

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Estudio de enzimas de la vía
biosintética de cefamicina C
en *Nocardia lactamdurans*
LC411 y en variantes Amy⁻**

Leonila Láiz Trobajo

Tesis Doctoral en microficha nº 82

Esta *tesis doctoral*, dirigida por los Drs. Dña. Paloma Liras Padín y D. Juan Francisco Martín Martín ha sido defendida el día 1 de Julio de 1991 ante un tribunal compuesto de la siguiente forma:

Presidente: Dr. D. Fernando Laborda

Secretario: Dr. D. José M^a Castro

Vocales: Dr. D. Jesús Sánchez

Dr. D. Juan Manuel Mesas

Dr. D. José Antonio Gil

La tesis obtuvo la calificación de *apto cum laude*.

© Universidad de León

© Leonila Láiz Trobajo

Impreso por E.T.D., S. A.

Aragón 123

08015 BARCELONA

ESPAÑA

Depósito legal: LE-804-1991

ISBN: 84-7719-271-5

Para solicitar ejemplares de esta tesis dirigirse a:

Servicio de Publicaciones

UNIVERSIDAD DE LEÓN

24071 LEÓN

Tel. (987) 240451

RESUMEN

Nocardia lactamdurans es el microorganismo utilizado por la industria para la producción de cefamicina C. *N. lactamdurans* LC411 crecido en medio NYG produce cefamicina C. Las actividades enzimáticas Isopenicilina N sintasa e Isopenicilina N epimerasa están implicadas en dos etapas tempranas de la vía biosintética de cefamicina C. Ambas son interesantes: IPNS por ser una enzima común en las ramificación de esta vía que conducen a la producción de penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas y por sintetizar el primer compuesto con actividad antibiótica que aparece en la ruta biosintética de β -lactamas; IPNE por ser la primera enzima exclusiva de los microorganismos capaces de llevar a cabo todas las etapas biosintéticas. Nuestros estudios se centraron en estas dos enzimas intentando aislar estas proteínas y determinar su secuencia de aminoácidos. Una causa de la baja productividad de *N. lactamdurans* es la inestabilidad intrínseca de la cepa. Aparecen frecuentemente variantes espontáneos Amy⁻ carentes de micelio aéreo que sintetizan cefamicina C en cantidades prácticamente indetectables. La pérdida de funciones que afectan al metabolismo secundario es corriente entre los actinomicetos, grupo de microorganismos al que pertenece *N. lactamdurans*, pero no lo es tanto que este fenómeno se manifieste de forma espontánea.

La escasa actividad de las enzimas de *N. lactamdurans* dificultó enormemente su purificación, siendo preciso partir de gran cantidad de micelio para conseguir el seguimiento de la actividad enzimática durante el proceso de purificación. Esta biomasa pudo conseguirse al optimizarse las condiciones de fermentación del microorganismo en fermentador para hacerlas similares a las de matraces indentados. El proceso de purificación también se vio entorpecido por la poca estabilidad de las actividades enzimáticas (especialmente la IPNE), y la dificultad de su detección por bioensayo dado que se requieren no menos de 16-17 h para cuantificar la actividad de cada etapa de purificación.

IPNS DE *Nocardia lactamdurans*

La enzima IPNS se considera crucial en la regulación de la biosíntesis de estos antibióticos, tanto en los productores eucariotas como en los procariotas. En nuestro caso, había sido realizado un estudio preliminar de la enzima de *N. lactamdurans* por Castro en 1985. Este estudio ha sido mejorado en varios aspectos, entre los que destaca la utilización de Sephadex G-75, más apropiado al tamaño esperado de la enzima, lo que hizo posible purificarla 63.1 veces con un porcentaje de recuperación del 85.5%. Aunque la purificación de la enzima en DEAE-HPLC fue menor, con ella se eliminaron de la muestra gran cantidad de proteínas contaminantes, obteniéndose fracciones con una actividad

enzimática muy baja, pero que estaban lo suficientemente puras como para determinar sin interferencias los parámetros de la proteína, peso molecular y punto isoeléctrico, en electroforesis bidimensional. El peso molecular de la enzima IPNE determinado a partir de Sephadex G-75 y de electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) fue 37500 ± 1000 Da, confirmándose nuestros resultados por la clonación del gen *pcbC* que la codifica. Su punto isoeléctrico es 5.5.

