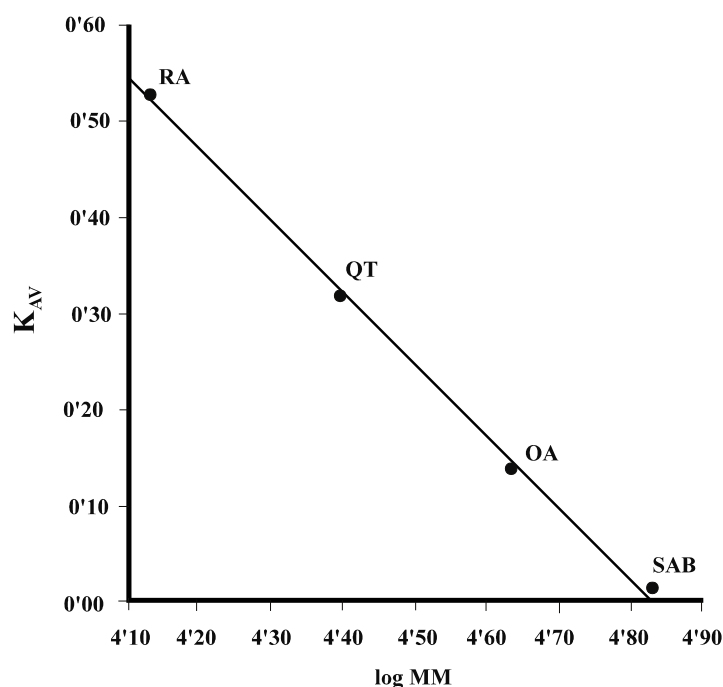


Figura 2.20. Recta patrón para la calibración de la columna de filtración en gel. **RA:** Ribonucleasa A, **QT:** Quimotripsinógeno, **OA:** Ovoalbúmina y **SAB:** Seroalbúmina bovina.

1. Para la determinación del tamaño molecular de la IPN aciltransferasa de distintas fuentes se procedió a la purificación parcial de las proteínas a partir de un extracto acelular obtenido en la forma descrita en el apartado 2.25.1. Tras centrifugar, el volumen del sobrenadante es medido en una probeta limpia y fría, para determinar la cantidad de sulfato de protamina que se añadirá a continuación.

2. Se disuelve un 0'4% (p/v) del volumen medido (más 10 mL que le añadiremos después) de sulfato de protamina en 10 mL de agua destilada y se calienta en un microondas hasta su completa disolución. Se añade esta solución gota a gota sobre el extracto proteico, mantenido en un baño de hielo y agua y sometido a una agitación suave con la ayuda de un agitador magnético. El sulfato de protamina ayuda a la eliminación de los ácidos nucleicos y las nucleoproteínas.

3. Se centrifuga la mezcla a 4°C y 8.000 r.p.m. en un rotor Sorvall GSA durante 25 minutos y el sobrenadante obtenido es medido con la ayuda de una probeta limpia y fría.

4. Se añade un 60% (p/v) de sulfato amónico al volumen del extracto proteico medido. El sulfato amónico debe triturarse previamente y se añade poco a poco al extracto, refrigerado en un baño de hielo y agua y sometido a una agitación suave con la ayuda de un agitador magnético.

5. Se centrifuga en las mismas condiciones descritas en el paso anterior y se desecha con cuidado el sobrenadante. El precipitado se resuspende en 3 mL de tampón TD, con cuidado de no introducir burbujas en la mezcla y manteniendo siempre una temperatura cercana a

los 4°C.

6. Se cargaron 3 mL de esta mezcla de proteínas en la columna previamente calibrada y se determinó el volumen de elución (y la K_{AV} por consiguiente) de la IPN aciltransferasa activa obtenida de las distintas fuentes mediante la valoración de la actividad enzimática fenilacetil-CoA:6-APA aciltransferásica (descrita en el apartado 2.25.3) de las fracciones obtenidas. Los valores de K_{AV} determinados para el volumen de elución correspondiente al máximo de la actividad enzimática fueron llevados a la recta patrón obtenida previamente, determinándose el tamaño molecular de las enzimas activas.

2.27. Expresión de los genes fúngicos en *Escherichia coli*.

Para la expresión del ADNc perteneciente a los genes *penDE* de *P. chrysogenum* y *A. nidulans* en *E. coli* se utilizó un sistema basado en el promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (Tabor y Richardson, 1985). El gen a expresar se fusiona al promotor $\phi 10$ del bacteriófago T7, presente en el plásmido pT7.7. Este promotor es reconocido específicamente por la ARN polimerasa del propio fago, cuyo gen está integrado en el genoma de la cepa *E. coli* JM109(DE3) bajo el control del promotor *lac* UV5 (inducible por IPTG). Así, una exposición a este compuesto induce la expresión de la ARN polimerasa del fago T7 y por lo tanto la actividad promotora de la secuencia $\phi 10$ bajo cuyo control se encuentra el gen de interés. Por ello, en estas condiciones, la proteína que se quiere expresar se encontrará más representada en la célula que las propias proteínas bacterianas.

2.27.1. Expresión de los genes en *E. coli*.

El protocolo utilizado se detalla a continuación:

1. Se construye la fusión entre el promotor $\phi 10$ presente en el plásmido pT7.7 y el gen clonado (si posee intrones debe utilizarse la secuencia de ADNc).

2. El plásmido resultante se transforma en la cepa *E. coli* JM109(DE3) y se extiende la transformación sobre medio LA con una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, incubándose a 37°C hasta la aparición de las colonias. Si la construcción se integra en un plásmido que confiera resistencia a cloranfenicol la selección se hace añadiendo este antibiótico en una concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ a las placas de LA.

3. A continuación se inocula un matraz de 500 mL con 100 mL de medio LB suplementado con el antibiótico apropiado con una colonia obtenida en la transformación anterior y se incuba a 37°C con agitación de 250 r.p.m. durante 12 horas.

4. Se pasan 2 mL del cultivo anterior a un matraz de 500 mL con 100 mL de medio LB suplementado con el antibiótico y se incuba a 37°C y 250 r.p.m. hasta que el cultivo alcance un valor de densidad óptica a 600 nm de 0.4 unidades. En este momento se añade IPTG (en una concentración final de 0.5 mM).

5. Se incuba el cultivo durante 3 horas más y se recogen las células por centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos en un rotor Sorvall GSA.

2.27.2. Marcaje radiactivo de proteínas por pulsos.

1. Se procede como en el apartado anterior hasta el punto 4, con la salvedad de que los cultivos se incuban solamente una hora tras la adición del compuesto inductor.

2. Se extrae 1 mL de cada cultivo inducido y se transfiere a un tubo de polipropileno estéril de 10 mL.

3. Se añaden al tubo 2.5 μL de una mezcla [^{35}S]Metionina/Cisteína (Trans ^{35}S -Label®, ICN

Biomedicals Inc.), con una actividad de aproximadamente 30 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$.

4. Se incuba durante 15 minutos en presencia de la mezcla de aminoácidos radiactivos y se recuperan las células por centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos en una centrífuga de mesa.

2.27.3. Análisis de la expresión heteróloga.

1. Las células precipitadas tras la centrifugación se resuspenden en un tampón Tris-HCl 50 mM pH 8'0 y EDTA 1 mM. La cantidad de tampón a añadir se determinó según el tamaño del precipitado.

2. Se tomaron 5 μL de la suspensión de células y se mezclaron con 10 μL de tampón de muestra desnaturante⁹². La mezcla así obtenida se hirvió durante 5 minutos y se cargó en un gel de acrilamida, siguiendo la técnica que se describirá en el apartado 2.28. La expresión de proteínas heterólogas se comprobó por comparación de los extractos proteicos de cada transformante en presencia y ausencia del compuesto inductor.

3. Para el caso de los experimentos de marcaje radiactivo los geles teñidos con azul de Coomassie se secaron y se expusieron a -70°C durante 48-72 horas dentro de un estuche con pantallas amplificadoras (DuPont) y un film de autorradiografía (Kodak X-OMAT AR). El revelado del film se realizó de acuerdo a procedimientos estándar.

2.27.4. Preparación de extractos acelulares de *E. coli* y purificación de

⁹² **Tampón de muestra desnaturante:** Se mezclan 4'8 mL de agua MilliQ, 1'2 mL de tampón Tris-HCl 0'5 M pH 6'8, 2 mL de SDS al 10% (p/v), 1 mL de glicerol y azul de bromofenol al 0'5% (p/v). Esta solución se puede conservar a temperatura ambiente. Si se desea reducir los puentes disulfuro de las proteínas se añaden 50 μL de β -mercaptoetanol por cada 950 μL de tampón de muestra.

cuerpos de inclusión.

1. Las células de *E. coli* incubadas de la forma habitual se recogieron por centrifugación a 8.000 r.p.m. durante 5 minutos en un rotor Sorvall GSA y se resuspendieron en tampón de lisis⁹³. Se homogeneizó la mezcla y se sometió a la acción de los ultrasonidos con un sonicador Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Co.), dentro de un baño de hielo y agua. Se aplicaron 5 pulsos de 10 segundos separados por periodos de 30 segundos.

2a. El extracto resultante se centrifugó a 4°C y 15.000 r.p.m. durante 15 minutos en un rotor Sorvall SS34, con el fin de eliminar los restos celulares y las proteínas incluidas en cuerpos de inclusión. El sobrenadante se utilizó en la valoración de la actividad enzimática de la IPN aciltransferasa.

2b. Cuando el extracto sonificado es centrifugado a bajas revoluciones (4°C y 3.000 r.p.m. durante 5 minutos en un rotor Sorvall GSA) pueden purificarse los cuerpos de inclusión. El precipitado obtenido tras la centrifugación se lava 2-3 veces con tampón de lavado⁹⁴ y es finalmente disuelto en urea 8 M.

2.27.5. Renaturalización de proteínas presentes en cuerpos de inclusión.

Si el objetivo es la renaturalización de las proteínas presentes en los cuerpos de inclusión, éstos se resuspenden en urea 8 M disuelta en un tampón redox⁹⁵. A continuación las proteínas se renaturalizan tras la dilución del tampón redox hasta una concentración final 4 M de urea y de 100 μg de proteína por mL y la adición de

⁹³ **Tampón de lisis:** DTT 5 mM, EDTA 1 mM pH 8'0, lisozima 1 mg/mL, NaCl 100 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8'0.

⁹⁴ **Tampón de lavado:** DTT 5 mM, EDTA 10 mM pH 8'0, lisozima 1 mg/mL, NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8'0 y Triton X-100 al 0'5% (v/v).

⁹⁵ **Tampón redox:** CaCl₂ 10 mM, Dímero de glutatión (GSSG) 1mM, MgCl₂ 10 mM, Monómero de glutatión (GSH) 10 mM y Tris 50 mM pH 8'0.

polietilenglicol 6.000 (en una relación molar final 10:1 de PEG respecto de la proteína). Esta mezcla se incuba durante 6 horas a la temperatura ambiental (20-25°C).

2.28. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes.

La electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó según el método descrito por Laemmli (1970). Este sistema discontinuo se basa en la utilización de dos geles contiguos: un gel separador, situado en la parte inferior, y un gel concentrante, situado en la parte superior. Los dos geles presentan distintas características de porosidad, pH y fuerza iónica. Además se utilizan distintos iones en los geles y en el tampón de electroforesis. La discontinuidad en los tampones permite la reducción del volumen de las muestras incorporadas al gel concentrante lo que favorecerá la resolución, de acuerdo a su tamaño molecular, de las bandas de proteína en el gel separador.

Para la realización de la SDS-PAGE se atendió al siguiente protocolo:

1. En primer lugar se monta la cubeta para la polimerización de los geles, según las instrucciones del fabricante. En nuestro caso se utilizó el sistema "Mini-Protean II" (Bio-Rad) para geles de 7 x 8 cm. El grosor del gel es de 0,75 mm.

2. Se prepara la mezcla con la acrilamida, utilizando las cantidades indicadas en la tabla 2.IV (la mayor o menor concentración de acrilamida permitirá la separación de proteínas de menor o mayor tamaño, respectivamente). No deben añadirse aún el persulfato amónico ni el TEMED, catalizadores de la polimerización. Esta mezcla se desgasifica durante 10 minutos.

3. A continuación se añaden los catalizadores de la polimerización, se mezcla

ligeramente y se deposita con una pipeta la solución entre los cristales de la cubeta previamente ensamblada. Cuando se alcanza la altura deseada para el gel separador se cubre inmediatamente la mezcla de gel con 2-butanol, para evitar el contacto con el aire, y se deja polimerizar durante 45-60 minutos.

4. Se prepara la solución del gel concentrante, con la siguiente mezcla:

Agua MilliQ	6,1 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 mL
Mezcla Acrilamida/Bis 30% ⁹⁶	1,3 mL
SDS al 10% (p/v)	100 µL
Persulfato amónico al 10% (p/v)	50 µL
TEMED	10 µL

Se sitúa un peine entre los dos cristales, para formar los pocillos donde se cargarán las muestras, se añade el gel y se deja polimerizar durante 15 minutos.

5. Se diluyen las muestras (con 10-40 microgramos de proteína, dependiendo del experimento) con al menos dos volúmenes de tampón de carga⁹⁷ y se hierve la mezcla durante 5 minutos.

⁹⁶ **Mezcla concentrada de acrilamida-bisacrilamida:** 30 g de Acrilamida y 0,8 gramos de Bisacrilamida. Se añade agua MilliQ hasta completar los 100 mL.

⁹⁷ **Tampón de carga (10 mL):** 4,8 mL de Agua destilada, 0,5 mL de Azul de bromofenol al 0,05% (p/v), 1 mL de Glicerol, 0,5 mL de 2-mercaptoetanol, 2 mL de SDS al 10% (p/v) y 1,2 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.

Componente	Concentración de poliacrilamida (%)		
	7'5 ^a	12 ^b	15 ^c
Agua MilliQ	4'85 mL	3'35 mL	2'35 mL
Tris-HCl 1'5 M pH 8'8	2'5 mL	2'5 mL	2'5 mL
Mezcla Acrilamida/Bis al 30% (p/v)	2'5 mL	4 mL	5 mL
SDS al 10% (p/v)	100 µL	100 µL	100 µL
Persulfato amónico al 10% (p/v)	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL

Tabla 2.IV. Volumen necesario de los distintos componentes para la preparación de 10 mL de mezcla (suficiente para dos geles de 7 x 8 cm de 0'75 mm de grosor).

a: Concentración utilizada para proteínas de masa molecular comprendida entre 250 y 50 kDa.

b: Concentración utilizada para proteínas de masa molecular comprendida entre 100 y 30 kDa.

c: Concentración utilizada para proteínas de masa molecular comprendida entre 60 y 10 kDa.

6. Se ensambla la cámara de electroforesis y se llenan las cubetas superior e inferior con tampón de electroforesis⁹⁸. Se cargan las muestras en los pocillos con una jeringa Hamilton[®].

7. Se conectan los electrodos a una fuente de corriente continua a 100-150 V. La electroforesis se detiene cuando la banda de colorante del tampón de muestra comienza a salir del gel.

8. Se tiñen los geles durante 30 minutos en solución de tinte⁹⁹ y se destiñen, hasta eliminar el fondo, en solución de desteñido¹⁰⁰ (normalmente durante 1-3 horas).

2.29. Ensayos de inmunodetección

⁹⁸ **Tampón de electroforesis:** 14'42 gramos de Glicina, 1 gramo de SDS, 3'03 gramos de Tris-HCl y agua destilada hasta 1 litro. Se ajusta el pH a 8'3 con HCl, si es preciso.

⁹⁹ **Solución para teñir el gel:** 100 mL de Acido acético glacial, 50 mL de Agua destilada, 0'5 gramos de Azul brillante de Coomassie R-250 y 450 mL de Metanol. El colorante se disuelve primero en metanol antes de añadir el resto de los componentes de la solución.

¹⁰⁰ **Solución para desteñir el gel:** 70 mL de Ácido acético glacial, 730 mL de Agua destilada y 200 mL de Metanol.

de la IPN aciltransferasa.

La detección inmunológica de proteínas inmovilizadas ("Western blotting"), descrita por Towbin y *col.* (1979), requiere de la separación electroforética de las proteínas y de su posterior transferencia a un soporte sólido. Una vez en este soporte, las proteínas son expuestas a la unión de anticuerpos específicos para una determinada secuencia de aminoácidos (los denominados epítomos antigénicos).

1. Cada conjunto de muestras que va a ser analizado mediante esta técnica se dispuso en dos geles de poliacrilamida en la forma ya descrita. Tras la separación electroforética, una de las réplicas se sometió a tinción con azul de Coomassie y la otra se equilibró sumergiéndola en un tampón de transferencia¹⁰¹, durante 15 minutos a la temperatura ambiental. A partir de este momento es muy importante el uso de guantes en todo momento, para evitar la aparición de manchas inespecíficas.

2. Se cortaron 6 láminas de papel Whatman 3MM y una membrana de transferencia

¹⁰¹ **Tampón de transferencia:** Glicina 39 mM, Metanol al 20% (v/v), SDS al 0'037% (p/v) y Tris base 48 mM. El pH se ajustó a un valor de 8'3.

Inmobilon® P de polivinil-fluoropropilideno (Millipore), de idénticas dimensiones que la porción resolutive del gel que iba a ser transferido. Las hojas de papel se empaparon en tampón de transferencia mientras que la membrana, extremadamente hidrofóbica, se humedeció en metanol durante 5 segundos, lavándose inmediatamente con agua destilada por dos veces durante 3 minutos. Tras el lavado la membrana se equilibró durante 5 minutos en tampón de transferencia.

3. La transferencia se llevó a cabo con un equipo NovaBlot LKB 2117-005 Multiphor II (LKB Instruments). Los electrodos de grafito se saturaron de agua destilada, retirándose el exceso con papel absorbente. Sobre el ánodo se dispusieron 3 láminas de papel Whatman 3MM, una a una y evitando la formación de burbujas entre las distintas capas. A continuación se colocó la membrana de transferencia, e inmediatamente sobre ella el gel de poliacrilamida. Las tres hojas de papel Whatman 3MM restantes se dispusieron sobre el gel de igual modo que las tres inferiores. Posteriormente se dispuso el cátodo y se conectó la unidad.

4. La electrotransferencia se realizó durante 45 minutos con una intensidad de 0'8 mA por cm² de superficie a transferir. Seguidamente se desmontó la unidad y el gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomassie para verificar la calidad de la transferencia.

5. Con el objeto de bloquear los sitios activos del filtro Inmobilon que no han sido ocupados por proteína (sitios a los que podrían unirse los anticuerpos), se incubó éste durante 30 minutos en tampón de saturación¹⁰². A continuación se sumergió durante 12 horas en una dilución del primer anticuerpo (dirigido contra la proteína de interés separada mediante electroforesis) en tampón de saturación. Las diluciones del primer anticuerpo oscilaron entre

1:1.000 y 1:5.000, según la cantidad de anticuerpo específico presente en el antisuero.

6. Tras tres lavados de 10 minutos cada uno en tampón de lavado¹⁰³, el filtro se incubó durante dos horas en un tampón para el segundo anticuerpo¹⁰⁴. El segundo anticuerpo es una anti-inmunoglobulina G de conejo que lleva acoplada en su molécula la enzima fosfatasa alcalina (Promega) y se añadió a este tampón en una dilución 1:7.500. Al finalizar este tratamiento el filtro se lavó tres veces consecutivas con tampón de lavado durante 5 minutos

7. Para el revelado se equilibró la membrana de transferencia en tampón de reacción¹⁰⁵ durante 5 minutos, incubándose posteriormente en 30 mL del mismo tampón suplementado con 100 µL de azul de nitrotetrazolio (NBT) y 50 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP), sustrato de la fosfatasa alcalina. Al liberarse BCI por acción de la enzima reaccionará con el NBT, dando lugar a un compuesto violáceo. Cuando se estimó conveniente (aproximadamente 5 minutos) se detuvo la reacción de revelado mediante la adición de varios volúmenes de agua destilada. El filtro, una vez seco, se conservó a la temperatura ambiental envuelto en un film plástico.

¹⁰² **Tampón de saturación:** Azida sódica 0'02% (p/v), BSA al 1% (p/v), NaCl al 0'9% (p/v) y Tris-HCl 50 mM pH 7'5.

¹⁰³ **Tampón de lavado:** NaCl al 0'9% (p/v), Tris-HCl 50 mM pH 7'5 y Tween 20 al 0'05% (v/v).

¹⁰⁴ **Tampón para el segundo anticuerpo:** Azida sódica 0'02% (p/v), BSA al 0'5% (p/v), NaCl 0'25 M y Tris-HCl 30 mM pH 8'0.

¹⁰⁵ **Tampón de reacción:** NaCl 100 mM, MgCl₂ 5mM y Tris-HCl 100 mM pH 9'5.

3. Resultados y Discusión

3.1. Caracterización de mutantes no productores de penicilina G afectados en el último paso de la ruta de biosíntesis del antibiótico.

Previamente se habían obtenido en nuestro grupo, por medio de mutagénesis al azar con nitrosoguanidina, algunos mutantes de *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 que presentaban alteraciones en su capacidad de biosíntesis de penicilina (Cantoral y col., 1993). Como se cita en la Introducción, uno de ellos (*npe10*) presenta una delección de 57'9 kpb que afecta a toda la región cromosómica que incluye los genes de biosíntesis de penicilina (Fierro y col., 1995a) mientras que los otros parecen poseer mutaciones puntuales (en lo referente al menos a los genes objeto de nuestro estudio), puesto que no se observa modificación en el patrón de tamaño de los fragmentos obtenidos tras la digestión con endonucleasas de restricción, separación electroforética e hibridación con sondas específicas de dichos genes (Cantoral y col., 1993). El mutante *npe5* carece de la actividad ACV sintetásica y en el caso de los mutantes *npe6*, *npe7* y *npe8* se determinó que la mutación responsable de la no producción de antibiótico se localizaba en el último paso de la biosíntesis, al no apreciarse la actividad enzimática de la isopenicilina N aciltransferasa.

Esto podría ser debido a varias razones:

a) las mutaciones podrían afectar al mecanismo de regulación de la expresión del gen, con lo que no se produciría la transcripción del gen *penDE*,

b) los mutantes podrían formar, mediante la aparición de un codón de finalización prematuro, una proteína incompleta o truncada que poseería una actividad enzimática menor o nula, o bien

c) podrían crearse sustituciones en los aminoácidos que constituyen el centro activo de la enzima o en aquellos que colaboran en el procesamiento postraduccional y la localización subcelular de la proteína. También podrían verse afectados aminoácidos necesarios para el mantenimiento de una organización tridimensional correcta de la proteína.

Estas tres posibilidades podrían llevar aparejadas un mismo tipo de efecto en lo referente a la observación de la actividad enzimática final.

3.1.1. Análisis de los transcritos de los genes biosintéticos de penicilina en los mutantes *npe6*, *npe7* y *npe8*.

El análisis de la existencia de transcritos y del tamaño de éste nos permite descartar la existencia de mutaciones localizadas a nivel de la regulación de la expresión del gen *penDE*.

El ARN total correspondiente a las cepas *P. chrysogenum npe5*, *npe6*, *npe7*, *npe8* y *npe10* y

Wisconsin 54-1255 (cepa parental de los mutantes, utilizada como control positivo) fue extraído e hibridado con una sonda que incluía el gen *penDE* completo (concretamente un fragmento de 1'6 kpb originado tras digestión con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *XbaI*; la sonda C de la figura 3.1). Un ARNm único y del mismo tamaño que el que presenta la cepa parental (aproximadamente 1'5 kb) se encontró en todos los mutantes *npe* a excepción de *npe10* (Fig. 3.2 C).

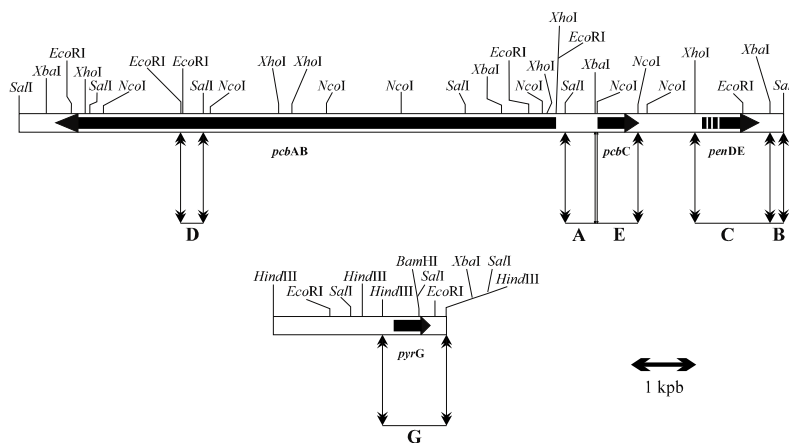


Figura 3.1. Fragmentos de ADN de *P. chrysogenum* portadores del agrupamiento génico para la biosíntesis de penicilina (esquema superior) y el gen *pyrG* (esquema inferior). Las sondas A y B se usaron en los experimentos de clonaje a partir de las bibliotecas genómicas construidas en λ -GEM-12 y las sondas C, D, E y G fueron utilizadas para la detección de la transcripción de los genes correspondientes mediante técnicas de Northern. Los genes se muestran como cajas negras, en las que la flecha indica la dirección de la transcripción.

Al mismo tiempo se observaron transcritos del tamaño esperado correspondientes a los genes *pcbAB* y *pcbC* (1'5 y 1'1 kb, respectivamente) en todos los mutantes, excepto en el *npe10* (Fig. 3.2 A y 3.2 B). Todas las cepas mostraron la presencia del transcrito de 1'1 kb correspondiente al gen *pyrG*, utilizado como control (Fig. 3.2 D).

El gen *pyrG* codifica para una enzima del metabolismo primario (la orotidina monofosfato decarboxilasa) que interviene en la biosíntesis de pirimidina y se encuentra localizado en el cromosoma II de *P. chrysogenum*, mientras que el grupo de los genes biosintéticos de penicilina se localiza en el cromosoma I (Fierro y col., 1993).

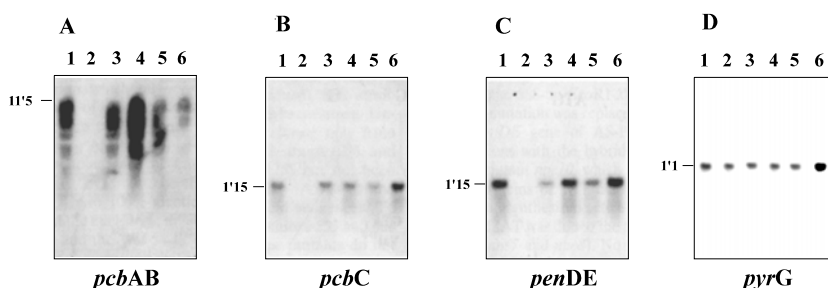


Figura 3.2. Transcritos de los genes *pcbAB* (A), *pcbC* (B), *penDE* (C) y *pyrG* (D) mostrados por hibridación con las sondas D, E, C y G, respectivamente (ver Fig. 3.1). Carriles: 1 - Cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255; 2 - *npe10*; 3 - *npe8*; 4 - *npe7*; 5 - *npe6*; 6 - *npe5*. El tamaño de los transcritos se indica en kb, a la izquierda de las fotografías. El transcrito correspondiente al gen *pcbAB* se encuentra parcialmente degradado debido a su gran tamaño. La hibridación con la sonda correspondiente al gen *pyrG* requirió tiempos de exposición superiores (14 días) a las otras (dos días) por los bajos niveles de expresión de este gen. Cada carril contiene 5 µg de ARN total.

3.1.2. Existencia de proteína IPN aciltransferasa en los mutantes *npe6*, *npe7* y *npe8*.

Las proteínas que formaban parte de los extractos crudos de los tres mutantes y de la cepa parental Wisconsin 54-1255 se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante como se describió en el apartado 2.28 de Materiales y Métodos. Tras la transferencia de las proteínas a un soporte sólido se procedió a la detección de la IPN aciltransferasa con anticuerpos generados contra la subunidad de 29 kDa de dicha proteína (anticuerpos policlonales de conejo cedidos por R. Bovenberg, de la compañía Gist-Brocades en Delft, Holanda, y capaces de reconocer no sólo la subunidad de 29 kDa sino también la forma precursora de 40 kDa, sin actividad enzimática en *P. chrysogenum*). Como se demuestra en la Fig. 3.3 se detectó la presencia de la proteína (en su forma precursora

o, de forma más intensa, en su forma madura) en los extractos de todos los microorganismos analizados, con excepción de los procedentes del mutante *npe10* (que carece de los genes de biosíntesis de penicilina). Los resultados obtenidos con los extractos del mutante *npe10* nos sirven como control negativo a la hora de estimar la especificidad de los anticuerpos utilizados en el ensayo.

Los mutantes *npe6*, *npe7* y *npe8* poseen IPN aciltransferasas del mismo tamaño que la cepa parental y mantienen intacta la capacidad de procesar la proteína de 40 kDa para originar las subunidades de 11 y 29 kDa. Puesto que la evidencia previa sugiere que estos mutantes carecen de la actividad IPN aciltransferásica que cataliza el último paso de la ruta de biosíntesis de penicilina, cabe suponerse que la proteína formada en estos mutantes es inactiva desde el punto de vista enzimático.

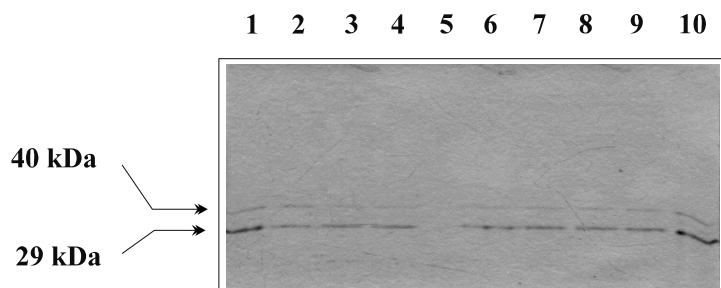


Figura 3.3. Inmunodetección de la proteína de 40 kDa (no procesada) y de la subunidad de 29 kDa de la IPN aciltransferasa de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (carriles 1 y 10), de las proteínas de los mutantes *npe6* (carril 2), *npe7* (carril 3), *npe8* (carril 4) y de las proteínas expresadas en los transformantes de *npe10* obtenidos con las construcciones pULPP6M y pULPP6H (carriles 6 y 7, respectivamente) o pULPP7M y pULPP7H (carriles 8 y 9, respectivamente). En el carril 5 se incluyó un extracto enzimático procedente del mutante *npe10*. Las construcciones mencionadas en esta figura se describen en la figura 3-15.

3.1.3. Construcción de bibliotecas genómicas de los mutantes *npe6*, *npe7* y *npe8* en el vector de reemplazamiento λ -GEM-12.

La existencia en los tres mutantes del ARNm y las proteínas correspondientes al gen *penDE* y de la aparente normalidad en lo que se refiere al tamaño de ambos o a la capacidad de procesamiento de la proteína precursora nos llevaron a plantearnos la posibilidad del clonaje y el análisis de la secuencia de nucleótidos de los genes *penDE* procedentes de los mutantes como forma de obtener la información que nos permitiera relacionar la pérdida de actividad enzimática con los cambios nucleotídicos originados tras el proceso de mutagénesis (es decir, con la existencia de cambios en la secuencia del gen que se tradujeran en la sustitución de aminoácidos imprescindibles para la actividad de la enzima por él codificada).

En primer lugar procedimos a la construcción de bibliotecas de ADN correspondientes a los tres mutantes a analizar, descartándose la estrategia de clonaje mediante el uso de las técnicas de “reacción en cadena de la polimerasa” debido a la

sospecha de la presencia de mutaciones de carácter puntual en el gen *penDE* y a la necesidad, por consiguiente, del mayor grado de fiabilidad posible.

Se obtuvo el ADN total correspondiente a los tres microorganismos por los métodos ya descritos anteriormente (apartado 2.9) y se procedió a su digestión con la endonucleasa de restricción *Sau3AI*, que genera fragmentos de ADN con extremos compatibles con los originados por la endonucleasa *BamHI*. La elección de la primera de ellas respecto de la segunda radica en que *Sau3AI* reconoce secuencias de ADN de tan sólo cuatro nucleótidos (frente a los seis nucleótidos que componen la secuencia de reconocimiento de la endonucleasa *BamHI*), por lo que se obtiene una variabilidad mucho mayor en los fragmentos que se generan tras el tratamiento con esta enzima. La digestión con *Sau3AI* se controla mediante la limitación del periodo de incubación o, más fácilmente, mediante la disminución secuencial de la cantidad de enzima suministrada. Con ello se consiguen digestiones parciales del ADN, apareciendo fracciones especialmente enriquecidas en tamaños concretos (Fig. 3.4). Los fragmentos obtenidos presentan un tamaño que varía en una forma

inversamente proporcional a los dos parámetros mencionados: duración del tratamiento y cantidad utilizada de la enzima. Los tamaños óptimos para su ensamblaje con el vector λ -GEM-12 se encuentran en el rango entre las 13-18 kpb y las digestiones parciales enriquecidas en estos tamaños se sometieron a centrifugación en un gradiente de sacarosa (Fig. 3.5).

Los fragmentos purificados a partir de las fracciones del gradiente se ligaron con el vector mencionado, digerido con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. A continuación la mezcla de ensamblaje se encapsidó mediante el uso del sistema de encapsidación "Gigapack II Plus" (Stratagene).

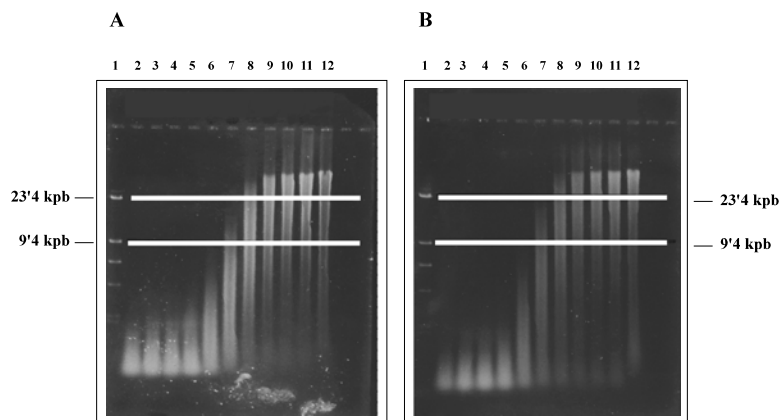


Figura 3.4. Digestiones parciales con la endonucleasa *Sau*3AI del ADN total de los mutantes *npe8* (A) y *npe6* (B). Con líneas blancas se delimita la región de tamaños útiles en la construcción de las bibliotecas.

