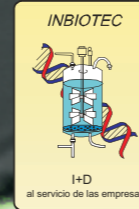


Fernando Teijeira Romón

Universidad de León

Departamento de Biología Molecular. Área de
Microbiología.



Instituto de Biotecnología. INBIOTEC

Compartimentalización de la biosíntesis de beta-lactamas y regulación de su secreción en *Acremonium chrysogenum*

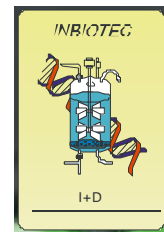
Tesis Doctoral

Fernando Teijeira Romón
León, 2009



Universidad de León.
Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales.
Departamento de Biología Molecular. Área de Microbiología.

Instituto de Biotecnología.
INBIOTEC



Compartimentalización de la biosíntesis de beta-lactamas y regulación de su secreción en *Acremonium chrysogenum*.

Memoria para optar al grado de Doctor en Bioquímica.
Fernando Teijeira Romón.

AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

Al profesor Dr. Juan Francisco Martín por haberme permitido desarrollar esta tesis doctoral en su laboratorio.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por concederme una beca de Formación del Profesorado Universitario para realizar la presente memoria. Igualmente a la Agencia de Inversiones y Servicios de la Junta de Castilla y León y al Ministerio de Ciencia y Tecnología por apoyarme económicamente con proyectos.

Al Dr. Ricardo Vicente Ullán por todo su apoyo y ayuda diarios, ya sea en la parte experimental como en la parte de escritura de la presente tesis doctoral. Sin tu ayuda esta tesis no podría haberla finalizado.

Al Dr. Santiago Gutiérrez Martín por haberme ayudado con el proceso de transformación que fue un obstáculo grande al inicio de este trabajo.

A mis compañeros de Inbiotec tanto actuales como pasados por crear un clima de trabajo agradable y propicio para que el día a día fuera más ameno y tranquilo. Especialmente a Fernando S, Javier, José, Carlos Barreiro, Rubén, Carlos García, Ramiro y Susana por su cordialidad en el trato diario. A Bernabé y Josefina por su apoyo con el material proporcionado para la realización de este trabajo.

A mis amigos Alfredo, Ormarys, Carlos Luis y Raúl por su apoyo dado para poder sacar adelante esta tesis doctoral aunque fuera en la distancia.

A toda mi familia, a mis padres y mi hermana por su cariño y apoyo constante.

A Marta por su cariño, apoyo y ayuda tanto en el día a día como en la escritura de la presente tesis doctoral.

Dedicada a mis padres, mi hermana y a Marta.

**“En el fondo de nosotros mismos siempre tenemos la misma edad”
Graham Greene**

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.- CARACTERÍSTICAS, TAXONOMÍA, MORFOLOGÍA Y DIFERENCIACIÓN DE <i>Acremonium chrysogenum</i>.	3
1.1.- Características generales de <i>Acremonium chrysogenum</i> .	3
1.2.- Clasificación taxonómica.	3
1.3.- Morfología y diferenciación del hongo.	4
2.- PRODUCCIÓN DE CEFALOSPORINA C EN <i>A. chrysogenum</i>.	6
2.1.- Antibióticos β -lactámicos.	6
2.2.- Descubrimiento de las cefalosporinas.	7
2.3.- Estructura de la cefalosporina C.	8
2.4.- Desarrollo de nuevas cefalosporinas semisintéticas e importancia industrial.	8
3.- RUTA BIOSINTÉTICA DE PENICILINAS Y CEFALOSPORINAS EN HONGOS FILAMENTOSOS.	10
4.- ORGANIZACIÓN DE LOS GENES DE BIOSÍNTESIS Y DE SECRECIÓN DE CEFALOSPORINAS.	13
5.- GENES DE BIOSÍNTESIS DE CEFALOSPORINAS.	14
5.1.- Genes comunes a la biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas.	14
5.2.- Genes específicos de la biosíntesis de cefalosporinas.	16
6.- ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LOS GENES DE BIOSÍNTESIS Y DE SECRECIÓN DE CEFALOSPORINAS.	18
7.- TRANSPORTADORES DE MEMBRANA.	20
7.1.- Definición. Funciones biológicas.	20
7.2.- Tipos de transportadores de membrana según la dirección del transporte.	21
7.3.- Clasificación de los sistemas de transporte de membrana en función del gasto de energía.	22
7.3.1.- Transporte pasivo.	22
7.3.2.- Transporte activo.	24
7.3.2.1.- Transporte activo primario.	24
7.3.2.2.- Transporte activo secundario.	25
7.4.- Proteínas auxiliares del transporte.	26
7.5.- Familias de transportadores. Nomenclatura. Distribución en los seres vivos.	26

8.- PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA SECRECIÓN DE ANTIBIÓTICOS.	27
8.1.- Características generales.	27
8.2.- Tipos de proteínas secretoras de antibióticos.	28
8.3.- Superfamilias MFS y ABC.	29
8.3.1.- Superfamilia MFS.	29
8.3.2.- Superfamilia ABC.	32
8.3.2.1.- Estructura de las proteínas ABC.	32
8.3.2.2.- Clasificación de la superfamilia ABC.	34
8.3.2.3.- Mecanismo de transporte. Ciclo de transporte.	35
9.- PROTEÍNAS MFS FÚNGICAS IMPLICADAS EN LA SECRECIÓN DE ANTIBIÓTICOS.	36
10.- PROTEÍNAS ABC FÚNGICAS IMPLICADAS EN LA SECRECIÓN DE ANTIBIÓTICOS.	36
11.- COMPARTIMENTALIZACIÓN DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS.	37
11.1.- Localización de las enzimas de la ruta de biosíntesis de penicilinas.	38
11.1.1.- δ -(L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina sintetasa (ACVS).	38
11.1.2.- Isopenicilina N sintasa (IPNS).	39
11.1.3.- Acilcoenzima A: isopenicilina N aciltransferasa (IAT).	39
11.2.- Localización de las enzimas específicas de la ruta de biosíntesis de cefalosporinas.	40
11.3.- Localización de enzimas accesorias de la ruta de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos.	40
11.3.1.- Acilcoenzima A sintetasa (ACS).	40
11.3.2.- Fenilacetilcoenzima A ligasa (PCL).	41
11.3.3.- Disulfuro reductasas.	41
11.3.4.- Acilasas de antibióticos β -lactámicos.	41
11.3.5.- Catalasa.	41
11.4.- Transporte de intermediarios de la ruta de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas.	41
11.5.- Transporte de penicilinas aromáticas y cefalosporina C.	42
11.6.- Papel de los peroxisomas y las vacuolas en la ruta de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas.	43
12.- REGULADORES DE SISTEMAS DE SECRECIÓN.	44
12.1.- Reguladores de sistemas de secreción en eucariotas.	45
12.1.1.- Proteínas con el “cluster” de zinc.	45
12.1.1.1.- Dominios estructurales y funcionales.	46
12.1.1.2.- Elementos de unión al ADN.	47
12.1.2.- Proteínas del “cluster” de zinc en <i>S. cerevisiae</i> .	48
12.1.2.1.- Reguladores transcripcionales implicados en la resistencia a drogas.	48
12.1.3.- Otras proteínas del “cluster” de zinc en hongos filamentosos.	49
12.2.- Proteínas con cremalleras de leucinas básicas (bZip).	50
12.2.1.- Proteínas bZip en <i>S. cerevisiae</i> .	51
13.- OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.	52
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1.- MICROORGANISMOS	57
1.1.- Cepas bacterianas.	57
1.2.- Cepas fúngicas.	57

2.- VECTORES PLASMÍDICOS	57
2.1.- Construcciones plasmídicas.	60
2.1.1.- Construcción del plásmido pDM.	60
2.1.2.- Construcción del plásmido pCM.	62
2.1.3.- Construcción del plásmido pSM.	62
2.1.4.- Construcción del plásmido pDR.	64
2.1.5.- Construcción del plásmido pCR.	66
2.1.6.- Construcción del plásmido pCR+T3.	66
2.1.7.- Construcción del plásmido pSCR.	67
2.1.7.- Construcción del plásmido p <i>cefM</i> -gfp.	68
3.- REACTIVOS QUÍMICOS.	69
3.1.- Reactivos químicos de uso general.	69
3.2.- Oligonucleótidos.	69
4.- MEDIOS DE CULTIVO	71
4.1.- Medios de cultivo para bacterias.	71
4.2.- Medios de cultivo para <i>Acremonium chrysogenum</i> .	72
5.- CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.	73
5.1.- Cepas bacterianas.	73
5.1.1.- Crecimiento de las cepas bacterianas.	73
5.1.2.- Mantenimiento de las cepas bacterianas.	74
5.2.- Cepas fúngicas.	74
5.2.1.- Crecimiento de <i>Acremonium chrysogenum</i> .	74
5.2.2.- Mantenimiento de las cepas de <i>A. chrysogenum</i> .	74
5.3.- Determinación del crecimiento de los microorganismos.	74
6.- PRODUCCION DE CEFALOSPORINA C POR <i>A. chrysogenum</i>.	75
7.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CEFALOSPORINAS EN CALDOS DE FERMENTACIÓN DE <i>A. chrysogenum</i> (BIOENSAYO).	75
8.- MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	76
8.1.- Eliminación selectiva de ácidos nucleicos.	76
8.2.- Manipulación de ADN.	76
8.2.1.- Eliminación de proteínas en muestras de ADN mediante extracción con fenol-cloroformo.	76
8.2.2.- Digestión de ADN con enzimas de restricción.	77
8.2.3.- Rellenado de extremos 5' protuberantes.	77
8.2.4.- Desfosforilación de extremos 5' de fragmentos de ADN mediante la fosfatasa alcalina de intestino de ternera.	77
8.2.5.- Ligación de moléculas de ADN.	78
8.2.6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	79
9.- PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. coli</i> PARA TRANSFORMACIÓN.	81
9.1.- Método del cloruro de rubidio.	81
10.- TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i> y OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.	81
10.1.- Transformación de <i>E. coli</i> .	81
10.2.- Minipreparaciones de ADN plasmídico (Minipreps).	82
10.3.- Obtención de ADN plasmídico a gran escala mediante lisis alcalina.	83
11.- TRANSFORMACIÓN DE <i>Acremonium chrysogenum</i>.	85
11.1.- Obtención de protoplastos.	86
11.2.- Transformación.	87

11.3.- Plaqueo.	87
12.- OBTENCIÓN DE ADN TOTAL DE <i>A. chrysogenum</i>.	88
13.- ELECTROFORESIS DE ADN.	88
13.1.- Electroforesis de ADN.	88
13.2.- Extracción de ADN de geles de agarosa.	89
14.- TRANSFERENCIA DE ADN.	91
14.1.- Transferencia de ADN mediante sistema de vacío.	91
15.- MANIPULACIÓN DE ARN TOTAL DE <i>A. chrysogenum</i>.	92
15.1.- Obtención de ARN total a gran escala.	92
15.2.- Obtención de ARN total a pequeña escala con el sistema RNeasy® (Qiagen).	93
15.3.- Retrotranscripción de ARN (RT-PCR) mediante el sistema Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen).	93
15.4.- Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes.	94
15.5.- Transferencia de ARN por capilaridad (northern).	94
16.- MANIPULACIÓN DE GENOTECAS FÁGICAS DE ADN.	95
16.1.- Preparación de células de <i>E. coli</i> para infección.	95
16.2.- Infección en medio sólido.	95
16.3.- Transferencia de placas de lisis a filtros de nitrocelulosa.	96
16.4.- Amplificación de bacteriófagos en medio sólido.	96
16.5.- Obtención de ADN de fagos recombinantes.	96
17.- HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	97
17.1.- Marcaje de sondas de ADN con digoxigenina.	97
17.2.- Prehibridación e hibridación.	98
17.3.- Lavado de los filtros.	99
17.4.- Detección inmunológica.	99
17.5.- Reutilización de filtros de ADN marcados con digoxigenina.	100
18.- SECUENCIACIÓN DE ADN.	100
19.- VALORACIÓN DE DESACETILCEFALOSPORINA C (DAC), CEFALOSPORINA C (CPC), ISOPENICILINA N (IPN) Y PENICILINA (PenN) POR HPLC (CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN).	101
20.- VALORACIÓN DE ISOPENICILINA N (IPN) Y PENICILINA (PenN) POR HPLC.	102
21.- DETERMINACIÓN INTRACELULAR DE IPN Y PenN MEDIANTE HPLC.	103
22.- MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.	103
22.1.- Preparación de los extractos libres de células.	103
22.2.- Determinación de la concentración de proteínas totales.	104
22.3.- Electroforesis de proteínas.	104
22.4.- Transferencia de proteínas (Western-blotting).	106
22.5.- Detección inmunológica.	106
23.- MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA.	107

SECCIÓN I: ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DEL GEN <i>cefM</i> EN LA BIOSÍNTESIS DE CEFALOSPORINA C EN <i>A. chrysogenum</i>.	113
1.- CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN ORF10 EN <i>Acremonium chrysogenum</i>.	113
2.- ANÁLISIS DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DEDUCIDA DE LA PROTEÍNA ORF10.	114
3.- INTERRUPCIÓN DEL GEN ORF10 EN <i>A. chrysogenum</i>.	115
3.1.- Transformación y selección de transformantes.	115
3.2.- Análisis genético de los transformantes interrumpidos mediante hibridación de Southern.	115
3.3.- Análisis de la producción de cefalosporinas en el transformante TDM 139.	117
3.3.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en el transformante TDM 139 mediante bioensayo.	117
3.3.2.- Análisis de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales mediante HPLC.	118
3.3.3.- El transformante TDM 139 acumula intracelularmente penicilina N.	119
4.- COMPLEMENTACIÓN EN <i>TRANS</i> DE LA CEPA INTERRUMPIDA TM139.	120
4.1.- Transformación, selección y análisis genético de los transformantes complementados con el gen <i>cefM</i> .	121
4.2.- Análisis de la producción de cefalosporinas en los transformantes complementados con el gen <i>cefM</i> .	121
4.2.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en los transformantes complementados con el gen <i>cefM</i> mediante bioensayo.	122
4.2.2.- Análisis mediante HPLC de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales extracelulares en el transformante TCM 27.	123
4.2.3.- El transformante TCM 27 restaura el nivel intracelular de penicilina N.	124
4.2.4.- El transformante TDM 139 es capaz de formar cefalosporina C <i>in vitro</i> .	125
4.2.5.- El transformante TDM 139 presenta alteraciones en la morfología de la colonia.	125
4.2.6.- El crecimiento en medio líquido del transformante TDM 139 es diferente al de la cepa parental.	126
5.- SOBREEXPRESIÓN DEL GEN <i>cefM</i> EN <i>Acremonium chrysogenum</i> C10.	128
5.1.- Transformación, selección y análisis genético de los transformantes.	128
5.2.- Análisis de la producción de cefalosporinas en los transformantes TSM.	129
5.2.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en los transformantes TSM mediante bioensayo.	129
5.2.2.- Análisis mediante HPLC de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales extracelulares en los transformantes TSM.	130
5.2.3.- Los transformantes TSM poseen una cantidad intracelular de penicilina N similar a la de la cepa parental C10.	131
6.- LOCALIZACIÓN <i>in vivo</i> DE LA PROTEÍNA CefM.	131
6.1.- Transformación, selección y análisis genético de los transformantes.	131
6.2.- Análisis de la expresión de la proteína CefM-GFP en el transformante TcefM-GFP 36.	133
6.3.- La proteína híbrida CefM-GFP se localiza intracelularmente en microcuerpos.	133

SECCIÓN II: CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DEL GEN <i>cefR</i> EN LA BIOSÍNTESIS DE CEFALOSPORINA C EN <i>A. chrysogenum</i>.	136
7.- CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN ORF8 EN <i>Acremonium chrysogenum</i>.	136
7.1.- Rastreo en la genoteca λ -EMBL3- <i>ble</i> .	136
7.2.- Secuenciación del gen ORF8 en <i>Acremonium chrysogenum</i> .	137
7.2.1.- Secuencia de nucleótidos.	137
7.2.2.- Determinación de la presencia de intrones mediante RT-PCR.	139
8.- ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DEDUCIDA DE LA PROTEÍNA ORF8.	140
9.- INTERRUPCIÓN DEL GEN ORF8 EN <i>A. chrysogenum</i>.	143
9.1.- Transformación y selección de los transformantes.	143
9.2.- Análisis genético de los transformantes interrumpidos mediante hibridación de Southern.	143
9.3.- Análisis de la producción de cefalosporinas en el transformante TDR 34.	145
9.3.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en el transformante TDR 34 mediante bioensayo.	145
9.3.2.- Análisis mediante HPLC de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales extracelulares en el transformante TDR 34.	146
9.3.3.- El transformante TDR 34 posee una cantidad intracelular de penicilina N similar a la de la cepa parental C10.	146
10.- COMPLEMENTACIÓN EN <i>TRANS</i> DE LA CEPA INTERRUMPIDA TDR 34.	147
10.1.- Transformación, selección y análisis genético de los transformantes complementados con el gen <i>cefR</i> .	147
10.2.- Análisis de la producción de cefalosporinas en los transformantes complementados con el gen <i>cefR</i> .	148
10.2.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en los transformantes complementados con el gen <i>cefR</i> mediante bioensayo.	148
10.2.2.- Análisis mediante HPLC de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales extracelulares en los transformantes TCR.	149
10.3.- Transformación, selección y análisis genético de los transformantes complementados con los genes <i>cefR</i> y <i>cefT3</i> .	150
10.4.- Análisis de la producción de cefalosporinas en los transformantes complementados con los genes <i>cefR</i> y <i>cefT3</i> .	151
10.4.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en los transformantes complementados con los genes <i>cefR</i> y <i>cefT3</i> mediante bioensayo.	151
10.4.2.- Análisis mediante HPLC de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales extracelulares en el transformante TCRT3 34.	152
10.5.- El transformante TDR 34 secreta un pigmento amarillento al medio de cultivo.	153
10.6.- La morfología de la colonia del transformante TDR 34 es muy diferente a la de la cepa parental C10.	154
11.- SOBREENPRESIÓN DEL GEN <i>cefR</i> EN <i>A. chrysogenum</i>.	155
11.1.- Transformación, selección y análisis genético de los transformantes.	155

11.2.- Análisis de la producción de cefalosporinas en los transformantes TSR.	156
11.2.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en los transformantes TSR mediante bioensayo.	156
11.2.2.- Análisis mediante HPLC de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales extracelulares en los transformantes TSR.	157
11.2.3.- El transformante TSR 63 posee una cantidad intracelular de penicilina N similar a la de la cepa parental C10.	158

SECCIÓN III: EL GEN *cefR* COMO UN MODULADOR DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE SECRECIÓN *cefM* Y *cefT*.