IPNE DE *Nocardia lactamdurans*

La enzima IPNE de *N. lactamdurans* convierte isopenicilina N en penicilina N cambiando a forma D la configuración del ácido L- α -aminoadípico que forma parte de la molécula de isopenicilina N. IPNE se detectó por primera vez en extractos acelulares de *Acremonium chrysogenum* y fue descrita como una enzima muy lábil. Paralelamente al trabajo que se presenta en esta memoria, Usui y Yu (1989) han purificado la enzima de *Streptomyces clavuligerus* a homogeneidad electroforética. En nuestras condiciones experimentales se favoreció claramente la reacción directa de IPN a penicilina N, determinándose el producto de la reacción mediante ensayo microbiológico. Esta reacción sólo requiere la presencia del sustrato IPN en tampón TPD. El tiempo óptimo de la reacción se fijó en 90 min. La enzima resulta estable en el rango de pH 4.5-9.0, al igual que sucede con la epimerasa de *S. clavuligerus*. Sin embargo, ambas enzimas difieren en su estabilidad en los procesos de diálisis: mientras que la IPNE en *S. clavuligerus* conserva su actividad, en *N. lactamdurans*, las preparaciones de sulfato amónico pierden completamente la actividad al diallzarlas. La enzima no requiere aparentemente ningún cofactor, pero el fosfato de piridoxal (PP) le confiere estabilidad. Nuestros resultados demuestran que el PP está unido a la enzima, puesto que ésta se inactiva por acción del borohidruro sódico (compuesto que inhibe a las enzimas dependientes de PP al reducir el complejo enzima-cofactor) y, ni la isoniazida ni la D-cicloserina (compuestos menos efectivos) son capaces de antagonizar significativamente al PP.

La IPNE de *N. lactamdurans* ha sido purificada 93.2 veces mediante cromatografía en Sephadex G-75 y MonoQ-HPLC. La cromatografía en Superosa 12-FPLC condujo a una preparación de proteína IPNE más pura, aunque prácticamente carente de actividad. La epimerasa aparece como una banda mayoritaria de peso molecular 59000 ± 1000 Da en SDS-PAGE. Cuando se realiza electroforesis bidimensional de muestras puras de IPNE de *N. lactamdurans*, aparecen dos formas

isoelectroforéticas con pl 5.13 y 5.26 que corresponden a la proteína de 59000 Da. Por otra parte, la secuencia de nucleótidos deducida para el extremo amino-terminal de la IPNE, está siendo utilizada en nuestro laboratorio para localizar el gen *cefD* de *N. lactamdurans*.

Nocardia lactamdurans VAR. AMY⁻

La cepa variante Amy⁻ es el modelo que hemos utilizado para relacionar los procesos de diferenciación con la producción de antibiótico en *N. lactamdurans*. Su crecimiento en medio líquido es similar al de la cepa Amy⁺. En medio sólido se observa macroscópicamente su incapacidad para desarrollar micelio aéreo. Microscópicamente su micelio es más fragmentado que el de la cepa Amy⁺. En *N. lactamdurans*, el 94% de las colonias que no producen cefamicina C son Amy⁻, pero no se conoce con exactitud el mecanismo que relaciona ambos procesos.