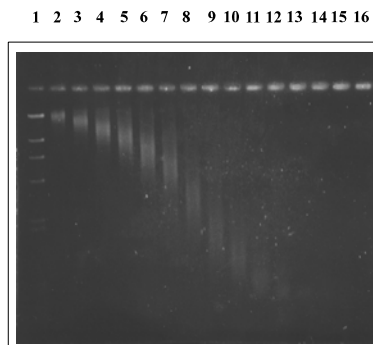


Figura 3.5. Fracciones obtenidas por centrifugación en gradiente de sacarosa de la digestión parcial seleccionada en el paso anterior para el ADN del mutante *npe7*. La fracción óptima (en este caso la correspondiente al carril 3) es aquella que posee moléculas de ADN de alrededor de 15 kpb.

Las mezclas de encapsidación fueron utilizadas para realizar pruebas de infección con las cepas de *E. coli* LE392 y NM359, pruebas que dieron como resultado la determinación del título de

bacteriófagos presente en las tres bibliotecas genómicas construidas:

- Biblioteca genómica de *P. chrysogenum* Wis. 54-1255 *npe6*: 675.000

unidades formadoras de placas (u.f.p., es una medida del número de bacteriófagos con capacidad infectiva real).

- Biblioteca genómica de *P. chrysogenum* Wis. 54-1255 *npe7*: 420.000 u.f.p.

- Biblioteca genómica de *P. chrysogenum* Wis. 54-1255 *npe8*: 417.500 u.f.p.

De acuerdo a lo descrito en el apartado 2.14.3, el número de bacteriófagos obtenidos permite suponer la representación de todo el ADN del microorganismo en las bibliotecas genómicas sintetizadas, por lo que se procedió a su

amplificación y conservación a 4 y -70°C.

Alrededor de 40.000 unidades formadoras de placas procedentes de las bibliotecas genómicas amplificadas se hibridaron con las sondas A (un fragmento de 677 pares de bases originado tras la digestión con las endonucleasas *Sall* y *XbaI*, localizado en el genoma de *P. chrysogenum* aguas arriba del gen *pcbC*) y B (un fragmento de 350 pares de bases originado tras la digestión con las endonucleasas *XbaI* y *Sall*, localizado en el genoma de *P. chrysogenum* aguas abajo del gen *penDE*), previamente marcadas de forma radiactiva con la técnica del desplazamiento de mellas. En la Fig. 3.1 se puede observar un esquema de la localización de las sondas.

Como resultado de estos experimentos se seleccionaron varios bacteriófagos que mostraban señales de hibridación positiva y que fueron purificados a través de sucesivos experimentos de hibridación (un ejemplo de ello puede apreciarse en la Fig. 3.6).

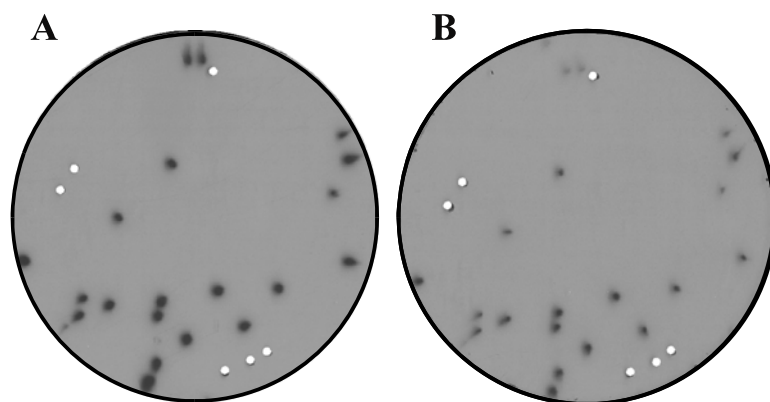


Figura 3. 6. Resultado de la exposición de filtros con el ADN de bacteriófagos seleccionados como portadores del gen *penDE* del mutante *npe8*. Se realizaron dos réplicas de cada placa y cada una de ellas fue hibridada con una sonda distinta : **A**- sonda A y **B**-sonda B (Fig. 3.1). Con puntos blancos se indican las marcas realizadas en el filtro para su posterior orientación.

3.1.4. Clonaje y análisis de secuencia de fragmentos de ADN que contienen los genes *penDE* de los mutantes *npe6*, *npe7* y *npe8*.

A partir del ADN de los bacteriófagos purificados de cada una de las tres bibliotecas genómicas se procedió al clonaje de los fragmentos de 5'1 kpb originados tras la digestión con la endonucleasa *SalI* (y que contienen los genes *pcbC* y *penDE*) y al subclonaje de los fragmentos de 3'1 kpb obtenidos tras la digestión con las endonucleasas *BamHI* y *XbaI* comprendidos en ellos (ver Introducción, Fig. 1.5). Estos fragmentos de 3'1 kpb contienen la secuencia que codifica el extremo carboxilo terminal de la IPN sintasa, la región localizada entre los genes *pcbC* y *penDE* y el gen *penDE* completo y fueron integrados en un vector pBluescript® KS(+) digerido con la endonucleasa *HindII* (que genera extremos romos) tras rellenar los extremos cohexivos generados por las endo-

nucleasas de restricción utilizadas. Se seleccionaron las dos posibles orientaciones del inserto en el vector para cada fragmento procedente de un mutante *npe* distinto y los plásmidos resultantes se purificaron mediante ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio, generándose a continuación delecciones unidireccionales (sistema "erase-a-base", Promega) de los plásmidos digeridos con las endonucleasas de restricción *XbaI*, rellenados con nucleótidos modificados que impidan la digestión exonucleolítica desde ese extremo del ADN y digeridos finalmente con la endonucleasa *BamHI*, que permite la digestión exonucleolítica desde este otro extremo de la molécula lineal de ADN.

A partir de los nuevos plásmidos obtenidos, se seleccionaron los clones portadores de las delecciones adecuadas (Fig. 3.7), clones que serían utilizados en los procesos de análisis de la secuencia de ADN tras la obtención de ADN de cadena sencilla.

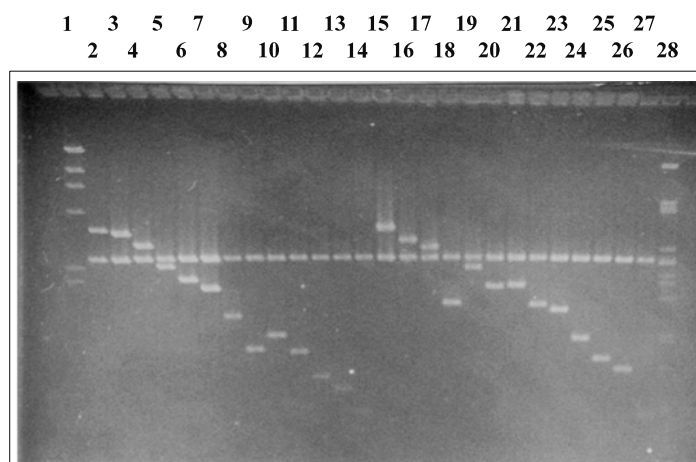


Figura 3.7. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones con endonucleasas de restricción realizadas con algunos de los clones seleccionados para el proceso de análisis de la secuencia de ADN del gen *penDE* correspondiente al mutante *npe7*.

3.1.5. Caracterización de las mutaciones.

El análisis de la secuencia se realizó para las dos cadenas del ADN mediante la aplicación del método de los didesoxinucleótidos, utilizando para la polimerización el sistema “Sequenase” (Amersham). El cebador utilizado fue el T7.

Las secuencias obtenidas para los tres mutantes (Fig. 3.8, 3.9 y 3.10) se compararon con la secuencia descrita anteriormente para el gen *penDE* del microorganismo *P. chrysogenum* AS-P-78 (Barredo y col., 1989c).



Figura 3.8. Secuencia de nucleótidos del gen *penDE* correspondiente al mutante *npe6*. Las mutaciones encontradas con respecto a la secuencia del gen *penDE* silvestre de *P. chrysogenum* AS-P-78 se encuentran recuadradas y sombreadas. Nótese que sólo una de ellas provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos (una valina, recuadrada y sombreada).

```

          G C C C C A G T T G A T G T C C C A T C A G T G T C A T G C T A T G G T C C C A G A T T G G T G G C T A C G G C C A A T A T A A A T C
TCAGCATGCAGTTCGGCTGCATGATCATCCCCAGGACGCGTTTGTATCTCCGTACGCCAGGTCTCAGTTGTTTACCCATCTCCGACCCCGCAGCAGAA -101
ATGCTTCACATCCTCTGTCAAGGCCTCCCTTTGAAGTAAGTGTGCACTGAATACCAGATTTTTCTCTCTGAATCTCCGAGTTCTGACCTGATCCAG -1
m l h i l c q g t p f e
-----
ATCGGCTACGAACATGGCTCTGCTGCCAAGCCGTGATAGCCAGAAGCATTGACTTCGCCGTGATCTCATCCGAGGAAAAAGAAAGACGGACGAAG 200
i g y e h g s a a k a v i a r s i d f a v d l i r g k t k k t d e e
AGCTTAACAGGTACTCTCGCAACTGGGGCCGCTGATCGAGGAAAGATGGCCAAATACTACGAGGAGATTCCGGGTGAGTGCCACTTCGGTCTTTCCTA 300
l k q v l s q l g r v i e e r w p k y y e e i r g
CATTCTGCACCAATGCTGACCGATGACCCCGAAAAACCAGGTATTGCAAAGGGCGCTGAACGGATGTCTCCGAGATTGTCATGCTTAATACCCGCA 400
-----
          i a k g a e r d v s e i v m l n t r t
CGGAATTTGCATACGGGCTCAAGGCAGCCCGTGTGGCTGCACCACCTGCTTATGTCAACTTCCAAATGGAGCCCTCCAGGGCCAAAACGGGATGTACG 500
e f a y g l k a a r d g c t t a y c q l p n g a l q g q n w d
TTAAGAGATTTTACCTCCTCATTATTTCATCGAATTTGCGCCGACTAATTTGGTTGTCAAGTCTTTCTGCCACCAAAGAGAACCTGATCCGGTTA 600
-----
          f f s a t k e n l i r l
ACGATCCGTCCAGGCCGACTTCCCACCATCAAATTCATAACCGAGGCTGGAATCATCGGAAGGTTGGATTTAACAGTGGCGGGGTGCGCGCTCAATTACA 700
t i r q a g l p t i k f i t e a g i i g k v g f n s a g v a v n y n
ACGCGCTTACCTTCAGGGTCTTCGACCCACCGGAGTTCCTTCGCATATTGCCCTCCGCATAGCGCTCGAAAGCACTTCTCCTTCCAGGCCTATGACCG 800
a l h l q g l r p t g v p s h i a l r i a l e s t s p s q a y d r
GATCGTGGAGCAAGCGGAATGGCCGCCAGCGCTTTTATCATGGTGGCAATGGCCACGAGGCATTTGGTTTGAATCTCCCCACCAGCATCCGAAAG 900
i v e q g g m a a s a f i m v g n g h e a f g l e f s p t s i r k
CAGTGCTCGACCGCAATGGTAGGATGGTGCACACCAACCCTGCTTGTCTCAGCACGGCAAAAATGAGAAAAGCTCGATCCCTTACCGGACTCATGGA 1000
q v l d a n g r m v h t n h c l l q h g k n e k l d p l p d s w n
ATCGCCACCAGCGTATGGAGTTCTCCTCGACGGTTCGACGGCACCAACAGGCATTTGCCAGCTCTGGCCGACGAAGCAATATCCCTTTAGCAT 1100
r h q r m e f l l d g f d g t k q a f a q l w a d e d n y p f s i
CTGCCCGCTTACGAGGAGGGCAAGAGCAGAGGGCGGACTCTGTTCAATATCATCTACGACCATGCCGTAGAGAGGCAACGGTGGCGCTTGGCCGGCCG 1200
c r a y e e g k s r g a t l f n i i y d h a r r e a t v r l g r p
ACCAACCTTGATGAGATGTTGTGATCGGGTTGACGAGGAGGACGAGAGGTCTGCGCTCAACCCAGGCTTTGAAGGCTCTTCATGACGAGCCAAATGCA 1300
t n p d e m f v m r f d e e d e r s a l n a r l .
TCTTTGTATGTAGCTTCAACCGACTCCGTCTTCACTTCTTCGCCGCACTGCCTACCGTTTGTACCATGTGACTCATATAAATGTAGCCCTACCTA 1400
CACTATACCTAAGGGAGAGAAGCGTAGAGTGAATTAACGTACGGCCCTATAGTACCCCGAT

```

Figura 3.9. Secuencia de nucleótidos del gen *penDE* correspondiente al mutante *npe7*. Las mutaciones encontradas con respecto a la secuencia del gen *penDE* silvestre de *P. chrysogenum* AS-P-78 se encuentran recuadradas y sombreadas. Al igual que ocurre en la figura anterior, sólo una de ellas provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos (una lisina, recuadrada y sombreada).



Figura 3.10. Secuencia de nucleótidos del gen *penDE* correspondiente al mutante *npe8*. Las mutaciones encontradas con respecto a la secuencia del gen *penDE* silvestre de *P. chrysogenum* AS-P-78 se encuentran recuadradas y sombreadas. También en este caso sólo una de ellas tiene reflejo en la secuencia de aminoácidos de la IPN aciltransferasa. La mutación presente en el gen *penDE* del mutante *npe8* es idéntica a la que aparece en el mismo gen del mutante *npe7*.

Como se muestra en las figuras 3.11 y 3.12, cada uno de los mutantes presentó tres sustituciones de nucleótidos con respecto a la secuencia de nucleótidos del gen *penDE* de AS-P-78, sustituciones que se traducen en la aparición de un único cambio si la comparación se hace a nivel de aminoácidos. Dos de estos cambios nucleotídicos son comunes a los tres mutantes analizados y no afectan a la secuencia de aminoácidos de la IPN aciltransferasa:

① el primero de los cambios (desoxicidina en los mutantes en lugar de desoxiadenosina en AS-P-78, en la posición 650 del gen) se localiza dentro de la secuencia del

tercer intrón del gen, en una región no esencial para el procesamiento del ARNm,

② el segundo nucleótido alterado (una desoxiguanosina en los mutantes frente a una desoxicidina en AS-P-78, en la posición 684 del gen) afecta a la tercera posición del triplete de nucleótidos que codifica para el aminoácido localizado en la posición 161 de la IPN aciltransferasa. Los dos codones descritos (GGC en los mutantes y GGG en AS-P-78) codifican para el aminoácido glicina, por lo que la sustitución del nucleótido no provoca ninguna alteración en la secuencia de aminoácidos.

IAT <i>npe6</i>	MLHILCQGTPEIGYEHGSAAKAVIARSIDFAVDLIRGKTKKTDE	
IAT <i>npe7/npe8</i>	MLHILCQGTPEIGYEHGSAAKAVIARSIDFAVDLIRGKTKKTDE	
IAT AS-P-78	MLHILCQGTPEIGYEHGSAAKAVIARSIDFAVDLIRGKTKKTDE	45
IAT <i>A. nidulans</i>	MLHVTCQGTPEIGYHHGSAAKGEIAKAIDFATGLIHGKTKKTQA	
		↓
	ELKQVLSQLGRVIEERWPKYEEIRGIAKGAERDVSEIVMLNTRTEFAYGLKAARDGCTT	
	ELKQVLSQLGRVIEERWPKYEEIRGIAKGAERDVSEIVMLNTRTEFAYGLKAARDGCTT	
	ELKQVLSQLGRVIEERWPKYEEIRGIAKGAERDVSEIVMLNTRTEFAYGLKAARDGCTT	105
	ELEQLLRELEQVMKQRWPRYYEICGIAKGAERDVSEIVMLNTRTEFAYGLVEARDGCTT	
	AYCQLPNGALQGQNWDFFSATKENLIRLTIRQAGLPTIKFITEAVIIGKVGFSAGVAVN	
	AYCQLPNGALQGQNWDFFSATKENLIRLTIRQAGLPTIKFITEAGIIGKVGFSAGVAVN	
	AYCQLPNGALQGQNWDFFSATKENLIRLTIRQAGLPTIKFITEAGIIGKVGFSAGVAVN	165
	VYCKTPNGALQGQNWDFFTATKENLIQLTICQPGLPTIKMITEAGIIGKVGFSAGVAVN	
	YNALHLQGLRPTGVPSHIALRIALESTSPSQAYDRIVEQGGMAASAFIMVNGHEAFGLE	
	YNALHLQGLRPTGVPSHIALRIALESTSPSQAYDRIVEQGGMAASAFIMVNGHEAFGLE	
	YNALHLQGLRPTGVPSHIALRIALESTSPSQAYDRIVEQGGMAASAFIMVNGHEAFGLE	215
	YNALHLHGLRPTGLPSHLALRMALALESTSPSEAYEKIVSQGGMAASAFIMVNGAHEAYGLE	
	FSPTSIRKQVLDANGRMVHTNHCLLQHGGKNEKELDPLPDSWNRHQRMFLLDGGFDGTKQA	
	FSPTSIRKQVLDANGRMVHTNHCLLQHGGKNEKELDPLPDSWNRHQRMFLLDGGFDGTKQA	
	FSPTSIRKQVLDANGRMVHTNHCLLQHGGKNEKELDPLPDSWNRHQRMFLLDGGFDGTKQA	275
	FSPI SLCKQVADTNGRIVHTNHCLLNHGSPSAQELNPLPDSWSRHRGRMEHLLSGFDGTKEA	
	FAQLWADEDNYPFSICRAYEEGKSRGATLFNIIYDHARREATVRLGRPTNPDEMFMVRFD	
	FAQLWADEDNYPFSICRAYEEGKSRGATLFNIIYDHARREATVRLGRPTNPDEMFMVRFD	
	FAQLWADEDNYPFSICRAYEEGKSRGATLFNIIYDHARREATVRLGRPTNPDEMFMVRFD	335
	FAKLWEDEDNYPFSICRAYEEGKSRGATLFNIVFDHVRKATVRLGRPTNPDET FVMTF S	
	EEDERSALNARL	
	EEDERSALNARL	
	EEDERSALNARL	347
	NLDTKSAIQANI	

Figura 3.11. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas para las IPN aciltransferasas de los mutantes *npe6*, *npe7* y *npe8* y para *P. chrysogenum* AS-P-78 y *A. nidulans* ATCC 28901. Con una flecha vertical se indica el sitio de procesamiento de la proteína de *P. chrysogenum*. En cajas sombreadas se indican los cambios de aminoácidos detectados en los mutantes *npe* (Gly¹⁵⁰ a Val o Glu²⁵⁸ a Lys). Es de destacar que los dos aminoácidos afectados por la mutación se encuentran conservados en la proteína de *A. nidulans* (el resto de Gly¹⁵⁰ se encuentra en una región muy conservada, mientras que el de Glu²⁵⁸ está conservado dentro de una región con muy baja similitud, recuadrada en el esquema). Las mutaciones encontradas no afectan a la región que rodea al sitio de procesamiento (subrayada) o al tripéptido Ala-Arg-Leu del extremo C-terminal de la proteína (recuadrado), responsable de la localización de la enzima en microcuerpos.

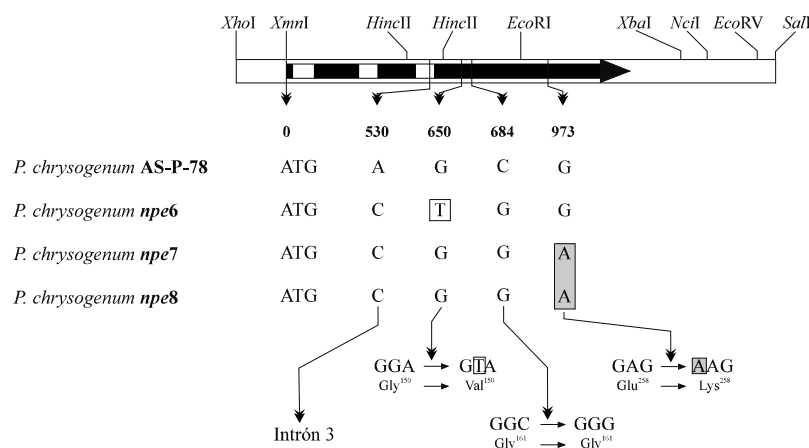


Figura 3.12. Esquema de las mutaciones presentes en el gen *penDE* de los mutantes *npe6*, *npe7* y *npe8*, en comparación con la secuencia de nucleótidos del gen silvestre de *P. chrysogenum* AS-P-78 (número de acceso en GenBank M31454). La caja negra indica la posición del gen *penDE* y las tres cajas blancas contenidas en ella corresponden a los tres intrones presentes en el gen. Las mutaciones en los nucleótidos de las posiciones 650 y 973, que originan cambios aminoacídicos (Gly-150 a Val y Glu-258 a Lys, respectivamente), se encuentran recuadradas y sombreadas.

el tercer cambio sí que origina diferencias en la secuencia aminoacídica de los mutantes respecto de la secuencia de la proteína de AS-P-78, y esta parece ser la razón de la pérdida de la actividad aciltransferásica. Este cambio es específico en cada mutante :

- la mutación que aparece en *npe6* (desoxitimidina en los mutantes por desoxiguanosina en AS-P-78, en la posición 650 del gen) se traduce en un cambio de la glicina de la posición 150 de la proteína por valina.

- la mutación que aparece en *npe7* y en *npe8* es idéntica (desoxiadenosina en los mutantes por desoxiguanosina en AS-P-78, en la posición 973 del gen) y se traduce en un cambio de ácido glutámico por lisina en la posición 258 de la proteína. Esta mutación origina una modificación de un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *SacI*, lo que es apreciable en el patrón de hibridación con la sonda C (Fig. 3.1) del ADN digerido con esta endonucleasa de los

bacteriófagos seleccionados correspondientes a las librerías genómicas de los dos mutantes (Fig. 3.13). La existencia de un sitio de reconocimiento para la endonucleasa *SacI* dentro del gen *penDE* de la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y del mutante *npe6* y la pérdida de este sitio de reconocimiento en los mutantes *npe7* y *npe8* fueron confirmadas por hibridación con la misma sonda C de los respectivos ADN totales digeridos con la endonucleasa *SacI* (Fig. 3.14).

Las dos sustituciones nucleotídicas comunes en las secuencias obtenidas para los genes *penDE* de los mutantes (posiciones 530 y 684 del gen) muy probablemente son debidas a diferencias entre la cepa parental Wisconsin 54-1255 (de la que los mutantes derivan) y AS-P-78. Desafortunadamente sólo se han analizado previamente las secuencias de nucleótidos del gen *penDE* en cepas de *P. chrysogenum* de alta producción, como AS-P-78 (Barredo y col., 1989c) y OM6.232.12 (Tobin y col., 1990) y se desconoce la secuencia del mismo gen de Wisconsin 54-1255.

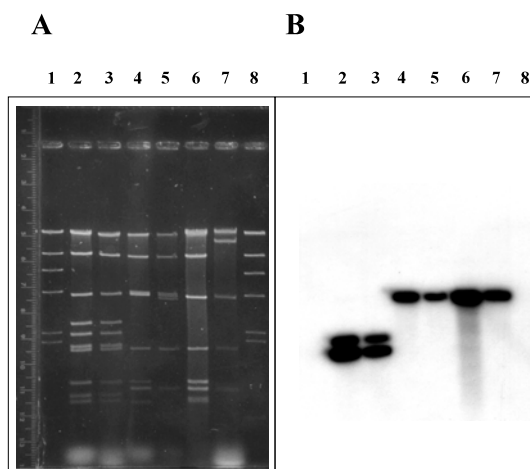


Figura 3.13. **A:** Electroforesis en gel del ADN digerido con la endonucleasa de restricción *SacI* de los bacteriófagos seleccionados a partir de las bibliotecas genómicas de los mutantes *npe6* (bacteriófago 6_{1.1}, carril 2 y 6_{1.2}, carril 3), *npe7* (bacteriófago 7_{1.1}, carril 4 y 7_{1.2}, carril 5) y *npe8* (bacteriófago 8_{1.1}, carril 6 y 6_{1.2}, carril 7). En los carriles 1 y 8 se ha incluido λ /*HindIII* como marcador de tamaño. **B.** Resultado de la hibridación del ADN presente en el gel anterior con la sonda C (Fig. 3.1).

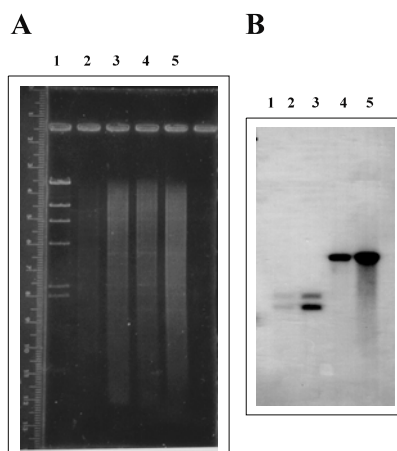


Figura 3.14. **A:** Electroforesis en gel del ADN digerido con la endonucleasa de restricción *SacI* de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (carril 2) y de los mutantes *npe6* (carril 3), *npe7* (carril 4) y *npe8* (carril 5). En el carril 1 se ha incluido λ /*HindIII* como marcador de tamaño. **B.** Resultado de la hibridación del ADN presente en el gel anterior con la sonda C (Fig. 3.1). Obsérvese que los mutantes *npe7* y *npe8* carecen de un sitio de reconocimiento y corte para la endonucleasa *SacI* dentro de la secuencia de ADN del gen *penDE*. El cambio de una guanósina en la posición 973 del gen por una adenósina altera la secuencia GAGCTC reconocida por la enzima (se resalta subrayado y en negrita el nucleótido modificado).

3.1.6. Complementación de las mutaciones.

Para confirmar que las diferencias nucleotídicas localizadas en las posiciones 533 y 684 del gen entre los mutantes y AS-P-78 no afectaban a la actividad enzimática y que la pérdida de ésta era debida a las mutaciones localizadas en las posiciones nucleotídicas 650 y 973 del gen se construyeron genes híbridos que permitían la recuperación de los aminoácidos originales Gly¹⁵⁰ y Glu²⁵⁸.

En primer lugar se obtuvieron fragmentos de ADN de aproximadamente 2'7 kpb tras la digestión con la endonucleasa de restricción *BstEII*, el rellenado de los extremos protuberantes y la digestión con *XbaI* de los plásmidos que incluyen la región de 5'1 kpb *SalI* (descrita en la Fig. 1.5, ver Introducción) de cada uno de los mutantes y de *P. chrysogenum* AS-P-78 (como control positivo). Estos fragmentos se insertaron en el vector pULC43, digerido con las enzimas *BamHI* (en este caso también se rellenan los extremos protuberantes) y *XbaI*. Estos nuevos plásmidos sirvieron de base para el reemplazamiento de la secuencia afectada por las mutaciones

En el caso del mutante *npe6* se construyó un nuevo gen *penDE* en el que se sustituyó el fragmento flanqueado por los sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción *HindIII-EcoRI* de 1.347 pares de bases que contiene la mutación por el fragmento homólogo del gen *penDE* de AS-P-78. Del mismo modo, en el caso del mutante *npe7* (por analogía, aplicable también a *npe8*) se construyó un nuevo gen *penDE* en el que se sustituyó el fragmento flanqueado por los sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción *EcoRI-XbaI* de 588 pares de bases que contiene la mutación por el fragmento homólogo del gen *penDE* de AS-P-

78. En este último caso no resultan modificados los cambios nucleotídicos localizados en las posiciones 533 y 684 del gen. El proceso de elaboración y las construcciones finales se muestran en la figura 3.15.

Las construcciones que incluían los genes híbridos (pULPP6H y pULPP7H) contenían la capacidad de conferir resistencia al antibiótico fleomicina y fueron transformadas en el mutante *npe10* (carente de los genes de penicilina y que no presenta trazas de las proteínas de 29 ó 40 kDa o de las actividades enzimáticas asociadas). Los genes híbridos se expresaron correctamente y sintetizaron IPN aciltransferasas activas (tabla 3.I), confirmando que la pérdida de la actividad enzimática en los mutantes era debida a las mutaciones de la Gly¹⁵⁰ (mutante *npe6*) y Glu²⁵⁸ (*npe7* y *npe8*). Los transformantes en los que se integraron los genes originales de los mutantes (pULPP6M y pULPP7M) no presentaban actividad IPN aciltransferásica. Tampoco aparecía ésta en los transformantes en los que se integró el vector sin inserto (pULC43), como control negativo, y la actividad enzimática era normal en los transformantes en los que se integraba el gen *penDE* de AS-P-78 (control positivo).

Como se esperaba, distintos transformantes procedentes de la transformación con los mismos plásmidos mostraron una actividad enzimática de la IPN aciltransferasa variable. Esto es probablemente debido a la incorporación de una o más copias del gen por integración no homóloga, puesto que la cepa *npe10* utilizada como receptora de los plásmidos carece de regiones homólogas con el gen *penDE* y además se sabe que la transformación de *P. chrysogenum* produce una amplia variedad de transformantes con un diferente rango de copias integradas (Cantoral y col., 1987).

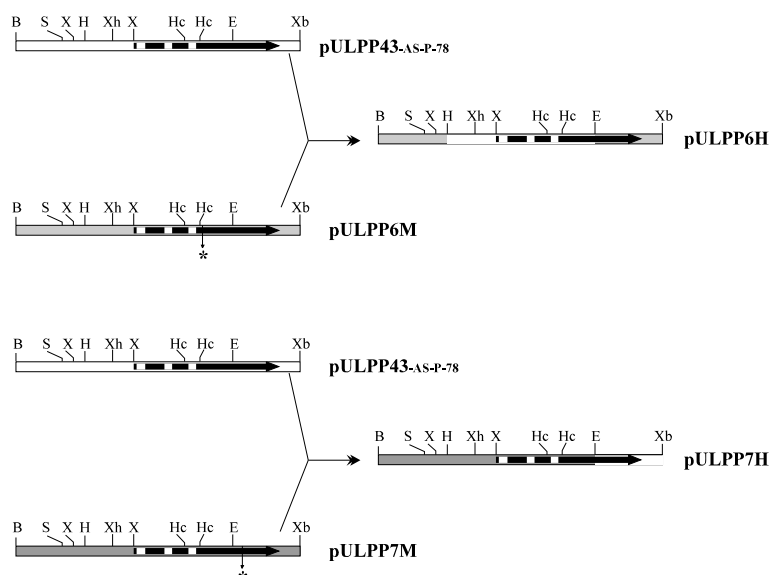


Figura 3.15. Complementación de las mutaciones que aparecen en el gen *penDE* de los mutantes *npe6* (señalada con un asterisco en el plásmido pULPP6M) y *npe7* (señalada con un asterisco en el plásmido pULPP7M), por medio de la fusión de fragmentos de los genes mutados (cajas sombreadas) con fragmentos del gen *penDE* silvestre de *P. chrysogenum* AS-P-78 (cajas blancas). Las abreviaturas para las endonucleasas de restricción son las siguientes: **B**= *BstEII*R (descrito en el texto); **S**= *SacI*; **X**= *XmnI*; **H**= *HindIII*; **Xh**= *XhoI*; **Hc**= *HincII*, **E**= *EcoRI* y **Xb**= *XbaI*.

Transformante	Plásmido usado en la transformación	Actividad 6-APA aciltransferásica	
		pkat/mL	pkat/mg de proteína
43.6 (control) ^a	pULC43	0'32	0'064
43.7 (control) ^a	pULC43	0	0
43-AS-P-78 ^b	pULPP43-AS-P-78	5'43	1'19
4-6M ^c	pULPP6M	0	0
1-6H ^d	pULPP6H	11'92	2'64
2-6H ^d	pULPP6H	9'24	2'05
3-6H ^d	pULPP6H	7'15	1'58
4-6H ^d	pULPP6H	1'97	0'44
6-6H ^d	pULPP6H	19'47	4'33
1-7M ^e	pULPP7M	0	0
1-7H ^f	pULPP7H	2'48	0'55

Tabla 3.1. Actividad enzimática de la IPN aciltransferasa de varios clones de *P. chrysogenum npe10* transformado con los genes *penDE* procedentes de los mutantes *npe6* y *npe7* o con genes *penDE* híbridos en los que se ha corregido la mutación. ^a Transformado con el vector sin inserto. ^b Transformado con el gen *penDE* de *P. chrysogenum* AS-P-78. ^c Transformado con el gen *penDE* del mutante *npe6*. ^d Transformado con un gen *penDE* híbrido en el que se corrigió la mutación que aparecía en *npe6*. ^e Transformado con el gen *penDE* del mutante *npe7*. ^f Transformado con un gen *penDE* híbrido en el que se corrigió la mutación que aparecía en *npe7*.

3.1.7. Discusión.

Los mutantes bloqueados en la biosíntesis de penicilina han demostrado ser siempre instrumentos muy útiles para la investigación de las relaciones gen-proteína en la célula, fundamentalmente debido a que permiten la realización de estudios de complementación (Queener y col., 1978). Así pues, la alteración específica de ciertos nucleótidos dentro de los genes de biosíntesis de penicilina nos podría proporcionar información acerca de los aminoácidos que pudieran formar parte del centro activo (o centros activos) o de dominios reguladores de las enzimas. Hay muchos casos conocidos de mutantes de *P. chrysogenum* o de *A. nidulans* con capacidad alterada de producir penicilina o cefalosporina (ya sea por defecto o por exceso). Sin embargo, y hasta el momento, sólo una de estas mutaciones había podido ser explicada a nivel molecular (Ramsden y col., 1989), en concreto la sufrida por *A. chrysogenum* N2 (ya comentada en la Introducción).

En nuestro laboratorio se habían caracterizado varios mutantes deficientes en la actividad IPN aciltransferásica (Martín y col., 1987; Cantoral y col., 1993), mutantes que carecían asimismo de las otras cuatro actividades asociadas al producto del gen *penDE* (Alvarez y col., 1993) y que fueron usados para el clonaje por complementación de los genes *penDE* de *P. chrysogenum* AS-P-78 (Barredo y col., 1989c) y de *A. nidulans* (Montenegro y col., 1990). Los tres mutantes analizados (*npe6*, *npe7* y *npe8*), que carecen por completo de actividad de la IPN aciltransferasa, sintetizan sin embargo un ARNm del gen *penDE* del tamaño esperado (1'15 kb) y que muestra una intensidad de hibridación similar al de la cepa parental. Estos resultados indicarían que no existen diferencias significativas en lo referente a la iniciación de la transcripción del gen *penDE* en los mutantes respecto de la que se da en Wisconsin 54-1255. Todos los mutantes analizados, con la excepción de *npe10* (que carece de todos los genes de la ruta biosintética de penicilina), presentaron también ARN mensajeros aparentemente normales correspondientes a los

genes *pcbAB* y *pcbC*. Además, estos mutantes poseen las actividades enzimáticas asociadas a estos genes (Cantoral y col., 1993), con lo que se excluye un posible efecto indirecto del producto de los genes “tempranos” sobre la transcripción del gen *penDE*.