12.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE BIOSÍNTESIS Y DE SECRECIÓN DE LA RUTA DE CEFALOSPORINA C EN C10, TSR 63 Y TDR 34 MEDIANTE NORTHERN.	160
12.1.- Análisis de la expresión de los genes <i>pcbC</i> , <i>cefEF</i> , <i>cefT</i> , <i>cefM</i> y <i>cefR</i> en los transformantes TDR 34, TSR 63 y la cepa parental C10 mediante northern.	160
12.2.- El análisis de northern confirmó la ausencia de expresión del gen <i>cefR</i> en el transformante TDR 34 junto con un mayor nivel de transcrito en el transformante TSR 63.	162
12.3.- La proteína CefR actúa como un represor de los genes de secreción <i>cefT</i> y <i>cefM</i> .	162
12.4.- La expresión del gen <i>cefT3</i> se modifica de igual forma tanto por la interrupción como por la sobreexpresión del gen <i>cefR</i> .	162
12.5.- El cambio en el nivel de expresión del gen <i>cefR</i> afecta indirectamente al nivel de transcripción de los genes de biosíntesis <i>pcbC</i> y <i>cefEF</i> .	163

DISCUSIÓN

1.- CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>cefM</i> DE <i>Acremonium chrysogenum</i>.	167
2.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA PROTEÍNA DEDUCIDA DEL GEN <i>cefM</i>.	168
2.1.- Composición aminoacídica de la proteína CefM.	168
2.2.- Predicción de la estructura secundaria y terciaria de la proteína CefM.	169
2.3.- Topología de la proteína CefM y estudio del perfil de hidrofobicidad.	171
2.4.- Motivos y dominios encontrados en la proteína CefM.	171
2.5.- Localización celular de la proteína CefM.	173
3.- ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR LA INTERRUPCIÓN DEL GEN <i>cefM</i>.	174
3.1.- El transformante interrumpido en el gen <i>cefM</i> tiene alterada la curva de crecimiento.	175
3.2.- En el transformante interrumpido en el gen <i>cefM</i> se reduce drásticamente la producción de cefalosporinas.	176
3.3.- El transformante interrumpido acumula intracelularmente penicilina N.	176
4.- LA COMPLEMENTACIÓN EN <i>TRANS</i> DE LA CEPA TDM 139 CON EL GEN <i>cefM</i>, RESTAURA LA SÍNTESIS DE CEFALOSPORINAS Y LOS NIVELES EXTRACELULARES E INTRACELULARES DE PENICILINA N.	177
5.- EL TRANSFORMANTE INTERRUPTO TDM 139 ES CAPAZ DE FORMAR CPC <i>IN VITRO</i>.	177
6.- EL TRANSPORTE DE PENICILINA N NO ES LIMITANTE EN LA RUTA BIOSINTÉTICA DE CPC EN <i>A. chrysogenum</i>.	178

7.- LA PROTEÍNA CefM SE LOCALIZA EN MICROCUERPOS DE TAMAÑO MEDIO.	178
8.- PAPEL DE LA PROTEÍNA CefM EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE CPC EN <i>A. chrysogenum</i>.	179
9.- ORIGEN EVOLUTIVO DE LA PROTEÍNA CefM DE <i>A. chrysogenum</i>.	183
10.- CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>cefR</i> DE <i>Acremonium chrysogenum</i>.	185
11.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA PROTEÍNA CefR.	185
11.1.- Composición aminoacídica de la proteína CefR.	186
11.2.- Predicción de la estructura secundaria y terciaria de la proteína CefR.	187
11.3.- Motivos y dominios encontrados en la proteína CefR.	187
11.4.- Localización celular de la proteína CefR.	190
12.- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA INTERRUPCIÓN DEL GEN <i>cefR</i>.	191
12.1.- El transformante interrumpido TDR 34 presenta un enlentecimiento en la curva de crecimiento y secreta un pigmento amarillento al caldo de cultivo.	191
12.2.- La interrupción del gen <i>cefR</i> provoca un incremento de la expresión de los genes <i>cefM</i> y <i>cefT</i> .	193
12.3.- La inactivación dirigida del gen <i>cefR</i> acelera la expresión del gen <i>cefT3</i> .	194
12.4.- La interrupción del gen <i>cefR</i> altera de manera indirecta la expresión de los genes biosintéticos <i>pcbC</i> y <i>cefEF</i> .	195
13.- LA COMPLEMENTACIÓN EN TRANS DE LA CEPA TDR 34 CON EL GEN <i>cefR</i>, NO RESTAURA LA SÍNTESIS DE CEFALOSPORINAS NI LA PIGMENTACIÓN DEL CALDO DE CULTIVO.	195
14.- LA COMPLEMENTACIÓN EN TRANS DE LA CEPA TDR 34 CON LOS GENES <i>cefR</i> Y <i>cefT3</i>, RESTAURA LA SÍNTESIS DE CEFALOSPORINAS Y LA PIGMENTACIÓN DEL CALDO DE CULTIVO.	196
15.- LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>cefR</i> CONSTITUYE UN PASO LIMITANTE EN LA PRODUCCIÓN DE CEFALOSPORINAS EN <i>A. chrysogenum</i>.	197
16.- PAPEL DEL GEN <i>cefR</i> COMO UN MODULADOR DE TRANSPORTADORES DE β-LACTAMAS EN <i>A. chrysogenum</i>.	198
CONCLUSIONES	205
ANEXO I	209
BIBLIOGRAFIA	217

ABREVIATURAS

ABC: <i>ATP-Binding Cassette</i>	GITC: 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil isotiocianato
7-ACA: ácido 7-aminocefalosporánico	h: hora
7-ADCA: ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico	HPLC: cromatografía líquida de alta presión
6-APA: ácido 6-aminopenicilánico	HTH: motivo hélice giro hélice
AAHS: familia simporter ácidos aromáticos: H ⁺	IAT: isopenicilina N aciltransferasa
ACV: δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina	IOD: <i>Integral Optic Density</i>
ACVS: ACV sintetasa	IPN: isopenicilina N
ACVS: acil-coenzima A sintetasa	IPNS: isopenicilina N sintasa
ACS: familia simporter anión: catión	IPTG: isopropil β -D-galactopiranosido
ACS: acil-coenzima A sintetasa	kb: kilobases
ADN: ácido desoxirribonucleico	kDa: kilodalton
ADNasa: desoxirribonucleasa	KLR: <i>Kernel Logistic Regression</i>
AAP: subfamilia de permeasas de aminoácidos	l: litro
APC: familia aminoácido-poliamina-colina	LLD-ACV: δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina
ARN: ácido ribonucleico	m: metro
ARNasa: ribonucleasa	M: molar
ARNm: ARN mensajero	MAT: respuesta a feromonas
ATP: adenosina 5' trifosfato	MATE: <i>Multidrug and Toxic Compounds Efflux</i>
ATPasa: adenosina 5' trifosfato hidrolasa	Mb: megabases
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato	MDR: resistencia a múltiples drogas
bHLH: hélice-giro-hélice básica	MCP: familia porter monocarboxilato
BST: familia de transportadores de sales biliares conjugadas	MFS: <i>Major Facilitator Superfamily</i>
bZip: proteínas con cremallera de leucinas básicas	MHS: familia simporter metabolito: H ⁺
CIA: cloroformo-alcohol isoamílico	MOPS: ácido morfolinopropanosulfónico
CoA: coenzima A	mPTS: <i>membrane Peroxisomal Targeting Signal</i>
CoA-SH: coenzima A	MRP: proteína de resistencia a múltiples drogas
CP: familia cianato permeasa	NBD: <i>Nucleotide Binding Domain</i>
CPC: cefalosporina C	NBT: azul de nitrotetrazolio
CRD: <i>Cystein Rich Domain</i>	ng: nanogramos
CTP: citidina 5' trifosfato	nm: nanometros
DAC: desacetilcefalosporina C	NHS: familia simporter nucleósido: H ⁺
7-DAC: 7-desacetilcefalosporina C	NLSs: <i>Nuclear Localization Signals</i>
DAOC: desacetoxicefalosporina C	NNP: familia porter nitrito-nitrato
dATP: desoxiadenosina 5' trifosfato	ORF: marco de lectura abierta
DBD: <i>DNA Binding Domain</i>	OCT: familia de transportadores de cationes orgánicos
dCTP: desoxicitidina 5' trifosfato	OFA: familia antiporter oxalato: formiato
dGTP: desoxiguanosina 5' trifosfato	OHS: familia simporter oligosacárido: H ⁺
DHA3: familia antiporter droga: H ⁺	OPA: familia antiporter fosfato orgánico: fosfato inorgánico
DHA12: familia antiporter droga: H ⁺ (12 segmentos transmembrana)	OPC: ácido 6-oxopiperidin-2-carboxílico
DHA14: familia antiporter droga: H ⁺ (14 segmentos transmembrana)	PAT: familia de transportadores péptido-acil-CoA
DIG: digoxigenina	pb: pares de bases
DMSO: dimetilsulfóxido	PCL: fenilacetilcoenzima A ligasa
dNTPs: desoxinucleotidos trifosfato	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
DO: densidad óptica	PEG: polietilenglicol
DRE: <i>Drug Resistance Element</i>	PenG: penicilina G
DTT: ditioneitol	PenN: penicilina N
dTTP: desoxitimidina 5' trifosfato	PenV: penicilina V
EDTA: ácido etilendiaminotetracético	PDB: <i>Peroxisomal Data Base</i>
eGFP: <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>	PDRE: <i>Pleiotropic Drug Resistance Element</i>
g: gramo	Pfam: <i>Protein families database of alignments</i>
FATP: proteína transportadora de ácidos grasos	PHS: familia simporte fosfato:H ⁺
FGHS: familia simporter fucosa-galactosa-glucosa H ⁺	PLP: piridoxal fosfato
FHA: <i>Forkhead-associated domain</i>	PLR: <i>Penalized Logistic Regression</i>
FKH: <i>Forkhead DNA-binding domain</i>	PMP: <i>Peroxisomal Membrane Protein</i>
GFP: <i>Green Fluorescent Protein</i>	PMPs: <i>Peroxisomal Membrane Proteins</i>

PPP: familia poliol permeasa
PTS: señal de localización en peroxisomas
PTS-1: *Peroxisomal Targetting Signal-1*
PTS-2: *Peroxisomal Targetting Signal-2*
PSA: *Protein Sequence Analysis*
RE: retículo endoplasmático
RND: *Resistance Nodulation Cell Division*
rpm: revoluciones por minuto
s: segundos
SDS: laurilsulfato sódico
SET: familia de transportadores implicados en la secreción de azúcares
SHS: familia simporter sialato: H⁺
SIT: familia de transportadores de sideróforos de hierro
SMR: *Small Multidrug Resistance*
SP: familia de proteínas portadoras de azúcar
SSPRED: *Secondary Structure Prediction of Proteins*
SVM: *Support Vector Machines*
TAE: Tris-acetato-EDTA
TAP: transporte asociado con la presentación de antígenos

TCS: *Transport Commission System*
Tm: temperatura de anillamiento (melting)
TMD: dominio transmembrana
TMS: segmento transmembrana
Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
µg: microgramo
µl: microlitro
UMF-1: familia de transportadores desconocidos 1
UMF-2: familia de transportadores desconocidos 2
UMF-3: familia de transportadores desconocidos 3
UMF-4: familia de transportadores desconocidos 4
uv: ultravioleta
V: voltio
VIC: *Voltage-Gated Ion Channel*
VNT: familia de transportadores de neurotransmisores vesiculares
W: watio
X-gal: 5 bromo- 4 cloro-3-indol-β -D-galactopiranosido
YRE: *Yeast Response Element*
YRRE: *Yeast Resistance Response Element*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.- CARACTERÍSTICAS, TAXONOMÍA, MORFOLOGÍA Y DIFERENCIACIÓN DE *Acremonium chrysogenum*.

1.1.- Características generales de *Acremonium chrysogenum*.

Acremonium chrysogenum es un hongo filamentoso microscópico perteneciente a los ascomicetos. Carece de ciclo reproductivo sexual conocido, por lo que se considera que es un hongo imperfecto. Sus hifas se organizan como segmentos uninucleados y las esporas asexuales (conidios) son producidas en estructuras conidiales simples (conidióforos). En el proceso de envejecimiento, las hifas pueden diferenciarse en fragmentos hinchados y septados multinucleados (artrosporas). Este hongo ascomiceto es anamorfo, es decir, no produce la forma sexual ascospórica característica, estando presente únicamente la forma vegetativa asexual (Peberdy, 1987). Durante su metabolismo secundario *A. chrysogenum* es capaz de producir los antibióticos β -lactámicos penicilina N y cefalosporina C, junto a otros metabolitos no β -lactámicos, de menor interés. A nivel industrial es utilizado para la producción de cefalosporina C (Abraham, 1990).

Recientemente, se ha demostrado que, aunque *A. chrysogenum* es un hongo filamentoso asexual, presenta el locus AcMAT-1 que contiene tres genes conservados de la vía de respuesta a feromonas llamados AcMAT 1-1-1, AcMAT 1-1-2 y AcMAT 1-1-3 (Pöggeler *et al.*, 2008). La presencia de estos genes MAT funcionales en *A. chrysogenum* implica que puede existir, tal vez, un ciclo sexual oculto poco funcional, debido a la pérdida de fertilidad tras el almacenamiento de las cepas de esta especie procedentes de las colecciones de cultivos tipo. Tampoco se descarta la posibilidad de que estas proteínas MAT puedan regular otros genes que no participen en la reproducción sexual (Pöggeler *et al.*, 2008).

El género *Acremonium* es cosmopolita, morfológicamente simple y solitario (Gams, 1971). Las especies de este género aparecen en sustratos tan diversos como el suelo, las raíces de plantas a las que puede atacar, los restos de materia vegetal o incluso en lagos (Guarro *et al.*, 1999). Desde el punto de vista clínico, algunas especies de este género provocan infecciones en humanos como micetomas e infecciones oculares. Además causan enfermedades oportunistas debidas a la depresión del sistema inmune (Guarro *et al.*, 1997).

1.2.- Clasificación taxonómica.

La taxonomía de este hongo filamentoso (Tabla 1.1) inicialmente llamado *Cephalosporium acremonium*, a día de hoy, no está muy clara. Hace unos años se englobaba en la clase Hyphomycetes dentro la subclase Deuteromycotina. Actualmente, la clasificación taxonómica es la siguiente:

<i>Acremonium chrysogneum</i> Clasificación Taxonómica
Reino: Fungi
Filo: Ascomycota
Subdivisión: Pezizomycotina
Clase: Sordariomycetes
Orden: Hypocreales (mitospóricos)
Familia: Hypocreomycetidae
Género: <i>Acremonium</i>
Especie: <i>Acremonium chrysogenum</i>

Tabla 1.1. Taxonomía de *A. chrysogenum*.

El análisis parcial del ADNr 18S muestra que el género *Acremonium* es polifilético debido a la presencia de teleomorfos de esta especie en géneros de ascomicetos como *Emericellopsis*, *Hapsidospora*, *Nectria*, *Nectriella*, *Neucospora*, *Pronectria* y *Thielavia* (Sordariales) (Glenn *et al.*, 1996). Como se puede observar en la tabla 1.1 anterior, *A. chrysogenum* pertenece al orden de los Hipocreales, siendo el término *Acremonium* aplicado únicamente a los anamorfos de esta especie (Guarro *et al.*, 1999).

1.3.- Morfología y diferenciación del hongo.

Las colonias de *A. chrysogenum* presentan un color amarillo pálido o cromado. La velocidad de crecimiento es lenta, de tal forma que una colonia crecida en medio MEA (extracto de malta con agar), tras 10 días de incubación a 20 °C, puede alcanzar solamente un diámetro que oscila entre 8-15 mm (Peberdy, 1987).

El micelio vegetativo sumergido presenta hifas largas de pared celular delgada e hialina delimitadas por septos en los cuáles aparecen conidióforos simples indistinguibles donde se forman los conidios o esporas asexuales, delimitados por un septo basal que puede continuarse con la hifa. Los conidios son hialinos de forma elíptica de 25-50 µm de longitud y pueden ser ocasionalmente ligeramente curvados (Peberdy, 1987). La conidiogénesis o esporulación del hongo es escasa, teniendo lugar de forma holoblástica para el primer conidio a partir de células especializadas llamadas conidiogénicas. Así este primer conidio se forma mediante la elongación de la parte apical del talo de dicha célula conidiogénica. La formación del resto de los conidios tiene lugar de manera enteroblástica, es decir, se origina una cadena de conidios de manera fialídica. En este tipo de conidiogénesis enteroblástica, en el sitio de salida del primer conidio queda como remanente un collar a través del cual se producen el resto de los conidios (Peberdy, 1987).

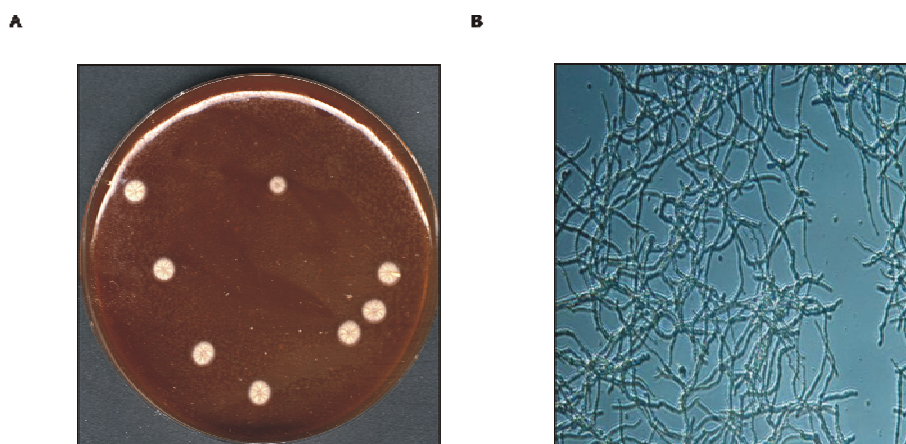


Figura 1.1. Morfología de *A. chrysogenum* C10. (A) Colonias aisladas de *A. chrysogenum* C10 en medio MCFA tras 7 días de crecimiento a 28 °C. (B) Micelio de *A. chrysogenum* C10 crecido en medio líquido MDFA (Medio definido de fermentación de *Acremonium*, Shen *et al.*, 1984).

La diferenciación morfológica de *A. chrysogenum* en cultivos sumergidos tiene un elevado grado de polimorfismo: largas hifas vegetativas, fragmentos de hifas, cadenas de artrosporas, artrosporas simples, conidióforos y conidios (Nash y Huber, 1971). La conidiogénesis es característica de cepas silvestres y de baja producción; también tiene lugar en cepas productoras cuando crecen en medios sintéticos. La biosíntesis de cefalosporinas está asociada con la diferenciación del cultivo en artrosporas (Nash y Huber, 1971) y es inducida por la presencia de metionina en el medio (Caltriger y Niss, 1966; Velasco *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 2004b).

Existen tres tipos básicos de diferenciación morfológica de este hongo (Bartoshevich, 1990):

- Tipo I conidiogénesis: transición desde el estado vegetativo al reproductivo con la formación de conidios. Asociado con el metabolismo básico, la producción de cefalosporinas está disminuída.
- Tipo II artrosporogénesis: se caracteriza por la formación de artrosporas en las últimas etapas de desarrollo. Las artrosporas sirven para la reproducción simple del hongo, el cuál presenta un metabolismo retardado y una producción reducida de cefalosporinas.
- Tipo III transformación en células levaduriformes: característico de condiciones de elevada producción de cefalosporinas. El micelio se encuentra alterado en su crecimiento y lo hace en forma de fragmentos ovoides ó esféricos como las levaduras. Dichos fragmentos esféricos no pueden considerarse artrosporas al no ser metabólicamente inactivas.

2.- PRODUCCIÓN DE CEFALOSPORINA C EN *A. chrysogenum*.

2.1.- Antibióticos β -lactámicos.

Un antibiótico es un compuesto de bajo peso molecular producido por microorganismos y que es capaz de inhibir el crecimiento o de provocar la muerte de otros microorganismos. Los antibióticos pertenecen al grupo de agentes quimioterapéuticos en el que se engloban antivirales, antifúngicos y antiparásitos (Davies, 1990).

Los antibióticos β -lactámicos son antibióticos de naturaleza peptídica que se forman mediante síntesis no ribosomal. (Demain, 1983). Son producidos tanto por bacterias Gram positivas y Gram negativas como por diferentes hongos filamentosos. Desde el punto de vista de su estructura química, poseen un anillo β -lactámico de 4 átomos (3 átomos de carbono y 1 átomo de nitrógeno) que da nombre al grupo. Se pueden clasificar en cinco grandes grupos (O'Sullivan *et al.*, 1979):

- **Penicilinas:** poseen el núcleo penam en su estructura química. Son únicamente producidas por hongos filamentosos.
- **Cefalosporinas:** poseen el núcleo ceph-3-em (coloquialmente “cefem”) en su estructura química. Son producidos tanto por hongos filamentosos como por bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- **Clavamas:** poseen el núcleo clavam en su estructura química y son producidas por especies del actinomiceto Gram positivo *Streptomyces*.
- **Carbapenemas:** poseen el núcleo carbapenema en su estructura y son producidas por bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- **Monobactamas:** poseen el núcleo monobactama en su estructura y son también producidas por bacterias Gram positivas y Gram negativas.

En la tabla 1.2 se muestra la estructura química del núcleo de cada uno de estos 5 grupos de antibióticos β -lactámicos y ejemplos de microorganismos productores.