En *N. lactamdurans* var. Amy⁻, la falta de producción de cefamicina C, se debe en parte a la ausencia de actividades enzimáticas de la vía biosintética, entre ellas IPNS e IPNE. Resultó por tanto, de interés analizar el origen del fenómeno que conduce en *N. lactamdurans* a la pérdida simultánea de la producción de micelio aéreo y de las actividades IPNS e IPNE. Para ello, se empleó rutinariamente electroforesis bidimensional (2D-PAGE). Esta técnica es utilizada con frecuencia para establecer diferencias entre los patrones proteicos de cepas silvestres y mutantes, o de cepas sometidas a cambios nutricionales, choques térmicos, luz UV, etc. En nuestro caso, la utilización del sistema 2D-PAGE con extractos precipitados con sulfato amónico 50-80% de la IPNS procedentes de *N. lactamdurans* var. Amy⁺ y var. Amy⁻, nos permitió concluir que el hecho de que la cepa Amy⁻ no posea actividad ciclasa no se debe a la falta de proteína IPNS. La proteína IPNS aparece en 2D-PAGE de los extractos procedentes de la cepa Amy⁻ en la misma zona de peso molecular (37.5 KDa) que en los extractos procedentes de Amy⁺, aunque ligeramente desplazada en el gradiente de pH hacia el cátodo (5.58 en contraposición a 5.55 en Amy⁺). Esta pequeña diferencia en migración de pl no se considera significativa y se asume que la proteína IPNS de la cepa variante Amy⁻ es igual que la de la cepa Amy⁺, o ligeramente modificada por la introducción de un grupo químico. La existencia de la proteína IPNE de *N. lactamdurans* var. Amy⁻ quedó probada utilizando 2D-PAGE y anticuerpos obtenidos frente a la proteína IPNE de Amy⁺. La proteína de 59 KDa pl 5.1-(5.26) es la enzima de *N. lactamdurans* var. Amy⁺. Los anticuerpos fueron obtenidos inmunizando con esta proteína y estos anticuerpos permiten identificarla claramente entre las numerosas proteínas de un extracto crudo, tanto en SDS-PAGE como en 2D-PAGE. Mediante Inmunoadsorción se puso de manifiesto la

existencia de la proteína de 59 KDa en geles conteniendo muestras procedentes de *N. lactamdurans* var. Amy. La electroforesis SDS-PAGE no distingue entre dos formas isoelectroforéticamente distintas. IPNE se detectó inequívocamente en SDS-PAGE, pero no fue posible visualizarla en 2D-PAGE a pesar de la evidencia de que esta cepa variante posee la proteína de 59 KDa. Las variaciones de unos pocos aminoácidos afectarán más al pI que al peso molecular, el cual ha de modificarse bastante para resolverse en SDS-PAGE de forma distinta; por tanto, dichas variaciones sólo se registrarán en IEF. Los anticuerpos, dirigidos principalmente frente a la proteína con pI 5.1, no la detectaron en las electroforesis bidimensionales de extractos Amy porque dicha variante no posee cantidad suficiente para la detección por tener más proteína con pI 5.26 que con pI 5.1.

La ausencia de actividades enzimáticas IPNS e IPNE puede explicarse en base a inhibición de dicha actividad. Una hipótesis alternativa es que existan niveles basales de todas las enzimas de la vía biosintética, en cantidades demasiado bajas para ser detectables por los métodos actuales de medida de las enzimas biosintéticas, así como del antibiótico que se produzca. Esta hipótesis supondría que existe una proteína reguladora, proteína que aumentaría la expresión de todos los genes de la vía. Reguladores positivos han sido encontrados en la biosíntesis de otros antibióticos.