El análisis a nivel molecular de estos mutantes demostró la existencia de mutaciones puntuales en la región del gen *penDE* correspondiente a la subunidad β (de 29 kDa) de la enzima madura. El cambio que se produce en la IPN aciltransferasa del mutante *npe6* (Gly¹⁵⁰ \rightarrow Val¹⁵⁰) se localiza en el aminoácido situado en la posición número 47 respecto del aminoácido que ocupa la posición amino terminal de la subunidad de 29 kDa de la proteína madura, dentro de una región que se encuentra altamente conservada en las IPN aciltransferasas de *P. chrysogenum* y *A. nidulans* (Fig. 3.11).

La mutación que aparece en los mutantes *npe7* y *npe8* (Glu²⁵⁸ \rightarrow Lys²⁵⁸) produce un significativo cambio en la carga del polipéptido en esa región (el ácido glutámico es un aminoácido fuertemente ácido y la lisina lo es fuertemente básico), lo que podría explicar la pérdida de la actividad enzimática. Este hecho se vería agravado por la presencia en esta región de las IPN aciltransferasas de *npe7* y *npe8* de dos lisinas consecutivas, en las posiciones 257 y 258. Los aminoácidos Glu²⁵⁸ y Leu²⁵⁹ se encuentran conservados en las IPN aciltransferasas de *P. chrysogenum* y *A. nidulans* dentro de una región de aminoácidos con un grado de conservación especialmente bajo, lo que sugiere que pueden ser esenciales para la actividad enzimática.

Es muy interesante el hecho de que esas mutaciones también llevan consigo la pérdida de las otras actividades enzimáticas asociadas a la IPN aciltransferasa (IPN amidohidrolásica, penicilina transacilásica y penicilina amidásica), como describieron Alvarez y colaboradores en 1993, lo que da valor a la hipótesis de que las diferentes actividades enzimáticas de esta enzima

se encuentran localizadas en el mismo centro (o centros) activo (Martín y col., 1991). Los estudios de hibridación con anticuerpos nos proporcionan una información útil acerca de la formación de la proteína precursora de 40 kDa y de la subunidad de 29 kDa de la proteína IPN aciltransferasa de los tres mutantes. La gran especificidad de los anticuerpos utilizados, como se demuestra por la ausencia de reactividad en los extractos del mutante de delección *npe10*, nos permite concluir que los tres mutantes son capaces de sintetizar la proteína precursora de 40 kDa y que todos ellos son capaces de procesar esta pre-proteína en sus subunidades de 11 y 29 kDa. Es decir, los mutantes *npe6*, *npe7* y *npe8* no ven alterada su capacidad para procesar la proteína precursora, procesamiento que se da de forma autocatalítica (Tobin y col., 1993). Esto estaría de acuerdo con el hecho de que no se ha visto alterada en ninguno de los mutantes la secuencia de aminoácidos localizada alrededor del sitio de procesamiento: RDG[↓]CTT, donde la flecha indica la posición del corte (Fig. 3.11). Tampoco se encuentra alterado en los mutantes el aminoácido serina localizado

en la posición 227 de la IPN aciltransferasa, aminoácido que se ha descrito como esencial para el mantenimiento de la capacidad de procesamiento de esta enzima (Tobin y col., 1994).

La IPN aciltransferasa de *P. chrysogenum* se localiza normalmente en microcuerpos (Müller y col., 1991 y 1992), demostrándose que la localización subcelular precisa de la proteína es condición indispensable para el mantenimiento de la actividad enzimática. Las mutaciones que afectan a *npe6*, *npe7* y *npe8* podrían resultar también en una localización anormal de las proteínas afectadas, puesto que Müller y colaboradores no consiguieron observar (en 1992 y por medio de inmunodetección con microscopía electrónica) la presencia de la proteína IPN aciltransferasa dentro de los microcuerpos del mutante *npe6*. La proteína IPN aciltransferasa de este mutante mantiene intacta la secuencia consenso de localización en microcuerpos, una secuencia alanina-arginina-leucina situada en el extremo carboxilo terminal de la proteína (Fig. 3.11), por lo que cabría deducirse de estos resultados que el aminoácido Gly¹⁵⁰ puede tener un papel adicional en la localización de la enzima activa en estos orgánulos.

3.2. Expresión heteróloga del gen *penDE* de *P. chrysogenum* y *A. nidulans*: distinta capacidad de procesamiento en las proteínas codificadas por ellos.

A. nidulans es un hongo filamentoso que comparte una gran cantidad de similitudes con *P. chrysogenum*, entre ellas la capacidad de producción de penicilina por parte de alguna de sus cepas. El nivel de producción de antibiótico en *A. nidulans* es muy inferior al que se detecta en *P. chrysogenum* incluso cuando se compara con cepas de un nivel de producción bajo, como puede ser el caso de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (un ejemplo de ello es la producción máxima obtenida por la cepa *A. nidulans* ATCC 28901, que presenta niveles incrementados de antibiótico y cuya producción, sin embargo, no supera los 5 µg/ml de penicilina). Si tenemos en cuenta que en la cepa Wisconsin 54-1255 hay una única copia de los genes biosintéticos de penicilina (Fierro y col., 1995), la menor capacidad de producción de penicilina de *A. nidulans* se tendría que explicar en base a una diferente regulación de la expresión de los genes o a diferencias en cuanto a la actividad catalítica de las enzimas que intervienen en el proceso. El apartado de regulación de la expresión de los genes de biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* está siendo abordado por otras personas de nuestro grupo de trabajo, habiéndose encontrado diferencias en alguno de los efectos regulatorios descritos para los mismos genes de *A. nidulans* (S. Gutiérrez, comunicación personal).

Dentro de nuestro interés por el gen *penDE* y su producto génico, tendríamos que comprobar la posible implicación de esta enzima en la menor producción de antibiótico por parte de *A. nidulans*. Las diferencias entre las IPN aciltransferasas de los dos microorganismos deberían tener un reflejo en sus secuencias de aminoácidos (diferencias que existen por el

simple hecho de la divergencia evolutiva entre las dos especies fúngicas, siendo difícil vincular los diversos cambios en la secuencia de la proteína con una mayor o menor producción de antibiótico) o bien en el tratamiento postraduccional sufrido por estas enzimas (incluyéndose aquí el procesamiento en dos subunidades y también la localización subcelular “correcta” de la enzima). En este apartado nos centraremos en el estudio del procesamiento y en el siguiente abordaremos el tema de la localización subcelular.

Como se ha observado en el apartado anterior, los cambios nucleotídicos que afectaban a los mutantes *npe6*, *npe7* y *npe8* no tenían efecto alguno sobre la capacidad de procesamiento de sus proteínas IPN aciltransferasas (y esto se atribuía al hecho de que tales sustituciones no afectaban en ningún caso a la secuencia específica de corte de la proteína precursora). Esta secuencia de procesamiento se encuentra altamente conservada entre las proteínas IPN aciltransferasas de *P. chrysogenum* y *A. nidulans*.

3.2.1. Estimación del tamaño molecular de la proteína IPN aciltransferasa de *P. chrysogenum* y *A. nidulans*.

La primera diferencia observada apareció en la determinación del peso molecular de las proteínas IPN aciltransferasas activas a partir de extractos crudos semipurificados de *P. chrysogenum* y de *A. nidulans* (Fig. 3.16): la primera mostró, tras cromatografía de filtración en gel a través de una matriz de Sephadex G-75 superfino, un valor de K_{AV} de 0.275 que se corresponde con un tamaño molecular aparente de 29.227 Da (± 1.000 Da) mientras que la segunda presentó, en las mismas circunstancias, un valor de K_{AV} de 0.171 que se corresponde con un tamaño molecular aparente de 39.811 kDa (± 1.000 Da). El método de detección, la valoración de la actividad enzimática, sólo permite la observación de la

proteína enzimáticamente activa por lo que no sirve para la detección de la proteína de 40 kDa

de *P. chrysogenum*, proteína precursora que resulta inactiva desde el punto de vista enzimático. La proteína de 40 kDa de *A. nidulans* sí presenta actividad enzimática.

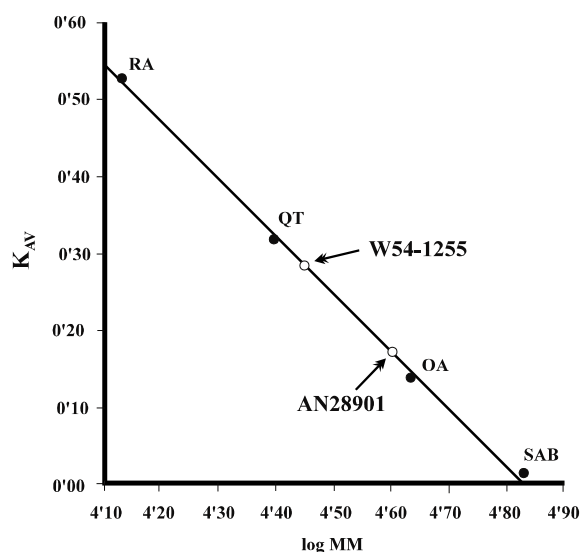


Figura 3.16. Valores de K_{AV} deducidos por cromatografía de filtración en Sephadex G75 superfino para las IPN aciltransferasas de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (W54-1255) y *A. nidulans* 28901 (AN28901). Como patrones de calibración (ver Fig. 2.20, en el Capítulo Materiales y Métodos) se emplearon la ribonucleasa A (RA), el quimotripsinógeno (QT), la ovoalbúmina (OA) y la seroalbúmina bovina (SAB).

3.2.2. Expresión heteróloga de los genes *penDE* de *P. chrysogenum* y *A. nidulans* en otros hongos filamentosos.

Para establecer si la diferente capacidad de procesamiento y/o disociación es debida a características intrínsecas de la propia proteína o a la ausencia de una endopeptidasa específica se procedió a la determinación del tamaño molecular, por cromatografía de filtración en gel a través de la matriz de Sephadex G-75 superfino, de las IPN aciltransferasas de cepas de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* en las que se habían introducido las secuencias de los genes *penDE* de *P. chrysogenum*

y *A. nidulans* (secuencias que mantienen sus intrones y se encuentran bajo el control de su propia región promotora). Las cepas utilizadas en este ensayo (Fig. 3.17) fueron *P. chrysogenum* 6p,1,13 y 6A2 (derivados del mutante no productor *npe6* transformado con los genes *penDE* de *P. chrysogenum* AS-P-78 y *A. nidulans* ATCC 28901, respectivamente), *P. chrysogenum* 8M-1-3 y 8B1 (derivados del mutante no productor *npe8* transformado con los genes *penDE* de *P. chrysogenum* AS-P-78 y *A. nidulans* ATCC 28901, respectivamente) y *A. chrysogenum* TCW19.3 y TCW19.10 (derivados de *A. chrysogenum* CW19, hongo que carece del último paso de la ruta biosintética de penicilina, transformado con los

genes *penDE* de *P. chrysogenum* AS-P-78 y *A. nidulans* ATCC 28901, respectivamente).

Este análisis permitió la observación de los mismos patrones de tamaño en la proteína IPN aciltransferasa que los que aparecían en los microorganismos originales. Como se muestra en la

figura 3.18, todos los transformantes de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* en los que se ha integrado el gen *penDE* de *A. nidulans* poseen IPN aciltransferasas activas de 39-40 kDa y todos aquellos transformantes que integran el mismo gen de *P. chrysogenum* muestran IPN aciltransferasas activas con tamaños de entre 28 y 29 kDa.

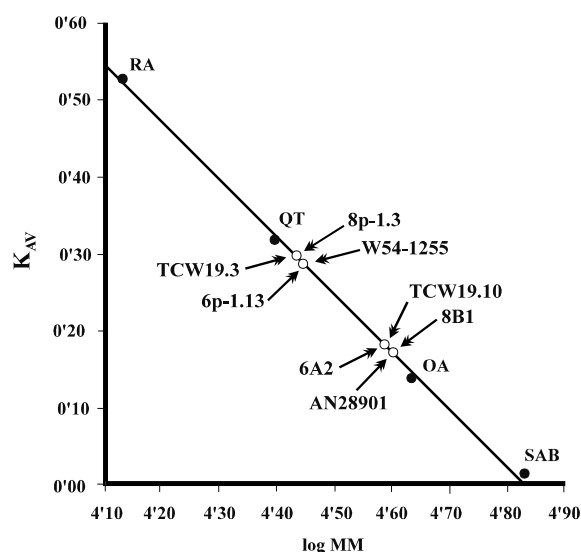


Figura 3.17. Valores de K_{AV} deducidos por cromatografía de filtración en Sephadex G75 superfino para las IPN aciltransferasas de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (**W54-1255**) y *A. nidulans* 28901 (**AN28901**) y de varios transformantes con el gen *penDE*: **TCW19.3**, **8p-1.3** y **6p-1.13** son transformantes de *A. chrysogenum* CW19, *P. chrysogenum npe8* y *P. chrysogenum npe6*, respectivamente, con el gen *penDE* de *P. chrysogenum* (en los tres casos se obtienen valores estimados de masa molecular de alrededor de 29 kDa). **TCW19.10**, **8B1** y **6A2** corresponden, respectivamente, a transformantes de *A. chrysogenum* CW19, *P. chrysogenum npe8* y *P. chrysogenum npe6*, respectivamente, con el gen *penDE* de *A. nidulans* (en los tres casos se obtienen valores estimados de masa molecular de alrededor de 40 kDa).

El procesamiento de la enzima de *P. chrysogenum* puede realizarse de forma autocatalítica o llevarse a cabo por medio de proteasas inespecíficas (pues es bastante dudoso que microorganismos que no poseen normalmente esta enzima, como es el caso de *A. chrysogenum*,

posean sistemas específicos de procesamiento de dicha enzima). Estos resultados complementan experimentos anteriores basados en técnicas de traducción "in vitro" (Tobin y col., 1993) en los que se describe la existencia de un autoprocesamiento.

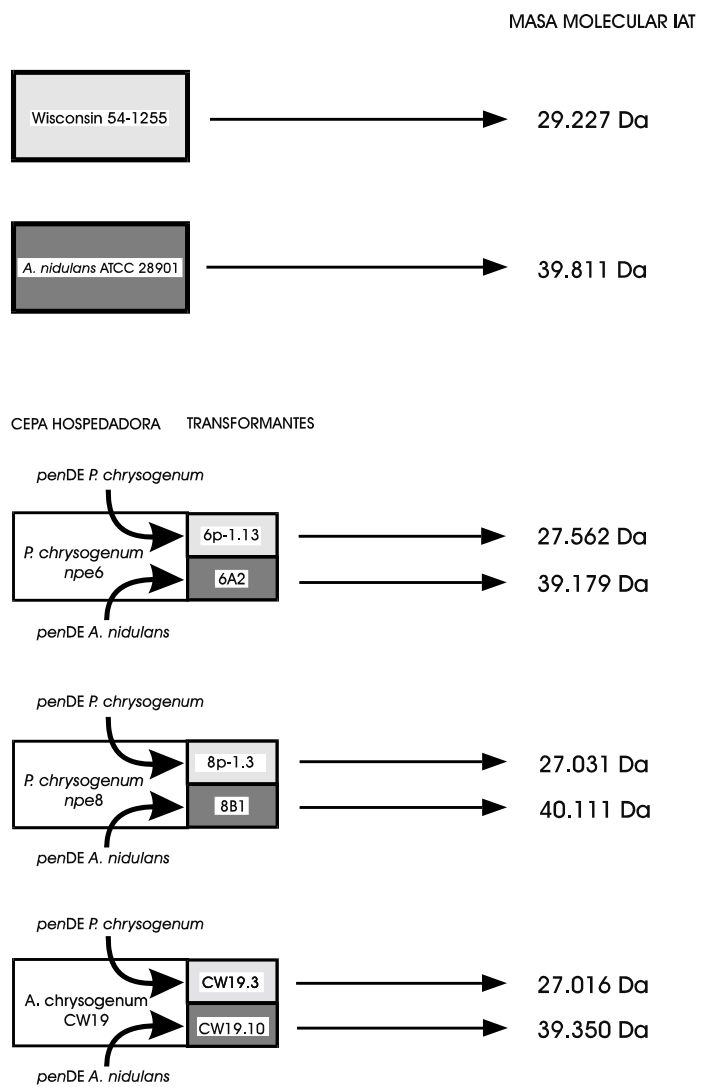


Figura 3.18. Esquema en el que se indican las cepas usadas como receptoras en la transformación con los genes *penDE* de distinto origen, los transformantes seleccionados y el tamaño estimado para sus correspondientes IPN aciltransferasas activas. Las abreviaturas de cada transformante coinciden con las citadas en la figura 3.17.

3.2.3. Expresión heteróloga de los genes *penDE* de *P. chrysogenum* y *A. nidulans* en *Escherichia coli*.

Al mismo tiempo, se diseñaron y realizaron construcciones en las que el ADN complementario de los genes *penDE* de los dos microorganismos (ambos presentan secuencias intrónicas en su interior) era capaz de ser expresado de forma eficiente en *Escherichia coli*.

3.2.3.1 Clonaje del ADN complementario correspondiente al gen *penDE* de *P. chrysogenum* y construcción de los vectores necesarios para la expresión en *E. coli*.

Los trabajos realizados con el gen *penDE* de *A. nidulans* fueron llevados a cabo por Eduardo Montenegro y forman parte de la memoria de su Tesis Doctoral (Montenegro, 1996), describiéndose en la figura 3.19 los plásmidos construidos por él para la expresión heteróloga en *E. coli*.

En cuanto al gen *penDE* de *P. chrysogenum*, en primer lugar se construyó una biblioteca de ADN complementario de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 49-408, partiendo de ARN mensajero obtenido a partir de micelio incubado en medio complejo de producción (MCFP) a 25°C y recogido a las 48 horas. El título obtenido fue de 600.000 u.f.p. totales, con un 2% de bacteriófagos sin inserto. Esta cepa de *P. chrysogenum* es incapaz de producir penicilina y la razón de su utilización en este punto radica en la posibilidad que nos proporcionaba para la realización de otros experimentos. Por ello, y para prevenir que la no producción de penicilina por parte de esta cepa

fuese debida a una anomalía producida en el gen *penDE* o en la proteína codificada por él, se determinó la actividad enzimática de la IPN aciltransferasa de la cepa 49-408, determinándose la existencia de niveles normales de enzima activa (F. Fierro, comunicación personal).

Tras la realización de los experimentos de hibridación con la sonda C (Fig. 3.1) se seleccionaron fagos recombinantes que incluían el ADN complementario correspondiente al gen *penDE* de *P. chrysogenum*. Se procedió a la escisión de dichos bacteriófagos, obteniéndose el plásmido p49-11a. Con el fin de confirmar la ausencia de posibles cambios nucleotídicos que afectaran a la estructura o actividad normales de la enzima IPN aciltransferasa en la cepa Wisconsin 49-408, se procedió a hacer un análisis de la secuencia del gen incluido en el plásmido p49-11a en forma de inserto. Para ello se generaron delecciones unidireccionales del plásmido p49-11a digerido con las endonucleasas de restricción *Bst*XI y *Bam*HI. Los clones delecionados que fueron seleccionados y analizados permitieron comprobar la ausencia de mutaciones en la secuencia de ADN y de los tres intrones del gen (Fig. 3.20). Al mismo tiempo se demostró que el ADN clonado se extendía 37 nucleótidos aguas arriba del inicio de la traducción.

Basándonos en esa secuencia de ADNc se construyeron dos plásmidos (Fig. 3.21), los llamados pT7DE y pBCDE, en los que el marco abierto de lectura del gen *penDE* (ahora ya podemos referirnos con este calificativo al gen) se encuentra fusionado a un promotor inducible (sistema pT7, mencionado en la Introducción). La fusión, transcripcional, se esquematiza en la figura 3.22 y se describirá a continuación.


```

TCTCAGTTGTTTACCCATCTTCGACCCGACGAGAA -1
ATGCTTCACATCCTCTGTCAAGGCACTCCCTTTGAAATCGGCTACGAAACATGGCTCTGCTGCCAAAGCCGTGATAGCCAGAAGCATTGACITCGCCGTCG -100
m l h i l c q g t p f e i g y e h g s a a k a v i a r s i d f a v d
ATCTCATCCGAGGGAAAAGCAAGAGCGGACGAAGAGCTTAAACAGGTACTCTCGCAACTGGGGCGGTGATCGAGGAAAGATGGCCCAAATACTACGA 200
l i r g k t k k t d e e l k q v l s q l g r v i e e r w p k y y e
GGAGATTCCGCGTGATTGCAAAGGGGCGCTGAACGGATGCTCCGAGATTGTCATGCTTAATACCGCACGGGAATTTGCATACGGGCTCAAGGCAGGCCG 300
e i r g i a k g a e r d v s e i v m l n t r t e f a y g l k a a r
TGATGGCTGCACCACTGCCTATTGTCAACTTCCAAATGGAGCCCTCCAGGGCCAAAACCTGGGATTTCTTTCTGCCACCAAAGAGAACCTGATCCGGTTA 400
d g c t t a y c q l p n g a l q g q n w d f f s a t k e n l i r l
ACGATCCGTCAGSCCGGACTTCCACCATCAAATTCATAACCGGAGGCTGGAATCATCGSSGAAGSTTGGATTTAACAGTGGGGGGTCCGCTCAATTACA 500
t i r q a g l p t i k f i t e a g i i g k v g f n s a g v a v n y n
ACGCCCTTCACTTCCAGSCTTCGACCCACCGGAGTTCCCTTCGCATATTCGCCCTCGCATAGCGCTCGAAAGCACITTCCTTCCAGGCCATGACCCG 600
a l h l q g l r p t g v p s h i a l r i a l e s t s p s q a y d r
GATCGTGGAGCAAGGGCGSAATGGCCCGCCAGCGCTTTTATCATGGTGGGCAATGGGCACGAGGCATTTGGTTTGGAAATCTCCCCACCAGCATCCGAAAG 700
i v e q g g m a a s a f i m v g n g h e a f g l e f s p t s i r k
CAGGTGCTCGACCGAATGGTAGGATGGTGCACACCAACCCTGCTTGCCTTCAGCACGGCAAAAATGAGAAAGAGCTCGATCCCTTACCCGACTCATGSA 800
q v l d a n g r m v h t n h c l l q h g k n e k e l d p l p d s w n
ATCGCCACAGCGTATGGAGTTCCTCCTCGACGGGTTCCAGCGCACCAACAGGCATTTGCCAGCCTCTGGCCGACGAGACAATTATCCCTTTAGCAT 900
r h q r m e f l l d g f d g t k q a f a q l w a d e d n y p f s i
CTGCCGCGCTTACGAGGAGGGCAAGAGCAGAGGGCGGACTCTGTTCAAATATCATCTACGACCATGCCCGTAGAGAGGCAACCGGTGCGGCTTGGCCGCGCC 1000
c r a y e e g k s r g a t l f n i i y d h a r r e a t v r l g r p
ACCAACCTGATGAGATGTTTGTATCGCGTTTGACGAGGAGGACGAGAGGTTCTCGCTCAACGCCAGGCTTTGAAGGCT 1080
t n p d e m f v m r f d e e d e r s a l n a r l .

```

Figura 3.20. Secuencia de ADNc del gen *penDE* de *P. chrysogenum* Wisconsin 49-408.

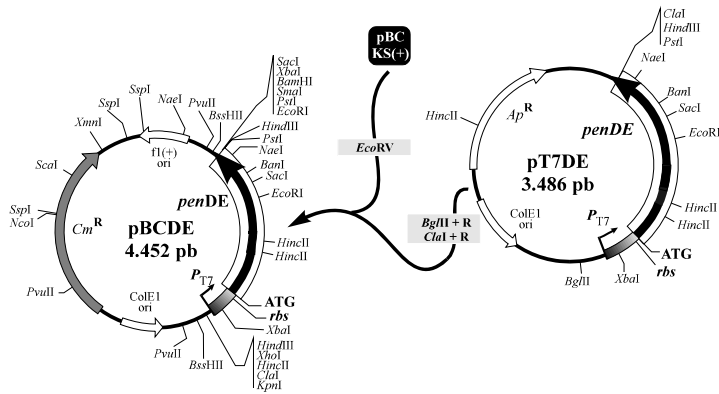


Figura 3.21. Esquema de los plásmidos pBCDE y pT7DE, que contienen el gen *penDE* de *P. chrysogenum* bajo el control del promotor T7. El primero de ellos posee resistencia a cloranfenicol, mientras que el segundo posee resistencia a ampicilina. Las características indicadas en la figura son las mismas descritas en el pie de la figura 3.19.

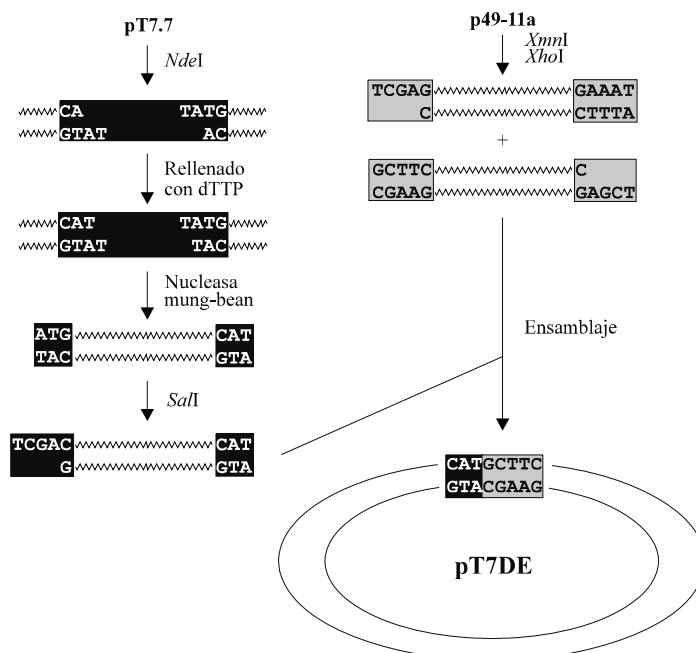


Figura 3.22. Esquema de construcción del plásmido pT7DE. La fusión es transcripcional. Sombreada en negro se destaca la parte de la molécula fusionada procedente del vector pT7.7; sombreada en gris la parte correspondiente al ADNc del gen *penDE* de *P. chrysogenum* Wisconsin 49-408 (procedente del vector p49-11a, descrito en el texto).

En cuanto al proceso de fusión:

1°.- Se digirió el plásmido que contiene el ADNc correspondiente al gen *penDE* con las endonucleasas de restricción *XmnI* y *XhoI* (la primera de las enzimas reconoce una secuencia de nucleótidos que incluye el triplete ATG de inicio de la traducción del gen y la última reconoce secuencias del plásmido situadas por detrás del codón que determina el final de la traducción del gen, por lo que se recupera el marco abierto de lectura completo).

2°.- Se digirió el vector pT7.7 con la endonucleasa *NdeI*, y el vector linealizado se relleno con dTTP y a continuación se trató con la exonucleasa “mung-bean” (con este último paso se elimina el nucleótido protuberante).

3°.- Por último, se realizó el ensamblaje de los dos fragmentos y la fusión se comprobó mediante el análisis de la secuencia de ADN (Fig. 3.23). Para ello se subclonó un fragmento obtenido por digestión del plásmido pT7DE con las endonucleasas de restricción *XbaI* e *HindIII* en un vector pBluescript® KS+ digerido con las mismas enzimas. En el análisis de la secuencia se utilizó el cebador T7.

La diferencia que existe entre los plásmidos pT7DE y pBCDE radica en que este último posee un marcador que proporciona resistencia a cloranfenicol, mientras que el otro plásmido proporciona resistencia a ampicilina (la ampicilina es un antibiótico β -lactámico del mismo tipo que la penicilina y la ausencia de antibiótico activo en los

ensayos podría deberse tanto a una mala expresión del gen *penDE* como a la presencia de una β -lactamasa activa, por lo que uno de los plásmidos que se construyen resuelve esa posible interferencia).

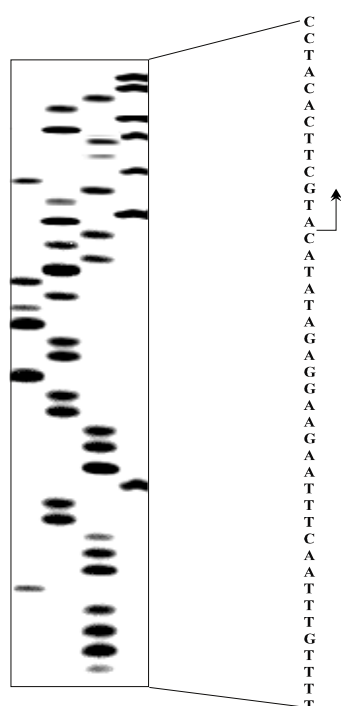


Figura 3.23. Secuencia de ADN correspondiente a la fusión entre el promotor T7 del vector pT7.7 y el gen *penDE* de *P. chrysogenum*. Con una flecha se indica el comienzo del gen *penDE*.

3.2.3.2. Sobreexpresión de los genes *penDE* de *P. chrysogenum* y *A. nidulans* en *Escherichia coli*.

Todas estas construcciones fueron introducidas en la cepa *E. coli* JM109(DE3), una cepa que contiene integrado en su cromosoma el gen para la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (a su vez bajo el

efecto regulador de un promotor inducible por la adición de IPTG). Tras los análisis electroforéticos en geles de poliacrilamida con SDS realizados con los extractos proteicos de los cultivos bacterianos se detectó la presencia de una nueva banda, muy engrosada, de aproximadamente 40 kDa en los extractos correspondientes a los transformantes que incluían el ADNc del gen *penDE* de *A. nidulans* y de otra banda de un tamaño similar en los extractos de los transformantes de *E. coli* que incluían la secuencia homóloga de *P. chrysogenum* (Fig. 3.24). Estas bandas no aparecen cuando no se induce la expresión de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 con IPTG.

La IPN aciltransferasa de *A. nidulans* de 40 kDa mostró una actividad enzimática (102 pmoles/min y mg de proteína) equivalente a la que aparece en extractos crudos de *A. nidulans*. El producto de la reacción era sensible a la acción de β -lactamasas y fue identificado como penicilina G mediante el empleo de cromatografía líquida de alta resolución (Montenegro, 1996). La proteína sobreexpresada constituía aproximadamente el 20% del total de las proteínas celulares y en ningún caso se observó procesamiento de la enzima en subunidades de 11 y 29 kDa.

Muy distinto fue el comportamiento de la proteína obtenida tras la expresión en *E. coli* del ADNc correspondiente al gen *penDE* de *P. chrysogenum*, puesto que la proteína de 40 kDa observada carece por completo de actividad enzimática y se encuentra localizada dentro de la bacteria en cuerpos de inclusión. La purificación de estos cuerpos de inclusión permitió comprobar la ausencia de las subunidades de 11 y 29 kDa. La renaturalización de la enzima a partir de estos acúmulos condujo a la aparición de las subunidades, confirmándose la existencia de procesamiento autocatalítico (Fig. 3.25). El heterodímero obtenido recuperaba la actividad IPN aciltransferásica.

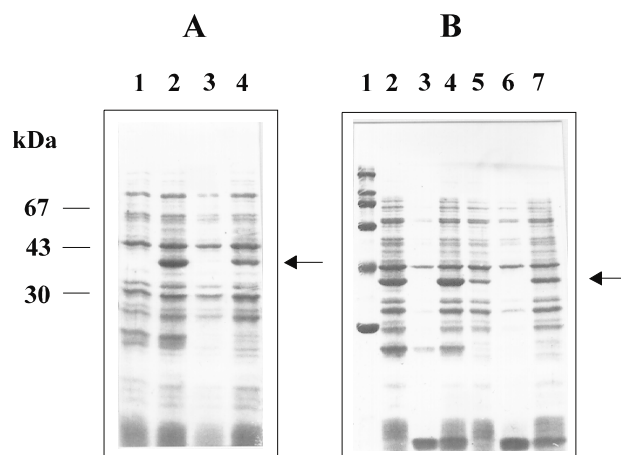


Figura 3.24. A. Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida de las proteínas expresadas en *E. coli* [pBCDE] y *E. coli* [pPT7DE]. Carriles 1 y 2: *E. coli* [pBCDE] (carril 1 sin inducción y carril 2 con inducción); carriles 3 y 4: *E. coli* [pPT7DE] (carril 3 sin inducción y carril 4 con inducción). Nótese la formación de una proteína de 40 kDa (flecha). A la izquierda se indican varios marcadores de tamaño. B. Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida de las proteínas recuperadas en forma insoluble (cuerpos de inclusión) después de la sobreexpresión de los dos transformantes de *E. coli*. Carril 1: patrones de tamaño; carril 2: extracto crudo de *E. coli* [pBCDE]; carril 3: sobrenadante del extracto crudo de *E. coli* [pBCDE] tras su centrifugación a 14.000 r.p.m.; carril 4: precipitado del proceso anterior resuspendido; carril 5: extracto crudo de *E. coli* [pPT7DE]; carril 6: sobrenadante del extracto crudo de *E. coli* [pPT7DE] tras su centrifugación a 14.000 r.p.m.; carril 7: precipitado del proceso anterior resuspendido. Nótese la presencia en los extractos crudos y en el material insoluble de una proteína de 40 kDa (flecha).

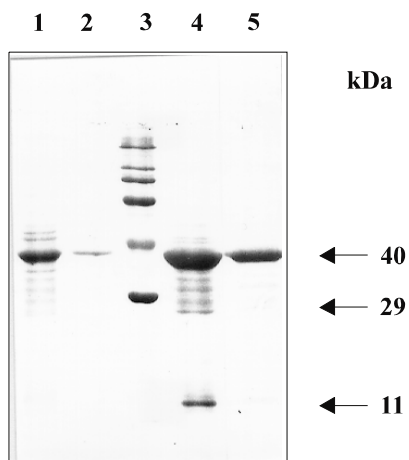


Figura 3.25. Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida del proceso de renaturalización de las proteínas presentes en los cuerpos de inclusión obtenidos tras la expresión en *E. coli*. Carril 1: proteínas presentes en los cuerpos de inclusión de *E. coli* [pPT7DE]; carril 2: proteínas presentes en los cuerpos de inclusión de *E. coli* [pBCDE]; carril 3: patrones de tamaño; carril 4: proteínas renaturalizadas a partir de los cuerpos de inclusión de *E. coli* [pPT7DE]; carril 5: proteínas renaturalizadas a partir de los cuerpos de inclusión de *E. coli* [pBCDE]. Nótese que tras la renaturalización se produce un procesamiento parcial de la proteína de 40 kDa en sus subunidades de 29 y 11 kDa (flechas). La proteína renaturalizada presentaba actividad enzimática (lo que no ocurría en el caso de las proteínas presentes en los cuerpos de inclusión).