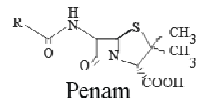
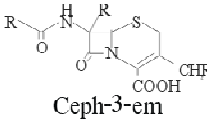
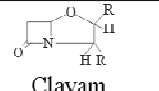
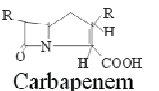
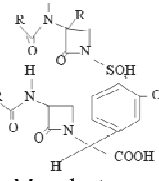
Estructura química	Antibióticos	Microorganismos productores	
		Hongos	Bacterias Gram ⁺ Gram ⁻
 <p>Penam</p>	Penicilinas	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>P. notatum</i> <i>Aspergillus nidulans</i>	
 <p>Ceph-3-em</p>	Cefalosporinas Cefamicinas Cefabacinas Citinovorinas	<i>Acremonium chrysogenum</i> <i>Paecilomyces persinicus</i>	<i>Streptomyces clavuligerus</i> <i>Amicoraptosis lactitudinans</i> <i>Flavobacterium sp.</i> <i>Lysobacter lactingenis</i>
 <p>Clavam</p>	Ácido clavulánico	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	
 <p>Carbapenem</p>	Tienamicinas Ácido olivánico Epitenamicinas	<i>Streptomyces clavuligerus</i> <i>S. olivaceus</i>	<i>Erwinia carotovora</i> <i>Serratia sp.</i>
 <p>Monolactam</p>	Nocardicinas Monobactamas	<i>Nocardia uniformis</i> subespecie <i>tsuyamakensis</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Pseudomonas acidophila</i>

Tabla 1.2. Clasificación de los antibióticos beta-lactámicos según su estructura química (O'Sullivan, 1979).

El papel natural de los antibióticos parece encontrarse en la inhibición del crecimiento de bacterias y otros microorganismos competidores de su entorno natural. Además pueden actuar como moléculas señalizadoras capaces de desencadenar cambios morfológicos y fisiológicos en respuesta a diferentes condiciones de estrés causada por la escasez de nutrientes (Demain *et al.*, 1979; Martín y Demain, 1980; Martín y Liras, 1989).

2.2.- Descubrimiento de las cefalosporinas.

La historia del descubrimiento de las cefalosporinas (Demain y Elander, 1999) se remonta al año 1945, cuando Giuseppe Brotzu aisló un cultivo de un hongo productor de antibióticos procedente de aguas residuales vertidas al mar en la localidad de Cagliari en Cerdeña, Italia (Brotzu, 1948). Este hongo fue denominado *Cephalosporium acremonium* y más tarde fue rebautizado con el nombre de *Acremonium chrysogenum* (Gams, 1971). Sin embargo, Brotzu no fue capaz de purificar el antibiótico y los trabajos fueron continuados por el grupo de Florey en el “*Sir William Dunn School of Pathology*” de la Universidad de Oxford. Este grupo inglés demostró que la cepa de Brotzu producía dos antibióticos: la cefalosporina P que es activa frente a bacterias Gram positivas y la cefalosporina N que actúa tanto sobre bacterias Gram positivas como Gram negativas (Burton y Abraham, 1951; Crawford *et al.*, 1952).

La cefalosporina P es un compuesto de naturaleza esteroide, mientras que la cefalosporina N es una penicilina hidrofílica que es activa frente a ambos grupos de bacterias a través del grupo carboxilo de su cadena lateral α -D-aminoadipil (Abraham *et al.*, 1953). Este último compuesto fue denominado penicilina N (Florey, 1955) y nunca se comercializó.

2.3.- Estructura de la cefalosporina C.

La cefalosporina C (CPC) es el principal antibiótico β -lactámico producido por *Acremonium chrysogenum*. La estructura de este compuesto fue determinada en 1955 durante la purificación de la penicilina N (Newton y Abraham, 1955). La CPC contiene una cadena lateral acilo (ácido D- α -aminoadípico) idéntica a la cadena lateral de la penicilina N, unida al grupo amino de un sistema de dos anillos: un anillo beta-lactámico de 4 átomos (común a todos los antibióticos beta-lactámicos) y otro anillo dihidrotiazínico de 6 átomos. Las características principales de este antibiótico se encuentran en la capacidad de absorber fuertemente la luz ultravioleta, su estabilidad en soluciones ácidas y sobre todo su resistencia a las penicilinasas estafilococales.

2.4.- Desarrollo de nuevas cefalosporinas semisintéticas e importancia actual.

La CPC procedente de *A. chrysogenum* posee algunas ventajas, como son la resistencia a penicilinasas estafilococales y el hecho de presentar una toxicidad selectiva, ya que actúa sobre bacterias pero no sobre células animales. Sin embargo, la escasa eficacia como antibiótico de la CPC impulsó el desarrollo de nuevos derivados semisintéticos más activos a partir de su núcleo el 7-ACA (ácido 7-aminocefalosporánico). De esta manera, se han comercializado las cefalosporinas semisintéticas cefalotina, cefaloridina o cefaloglicina, además de otras con mayor actividad antibiótica. Por ello, la CPC ha dejado de ser utilizada clínicamente.

En las décadas de 1960 y 1970 se estudiaron las condiciones óptimas de fermentación para la biosíntesis de CPC. Así, se observó que la DL-metionina estimula la producción de CPC proporcionando el átomo de azufre del antibiótico (Demain *et al.*, 1963a) e induciendo las enzimas de síntesis de CPC (Drew y Demain, 1973; Komatsu *et al.*, 1975; Sawada *et al.*, 1980; Demain y Zhang, 1998; Martín y Demain, 2002). Igualmente, estos estudios determinaron que la L-cisteína y la L-valina son precursores del núcleo 7-ACA (Trown *et al.*, 1963a; Demain, 1963b), mientras que el L- α -aminoadípico es precursor de la cadena lateral D- α -aminoadipilo (Trown *et al.*, 1963b).

En las décadas de 1980 y 1990 se aislaron, clonaron los genes, se expresaron y se caracterizaron la mayor parte de las enzimas de la ruta biosintética de CPC y algunos de los genes que las codificaban fueron incluso secuenciados. En la década de 1990 se estudiaron tanto la regulación metabólica de la ruta de biosíntesis de CPC como la organización de los genes biosintéticos (revisión de Demain y Elander, 1999).

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta el uso de las cefalosporinas es la aparición de cepas microbianas resistentes a los mismos, lo cuál ha impulsado la búsqueda de nuevos antibióticos semisintéticos más potentes y que eviten este problema. Así se desarrollaron

derivados semisintéticos del 7-ACA, del 7-ADCA (7-aminodesacetoxicefalosporánico) y del 7-DAC (7-aminodesacetilcefalosporánico). Se ha visto que la modificación del C3 y del C7 del anillo altera el espectro antibacteriano, la estabilidad frente a β -lactamasas y las propiedades farmacocinéticas de la molécula.

Existen diversas estrategias que se han utilizado para la producción de los compuestos 7-ACA, 7-ADCA y 7-DAC:

1. Producción de 7-ACA, 7-ADCA y 7-DAC:

- Para ello, se ha introducido en *A. chrysogenum* un operon capaz de formar 7-ACA. Dicho operon consta de dos genes: uno que codifica una D-aminoácido oxidasa de *Fusarium solanarum* y otro que codifica una glutaril acilasa de *Pseudomonas diminuta* (Isogai *et al.*, 1991). Esta cepa transforma directamente CPC en 7-ACA junto con 7-DAC y 7-ADCA. Sin embargo, los niveles producidos no eran rentables a nivel industrial (Velasco *et al.*, 2000).

2. Producción de 7-ADCA:

- La producción industrial del 7-ADCA tiene lugar también mediante un proceso costoso de múltiples pasos en el que se expande el núcleo de la penicilina G a fenilacetil-7-ADCA. Posteriormente, la cadena lateral se elimina por una penicilina acilasa (Herbasch *et al.*, 1984).
- Otro método utiliza cepas de *P. chrysogenum* que expresan los genes *cefE* de *S. clavuligerus* y *cefEF* de *A. chrysogenum*, por lo que cuando se añade ácido adípico como precursor de la cadena lateral, se expande el adipil-6-APA a adipil-7-ADCA (Crawford *et al.*, 1990).
- Recientemente, se ha desarrollado un proceso seguro para producir 7-ADCA (Velasco *et al.*, 2000). Dicho proceso consiste en expresar el gen *cefE* de *S. clavuligerus* en un transformante de *A. chrysogenum* interrumpido en el gen *cefEF*, produciéndose mayoritariamente DAOC. A partir de DAOC mediante dos pasos enzimáticos se consigue formar 7-ADCA. En el primer paso DAOC se transforma en ácido cetoadipil-7-ADCA (ácido 7- β -(5-carboxi-5-oxopentamido) mediante una D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* (Alonso *et al.*, 1998). Este compuesto reacciona espontáneamente con el peróxido de hidrógeno producido en la reacción, originándose el ácido glutaril-7-ADCA (ácido 7- β -(4-carboxibutamido)-deacetoxicefalosporánico). Finalmente, el glutaril 7-ADCA se hidroliza a 7-ADCA por una glutaril acilasa de *Acinetobacter sp.* (Velasco *et al.*, 2000).

A partir de los compuestos 7-ACA, 7-ADCA y 7-DAC se han desarrollado cefalosporinas de hasta 4 generaciones diferentes, siendo algunos ejemplos los siguientes (Demain y Elander, 1999; Barber *et al.*, 2004):

- Cefalosporinas de primera generación: cefalotina, cefapirina y cefazolim.
- Cefalosporinas de segunda generación: cefuroxima, cefoxitina y cefaclor.
- Cefalosporinas de tercera y cuarta generación: loracarbef, cefotaxima, cefoperazone y cefepime.

Otra estrategia que se ha utilizado para mejorar la actividad antibiótica de las cefalosporinas y minimizar la aparición de microorganismos resistentes, ha sido la utilización de un inhibidor de β -lactamasas junto con el antibiótico β -lactámico correspondiente. Un ejemplo es la combinación de la cefalosporina cefoperazone y del inhibidor sulbactam en el producto comercial Sulperazone (Demain y Elander, 1999).

La importancia de las cefalosporinas actualmente es enorme teniendo en cuenta que sólo en el año 1999 dicho mercado movió 9000 millones de dólares (Demain y Elander, 1999). En un futuro próximo, la investigación profundizará en el estudio del metabolismo primario y secundario, su biosíntesis y regulación, con el fin de desarrollar nuevas cefalosporinas.

3.- RUTA BIOSINTÉTICA DE PENICILINAS Y CEFALOSPORINAS EN HONGOS FILAMENTOSOS.

La biosíntesis de cefalosporinas y penicilinas (Figura 1.2), tanto en bacterias como en hongos filamentosos comienza con la condensación no ribosomal de tres precursores aminoacídicos: ácido L- α -aminoadípico (L- α -AAA), L-cisteína (L-Cys) y L-valina (L-Val) para formar el tripéptido δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (LLD-ACV) (Martín y Liras., 1989; Aharanowitz *et al.*, 1992). Esta reacción la cataliza la ACV-sintetasasa (codificada por el gen *pcbAB*) (Díez *et al.*, 1990; Gutiérrez *et al.*, 1991b; MacCabe *et al.*, 1991).

El siguiente paso en la ruta biosintética consiste en la ciclación del tripéptido para formar isopenicilina N (IPN) que es el primer intermediario de la ruta con bioactividad. Esta reacción está catalizada por la IPN sintasa (codificada por el gen *pcbC*) (Samson *et al.*, 1985; Carr *et al.*, 1986; Ramón *et al.*, 1987; Barredo *et al.*, 1989a)

Estos dos primeros pasos son comunes a los procesos biosintéticos de todos los antibióticos β -lactámicos. A partir de aquí la ruta puede dirigirse hacia la biosíntesis de penicilinas hidrofóbicas, como penicilinas G y V en *Penicillium* y *Aspergillus* en ambos, o bien hacia la biosíntesis de cefalosporina C en *Acremonium*.

Los hongos filamentosos *P. chrysogenum* y *A. nidulans* sintetizan penicilina G (PenG) y penicilina V (PenV) por el reemplazamiento de la cadena lateral del L- α -aminoadipil de la isopenicilina N por cadenas laterales no polares como son el ácido fenilacético o fenoxiacético respectivamente. El proceso tiene lugar en dos pasos catalizados por dos actividades enzimáticas codificadas por el gen *penDE* (Barredo *et al.*, 1989b; Montenegro *et al.*, 1990). En un primer paso la cadena lateral L- α -

aminoadipilo de la isopenicilina N se elimina formando el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) catalizado por la actividad isopenicilil N amidohidrolasa. Posteriormente, el 6-APA se convierte en PenG mediante la incorporación del fenilacético activado como fenilacetilcoenzima A en una reacción catalizada por la actividad acilCoA: 6-APA aciltransferasa (Álvarez et al., 1993)

En *P. chrysogenum* el gen *penDE* posee un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 39,94 kDa y al igual que en *A. nidulans* posee 3 intrones en la mitad final del gen (Barredo et al., 1989b; Montenegro et al., 1990; Tobin et al., 1990). La conversión de IPN a PenG está catalizada por una única enzima con dos subunidades (Whiteman et al., 1990) que se sintetiza como una preproteína de 40 kDa, sufriendo posteriormente un procesamiento postraduccional (Tobin et al., 1990).

El primer paso específico de la ruta que conduce hacia la biosíntesis de cefalosporina C implica la epimerización de la cadena lateral del ácido L- α -aminoadípico (L- α -AAA) a D- α -AAA, formándose penicilina N (PenN), que es el precursor común a todas las cefalosporinas. Esta reacción está catalizada por una isopenicilina N epimerasa (Kovacevic et al., 1990; Coque et al., 1993) en el caso de bacterias, y por un sistema de al menos dos enzimas en *A. chrysogenum*. Dichas enzimas son una isopenicilil N-CoA sintetasa (codificada por el gen *cefD1*) y una isopenicilil N-CoA epimerasa (codificada por el gen *cefD2*), pudiendo existir una tioesterasa probablemente inespecífica que libera la penicilina N del CoA (Ullán et al., 2002b).

A continuación la penicilina N es convertida en desacetoxicefalosporina C (DAOC) en una reacción catalizada por una DAOC sintetasa (comúnmente denominada expandasa). Mediante esta reacción, el anillo tiazolidínico de la penicilina N sufre una expansión para originar el anillo dihidrotiazínico (que poseen todas las cefalosporinas) y el núcleo ceph-3-em (Kupka et al., 1983; Dotzlaf et al., 1987).

En el siguiente paso, el grupo metilo del carbono 3 de DAOC es hidroxilado y posteriormente oxidado para originar desacetilcefalosporina C (DAC). Dicha reacción está catalizada por una DAC-hidroxilasa. En bacterias estas reacciones sucesivas de hidroxilación y oxidación están catalizadas por dos enzimas diferentes (Jensen et al., 1985), mientras que en *A. chrysogenum* ambas están catalizadas por una única enzima bifuncional, denominada DAOC sintetasa (expandasa)/ DAC hidroxilasa (codificada por el gen *cefEF*) (Samson et al., 1987).

El último paso de la ruta de biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum* conlleva la acetilación de la cadena lateral de DAC, procediendo el grupo acetilo que se transfiere del acetilCoA. Esta reacción está catalizada por la acetil-CoA: DAC acetiltransferasa (codificada por el gen *cefG*) (Gutiérrez et al., 1992).

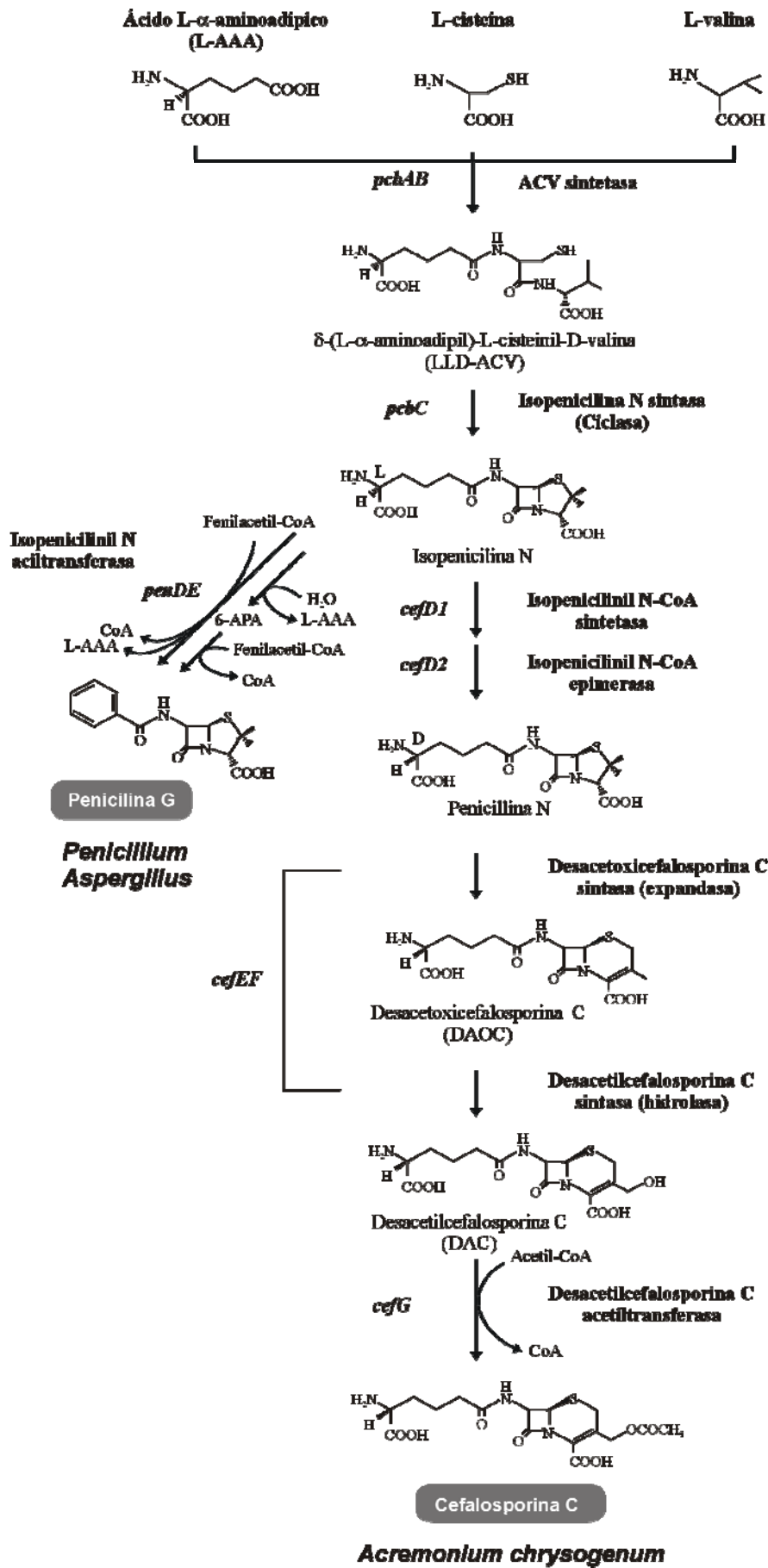


Figura 1.2. Rutas biosintéticas de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum* y penicilina G en *Penicillium* y *Aspergillus*.

4.- ORGANIZACIÓN DE LOS GENES DE BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN DE CEFALOSPORINAS.

En *Acremonium chrysogenum* los genes de biosíntesis y de secreción de cefalosporinas se organizan en agrupaciones génicas o “clusters” (Liras y Martín, 2006). Existen dos “clusters”: el temprano y el tardío.

- **Cluster temprano:** agrupa a los genes *pcbAB* y *pcbC*, que se transcriben en dirección opuesta (Skatrud *et al.*, 1989, 1992). A continuación del gen *pcbC* (“downstream”) se encuentran los genes *cefD2* y *cefD1* que se transcriben también de manera divergente (Ullán *et al.*, 2002a). Además de los genes de biosíntesis de cefalosporinas el cluster temprano incluye otros genes implicados en la secreción de cefalosporinas. Así, “aguas arriba” del gen *pcbAB*, se encuentran en este orden: la ORF3 que codifica una hipotética deshidrogenasa; el gen *cefT* que codifica una proteína que presenta similitud con la superfamilia de transportadores de multidroga (MFS, Major Facilitator Superfamily) (Ullán *et al.*, 2002b) y el gen *cefT3* que presenta homología con proteínas de membrana de función desconocida (Ullán RV, Teijeira F y Martín JF, resultados no publicados). Este cluster se encuentra localizado en el cromosoma VII en la cepa C10 de *A. chrysogenum* (Gutiérrez *et al.*, 1999), mientras que en otras cepas se localiza en el cromosoma VI (Skatrud y Queener, 1999).
- **Cluster tardío:** contiene los genes *cefEF* y *cefG* que se transcriben de manera divergente a partir de un único promotor bidireccional. Este cluster se encuentra en el cromosoma I en la cepa C10 de *A. chrysogenum* (Gutiérrez *et al.*, 1999), mientras que en otras cepas de esta especie se localiza en el cromosoma II (Skatrud y Queener, 1999).