***Nocardia lactamdurans* VAR. AMY⁺ CRECIDO EN CONDICIONES DE REGULACION NITROGENADA**

Para nuestros estudios, realizamos una purificación de la hipotética proteína IPNE de cultivos crecidos en presencia de amonio, paralela a la de cultivos control y se compararon ambos tipos de fracciones semipurificadas en 2D-PAGE. La regulación nitrogenada provoca tales cambios en el patrón de proteínas, originando un aumento de las de bajo peso molecular, que hace prácticamente imposible la detección de pico proteico resuelto en la zona correspondiente a IPNE (59 KDa pI 5.1). Parecería que, con estas condiciones de fermentación, *N. lactamdurans* sintetiza una cantidad de proteína IPNE inferior a la normal. Sin embargo, no existe represión completa de la síntesis de IPNE, como se demostró al detectarla en SDS-PAGE utilizando anticuerpos. La complejidad de los mecanismos de regulación nitrogenada en *N. lactamdurans*, hace necesaria la continuación de estudios encaminados a caracterizar dichos mecanismos y a establecer el tipo de control que ejercen los posibles genes reguladores de la expresión de los estructurales como respuesta a factores medioambientales.

ABSTRACT

The biosynthesis of cephalosporins by *Acremonium chrysogenum* (syn. *Cephalosporium acremonium*) and cephamycins by *Nocardia lactamdurans* (syn. *Streptomyces lactamdurans*) takes place through similar biosynthetic pathways (reviewed by Martin & Liras, 1985). In both cases, the first step involves the formation of tripeptide δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteine-D-valine (ACV) by the enzyme ACV synthetase, followed by cyclization of ACV to isopenicillin N by isopenicillin N synthase (IPNS). Isopenicillin N epimerase (IPNE), which converts IPN into penicillin N by changing the L- α -aminoadipic acid side chain to the D-configuration was first detected in *A. chrysogenum* (Sawada et al., 1980). The enzyme was so labile that it could not be characterized further. The IPNS of *N. lactamdurans* appears to be a monomer since the molecular weight of the natural (non-denatured) form calculated by gel filtration is identical to the molecular weight of SDS-denatured protein as estimated by PAGE: 37800 Da. Its pI is 5.5. The IPNE was extracted from *N. lactamdurans* and purified 93.2-fold. The enzyme was unstable but could be partially stabilized by addition of pyridoxal phosphate. The purified enzyme did not require ATP for activity in contrast to other amino acid racemases. The enzyme has a molecular weight of 59000 Da as determined by gel filtration. A protein band of 59000 Da and pI 5.1-5.26 was found to be enriched in active fractions which were obtained from *N. lactamdurans* and analyzed in SDS-PAGE, the band was also immunodetected. In addition, *N. lactamdurans* var. *Amy*, a non-producing cephamycin C strain has the immunodetectable proteins IPNS and IPNE, and they can be visualized in two-dimensional electrophoresis system.

Bibliografia

Martin/ J.F. & Liras, P. "Biosynthesis of β -Lactam Antibiotics: Design and Construction of Overproducing Strain". Trends Biotechnol. 3, 39-44. 1985.

Sawada, Y., Baldwin, J.E., Singh, P.D., Solomon, N.A. & Demain, A.L. "Cell Free Cyclization of δ -(L-Aminoadipyl)-L-cysteine-D-valine to Isopenicillin N". Antimicrob. Agents Chemother. 18, 465-470. 1980.