Se ha descrito en algunos casos que la incubación de las bacterias realizada a temperaturas inferiores tiende a favorecer la no incorporación en cuerpos de

inclusión de las proteínas sobreexpresadas en *E. coli* (Tobin y col., 1993). Por ello se repitió el experimento realizándose la incubación de los transformantes a 25°C, detectándose en estas nuevas circunstancias (y solamente tras la adición del agente inductor IPTG) la presencia de la misma banda de aproximadamente 40 kDa en aquellos

transformantes que incluían el ADNc del gen *penDE* de *A. nidulans* y de una banda de un tamaño aproximado de 29 kDa en el caso de los transformantes de *E. coli* que incluían la misma secuencia de *P. chrysogenum*. Cuando se realizaban los experimentos, tanto a 25°C como a 37°C, utilizando pulsos con metionina marcada con ³⁵S se apreciaba la incorporación de la radiactividad en las mismas proteínas descritas (Fig. 3.26).

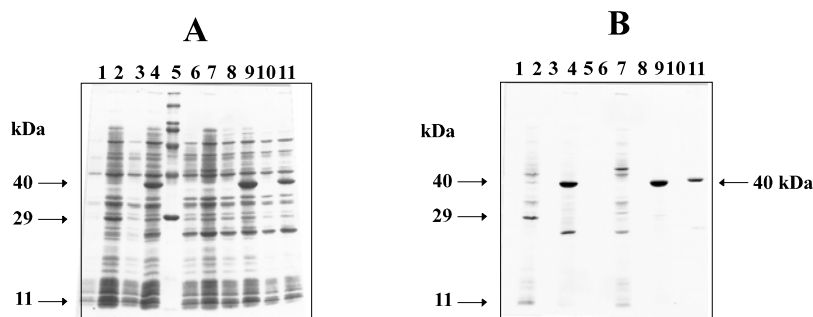


Figura 3.26. Expresión comparativa en *E. coli*, a dos temperaturas distintas, de los genes *penDE* de *P. chrysogenum* y *A. nidulans*. **A.** Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida de los extractos proteicos. **B.** Autorradiografía del gel. Carriles 1, 2, 8 y 9: *E. coli* [pBCDE], que contiene el gen *penDE* de *P. chrysogenum* (carriles 1 y 8 sin inducción y carriles 2 y 9 con ella). Carriles 3, 4, 10 y 11: *E. coli* [pULCT107], que contiene el gen *penDE* de *A. nidulans* (carriles 3 y 10 sin inducción y carriles 4 y 11 con ella). Carril 5: patrones de tamaño. Carriles 6 y 7: *E. coli* [pT7.7], usado como control (carril 6 sin inducción y carril 7 con ella). Los carriles 1-4, 6 y 7 contienen extractos obtenidos a partir de bacterias incubadas a 28°C y los carriles 8-11 a partir de bacterias incubadas a 37°C. Nótese la aparición de las subunidades de 29 y 11 kDa en el carril 2 y de una proteína de 40 kDa (y la ausencia de las subunidades) en el carril 4. En el carril 4 aparece una banda de un tamaño inferior a 29 kDa, banda inespecífica que también aparece en el carril 7 (control negativo con inducción).



Figura 3.27. Ausencia de procesamiento de la IPN aciltransferasa de *A. nidulans* expresada en *E. coli* y marcada con [³⁵S]metionina tras la incubación con extractos proteicos de *A. nidulans*, en diferentes condiciones. Carril 1: extracto de *A. nidulans* (no hay marcaje). Carriles 2 y 3: dos diferentes preparaciones de la IPN aciltransferasa expresada en *E. coli* y marcada. Carril 4: preparación de la IPN aciltransferasa expresada en *E. coli* y marcada mezclada con un extracto hervido de *A. nidulans*. Carril 5: patrones de tamaño (sin marcaje). Carriles 6, 7, 8 y 9: preparación de la IPN aciltransferasa expresada en *E. coli* y marcada mezclada con un extracto de *A. nidulans* durante 0, 30, 60 y 90 minutos, respectivamente. Nótese que la proteína de 40 kDa no cambia de tamaño.

3.2.3.3. Ensayo de autoprocesamiento de la IPN aciltransferasa de *A. nidulans*.

Para excluir la posibilidad de que la falta de procesamiento en *A. nidulans* se debiera a la ausencia de una actividad peptidásica presente en este hongo, el extracto proteico del transformante que incluye el ADNc correspondiente al gen *penDE* de *A. nidulans* (con la banda de 40 kDa perteneciente a la IPN aciltransferasa) fue incubado a 25°C durante 0, 30, 60 y 90 minutos con extractos libres de células obtenidos a partir de micelio de *A. nidulans* ATCC 28901 incubado en medio de fermentación de *Aspergillus* (MFA) a 25°C y con agitación orbital de 250 r.p.m. durante 48 horas. Los resultados (Fig. 3.27) muestran que no hay procesamiento de la enzima bajo esas circunstancias. Tras realizar experimentos de pulso con metionina marcada con ³⁵S se observa que la cantidad de proteína marcada tras el tratamiento con los extractos proteicos de *A. nidulans* fue aproximadamente la misma que la que se observa tras el tratamiento con los mismos extractos hervidos.

3.2.4. Discusión.

La formación de enzimas maduras a partir de proenzimas es un fenómeno frecuente en los organismos eucarióticos. En la mayor parte de los casos, además, hay endopeptidasas específicas encargadas del reconocimiento del sitio de rotura y del procesamiento en sí mismo e incluso algunas proteínas con actividad peptidásica pueden procesarse en forma autocatalítica (Baker y col., 1993).

Las IPN aciltransferasas de *P. chrysogenum* y *A. nidulans* catalizan el último paso de la biosíntesis de penicilina, promoviendo la rotura del enlace peptídico entre la cadena de α -aminoadipilo (derivada del aminoácido precursor) y la parte del núcleo de penicilina correspondiente a la cisteína (no debe olvidarse que el anillo β -lactámico y el tiazolidínico proceden de la condensación de los aminoácidos cisteína y valina). El sitio específico de

procesamiento de la pre-proteína se manifiesta a nivel del enlace Gly¹⁰²-Cys¹⁰³, como se demuestra por el análisis de la secuencia del extremo amino terminal de la subunidad de 29 kDa (Barredo y col., 1989c) y es muy llamativo el hecho de que este lugar de procesamiento presente un cierto parecido con el sitio de corte en la IPN, sustrato natural de la enzima (Tobin y col., 1990). La IPN aciltransferasa de *P. chrysogenum* es fuertemente inhibida por fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Alvarez y col., 1993), conocido inhibidor de proteasas de serina y de aciltransferasas.

Tobin y colaboradores habían demostrado en 1994 que el aminoácido Ser³⁰⁹ juega un papel importante en la actividad de la enzima (su sustitución hace desaparecer la actividad enzimática sin modificarse la capacidad de procesamiento de la pre-proteína) y que la mutación del aminoácido Ser²²⁷ altera dicha capacidad de procesamiento.

Los resultados aquí mostrados indican que las IPN aciltransferasas de *A. nidulans* y *P. chrysogenum* difieren en su capacidad de autoprocesamiento y/o de mantenimiento en forma asociada del heterodímero resultante del mismo. Esta diferencia no parece ser producto de una distinta secuencia de aminoácidos en el entorno del sitio de procesamiento de las dos proteínas, debido al alto grado de conservación de esta región entre ellas (Fig. 3.11). Del mismo modo, el aminoácido Ser²²⁷ se encuentra conservado en la secuencia de las dos proteínas, lo que indica que el ineficiente procesamiento y la pérdida de disociación en la enzima de *A. nidulans* no es debida a una alteración puntual ocurrida a este nivel.

Por otro lado, la disociación de forma artificial de la IPN aciltransferasa de *A. nidulans* en dos subunidades análogas a las de la proteína de *P. chrysogenum* permitió comprobar el requerimiento de la integridad del polipéptido de 40 kDa para el mantenimiento de la actividad enzimática (Montenegro, 1996). Esto contrasta con los resultados obtenidos previamente por Tobin y colaboradores (1993) para la proteína de *P.*

chrysogenum, en los que se describe la necesidad de la presencia de las dos subunidades de la proteína pero no de la integridad de la pre-proteína.

Una mayor fuerza de cohesión en la IPN aciltransferasa de *A. nidulans* podría derivarse de la presencia de dos restos más del aminoácido cisteína en su molécula respecto de los que aparecen en la proteína de *P. chrysogenum* (seis en la primera por cuatro en la segunda). La aparición de una cisteína adicional en cada una de las subunidades teóricas podría provocar una interacción más fuerte entre ellas por medio de la creación de puentes disulfuro. Sin embargo, la presencia de una banda única de 40 kDa se detecta incluso tras realizar electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (condiciones en las que los puentes disulfuro desaparecen).

La utilización de construcciones en las que se producen fusiones traduccionales del ADNc del gen *penDE* de *A. nidulans* al promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (Fig. 3.19) podría afectar a la actividad de la proteína (se forma una proteína de fusión, con una pequeña secuencia adicional en el extremo amino terminal de la proteína, aunque los resultados demuestran que la

actividad enzimática no se ve afectada) y/o a la capacidad de procesamiento de la IPN aciltransferasa tras su expresión en *E. coli*. Sin embargo, esta objeción (que no puede aplicarse en ningún caso a la construcción realizada para el gen de *P. chrysogenum*) no tiene validez a la hora de enjuiciar los resultados obtenidos tras la expresión heteróloga del gen *penDE* de *A. nidulans* en otros hongos filamentosos. Como se puede apreciar en la Fig. 3.17, en todos estos casos se detecta una proteína activa de unos 40 kDa, en contraposición con los resultados obtenidos para los transformantes que incluyen el mismo gen de *P. chrysogenum* (poseen proteínas con un patrón de tamaño molecular próximo a los 29 kDa). Estos experimentos, realizados en las mismas condiciones para los dos microorganismos, permiten confirmar la existencia de diferencias entre las IPN aciltransferasas de las dos especies fúngicas (ya sea en el procesamiento o en el mantenimiento en forma estable del heterodímero resultante).

Sin embargo, y en este momento, no pueden asociarse las diferencias existentes a nivel de la producción de antibiótico entre los dos microorganismos con este distinto comportamiento de las enzimas. La posible relación entre estos dos temas deberá ser estudiada en el futuro.

3.3. Localización subcelular de las IAT aciltransferasas de *P. chrysogenum* y *A. nidulans*.

La menor producción de penicilina por parte de *A. nidulans* también podría ser debida, como se indicó en el capítulo anterior, a una incorrecta localización subcelular de la proteína IPN aciltransferasa madura. Se ha descrito que esta proteína debe encontrarse en microcuerpos para que sea activa (Müller y col., 1992). La secuencia de aminoácidos de la proteína de *P. chrysogenum* presenta en su extremo carboxilo terminal un triplete de aminoácidos, Ala-Arg-Leu, en consonancia con la secuencia definida como consenso para la transferencia de proteínas a orgá-

nulos membranosos subcelulares Ser/Cys/Ala-Lys/His/Arg-Leu (Gould y col., 1989; de Hoop y Ab, 1992). Por su parte, *A. nidulans* posee una IPN aciltransferasa con un tripéptido Ala-Asn-Ile en su extremo carboxilo terminal, secuencia que no se ajusta tan perfectamente a la secuencia consenso (especialmente en el caso del aminoácido central).

Este hecho podría ser responsable de una localización subcelular ineficaz y, en consecuencia, una actividad enzimática disminuida. Por ello se decidió sustituir la secuencia Ala-Asn-Ile del final de la proteína IPN aciltransferasa de *A. nidulans* por la secuencia Ala-Arg-Leu presente en la proteína de *P. chrysogenum*.

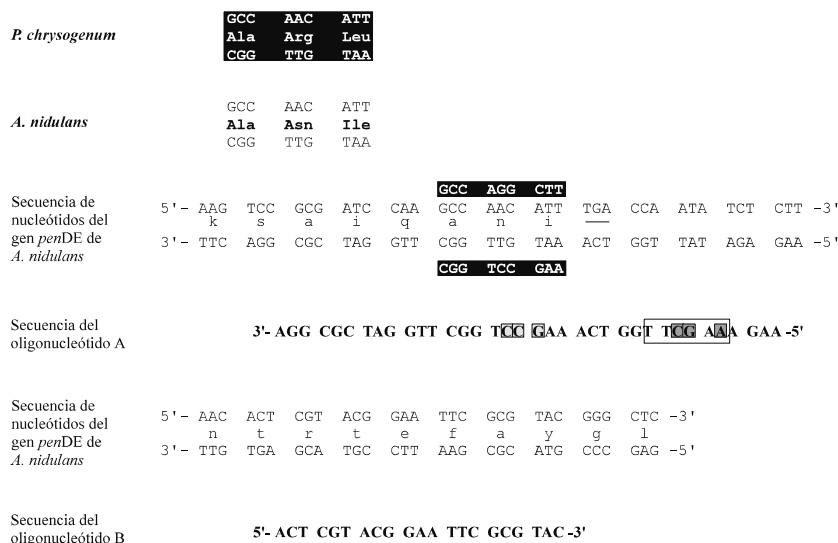


Figura 3.28. Diseño de los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis del extremo carboxilo terminal de la IPN aciltransferasa de *A. nidulans*. Con fondo oscuro se destaca la secuencia de nucleótidos correspondiente al gen *penDE* de *P. chrysogenum*. Sombreados se destacan los cambios necesarios para la modificación de la secuencia de *A. nidulans* y para la creación de un nuevo sitio de reconocimiento y corte para la endonucleasa de restricción *HindIII* (región a su vez recuadrada).

3.3.1. Modificación del extremo carboxilo terminal de la IPN aciltransferasa de *A. nidulans*.

Este proceso se abordó por medio de la aplicación de la denominada técnica de reacción en cadena de la polimerasa. En una variante de esta técnica, si se introduce en uno de los cebadores (o en los dos, si es necesario) algún cambio en relación con la secuencia de ADN a amplificar se conseguirá que dichos cambios queden incorporados en las moléculas amplificadas.

Siguiendo este planteamiento, se diseñó un oligonucleótido (oligonucleótido A, Fig. 3.28) que incluyera la región del gen *penDE* de *A. nidulans* capaz de codificar para la secuencia carboxilo terminal de la proteína y se efectuaron sobre él las modificaciones necesarias para el cambio de la secuencia Ala-Asn-Ile por la nueva secuencia Ala-Arg-Leu. Al mismo tiempo se incorporó a este oligonucleótido una secuencia de reconocimiento y corte para la endonucleasa de restricción *HindIII*, secuencia que tampoco aparece en el ADN original a amplificar (así, por un lado se conseguía la mutación deseada y por otro se facilitaba el proceso de clonaje y construcción de los plásmidos necesarios para la expresión del nuevo gen). El otro cebador requerido (oligonucleótido B, Fig. 3.28) se basó en la secuencia exacta localizada alrededor de la posición 378 del gen *penDE* de *A. nidulans*, donde se encuentra un sitio de reconocimiento y corte para la endonucleasa de restricción *EcoRI*.

El producto de 883 pb amplificado (Fig. 3.29) fue aislado del gel, purificado y digerido con las endonucleasas *HindIII* y *EcoRI* y el fragmento de 860 pares de bases que contiene la región de ADN de interés se subclonó en los vectores pBluescript® KS+ y SK+ digeridos con las mismas enzimas. Para confirmar la incorporación de las sustituciones deseadas y la ausencia de mutaciones indeseadas se realizó el análisis de la secuencia de ADN integrada en estos plásmidos

(el cebador utilizado fue el oligonucleótido T7). Una vez comprobado esto (Fig. 3.30), el fragmento de 860 pares de bases resultante de la digestión con las endonucleasas *HindIII* y *EcoRI* se utilizó para sustituir un fragmento con los mismos extremos del vector pULEM1 (Fig. 3.31).

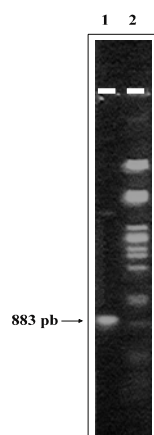


Figura 3.29. Reacción en cadena de la polimerasa realizada con el gen *penDE* de *A. nidulans* como molde (integrado en el plásmido pULEM1) y los oligonucleótidos A y B (figura 3.28) como cebadores. Carril 1: reacción de amplificación y carril 2: λ /*PstI*, como marcador de tamaño.

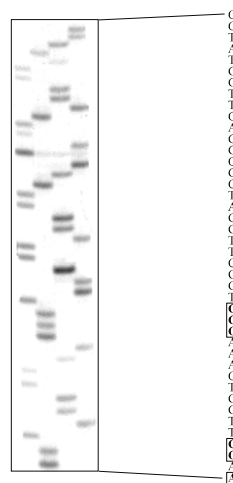


Figura 3.30. Secuencia de ADN correspondiente al extremo carboxilo terminal del gen *penDE* de *A. nidulans* presente en el producto amplificado. Se han recuadrado los nucleótidos que resultan modificados.

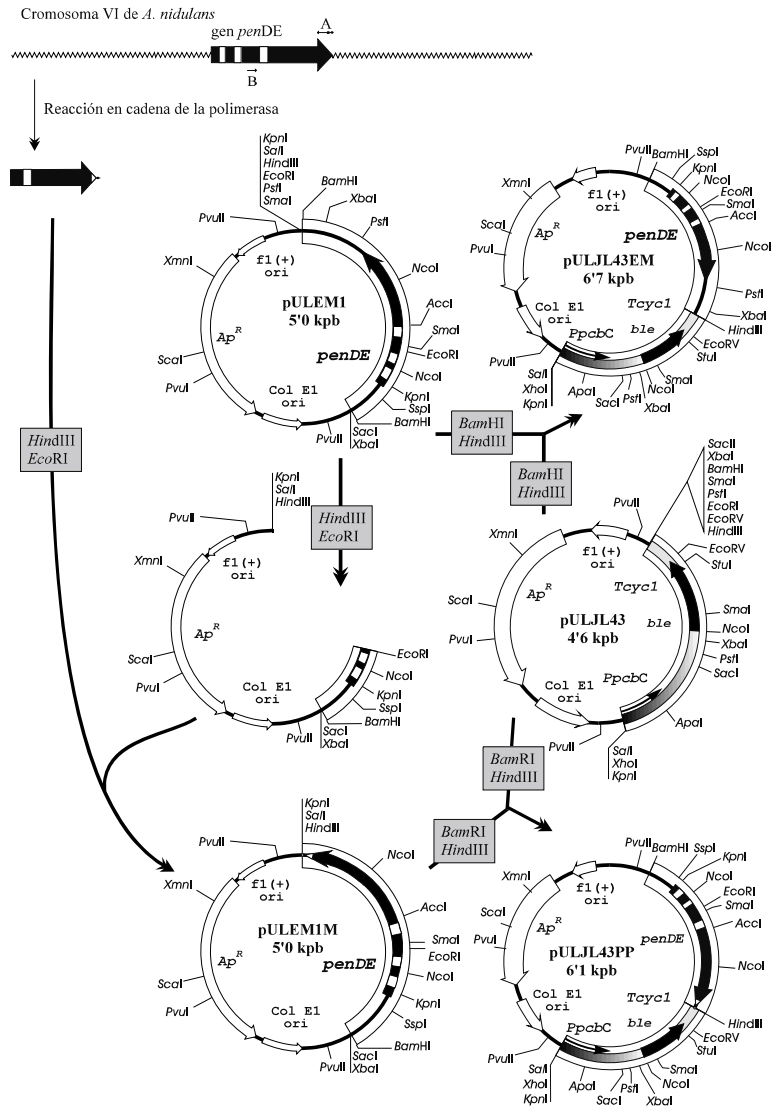


Figura 3.31. Esquema de la construcción de los plásmidos pULEM1M y pULJL43PP (ambos contienen el gen *penDE* de *A. nidulans* modificado para obtener una IPN aciltransferasa con un tripéptido Ala-Arg-Leu en el extremo carboxilo terminal, señalado como un pequeño triángulo blanco en el extremo distal de la caja correspondiente al gen *penDE*) y pULJL43EM (contiene el gen *penDE* silvestre de *A. nidulans*). A y B son los oligonucleótidos utilizados en la amplificación (ya citados).

Como resultado de la sustitución se obtuvo el plásmido pULEM1M que posee la secuencia original del gen *penDE* de *A. nidulans* con la única modificación de la región correspondiente al extremo carboxilo terminal de la proteína (que ahora termina en la secuencia de aminoácidos Ala-Arg-Leu). De este plásmido se extrajo, tras la digestión con las endonucleasas de restricción *Bam*HI e *Hind*III, un fragmento de 1'5 kpb que incluye el nuevo gen completo. Este fragmento se incluyó dentro del vector pULJL43 digerido con las mismas enzimas (el vector pULJL43 proporciona resistencia al antibiótico fleomicina, lo que facilitará el proceso de transformación de los hongos con las nuevas construcciones). El nuevo plásmido se denominó pULJL43PP. Como control negativo se utilizó una construcción similar en la que la secuencia que codifica para el extremo carboxilo terminal de la IPN aciltransferasa de *A. nidulans* no había sido modificada (en este caso se integró en el vector pULJL43 un fragmento de 2'1 kpb producto de la digestión del plásmido pULEM1 con las endonucleasas *Bam*HI e *Hind*III). El plásmido resultante se denominó pULJL43EM.

3.3.2. Transformación de los plásmidos pULJL43EM y pULJL43PP en *P. chrysogenum npe6* y en *A. nidulans* ATCC 28901 y GH79.

Los dos plásmidos se transformaron en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 *npe6* y se seleccionaron colonias resistentes al antibiótico fleomicina. El número de copias integradas de estos plásmidos fue variable, como se demuestra por la aplicación de un rango de resistencia a dicho antibiótico de los distintos transformantes (tabla 3.II) y por la hibridación del ADN digerido con la endonucleasa *Xba*I de varios de ellos con una sonda específica del gen *penDE* de *A. nidulans* (un fragmento de 1'5 kpb obtenido tras la digestión del plásmido pULEM1 con las endonucleasas de restricción *Xba*I y *Pst*I) (Fig 3.32).

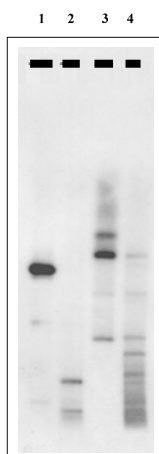


Figura 3.32. Análisis del ADN, mediante transferencia de Southern y posterior hibridación con una sonda para el gen *penDE* de *A. nidulans* (descrita en el texto), de varios transformantes de *P. chrysogenum npe6* que incluyen los plásmidos pULJL43EM (con el gen *penDE* silvestre de *A. nidulans*) o pULJL43PP (con el gen mutado). Carriles 1 y 2: 6PP1 y 6PP3 (ambos con el plásmido pULJL43PP). Carriles 3 y 4: 6EM3 y 6EM5 (ambos con el plásmido pULJL43EM).

Para confirmar la integración de los plásmidos se aplicó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con el ADN total de varios transformantes y de una serie de cepas de control. En la realización de esta técnica se usaron los mismos oligonucleótidos y condiciones utilizadas en el proceso de mutagénesis (descritas en el apartado 2.10.2.4. Asimismo, se utilizaron cantidades idénticas de ADN molde en cada reacción y un mismo número de ciclos durante el proceso de amplificación. Como resultado del experimento se demostró la existencia de un producto amplificado, apareciendo éste en concentraciones distintas en función de los diferentes transformantes analizados (Fig. 3.33). La mayor similitud de la secuencia del gen *penDE* de *A. nidulans* con los oligonucleótidos utilizados como cebadores (Fig. 3.34) permite explicar la mayor amplificación que aparece en las reacciones en las que el ADN molde corresponde a los hongos *A. nidulans* ATCC 28901 y GH79 o a los transformantes de *P. chrysogenum npe6* en los que se ha integrado el gen *penDE* de *A. nidulans* (ya contenga una secuencia capaz de codificar para el tripéptido Ala-Arg-Leu o para el tripéptido Ala-Asn-Ile en el extremo carboxilo terminal de la proteína) y la menor amplificación conseguida cuando el ADN

molde pertenece a las cepas *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y *npe6*.

Concentración de fleomicina (µg/mL)	Diámetro de las colonias (mm)									
	Wisconsin 54-1255	<i>npe6</i>	PP1	PP3	PP4	PP5	EM2	EM3	EM4	EM5
0	19	19	19	15	17	15	17	16	16	17
30	-	-	17	15	15	17	16	16	16	17
50	-	-	15	16	15	16	11	17	17	16
70	-	-	16	15	16	-	-	15	-	-
90	-	-	-	15	14	-	-	8	-	-

Tabla 3.II. Diámetro (en milímetros) de las colonias de los distintos microorganismos incubados sobre medio Czapeck-fleomicina (las concentraciones se indican en µg/mL, en la primera columna). El crecimiento en las concentraciones mayores de fleomicina es indicativo de un número más elevado de copias del plásmido integradas. Las placas con el medio y las colonias se incubaron a 25°C durante 15 días.

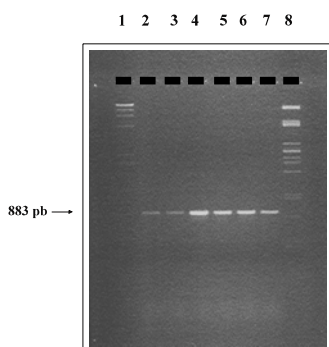


Figura 3.33. Reacción en cadena de la polimerasa realizada con el ADN total de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (carril 2), *npe6* (carril 3), 6PP1 (carril 4), 6EM3 (carril 5), *A. nidulans* ATCC 28901 (carril 6) y *A. nidulans* GH79 (carril 7). Los cebadores utilizados fueron los oligonucleótidos A y B, ya descritos. Los carriles 1 (λ /HindIII) y 8 (λ /PstI) contienen marcadores de tamaño.

Oligonucleótido A	3' - AGG CGC TAG GTT CGG TCC GAA ACT GGT TCG AAA GAA -5'
<i>A. nidulans</i>	3' - AGG CGC TAG GTT CGG TTC TAA ACT GGT TAT AGA GAA -5'
<i>P. chrysogenum</i>	3' - AG A CGC GAG TTC CGG TCC GAA ACT TCC CAG AA G TAA -5'
Oligonucleótido B	5' - ACT CGT ACG GAA TTC GCG TAC -3'
<i>A. nidulans</i>	5' - ACT CGT ACG GAA TTC GCG TAC -3'
<i>P. chrysogenum</i>	5' - AC C C G ACG GAA TT T G C TAC -3'

Figura 3.34. Comparación de los dos oligonucleótidos empleados en el proceso de amplificación y mutagénesis con las secuencias diana localizadas en el ADN de *A. nidulans* y *P. chrysogenum*. Sombreadas se resaltan las diferencias entre las secuencias genómicas y los oligonucleótidos.

Los plásmidos pULJL43EM y pULJL43PP fueron transformados también en las cepas *A. nidulans* ATCC 28901 (productora de penicilina) y GH79 (no productora de penicilina) y se seleccionaron los transformantes con mayor resistencia a fleomicina.

3.3.3. Análisis de la producción de penicilina de los transformantes.

Se realizaron fermentaciones con los transformantes seleccionados, en medio de producción y en las condiciones descritas en el apartado 2.5.2.2. Los resultados de producción de antibiótico en *P. chrysogenum* se detallan en la tabla 3.III y en la figura 3.35.

Transformantes	Penicilina ($\mu\text{g/mL}$)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>npe6</i>	0	0	0	0
6PP1	10'9	43'8	123'4	171'2
6PP3	6'5	32'4	54'5	42'6
6PP4	1'2	21'8	46'2	62'4
6PP5	4'7	31'6	94'0	134'0
6EM2	0	12'2	17'3	17'3
6EM3	1'2	34'3	54'5	53'0
6EM4	0'8	16'4	18'8	18'8
6EM5	2'5	65'9	126'8	192'3
Wis. 54-1255	6'5	48'8	126'8	224'9

Tabla 3.III. Producción de penicilinas en $\mu\text{g/mL}$ por *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y por distintos transformantes del mutante *npe6* (deficiente en IPN aciltransferasa) en los que se ha integrado el plásmido pULJL43PP (denominados como 6PP1, 6PP3, 6PP4 y 6PP5) o el plásmido pULJL43EM (denominados como 6EM2-6EM5).

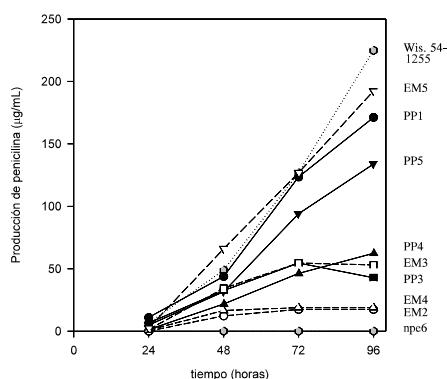


Figura 3.35. Representación gráfica de los valores obtenidos en la tabla 3.III. Con líneas de puntos se indican los controles positivos (*P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255) y negativo (mutante *npe6*, microorganismo receptor de los plásmidos en la transformación). Los dos microorganismos se destacan, asimismo, porque sus valores están representados por hexágonos grises. Con líneas discontinuas y símbolos abiertos se destacan algunos transformantes obtenidos al integrar en el mutante *npe6* el plásmido pULJL43EM (con la secuencia del gen *penDE* silvestre de *A. nidulans*). Con líneas continuas y símbolos llenos se destacan algunos transformantes obtenidos al integrar en el mutante *npe6* el plásmido pULJL43PP (con la secuencia del gen *penDE* de *A. nidulans* corregida de tal forma que se genera un tripéptido final Ala-Arg-Leu en la IPN aciltransferasa de estos microorganismos).

Los resultados de producción de penicilina en los transformantes de *A. nidulans* se muestran en la tabla 3.IV y los resultados de la valoración de la actividad enzimática de la IPN aciltransferasa en dichos transformantes en la tabla 3.V. No fue necesario realizar la misma valoración enzimática en los transformantes de *P. chrysogenum npe6*

porque la comparación de actividades enzimáticas de los transformantes con la cepa sin transformar no es posible (ésta no posee IPN aciltransferasa activa, como se demostró anteriormente). La existencia de proteína activa en estos transformantes queda demostrada por la complementación de la mutación que en ellos se produce.

A

Transformantes	Producción de penicilina ($\mu\text{g/mL}$)		
	24 h	48 h	72 h
GH79	0	0	0
GHEM10	0	0	0
GHPP4	0	0	0
AN28901	0	0'24	0'34
ATEM1	0	0'20	0'22
ATPP2	0	0'24	0'18

Tabla 3.IV. Producción de penicilinas (en $\mu\text{g/mL}$) por *A. nidulans* GH79 (no productor), ATCC 28901 (abreviado como AN28901) y por distintos transformantes de dichas cepas en los que se ha integrado el plásmido pULJL43PP (denominados como GHPP4 y ATPP2, respectivamente) o el plásmido pULJL43EM (denominados como GHEM10 y ATEM1).

3.3.4. Discusión.

La sustitución de la secuencia del extremo carboxilo terminal de la IPN aciltransferasa de *A. nidulans* por otra más ajustada a la secuencia consenso de localización de la proteína en microcuerpos no parece tener efecto sobre la producción de penicilina. El nivel de producción de antibiótico alcanzado por los transformantes que contienen los dos plásmidos utilizados (uno con la secuencia original y otro con la secuencia corregida) es similar, independientemente del factor de interferencia que ocasiona la integración

B

Transformantes	IPN aciltransferasa		
	(pkat/mL)	[proteína] (mg/mL)	(pkat/mg de proteína)
GH79	0'55	0'51	1'09
GHEM10	15'97	0'758	21'35
GHPP4	43'35	0'79	54'53
AN28901	0'83	1'06	0'78
ATEM1	3'44	1'47	2'34
ATPP2	3'30	1'25	2'64

Tabla 3.V. Datos de la valoración enzimática de la IPN aciltransferasa presente en los micelios de *A. nidulans* GH79 (no productor), ATCC 28901 (abreviado como AN28901) y de los distintos transformantes de dichas cepas en los que se ha integrado el plásmido pULJL43PP o el plásmido pULJL43EM. Se ha seguido la misma nomenclatura descrita en la tabla 3.IV.

de un número indeterminado de copias del plásmido, y por lo tanto del gen. En todos ellos se complementa la mutación presente en el microorganismo receptor de los plásmidos.

Los transformantes de *A. nidulans* ATCC 28901 no presentan un mejor comportamiento en cuanto a la producción de antibiótico, a pesar de que la actividad enzimática es mayor en ellos que en la cepa parental (muy probablemente debido a la presencia de un mayor número de copias del gen *penDE* en su interior). Esta actividad enzimática también se encuentra muy incrementada en los

transformantes de la cepa *A. nidulans* GH79 (muy posiblemente por los mismos motivos), aunque sin embargo no son capaces de producir penicilina. Nuestros resultados demuestran que la mutación existente en la cepa *A. nidulans* GH79 no afecta al gen *penDE* o bien esta cepa presenta varias mutaciones en el conjunto de genes biosintéticos de penicilina (lo que explicaría que no se recuperase la producción de penicilina tras la transformación con el gen *penDE*).

La comparación de los valores de producción de transformantes obtenidos con las dos construcciones sugieren un mismo papel para los dos tripéptidos analizados en la posición carboxilo terminal de la IPN aciltransferasa. La presencia de secuencias distintas a la definida como consenso ha sido descrita en una serie de proteínas localizadas en microcuerpos (de Hoop y Ab, 1992). Una posible explicación a esta circunstancia es que la secuencia definida como consenso por Gould y colaboradores (1989), la secuencia Ser/Cys/Ala-Lys/His/Arg-Leu, se encuentre más degenerada de lo que se propuso en un principio.

En este sentido, se ha descrito el reconocimiento del tripéptido Ser-Lys-Met como señal de localización en glicosomas. También se ha descrito la localización subcelular correcta en microcuerpos de las proteínas alcohol oxidasa, con una secuencia Ala-Arg-Phe en su extremo carboxilo terminal, y dihidroxiacetona sintasa de *H. polymorpha*, con una secuencia Asn-Lys-Leu en la misma posición (de Hoop y Ab, 1992). El triplete Asn-Lys-Leu está también presente en el extremo carboxilo terminal de la alanina:glioxilato aminotransferasa de rata (Oda y col., 1990), que también se localiza en estos orgánulos, y una función similar ha sido asignada al tripéptido Ala-Lys-Ile de la enzima trifuncional hidratasa:deshidrogenasa:epimerasa de *Candida tropicalis* (Aitchison y col., 1991).