En cualquier caso, independientemente de estas variaciones en la localización según la cepa, estas agrupaciones génicas se encuentran como una única copia en *A. chrysogenum*. Además los genes se transcriben de forma separada a partir de diferentes promotores, por lo que este tipo de organización en agrupaciones o “clusters” refleja un origen evolutivo común (Skatrud y Queener, 1989; Liras y Martín, 2006).

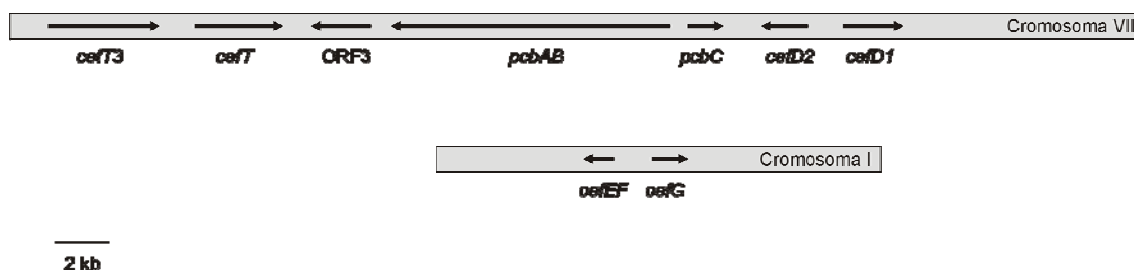


Figura 1.3. Organización de los genes de biosíntesis y de secreción de cefalosporinas en *A. chrysogenum* C10.

5.- GENES DE BIOSÍNTESIS DE CEFALOSPORINAS.

Como ya se ha indicado las rutas de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas comparten los pasos iniciales, y posteriormente la ruta se diversifica hacia la síntesis de penicilinas o cefalosporinas.

5.1.- Genes comunes a la biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas.

- ***pcbAB*: ACV sintetasa.**

Cataliza el primer paso de la ruta de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas que consiste en la condensación no-ribosomal de tres aminoácidos: ácido L- α -aminoadípico; L-cisteína y L-valina para formar el tripéptido lineal δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (LLD-ACV). Este tripéptido puede oxidarse espontáneamente y las moléculas activadas pueden unirse a través de los grupos tiol formando el dímero *bis*-ACV que es inactivo. La ACV sintetasa (Díez *et al.*, 1990) es un complejo multienzimático que actúa como las péptido sintetetas que llevan a cabo la síntesis no-ribosomal de antibióticos peptídicos. Cataliza la activación dependiente de ATP de los tres L- α -aminoácidos, la unión de los aminoácidos activados como aminoacil-CoA (tioésteres) a los centros activos de la enzima, la epimerización de la cadena lateral de la L-valina a D-valina y la polimerización de los tres aminoácidos para formar el tripéptido mediante la formación de enlaces peptídicos. Esta enzima ha sido purificada en *Aspergillus nidulans*, *A. chrysogenum* y *Streptomyces clavuligerus* (van Liempt *et al.*, 1989; Zhang y Demain, 1990; Schwecke *et al.*, 1992).

La ACV sintetasa cataliza la activación del grupo carboxilo del primer aminoácido con gasto de ATP, empleando Mg^{2+} , formándose el intermediario adenil-aminoácido y liberándose pirofosfato inorgánico. Posteriormente, el aminoácido activado transfiere el grupo carboxilo activado al cofactor 4'-fosfopanteteína, dando lugar a un enlace tioéster entre la enzima y el aminoácido. A continuación, el aminoácido tioesterificado es la diana para el ataque nucleofílico por el grupo amino del segundo aminoácido, originando el primer péptido entre el ácido L- α -aminoadípico y la L-cisteína. Este dipéptido se forma desde el extremo amino al carboxilo, permaneciendo unido a la enzima en forma de tioéster a través del grupo carboxilo. La unión de la L-Val da lugar al tripéptido y una vez formado tiene lugar la epimerización de su cadena lateral al enantiómero D. Finalmente, este tripéptido se libera de la enzima mediante el dominio tioesterasa localizado en la región carboxilo terminal de la misma (Gutiérrez *et al.*, 1991b; Kallow *et al.*, 1997; van Liempt *et al.*, 1989).

En *P. chrysogenum* el gen *pcbAB* fue clonado mediante la complementación de mutantes bloqueados en la síntesis de penicilinas denominados “npe” (Díez *et al.* 1990). El gen posee 11376 pb, no tiene intrones aunque existen algunas secuencias con características intrónicas pero sin la señal de terminación. Posee 3 regiones o módulos llamados A, C y V de más de 500 aminoácidos y muestran similitud con diversas enzimas que activan el grupo carboxilo de aminoácidos, hidroxiaácidos o ácidos en general (Kleinkauf y von Dohren, 1990, 1996). Cada módulo posee los dominios funcionales necesarios para el reconocimiento del aminoácido, la activación y la tiolización. Estos dominios son probablemente las zonas específicas de activación de los

aminoácidos. La interrupción de este gen sólo afecta a la síntesis del tripéptido y no a otros genes de biosíntesis de penicilinas (Hoskins *et al.*, 1990).

En *A. chrysogenum* el gen posee 11136 pb que codifican una enzima de tamaño muy similar a la de *P. chrysogenum* (Gutiérrez *et al.*, 1991b). En la secuencia de la ACV sintetasa de *A. chrysogenum* existen tres módulos repetitivos y similares a los módulos A, C y V de la ACV sintetasa de *P. chrysogenum*. El gen *pcbAB* se expresa de forma coordinadamente regulada con el gen *pcbC*, siendo su expresión más débil que la del gen *pcbC* (Menne *et al.*, 1994).

Todas las ACV sintetetas de hongos poseen integrado un dominio tioesterasa consenso similar al encontrado en las ácido graso sintetetas. Además los genes *pcbAB* son muy similares en procariotas y eucariotas, existiendo los tres dominios A, C y V con un alto grado de homología en todos los organismos (Martín, 1992).

- ***pcbC*: isopenicilina N sintasa.**

El segundo paso de la ruta de biosíntesis de cefalosporinas y penicilinas consiste en la conversión del tripéptido ACV en isopenicilina N (IPN). La IPN sintasa cataliza la oxidación (deshidrogenación) del tripéptido lineal para formar IPN, y posterior ciclación originando el anillo β -lactámico y el anillo tiazonidílico. Se caracteriza por tener una amplia especificidad de sustrato, lo cual ha sido utilizado para la producción de nuevas penicilinas y análogos del ACV (Baldwin y Abraham, 1988). Asimismo la reacción requiere el catión ferroso (Fe^{2+}), oxígeno molecular (O_2) y un donador de electrones como el ascorbato. El hierro es necesario para la unión del tripéptido ACV a la enzima a través de su grupo tiol libre.

La IPN sintasa cataliza en una única reacción la transferencia de 4 átomos de hidrógeno desde el tripéptido ACV al oxígeno molecular, originando el cierre de la molécula mediante deshidrogenación y liberación de dos moléculas de agua (Roach *et al.*, 1995). De forma más detallada, el tripéptido se une al hierro del centro activo originando un tiol cisteinil a través del átomo de azufre del ACV. Esta unión del tripéptido desencadena la reacción, formando complejos Fe^{2+} -ACV-IPN sintasa que ocupan 3 de los 5 posibles sitios de coordinación con estos ligandos, mientras que los otros dos sitios son ocupados por moléculas de agua. Posteriormente se produce la eliminación de los 4 átomos de hidrógeno por las especies de hierro-dioxígeno y se cicla la molécula liberando IPN y dos moléculas de agua (Kreisberg-Zakarin *et al.*, 1999).

Además la IPN sintasa existe en dos formas interconvertibles: un estado oxidado y otro reducido. En el centro catalítico de la enzima existen dos motivos conservados: un motivo H-X-D-X-H necesario para la coordinación del hierro y la unión del sustrato y otro motivo R-X-S necesario para la actividad catalítica. Además existe una tirosina implicada en la unión del grupo carboxilo de la valina del tripéptido. El sitio activo de la enzima posee un plegamiento que permite aislar al sustrato del medio externo, estando delimitado por aminoácidos hidrofóbicos (Kreisberg-Zakarin *et al.*, 1999).

La IPN sintasa fue primeramente purificada en *A. chrysogenum* (Samson *et al.*, 1985) y más tarde en *P. chrysogenum* (Ramos *et al.*, 1985). Posee dos dominios con un alto grado de homología en ambos casos y con dos cisteínas en posiciones conservadas, que deben estar libres (en su forma reducida) para que la enzima sea activa.

El gen *pcbC* en hongos carece de intrones y codifica una proteína que presenta un tamaño muy similar en *P. chrysogenum* (Carr *et al.*, 1986; Barredo *et al.*, 1989a) y *A. chrysogenum* (Samson *et al.*, 1985). En el caso de *A. chrysogenum* dicha proteína tiene 338 aminoácidos y un peso molecular deducido de 38416 Da.

5.2.- Genes específicos de la biosíntesis de cefalosporinas.

▪ *cefD*; *cefD1* y *cefD2*: isopenicilina N epimerasa.

Los pasos específicos de la ruta de biosíntesis de cefalosporinas comienzan con la epimerización de la cadena lateral L- α -AAA de la isopenicilina N de la configuración L a la configuración D, en la penicilina N.

En bacterias la epimerización de IPN a PenN tiene lugar mediante una IPN epimerasa dependiente de piridoxalfosfato (PLP) codificada por el gen *cefD* (Kovacevick *et al.*, 1990; Coque *et al.*, 1993). Esta enzima ha sido purificada y caracterizada en *S. clavuligerus* (Jensen *et al.*, 1983) y *Amycolatopsis lactamdurans* (Laiz *et al.*, 1990).

En *A. chrysogenum* la epimerización de IPN a PenN está catalizada por un sistema de dos componentes codificados por los genes *cefD1* y *cefD2* (Ullán *et al.*, 2002b; Martín *et al.*, 2004). Para ello la isopenicilina N se activa como isopenicilil N-CoA, en una reacción catalizada por la isopenicilil-CoA sintetasa, formándose isopenicilil N-CoA (codificada por el gen *cefD1*). A continuación la isopenicilil-N-CoA epimerasa (codificada por el gen *cefD2*) cataliza la conversión de la isopenicilil N-CoA en penicilil N-CoA por la epimerización de la cadena lateral del L- α -AAA de la configuración L a la D, originando el intermediario penicilil-N-coenzima A. Por último, una tioesterasa (posiblemente inespecífica) hidroliza el grupo CoA-SH formándose penicilina N.

El gen *cefD1* posee un marco de lectura abierto de 2193 pb interrumpido por la presencia de 4 intrones, mientras que el gen *cefD2* posee un marco de lectura abierto de 1146 pb interrumpido por un único intrón. Ambos genes se transcriben de manera divergente a partir de un único promotor bidireccional (Ullán *et al.*, 2002b).

Los genes *cefD1* y *cefD2* son necesarios para la ruta de biosíntesis de CPC ya que su interrupción bloquea la formación de la misma, acumulándose IPN (Ullán *et al.*, 2002b). Por otro lado, la sobreexpresión de ambos genes produce un aumento de la producción de CPC e indica que la epimerización de IPN en PenN (catalizada por las enzimas CefD1 y CefD2) es un paso limitante en la biosíntesis de CPC (Ullán *et al.*, 2004).

- ***cefE*; *cefF* y *cefEF*: expandasa; hidroxilasa y expandasa/hidroxilasa.**

En el siguiente paso, la penicilina N, precursor directo de la biosíntesis de cefalosporinas, sufre la expansión del anillo tiazolidínico del núcleo “penam” de 5 átomos para formar el anillo dihidrotiazínico de 6 átomos que contiene el núcleo “ceph-3-em” de las cefalosporinas. Dicha reacción está catalizada por una desacetoxicefalosporina C sintasa (expandasa) formándose, a partir de PenN, desacetoxicefalosporina (DAOC). A continuación, la DAOC se hidroxila a desacetilcefalosporina C (DAC) en una reacción catalizada por una DAC sintasa o DAOC hidroxilasa. En este paso se incorpora un átomo de oxígeno procedente del oxígeno molecular en el grupo metilo exocíclico del carbono 3' del intermediario DAOC (Schofield *et al.*, 1997).

En bacterias ambas actividades están codificadas por dos genes distintos: *cefE* que codifica la expandasa y *cefF* que codifica la hidroxilasa (Jensen *et al.*, 1985). Además las enzimas de procariotas y eucariotas son bastante diferentes.

En *A. chrysogenum* el gen *cefEF* codifica una proteína que posee ambas actividades expandasa/3'-hidroxilasa (Samson *et al.*, 1987). Estas dos actividades fueron observadas en extractos libres de células (Kohsaka *et al.*, 1976; Yoshida *et al.*, 1978), requiriendo como cofactores oxígeno molecular (O₂), ditiotreitolo (DTT) y 2-cetoglutarato (Kupka *et al.*, 1983). Esta enzima posee una región de 10 aminoácidos dentro de la que existe una cisteína similar a la contenida en otra región parecida de la IPN sintasa. Dicha cisteína participa directa o indirectamente en la unión del sustrato. Además los grupos sulfhidrilo de la enzima son necesarios para la expansión y la hidroxilación del anillo (Dotzlaw y Yeh, 1987). Por último, la enzima posee una amplia especificidad de sustrato que permite llevar a cabo la expansión de diferentes moléculas con una mayor o menor eficiencia (Chin *et al.*, 2003). El gen *cefEF* posee un marco de lectura abierto de 996 pb, careciendo de intrones, que codifican una proteína de 332 aminoácidos. El origen de este gen es probablemente procariota y se transcribe a partir de su propio promotor en sentido opuesto al gen *cefG* (Gutiérrez *et al.*, 1992).

- ***cefG*: acetilCoA: desacetilcefalosporina C acetiltransferasa.**

El último paso de la biosíntesis de CPC implica la acetilación de DAC a CPC (Nüesch *et al.*, 1987; Gutiérrez *et al.*, 1992; Martín *et al.*, 1994). Esta reacción la lleva a cabo la acetil-CoA: DAC acetiltransferasa codificada por el gen *cefG*. Este gen posee un marco de lectura abierto de 1332 pb interrumpido por la presencia de 2 intrones (Gutiérrez *et al.*, 1992).

En *A. chrysogenum* la enzima ha sido purificada parcialmente (Fujisawa y Kanzaki, 1975) y el gen fue clonado por varios grupos de investigación (Gutiérrez *et al.*, 1992; Matsuda *et al.*, 1992; Mathinson *et al.*, 1993). La proteína posee un peso molecular de 50 kDa (Velasco *et al.*, 1999) y pertenece a la clase de las α/β hidroxilasas de las acetiltransferasas. Recientemente, se ha determinado que esta enzima se organiza como dímeros, teniendo cada monómero una arquitectura de dos dominios: un dominio de plegamiento típico de α/β hidrolasas y otro dominio “cap” responsable de la interacción entre monómeros (Lejon *et al.*, 2008). Además la proteína posee una

tríada catalítica, Ser-His-Asp (típica de serina proteasas). Dicha tríada es importante en la formación de los estados de transición oxianiónicos y la unión de los intermediarios.

La reacción de acetilación de DAC a CPC tiene lugar en dos pasos. En primer lugar el acetil-CoA se une a una serina del sitio activo de la enzima formando un estado de transición oxianiónico tetraédrico. A partir de este momento se liberan el intermediario acil-enzima y el coenzima A. Posteriormente, la unión de DAC al sitio activo origina el segundo estado de transición oxianiónico tetraédrico, formando finalmente CPC (Lejon *et al.*, 2008).

El gen *cefG* está bajo el control de un promotor débil por lo que se expresa a muy bajos niveles en comparación con otros genes de la ruta (Velasco *et al.*, 1994). Al colocar el gen bajo el control de promotores fúngicos de expresión fuerte se consigue aumentar la expresión del gen y la producción de CPC. Por tanto, la reacción catalizada por la DAC acetiltransferasa constituye otro paso limitante en la ruta biosintética de CPC (Gutiérrez *et al.*, 1997).

6.- ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LOS GENES BIOSINTÉTICOS DE PENICILINAS Y CEFALOSPORINAS.

Existen tres hechos fundamentales que son claves para entender y poder explicar el origen y la evolución de los genes de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas (Gutiérrez *et al.*, 1999):

1. La elevada similitud entre los genes biosintéticos fúngicos y bacterianos, implicados en la formación de β -lactamas (Aharonowitz *et al.*, 1992).
2. La existencia de un estrecho rango de microorganismos productores de antibióticos β -lactámicos (Aharonowitz *et al.*, 1992).
3. El hecho de que los genes de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos se organicen en agrupaciones génicas o “clusters”, un fenómeno común en bacterias.

Estos tres aspectos hacen pensar que, en general, los genes de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos se transfirieron de forma horizontal como bloques o agrupaciones génicas desde la línea procariota (más antigua) hasta la línea eucariota (Landan *et al.*, 1990; Peñalva *et al.*, 1990). Posteriormente a esta transferencia se produjo una reorganización de los mismos. Teniendo en cuenta que la divergencia evolutiva entre procariotas y eucariotas ocurrió hace 1800 millones de años (Doolittle *et al.*, 1989), la transferencia horizontal pudo ocurrir hace 370 millones de años (Weigel *et al.*, 1988). Ejemplos de genes transferidos de esta forma pudieron ser los genes *pcbAB*, *pcbC* (Doolittle *et al.*, 1986; Hensel *et al.*, 1989) y el gen *cefEF* de *A. chrysogenum* (Samson *et al.*, 1987).

En el curso de la evolución se produjeron al menos dos fenómenos de transferencia horizontal:

1. Desde una bacteria (probablemente *Streptomyces*) hasta hongos productores de penicilinas y cefalosporinas se transfirieron los genes *pcbAB* y *pcbC* que son comunes a todos estos organismos. Existen una serie de aspectos que apoyan esta hipótesis como son:
 - 1.1. La capacidad de producir antibióticos β -lactámicos es más elaborada en bacterias que en hongos, por lo que éstos últimos serían los receptores de estos genes (Aharonowitz *et al.*, 1992).
 - 1.2. El uso de codones en hongos es reminiscente del de *Streptomyces* o de un ancestro con un elevado porcentaje de G + C (guanina y citosina) como es este actinomiceto. Esta deducción proviene de comparar el uso de codones de las IPN sintetas bacterianas y fúngicas (Peñalva *et al.*, 1989).
 - 1.3. Los genes *pcbAB*, a pesar de su gran tamaño, carecen de intrones lo que caracteriza a los genes de procariotas. Además las especies de *Streptomyces* no son resistentes a los antibióticos β -lactámicos, cuando debían haber evolucionado para poder competir y ser resistentes a estos antibióticos. Los genes de resistencia suelen presentarse asociados a los biosintéticos (Aharonowitz *et al.*, 1992).
2. Desde *Streptomyces* hasta hongos productores de cefalosporinas como *Acremonium*. En este caso los genes se habrían transferido en dos bloques: por una parte los genes comunes a todos los organismos que sintetizan antibióticos β -lactámicos (*pcbAB* y *pcbC*) y por otra parte los genes específicos de la biosíntesis de cefalosporinas, como los genes *cefE* y *cefF*. Los genes *cefE* y *cefF* de *S. clavuligerus* y el gen *cefEF* de *A. chrysogenum* son bastante similares. El hecho de que en éste último exista un único gen puede deberse a que los genes *cefE* y *cefF* aparecieron primero en procariotas, se transfirieron a eucariotas donde habrían sufrido una reorganización y un aumento de su complejidad (Carr *et al.*, 1986).

Los genes *cefD1* y *cefD2* podrían haberse originado por la especialización de enzimas del metabolismo de ácidos grasos hacia la conversión de IPN en PenN (Ullán, 2002). Esto habría ocurrido tras la integración de los genes *pcbAB* y *pcbC* procedentes de procariotas en una región del genoma con genes implicados en funciones diferentes a la biosíntesis de antibióticos. Estos genes posiblemente estaban relacionados con el metabolismo de ácidos grasos y habrían evolucionado hacia la producción de PenN. La capacidad de producción de PenN, más activa que la IPN, en un antepasado de *A. chrysogenum* supuso una ventaja ecológica frente a aquellos que sólo formaban IPN, por lo que se conservó a lo largo de la evolución (Ullán, 2002).

El gen *cefG* tiene un origen fúngico independiente de la transferencia horizontal, al tener dos intrones, siendo similar al gen *met2* de *Ascolobus inmersus* y de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que hace pensar que ambos genes proceden de un ancestro eucariota a partir del cuál se habrían producido dos líneas de evolución independiente en cada uno de los cuales habría conducido a la aparición de un gen diferente (Gutiérrez *et al.*, 1992).