ÍNDICE

Pág. Micro-
ficha

| | | |
|---|----|---|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 | 1 |
| 1.1 Metabolismo secundario: producción de antibióticos | 2 | 1 |
| 1.2 Diferenciación celular y metabolismo secundario | 6 | 1 |
| 1.3 <i>Nocardia lactamdurans</i> como sistema de estudio del metabolismo secundario | 12 | 1 |
| 1.4 Estructura y propiedades de la cefamicina c | 15 | 1 |
| 1.5 Biosíntesis de cefamicina C | 17 | 1 |
| 1.6 Regulación nitrogenada de la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos | 24 | 1 |
| 1.7 Objetivos del presente trabajo | 26 | 1 |
| | | |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS | 27 | 1 |
| II.1 Microorganismos utilizados | 28 | 1 |
| II.2 Medios de cultivo | 28 | 1 |
| II.3 Mantenimiento de los cultivos | 30 | 1 |
| II.4 Crecimiento de los microorganismos | 30 | 1 |
| II.5 Obtención de extractos enzimáticos acelulares | 32 | 1 |
| II.6 Valoración de las actividades enzimáticas | 33 | 1 |
| II.7 Cuantificación de proteína | 35 | 1 |
| II.8 Purificación de la actividad enzimática isopenicilina N sintasa (IPNS) | 36 | 1 |
| II.9 Purificación de la actividad enzimática isopenicilina N epimerasa (IPNE) | 37 | 1 |
| II.10 Electroforesis en geles de poliacrilamida | 39 | 1 |
| II.11 Tinción de geles de poliacrilamida | 42 | 1 |
| II.12 Transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a membranas de difluoruro de polivinilo | 43 | 1 |
| II.13 Inmunoadsorción e inmunodifusión | 44 | 1 |
| II.14 Productos utilizados | 45 | 1 |
| | | |
| III. RESULTADOS | 46 | 1 |
| III.1 Características de <i>Nocardia lactamdurans</i> LC411 variante Amy ⁺ | 47 | 1 |
| III.2 Características de <i>Nocardia lactamdurans</i> LC411 variante Amy ⁻ | 49 | 1 |
| III.3 Etapas de purificación de la IPNS | 52 | 1 |
| III.4 Electroforesis en SDS-PAGE de IPNS | 55 | 1 |
| III.5 Determinación del punto isoeléctrico de IPNS | 58 | 1 |
| III.6 IPNS de <i>N. lactamdurans</i> var. Amy ⁺ y <i>N. lactamdurans</i> var. Amy ⁻ | 61 | 1 |

| | Pág. | Micro- ficha |
|---|------|-----------------|
| III.7 Regulación nitrogenada: IPNS de <i>N. lactamdurans</i> var. Amy ⁺ e IPNS de <i>N. lactamdurans</i> var. Amy ⁺ crecido en presencia de amonio | 65 | 1 |
| III.8 Condiciones óptimas para el ensayo de la reacción catalizada por IPNE | 69 | 1 |
| III.9 Papel desempeñado por el fosfato de piridoxal (PP) en la caracterización y purificación de IPNE | 72 | 1 |
| III.10 Influencia sobre la actividad IPNE de compuestos que reaccionan con grupos -SH | 74 | 1 |
| III.11 Etapas de purificación de IPNE | 75 | 1 |
| III.12 Electroforesis en SDS-PAGE de la proteína IPNE | 79 | 1 |
| III.13 Determinación del punto isoeléctrico de IPNE | 81 | 1 |
| III.14 Determinación de la secuencia de aminoácidos del extremo aminoterminal de la proteína IPNE | 86 | 1 |
| III.15 IPNE de <i>N. lactamdurans</i> var. Amy ⁺ e IPNE de <i>N. lactamdurans</i> var. Amy ⁻ | 87 | 1-2 |
| III.16 Regulación nitrogenada: IPNE de <i>N. lactamdurans</i> var. Amy ⁺ e IPNE de <i>N. lactamdurans</i> var. Amy ⁺ crecido en presencia de amonio | 97 | 2 |
| IV DISCUSIÓN | 104 | 2 |
| IV.1 IPNS de <i>Nocardia lactamdurans</i> var. Amy ⁺ | 106 | 2 |
| IV.2 IPNE de <i>Nocardia lactamdurans</i> var. Amy ⁺ | 107 | 2 |
| IV.3 <i>Nocardia lactamdurans</i> var. Amy ⁻ | 110 | 2 |
| IV.4 <i>Nocardia lactamdurans</i> var. Amy ⁺ crecido en condiciones de regulación nitrogenada | 113 | 2 |
| V CONCLUSIONES | 116 | 2 |
| VI. BIBLIOGRAFÍA | 119 | 2 |