Estos datos y nuestros propios resultados justifican la necesidad de retocar la secuencia definida hasta el momento como secuencia

consenso. En este sentido se han manifestado también de Hoop y Ab (1992), sugiriendo que el tripéptido del extremo carboxilo terminal de proteínas localizadas en microcuerpos debería estar compuesto en primer lugar por un aminoácido de pequeño tamaño, un aminoácido de carácter básico en la penúltima posición y un aminoácido grande y sin polaridad en la posición final. La presencia de Asn, aminoácido de características no tan básicas en la penúltima posición de una proteína correctamente localizada (y este parece ser el caso, en función de los resultados obtenidos en la producción de antibiótico) haría modificar de nuevo la secuencia definida como consenso, ampliándola.

La comprobación definitiva requeriría de un estudio de inmunodetección por microscopía electrónica que en este momento no puede ser desarrollado en nuestro laboratorio. Sin embargo, la expresión en *E. coli* del gen *penDE* de *P. chrysogenum* y *A. nidulans* nos permitirá facilitar el proceso de purificación de las respectivas IPN aciltransferasas, lo que favorecerá la obtención de los anticuerpos necesarios para el desarrollo de esta técnica.

Otra cuestión a considerar está relacionada con la determinación de la mutación existente a nivel molecular en la cepa *P. chrysogenum npe6*. Como se indicó en el apartado 3.1.7., la ausencia de la IPN aciltransferasa de este microorganismo en microcuerpos no puede explicarse en función de la aparición de modificaciones en la secuencia guía del extremo carboxilo terminal. La mutagénesis de la porción amino terminal de la luciferasa de *Photinus pyralis* hizo que se perdiera la localización en peroxisomas de la proteína madura, a pesar de la presencia de una secuencia señal intacta para la localización en microcuerpos (Gould y col., 1987). Resultados similares se han obtenido en *Saccharomyces cerevisiae*, donde ciertas proteínas fusionadas que finalizan en una secuencia de localización en microcuerpos no parecen incorporarse en peroxisomas (Distel y col., 1992). En otro caso, la unión de un tripéptido

Ser-Lys-Leu o Ser-Arg-Leu al extremo carboxilo terminal de una proteína citosólica era capaz de hacer que sólo el 10% de ella aparezca en los peroxisomas de *S. cerevisiae* (de Hoop y col., 1992). Estos datos indican que la secuencia del extremo carboxilo terminal probablemente no es suficiente para conseguir la localización de las proteínas en los microcuerpos y que se requieren

para ello factores adicionales (la Gly¹⁵⁰ de la IPN aciltransferasa podría ser un ejemplo concreto)

Un tema de debate aparte radica en si la localización de la enzima madura en los microcuerpos constituye un proceso definitivo, teoría defendida hasta el momento, o si estos orgánulos subcelulares constituyen solamente un lugar de tránsito hacia una localización definitiva en la membrana celular. El hecho de que la proteína IPN aciltransferasa sea fácilmente extraída mediante lavados con cloruro sódico del micelio intacto de *P. chrysogenum* (S. Gil, comunicación personal) parecería apoyar esta última hipótesis.

3.4. Sustitución del promotor del gen *penDE* de *P. chrysogenum* por el promotor de un gen del metabolismo primario.

En trabajos realizados en nuestro laboratorio (S. Gutiérrez, comunicación personal) se habían realizado construcciones en las que el gen que confiere resistencia a fleomicina se integraba bajo el control de las regiones promotoras de los tres genes de la ruta de biosíntesis de penicilina. A igualdad en el número de copias integradas, los transformantes expresan mayor o menor resistencia al antibiótico selectivo en un modo directamente proporcional a la eficiencia del promotor (sería, por así decirlo, una medida del nivel de expresión que confieren dichas secuencias promotoras). La mayor eficiencia correspondería al promotor del gen *pcbC*, por delante del promotor del gen *pcbAB*. El promotor “menos fuerte” sería el del gen *penDE* y este bajo nivel de expresión podría ser limitante para el incremento de la producción de penicilina. Por ello, se pensó en la sustitución del promotor original por un promotor de mayor eficiencia y que no perteneciera al metabolismo secundario (con el fin de intentar conseguir una expresión génica independiente del tiempo e incluso del medio de cultivo y de las condiciones de incubación).

3.4.1. Sustitución del promotor del gen *penDE* de *P. chrysogenum* por el promotor del gen *gpdA* de *A. nidulans*.

En nuestro laboratorio se había observado, en trabajos realizados con el gen *cefG* de *A. chrysogenum*, que la región promotora del gen *gpdA* de *A. nidulans* era una buena candidata para ser utilizada en esta sustitución (Gutiérrez y col., 1997). El gen *gpdA* codifica para la enzima del metabolismo primario gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, que en varios organismos

eucarióticos llega a constituir hasta un 5% del total de proteínas celulares solubles (lo que da una idea de la fortaleza del promotor). Además de los buenos resultados obtenidos en nuestro laboratorio se ha descrito su empleo con éxito en el estudio de la regulación de genes inducibles (Punt y col., 1992).

Por todo ello se decidió utilizar la región promotora de este gen para la sustitución de la secuencia promotora original del gen *penDE* de *P. chrysogenum* y comprobar la incidencia de este cambio en la producción de penicilina del hongo.

En primer lugar, y basándose en la secuencia de nucleótidos del promotor del gen *gpdA* (Punt y col., 1988) y en la de la región más próxima al inicio de transcripción del gen *penDE*, se diseñó la fusión de manera que fuese de tipo transcripcional. Para ello se digirió el plásmido pAN52.1 con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Not*I, aislándose y purificándose un fragmento de ADN de 1'8 kpb que contiene la secuencia promotora del gen *gpdA* de *A. nidulans*. Este fragmento fue ligado en un vector pBluescript® KS+ digerido con las mismas enzimas, originándose el plásmido pULPP5 de 4'4 kb (Fig. 3.36).

A continuación se procedió a la digestión del plásmido pULPP5 con la endonucleasa de restricción *Nco*I. Los extremos protuberantes generados se rellenaron con los nucleótidos dCTP, dATP y dTTP, tratándose a continuación con la exonucleasa “Mung-bean” que degrada las secuencias de ADN de cadena sencilla que persistan en los extremos del plásmido después del relleno. Tras purificar el vector así tratado, se procedió a su digestión con la endonucleasa de restricción *Eco*RV (con un sitio de reconocimiento y corte en la parte del plásmido perteneciente a la región múltiple de clonaje del vector pBluescript®). Con ello se evita el que se forme una proteína de fusión entre la IPN aciltransferasa y el extremo amino terminal de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, cuya secuencia de ADN

codificante se encuentra incluida en el vector pAN52.1 a continuación de la región promotora. Los extremos 5' de este plásmido modificado fueron desfosforilados y las moléculas resultantes fueron empleadas para el ensamblaje de un

fragmento de 1.744 pb procedente de la digestión del plásmido pULJL36 con las endonucleasas de restricción *XmnI* (presenta un sitio de reconocimiento y corte que incluye el triplete inicial del gen *penDE*) y *EcoRV*. El resultado de estas operaciones fue el plásmido pULPP51, de aproximadamente 6 kpb.

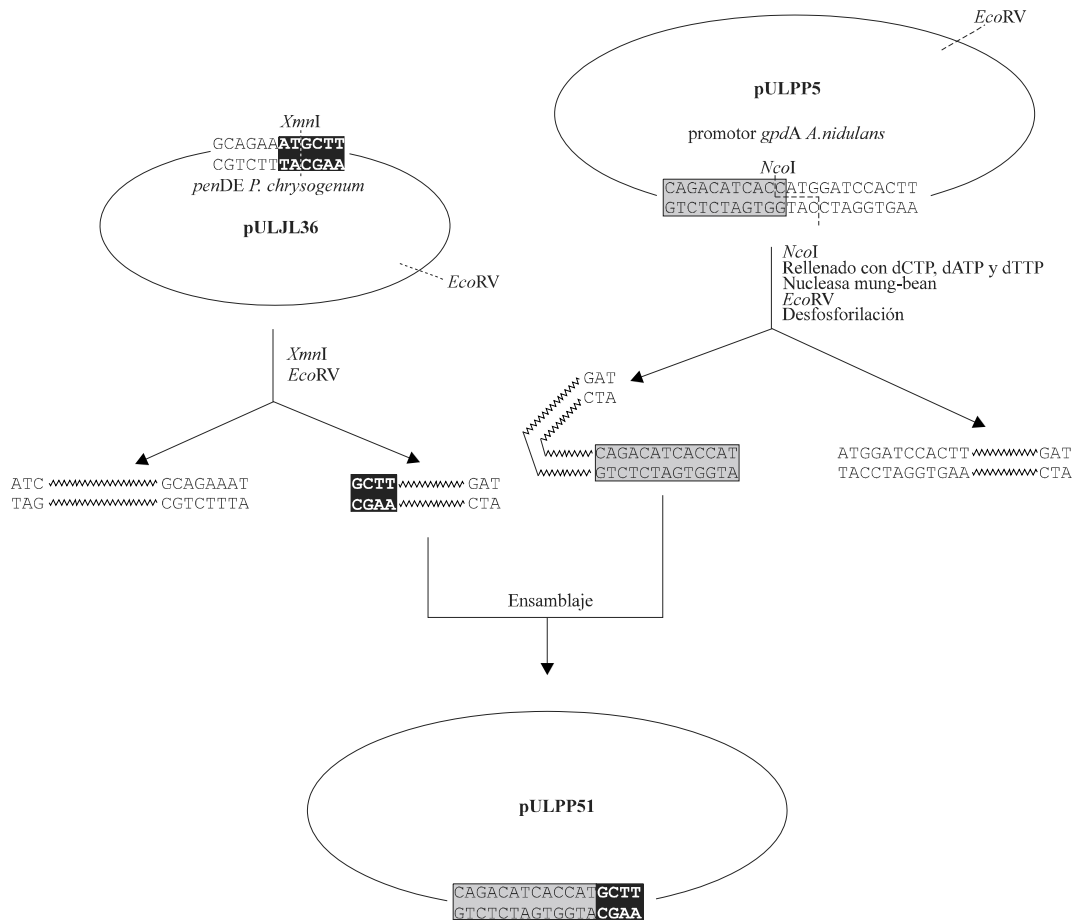


Figura 3.36. Esquema de la fusión transcripcional generada entre el promotor del gen *gpdA* de *A. nidulans* y el gen *penDE* de *P. chrysogenum*. En gris se marca la parte del triplete de inicio perteneciente a la secuencia de *A. nidulans* y en negro la correspondiente al gen *penDE* de *P. chrysogenum*. La fusión se encuentra integrada en el plásmido pULPP51 (representado en la figura 3.38 A).

La fusión entre el promotor del gen *gpdA* y el gen *penDE* fue comprobada mediante el análisis de la secuencia de ADN. Para ello se aisló un fragmento de 3'5 kpb obtenido tras la digestión del plásmido pULPP51 con la endonucleasa *PvuII* y se integró en un vector pBluescript® KS+ digerido con la endonucleasa *EcoRV* y con los extremos 5' desfosforilados. Una de las dos posibles integraciones del fragmento en el vector nos permitiría el análisis de la secuencia de ADN, utilizando el cebador T7 (Fig. 3.37). Determinado este aspecto se seleccionó también una variante del plásmido pULPP51 en la que el promotor del gen *gpdA* se continúa con el gen *penDE* en una orientación invertida a la normal. Este nuevo plásmido, denominado pULPP51.N, sirvió de base para obtener controles negativos apropiados para los procesos de fermentación posteriores.

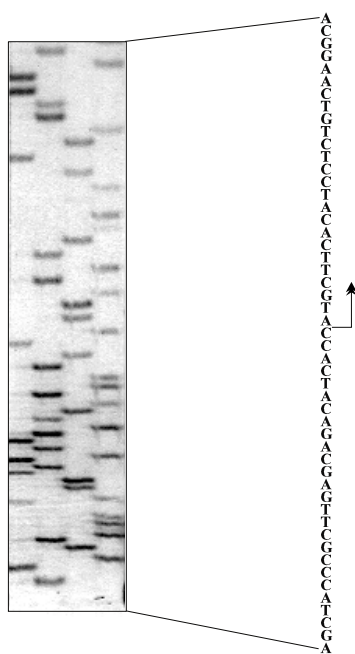


Figura 3.37. Secuencia de ADN que incluye la fusión transcripcional entre el promotor del gen *gpdA* de *A. nidulans* y el gen *penDE* de *P. chrysogenum*. Con una flecha se indica el comienzo del gen *penDE*.

A continuación se digirieron los plásmidos pULPP51 y pULPP51.N con la endonucleasa de restricción *NotI*, se rellenaron los extremos protuberantes generados y se desfosforilaron los extremos 5'. En estos vectores modificados se integró un fragmento de 1'5 kpb obtenido tras la digestión del plásmido pULAC43 con las endonucleasas de restricción *XhoI* e *HindIII* y el posterior relleno de los extremos protuberantes, y que aporta la resistencia al antibiótico fleomicina. Los plásmidos obtenidos se denominaron pULPP510 y pULPP510.N, respectivamente.

Por último, con el objeto de obtener vectores con capacidad de replicarse en una forma autónoma de los cromosomas fúngicos, los plásmidos pULPP510 y pULPP510.N fueron digeridos con la endonucleasa de restricción *HindIII* y los extremos 5' de las moléculas generadas fueron desfosforilados. En estos vectores modificados se integró un fragmento de 5 kpb (región *AMA1*) procedente de la digestión del plásmido pARp1 con la misma endonucleasa de restricción. Así se obtuvieron los plásmidos pULPP510A y pULPP510.NA que poseen la capacidad de replicación autónoma. Los plásmidos que incluyen este tipo de secuencias no son integrativos y se mantienen como tales una vez transformados (Fierro y col., 1995). Una representación gráfica de todo el proceso de construcción de los plásmidos se puede apreciar en las figuras 3.38 A y B.

3.4.2. Transformación de los plásmidos pULPP510, pULPP510.N, pULPP510A y pULPP510.NA en *P. chrysogenum*.

Las nuevas construcciones obtenidas se transformaron en la cepa AS-P-78, cepa de alto nivel de producción de penicilina y que nos permitiría detectar la presencia de aumentos significativamente importantes en la producción de este antibiótico.

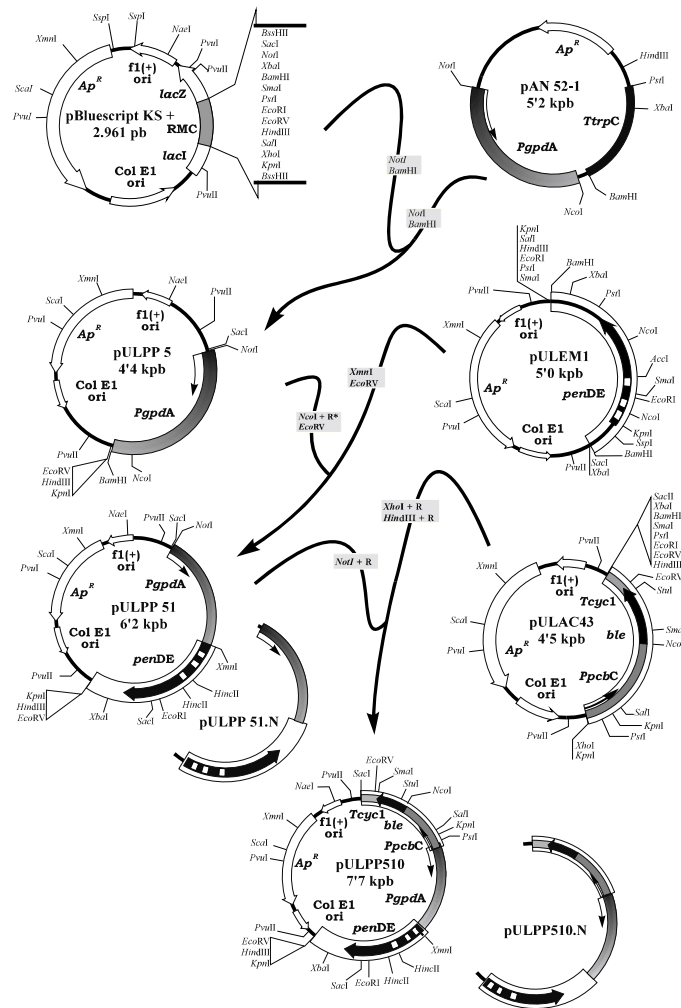


Figura 3.38 A. Esquema de la construcción de los plásmidos pULPP51 (contiene la fusión transcripcional entre el promotor del gen *gpdA* de *A. nidulans* y el gen *penDE* de *P. chrysogenum*), pULPP51.N (control negativo), pULPP510 (contiene el módulo de resistencia a fleomicina, además de las características del plásmido pULPP51) y pULPP510.N (control negativo).

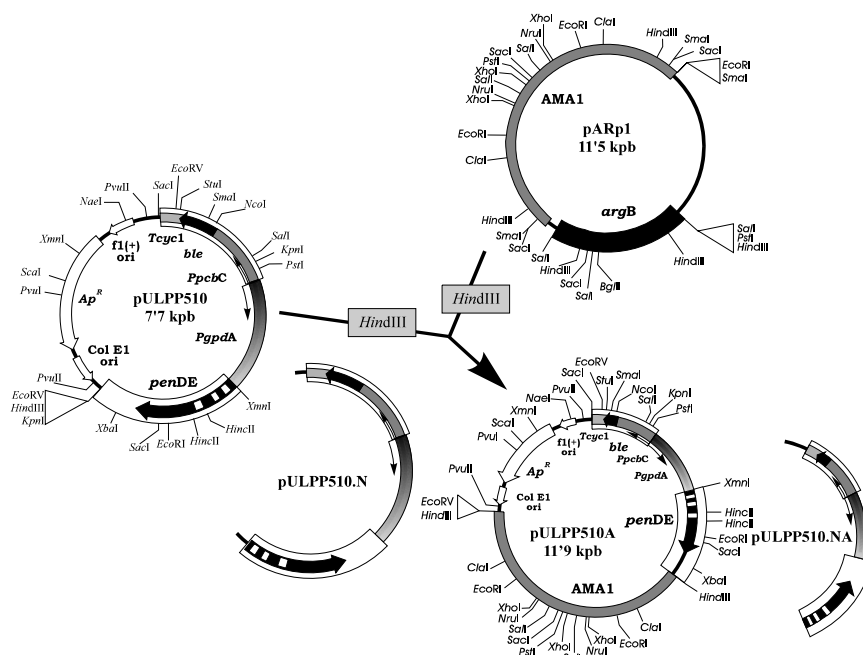


Figura 3.38 B. Esquema de la construcción de los plásmidos pULPP510A (contiene la capacidad de replicación autónoma, además de las características del plásmido pULPP510) y pULPP510A.N (control negativo).

Los transformantes se seleccionaron en función de la resistencia a una concentración de fleomicina en las placas de 40 µg por mililitro de medio. Todos ellos (un total de 24 transformantes) fueron utilizados en una primera fermentación realizada en condiciones normales con el medio de producción MCFP-A, como resultado de la cual se seleccionaron los dos transformantes de los plásmidos pULPP510 y pULPP510A con mejor capacidad productiva y el mejor productor de penicilina de los transformantes en los que se habían integrado los plásmidos pULPP510.N y pULPP510.NA. La variabilidad de los valores de producción de los distintos transformantes fue muy baja y la diferencia entre el mejor y el peor productor de penicilina fue de sólo un 10% del valor máximo.

Los transformantes seleccionados fueron incubados en las condiciones normales y con un medio de producción MCFP-A en el que la fuente de carbono principal fue la glucosa (al 3% en relación peso/volumen), la lactosa (en idéntica concentración) o una mezcla de glucosa y lactosa (al 1.5% cada una de ellas, en relación peso/volumen). El pH de estos medios se ajustó a un valor de 6.8, procediéndose a su esterilización. Tras la esterilización se midieron los valores de pH de cada uno de los medios preparados (medio con glucosa= 6.96, medio con lactosa= 6.98 y medio con glucosa y lactosa= 7.13) con el fin de rechazar la incidencia de una posible variación en el pH del medio de cultivo sobre los niveles de producción de antibiótico.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.VI y la figura 3.39.

		Producción de penicilinas ($\mu\text{g/mL}$)					
		24 h		48 h		72 h	
		Producción	Producción por miligramo de peso seco	Producción	Producción por miligramo de peso seco	Producción	Producción por miligramo de peso seco
Transformante	Fuente de carbono						
A8	G	8'4	0'6	18'8	1'0	12'2	0'6
	L	220'6	16'6	330'5	43'1	798'7	84'6
	G + L	11'6	0'7	29'3	1'5	269'0	15'4
A9	G	28'2	1'8	63'2	3'9	74'2	3'8
	L	211'8	17'1	372'5	47'4	935'3	98'9
	G + L	27'1	1'6	94'6	5'3	625'2	38'4
AN1	G	27'1	1'6	63'2	3'8	68'5	3'2
	L	229'5	19'2	387'8	49'3	1.148'2	127'9
	G + L	31'8	1'8	71'3	4'7	533'7	29'2
AA1	G	40'5	2'3	90'8	5'2	106'7	5'4
	L	211'8	18'3	330'4	47'2	737'0	82'1
	G + L	33'1	2'1	111'1	6'3	578'5	33'6
AA10	G	38'9	2'9	80'5	4'7	106'7	5'0
	L	220'5	18'14	315'2	46'1	419'0	51'2
	G + L	40'5	2'3	130'6	7'0	326'5	19'6
ANA1	G	40'5	2'6	87'2	4'9	90'8	4'7
	L	248'9	20'7	387'8	52'4	865'1	98'5
	G + L	37'4	2'6	106'7	6'7	533'7	31'7
AS-P-78	G	36'7	2'5	82'2	5'0	85'6	5'2
	L	234'5	21'1	380'5	51'4	948'9	105'0
	G + L	38'2	2'4	85'6	4'1	85'6	4'4

Tabla 3.VI. Resultados de producción de penicilinas (en microgramos por mililitro de cultivo y por miligramo de peso seco) por parte de transformantes de *P. chrysogenum* AS-P-78 en los que se ha integrado el plásmido pULLPP510 (transformantes A8 y A9), el plásmido pULPP510.N (control negativo, transformante AN1), el plásmido pULPP510A (transformantes AA1 y AA10) o el plásmido pULPP510A.N (control negativo, transformante ANA1). Se fermentó *P. chrysogenum* AS-P-78 para determinar el nivel basal de producción de penicilinas en los transformantes.

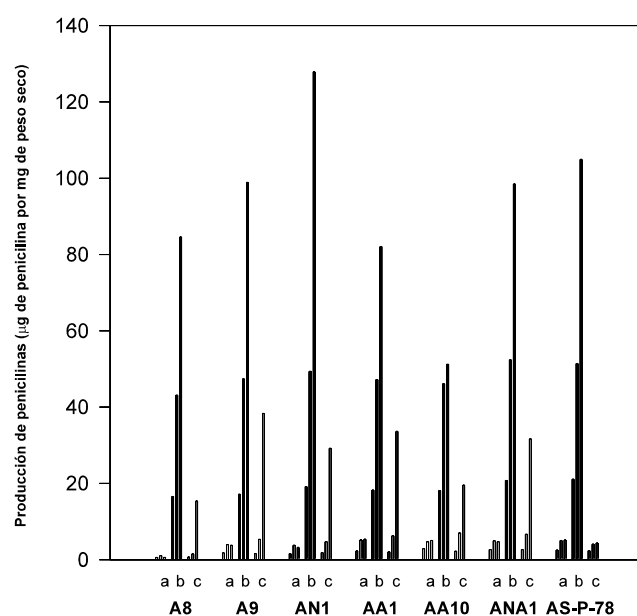


Figura 3.39. Representación gráfica de los valores detallados en la tabla 3.V. La producción se expresa como microgramos de penicilina por miligramo de peso seco. Cada conjunto de tres bloques (marcados con una letra minúscula en la base) contiene los valores correspondientes a un microorganismo y unas condiciones de medio determinadas: "a" indica que el hongo ha sido cultivado en un medio con glucosa como fuente de carbono; "b" que el hongo se ha cultivado en un medio con lactosa; "c" que las fuentes de carbono añadidas al medio son glucosa y lactosa. Cada uno de los tres bloques corresponde, en el orden mencionado, a los valores obtenidos a las 24, 48 ó 72 horas de incubación.

3.4.3. Discusión.

El aumento del número de copias de un gen es, normalmente, un mecanismo útil para aumentar la eficiencia de la reacción catalizada por la proteína por él codificada. Prueba de ello es la mayor producción de penicilina que se obtiene en las cepas de utilización industrial, en las que el número de copias de los genes de biosíntesis del antibiótico supera las cinco (Fierro y col., 1995). Asimismo, se han descrito incrementos en la producción de penicilina del 40% en transformantes de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin

54-1255 en los que se incorpora un plásmido que incluye los genes *pcbC* y *penDE* de este microorganismo (Veenstra y col., 1991). Rambossek y Leach (1987) detectaron un aumento en el nivel de expresión del gen *gla*, que codifica para la enzima glucoamilasa, en *Aspergillus niger* y este aumento era proporcional al número de copias del plásmido integradas (aunque hasta un máximo de cinco copias). En otros casos no se ha detectado este tipo de correlación entre dosis génica y nivel de expresión (Van Gorcom y col., 1985; Peñalva y col., 1989; Skatrud y col., 1989).

En cualquier caso, parece ser que el aumento en la dosis génica puede tener un límite establecido por el propio microorganismo y que una vez superado este umbral no se obtendrían mejoras en la capacidad de producción de antibiótico debidas a este tipo de fenómeno. Los estudios acerca de la regulación de los genes de biosíntesis de penicilina pueden aportar una nueva perspectiva a este problema y la modificación de este tipo de procesos podría tener su traducción en una mejora de la capacidad biosintética de las cepas fúngicas empleadas.

La expresión constitutiva de los genes de antibióticos β -lactámicos ha sido intentada con diferente resultado. Así, la sobreexpresión del gen *cefG* de *A. chrysogenum* con la región promotora del gen *gpdA* de *A. nidulans* condujo al aumento de la producción de cefalosporina C por parte de los transformantes y a una disminución en la acumulación intracelular del intermediario desacetilcefalosporina C, determinándose el paso

catalizado por la DAC acetiltransferasa codificada por el gen *cefG* como un punto limitante en la biosíntesis de cefalosporina C (Gutiérrez y col., 1997). La sobreexpresión del gen *penDE* de *A. nidulans* bajo el control de los promotores de los genes que codifican para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Montenegro, 1996) y para la alcohol deshidrogenasa I (Fernández-Cañón y col., 1995) del mismo microorganismo condujeron a aumentos en la actividad enzimática que no se reflejaban en incrementos en la producción de penicilina.

Nuestros resultados se asemejan en gran manera a los obtenidos con el mismo gen de *A. nidulans*, determinándose que la sobreexpresión del gen *penDE* de *P. chrysogenum* bajo el control de la región promotora del gen *gpdA* es efectiva y no tiene efecto sobre la producción del antibiótico. De ello se puede deducir que el gen *penDE*, por sí solo, no constituye en *P. chrysogenum* AS-P-78 (al igual que ocurre en *A. nidulans*) un punto limitante o “cuello de botella” en la producción de penicilina.

3.5. Influencia de las regiones de ADN físicamente próximas sobre la expresión del gen *penDE* de *P. chrysogenum*.

La posibilidad de obtener transformantes con el mismo número de copias integradas de un plásmido determinado constituye una herramienta inmejorable para la comparación de la eficiencia de los promotores y, fundamentalmente, para el estudio de la regulación de los genes de la ruta de biosíntesis de penicilina (tanto de la regulación que se ejerce “en cis”, con necesidad de una contigüidad física de las secuencias de ADN responsables de la regulación, como de la que se ejerce “en trans”, realizada por intermediación de una proteína que puede actuar incluso si no existe esa contigüidad física).

Los estudios acerca de la regulación “en trans” de los genes de biosíntesis de penicilina de *P. chrysogenum* están siendo abordados en estos momentos en nuestro laboratorio por la Dra. Ana Teresa Marcos, Katarina Kosalková y Oscar Bañuelos.

La posibilidad de regulación de los genes de biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* por secuencias de ADN adyacentes se comenzó a considerar cuando se observó que la integración del gen *penDE* bajo el control de su región promotora en una localización distinta a la habitual traía consigo la ausencia en la expresión de dicho gen. Esos experimentos se describen a continuación.

3.5.1. Construcción del plásmido pSB*G*DE y obtención de transformantes con una única copia del mismo integrada en el locus *pyrG*.

A la hora de construir un plásmido para la integración de una única copia en un locus específico de una cepa receptora se requiere un marcador de selección mutado en el plásmido que complemente una mutación presente en dicha cepa. Solamente en aquellos casos en que se produce un doble entrecruzamiento podría generarse una copia sin mutaciones del elemento que permitiría la selección inicial de los transformantes. La integración dirigida permite, conociendo la secuencia de ADN del entorno del gen diana y la de los plásmidos utilizados en la transformación, estimar el patrón que aparecería tras el análisis mediante técnicas de Southern del ADN de estos transformantes (digerido con endonucleasas de restricción con sitios de reconocimiento y corte dentro del entorno del locus de integración). La realización de estas técnicas permite confirmar la asignación de cada uno de los transformantes obtenidos a alguno de los tres grupos siguientes: transformantes con un única copia del plásmido integrada, transformantes con varias copias del plásmido integradas y revertientes (Fig. 3.40).

En nuestro laboratorio se dispone de mutantes auxótrofos de uridina, algunos de los cuales (*npe6 pyrG* o *npe10 pyrG*, por ejemplo) no producen penicilina. También se dispone del gen *pyrG* capaz de complementar esta auxotrofia, clonado a partir de *P. chrysogenum* AS-P-78 (Cantoral y col., 1988), por lo que éste parece ser el locus lógico para la integración de los vectores.

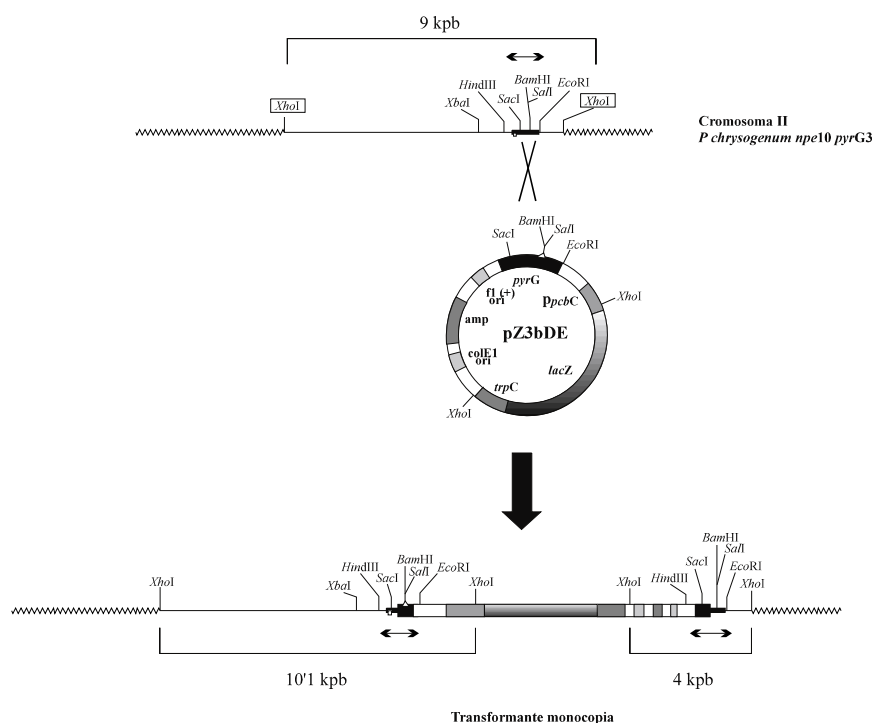


Figura 3.40. Representación del proceso de recombinación que ocurre al transformar *P. chrysogenum npe10 pyrG* con el plásmido pZ3bDE. En la figura también se representa el tamaño de los fragmentos que deberían obtenerse tras la digestión del ADN de un transformante monocopia (parte inferior de la figura) o del microorganismo receptor de la transformación (parte superior de la figura) con la endonucleasa de restricción *XhoI* y la posterior hibridación con una sonda correspondiente al gen *pyrG*. Las mutaciones presentes en el gen *pyrG* de la cepa receptora y del plásmido utilizado se esquematizan como un pequeño cuadrado blanco en la parte inferior o un pequeño triángulo blanco en la parte superior de los genes, respectivamente. Con una línea con doble flecha se destacan las copias generadas del gen *pyrG* (no funcionales si contienen alguna de las mutaciones señaladas o funcionales si no las contienen).

El vector utilizado como punto de partida fue el pSB*G*, un pBluescript® SK+ que posee mutado el sitio de reconocimiento y corte para la endonucleasa de restricción *Bam*HI (tras digerir con esta enzima, rellenar los extremos protuberantes y procederse al autoensamblaje del nuevo fragmento generado). El plásmido pSB*G* contiene el gen *pyrG* de *P. chrysogenum* mutado en el sitio de reconocimiento y corte para la endonucleasa de restricción *Bam*HI, localizada alrededor de la posición 536 del gen (el procedimiento de mutación es idéntico en este caso).

Este plásmido fue digerido con las endonucleasas de restricción *Sma*I y *Xba*I, purificándose el vector lineal y ensamblándose con un fragmento de 2'7 kpb obtenido tras la digestión del plásmido pULJL33 con la endonucleasa de restricción *Bst*EII, el rellenado de los extremos protuberantes y la digestión con la enzima *Xba*I.

El nuevo plásmido, de 6'2 kpb, se denominó pSB*G*DE y contiene el gen *pen*DE de *P. chrysogenum* bajo el control de su propio promotor, además de las secuencias correspondientes al plásmido de partida. Con él se

transformaron las cepas *P. chrysogenum npe6 pyrG* y *npe10 pyrG* y se seleccionaron transformantes en base a su capacidad de crecimiento en un medio mínimo sin suplementar. De ellos se analizaron 15 transformantes de la primera cepa y 5 de la segunda, debido a que ésta última no posee en su genoma la región que incluye los genes de biosíntesis de penicilina y se ha descrito en ella una mayor eficiencia en la obtención de una única

copia de estos genes integrada en el locus *pyrG* (Arenós, 1993).

Para el análisis se obtuvo el ADN total de cada uno de ellos y se digirió con la endonucleasa de restricción *XhoI*. El gel de electroforesis realizado con estas digestiones se transfirió a un filtro de nilón y se hibridó con una sonda específica correspondiente al gen *pyrG* (sonda G, Fig. 3.1). El resultado de esta hibridación se muestra en la figura 3.41.