7.- TRANSPORTADORES DE MEMBRANA.

La membrana plasmática es una bicapa lipídica, que incluye proteínas, glicoproteínas y glicolípidos en su composición. Esta combinación forma una estructura muy dinámica y fluida (revisión de Vereb *et al.*, 2003) que controla el paso de iones inorgánicos, vitaminas y nutrientes hacia el interior de la célula, así como la salida de drogas y productos de desecho. Se encarga del mantenimiento de la integridad de la estructura celular y de los orgánulos, al separar los espacios intra y extracelular. Además, está sometida a cambios continuos en su composición que son muy importantes en toda una serie de procesos que tienen lugar en la membrana celular, como es la transducción de señales.

Las características hidrofóbicas de la membrana hacen que ésta actúe como una barrera de permeabilidad selectiva. Por ello, compuestos no polares de bajo peso molecular pueden atravesar la membrana mediante difusión simple a favor de gradiente de concentración. Sin embargo, los compuestos polares y las sustancias hidrofílicas como ácidos orgánicos, aminoácidos y sales inorgánicas requieren la participación de proteínas transportadoras específicas para poder atravesar la membrana.

Por tanto, el transporte de la mayor parte de las moléculas que no pueden atravesar la membrana se lleva a cabo mediante la acción de proteínas transportadoras de membrana.

7.1.- Definición. Funciones biológicas.

Los transportadores son proteínas integrales de membrana que pueden actuar junto con receptores extracitoplasmáticos, dominios de receptores, proteínas reguladoras o dominios de proteínas citoplasmáticas que acoplan energía (Higgins, 1995) y posibilitan el proceso de transporte.

Asimismo, los transportadores cumplen diversas funciones (Saier *et al.*, 2000):

- Intervienen en la entrada de nutrientes (C, N, S y P) al citoplasma y a varios orgánulos.
- Regulan la concentración de metabolitos en el citoplasma y el interior de los orgánulos mediando su secreción.
- Participan en la eliminación activa de drogas y otros tóxicos desde el citoplasma.
- Permiten mantener el potencial de membrana al regular las concentraciones iónicas a ambos lados de la misma.
- Participan en el transporte de proteínas, carbohidratos complejos, lípidos y ácidos nucleicos.
- Median en la comunicación bioquímica mediante hormonas, alarmonas, feromonas, neurotransmisores y otros tipos de moléculas señalizadoras.
- Permiten la secreción de antibióticos, antivirales, antifúngicos y toxinas como parte de procesos de defensa biológica.

7.2.- Tipos de transportadores de membrana según la dirección del transporte.

Se han identificado tres tipos de transportadores de membrana (Figura 1.4) según el sentido del transporte que llevan a cabo y el número de moléculas movilizadas en cada caso (Saier *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 2007):

- **Uniportadores (transporte sencillo):** son proteínas capaces de transportar una sustancia de un lado a otro de la membrana.
- **Cotransportadores:** son proteínas de membrana que mueven sustancias de un lado a otro de la membrana requiriendo para ello que sea transportada simultáneamente una segunda sustancia. Los cotransportadores pueden ser de dos tipos:
 1. **Simportadores:** son los cotransportadores que transportan las dos sustancias en el mismo sentido.
 2. **Antiportadores:** son los cotransportadores que transportan las dos sustancias en sentido opuesto.

La existencia de este tipo de transportadores diferentes de la difusión simple permite que los microorganismos puedan acumular solutos en contra de gradiente de concentración. Este tipo de procesos de transporte mediados por portadores (“carriers”) se caracteriza por la elevada especificidad del proceso. La unión y el transporte de un sustrato a través de la membrana recuerdan a una reacción enzimática. Algunos portadores sólo reaccionan con un único tipo de moléculas y otros con moléculas de la misma clase (como aminoácidos relacionados estructuralmente o azúcares con características comunes). Esta capacidad de transporte múltiple permite incrementar la economía celular, al no requerirse diferentes transportadores específicos para cada sustrato (Saier, 2000).

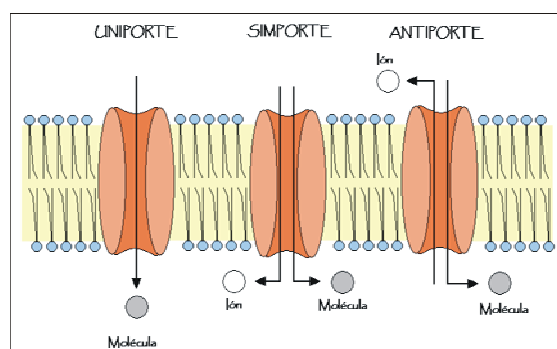


Figura 1.4. Tipos de transportadores según el sentido del transporte.

7.3.- Clasificación de los sistemas de transporte de membrana en función del gasto de energía.

Los sistemas de transporte son clasificados, de acuerdo con el requerimiento de energía, en transporte pasivo y transporte activo (Alberts *et al.* 2007; Saier, 2000).

7.3.1.- Transporte pasivo.

Es un tipo de transporte espontáneo que no implica ningún gasto de energía, ya que la dirección del proceso es a favor de gradiente de concentración. Esto quiere decir que la sustancia a transportar se desliza desde el compartimento donde hay más hacia el compartimento donde hay menos concentración de la misma.

El transporte pasivo puede consistir en una difusión simple o en una difusión facilitada (Figura 1.5):

- **Difusión simple:**

Es el fenómeno por el que pequeñas sustancias no polares son transportadas a través de la membrana a favor de gradiente de concentración. Es un tipo de transporte inespecífico y no saturable. La velocidad del transporte es tanto mayor cuanto menor es la molécula y mayor la diferencia de concentración entre ambos lados de la membrana. La difusión simple puede tener lugar a través de la membrana directamente en el caso de moléculas lipídicas como los esteroides, anestésicos como el éter y el cloroformo, sustancias apolares como el oxígeno y el nitrógeno atmosféricos y otras moléculas pequeñas con poca carga como agua, urea, etanol y glicerol. Además la difusión simple puede ocurrir a través de proteínas canal en el caso de iones como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- . Las proteínas canal son proteínas transmembrana con un orificio central que normalmente está cerrado y cuya apertura puede ser regulada por variaciones en el potencial eléctrico de la membrana o por la unión de ligandos, lo que induce la apertura del canal central (van Bambeke *et al.*, 2000).

- **Difusión facilitada:**

Es el tipo de transporte pasivo por el que las moléculas polares son transportadas a favor del gradiente electroquímico y mediante proteínas transportadoras específicas o permeasas que catalizan el proceso ya que dichas moléculas no pueden atravesar la membrana por sí mismas. Por tanto, depende de la concentración y de la carga del sustrato. De forma natural existe un gradiente eléctrico transmembranal: [generalmente el exterior es positivo y el medio interno (celular) es negativo], lo que favorece el transporte hacia el interior de la célula de cationes e impide el de aniones. La difusión facilitada es un proceso saturable, al existir una tasa máxima de transporte o T_{max} , que se alcanza cuando la concentración de la sustancia a transportar es muy alta, y la proteína transportadora se satura. Además la difusión es muy específica ya que cada transportador únicamente mueve una molécula o una clase de moléculas o sustancias relacionadas. Este tipo de

transporte puede describirse por las ecuaciones de la catálisis enzimática. Existen dos tipos de transportadores que actúan mediante difusión facilitada (Saier, 2000):

1. **Proteínas canal:** En este tipo de transportadores los sitios de unión del sustrato son accesibles por ambos lados de la membrana y no se requieren cambios conformacionales para la translocación de los sustratos de un lado a otro de la membrana (Figura 1.5). Sin embargo, estos canales pueden abrirse o cerrarse en respuesta a cambios de voltaje (canales regulados por voltaje) o a la unión de determinado ligando (canales regulados por ligando). Los canales son oligómeros transmembranales con un poro o canal delimitado por diferentes tipos de aminoácidos (según el tipo de sustrato a transportar) pudiendo ser hidrofóbicos, hidrofílicos o anfipáticos. Ejemplos de proteínas de canal son las que transportan agua, cationes como sodio, potasio, calcio o el anión cloruro por lo que reciben el nombre de ionóforos. Existen diversos tipos de proteínas canal:

1.1.- Proteínas canal de tipo α : transportan iones a través de un poro acuoso, desde el citoplasma hacia el medio extracelular y entre compartimentos intracelulares. Son ubicuos y aparecen tanto en bacterias como en animales. Estas proteínas son oligómeros en los que cada cadena polipeptídica constituye una subunidad o dominio con hasta 3 segmentos transmembrana (TMS). Las cadenas polipeptídicas se organizan principalmente como hélices α aunque también pueden presentar configuración de β -láminas (Saier, 2000).

1.2.- Porinas tipo barril β : forman poros transmembranales que permiten el transporte de moléculas pequeñas (de menos de 650 Da) de forma no selectiva o de una única clase de moléculas sin gasto de energía. Aparecen en la membrana externa de bacterias Gram negativas, en bacterias Gram positivas y en la membrana externa de mitocondrias y cloroplastos. Son trímeros proteicos cuyos segmentos transmembrana tienen una conformación en lámina β (Saier, 2000).

1.3.- Poros de toxinas: son proteínas sintetizadas y secretadas por una célula para integrarse en la membrana de otra célula. Facilitan la entrada de proteínas tóxicas producidas por la célula que sintetiza la proteína del poro donde éste se integra. Aparecen fundamentalmente en bacterias y en ocasiones en eucariotas (Saier, 2000).

1.4.- Canales de síntesis no-ribosomal: son canales iónicos oligoméricos formados por aminoácidos L- y D- e hidroxiaácidos. Aparecen en bacterias y hongos e intervienen en procesos de transporte relacionados con la lucha biológica (Saier, 2000).

2. **Carriers:** son proteínas que facilitan el transporte de moléculas sin gasto de energía y a favor de gradiente de concentración (Figura 1.5). Los “carriers” poseen estereoespecificidad de sustrato y son saturables. La tasa máxima de transporte es menor que en el caso de las proteínas canal.

7.3.2.- Transporte activo.

Es aquel tipo de transporte de sustancias que implica gasto de energía. Tiene lugar a través de la membrana en contra de gradiente electroquímico. Es un proceso específico y saturable. Existen dos tipos de transporte activo (Putman *et al.*, 2000):

- **Primario:** La energía se emplea directamente en mover la sustancia a transportar. Ésta se combina en el exterior celular con un transportador y pasa al interior sin sufrir ninguna modificación química (Figura 1.5). Ejemplos de este tipo de transportadores son las bombas iónicas ATPasas como la H⁺-ATPasa de mitocondrias y vesículas citoplasmáticas; la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa de distribución ubicua y que genera el potencial de acción en las neuronas; la bomba Ca²⁺-ATPasa de membrana o los transportadores ABC (ATP Binding Cassette; entre los que se encuentra la glicoproteína P (Rosenberg *et al.*, 2001), la clase de proteínas de resistencia a multidrogas (MRP) o la proteína TAP (transporte asociado con la presentación de antígenos).
- **Secundario:** La energía necesaria para el transporte de la sustancia procede del acoplamiento con un gradiente electroquímico de protones (llamado fuerza protón-motriz), que se genera como consecuencia de la fosforilación oxidativa de la respiración celular o la fotofosforilación oxidativa del ATP en la fotosíntesis. El gradiente puede deberse también a otro tipo de cationes sodio (fuerza sodio protón-motriz). Los transportadores que llevan a cabo este transporte pueden actuar mediante uniporte (movimiento de una sustancia aprovechando la fuerza protón-motriz); simporte (la sustancia se mueve en la misma dirección que la fuerza protón-motriz o el gradiente electroquímico) o antiporte (el movimiento es en dirección contraria). Ejemplos de este tipo de transportadores son las superfamilias de transportadores MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance), RND (Resistance Nodulation Cell Division) y MATE (Multidrug and Toxic Compounds Efflux). Junto con las de la superfamilia ABC (ATP-Binding Cassette), todos éstos están implicados en la resistencia a multidrogas y pertenecen a la clase de proteínas MDR de resistencia a multidrogas (Putman *et al.*, 2000; van Bambeke *et al.*, 2000).

7.3.2.1.- Transporte activo primario.

Aquel tipo de transporte en el que una fuente de energía primaria es utilizada para mover un soluto en contra de gradiente de concentración se denomina transporte activo primario. La energía utilizada puede ser química, eléctrica o solar. Los transportadores implicados en el transporte activo primario pueden actuar como canales y establecen los gradientes iónicos responsables del potencial de membrana, que es utilizado por los transportadores activos secundarios para llevar a cabo su función. Los transportadores del transporte activo primario son más complejos que otros tipos de proteínas transportadoras. De acuerdo con el tipo de energía del transporte activo primario utilizada para mover el soluto en contra del gradiente de concentración, se pueden distinguir diferentes tipos de transportadores (Putman *et al.*, 2000):

1. Transportadores que utilizan la energía de los enlaces difosfato. Aparecen en todos los seres vivos y emplean la energía procedente de la hidrólisis del enlace difosfato del ATP u otros nucleótidos trifosfato. La proteína transportadora puede estar o no fosforilada mientras que el sustrato transportado nunca está fosforilado.
2. Transportadores que emplean la energía de descarboxilación. Presentes en procariotas utilizan la energía procedente de la descarboxilación de un sustrato citoplasmático.
3. Transportadores que usan la energía de la transferencia de grupos metilo. Incluye únicamente las proteínas de la familia Na⁺-metiltetrahidrometanopterina: coenzima M metiltransferasa. Aparecen en arqueas.
4. Transportadores que utilizan la energía redox. Son universales y se caracterizan por aprovechar la energía del flujo exotérmico de electrones desde un sustrato reducido a un sustrato oxidado.
5. Transportadores que emplean la energía solar. Aparecen en arqueas, cloroplastos de eucariotas y bacterias, aprovechando la energía derivada de la absorción de la luz.

7.3.2.2.- Transporte activo secundario.

Es el tipo de transporte en el que se utiliza un gradiente electroquímico (fuerza protón motriz y fuerza sodio motriz) generado a partir de una energía primaria para mover un soluto en contra de gradiente de concentración. Existen diferentes tipos de transportadores (Putman *et al.*, 2000):

1. Portadores. Se caracterizan por transportar una gran variedad de sustratos como son sustratos orgánicos, inorgánicos (cationes, aniones) e incluso macromoléculas (azúcares, polioles, aminoácidos, nucleótidos y vitaminas). Están constituidos por 8 o más TMS y pueden actuar mediante uniporte, antiporte o simporte.
2. Transportadores de síntesis no-ribosomal. Son entidades no peptídicas (depsipéptidos) que llevan en su interior hidrofílico un catión que facilita la translocación del complejo a través de membrana a la que exponen su lado hidrofóbico. Si el transportador atraviesa la membrana el transporte se denomina electroforético (la molécula se mueve por gradiente electroquímico), mientras que si no lo hace se llama electroneutro (no cambia la carga ambos lados de la membrana al intercambiarse una sustancia cargada por otra).
3. Transportadores que utilizan el gradiente iónico. Estos transportadores emplean la fuerza protón motriz o sodio motriz para mover solutos hacia el periplasma en bacterias Gram negativas.

En la siguiente figura se muestran esquemáticamente los tipos de transporte activo y pasivo:

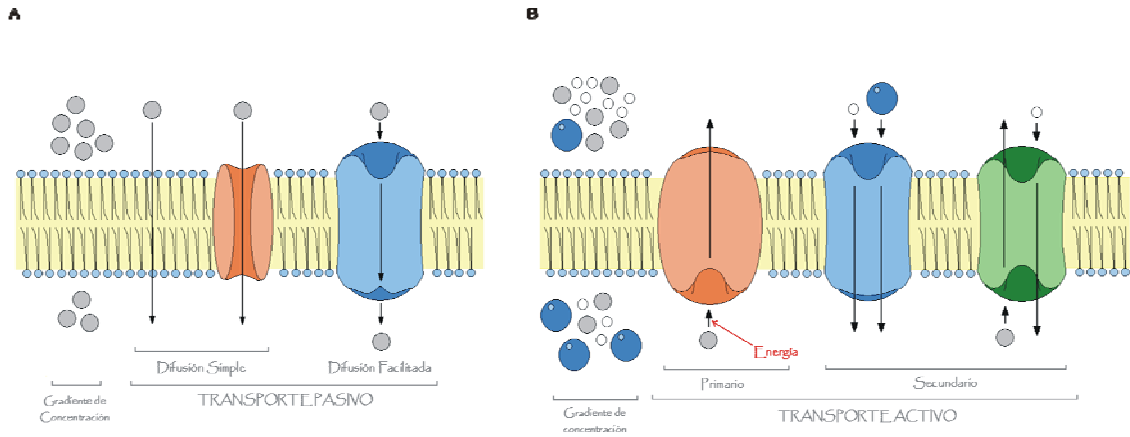


Figura 1.5. Tipos de transporte a través de la membrana plasmática. (A) Transporte pasivo. (B) Transporte activo. En ambos casos se indica el gradiente de concentración.

7.4.- Proteínas auxiliares del transporte.

En algunos casos, el proceso de transporte requiere la intervención de proteínas auxiliares que facilitan el transporte a través de la membrana pero no participan directamente en el mismo. Pueden actuar acoplando la energía, formando complejos con los transportadores, o bien participando en la regulación y estabilización del transporte (Saier, 2000).

A pesar de toda la clasificación expuesta, aún hoy en día múltiples proteínas auxiliares no han sido completamente caracterizadas, desconociéndose el modo en el que colaboran con otras proteínas para realizar los procesos de transporte. Muchas otras proteínas auxiliares han sido caracterizadas funcionalmente pero que no se han clasificado en ninguna familia concreta (Saier, 2000).

El sistema bacteriano fosfoenolpiruvato: azúcar PTS constituye un ejemplo de transporte diferente a los anteriormente indicados. En él se modifica por fosforilación el sustrato transportado. Este tipo de transportadores se clasifica dentro de los translocadores de grupo (Postma *et al.*, 1993).

7.5.- Familias de transportadores. Nomenclatura. Distribución en los seres vivos.

Los transportadores se clasifican en familias que incluyen a transportadores que, en general, utilizan un único modo de transporte, presentan el mismo mecanismo de acoplamiento de la energía y tienen la misma topología. Actualmente existen más de 250 familias de transportadores (Busch y Saier, 2002). Algunas son consideradas superfamilias por el gran número de transportadores que incluye como la MFS (del inglés “Major Facilitator Superfamily”), la ABC (del inglés “ATP-Binding Cassette”) y la VIC (del inglés “Voltage-Gated Ion Channel”). Otras familias son pequeñas e incluyen a pocos miembros, mientras que la mayoría tienen un tamaño medio (5-500 proteínas) (Saier, 2000).

En cuanto a la nomenclatura, los transportadores se nombran de acuerdo a las normas del sistema TCS (del inglés “Transport Commission System”) mediante un número TC de la forma

(W.X.Y.Z) siendo W, Y y Z dígitos y “X” una letra (Saier *et al.*, 1998). En este número “W” y “X” hacen referencia a la clase y a la subclase de transportador respectivamente. Estas categorías indican el tipo proteína transportadora y el tipo de transporte llevado a cabo. Por otro lado, “Y” se refiere a la familia y al tipo de familia dentro de una superfamilia. Finalmente, “Z” indica características como el sustrato transportado, el mecanismo de acoplamiento de la energía y la polaridad del transporte.

Las proteínas transportadoras evolucionaron como una clase de proteínas independiente, siendo su distribución variable dentro de los tres dominios de seres vivos (arqueas, bacterias y eucariotas). Otras familias son ubicuas, es decir, tienen una amplia distribución dentro de los tres dominios de seres vivos. Estas familias eran las más antiguas y surgieron antes de la divergencia de los tres dominios evolutivos hace unos 3000 millones de años. Algunas familias de transportadores suelen estar restringidas a uno de los dominios, por lo que habrían surgido tras la divergencia de éstos. Este hecho supone una ventaja, puesto que un determinado modo de transporte y acoplamiento de la energía puede ser beneficioso en un dominio pero desfavorable en otros. Las familias ubicuas suelen ser transportadores secundarios, los canales tipo α aparecen en eucariotas (animales), las porinas tipo β son bacterianos y los transportadores primarios aparecen en bacterias y en ocasiones también en eucariotas (Saier, 2000).

Es importante destacar la falta de homología entre algunas familias de transportadores, hecho que indica que la transferencia horizontal y la posterior fijación del material genético es mínima en estos casos (Paulsen, 2003; Saier, 2000).

8.- PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA SECRECIÓN DE ANTIBIÓTICOS.