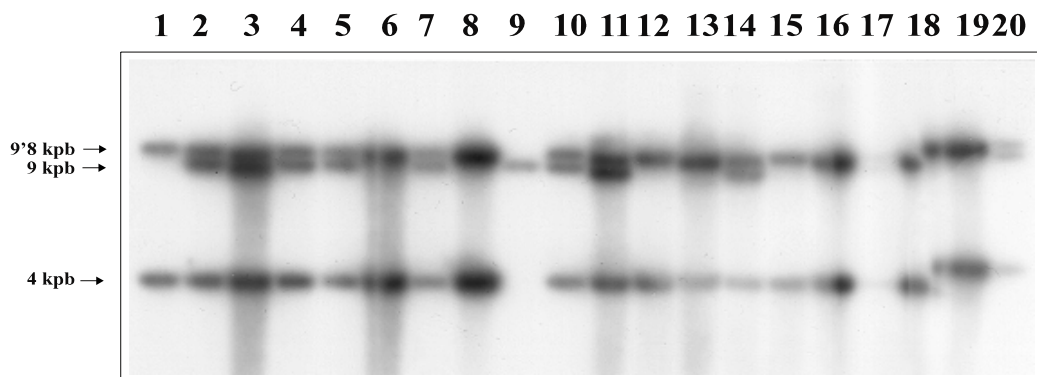


Figura 3.41. Electroforesis en gel de agarosa del ADN B. Análisis por técnicas de Southern del ADN de varios transformantes con el plásmido pSB*G*DE digerido con la endonucleasa *XhoI*. Carriles 1-15: transformantes de *P. chrysogenum npe6* con el plásmido pSB*G*DE y carriles 17-21: transformantes de *P. chrysogenum npe10* con el mismo plásmido.

Los transformantes 6DE12 y 10DE4, que incluían una única copia del plásmido, y la cepa control *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 se incubaron en medio de fermentación, en las condiciones habituales para la producción de penicilina. A las 48 horas de incubación se valoró la producción de penicilina y se recogió el micelio para la determinación de la actividad enzimática de la IPN aciltransferasa. Los resultados de las dos valoraciones se recogen en la tabla 3.VII, demostrándose que el gen *penDE* no era correctamente expresado cuando se integraba fuera de su entorno.

Cepas	Producción 48 horas (µg/mL)	IPN aciltransferasa	
		pkat/mL	pkat/mg de prot.
W. 54-1255	137'9	16'0	6'1
6DE12	0	0	0
10DE4	0	0	0

Tabla 3.VII. Producción de penicilinas en cultivos de 48 horas de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (W. 54-1255) y de los transformantes monocopia 6DE12 (procedente de la transformación del mutante *npe6 pyrG* con el plásmido pSB*G*DE) y 10DE4 (procedente de la transformación del mismo plásmido en el mutante *npe10 pyrG*).

Idénticos resultados se han conseguido tras la introducción del gen *penDE* de *P. chrysogenum* con su propia región promotora en plásmidos con

capacidad de replicación autónoma y que no se integran en el genoma fúngico (F. Fierro, comunicación personal).

3.5.2. Construcción de los plásmidos pCT1 y pCT2 e integración en el locus *pyrG* de *P. chrysogenum* *npe10 pyrG*.

A la vista de estos resultados se decidió construir dos plásmidos basados en el vector pZ3bDE, que contiene el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control de la región promotora del gen *penDE* de *P. chrysogenum*. Estos nuevos vectores permitirían observar la influencia de determinadas secuencias sobre la expresión de la enzima β -galactosidasa codificada por el gen *lacZ* (que actuaría, pues, como gen testigo) y, por lo tanto, sobre la funcionalidad de la región que actúa como promotora de este gen.

En primer lugar se digirió el vector pULJL43b (que incluye el promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* acoplado al gen de resistencia a fleomicina de *S. hindustanus*) con la endonucleasa de restricción *NcoI*, que posee un sitio de reconocimiento y corte al final de la región promotora del gen mencionado anteriormente. Los nucleótidos protuberantes del vector linealizado se rellenaron con una mezcla de dATP, dCTP y dTTP, eliminándose los restantes mediante tratamiento con la exonucleasa Mungbean. Se desfosforilaron los extremos 5' del vector y se ensambló con un fragmento de 1'4 kpb obtenido tras la digestión del plásmido pULJL33 con la endonucleasa de restricción *XbaI*, el rellenado de los extremos protuberantes y la digestión con la endonucleasa de restricción *XmnI*. El plásmido obtenido, de 5'9 kpb, se denominó pCT0.1 y contiene el gen *penDE* de *P. chrysogenum* bajo el control del promotor del gen *pcbC* del mismo organismo. Este plásmido fue digerido con la endonucleasa de restricción *PstI* y posteriormente autoensamblado, con lo que se consigue un vector que sirve para la

determinación de la secuencia de nucleótidos de la fusión (Fig. 3.42).

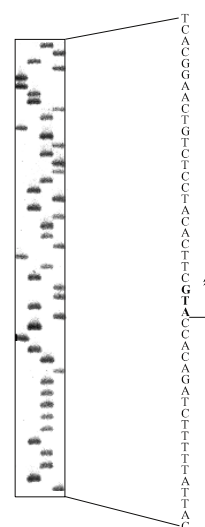


Figura 3.42. Secuencia de ADN correspondiente a la fusión transcripcional entre el promotor del gen *pcbC* y el gen *penDE* de *P. chrysogenum*. Esta fusión se encuentra integrada en el plásmido pCT0.1 (figura 3.43). Con una flecha se indica el comienzo del gen *penDE*.

Un fragmento de 2'4 kpb obtenido tras la digestión del plásmido pCT0.1 con la enzima *SmaI* fue ensamblado en el vector pZ3bDE digerido con la endonucleasa *BamHI*, con los nucleótidos protuberantes rellenados y con los extremos 5' desfosforilados. Se originó así el plásmido pCT1, de 12'1 kpb, que incluía el gen *penDE* de *P. chrysogenum* bajo el control del promotor del gen *pcbC* de este microorganismo y el gen *lacZ* de *E. coli* regulado por la región promotora del gen *penDE* de *P. chrysogenum*. Se seleccionaron las dos orientaciones posibles del inserto procedente del plásmido pCT0.1 en la nueva construcción por si pudieran observarse diferencias en la expresión del gen *lacZ* en función de este parámetro, y se denominó pCT1a al plásmido en el que el gen *penDE* se transcribe en sentido contrario a *lacZ* y pCT1b a aquel que contiene la orientación inversa (Fig. 3.43). Estos

dos plásmidos sirvieron para comprobar un posible efecto de la IPN aciltransferasa de *P. chrysogenum* sobre su propio promotor. La susti-

tución del promotor original del gen *penDE* por el del promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum*, que daba origen a un buen nivel de expresión del gen *lacZ* de *E. coli* cuando se integraba en el locus *pyrG* (Arenós, 1993), perseguía la eliminación de toda posible interferencia a este respecto.

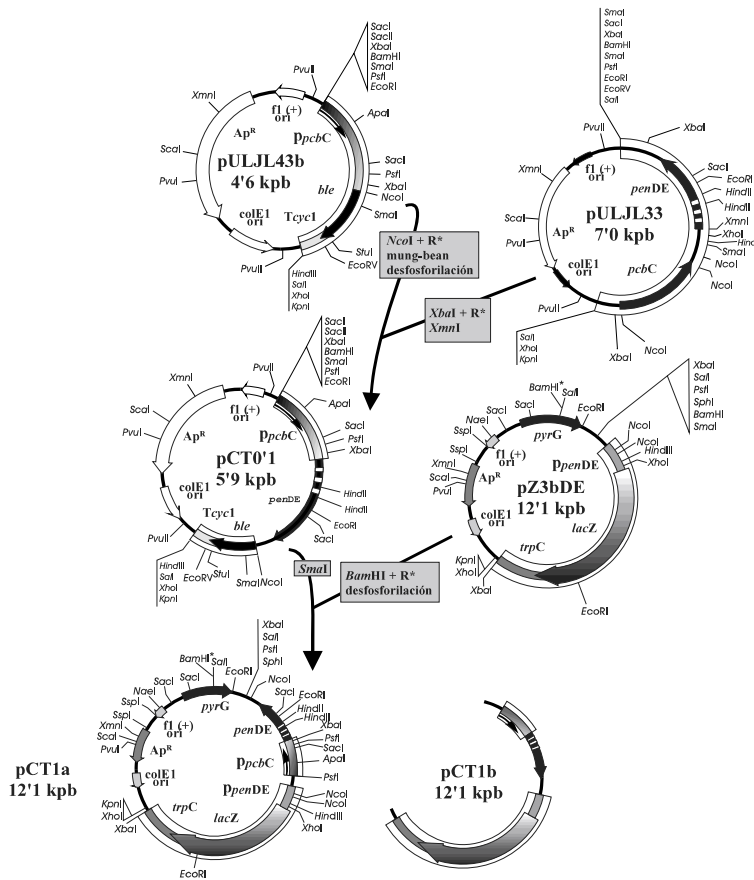


Figura 3.43. Esquema de la construcción de los plásmidos pCT0.1 (contiene la fusión transcripcional entre el promotor del gen *pcbC* y el gen *penDE* de *P. chrysogenum*) y pCT1 (posee el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor del gen *penDE* de *P. chrysogenum* y el gen *penDE* de *P. chrysogenum* bajo el control del promotor del gen *pcbC* del mismo microorganismo). Las orientaciones definidas como “a” son aquellas en que los dos genes se expresan en sentidos distintos y las llamadas “b” las orientaciones contrarias.

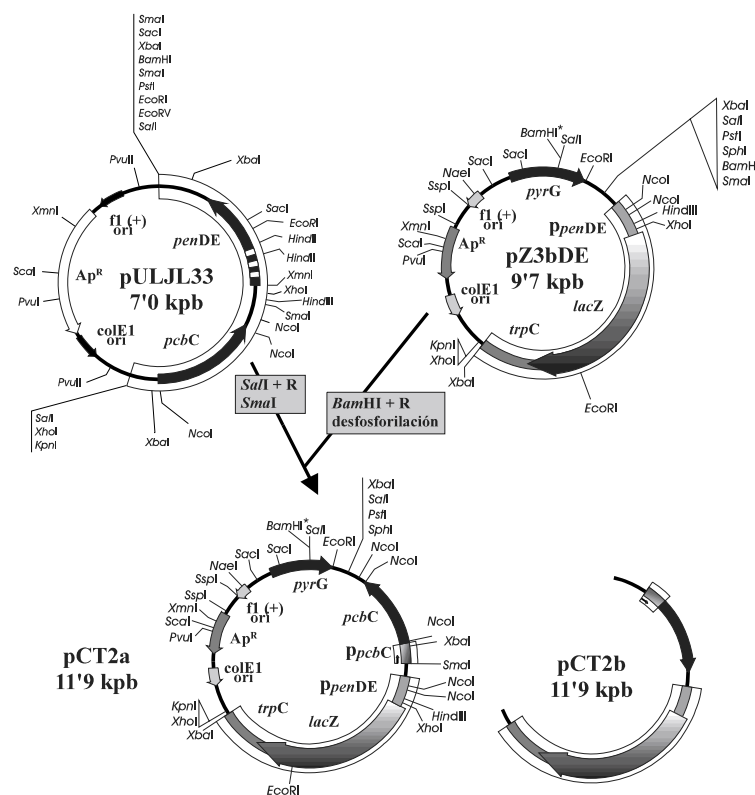


Figura 3.44. Esquema de la construcción pCT2, que posee el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor del gen *penDE* de *P. chrysogenum* y el gen *pcbC* de *P. chrysogenum* con su propia región promotora. Las orientaciones definidas como “a” son aquellas en que los dos genes se expresan en sentidos distintos y las llamadas “b” las orientaciones contrarias.

Simultáneamente, se ensambló un fragmento de 2'2 kpb, obtenido tras la digestión del plásmido pULJL33 con la endonucleasa de restricción *Sall*, el rellenado de los extremos protuberantes y la digestión con la endonucleasa *SmaI*, con el vector pZ3bDE digerido con la endonucleasa *BamHI*, con los nucleótidos protuberantes rellenados y con los extremos 5' desfosforilados. El nuevo plásmido originado se denominó pCT2, de 11'9 kpb, y contiene el gen *pcbC* de *P. chrysogenum* con su promotor y el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control de la región promotora del gen *penDE* de *P. chrysogenum*. Se seleccionaron las dos orientaciones posibles en el plásmido del inserto procedente de la construcción pULJL33 por si

tuviesen efectos distintos sobre la expresión del gen *lacZ*, denominándose como pCT2a al plásmido en el que el gen *pcbC* se transcribe en sentido contrario al *lacZ* y pCT2b a aquel que contiene la orientación inversa (Fig. 3.44). Estos plásmidos sirvieron para comprobar un posible efecto de la IPN sintasa de *P. chrysogenum* sobre el promotor del gen *penDE* del mismo microorganismo.

Los cuatro plásmidos obtenidos fueron utilizados para la transformación de *P. chrysogenum* *npe10 pyrG*, seleccionándose transformantes capaces de desarrollarse en un

medio mínimo sin suplementar. Se extrajo el ADN total de estos transformantes y a continuación se digirió con la endonucleasa de restricción *Xho*I, separándose los fragmentos ge-

nerados mediante una electroforesis en un gel de agarosa. El ADN digerido se transfirió a un filtro de nilón y se hibridó con una sonda específica para el gen *pyrG* (sonda G, figura 3.1), con el fin de determinar el número de copias del plásmido integradas. El resultado obtenido se muestra en la figura 3.45.

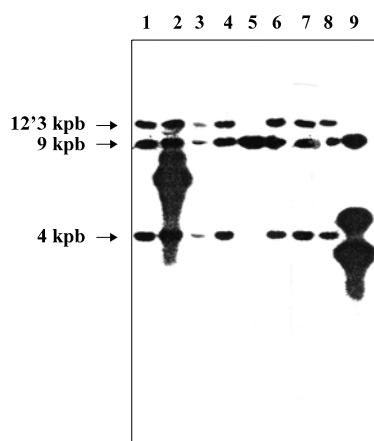


Figura 3.45. Análisis, mediante técnicas de Southern, del ADN de varios transformantes de *P. chrysogenum npe10* con los plásmidos pCT1 (a y b) y pCT2 (a y b). Carril 1: 101a4 (con el plásmido pCT1a); carriles 2 y 3: 101b3 y 101b4 (con el plásmido pCT1b); carriles 4, 5 y 6: 102a2, 102a4 y 102a5 (con el plásmido pCT2a) y carriles 7, 8 y 9: 102b2, 102b5 y 102b9 (con el plásmido pCT2b).

En este punto cabe destacar la gran inestabilidad en la integración de los transformantes que incorporan el vector pZ3bDE o derivados de él, inestabilidad ya conocida sobradamente en nuestro laboratorio (Arenós, 1993; O. Bañuelos, comunicación personal) y que explica la aparición en ciertos transformantes del patrón de hibridación específico de aquellos transformantes con una sola copia del plásmido integrada junto con el patrón específico de la cepa sin transformar. Este fenómeno, que también se observó (aunque en menor grado) cuando se utilizó en la transformación el plásmido pSB*G*DE (Fig. 3.41), se explicaría por la pérdida espontánea del vector integrado en el locus *pyrG* por una parte de la población fúngica.

El transformante T10DE2 obtenido por C. Arenós (Arenós, 1993), definido como monocopia para la integración del plásmido pZ3bDE en

el locus *pyrG* de la cepa *P. chrysogenum npe10* *pyrG* y utilizado en nuestros experimentos para establecer un nivel basal de referencia en la expresión de la β -galactosidasa no era ajeno a este fenómeno. Este hecho y la observación de un patrón similar en la hibridación y en la intensidad de las bandas objeto de nuestro estudio permitieron afirmar que los resultados obtenidos en el análisis de los distintos transformantes seleccionados como monocopia para estas integraciones caben ser asignados a cepas con un mismo número de copias de estos plásmidos integradas en el locus *pyrG*, no siendo este número en ningún caso superior a la unidad).

Los transformantes T101a4, T101b4, T102a5, T102b5 (y T10DE2 como control) se incubaron en las condiciones habituales para la producción de penicilina durante 48 horas, recogiendo el micelio por filtración y valorándose la actividad

β -galactosidásica de la forma previamente descrita. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 3.VIII y en la figura 3.46.

En ningún caso se obtuvo un incremento significativo en la actividad β -galactosidásica con respecto a la presente en la cepa control T10DE2.

Transformantes	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad β -galactosidásica		
		Actividad específica (U/mg de prot.)	valor mínimo / valor máximo	Variación respecto del control (%)
T10DE2	1'85	7'05	7'0 / 7'15	0
101a4	2'10	6'45	6'33 / 6'56	- 8'5
101b4	1'62	7'24	6'97 / 7'51	+ 2'69
102a5	2'04	6'70	6'50 / 7'09	- 4'96
102b5	1'61	6'50	6'35 / 6'70	- 7'8

Tabla 3.VIII. Actividad β -galactosidásica determinada en transformantes monocopia de *P. chrysogenum npe10*. **T10DE2** contiene el plásmido pZ3bDE (este transformante se ha usado para determinar el nivel basal de actividad β -galactosidásica que encontraremos en los transformantes monocopia, lo que es sólo válido para los plásmidos cuya estructura se basa en el pZ3bDE), **101a4** contiene el plásmido pCT1a, **101b4** contiene el plásmido pCT1b, **102a5** contiene el plásmido pCT2a y **102b5** es un transformante monocopia del plásmido pCT2b.

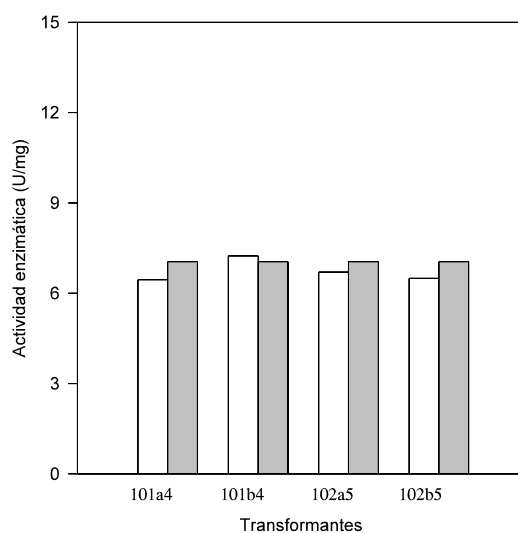


Figura 3.46. Representación gráfica de los valores de la tabla 3.VII. La actividad β -galactosidásica se indica en U/mg de proteína. El valor correspondiente a cada transformante (indicado en el eje de abscisas) se esquematiza con un bloque de fondo blanco, en comparación con el valor de actividad basal determinado con el transformante T10DE2 (indicado con un bloque de fondo gris).

3.5.3. Construcción del plásmido pCT2N e integración en el locus *pyrG* de *P. chrysogenum npe10 pyrG*.

La expresión a partir del promotor del gen *penDE* de *P. chrysogenum* no parece verse estimulada por la IPN sintasa o la propia IPN aciltransferasa, pero podría verse influida por secuencias sin capacidad codificante localizadas en la proximidad de su entorno génico habitual y que podrían no estar incluidas en las construcciones utilizadas hasta el momento.

También podía darse el caso de que se requiriese una determinada configuración física de estas secuencias dentro del vector para que su acción sobre el promotor fuese válida. Por ello se elaboró una nueva construcción, resultado de ensamblar un fragmento de 2'2 kpb (originado por la digestión del plásmido pULJL33 con la endonucleasa *SalI*, el rellenado de los extremos protuberantes y la digestión con la enzima *HindIII*) en el vector pZ3bDE digerido con la endonucleasa de restricción *SpeI*, el rellenado de los extremos protuberantes y la digestión con la enzima *HindIII*.

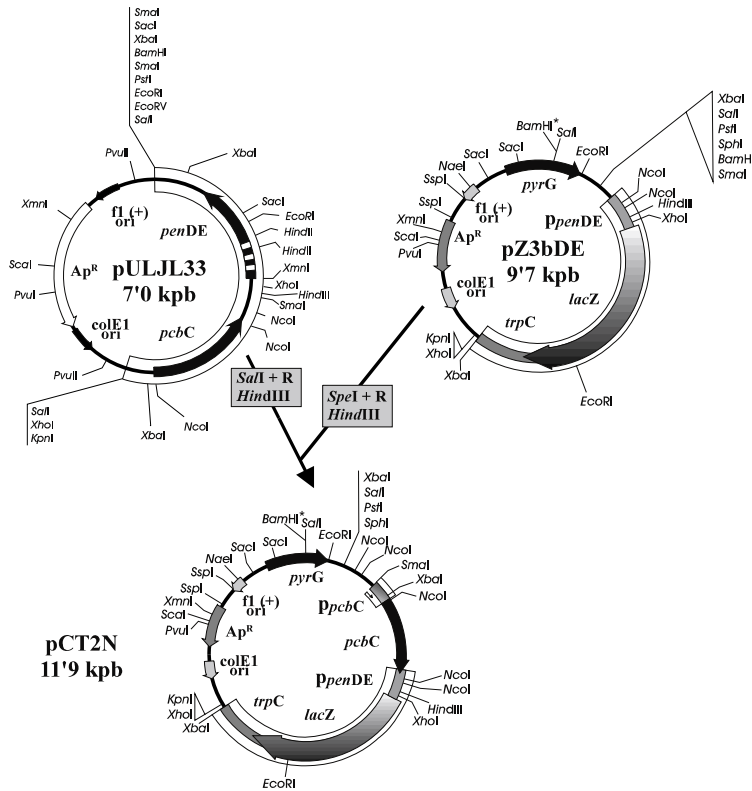


Figura 3.47. Esquema de la construcción del plásmido pCT2N, que contiene el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor del gen *penDE* de *P. chrysogenum*. Aguas arriba se encuentra integrado el gen *pcbC* de este microorganismo con su propio promotor, en una forma tal que se recompone la estructura original del conjunto *pcbC-penDE* en *P. chrysogenum*.

Este nuevo plásmido, de 11'9 kpb, se denominó pCT2N y contiene el gen *pcbC* de *P. chrysogenum* con su propia región promotora y el gen *lacZ* bajo el control del promotor del gen *penDE* del mismo microorganismo (Fig. 3.47). La diferencia con respecto al plásmido pCT2b radica en que la disposición de estos elementos en el plásmido pCT2N es idéntica a la que aparece en las cepas de *P. chrysogenum* productoras de penicilina analizadas hasta el momento (se mantiene la integridad de la región de ADN presente entre los genes *pcbC* y *penDE*), por lo que el gen testigo se encontraría en las mismas condiciones en las que se encuentra el gen *penDE* en esas cepas (al menos con respecto a las secuen-

cias más próximas situadas aguas arriba de él).

El plásmido pCT2N se transformó en la cepa *P. chrysogenum npe10 pyrG* y se seleccionaron transformantes capaces de desarrollarse en un medio mínimo sin suplementar. Se aisló el ADN total de todos ellos y se digirió con la endonucleasa de restricción *XhoI*. Tras realizar la electroforesis y transferirse el ADN a un filtro de nilón, éste se hibridó con una sonda específica para el gen *pyrG* (sonda G, figura 3.1), obteniéndose un patrón de hibridación con características similares a los obtenidos anteriormente (Fig. 3.48).

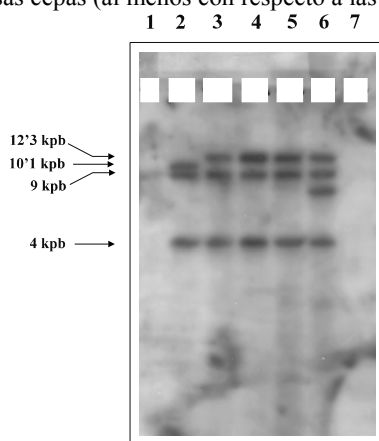


Figura 3.48. Análisis, mediante técnicas de Southern, del ADN de varios transformantes monocopias del plásmido pCT2N digeridos con la endonucleasa de restricción *XhoI*. Carril 1: λ *HindIII*, marcador de tamaño (no da señal). Carril 2: T10DE2 (con el plásmido pULZ3bDE, plásmido control). Carriles 3, 4, 5 y 6: T10N1, T10N2, T10N3 y T10N4 (con el plásmido pCT2N).

Se realizó una fermentación en condiciones de producción de penicilina de todos los transformantes obtenidos con el plásmido pCT2N y de dos transformantes con múltiples copias de la construcción pCT1b (transformante 101b3) y pCT2b (transformante 102b9). No se obtuvieron transformantes con múltiples copias de las construcciones pCT1a y pCT2a.

Se recogió el micelio a las 48 horas y se valoró la actividad β -galactosidásica presente en cada uno de los transformantes. Los resultados se

recogen en la tabla 3.IX y en la figura 3.49.

Los transformantes con una copia integrada en el locus *pyrG* del plásmido pCT2N mostraron incrementos del 20'8% (transformante T102N2), 28'2% (transformante T102N1) y 43'9% (transformante T102N3) con respecto de la actividad β -galactosidásica presente en el transformante control T10DE2 y el transformante multicopia T102N4 presenta un aumento del 31'4% respecto del mismo control.

Transformantes	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad β -galactosidásica		
		Actividad específica (U/mg de prot.)	valor mínimo / valor máximo	Variación respecto del control (%)
T10DE2	1'53	7'27	7'24 / 7'325	0
T10N1	2'13	9'32	8'99 / 9'64	+ 28'2
T10N2	1'65	8'78	8'40 / 9'31	+ 20'8
T10N3	1'77	10'46	10'24 / 10'67	+ 43'9
T10N4	1'30	9'55	9'01 / 10'56	+ 31'4
T101b3	1'68	8'49	8'32 / 8'77	+ 16'8
T102b9	1'35	8'98	8'79 / 9'26	+ 23'5

Tabla 3.IX. Actividad β -galactosidásica determinada en transformantes monocopia y multicopia de *P. chrysogenum npe10*. **T10DE2** contiene una sola copia del plásmido pZ3bDE, **T10N1**, **T10N2** y **T10N3** son transformantes monocopia del plásmido pCT2N, **T10N4** es un transformante multicopia de ese mismo plásmido, **101b3** es un transformante multicopia del plásmido pCT1b y **102b9** es un transformante multicopia del plásmido pCT2b.

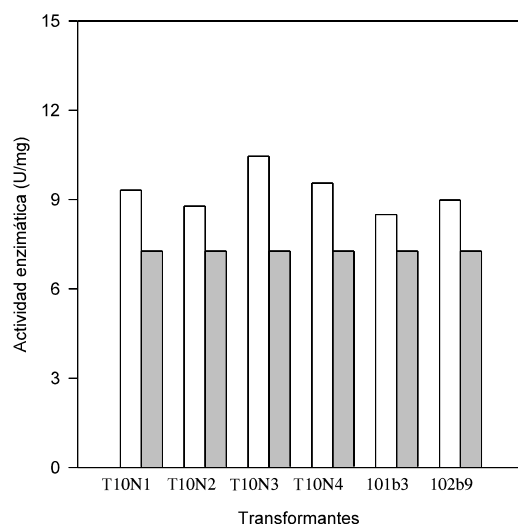


Figura 3.49. Representación gráfica de los valores de la tabla 3.VIII. La actividad β -galactosidásica se indica en U/mg de proteína. Al igual que en la figura 3.46, el valor correspondiente a cada transformante (indicado en el eje de abscisas) se esquematiza con un bloque de fondo blanco, en comparación con el valor de actividad basal determinado con el transformante T10DE2 (indicado con un bloque de fondo gris).

Los transformantes multicopia 101b3 y 102b9 presentan también valores superiores a los del control (un 16'8 y un 23'5%, respectivamente), valores que curiosamente son inferiores a los obtenidos por los transformantes monocopia del plásmido pCT2N.

3.5.4. Discusión.

La integración del gen *penDE* de *P. chrysogenum* fuera de su entorno habitual (bien en el locus *pyrG* o en plásmidos con capacidad de replicación autónoma) provoca el que no se detecte su expresión. La integración de secuencias concretas de su entorno, en una disposición concreta, es capaz de provocar un moderado aumento en el nivel de expresión conseguido a partir del promotor de este gen. Esto apuntaría hacia la existencia de algún factor presente en dicho entorno y que de algún modo facilitara este proceso.

Una de las posibilidades que explicarían este fenómeno sería la existencia de una secuencia reguladora localizada "en cis" del gen *penDE*. Hay varios casos de regulación por mecanismos dependientes de la posición descritos en hongos, siendo uno de ellos el demostrado para el gen *C1C* de *A. nidulans* (Miller y col., 1987). Este gen se encuentra situado dentro del grupo génico *SpoC1* (Gwynne y col., 1984), que tiene una expresión limitada a un cierto periodo del desarrollo del hongo (concretamente sólo se da en los conidios en diferenciación). Cuando el gen *C1C* es integrado en el exterior de este grupo génico, en cualquier lugar del cromosoma, se transcribe en las hifas. El control de este proceso es mediado en parte por un elemento regulador negativo situado "en cis" (en la misma molécula de ADN) y que parece actuar incluso a considerables distancias (Miller y col., 1987). También se ha descrito un elemento regulador "en cis" dentro de la agrupación génica que permite el catabolismo de la L-prolina en *A. nidulans* (Hull y col., 1989).

La existencia de una secuencia de este tipo se ha descrito en la región de ADN localizada entre los genes *pcbAB* y *pcbC* de *A. nidulans* y está implicada, aunque de forma distinta para cada uno de ellos, en la expresión de estos dos genes (Then Bergh y col., 1996). Esta región de ADN (basada en una secuencia CCAAT) parece estar conservada en *A. nidulans* y *P. chrysogenum* y sería el punto de unión de una proteína reguladora denominada PENR1.

La proteína PENR1 se une también a la región promotora del gen *penDE* de *A. nidulans* (la secuencia de unión se halla aproximadamente a 350 pb del triplete de inicio de la traducción) y la sustitución por una secuencia distinta conduce a una disminución de cuatro veces en la expresión de un gen testigo (Litzka y col., 1996). La secuencia descrita se ha localizado en *P. chrysogenum* unas 450 pb aguas arriba del triplete de inicio de la traducción y también parece intervenir en la unión de la proteína PENR1 (Litzka y col., 1996). Esta región se encuentra incluida en todas las construcciones transformadas en nuestros ensayos, debido a que está comprendida en la región promotora del gen *penDE* acoplada al gen testigo en el "plásmido base" pZ3bDE, por lo que no va a ser motivo de interferencias.

Gómez-Pardo y Peñalva encontraron en 1990 que la expresión del gen *lacZ* fusionado al promotor del gen *pcbC* de *A. nidulans* no era completamente normal cuando se integraba en el locus *argB*, fuera de su entorno habitual. Este hecho, unido con los resultados aquí mostrados y con la existencia de regiones de unión para una misma proteína reguladora en las regiones promotoras de los tres genes de biosíntesis de penicilina de *A. nidulans* y *P. chrysogenum*, sugieren la existencia de un mecanismo regulatorio común para estos tres genes. Esta sugerencia ha sido ya propuesta para explicar, desde el punto de vista evolutivo, la aparición de la agrupación de genes de biosíntesis de penicilina. Según esta hipótesis, durante la transferencia de los genes *pcbC* y *penDE* desde procariotas hasta el supuesto ancestro común de *A.*

nidulans y *P. chrysogenum* se favoreció la integración en un entorno que permitiera la adquisición de una ventaja evolutiva (por ejemplo, en la proximidad de un gen capaz de completar la formación de un nuevo antibiótico, más potente). La integración en este punto concreto favorecería la regulación conjunta de todo el proceso.

La existencia de mecanismos de recombinación que suponen la pérdida del plásmido integrado no caben ser asignados exclusivamente al locus *pyrG*, puesto que esos mismos fenómenos no se aprecian en ningún caso cuando las regiones de ADN introducidas en él no pertenecen al gen *penDE*. Esta especificidad podría explicarse por la existencia de un “punto caliente de recombinación” en la secuencia de ADN localizada entre los genes *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum* (y esto coincidiría con una de las hipótesis propuestas para interpretar la localización conjunta de los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE* en *A. nidulans* y *P. chrysogenum*, mencionada en la Introducción).

No debería descartarse, por último, el posible influjo del locus *pyrG* sobre la expresión del promotor del gen *penDE* de *P. chrysogenum*, puesto que la expresión normal en la célula del propio gen *pyrG* es muy baja (como lo demuestran los experimentos de análisis de ARNm realizados en el apartado 3.1) y la regulación sufrida por este gen puede afectar, de algún modo, a los genes que se integren en él. En este sentido, Litzka y col. (1995) han descrito la expresión en el locus *argB* del gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del gen *penDE* de *A. nidulans*, resultados que contrastan con los aquí mostrados y que podrían hacer pensar en un mecanismo dependiente del sitio de integración.

Esta teoría queda en entredicho por el diferente nivel de expresión del gen *lacZ* de *E. coli* expresado bajo el control de las regiones promotoras de los tres genes biosintéticos de penicilina

(Arenós, 1993). La posible “influencia negativa” de la regulación ejercida sobre el gen *pyrG* debería actuar por igual sobre cualquier gen integrado en esa posición. Podría ocurrir que la acción de este entorno se diera sobre secuencias específicas de ADN contenidas en la región promotora del gen *penDE* y que no se encontraran presentes en los promotores de los genes *pcbAB* y, sobre todo, *pcbC*. Sin embargo, este planteamiento no es capaz de explicar lo que ocurre cuando el gen *penDE* de *P. chrysogenum* se incluye en plásmidos con capacidad de replicación autónoma.

Pero incluso si se considerara la posible influencia negativa del locus *pyrG* sobre la expresión específica del gen *penDE* de *P. chrysogenum* no sería discutible el efecto estimulador de la expresión del gen *lacZ* por parte de la secuencia de ADN introducida en el plásmido pCT2N y, por lo tanto, la existencia de un efecto adyuvante en la expresión del gen *penDE* de *P. chrysogenum* por parte de secuencias de ADN localizadas en su proximidad más o menos inmediata y distintas a las descritas hasta el momento.

Este efecto adyuvante explicaría la aparición de producciones más elevadas de penicilina tras la transformación de *P. chrysogenum* con el conjunto *pcbC-penDE* (Veenstra y col., 1991) y el nulo efecto conseguido tras la transformación del mismo microorganismo con cada uno de los genes por separado (Barredo, 1990; Montenegro, 1996; resultados del presente trabajo).

El requerimiento de regiones concretas de la agrupación de genes biosintéticos no tiene por qué restringirse a secuencias situadas dentro de la región de 5'1 kpb delimitada por los sitios de reconocimiento y corte para la endonucleasa de restricción *SaII*, sino que puede extenderse al gen *pcbAB* e incluso a regiones del mismo cromosoma muy alejadas de estos genes.

4. Conclusiones

1. Se han caracterizado tres mutantes de *P. chrysogenum* no productores de penicilina y que carecen de la actividad IPN aciltransferásica (mutantes *npe6*, *npe7* y *npe8*). El análisis de la secuencia de nucleótidos del gen *penDE* correspondiente a cada mutante indica que los aminoácidos Gly¹⁵⁰ y Glu²⁵⁸ de la IPN aciltransferasa son esenciales en el mantenimiento de una correcta actividad enzimática.
2. Las IPN aciltransferasas de *P. chrysogenum* y *A. nidulans* presentan un distinto grado en su capacidad de procesamiento. La proteína de *P. chrysogenum* se disocia siempre en dos subunidades de 29 y 11 kDa, mientras que la de *A. nidulans* aparece en forma de un monómero de 40 kDa.
3. La localización subcelular en microcuerpos de la IPN aciltransferasa no está determinada únicamente por la secuencia señal presente en el extremo C-terminal de la proteína. La secuencia de localización definida como consenso a este respecto debe ser modificada con el fin de que incluya aminoácidos de características no estrictamente básicas en la penúltima posición.
4. El mutante *A. nidulans* GH79, no productor de penicilina, no está únicamente afectado en el último paso de la ruta de biosíntesis de penicilina. La transformación con el gen *penDE* provoca la aparición de niveles incrementados en la actividad IPN aciltransferásica, sin conseguir recuperar la producción de penicilina.
5. El último paso de la ruta de biosíntesis de penicilina no es limitante en la producción de penicilina por *P. chrysogenum* AS-P-78.
6. La expresión del gen *penDE* se ve favorecida por la presencia de secuencias de ADN localizadas en su proximidad, dentro de la agrupación de genes de biosíntesis de penicilina.

5. Bibliografía

Bibliografía general

50 Years of Penicillin Application. History and Trends. (1992). H. Kleinkauf y H. von Döhren, eds. Technische Universität Berlin. Public Ltd, República Checa.

Biology of microorganisms, Eighth Edition. (1997). M.T. Madigan, J.M. Martinko y J. Parker. Prentice Hall, Upper Saddle River, Nueva Jersey.

Bioquímica, Cuarta Edición. (1995). L. Stryer. Editorial Reverté, Barcelona.

Current protocols in molecular biology. (1987). F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman y K. Struhl. Greene Publishing Associates, Brooklyn, Nueva York.

Cephalosporins and penicillins. (1972). E.H. Flynn, ed. Academic Press, Nueva York.

Genes IV. (1990). B. Lewin. Oxford University Press, Nueva York.

Molecular cloning. A laboratory manual. (1989). J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Penicillium and Acremonium. (1987). J.F. Peberdy, ed. Plenum Press, Nueva York.

Relación de citas bibliográficas

Abraham, E.P., Chain, E., Florey, H.W., Florey, M.E., Heatley, N.G., Jennings, M.A. y Sanders, A.G. (1949). En *Antibiotics*, Vol. 2 (pp. 631-671). E.P. Abraham, E. Chain, H.W. Florey, N.G. Heatley, M.A. Jennings y A.G. Sanders, eds. Oxford University Press, Londres.

Abraham, E.P., Newton, G.G.F., Crawford, K., Burton, H.S. y Hale, C.W. (1953). Cephalosporin N: a new type of penicillin. *Nature* **171**: 343.

Abraham, E.P. y Newton, G.G.F. (1961). The structure of cephalosporin C. *Biochem. J.* **79**: 377-393.

Adlington, R.M., Aplin, R.T., Baldwin, J.E., Chakravarti, B., Field, L.D., John, E.M.M., Abraham, E.P. y White, R.L. (1983). Conversion of ¹⁷O/¹⁸O-labelled isopenicillin N in a cell-free extract of *Cephalosporium acremonium*. A study by ¹⁷O-NMR spectroscopy and mass spectroscopy. *Tetrahedron* **39**: 1061-1068.

Affenzeller, K., Jaklitsch, W.M., Hönlinger, C. y Kubicek, C.P. (1989). Lysine biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is regulated by feedback inhibition of α -amino adipate reductase. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**: 293-298.

- Aharonowitz, Y., Cohen, G. y Martín, J.F. (1992). Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: Structure, organization, regulation, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 461-495.
- Aharonowitz, Y., Bergmeyer, J., Cantoral, J.M., Cohen, G., Demain, A.L., Fink, U., Kinghorn, J., Kleinkauf, H., MacCabe, A., Palissa, H., Pfeiffer, E., Schwecke, T., van Liempt, H., von Döhren, H., Wolfe, S. y Zhang, J. (1993). δ -(L-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, the multienzyme integrating the four primary reactions in β -lactam biosynthesis, as a model peptide synthetase. *Bio/Technology* **11**: 807-810.
- Aitchison, J.D., Murray, W.W. y Rachubinski, R.A. (1991) The carboxyl-terminal tripeptide Ala-Lys-Ile is essential for targeting *Candida tropicalis* trifunctional enzyme to yeast peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **266**: 23197-23203.
- Alonso, M.J., Bermejo, F., Reglero, A., Fernández-Cañón, J.M., González de Buitrago, G. y Luengo, J.M. (1988). Enzymatic synthesis of penicillins. *J. Antibiot.* **41**: 1074-1084.
- Alvarez, E., Cantoral, J.M., Barredo, J.L., Díez, B. y Martín, J.F. (1987). Purification to homogeneity and characterization of acyl coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *P. chrysogenum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 1675-1682.
- Alvarez, E., Meesschaert, B., Montenegro, E., Gutiérrez, S., Díez, B., Barredo, J.L. y Martín, J.F. (1993). The isopenicillin N acyltransferase of *P. chrysogenum* has isopenicillin N amidohydrolyase, 6-aminopenicillanic acid acyltransferase and penicillin amidase activities, all of which are encoded by the single *penDE* gene. *Eur. J. Biochem.* **215**: 323-332.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J. y Stark, G.R. (1977). Method for the detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5350-5354.
- Anné, J. y Peberdy, J.F. (1976). Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 413-417.
- Anné, J. (1977). Somatic hybridization between *Penicillium* species after induced fusion of their protoplasts. *Agricultura* **25**: 1-117.
- Anné, J. (1983). Protoplasts of filamentous fungi in genetics and metabolite production. En: *Protoplasts 1983: Lecture Proceedings* (pp. 167-178). I. Potrykus, C.T. Harms, A. Hinner, R. Hutter, P.J. King y R.D. Shillito, eds. Birkhauser Verlag, Basilea, Stuttgart y Nueva York.
- Aplin, R.T., Baldwin, J.E., Cole, S.J.C., Sutherland, J.D. y Tobin, M.B. (1993). On the production of α,β -heterodimeric acyl-coenzyme A:isopenicillin N acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*: studies using a recombinant source. *FEBS Lett.* **319**: 166-170.
- Aramayo R., Adams T.H. y Timberlake W.E. (1989) A large cluster of highly expressed genes is dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **122**: 65-71.
- Arenós, C. (1993). Obtención y caracterización de transformantes por integración dirigida en *Penicillium chrysogenum* para el estudio de la regulación de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina. Tesina de Licenciatura. Universidad de Valencia.
- Arnstein, H.R.V. y Morris, D. (1960). The structure of a peptide containing α -aminoadipic

acid, cysteine, and valine, present in the mycelium of *Penicillium chrysogenum*. *Biochem J.* **76**: 357-361.

Auerbach, C. (1976). Mutation research: problems, results and perspectives. Chapman and Hall, Londres.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D., Smith, J.A., Seidman, J.G. y Struhl, K. (1987). Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates, Brooklyn, Nueva York.

Baker D, Shiau A.K. y Agard D.A. (1993) The role of pro regions in protein folding repression in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 966-970.

Bailey, C.R. y Arst, H.N., Jr. (1975). Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Eur. J. Biochem.* **51**: 573-577.

Bainbridge, B.W. (1981). En: The Fungal Nucleus (pp. 259-275). K. Gull y S.G. Oliver, eds. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.

Baldwin, J.E., Adlington, R.M., Coates, B, Crabbe, M.J.C., Crouch, N.P., Keeping, J.W., Knight, G.C., Schofield, C.J., Ting, H.-H., Vallejo, C.A., Thorniley, M. y Abraham, E.P. (1987). Purification and initial characterization of an enzyme with deacetoxycephalosporin C synthetase and hidroxylase activities. *Biochem. J.* **245**: 831-841.

Baldwin, J.E. y Abraham, E.P. (1988). The biosynthesis of penicillins and cephalosporins. *Nat. Prod. Rep.* **5**: 129-145.

Baldwin, J.E., Bird, J.W., Field, R.A., O'Callaghan, N.M. y Schofield, C.J. (1990). Isolation and partial characterization of ACV synthetase from *Cephalosporium acremonium* and

Streptomyces clavuligerus. *J. Antibiot.* **43**: 1055-1057.

Ball, C. y McGonagle, M.P. (1978). Development and evaluation of a potency index screen for detecting mutants of *P. chrysogenum* having increased penicillin yield. *J. Appl. Bacteriol.* **45**: 67-74.

Banko, G., Wolfe, S. y Demain, A.L. (1986). Cell-free synthesis of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine, the first intermediate of penicillin and cephalosporin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**: 528-535.

Banko, G., Demain, A.L. y Wolfe, S. (1987). δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase (ACV synthetase): a multifunctional enzyme with broad substrate specificity for the synthesis of penicillins and cephalosporins precursors. *J. Am. Chem. Soc.* **109**: 2858-2860.

Barredo, J.L., Alvarez, E., Cantoral, J.M., Díez, B. y Martín, J.F. (1988). Glucokinase-deficient mutant of *Penicillium chrysogenum* is derepressed in glucose catabolite regulation of both β -galactosidase and penicillin biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 1061-1067.

Barredo, J.L., Díez, B., Alvarez, E. y Martín, J.F. (1989a). Large amplification of a 35-kb fragment carrying two penicillin biosynthetic genes in high producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* **16**: 453-459.

Barredo, J.L., Cantoral, J.M., Alvarez, E., Díez, B. y Martín, J.F. (1989b). Cloning, sequence analysis and transcriptional study of the isopenicillin N synthase of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 91-98.

Barredo, J.L., van Solingen, P., Díez, B., Alvarez, E., Cantoral, J.M., Kattvilder, A., Smaal, E.B., Groenen, M.A.M., Veenstra, A.E. y Martín, J.F. (1989c). Cloning and characterization of the acyl-coenzyme A-6-aminopenicillanic-acid-

- acyltransferase gene of *Penicillium chrysogenum*. *Gene* **83**: 291-300.
- Barredo, J.L.** (1990). Análisis de una región del genoma de *Penicillium chrysogenum* que contiene los genes *pcbC* y *penDE*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Barrios-González, J., Montenegro, E. y Martín, J.F.** (1993). Penicillin production by mutants resistant to phenylacetic acid. *J. Ferment. Bioeng.* **76**: 455-458.
- Beggs, J.D.** (1978). Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* **275**: 104.
- Bej, A. y Perlin, M.H.** (1991). Acquisition of mitochondrial DNA by a transformation vector for *Ustilago violacea*. *Gene* **98**: 135-140.
- Berdy, J.** (1980). Bleomycin type antibiotics. Handbook of antibiotic compounds, vol. IV (pp. 459-491). CRC Press, Boca Ratón, E.U.A.
- Beri, R.K. y Turner, G.** (1987). Transformation of *Penicillium chrysogenum* using the *Aspergillus nidulans amdS* gene as a dominant selective marker. *Curr. Genet.* **11**: 6390-6411.
- Brakhage, A.E., Browne, P., y Turner, G.** (1992). Regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis and penicillin biosynthetic genes *acvA* and *ipnA* by glucose. *J. Bacteriol.* **174**: 3789-3799.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brotzu, G.** (1948). Ricerche Su di un Nuovo Antibiotico. Lavori dell'istituto D'Igiene di Cagliari (pp. 1-11).
- Brückner, B., Unkles, S.E., Weltring, K. y Kinghorn, J.** (1992). Transformation of *Gibberella fujikuroi*: effect of the *Aspergillus nidulans* AMA1 sequence on frequency and integration. *Curr. Genet.* **22**: 313-316.
- Bruns, W., Hoppe, J., Tsai, H., Bruning, H.J., Maywald, F., Collins, J. y Mayer, H.** (1985). Structure of the penicillin acylase from *Escherichia coli*: a periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing. *J. Mol. Appl. Genet.* **3**: 36-44.
- Bullock, W.O., Fernández, J.M. y Short, J.M.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-379.
- Burr, K.W., Roper, J.A. y Relton, J.** (1982). Modification of chromosome instability in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2899-2907.
- Burton, H.S. y Abraham, E.P.** (1951). Isolation of antibiotics from a species of *Cephalosporium*. Cephalosporins P1, P2, P3, P4 and P5. *Biochem. J.* **50**: 164-174.
- Cantoral, J.M.** (1983). Obtención y caracterización de mutantes de *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255, bloqueados en la biosíntesis de penicilina. Tesina de Licenciatura. Universidad de León.
- Cantoral, J.M., Díez, B., Barredo, J.L., Alvarez, E. y Martín, J.F.** (1987). High frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Bio/Technology* **5**: 494-497.
- Cantoral, J.M., Barredo, J.L., Díez, B., Alvarez, E. y Martín, J.F.** (1988). Nucleotide sequence of the *Penicillium chrysogenum pyrG* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene. *Nucleic Acids Res.* **16**: 8177.

- Cantoral, J.M., Gutiérrez, S., Fierro, F., Gil-Espinosa, S., van Liempt, H. y Martín, J.F.** (1993). Biochemical characterization and molecular genetics of nine mutants of *Penicillium chrysogenum* impaired in penicillin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **268**: 737-744.
- Carlson, T.A. y Chelm, B.K.** (1986). Apparent eukaryotic origin of glutamine synthetase II from the bacteria *Bradyrhizobium japonicum*. *Nature* **322**: 568-570.
- Carr, L.G., Skatrud, P.L., Scheetz III, M.E., Queener, S.W. e Ingolia, T.D.** (1986). Cloning and expression of the isopenicillin N synthetase gene from *Penicillium chrysogenum*. *Gene* **48**: 257-266.
- Case, M.E.** (1982). Transformation of *Neurospora crassa* utilizing recombinant plasmid DNA. *Basic. Life Sci.* **19**: 87-100.
- Castro, J.M., Liras, P., Láiz, L., Cortés, J. y Martín, J.F.** (1988). Purification and characterization of the isopenicillin N synthase of *Streptomyces lactamdurans*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 133-141.
- Clarke, L. y Carbon, J.** (1976). A colony bank containing synthetic *ColE1* hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**: 91.
- Collins, C.M. y Hall, R.M.** (1985). Identification of a Tn5 determinant conferring resistance to phleomycine, bleomycine and tallysomyne. *Plasmid* **14**: 143-151.
- Cooper, T.G.** (1982). Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. En: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression (pp. 39-100). E.W. Jones y J. Broach, eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Coque, J.J.R., Martín, J.F., Calzada, J.G. y Liras, P.** (1991). The cephamycin biosynthetic genes *pcbAB*, encoding a large multidomain peptide synthetase, and *pcbC* of *Nocardia lactamdurans* are clustered together in an organization different from the same genes in *Acremonium chrysogenum* and *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1125-113.
- Cortés, J., Martín, J.F., Castro, J.M., Láiz, L. y Liras, P.** (1987). Purification and characterization of a 2-oxoglutarate linked ATP independent deacetoxycephalosporin C synthase of *S. lactamdurans*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3165-3174.
- Cove, D.J.** (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **113**: 51-56.
- Clutterbuck, P.W., Lovell, R. y Raistrick, H.** (1932). Studies in the biochemistry of microorganisms. The formation of glucose by members of the *Penicillium chrysogenum* series of a pigment, an alkalisoluble protein and penicillin (the antibacterial substance of Fleming). *Biochem. J.* **26**: 1907-1918.
- Crawford, L., Stepan, A.M., McAda, P.C., Rambossek, J.A., Conder, M.J., Vinci, V.A. y Reeves, C.D.** (1995). Production of cephalosporin intermediates by feeding adipic acid to recombinant *Penicillium chrysogenum* strains expressing ring expansion activity. *Bio/Technology* **13**: 58-62.
- CHang, L.T. y Elander, R.P.** (1979). Rational selection for improved cephalosporin C productivity in strains of *Acremonium chrysogenum* Gams. *Devel. Ind. Microbiol.* **20**: 367-379.
- Chapman, J.L., Skatrud, P.L., Ingolia, T.D., Samson, S.M., Kaster, K.R. y Queener, S.W.** (1987). Recombinant DNA studies in

- Cephalosporium acremonium*. *Devel. Ind. Microbiol.* **27**: 165-174.
- Chen, M., Anne, J., Volckaert, G., Huysmans, E., Vanderberghe, A. y De Wachter, R.** (1984). The nucleotide sequence of the 5S rRNA of seven molds and a yeast and their use in studying ascomycete phylogeny. *Nucleic Acids Res.* **12**: 4881-4892.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- Chu, Y.W., Renno, D. y Saunders, G.** (1995). Detection of a protein with binds specifically to the upstream region of the *pcbAB* gene in *P. chrysogenum*. *Curr. Genet.* **27**: 184-189.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. y Miller, R.H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 2172-2175.
- Daumy, G.O., Williams, J.A., McCool, A.S., Zuzel, T.J. y Danley, D.** (1986). Expression and regulation of the penicillin G acylase gene from *Proteus rettgeri* cloned in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**: 431-433.
- Davis, C.B., Smith, K.E., Campbell, B.N. y Hammer, G.G.** (1990). The ATP binding site of the yeast plasma membrane proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **265**: 1300-1305.
- Delderfield, J.S., Mtetwa, E., Thomas, R. y Tyobeka, T.E.** (1981). Partial elimination of valine-oxygen during penicillin biosynthesis. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, p. 650.
- de Hoop, M.J. y Ab, G.** (1992). Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. *Biochem J.* **286**: 657-669.
- de Hoop, M.J., Valkema, R., Kienhuis, C.B.M.; Hoyer, M. y Ab, G.** (1992). The peroxisomal import signal of amine oxidase from the yeast *Hansenula polymorpha* is not universal. *Yeast* **8**: 243-252.
- Demain, A.L.** (1957). Inhibition of penicillin formation by lysine. *Arch. Biochem. Biophys.* **67**: 244-245.
- Demain, A.L. y Masurekar, P.S.** (1974). Lysine inhibition of *in vivo* homocitrate synthesis in *P. chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.* **82**: 143-151.
- Demain, A.L.** (1983). Biosynthesis of β -lactam antibiotics. En: Antibiotics Containig the β -lactam Structure (pp. 189-228). A.L. Demain y N.A. Solomon, eds. Springer-Verlag, Berlín.
- DeModena, J.A., Gutiérrez, S., Velasco, J., Fernández, F.J., Fachini, R.A., Galazzo, J.L., Hughes, D.E. y Martín, J.F.** (1993). The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology* **11**: 926-929.
- Díez, B., Alvarez, E., Cantoral, J.M., Barredo, J.L. y Martín, J.F.** (1987). Selection and characterization of *pyrG* mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase and complementation by the *pyr4* gene of *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* **12**: 277-282.
- Díez, B., Barredo, J.L., Alvarez, E., Cantoral, J.M., van Solingen, P., Groenen, M.A.M., Veenstra, A.E. y Martín, J.F.** (1989). Two genes involved in penicillin biosynthesis are linked in a 5.1 kb *Sall* fragment in the genome of *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 572-576.
- Díez, B., Gutiérrez, S., Barredo, J.L., van Solingen, P., van der Voort, L.H.M. y Martín, J.F.** (1990). The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the

- pcbAB* gene encoding the α -aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. *J. Biol. Chem.* **265**: 16358-16365.
- Distel B., Gould S.J., Voorn-Brouwer T., van der Berg M., Tabak H.F. y Subramani S.** (1992) The carboxyl-terminal tripeptide serine-lysine-leucine of firefly luciferase is necessary but not sufficient for peroxisomal import in yeast. *New Biol.* **4**: 157-165.
- Ditchburn, P., Giddings, B. y MacDonald, K.D.** (1974). Rapid screening for the isolation of mutants of *Aspergillus nidulans* with increased penicillin yields. *J. Appl. Bacteriol.* **37**: 515-523.
- Doran, J.L., Leskiw, B.K., Petrich, A.K., Westlake, D.W.S. y Jensen, S.E.** (1991). Production of *Streptomyces clavuligerus* isopenicillin N synthase in *Escherichia coli* using two-cistron expression systems. *J. Ind. Microbiol.* **5**: 197-206.
- Dotzlaf, J.E. y Yeh, W.-K.** (1987). Copurification and characterization of deacetoxycephalosporin C synthetase/hydroxylase from *Cephalosporium acremonium*. *J. Bacteriol.* **169**: 1611-1618.
- Dowzer, C.E.A. y Kelly, J.M.** (1989). Cloning of the *creA* gene of *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. *Curr. Genet.* **15**: 457-459.
- Dowzer, C.E.A. y Kelly, J.M.** (1991). Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5701-5709.
- Drocourt, D., Camels, T., Reynes, J.P., Baron, M. y Tiraby, G.** (1990). Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes. *Nucl. Acids Res.* **18**: 4009.
- Dulaney, E.L. y Dulaney, D.D.** (1967). Mutant populations of *Streptomyces viridifaciens*. *T. N. Y. Acad. Sci.* **29**: 782-799.
- Elander, R.P. y Aoki, H.** (1982). β -lactam-producing microorganisms: Their biology and fermentation behavior. En: Chemistry and Biology of β -lactam Antibiotics, Vol III (pp. 84-183). R.B. Morin and M. Gorman, eds. Academic Press, Nueva York.
- Enriquez, L. y Pisano, M.A.** (1979). Isolation and nature of intracellular alpha-aminoadipic acid-containing peptides from *Paecilomyces persicinus* P-10. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**: 392-397.
- Entian, K.-D., Kopetzki, E., Fröhlich, K.-U. y Mecke, D.** (1984). Cloning of hexokinase isoenzyme PI from *Saccharomyces cerevisiae*: PI transformants confirm the unique role of hexokinase isoenzyme PII for glucose repression in yeasts. *Mol. Gen. Genet.* **198**: 50-54.
- Eriksen, S.H., Jensen, B., Schneider, Y., Kaasgaard, S. y Olsen, J.** (1995). Uptake of phenoxyacetic acid by *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 945-950.
- Esmahan, C., Alvarez, E., Montenegro, E. y Martín, J.F.** (1994). Catabolism of lysine in *Penicillium chrysogenum* leads to formation of 2-aminoadipic acid, a precursor of penicillin biosynthesis. *Appl. Environm. Microbiol.* **60**: 1705-1710.
- Espeso, E.A. y Peñalva, M.A.** (1992). Carbon catabolite repression can account for the temporal pattern of expression of a penicillin structural gene in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **6**: 1457-1465.

- Espeso, E.A., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr. y Peñalva, M.A.** (1993). pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12**: 3947-3956.
- Espeso, E.A. y Peñalva, M.A.** (1994). In vitro binding of the two-finger repressor CreA to several consensus and non-consensus sites at the *ipnA* upstream region is context dependent. *FEBS Lett.* **342**: 43-48.
- Fawcett, P.A. y Abraham, E.P.** (1975). δ -(L- α -aminoadipyl)cysteinyl valine synthetase. *Method. Enzymol.* **42**: 471.
- Fawcett, P.A., Usher, J.J., Huddleston, J.A., Bleaney, R.C., Nisbet, J.J y Abraham, E.P.** (1976). Synthesis of δ -(L- α -aminoadipyl)-cysteinyl-valine and its role in penicillin biosynthesis. *Biochem J.* **157**: 651-660.
- Feng, B., Friedlin, E., Marzluf, G.A.** (1994). A reporter gene analysis of penicillin biosynthesis gene expression in *Penicillium chrysogenum* and its regulation by nitrogen and glucose catabolite repression. *Appl. Environm. Microbiol.* **60**: 4432-4439.
- Feng, B., Friedlin, E., Marzluf, G.A.** (1995). Nuclear DNA-binding proteins with recognize the intergenic control region of penicillin biosynthetic gene. *Curr. Genet.* **27**: 351-358.
- Fernández, F.J., Gutiérrez, S., Velasco, J., Montenegro, E., Marcos, A.T. y Martín, J.F.** (1994). Molecular characterization of three loss-of-function mutations in the isopenicillin N-acyltransferase gene (*penDE*) of *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* **176**: 4941-4948.
- Fernández-Cañón, J.M., Reglero, A., Martínez-Blanco, H. y Luengo, J.M.** (1989a). Uptake of phenylacetic acid by *Penicillium chrysogenum* WIS 54-1255: A critical regulatory point in benzylpenicillin biosynthesis. *J. Antibiot.* **42**: 1398-1409.
- Fernández-Cañón, J.M., Reglero, A., Martínez-Blanco, H., Ferrero, M.A. y Luengo, J.M.** (1989b). Phenylacetic acid transport system in *Penicillium chrysogenum* WIS 54-1255: Molecular specificity of its induction. *J. Antibiot.* **42**: 1410-1415.
- Fernández-Cañón y Peñalva, M.A.** (1995). Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 110-118.
- Ferrero, M.A., Reglero, A., Martínez-Blanco, H., Fernández-Valverde, M. y Luengo, J.M.** (1991). In vitro enzymatic synthesis of new penicillins containing keto acids as side chains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1931-1932.
- Fierro, F., Gutiérrez, S., Díez, B. y Martín, J.F.** (1993). Resolution of four large chromosomes in penicillin-producing filamentous fungi: the penicillin gene cluster is located on chromosome II (9.6 mb) in *Penicillium notatum* and chromosome I (10.4 mb) in *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 573-579.
- Fierro, F., Barredo, J.L., Díez, B., Gutiérrez, S., Fernández, F.J. y Martín, J.F.** (1995). The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6200-6204.
- Fierro, F.** (1996). Localización cromosomal y estudio de la región genómica amplificada que contiene los genes biosintéticos de penicilina en *Penicillium chrysogenum*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Fierro, F., Montenegro, E., Gutiérrez, S., y Martín, J.F.** (1996a). Mutants blocked in penicillin biosynthesis show a deletion of the entire penicillin gene cluster at a specific site within a conserved

- hexanucleotide sequence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 597-604.
- Fierro, F., Kosalková, K., Gutiérrez, S., y Martín, J.F.** (1996b). Autonomously replicating plasmids carrying the *AMA1* region in *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* **29**: 482-489.
- Fincham, J.R.S.** (1989). Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.* **53**: 148-170.
- Fleming, A.** (1929). On the antibacterial action of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Pathol.* **10**: 226-236.
- Florey, H.M., Abraham, E.P., Newton, G.G.F., Burton, H.S., Kelly, B.K., Hale, C.W. y Miller, G.A.** (1956). Improvements relating to the production of an antibiotic substance by a *Cephalosporium* species. Patente británica 745.208.
- Fogel, S. y Welch, J.W.** (1982). Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 5342-5346.
- Fredericksen, R.B. y Emborg, C.** (1984). Conversion of cephalosporin C into 7-phenoxyacetamido-cephalosporanic acid by acyltransferase of mutants of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Lett.* **6**: 549-554.
- Friedrich, C.G. y Demain, A.L.** (1977). Homocitrate synthase as the crucial site of the lysine effect on penicillin biosynthesis. *J. Antibiot.* **30**: 760-761.
- Friedrich, C.G. y Demain, A.L.** (1978). Uptake and metabolism of α -amino adipate by *Penicillium chrysogenum*. *Arch. Microbiol.* **119**: 43-47.
- Frischauf, A., Lehrach, H., Poustka, A. y Murray, N.** (1984). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**: 827-842.
- Fujisawa, Y., Shirafuji, H., Kida, M., Nara, K., Yoneda, M. y Kanzaki, T.** (1973). New findings on cephalosporin C biosynthesis. *Nature New Biol.* **246**: 154-155.
- Fujisawa, Y., Shirafuji, H., Kida, M., Nara, K., Yoneda, M. y Kanzaki, T.** (1975). Accumulation of deacetylcephalosporin C by cephalosporin C negative mutants of *Cephalosporium acremonium*. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 1295-1301.
- García-Domínguez, M., Liras, P. y Martín, J.F.** (1991). Cloning and characterization of the isopenicillin N synthase gene of *Streptomyces griseus* NRRL 3851 and studies of expression and complementation of the cephamycin pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 44-52.
- Gatignol, A., Baron, M. y Tiraby, G.** (1987). Phleomycin resistance encoded by the *ble* gene from transposon Tn5 as a dominant selectable marker in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **207**: 342-348.
- Gems, D., Johnston, I.L. y Clutterbuck, A.J.** (1991). An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* **98**: 61-67.
- Genilloud, O., Garrido, M.C. y Moreno, F.** (1984). The transposon Tn5 carries a bleomycin-resistance determinant. *Gene* **32**: 225-233.
- Godfrey, O.W.** (1973). Isolation of regulatory mutants of the aspartic and pyruvic acid families and their effect on antibiotic production in *Streptomyces lipmanii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**: 73-79.
- Gómez-Pardo, E. y Peñalva, M.A.** (1990). The upstream region of the IPNS gene determines

expression during secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **89**: 109-115.

Goosen, T., Bos, C.J. y van den Broek, H.W.J. (1990). Transformation and gene manipulation in filamentous fungi: An overview. En: Handbook of Applied Mycology. Fungal Biotechnology, Vol. 4 D.K. Arora, K.G. Mukerji y R.P. Elander, eds. Marcel Dekker, Nueva York.

Gould S.G., Keller G.A. y Subramani S. (1987) Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J. Cell Biol.* **105**: 2923-2931.

Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J. y Subramani, S. (1989). A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J. Cell. Biol.* **108**: 1657-1664.

Greener, A. (1990). E. coli SURE™ strain: clone "unclonable" DNA. *Strategies* **3**: 5-6.

Gutiérrez, S. (1988). Manipulación genética de hongos productores de antibióticos β-lactámicos. Tesina de Licenciatura. Universidad de León.

Gutiérrez, S., Díez, B., Montenegro, E. y Martín, J.F. (1991a). Characterization of the *Cephalosporium acremonium* *pcbAB* gene encoding α-aminoadipyl-cysteiny-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. *J. Bacteriol.* **173**: 2354-2365.

Gutiérrez, S., Díez, B., Alvarez, E., Barredo, J.L. y Martín, J.F. (1991b). Expression of the *penDE* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding isopenicillin N acyltransferase in *Cephalosporium acremonium*: production of benzylpenicillin by the transformants. *Mol. Gen. Genet.* **225**: 56-64.

Gutiérrez, S., Velasco, J., Fernández, F.J. y Martín, J.F. (1992). The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF*

gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase. *J. Bacteriol.* **174**: 3056-3064.

Gutiérrez, S. (1994). Caracterización de los genes *pcbAB* y *cefG* y análisis de las regiones del genoma de *Acremonium chrysogenum* que contienen los genes *pcbC* y *cefEF* implicados en la biosíntesis de cefalosporina C. Tesis Doctoral. Universidad de León.

Gutiérrez, S., Velasco, J., Marcos, A.T., Fernández, F.J., Fierro, F., Barredo, J.L., Díez, B. y Martín, J.F. (1997) Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum* as shown by promoter replacement studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, en prensa.

Gwynne, D.I., Miller, B.L., Miller, K.Y. y Timberlake, W.E. (1984). Structure and regulated expression of the *SpoC1* gene cluster from *Aspergillus nidulans*. *J. Mol. Biol.* **180**: 91-109.

Haas, H. y Marzluf, G.A. (1995). NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum*, binds specifically to elements in the intergenic promoter region of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters. *Curr. Genet.* **28**: 177-183.

Haas, H., Bauer, B., Redl, B., Stöffler, G. y Marzluf, G.A. (1995). Molecular cloning and analysis of *nre*, the major nitrogen regulatory gene of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* **27**: 150-158.

Hamlyn, P.F. y Ball, C. (1979). Recombination studies with *Cephalosporium acremonium*. En: Genetics of Industrial Microorganisms (pp. 185-191). O.K. Sebek y A.L. Laskin, eds. American Society for Microbiology, Washington D.C.

- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. En: DNA cloning: a practical approach (pp. 109-135). D.M. Glover, ed. IRL Press, Oxford.
- Hare, R.** (1982). New light on the history of penicillin. *Med. Hist.* **26**: 1-24.
- Heinemann, J.A. y Sprague, G.F., Jr.** (1989). Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* **340**: 205-209.
- Henikoff, S.** (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**: 351-359.
- Hersbach, G.J.M., van der Beek, C.P. y van Dijk, P.W.M.** (1984). The Penicillins: Properties, Biosynthesis and Fermentation. Biotechnology of Industrial Antibiotics (pp. 45-140). Vandamme, ed. Marcel Dekker Inc., Nueva York y Basilea.
- Hertzberg, R.P., Caranfa, M.J. y Hecht S.M.** (1985). DNA methylation diminishes bleomycin-mediated strand scission. *Biochem.* **24**: 5285-5289.
- Hinnen A., Hicks J.B., Fink G.R.** (1978). Transformation of yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 1929-1933.
- Hodgkin, D.C. y Maslen, E.N.** (1961). The X-ray analysis of the structure of cephalosporin C. *Biochem. J.* **79**: 393-402.
- Hohn, B. y Murray, K.** (1977). Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles in vitro. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 3259-3263.
- Hollander, I.J., Shen, Y.-Q., Heim, J. y Demain, A.L.** (1984). A pure enzyme catalyzing penicillin biosynthesis. *Science* **224**: 610-612.
- Holmes, D.S. y Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- Hönlinger, C y Kubicek, C.P.** (1989). Regulation of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine and isopenicillin N biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* by the α -aminoadipate pool size. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**: 71-76.
- Hughes, K., Case, M.E., Geever, R., Vapnek, D. y Giles, N.H.** (1983). A chimeric plasmid that replicates autonomously in both *Escherichia coli* and *Neurospora crassa*. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 1053-1057.
- Hull, E.P., Green, P.M., Arst, H.N. y Scazzocchio, C.** (1989). Cloning and physical characterization of the L-proline catabolism gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **3**: 553-559.
- Ichikawa, T., Date, M., Ishikura, T., y Ozaki, A.** (1971). Improvement of kasugamycin producing strain by the agar piece method and the prototrophy method. *Folia Microbiol.* **16**: 218-224.
- Imshenetskii, A.A. y Kondrateva T.F.** (1977). Frequency of arisal of nystatin resistant mutants in polyploid strains of *Candida scottii*. *Mikrobiologiya* **46**: 71-74.
- Isogai, T., Fukagawa, M., Aramori, I., Iwami, M., Kojo, H., Ono, T., Ueda, Y., Kohsaka, M. e Imanaka, H.** (1991). Construction of a 7-aminocephalosporanic acid (7ACA) biosynthetic operon and direct production of 7ACA in *Acremonium chrysogenum*. *Bio/Technology* **9**: 88-191.