8.1.- Características generales.

Los antibióticos son metabolitos secundarios producidos al final de la fase exponencial de crecimiento de los microorganismos productores. No son esenciales para la supervivencia y su biosíntesis depende en gran medida de la composición del medio de crecimiento. Poseen una amplia variedad de estructuras químicas y actividades biológicas. La síntesis de antibióticos se lleva a cabo mediante proteínas codificadas por genes organizados generalmente en agrupaciones génicas o “clusters” que están sometidos a mecanismos regulatorios perfectamente integrados (Vining, 1992; Martín, 2000).

El hecho de que los antibióticos sean frecuentemente tóxicos para el microorganismo productor, ha permitido el desarrollo de diferentes formas de resistencia a los mismos que de forma colateral también otorgan, en algunos casos, resistencia a otro tipo de sustancias tóxicas. Existen tres mecanismos principales de resistencia:

- Inactivación o secuestro de la molécula antibiótica de sus precursores activos: un ejemplo son las β -lactamas que son hidrolizadas por β -lactamasas.
- Modificación o reemplazamiento de las dianas celulares, para impedir que el antibiótico pueda reconocerlas.
- Alteración de la permeabilidad de la membrana para dificultar la entrada del antibiótico.

Las proteínas encargadas de la secreción de antibióticos están restringidas a organismos productores de dichos antibióticos y constituyen una parte integral de la vía biosintética. *A. chrysoeum* es un microorganismo productor de cefalosporinas y es muy probable que posea alguna proteína secretora de cefalosporinas además de la proteína CefT (Ullán *et al.*, 2002a) para exportar las sustancias al medio extracelular. Las proteínas de secreción de antibióticos poseen las siguientes características generales (van Bambeke *et al.*, 2000):

- Poseen una amplia especificidad de sustrato.
- Una misma proteína puede secretar diferentes antibióticos (generalmente de la misma familia).
- Forman parte de sistemas de resistencia de los microorganismos a muchas clases de antibióticos.
- Bloquean la acción intracelular de los antibióticos mediante su secreción al exterior de la célula, permitiendo la aparición de bacterias resistentes.
- Secretan sustratos polares que constan de una cabeza cargada asociada con un dominio hidrofóbico. La carga depende del pH que determina el tipo de ionización de la molécula.

Un tipo concreto de proteínas que en algunos casos participan en la secreción de antibióticos son las proteínas de resistencia a múltiples drogas (MDR). Son transportadores que se encargan de la detoxificación de diferentes compuestos tóxicos diversos estructuralmente, estando ampliamente distribuidos en la naturaleza. Desde el punto de vista energético, los transportadores de múltiples drogas actúan mediante dos sistemas (Putman *et al.*, 2000):

- **Transporte activo primario:** utilizando la energía procedente de la hidrólisis del ATP.
- **Transporte activo secundario:** utilizando la energía procedente de un gradiente electroquímico de protones o cationes sodio. En ambos casos la obtención de la energía se acopla al proceso de excreción de sustancias tóxicas.

8.2.- Tipos de proteínas secretoras de antibióticos.

Las proteínas encargadas de la secreción de antibióticos (revisión de Martín *et al.*, 2005) forman parte de las siguientes superfamilias de transportadores (van Bambeke *et al.*, 2000):

- Superfamilia SMR (Small Multidrug Resistance). Este tipo de proteínas posee 4 TMS así como los motivos conservados “a”, “b” y “c”. Actúan mediante antiporte protón motriz, siendo intercambiado el antibiótico por el protón de un resto glutámico del motivo

conservado “a”. Los antibióticos transportados son lipofílicos y multicatiónicos como las tetraciclinas, la eritromicina y la sulfadiazina (Paulsen *et al.*, 1996; Chung y Saier, 2001).

- Superfamilia RND (Resistance-Nodulation-cell Division). Estos transportadores poseen 12 TMS y los motivos conservados “a”, “b”, “c” y “d”. Actúan mediante antiporte protón motriz. Se caracterizan por transportar sustratos anfipáticos, sustratos cargados positivamente (tetraciclinas, fluoroquinolonas, eritromicina y rifampicina) o sustratos cargados negativamente (β -lactamas, fluoroquinolonas y ácido fusídico) (Tseng *et al.*, 1999).
- Superfamilia MFS (Major Facilitator Superfamily). Las proteínas de esta superfamilia se caracterizan por transportar sustratos anfipáticos, mono o dicatiónicos (tetraciclinas, fluoroquinolonas, eritromicina, lincosamidas, rifampicina y pristinamicina), aniónicos o neutros (cloramfenicol y aminoglicósidos) (Pao *et al.*, 1998; Saier, 2000).
- Superfamilia ABC (ATP-Binding Cassette). Este grupo incluye dos tipos principales de transportadores que se denominan MDR (Multi Drug Resistance) y MPR (Multidrug Resistance Protein). Los transportadores de tipo MDR tienen como sustratos antibióticos anfipáticos, neutros (cloramfenicol y aminoglicósidos) o catiónicos (tetraciclinas, fluoroquinolonas, macrólidos, lincosamidas y rifampicina). Los transportadores de tipo MPR se encargan del transporte de sustratos orgánicos, tanto aniónicos (fluoroquinolonas) como catiónicos (tetraciclinas y macrólidos) (Higgins, 1992; Decottingnies y Goffeau, 1997; Croop, 1998).

8.3.- Superfamilias MFS y ABC.

Las superfamilias MFS y ABC incluyen ejemplos de proteínas tanto bacterianas como fúngicas que participan en la secreción de antibióticos, por lo que en vista del objeto de este trabajo de investigación se dará una información más detallada de ambas.

8.3.1.- Superfamilia MFS.

Los miembros de la superfamilia MFS presentan una serie de características generales que los diferencian de otros tipos de transportadores (Saier *et al.*, 1999; Pao *et al.*, 1998; Paulsen *et al.*, 1996, 2003):

- Son ubicuos, existiendo transportadores de tipo MFS en bacterias, eucariotas y arqueas. Algunas familias están restringidas a un dominio biológico determinado.
- Son proteínas que poseen entre 400 y 800 aminoácidos con un peso molecular de entre 45 y 90 kDa (del Sorbo *et al.*, 2000).
- La mayor parte de las proteínas de esta superfamilia están implicadas en el transporte activo secundario mediante uniporte, antiporte o simporte. Las moléculas que transportan son de

naturaleza muy variada como azúcares, intermediarios del ciclo de Krebs, ésteres fosforilados, oligosacáridos, antibióticos y diversas drogas (Marger y Saier, 1993).

- Las proteínas de la superfamilia MFS tienen una estructura consistente en un gran dominio central, topológicamente citoplasmático, y 12 o 14 segmentos transmembrana (TMS). Todas las familias de la MFS se engloban dentro de uno u otro modelo de organización estructural (12 o 14 TMS) , constituyendo una de las familias proteicas más antiguas del planeta (Pao *et al.*, 1998)
- La familia MFS posee un motivo de 5 aminoácidos (RXGRR, donde “X” es cualquier aminoácido) muy conservado situado entre los segmentos transmembrana 2 y 3 (Henderson y Maiden, 1990). Dicho motivo tiene una configuración en lámina β que une los segmentos transmembranales adyacentes. Posteriormente ha sido ampliado a una secuencia de 7 residuos [RK]-X-G-R-[RK] (Pao *et al.*, 1998), donde los residuos catiónicos interactúan con las cargas negativas de los lípidos de membrana para el anclaje del transportador a la misma. Se ha encontrado un segundo motivo menos conservado entre los segmentos transmembrana 8 y 9 similar al encontrado entre los segmentos transmembrana 2 y 3 cuya secuencia consenso es GXXXDRKXCGRRK (Griffith *et al.*, 1992).
- Además, presentan una amplia especificidad de sustrato debido a la presencia de una gran cavidad hidrofóbica flexible, en la que pueden unir diferentes sustratos mediante puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas (Neyfakh, 2002; Paulsen, 2003).
- Finalmente, presentan una regulación local y global muy compleja (Grkovic *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista estructural, dentro de una familia existe una mayor similitud en la secuencia de la mitad amino terminal que en la mitad carboxilo terminal, aunque ambas mitades presentan un elevado grado de conservación. El dominio amino terminal parece estar implicado en la translocación del protón, mientras que el dominio carboxilo terminal determina la especificidad de sustrato (Griffith *et al.*, 1992).

Además las mitades amino y carboxilo terminal son bastante similares, lo que sugiere que este tipo de transportadores habría evolucionado mediante duplicación génica a partir de un ancestro común con 6 TMS (Rubin *et al.*, 1990), lo que explicaría la organización topológica de 12 TMS. En cuanto a la organización de 14 TMS puede haber aparecido mediante duplicación génica y posterior adquisición de 2 segmentos adicionales (Saier *et al.*, 1998).

Existen una serie de motivos conservados en la superfamilia MFS (Figura 1.6), algunos de ellos comunes a los dos tipos de topología de 12 TMS y 14 TMS, mientras que otros son específicos de cada tipo de topología (Putman *et al.*, 2000). Son los siguientes:

- **Motivos específicos de los 12 TMS:** el motivo D2 cuya secuencia consenso es lgxxxxPvxP situado al final del TMS 1 y el motivo G cuya secuencia consenso es GxxxGPL que se encuentra al final del TMS 11 (Putman *et al.*, 2000).
- **Motivos específicos de los 14 TMS:** el motivo D1 que tiene la secuencia consenso lDxTvxnvAIP localizado al final del TMS1; el motivo E de secuencia consenso DxxGxxL situado en el TMS 7; el motivo F cuya secuencia consenso es lgxxxGxavxgxl localizado en el TMS 13 y el motivo H con la secuencia consenso WxwxFlINvPig que se encuentra en el TMS 6 (Putman *et al.*, 2000).
- **Motivos comunes a 12 TMS y 14 TMS:** el motivo A cuya secuencia consenso es GxLaDrxGrkxx(x)l y se sitúa en el lazo de unión entre los segmentos transmembranales 2 y 3; el motivo B cuya secuencia consenso es lxxxRxxqGxgaa situado en el TMS 4 y el motivo C de secuencia gxxxGPxxGGxl que se localiza al final del TMS 5 (Putman *et al.*, 2000).

Esta serie de motivos tendría funciones diferentes: así el motivo A está implicado en los cambios conformacionales necesarios para la apertura y el cierre del canal de transporte. Por otro lado, la arginina conservada del motivo B participa en la transferencia de protones (Paulsen y Skurray, 1993) mientras que el motivo C (que sólo aparece en proteínas que actúan mediante simporte) interviene en el establecimiento de la dirección del transporte (Paulsen y Skurray, 1993) y la orientación del sitio de unión. Finalmente los motivos F y G poseen una función muy similar (Paulsen y Skurray, 1993).

En cuanto el mecanismo de transporte de los sustratos, parece que las proteínas de la superfamilia MFS llevan a cabo un transporte a través de la membrana plasmática, ya que muchos de los sustratos son hidrofóbicos. (Higgins y Gottesman, 1992). El proceso tiene lugar desde la cara interna de la membrana hasta el exterior celular, lo que requiere una alta afinidad del sustrato por los sitios de unión. De esta forma son muy importantes las interacciones del sustrato con aminoácidos polares, aromáticos y no polares en el proceso de unión.

Por último, la función fisiológica de las proteínas de la superfamilia MFS es la protección frente a diversas toxinas ambientales. Posiblemente, en un principio eran transportadores con una función diferente a la detoxificación de sustancias (por ejemplo, la secreción de metabolitos secundarios), pero las condiciones ambientales hicieron que adquirieran la capacidad de secretar los compuestos tóxicos (Neyfakh, 1997).

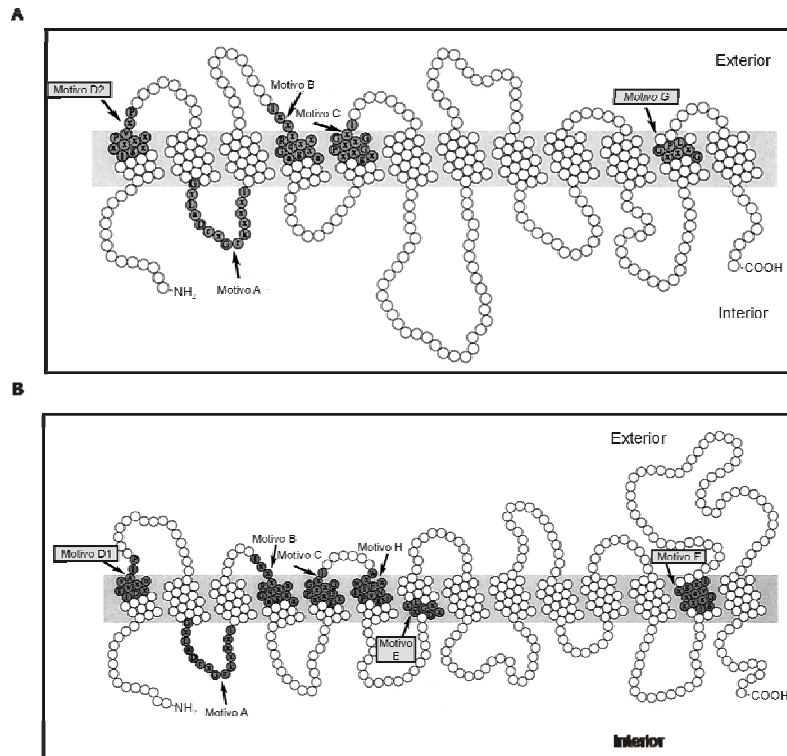


Figura 1.6. Esquema de la topología de las proteínas MFS donde aparecen recuadrados los motivos específicos de cada una de ellas. (A) Esquema de las proteínas con topología de 12-TMS. (B) Esquema de las proteínas con topología de 14-TMS.

La superfamilia MFS se divide en 29 familias que se recogen en el anexo I de esta tesis.

8.3.2- Superfamilia ABC.

Los transportadores de la superfamilia ABC (ATP Binding Cassette) actúan mediante transporte activo primario con la energía que proporciona la hidrólisis del ATP, por lo que son llamados ATPasas. Representan una de las mayores superfamilias de transportadores y están ampliamente distribuidas en la naturaleza, siendo capaces de exportar o importar una gran variedad de sustratos como aminoácidos, iones, azúcares, lípidos y drogas. (Couture *et al.*, 2006; Chang, 2003). Además, agrupa incluso a transportadores de eucariotas que están implicados en la resistencia a diferentes agentes quimioterapéuticos (Paulsen y Skurray, 1993).

8.3.2.1.- Estructura de las proteínas ABC.

Las proteínas ABC poseen entre 1300-1600 aminoácidos con un peso molecular deducido de entre 140 y 170 kDa estando codificadas por un único gen. La mayoría de los transportadores ABC poseen una topología (TMD₆-NBF)₂ o (NBF- TMD)₂. Debido a esta organización bimodular, los transportadores ABC pueden ser homodímeros o heterodímeros (del Sorbo *et al.*, 2000; Higgins, 1992). Los dominios transmembrana (TMD) son regiones de la proteína que contienen los sitios de unión al sustrato. La especificidad de reconocimiento de dicho sustrato, depende de las diferencias estructurales en estos dominios. Además transportan los sustratos hidrofílicos mediante una “vía hidrofílica” que establecen a través de la membrana. En su función pueden necesitar la participación de una proteína colaboradora periplásmica para facilitar el transporte (Chang, 2003).

Los transportadores de la superfamilia ABC comparten entre un 30-50 % de homología en su secuencia, siendo los dominios NBD (nucleotide binding domain) las zonas con un mayor grado de conservación. Los dominios de unión de nucleótidos hidrofílicos (NBD) son regiones situadas hacia el citoplasma celular en las que se encuentran los sitios de unión e hidrólisis del ATP, liberando la energía necesaria para el transporte de los sustratos (Higgins, 1992; Schneider y Hunke, 1998). Además contienen los motivos conservados “Walker A” y “Walker B” y la secuencia ABC (que precede al motivo “Walker B”), característica de esta superfamilia. La secuencia ABC es responsable de la transducción de la energía de la hidrólisis del ATP para que se produzcan los cambios conformacionales necesarios en los dominios TMD para la translocación del sustrato (Hyde *et al.*, 1990). La secuencia consenso de la secuencia ABC, también llamada motivo C, es (L,V)-SGG-(X)₃-R-aminoácido hidrofóbico-X-aminoácido hidrofóbico-A. Entre los motivos conservados “Walker” existen otros lazos llamados Q, D y H que poseen aminoácidos conservados implicados tanto en la unión del ATP como en su hidrólisis (Higgins, 2001).

Los dominios NBD de cada uno de los dos módulos en los que se organizan habitualmente las proteínas ABC son funcionalmente equivalentes, pero existen diferencias estructurales que hacen que en el ciclo catalítico de transporte el funcionamiento de una y otra sean diferentes. Así por ejemplo en los dominios NBD1 existe un menor espacio entre el motivo Walker A y la secuencia ABC. Además el motivo C del dominio NBD2 es diferente al del dominio NBD1 (Cole *et al.*, 1992). Por último, la afinidad del dominio NBD1 por el ATP es de 2 a 3 veces mayor que en el dominio NBD2, dependiendo la unión e hidrólisis del ATP en el dominio NBD2 de la unión del ATP en el dominio NBD1 (Yang *et al.*, 2003).

Desde un punto de vista estructural, en función de la topología pueden establecerse 3 grupos de transportadores (Deeley *et al.*, 2006):

- Proteínas ABC “cortas”: constan de dos dominios transmembrana hidrofóbicos llamados TMD1 y TMD2 con 6 TMS (con estructura secundaria en hélice α) cada uno y dos dominios de unión de nucleótidos hidrofílicos (NBD). Los dominios NBD poseen los motivos conservados “Walker A” y “Walker B” junto con la secuencia ABC, implicada en la unión del ATP y en el acoplamiento de su hidrólisis con el transporte (Higgins, 1992).
- Proteínas ABC “largas”: poseen tres dominios transmembrana hidrofóbicos denominados TMD0, TMD1 y TMD2. Los dominios TMD1 y TMD2 son equivalentes a los mismos dominios de las proteínas ABC “cortas”. El otro dominio transmembrana (TMD0) se localiza hacia el extremo amino terminal extracelular de la proteína y posee entre 4-6 TMS (normalmente 5 hélices α). Este dominio está poco conservado pero parece estar implicado en la localización de la proteína en la membrana del retículo endoplasmático y de vacuolas, puesto que posee diferentes señales de localización (Westlake *et al.*, 2005).
- Proteínas ABC semi-transportadores: poseen un único dominio transmembrana (TMD) y un único dominio de unión de nucleótidos (NBD) (Wanders *et al.*, 2007).

8.3.2.2.- Clasificación de la superfamilia ABC.

La superfamilia de transportadores ABC se subdivide en tres familias diferentes en función de su distribución biológica y también de acuerdo a su función como exportadores o importadores (Fath y Kolter, 1993):

- Transportadores ABC de eucariotas: son complejos con 2 dominios NBD asociados a 2 dominios TMD, originados por una duplicación génica y que no requieren otras subunidades para su función. En este caso, tanto el dominio NBD como el dominio TMD se sintetizan incluidos en el mismo polipéptido.

Los transportadores de tipo ABC de humanos, que se incluyen dentro de la familia de transportadores ABC de eucariotas, se clasifican en siete subfamilias que se nombran de la A a la G de acuerdo con la secuencia aminoacídica de las proteínas, la organización de los dominios y la similitud entre los genes que las codifican (Dean *et al.*, 2001 Couture *et al.*, 2006). Las subfamilias B (MDR, Multidrug Resistance) y C (MRP, Multidrug Resistance-Associated Protein) están implicadas en el transporte de drogas. Otras subfamilias están encargadas del mantenimiento de la bicapa lipídica mediante el transporte de ácidos grasos y esteroides. La mutación de algunos de los genes es responsable, en humanos, de la aparición de diversas enfermedades como fibrosis quística, desórdenes neurológicos, anemia, degeneración de la retina y alteraciones en el transporte de colesterol y sales biliares entre otras patologías (Dean *et al.*, 2001).

- Importadores ABC bacterianos (permeasas periplasmáticas): son sistemas compuestos por varias subunidades y poseen una proteína hidrofílica asociada a la membrana que contiene el dominio NBD. En algunos de estos sistemas esta proteína está asociada a su vez con otras dos proteínas hidrofóbicas (Kerppola *et al.*, 1991). Además existe una proteína de unión situada en el periplasma, cuya función es interaccionar con el sustrato para que pueda ser importado por el sistema anterior. Los dominios NBD y TMD se sintetizan como parte de polipéptidos distintos.
- Exportadores ABC bacterianos: constan de los componentes necesarios para formar un complejo de 4 dominios, pudiendo encontrarse el dominio NBD y el dominio TMD en el mismo polipéptido o en polipéptidos diferentes. Constituyen el grupo más amplio de las tres familias mencionadas y pueden mediar en el transporte de proteínas, péptidos y sustratos de naturaleza no proteica.

Tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas existen una serie de proteínas accesorias que facilitan la secreción de las moléculas a transportar (Mackman *et al.*, 1987; Delepelaire y Wandersman, 1991). En bacterias Gram negativas con exportadores ABC, dichas proteínas se encuentran a ambos lados de la membrana plasmática y aparecen también en el periplasma actuando como un punto de unión entre la membrana externa e interna. Los genes que codifican estas proteínas accesorias se encuentran asociados a los que codifican los diferentes

transportadores ABC (Wanders y Delepelaire, 1990). Además en exportadores de sustratos no proteicos aparecen otro tipo de proteínas llamadas factores de membrana externa y factores accesorios (Glaser *et al.*, 1988). En bacterias Gram positivas, existen otros factores accesorios, siendo en este caso incierto su papel en la secreción de las moléculas puesto que sólo existe una única membrana en este tipo de microorganismos.

8.3.2.3.- Mecanismo de transporte. Ciclo de transporte.

Los transportadores de la superfamilia ABC actúan como ATPasas, puesto que acoplan la energía de la hidrólisis del ATP con el transporte de un sustrato, en contra de gradiente de concentración. El mecanismo de la hidrólisis de ATP está conservado y aunque existen pequeñas variaciones en la forma de acoplar la energía entre los transportadores que actúan como exportadores de moléculas hidrofóbicas y los que actúan como importadores de moléculas hidrofílicas (Saurin *et al.*, 1999). Además en un transportador ABC la actividad ATPasa depende de la cooperación y las interacciones entre los dos dominios NBD.

Los transportadores ABC de tipo MDR son flipasas que participan en la secreción de lípidos y moléculas hidrofóbicas mediante un mecanismo de “flip-flop”. Anclan los sustratos a la membrana y los mantienen secuestrados en las inmediaciones de una cámara delimitada por los dominios TMD que favorece la salida de los sustratos (Chang, 2003).

El ciclo de transporte de una proteína ABC consta de los siguientes pasos (Deeley *et al.*, 2006):

1. Unión del sustrato (o de GSH, glutation reducido, en los sustratos dependientes de GSH) en los sitios de alta afinidad de los dominios TMD. Dicha unión induce cambios conformacionales que facilitan la unión de ATP al dominio NBD1.
2. Unión del ATP al dominio NBD1. Esto genera una interacción entre los dominios NBD1 y NBD2 a través del motivo C de NBD2, facilitando a su vez la unión de otra molécula de ATP a NBD2.
3. Liberación del sustrato. La unión de la segunda molécula de ATP facilita la formación de un dímero cerrado NBD1-2. Dicha unión, provoca cambios conformacionales en NBD2 que se transmiten a los dominios TMD y hacen que disminuya la afinidad por el sustrato liberándolo.
4. La proteína se mantiene en un estado de baja afinidad por el sustrato tras la hidrólisis del ATP en el dominio NBD2. El dominio NBD1 está ocupado por ATP hasta que el ADP no se libere del dominio NBD2.
5. La proteína vuelve al estado inicial si el ADP se libera del dominio NBD2 y si además se produce la hidrólisis del ATP en el dominio NBD1.

9.- PROTEÍNAS MFS FÚNGICAS IMPLICADAS EN LA SECRECIÓN DE ANTIBIÓTICOS.

En hongos filamentosos el único caso descrito de proteínas de la superfamilia MFS implicadas en la secreción de antibióticos β -lactámicos es la proteína CefT de *A. chrysogenum* (Ullán *et al.*, 2002a). Dicho transportador se incluye en la familia 3 de la superfamilia MFS. Posee 12 TMS y los motivos conservados A, B, C, D2 y G característicos de esta familia. El mecanismo de transporte que utiliza esta proteína es un transporte activo secundario mediante antiporte protón motriz. Además posee el motivo característico de la superfamilia MFS localizado entre los TMS2 y TMS3 cuya secuencia consenso es GXXXDRKXCGRRK, donde “X” es un aminoácido cualquiera (Griffith *et al.*, 1992)

En *A. chrysogenum*, CefT participa en la secreción de cefalosporinas, como demuestra el hecho de que la sobreexpresión de este transportador aumente la cantidad de cefalosporinas secretadas. Sin embargo, la inactivación no disminuye a la secreción de cefalosporinas, por lo que deben existir otros sistemas de secreción adicionales (Ullán *et al.*, 2002a). Otra posible función de CefT es que actúe como proteína sensora de las condiciones del medio externo, integrando las señales extracelulares con la biosíntesis de cefalosporinas.

En *P. chrysogenum* transformado con el gen *cefT* de *A. chrysogenum*, se ha demostrado recientemente que la proteína CefT se localiza en la membrana plasmática (Nijland *et al.*, 2008). La expresión heteróloga de este transportador ha permitido determinar que participa en la secreción de desacetilcefalosporina C (DAC) y de penicilinas hidrofílicas (IPN y PenN), pero no transporta penicilinas hidrofóbicas como penicilina G (Ullán *et al.*, 2008b). Por tanto, la proteína CefT es un transportador con una amplia especificidad de sustrato encargado del transporte de β -lactamas hidrofílicas como DAC e IPN.

10.- PROTEÍNAS ABC FÚNGICAS IMPLICADAS EN EL TRANSPORTE DE DROGAS.

En hongos filamentosos, los transportadores de tipo ABC están implicados fundamentalmente en la detoxificación de drogas, confiriendo resistencia a diferentes sustancias tóxicas como las proteínas de las familias MDR y MRP (Gottesman y Pastan, 1993). Este tipo de proteínas pueden transportar diferentes sustratos similares, aunque su estructura (tamaño y topología) y secuencia primaria sean diferentes. Asimismo las variaciones en la composición de la membrana pueden modificar la especificidad del tipo de sustrato reconocido y la actividad ATPasa del transportador (de Waard *et al.*, 2006).

Dentro de este grupo de proteínas fúngicas implicadas en la secreción de antibióticos, únicamente se ha descrito el transportador AtrD de *Aspergillus nidulans* (Andrade *et al.*, 2000). La proteína AtrD de *A. nidulans* participa en la secreción de penicilinas, ya sea de una forma directa o

indirecta actuando en la transducción de señales que regulan la maquinaria de secreción de este antibiótico. Otra función de AtrD es la destoxicación de diversos compuestos tóxicos como son ciclosporina, nigericina, valinomicina y el fungicida fenarimol. Además la existencia en el promotor de *atrD* de un sitio de unión para AflR, (un regulador de la síntesis de esterigmatocistina y precursor de diversos tipos de aflatoxinas), amplía el papel de AtrD como una proteína de tipo MDR (Andrade *et al.*, 2000).

En hongos saprófitos del suelo como *A. nidulans* existen diversos transportadores de tipo ABC que están encargados de la eliminación de toxinas, debido fundamentalmente a la presencia de las mismas en el suelo. Así aunque la función inicial de estas proteínas fuera la secreción de metabolitos secundarios, se han especializado en la detoxificación de compuestos tóxicos (Neyfakh, 1997). No se han descrito otros ABC encargados de la secreción de antibióticos y normalmente sólo se conoce su papel como proteínas de resistencia a diferentes drogas.

11.- COMPARTIMENTALIZACIÓN DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS.

Los hongos filamentosos poseen células con el citoplasma separado del exterior por una membrana plasmática rodeada de una pared celular compuesta de polímeros que permite el paso de moléculas con un tamaño menor de 700 Da (Kuhn *et al.*, 1990). La membrana plasmática constituye la principal barrera entre el medio externo y el citoplasma. Se compone de glicerofosfolípidos combinados con elevadas cantidades de esteroides que tensan el empaquetamiento de los lípidos reduciendo la permeabilidad de la membrana, junto con pequeñas cantidades de esfingolípidos y glicolípidos (van der Rest *et al.*, 1995). Además existen una serie de endomembranas que delimitan toda una serie de orgánulos como el núcleo, el retículo endoplasmático, las mitocondrias, los microcuerpos, los cuerpos de Woronin y diferentes vesículas (Pringle *et al.*, 1997).

La existencia de estas endomembranas posibilita la generación de microambientes diferentes en distintos compartimentos subcelulares. Precisamente ese confinamiento de los pasos de la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos en estos compartimentos hace necesarios toda una serie de procesos de transporte que permitan tanto la entrada de precursores como la liberación de productos del compartimento en cuestión (van de Kamp *et al.*, 1999). La compartimentalización de las reacciones metabólicas permite una adecuada regulación y determinación de los flujos metabólicos en los que las concentraciones de los sustratos son óptimas para que las enzimas cumplan su función. Algunas rutas del metabolismo primario están compartimentalizadas en parte (Gow y Gadd, 1995), mientras que en el metabolismo secundario no se conoce mucho sobre dicha compartimentalización (van de Kamp *et al.*, 1999).

En *P. chrysogenum*, la ruta de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos está compartimentalizada (van de Kamp *et al.*, 1999; Evers *et al.*, 2004), permitiendo que las reacciones transcurran de forma óptima entre el citoplasma y los peroxisomas. Esto hace necesario que se establezcan toda una serie

de flujos de precursores, intermediarios y productos finales a través de las diferentes membranas, con el fin de que entren y salgan los sustratos necesarios y los productos formados en dicho proceso.

11.1.- Localización de las enzimas de la ruta de biosíntesis de penicilinas.

En *P. chrysogenum* la ruta biosintética de penicilinas tiene lugar en dos compartimentos celulares bien definidos: el citoplasma y los microcuerpos (Figura 1.7). Diferentes estudios de inmunoelectromicroscopía y de fraccionamiento celular han permitido determinar que los dos primeros pasos de la ruta de biosíntesis de penicilinas transcurren en el citosol, mientras que el último paso que conduce hacia la síntesis de penicilina G o penicilina V, (dependiendo del tipo de cadena lateral añadida) tiene lugar en los microcuerpos (Müller *et al.*, 1991, 1992; van der Lende *et al.*, 2002).

11.1.1.- δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa (ACVS).

El primer paso de la ruta de biosíntesis tanto de penicilinas como de cefalosporinas es la formación del tripéptido δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (LLD-ACV) catalizado por la enzima ACV sintetasa (Figura 1.7). Dicha proteína es un complejo multienzimático codificado por el gen *pcbAB* (Díez *et al.*, 1990; Gutiérrez *et al.*, 1991b).

La localización de la ACV sintetasa ha permanecido sin esclarecerse durante mucho tiempo. Durante un tiempo, se pensó que esta enzima era una proteína asociada a membrana y que se encontraba en vesículas del aparato de Golgi o tal vez en vacuolas (Lendenfeld *et al.*, 1993). Sin embargo, existían una serie de evidencias que se oponían a esta posible opción como la carencia de señales de localización en retículo endoplasmático o vacuolas de la enzima; la ausencia de segmentos transmembranales en la proteína y la inestabilidad de dicha enzima en el ambiente proteolítico de la vacuola. En resumen, todos estos hechos hicieron que se descartara la localización vacuolar de la ACV sintetasa.

Estudios de inmunoelectromicroscopía permitieron determinar que en *P. chrysogenum* la ACV sintetasa se localiza en el citoplasma celular (van der Lende *et al.*, 2002). En otros hongos filamentosos como *A. nidulans* (Vousden y Turner, 2001) dicha enzima también se localiza en el citoplasma. Estos resultados son más coherentes con el valor óptimo del pH de la enzima de entorno a 8, cercano al valor del pH del citoplasma. Además los sustratos aminoácidos (junto con ciertos cofactores necesarios para el funcionamiento de la ACV sintetasa) están disponibles en el citoplasma, evitando de esta manera procesos de transporte de los mismos. Por otro lado, el producto ACV se forma en el mismo lugar en el que es utilizado por la siguiente enzima de la ruta, la isopenicilina N sintasa. El hecho de que el gen *pcbAB* tenga un origen procariótico también apoya la hipótesis de que la ACV sintetasa tenga una localización citoplasmática (Smith *et al.*, 1992).

11.1.2.- Isopenicilina N sintasa (IPNS).

El segundo paso común a las rutas de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas es la ciclación del tripéptido LLD-ACV para formar isopenicilina N (Figura 1.7), primer intermediario bioactivo de la ruta. Este paso está catalizado por la isopenicilina N sintasa codificada por el gen *pcbC* (Barredo *et al.*, 1989a). Esta enzima es citosólica, como se ha demostrado mediante estudios de inmunoelectromicroscopia y fraccionamiento celular (Müller *et al.*, 1991). Esta localización celular viene confirmada por la ausencia de señales de localización en orgánulos, de segmentos transmembranales y el valor óptimo de pH de la enzima. De esta forma, se acopla la formación del tripéptido con su posterior ciclación lo cuál facilita el flujo hacia la formación de penicilinas o cefalosporinas (van de Kamp *et al.*, 1999; Evers *et al.*, 2004).

11.1.3.- Acilcoenzima A: isopenicilina N aciltransferasa (IAT).

El último paso de la ruta de biosíntesis de penicilinas en *P. chrysogenum* y *A. nidulans* consiste en el intercambio de la cadena lateral del ácido L- α -aminoadípico por el ácido fenilacético o fenoxiacético formando penicilina G (PenG) o penicilina V (PenV), respectivamente (Álvarez *et al.*, 1993) (Figura 1.7). Este paso está catalizado por la enzima acilcoenzima A: isopenicilina N aciltransferasa codificada por el gen *penDE* (Barredo *et al.*, 1989b; Tobin *et al.*, 1990). Dicha enzima cataliza la transferencia de la cadena lateral activada como un tioéster de coenzima A.

La IPNS se localiza en microcuerpos (peroxisomas) como han confirmado los estudios de inmunoelectromicroscopia (Müller *et al.*, 1991). De hecho, dicha proteína posee la señal de localización peroxisomal “ARL” (PTS-1, del inglés “Peroxisomal Targeting Signal-1”) en su extremo carboxilo terminal. La enzima se forma como una preproteína inactiva que sufre un procesamiento autocatalítico originando un heterodímero (Fernández *et al.*, 2003) que es importado a la matriz peroxisomal (Subramani, 1996).

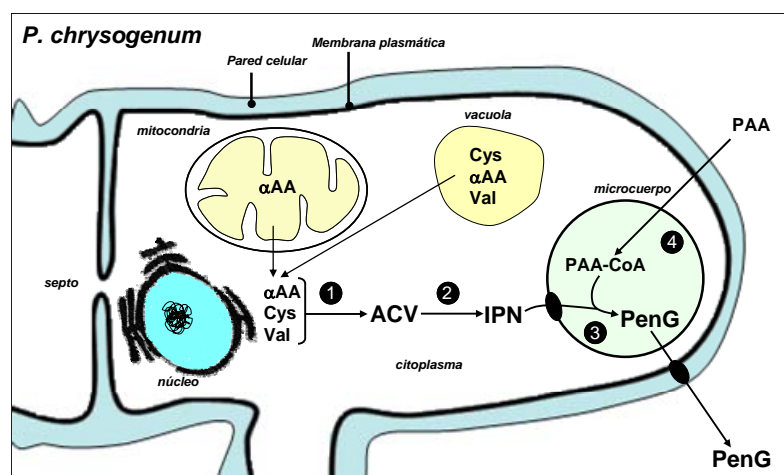


Figura 1.7. Modelo de la compartimentalización de la ruta de biosíntesis de penicilinas en *P. chrysogenum*. Se indica la localización de las enzimas de la ruta: ACV sintetasa (1); IPN sintasa (2); IAT (3); fenilacetilcoenzima A ligasa, PCL (4); ácido L- α -aminoadípico (α AA); ácido fenilacético (PAA); fenilacetilcoenzima A (PAA-CoA).

11.2.- Localización de las enzimas específicas de la ruta de biosíntesis de cefalosporinas.

En *A. chrysogenum* se piensa que todos los pasos exclusivos de la biosíntesis de cefalosporinas transcurren en el citoplasma (Van de Kamp *et al.*, 1999; Evers *et al.*, 2004). Sin embargo, aunque no existen evidencias experimentales de su posible localización, es probable que la epimerización de la cadena lateral de la IPN a PenN (Ullán, 2002), catalizada por la acción conjunta de las enzimas CefD1 y CefD2, tenga lugar en los peroxisomas (Figura 1.8). La proteína CefD1 presenta homología con acilcoenzima A sintetatas de ácidos grasos y posee la señal PTS-1 “PRL”, mientras que la proteína CefD2 es similar a α -metilacil-coenzima A racemasas y tiene tanto la señal PTS-1 “EKL” como la señal peroxisomal PTS-2, que es un nonapéptido de la región amino terminal cuya secuencia consenso es (RK)(LVI)X₅(HQ)(LAF) (Reumann, 2004) “¹²KLVVELAGL”. El hecho de que ambas proteínas presenten señales de localización peroxisomal junto con la existencia de homología con enzimas del metabolismo de ácidos grasos sugiere la posible localización peroxisomal o en microcuerpos de este paso limitante de la ruta (Vaca-Cerezo, 2008).

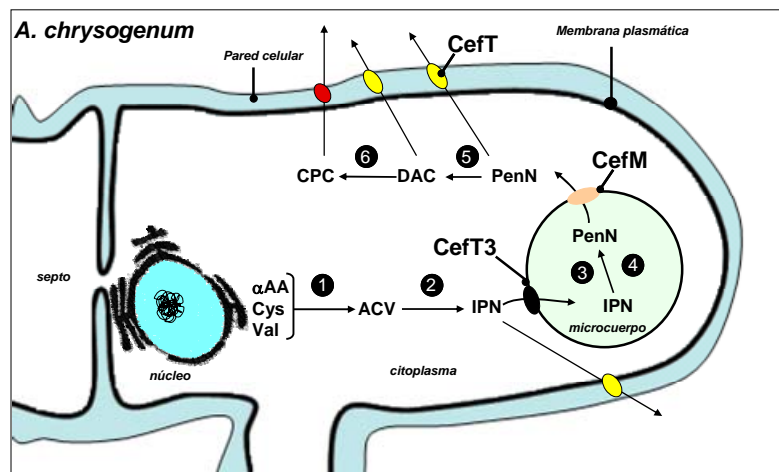


Figura 1.8. Modelo de la compartimentalización de la ruta de cefalosporinas en *A. chrysogenum*. Se indica la localización de las enzimas de la ruta: ACV sintetasa (1); IPN sintetasa (2); isopenicilil N-CoA sintetasa (3); isopenicilil N-CoA epimerasa (4); desacetoxicefalosporina C sintetasa (expandasa)/ desacetoxicefalosporina C sintetasa (hidroxilasa) (5); desacetilcefalosporina C acetiltransferasa (6).

11.3.- Localización de enzimas accesorias de la ruta de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos.

En la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos intervienen una serie de enzimas auxiliares propias del metabolismo primario (van de Kamp *et al.*, 1999) que se describen a continuación.

11.3.1.- Acilcoenzima A sintetasa (ACS).

La enzima ACS lleva a cabo la activación de la cadena lateral de las penicilinas mediante tioesterificación formando ésteres de coenzima A que implican gasto de energía. En hongos filamentosos como *A. nidulans* y *P. chrysogenum* se ha determinado que esta proteína tiene una localización citoplasmática (Gouka *et al.*, 1993; Connerton *et al.*, 1990). Parece que en la síntesis de

penicilinas, la activación que realiza la ACS es escasa en la síntesis de penicilinas puesto que la inactivación de este gen no afecta a dicho proceso de forma notable (Martínez-Blanco *et al.*, 1992).

11.3.2.- Fenilacetilcoenzima A ligasa (PCL).

La enzima PCL pertenece a la familia de las aciladenilato ligasas que activan los ácidos como tioésteres de coenzima A con gasto de energía. En el caso concreto de *P. chrysogenum* pertenece a las arilcoenzima A ligasas de tipo 4-coumaroil-coenzima A ligasas y es similar a la de *A. nidulans*. Es una enzima que capta los ácidos fenilacético y fenoxiacético, y los activa, transfiriéndolos activados a la IAT (Lamas-Maceiras *et al.*, 2006; Koetsier *et al.*, 2008). Se han identificado dos aril-CoA ligasas (Lamas-Maceiras *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007) que están localizadas en peroxisomas (Kiel *et al.*, 2009). La localización peroxisomal de PCL hace que los precursores activados que genera, que son sustratos de la IAT (también peroxisomal), se encuentren en altas concentraciones en el compartimento celular donde son utilizados lo cuál es energéticamente favorable para la célula (Evers *et al.*, 2004).