- Jaklitsch, W.M., Hampel, W., Röhr, M. y Kubicek, C.P.** (1986). α -Amino adipate pool concentration and penicillin biosynthesis in strains of *Penicillium chrysogenum*. *Can. J. Microbiol.* **32**: 473-480.
- Jaklitsch, W.M., Röhr, M. y Kubicek, C.P.** (1987). Lysine biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*: regulation by general amino acid control and absence of lysine repression. *Exp. Mycol.* **11**: 141-149.
- Jaklitsch, W.M. y Kubicek, C.P.** (1990). Homocitrate synthase from *Penicillium chrysogenum*. Localization, purification of the cytosolic isoenzyme, and sensitivity to lysine. *Biochem. J.* **269**: 247-253.
- Jayatilake, G.S., Huddleston, J.A. y Abraham, E.P.** (1981). Conversion of isopenicillin N into penicillin N in cell-free extracts of *Cephalosporium acremonium*. *Biochem. J.* **194**: 645-648.
- Jensen, S.E., Westlake, D.W.S. y Wolfe, S.** (1982). Cyclization of δ -(L- α -amino adipyl)-L-cysteiny-D-valine to penicillin by cell-free extracts of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Antibiot.* **35**: 483-490.
- Jensen, S.E., Westlake, D.W.S. y Wolfe, S.** (1985). Deacetoxycephalosporin C synthetase and deacetoxycephalosporin C hydroxylase are two separate enzymes in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Antibiot.* **38**: 263-265.
- Jensen, S.E.** (1986). Biosynthesis of cephalosporins. *Crit. Rev. Biotechnol.* **3**: 277-310.
- Jensen, S.E., Leskiw, B.K., Vining, L.C., Aharonowitz, Y., Westlake, D.W.S. y Wolfe, S.** (1986). Purification of isopenicillin N synthetase from *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.* **32**: 953-958.
- Kennedy, J. y Turner, G.** (1996). δ -(L- α -amino adipyl)-L-cysteiny-D-valine synthetase is a rate limiting enzyme for penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **253**: 189-197.
- Kleinkauf, H. y von Döhren, H.** (1990). Non-ribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur. J. Biochem.* **192**: 1-15.
- Konomi, T., Herchen, S., Baldwin, J.E., Yoshida, M., Hunt, N.A. y Demain, A.L.** (1979). Cell-free conversion of δ -(L- α -amino adipyl)-L-cysteiny-D-valine to an antibiotic with properties of isopenicillin N in *Cephalosporium acremonium*. *Biochem. J.* **184**: 427-430.
- Kudla, B., Caddick, M.X., Langdon, T., Martínez-Rossi, N.M., Bennet, C.F., Sibley, S., Davies, R.W. y Arst, H.N., Jr.** (1990). The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBO J.* **9**: 1355-1364.
- Kuenzi, M.T.** (1988). Regulation of the cephalosporin synthesis in *Cephalosporium acremonium* by phosphate and glucose. *Arch. Microbiol.* **128**: 78-81.
- Künkel, W., Berger, D., Risch, S. y Wittmann-Bresinsky B.** (1992). Genetic instability of industrial strains of *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 499-502.
- Kurylowick, W., Kurzatkowski, W. y Kurzatkowski, J.** (1987). Biosynthesis of benzylpenicillin by *Penicillium chrysogenum* and its Golgi apparatus. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **35**: 699-724.

- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Landan, G., Cohen, G., Aharonowitz, Y., Suhali, Y., Graur, D., y Schiffman, D.** (1990). Evolution of isopenicillin N synthase genes may have involved horizontal gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* **7**: 399-406.
- Lein, J.** (1986). The Panlabs penicillin strain improvement program. En: Overproduction of Microbial Metabolites (pp. 105-139). Z. Vanek y Z. Hostalek., eds. Butterworths, Boston.
- Leskiw, B.K., Aharonowitz, Y., Mevarech, M., Wolfe, S., Vining, L.C., Westlake, D.W.S. y Jensen, S.E.** (1988). Cloning and nucleotide sequence determination of the isopenicillin N synthetase gene from *Streptomyces clavuligerus*. *Gene* **62**: 187-196.
- Liggett, R.W. y Koffler, H.** (1948). Corn steep liquor in microbiology. *Bacteriol. Rev.* **12**:297-311.
- Litzka, O., Bergh, K.T. y Brakhage, A.A.** (1995). Analysis of the regulation of the *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis gene *aat* (*penDE*), which encodes acyl coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase. *Mol. Gen. Genet.* **249**: 557-569.
- Litzka, O., Then Bergh, K. y Brakhage, A.A.** (1996). The *Aspergillus nidulans* penicillin-biosynthesis gene *aat* (*penDE*) is controlled by a CCAAT-containing DNA element. *Eur. J. Biochem.* **238**: 675-682.
- Lode, H., Janish, P., Kupper, G. y Weuta, H.** (1974). Comparative clinical pharmacology of three ampicillins and amoxicillin administered orally. *J. Infect. Dis.* **129** (supl.): S156-S169.
- López-Nieto, M.J., García-Acha, I. y Martín, J.F.** (1981). Penicillin production by recombinant strains of *Penicillium chrysogenum* obtained by fusion of protoplasts. En: Advances in Biotechnology. Fermentation Products, Vol. 3 (pp. 51-57). C. Vezina y K. Singh, eds. Pergamon Press, Nueva York.
- López-Nieto, M.J., Ramos, F.R., Luengo, J.M. y Martín, J.F.** (1985). Characterization of the biosynthesis in vivo of α -aminoadipyl-L-cysteinyl-D-valine in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 343-351.
- Lu, Y., Mach, R.L., Affenzeller, K. y Kubicek, C.** (1991). Regulation of α -aminoadipate reductase from *Penicillium chrysogenum* in relation to the flux from α -aminoadipate into penicillin biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* **38**: 758-763.
- Luengo, J.M., Revilla, G., López, M.J., Villanueva J.R. y Martín, J.F.** (1977). Penicillin production by mutants of *Penicillium chrysogenum* Wis. 54-1255 resistant to polyene-macrolide antibiotics. *Biotechnol. Lett.* **1**: 233-238.
- Luengo, J.M., Revilla, G., Villanueva, J.R. y Martín, J.F.** (1979). Lysine regulation of penicillin biosynthesis in low-producing and industrial strains of *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.* **115**: 207-211.
- Luengo, J.M., Revilla, G., López, M.J., Villanueva, J.R. y Martín, J.F.** (1980). Inhibition and repression of homocitrate synthase by lysine in *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* **144**: 869-876.
- Luengo, J.M., Iriso, J.L. y López-Nieto, M.J.** (1986). Direct evaluation of phenylacetyl-CoA:6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *Penicillium chrysogenum* by bioassay. *J. Antibiot.* **39**: 1565-1573.

Luengo, J.M. (1989). Recent advances in the enzymatic synthesis of penicillins. En: Bioactive Metabolites from Microorganisms. Progress in Industrial Microbiology, Vol. 27 (pp. 315-332). M.E. Bushell y N. Gräfe, eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Luengo, J.M. y Peñalva, M.A. (1993). Penicillin biosynthesis. En: "Aspergillus: 50 years on". Progress in Industrial Microbiology, Vol. 29 (pp. 603-638). S.D. Martinelli y J.R. Kinghorn, eds. Elsevier, Amsterdam.

MacCabe, A., Riach, M., Unkles, S., y Kinghorn, J. (1990). The *Aspergillus nidulans* *npeA* locus consists of three contiguous genes required for penicillin biosynthesis. *EMBO J.* **9**: 279-287.

MacCabe, A., van Liempt, H., Palissa, H., Unkles S.E., Riach M.B., Pfeifer E., von Döhren H. y Kinghorn J.R. (1991). δ -(L- α -Amino-adipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **256**: 12646-12654.

Mahro, B. y Demain, A.L. (1987). In vivo conversion of penicillin N into a cephalosporin type antibiotic by a non-producing mutant of *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 272-275.

Makins, J.F., Holt, G. y Macdonald, K.D. (1980). Co-synthesis of penicillin following treatment of mutants of *Aspergillus nidulans* impaired in antibiotic production with lytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* **119**: 397-404.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Martín, J.F., Revilla, G., Zanca, D.M. y López-Nieto, M.J. (1982). Carbon catabolite regulation of penicillin and cephalosporin biosynthesis. En: Trends in Antibiotic Research (pp. 256-268). H. Umezawa, A.L. Demain, T. Hata y C.R. Hutchinson, eds. Japanese Antibiotics Research Association, Tokio.

Martín, J.F. y Aharonowitz, Y. (1983). Regulation of biosynthesis of β -lactam antibiotics. En: Antibiotics Containig the β -lactam Structure I (pp. 229-254). A.L. Demain y N.A. Solomon, eds. Springer-Verlag, Berlín.

Martín, J.F., Díez, B., Alvarez, E., Barredo, J.L. y Cantoral, M.J. (1987). Development of a transformation system in *Penicillium chrysogenum*: Cloning of genes involved in penicillin biosynthesis. En: Genetic of industrial microorganisms (pp. 297-304). M. Alacevic, D. Hraneli y Z. Toman, eds. Pliva, Zagreb.

Martín, J.F. y Liras, P. (1989a). Enzymes involved in penicillin, cephalosporin and cephamycin biosynthesis. En: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 39 (pp. 153-187). A. Fiechter, ed. Springer-Verlag, Berlín.

Martín, J.F. y Liras, P. (1989b). Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 173-206.

Martín, J.F., Ingolia, T.D. y Queener, S.W. (1991). Molecular genetics of penicillin and cephalosporin antibiotic biosynthesis. En: Molecular Industrial Mycology: Systems and Applications for Filamentous Fungi (pp. 149-196). S.A. Leong y R.M. Berka, eds. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.

Martín, J.F. y Gutiérrez, S. (1992). Molecular genetics of fungal secondary metabolites. En: Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi

- (pp. 214-252). J.R. Kinghorn y G. Turner, eds. Blackie and Son Ltd; Glasgow, Reino Unido.
- Martín-Villacorta, J., Reglero, A. y Luengo, J.M.** (1989). Acyl-CoA: 6-APA acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. Studies on substrate specificity using phenylacetyl-CoA variants. *J. Antibiot.* **42**: 1502-1505.
- Martín-Villacorta, J., Reglero, A. y Luengo, J.M.** (1990). Aliphatic molecules (C-6 to C-8) containing double or triple bonds as potential penicillin side chain precursors. *J. Antibiot.* **43**: 1559-1563.
- Martín-Villacorta, J., Reglero, A. y Luengo, J.M.** (1991a). Acyl CoA: 6-APA acyltransferase from *Penicillium chrysogenum*. Studies on its hydrolytic activity. *J. Antibiot.* **44**: 108-110.
- Martín-Villacorta, J., Reglero, A. y Luengo, J.M.** (1991b). Biosynthesis of methoxy benzylpenicillins. *Biotechnol. Forum Europe* **8**: 60-62.
- Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Ferrero, M.A., Fernández-Cañón, J.M. y Luengo, J.M.** (1989). Repression of phenylacetic acid transport system in *Penicillium chrysogenum* WIS 54-1255 by free amino acids and ammonium salts. *J. Antibiot.* **42**: 1416-1423.
- Martínez-Blanco, H., Reglero, A. y Luengo, J.M.** (1991). In vitro synthesis of different naturally-occurring semisynthetic and synthetic penicillins using a new and effective enzymatic coupled system. *J. Antibiot.* **44**: 1252-1258.
- Matsuda, A. y Komatsu, K.-I.** (1985). Molecular cloning and structure of the gene for 7 β -(4-carboxybutanamido)cephalosporanic acid acylase from a *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* **163**: 1222-1228.
- Matsuda, A., Matsuyama, K.-I., Yamamoto, K., Ichikawa, S. y Komatsu, K.** (1987a). Cloning and characterization of the gene for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* **169**: 5815-5820.
- Matsuda, A., Toma, K. y Komatsu, K.** (1987b). Nucleotide sequences of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* **169**: 5821-5826.
- Mckenzie, T., Hoshino, T., Tanaka, T. y Sueoka, N.** (1986). The nucleotide sequence of pUB110; some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* **15**: 93-103.
- Mellon, F.M., Peberdy, J.F. y Macdonald K.D.** (1983). Hybridisation of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium baarnense* by protoplasts fusion: genetic and biochemical analysis. En: Protoplasts 1983: Lecture Proceedings (pp. 310-311). I. Potrykus, C.T. Harms, A. Hinner, R. Hutter, P.J. King y R.D. Shillito, eds. Birkhauser Verlag, Basilea, Stuttgart and Nueva York.
- Miller, B.L., Miller, K.Y., Roberti, K.A. y Timberlake, W.E.** (1987). Position-dependent and independent mechanisms regulate cell-specific expression of the *SpoC1* gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 427-434.
- Miller, J.H.** (1972). Experiments in Molecular Genetics (pp. 352-355). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Montenegro, E., Barredo, J.L., Gutiérrez, S., Diez, B., Alvarez, E. y Martín, J.F.** (1990). Cloning, characterization of the acyl-CoA:6-amino penicillanic acid acyltransferase gene of *Aspergillus nidulans* and linkage to the isopenicillin N synthase gene. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 322-330.
- Montenegro, E., Fierro, F., Fernández, F.J., Gutiérrez, S. y Martín J.F.** (1992). Resolution of chromosomes III and VI of *Aspergillus nidulans* by pulsed-field gel electrophoresis shows that the penicillin pathway genes *pcbAB*, *pcbC* and *penDE*

are clustered on chromosome VI (3.0 megabases). *J. Bacteriol.* **174**: 7063-7067.

Montenegro, E. (1996). Caracterización del gen *penDE* de *Aspergillus nidulans*, y su producto génico, isopenicilina N aciltransferasa. Tesis Doctoral. Universidad de León.

Müller, W.H., van der Krift, T.P., Kronwer, A.J.J., Wösten, H.A.B., van der Voort, L.H.M., Smaal, E.B. y Verkleij, A.J. (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.* **10**: 489-495.

Müller, W.H., Bovenberg, R.A.L., Groothuis, M.H., Kattevilder, F., Smaal E.B. y Verkleij, A.J. (1992). Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis. *Biochim. Biophys Acta* **1116**: 210-213.

Mullis, K.B. y Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. En: *Methods in Enzymology* Vol. **155** (pp. 335-350). R. Wu, ed. Academic Press, San Diego, E.U.A.

Nagarajan, R., Boeck, L.D., Gorman, M., Hamill, R.C., Higgins, C.E., Hoehn, M.M., Stark, W.M. y Whitney, J.G. (1971). β -lactam antibiotics from *Streptomyces*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**: 2308-2310.

Newmeyer, D y Galeazzi, D.R. (1977). The instability of *Neurospora crassa* duplication *Dp(IL \rightarrow IR) H4250* and its genetic control. *Genetics* **85**: 461-487.

Newton, G.G.F. y Abraham, E.P. (1954). Degradation, structure and some derivatives of cephalosporin N. *Biochem. J.* **58**: 103-111.

Newton, G.G.F. y Abraham, E.P. (1956). Isolation of cephalosporin C, a penicillin-like antibiotic containing D- α -amino adipic acid. *Biochem. J.* **62**: 651-658.

Normansell, P.J.M., Normansell, I.D. y Holt, G. (1979). Genetic and biochemical studies of mutants of *Penicillium chrysogenum* impaired in penicillin production. *J. Gen. Microbiol.* **112**: 113-126.

Nuesch, J., Hinnen, A., Liersch, M. y Treichler, J.H. (1976). A biochemical and genetical approach to the biosynthesis of cephalosporin C. Second Int. Symp. Genet. Ind. Microorganisms (pp. 451-472). K.D. MacDonald, ed. Academic Press, Londres.

Oda T., Funai T. e Ichiyama A. (1990). Generation from a single gene of two mRNAs that encode the mitochondrial and peroxisomal serine:pyruvate aminotransferase of rat liver. *J. Biol. Chem.* **265**: 7513-7519.

Palissa, H., von Döhren, H., Kleinkauf, H., Tingand, H.H. y Baldwin, J.E. (1989). β -Lactam biosynthesis in a Gram-negative eubacterium: purification and characterization of isopenicillin N synthase from *Flavobacterium* sp. strain SC 12154. *J. Bacteriol.* **171**: 5720-5728.

Pang, C.-P., Chakravarti, B., Adlington, R.M., Ting, H.-H., White, R.L., Jayatilake, G.S., Baldwin, J.E. y Abraham, E.P. (1984). Purification of isopenicillin N synthetase. *Biochem. J.* **222**: 789-795.

Parag, Y. y Roper, J.A. (1975). Genetic control of instability in *Aspergillus nidulans* as a means for gene amplification in eukaryotic microorganisms. *Mol. Gen. Genet.* **140**: 275-287.

Peng, M., Singh, N.K. y Lemke, P.A. (1992). Recovery of recombinant plasmids from *Pleurotus ostreatus* transformants. *Curr. Genet.* **22**: 53-59.

Peng, M., Lemke, P.A. y Singh, N.K. (1993). A nucleotide sequence involved in replicative transformation of a filamentous fungus. *Curr. Genet.* **24**: 114-121.

- Peñalva, M.A., Touriño, A., Patiño, C., Sánchez, F., Fernández Sousa, J.M. y Rubio, V.** (1985). Studies on transformation of *Cephalosporium acremonium*. En: Molecular Genetics of Filamentous Fungi (p. 59). W.E. Timberlake, ed. Alan R. Liss, Nueva York.
- Peñalva, M.A., Vian, A., Patiño, C., Pérez-Aranda, A. y Ramón, D.** (1989). Molecular biology of penicillin production in *Aspergillus nidulans*. En: Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms (pp. 256-262). C.L. Hershberger, S.W. Queener y G. Hegeman, eds. Am. Soc. Microbiol., Washington D.C.
- Peñalva, M.A., Moya, A., Dopazo, J. y Ramón, D.** (1990). Sequences of isopenicillin N synthetase genes suggest horizontal gene transfer from prokaryotes to eukaryotes. *P. R. Soc. London B* **241**: 164-169.
- Peñalva, M.A., Espeso, E., Orejas, M. y Gómez-Pardo, E.** (1991a). Evolution and control of gene expression of the *Aspergillus nidulans* isopenicillin N synthetase gene. En: Fifty Years of Penicillin Application (pp. 224-230). H. Kleinkauf y H. von Döhren, eds. Public Ltd, República Checa.
- Peñalva, M.A., Espeso, E., Orejas, M. y Gómez-Pardo, E.** (1991b). Penicillin production by *Aspergillus nidulans*: studies on the regulation of expression of the IPNS gene. En: Molecular Biology of Filamentous Fungi (pp. 217-227). U. Stahl y P. Tudzinsky, eds. VCH Publishers, Weinheim, Alemania.
- Pérez-Esteban, B., Orejas, M., Gómez-Pardo, E. y Peñalva, M.A.** (1993). Molecular characterization of a fungal secondary metabolism promoter: transcription of the *Aspergillus nidulans* isopenicillin N synthetase gene is modulated by upstream negative elements. *Mol. Microbiol.* **9**: 881-895.
- Perlin, M.H., Bej, A.K., Will, O.H. y Jacob, R.J.** (1990). Introduction and maintenance of prokaryotic DNA in *Ustilago violacea*. *J. Ind. Microbiol.* **5**: 355-364.
- Pirt, S.J.** (1983). The role of microbial Physiology in Biotechnology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **33B**: 137-138.
- Polman, J.K. y Larkin, J.M.** (1989). Purification of DNA from agarose gels. *Biotechnol. Techn.* **3**: 329-332.
- Punt, P.J., Dingemans, M.A., Jacobs-Meijnsing, B.J.M., Pouwels, P.H. y van den Hondel, C.A.M.J.J.** (1988). Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **69**: 49-57.
- Punt, P.J., Dingemans, M.A., Kuyvenhoven, A. Soede, R.D.M., Pouwels, P.H. y van den Hondel, C.A.M.J.J.** (1990). Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene, encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* **93**: 101-109.
- Punt, P.J., Kramer, C., Kuyvenhoven, A., Pouwels, P.H. y van den Hondel, C.A.M.J.J.** (1992). An upstream activating sequence from the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene. *Gene* **120**: 67-73.
- Queener, S.W., Sebek, O.K. y Vézina, C.** (1978). Mutants blocked in antibiotic synthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**: 593-636.
- Queener, S.W. y Neuss, N.** (1982). The biosynthesis of β -lactam antibiotics. En: The Chemistry and Biology of β -lactam Antibiotics, Vol. 3 (pp. 1-81). E.B. Morin y M. Morgan, eds. Academic Press, Londres.
- Queener, S.W., Ingolia, T.D., Skatrud, P.L., Chapman, J.L. y Kaster, K.R.** (1985). A system for genetic transformation of *Cephalosporium*

accremonium. En: Microbiology (pp. 468-472). L. Lieve, ed. American Society for Microbiology.

Rambosek, J.A. y Leach, J. (1987). Recombinant DNA in filamentous fungi: progress and prospects. *Rev. Biotechnol.* **6**: 357-373.

Ramón, D., Carramolino, L., Patiño, C., Sánchez, F. y Peñalva M.A. (1987). Cloning and characterization of the isopenicillin N synthetase gene mediating the formation of the β -lactam ring in *A. nidulans*. *Gene* **57**: 171-181.

Ramos, F.R., López-Nieto, M.J. y Martín, J.F. (1985). Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**: 380-387.

Ramos, F.R., López-Nieto, M.J. y Martín, J.F. (1986). Coordinate increase of isopenicillin N synthetase, isopenicillin N epimerase and deacetoxycephalosporin C synthetase in a high cephalosporin-producing mutant of *Acremonium chrysogenum* and simultaneous loss of the three enzymes in a non-producing mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* **35**: 123-127.

Ramsden, M., McQuade, B.A., Saunders, K., Turner, M.K. y Haford, S. (1989). Characterization of a loss-of-function mutation in the isopenicillin N synthetase gene of *Acremonium chrysogenum*. *Gene* **85**: 267-273.

Randall, T., Rao, T. y Reddy, C.A. (1989). Use of a shuttle vector for the transformation of the white rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**: 720-725.

Randall, T., Reddy, C.A. y Boominathan, K. (1991). A novel extrachromosomally maintained transformation vector for the lignin-degrading

basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **173**: 776-782.

Revilla, G., López-Nieto, M.J., Luengo, J.M. y Martín, J.F. (1984). Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *J. Antibiot.* **37**: 781-789.

Revilla, G., López-Nieto, M.J., Ramos, F.R., Alvarez, E. y Martín, J.F. (1986). Glucose represses formation of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine and isopenicillin N synthetase but not penicillin acyltransferase in *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* **168**: 947-952.

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. y Berg, P. (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**: 237-251.

Romero, J., Liras, P. y Martín, J.F. (1988). Isolation and biochemical characterization of *Streptomyces clavuligerus* mutants in the biosynthesis of clavulanic acid and cephamycin C. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 510-516.

Roper, J.A. (1966). The parasexual cycle. En: The fungi (pp. 589-617). G.C. Ainsworth y A.S. Sussman, eds. Academic Press, Nueva York.

Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. y Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Samson, S.M., Belagaje, R., Blankenship, D.T., Chapman, J.L., Perry, D., Skatrud, P.L., Frank, R.M., Abraham, E.P., Baldwin, J.E., Queener, S.W. e Ingolia, T.D.** (1985). Isolation, sequence determination and expression in *E. coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium*. *Nature* **318**: 191-194.
- Samson, S.M., Dotzlar, J.E., Sliis, M.L., Becker, G.W., van Frank, R.M., Veal, L.E., Yeh, W.K., Miller, J.R., Queener, S.W. e Ingolia, T.D.** (1987). Cloning and expression of the fungal expandase/hydroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis. *Bio/Technology* **5**: 1207-1216.
- Sánchez, F., Lozano, M., Rubio, V y Peñalva, M.A.** (1987). Transformation in *Penicillium chrysogenum*. *Gene* **51**: 97-102.
- Sánchez, S., Paniagua, L., Mateos, R.C., Lara, F. y Mora, J.** (1981). Nitrogen regulation of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. En: *Advances in Biotechnology*, vol. III (pp. 147-154). C. Vezina y K. Singh, eds. Pergamon Press, Toronto, Canadá.
- Sánchez, S., Flores, M.E. y Demain, A.L.** (1988). Nitrogen regulation of penicillin and cephalosporin fermentations. En: *Nitrogen Source Control of Microbial Processes* (pp. 121-136). S. Sánchez-Esquível, ed. CRC Press, Boca Ratón, E.U.A.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.
- Scheidegger, A., Kuenzi, M.T. y Nuesch, J.** (1984). Partial purification and catalytic properties of a bifunctional enzyme in the biosynthetic pathway of beta-lactams in *Cephalosporium acremonium*. *J. Antibiot.* **37**: 522-531.
- Sermonti, G.** (1956). Complementary genes which affect penicillin yields. *J. Gen. Microbiol.* **15**: 599-608.
- Sexton, C. y Roper, J.A.** (1984). Spontaneous duplications and transpositions of a large chromosome segment in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 583-595.
- Shah, A.J., Tilburn, J., Adlard, M.W. y Arst, H.N., Jr.** (1991). pH regulation of penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**: 209-212.
- Sheehan, J.C. y Henery-Logan, K.R.** (1959). The total synthesis of penicillin V. *J. Am. Chem. Soc.* **81**: 3089-3094.
- Shen, Y.-Q., Heim, J., Solomon, N.A., Wolfe, S. y Demain, A.L.** (1984). Repression of β -lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources. *J. Antibiot.* **37**: 503-511.
- Shiffman, D., Cohen, G., Aharonowitz, Y., Palissa, H., von Döhren, H., Kleinkauf, H. y Mevarech, M.** (1990). Nucleotide sequence of the isopenicillin N synthase gene (*pcbC*) of the gram negative *Flavobacterium* sp. SC 12,154. *Nucl. Acids Res.* **18**: 660.
- Shirafuji, H., Fujisawa, Y., Kida, M., Kanzaki, T. y Yoneda, M.** (1979). Accumulation of tripeptide derivatives by mutants of *Cephalosporium acremonium*. *Agr. Biol. Chem.* **43**: 155-160.
- Skatrud, P.L. y Queener, S.W.** (1984). Cloning of a DNA fragment from *Cephalosporium acremonium* which functions as an autonomous replication sequence in yeast. *Curr. Genet.* **8**: 155-163.

- Skatrud, P.L., Queener, S.W., Carr, L.G. y Fisher, D.L.** (1987). Efficient integrative transformation of *C. acremonium*. *Curr. Genet.* **12**: 337-348.
- Skatrud, P.L., Tietz, A.J., Ingolia, T.D., Cantwell, C.A., Fisher, D.L., Chapman, J.L. y Queener, S.W.** (1989). Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. *Bio/Technology* **7**: 477-485.
- Skatrud, P.L., Hoskins, J., Tobin, M.B., Miller, J.R., Wood, J.S., Kovacevic, S. y Queener, S.W.** (1991). Identification of the *Cephalosporium acremonium* *pcbAB* gene using prediction from an evolutionary hypothesis. En: *Applied Molecular Genetics of Fungi* (pp. 146-160). J.F. Peberdy, C.E. Caten, J.E. Ogden y J.W. Bennett, eds. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Smith, D.J., Bull, J., Edwards, J. y Turner, G.** (1989). Amplification of the isopenicillin N synthetase gene in a strain of *Penicillium chrysogenum* producing high levels of penicillin. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 492-497.
- Smith, D.J., Burnham, M.K.R., Bull, J.H., Hodgson, J.E., Ward, J.M., Browne, P., Brown, J., Barton, B., Earl, A.J. y Turner, G.** (1990a). β -Lactam antibiotic bisynthetic genes have been conserved in clusters in prokariotes and eukariotes. *EMBO J.* **9**: 741-747.
- Smith, D.J., Burnham, M.K.R., Edwards, J., Earl, A.J. y Turner, G.** (1990b). Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *Penicillium chrysogenum*. *Bio/Technology* **8**: 39-41.
- Soltero, F.V. y Johnson, M.J.** (1953). Effect of the carbohydrate nutrition on penicillin production by *P. chrysogenum* Q-176. *Appl. Microbiol.* **1**: 52-57.
- Som, T., Armstrong, K.A., Volkert, F.C. y Broach, J.R.** (1988). Autoregulation of 2 μ m circle gene expression provides a model for maintenance of stable plasmid copy levels. *Cell* **52**: 27-37.
- Somerson, N.L., Demain, A.L. y Nunheimer, T.D.** (1961). Reversal of lysine inhibition of penicillin production by α -amino adipic acid. *Arch. Biochem.* **93**: 238-241.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Specht, C.A., DiRusso, C.C., Novotny, C.P. y Ulrich, R.C.** (1982). A method for extracting high-molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal. Biochem.* **119**: 158-163.
- Spencer, B. y Maung, C.** (1970). Multiple activities of penicillin acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. J.* **118**: 29-30.
- Stadtman, E.R.** (1957). Preparation and assay of acyl coenzyme A and other thiol esters; use of hydroxylamine. *Methods Enzymol.* **3**: 931-941.
- Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S. y Davis, R.W.** (1979). High-frequency transformation of *Mucor* with recombination plasmid DNA. *Carlsberg Res. Commun.* **49**: 691-702.
- Tabor, S. y Richardson, C.C.** (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 1074-1078.
- Then Berg, K., Litzka, O. y Brakhage, A.A.** (1996). Identification of a major *cis*-acting DNA element controlling the bidirectionally transcribed penicillin biosynthesis genes *acvA* (*pcbAB*) and *ipnA* (*pcbC*) of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **178**: 3908-3916.

- Thomas, P.S.** (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 5201-5205.
- Tilburn, J., Scazzochio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A. y Davis, R.W.** (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**: 205-221.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A. y Arst, H.N., Jr.** (1995). The *Aspergillus* PacZ zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**: 779-790.
- Tobin, M.B., Fleming, M.D., Skatrud, P.L., y Miller, J.R.** (1990). Molecular characterization of the Acyl-Coenzyme A: Isopenicillin N acyltransferase gene (*penDE*) from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans* and activity of recombinant enzyme in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 5908-5914.
- Tobin, M.B., Baldwin, J.E., Cole, S.C.J., Miller, J.R., Skatrud, P.L. y Sutherland, J.D.** (1993). The requirement for subunit interaction in the production of *Penicillium chrysogenum* acyl-coenzyme A: isopenicillin N acyltransferase in *Escherichia coli*. *Gene* **132**: 199-206.
- Tobin, M.B., Cole, S.C.J., Kovacevic, S., Miller, J.R., Baldwin, J.E. y Sutherland, J.D.** (1994). Acyl-coenzyme A: isopenicillin N acyltransferase from *Penicillium chrysogenum*: effect of amino acid substitutions at Ser²²⁷, Ser²³⁰ and Ser³⁰⁹ on proenzyme cleavage and activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 39-46.
- Tobin, M.B., Cole, S.C.J., Miller, J.R., Baldwin, J.E. y Sutherland, J.D.** (1995). Amino-acid substitutions in the cleavage site of acyl-coenzyme A: isopenicillin N acyltransferase from *Penicillium chrysogenum*: effect on proenzyme cleavage and activity. *Gene* **162**: 29-35.
- Towbin, H., Staehlin, T. y Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350-4354.
- Treichler, H.J., Liersch, M., Nuesch, J. y Dobeli, H.** (1979). The role of sulfur metabolism in cephalosporin C and penicillin biosynthesis. En: Proc. 3rd Int. Symp. Genet. Ind. Microorganisms (p. 97). O.K. Sebeck, ed. Academic Press, Nueva York.
- Turgay, K., Krause, M. y Marahiel, M.A.** (1992). Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenilate forming enzymes. *Mol. Microbiol.* **6**: 529-546.
- Uphall, A., Gidings, B. y Mortimore, I.D.** (1977). The use of benomyl for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **100**: 414-418.
- Van den Hondel, C.A.M.J.J. y Punt, P.H.** (1990). Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi. British Mycological Society Symposium Vol. 18. Applied Molecular Genetics of Fungi.
- van Gorcom, R.F.M., Pouwels, P.H., Goosen, T., Visser, J., van der Broek, H.W.J., Hamer, J.E., Timberlake, W.E. y van den Hondel, C.A.M.J.J.** (1985). Expression of an *Escherichia coli* β -galactosidase fusion gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **40**: 99-106.
- van Heeswijck, R. y Roncero, M.I.G.** (1984). High-frequency transformation of *Mucor* with

recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Res. Commun.* **49**: 691-702.

van Liempt, H., von Döhren, H. y Kleinkauf, H. (1989). δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **264**: 3680-3684.

Veenstra, A.E., van Solingen, P. Bovemberg, R.A.L. y van der Voort, L.H.M. (1991). Strain improvement of *Penicillium chrysogenum* by recombinant DNA techniques. *J. Biotechnol.* **17**: 81-90.

Velasco, J., Gutiérrez, S., Fernández, F.J., Marcos, A.T., Arenós, C. y Martín, J.F. (1994). Exogenous methionine increases levels of mRNAs transcribed from *pcbAB*, *pcbC* and *cefEF* genes, encoding enzymes of the cephalosporin biosynthetic pathway, in *Acremonium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* **176**: 985-991.

Velasco, J (1997). Genes y enzimas implicados en los últimos pasos de la biosíntesis de cefalosporina C. Tesis Doctoral. Universidad de León.

Walker, G.C. (1985). Inducible DNA repair systems. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 425-457.

Walton, J.D., Paquin, C.E., Kaneko, K. y Williamson, V.M. (1986). Resistance to antimycin A in yeast by amplification of *ADH4* on a linear, 42 kb palindromic plasmid. *Cell* **46**: 857-863.

Weigel, B.J., Burgett, S.G., Chen V.J., Skatrud, P.L., Frolík, C.A., Queener, S.W. e Ingolia, T.D. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of isopenicillin N synthetase genes from *Streptomyces lipmanii* and *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **170**: 3817-3826.

Whiteman, P.A., Abraham, E.P., Baldwin, F.L., Fleming, M.D., Schofield, C.J., Sutherland, J.D. y Willis, A.C. (1990). Acyl-coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase from

Penicillium chrysogenum and *Aspergillus nidulans*. *FEBS Lett.* **262**: 342-344.

Williamson, D.H. (1985). The yeast ARS element, six years on: a program report. *Cell* **42**: 951-958.

Woodward, R.B. (1966). Recent advances in the chemistry of natural products. *Science* **153**: 487-493.

Xiao, X., Wolf, S. y Demain, A.L. (1991). Purification and characterization of cephalosporin 7 α -hydroxylase from *S. clavuligerus*. *Biochem J.* **280**: 471-474.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

Yelton, M.M., Hamer, J.E. y Timberlake, W.E. (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 1470-1474.

Zhang, J., Wolfe, S. y Demain, A.L. (1988). Phosphate repressible and inhibitable β -lactam synthetases in *Cephalosporium acremonium* strain C-10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 242-247.