11.3.3.- Disulfuro reductasas.

Las disulfuro reductasas son enzimas que se encargan de reducir compuestos con un puente disulfuro. Un ejemplo de este tipo de proteínas es la enzima TrxAB, una disulfuro reductasa de amplio rango dependiente de NADPH y tiorredoxina, cuya función es reducir el bis-ACV (un dímero de ACV) (Theilgaard *et al.*, 1997). De esta forma dicho compuesto puede entrar de nuevo en la ruta de biosíntesis de penicilinas. La enzima TrxAB se localiza en el citoplasma (Cohen *et al.*, 1994).

11.3.4.- Acilasas de antibióticos β -lactámicos.

La penicilina acilasa de *P. chrysogenum* forma 6-APA a partir de la penicilina G y se ha demostrado que es una enzima citoplasmática (Álvarez *et al.*, 1993).

11.3.5.- Catalasa.

La catalasa está implicada en la formación de p- u o-hidroxipenicilinas por hidroxilación de ésteres de su cadena lateral. Se localiza en peroxisomas (Müller *et al.*, 1991; Valenciano *et al.*, 1998).

11.4.- Transporte de intermediarios de la ruta de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas.

El LLD-ACV es un compuesto que se acumula extracelularmente durante las fermentaciones de las cepas con una elevada producción de penicilinas (López-Nieto *et al.*, 1985; Jørgensen *et al.*, 1995). Se encuentra presente como bis-ACV o una mezcla de disulfidos reducidos. Una elevada concentración de este intermediario inhibe a la enzima que lo produce (ACVS) (Theilgaard *et al.*, 1997). El LLD-ACV es secretado al medio externo mediante un sistema que emplea glutatión (del

Carmen Mateos y Sánchez, 1990), pero no es captado del medio extracelular debido posiblemente a su rápida oxidación a bis-ACV (García-Estrada *et al.*, 2007).

El intermediario IPN es una molécula hidrofílica polar para la que se desconoce el mecanismo de secreción al medio extracelular. Sin embargo, se ha comprobado que este proceso depende de los niveles intracelulares de fenilacetilcoenzima A, disminuyendo la secreción de IPN a concentraciones elevadas de fenilacetilcoenzima A. El hecho de que la IPN tenga que entrar dentro del peroxisoma para la formación de penicilinas aromáticas, junto con el hecho de que la IPN no pueda atravesar fácilmente la membrana peroxisomal, hacen pensar en la existencia de alguna proteína transportadora de membrana peroxisomal (PMP, Peroxisomal Membrane Protein) específica que asegure una adecuada concentración de este intermediario en la matriz peroxisomal (García-Estrada *et al.*, 2007).

El 6-APA es un intermediario más hidrofóbico que la IPN en la ruta de biosíntesis de penicilinas. Se forma mediante una penicilina acilasa a partir de las penicilinas aromáticas cuando el aporte de precursores de la cadena lateral es escaso (Henriksen, 1996). En *P. chrysogenum*, se ha comprobado que este compuesto es captado eficientemente desde el medio extracelular para la formación de penicilinas aromáticas (García-Estrada *et al.*, 2007). Se desconoce el mecanismo de exportación del 6-APA al medio externo o su importación al citoplasma y a la matriz peroxisomal, aunque podría ser mediante difusión pasiva, por su propio carácter hidrofóbico (García-Estrada *et al.*, 2007).

El ácido 6-oxopiperidin-2-carboxílico (OPC) es un isómero circular del ácido L- α -aminoadípico que se acumula extracelularmente. Su secreción tiene lugar mediante un mecanismo aún no determinado pero que está relacionado con la existencia de una elevada concentración intracelular de ácido L- α -aminoadípico que es tóxico para la célula (Hönlinger y Kubicek, 1989). Parece que la IAT podría estar implicada en la formación de OPC, aunque también podrían estarlo otras enzimas independientes de la ruta de biosíntesis de penicilinas (Henriksen *et al.*, 1998).

La desacetilcefalosporina C (DAC) y la penicilina N (PenN, isómero D de la IPN), son dos intermediarios de la ruta de biosíntesis de cefalosporinas que se acumulan extracelularmente durante las fermentaciones de *A. chrysogenum* (Nüesch *et al.*, 1987). Aunque se desconoce el mecanismo de secreción de estas dos moléculas, recientemente se ha descrito la proteína CefT como un posible transportador de DAC, PenN e IPN tras su expresión heteróloga en *P. chrysogenum* (Ullán *et al.*, 2008b).

11.5.- Transporte de penicilinas aromáticas y cefalosporina C.

Existen tres posibles mecanismos de secreción de penicilinas aromáticas y cefalosporina C en *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* respectivamente (Evers *et al.*, 2004): difusión pasiva, transporte a través de vesículas o mediante transportadores. La primera opción (la difusión pasiva) parece un mecanismo de transporte improbable, ya que aunque las penicilinas aromáticas son compuestos moderadamente hidrofóbicos, la membrana plasmática de los hongos filamentosos es rica en

ergosterol. Precisamente este ergosterol disminuye la permeabilidad de la membrana y dificulta este tipo de transporte. Por tanto, deben existir proteínas transportadoras encargadas de dicha secreción ya que las penicilinas son compuestos que pueden resultar tóxicos para el organismo productor al establecer interacciones lipofílicas que las anclan a la membrana plasmática y las endomembranas. Esto último, tampoco apoya la difusión pasiva como mecanismo de secreción (Sikkema *et al.*, 1995). La proteína AtrD es el único caso descrito hasta la fecha implicado en la secreción de penicilinas en *A. nidulans* (Andrade *et al.*, 2000). Con respecto a la cefalosporina C, una molécula más hidrofílica que las penicilinas aromáticas, es probable que exista un transportador encargado de su secreción. Aunque la proteína CefT está implicada en la secreción de DAC (Ullán *et al.*, 2008b), lo cuál se ha comprobado tras su expresión heteróloga en *P. chrysogenum*, el hecho de que la inactivación del gen que la codifica no afecte a la secreción de cefalosporinas indica que deben existir otros sistemas de secreción adicionales aún desconocidos (Ullán *et al.*, 2002a). Por último, el transporte mediante vesículas de penicilinas aromáticas y cefalosporina C que se fusionarían con la membrana plasmática para liberar su contenido al exterior, es otra opción que no se descarta, aunque no existen evidencias experimentales del mismo (Evers *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2009).

11.6.- Papel de los peroxisomas y las vacuolas en la ruta de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas.

Los microcuerpos (glicosomas, glioxisomas y peroxisomas) son orgánulos importantes que están presentes en las células eucariotas que cumplen diversas funciones en rutas específicas tanto del metabolismo primario como del secundario. Así parece que están implicados en la biosíntesis de plasmalógenos en mamíferos; la fotorrespiración en plantas; la glucólisis en tripanosomas; la β -oxidación de los ácidos grasos y dicarboxilatos; el metabolismo primario de fuentes de carbono inusuales y la metabolización del peróxido de hidrógeno, del glioxilato, del colesterol y de lípidos tipo éter (Parsons *et al.*, 2001; Visser *et al.*, 2007).

Los microcuerpos están formados por una matriz proteica envuelta por una membrana simple que tiene un bajo contenido en ergosterol (Heiland y Erdmann, 2005). Dicha membrana es impermeable a pequeñas moléculas como son el NAD(P)H, el acetilcoenzima A y los ácidos grasos activados (Visser *et al.*, 2007). Por este motivo, deben existir proteínas transportadoras en la membrana de los microcuerpos encargadas del transporte de este tipo de moléculas, que son necesarias en muchos procesos metabólicos. La mayor parte de estos transportadores pertenece a la superfamilia ABC (Wanders *et al.*, 2007).

En hongos filamentosos los microcuerpos participan en funciones como la β -oxidación de los ácidos grasos, el desarrollo sexual y la biosíntesis de penicilinas (van der Lende *et al.*, 2002). En dicha ruta biosintética parece que albergan el paso final de síntesis de penicilina G (Müller *et al.*, 1991) y probablemente la epimerización de IPN a PenN en la biosíntesis de cefalosporinas, proporcionando un microambiente propicio para que ocurran dichas reacciones (Vaca-Cerezo, 2008). Por último, cabe indicar que existe una correlación positiva entre el número de peroxisomas y la producción de penicilinas en *P. chrysogenum* (Kiel *et al.*, 2005).

En hongos filamentosos, las vacuolas son orgánulos con una membrana simple impermeable que sirven como compartimento de almacenamiento de aminoácidos básicos, polifosfatos, sulfato y calcio (Lendefeld *et al.*, 1993). En cuanto a su función, están implicadas en la destoxicación de compuestos tóxicos, la degradación de proteínas y la homeostasis celular de iones al controlar su concentración (Cole *et al.*, 1998). En *P. chrysogenum* las vacuolas cambian de tamaño y número durante el desarrollo del hongo. Así en las regiones apicales de las hifas, donde las células son más viejas, son pequeñas y escasas e incrementan su número en las regiones de las hifas subapicales (Paul y Thomas, 1996). El papel de las vacuolas en la ruta de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas es almacenar y suministrar aminoácidos como cisteína y valina al citoplasma para que estén disponibles para la biosíntesis de estos antibióticos. El ácido L- α -aminoadípico no procede de la vacuola (Lendefeld *et al.*, 1993), sino que proviene de la biosíntesis de lisina que tiene lugar en el citoplasma y las mitocondrias (Casqueiro *et al.*, 1999). Parece que existe una relación entre la concentración citosólica de aminoácidos y la tasa de liberación desde las vacuolas, de forma que si dicha concentración es pequeña la tasa de liberación será elevada (Roos *et al.*, 1997).

12.- REGULADORES DE SISTEMAS DE SECRECIÓN.

La resistencia a múltiples drogas es un fenómeno ampliamente extendido en la naturaleza presente desde procariontes hasta levaduras y humanos. Esta resistencia confiere a las células capacidad para sobrevivir a dosis letales de diferentes compuestos tóxicos. La aparición de esta resistencia constituye un serio problema médico en el tratamiento de diversas enfermedades causadas por patógenos como *E. coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* o *Candida albicans*, que no pueden ser combatidos eficientemente por diferentes antimicrobianos (Kolaczowska y Goffeau, 1999). Por otro lado, la existencia de células tumorales resistentes a diversos antitumorales ha provocado el fallo del tratamiento mediante quimioterapia (Gottesman *et al.*, 1996).

La resistencia a múltiples drogas se debe a la sobreexpresión de diferentes proteínas de membrana encargadas de la secreción de dichos compuestos tóxicos que pertenecen principalmente a las superfamilias MFS y ABC (Lewis, 2001). Esta sobreexpresión ha aparecido debido a la presencia de diferentes drogas o antibióticos en el medio, lo que ha conducido a cambios en la expresión de diferentes transportadores mediada por diversas proteínas reguladoras, tanto globales como locales (Grkovic *et al.*, 2002).

Los transportadores pueden secretar compuestos muy diversos estructuralmente, lo que ha permitido a los microorganismos adquirir resistencia a bajas concentraciones de los compuestos secretados (punto de partida para poder sobrevivir a concentraciones cambiantes de los mismos). Por tanto, un gran número de estas proteínas transportadoras implicadas en la resistencia a multidrogas secretan diversos compuestos antimicrobianos. De hecho, la mayor parte de los compuestos antimicrobianos utilizados en la lucha contra las infecciones son sustratos de uno o más transportadores implicados en la secreción de drogas (Paulsen *et al.*, 1996; Putman *et al.*, 2000). Aunque la función natural de estas proteínas transportadoras es la protección frente a bajos niveles

de compuestos tóxicos presentes en el medio ambiente, también participan en el transporte de metabolitos específicos, como por ejemplo, la secreción de señales implicadas en el fenómeno de “quorum-sensing” en *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Rahmati *et al.*, 2002; Köhler *et al.*, 2007). La presencia de sistemas de secreción de multidrogas redundantes hace pensar que se cuestione como única función la quimioprotección, siendo más probable que cada sistema posea otras funciones más específicas aún no identificadas (Neyfakh, 1997).

Algunos sistemas de secreción no están sujetos a ningún tipo de control debido a su bajo nivel de expresión. Se expresan constitutivamente y se renueva la cantidad de ARNm y de proteína transportadora. Sin embargo, la mayor parte de las proteínas transportadoras están sometidas a alguna forma de regulación transcripcional y traduccional evitando los efectos perjudiciales que provoca la sobreexpresión de dichos transportadores que además del tóxico también utilizan como sustrato otros compuestos interesantes para la célula. Existen una serie de proteínas reguladoras de estos sistemas de secreción que actúan tanto a nivel local como global. De esta forma la cantidad de proteínas transportadoras presentes en un determinado momento está estrictamente regulada (Grkovic *et al.*, 2002). Se describen a continuación, solamente los sistemas reguladores de la secreción en eucariotas.

12.1.- Reguladores de sistemas de secreción en eucariotas.

En eucariotas existen dos familias de factores transcripción implicados en la regulación de la resistencia a múltiples drogas:

- Proteínas con un “cluster” de zinc.
- Proteínas con cremalleras de leucinas básicas (bZip).

12.1.1.- Proteínas con el “cluster” de zinc.

Las proteínas con zinc son una de las mayores familias de reguladores transcripcionales de eucariotas y su principal característica es la posesión de un motivo conservado llamado “dedo de zinc”. Dicho motivo se compone de una hélice α y un par de cintas β antiparalelas. Asimismo uno o más átomos de zinc están unidos a residuos de cisteína o histidina, estabilizando el dominio, lo cuál contribuye a una apropiada estructura para la función de la proteína. La mayor parte de estas proteínas se unen al ADN, aunque en otros casos pueden desempeñar otras funciones como son la mediación en las interacciones proteína-proteína, la remodelación de la cromatina, actuar como chaperonas, unirse a lípidos o mediar en la sensibilidad al zinc (Laity *et al.*, 2001; Wolfe *et al.*, 2000).

Existen tres clases de proteínas con “dedos de zinc” en eucariotas:

- Clase I: son proteínas con dedos de zinc clásicos del tipo Cys₂His₂ (Wolfe *et al.*, 2000). Es uno de los tipos de reguladores más comunes en eucariotas y contienen 2 o más dedos de zinc repetidos. Los miembros de esta clase de proteínas se unen como monómeros al

ADN (Laity *et al.*, 2001). Un ejemplo de este tipo de proteínas es el factor de transcripción Sp1 en humanos (Näär *et al.*, 1998).

- Clase II: son proteínas que contienen dedos de zinc de tipo Cys₄ entre los que se incluyen las proteínas GATA, LIM y receptores nucleares de proteínas. Los factores de transcripción GATA se unen al ADN en la secuencia nucleotídica GATA, que está situada en las regiones reguladoras de los genes diana. Dicha unión tiene lugar a través de 2 dominios con dedos de zinc (Urnov, 2002). Estas proteínas contienen un dedo de zinc y se unen al ADN como homo o heterodímeros. Los homodímeros se unen a repeticiones invertidas mientras que los heterodímeros lo hacen a repeticiones directas (Laity *et al.*, 2001).
- Clase III: son proteínas con dedos de zinc que contienen un dominio de unión a ADN (DBD, DNA binding domain) que consta de 6 cisteínas unidas a 2 átomos de zinc, que se denominan proteínas del “cluster de zinc”, cluster de zinc binuclear o proteínas Zn(II)₂Cys₆. Este tipo de proteínas poseen un único dedo de zinc que une 2 átomos de zinc. Además pueden interactuar con el ADN como monómeros, homodímeros o heterodímeros (Tood y Andrianopoulos, 1997).

Las proteínas del cluster de zinc aparecen únicamente en hongos aunque existen otros tipos de proteínas con dedos de zinc dentro de este reino de los seres vivos. Las proteínas del cluster de zinc se encuentran fundamentalmente en la familia de los ascomicetos. Este hecho pudo deberse a que el motivo Zn(II)₂Cys₆ apareció en los ascomicetos después de la divergencia entre ascomicetos y basidiomicetos. Este tipo de proteínas se han encontrado en *Aspergillus*, *Candida*, *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces pombe* (Tood y Andrianopoulos, 1997).

12.1.1.1.- Dominios estructurales y funcionales.

Las proteínas del cluster de zinc poseen además del dominio de unión al ADN, varios dominios reguladores y activadores.

El dominio de unión al ADN se localiza normalmente en el extremo amino terminal de la proteína y posee 3 regiones: el dedo de zinc, la región espaciadora y la región de dimerización.

1. El dedo de zinc permite la asociación de 2 proteínas de este tipo para formar complejos homodiméricos que son capaces de unirse al surco mayor del ADN ya que reconocen una pareja de tripletes CGG (MacPherson *et al.*, 2006).
2. La región espaciadora está localizada hacia el extremo carboxilo terminal del dominio de unión al ADN y proporciona un plegamiento bastante rígido a todo el dominio siendo bastante variable. La variabilidad en esta región explica su implicación en la especificidad de la unión al ADN puesto que la composición de aminoácidos de esta secuencia determina la secuencia diana reconocida en cada caso (Mamane *et al.*, 1998).

3. La región de dimerización es el elemento más distal del dominio de unión al ADN, situándose en posición carboxilo terminal con respecto a la región espaciadora. Asimismo consta de repeticiones de heptadas similares a las encontradas en las cremalleras de leucina. Estas repeticiones heptadas forman una estructura que participa probablemente en la dimerización y en las interacciones proteína-proteína (Schjerling y Holmberg, 1996).

El dominio regulador contiene una región poco conservada que separa el dominio de unión al ADN de la región ácida carboxilo terminal. Esta región podría autoregular la transcripción de las proteínas del cluster de zinc (Schjerling y Holmberg, 1996). Los dominios reguladores que actúan como activadores poseen una región rica en asparraginas (5-10 residuos) que confiere flexibilidad al dominio. Dicha flexibilidad es necesaria para establecer múltiples contactos y activar la maquinaria de transcripción (Kolczkowska *et al.*, 2002).

Las proteínas del cluster de zinc suelen presentar un dominio ácido localizado, en general, en el extremo carboxilo terminal que no está muy conservado. Este dominio puede ejercer un papel diferente en cada proteína del cluster de zinc incluso puede actuar como un segundo dominio de dimerización. Sin embargo, tanto su función como su estructura, en muchos casos, no han sido bien caracterizadas (MacPherson *et al.*, 2006).

12.1.1.2.- Elementos de unión al ADN.

Las proteínas del cluster de zinc reconocen elementos conservados de secuencias de 3 nucleótidos simples o repetidas, simétricas o asimétricas. Los tripletes CGG son los más comunes aunque existen variaciones, siendo muy importantes en la unión al ADN, tanto la secuencia concreta del triplete como la orientación y el espaciamiento entre los mismos. Además existen diversas proteínas que influyen tanto en el reconocimiento como en la unión al ADN de las proteínas del cluster de zinc (Todd y Andrianopoulos, 1997).

La actividad transcripcional de las proteínas del cluster de zinc está controlada por múltiples estrategias como son: el tráfico núcleo-citoplasma, la unión al ADN, la fosforilación y el desenmascaramiento del dominio de activación (Sellick y Reece, 2005).

Las proteínas del cluster de zinc se unen al ADN de manera habitual en forma de homodímeros, si bien también pueden unirse como monómeros o heterodímeros bajo ciertas condiciones fisiológicas. El hecho de que intervengan como monómeros o dímeros depende del tipo de secuencia diana que reconozcan. Las proteínas del cluster de zinc pueden formar heterodímeros con miembros de otras familias de factores de transcripción, ampliando así el rango de secuencias diana reconocidos por este tipo de factores. De esta manera se amplía el número de genes que pueden regular (MacPherson *et al.*, 2006).

Por otro lado, varias proteínas del cluster de zinc están sometidas a una autorregulación mediante la regulación cruzada entre 2 activadores. De esta forma, unas proteínas del cluster de zinc regulan la expresión de otras proteínas de su misma clase (MacPherson *et al.*, 2006).

Es sabido que el ADN de eucariotas está fuertemente empaquetado junto con proteínas en forma de cromatina lo cuál limita la accesibilidad al ADN de los factores de transcripción al igual que el de otros factores. Por este motivo, las proteínas del cluster de zinc requieren la ayuda de complejos enzimáticos remodeladores de la cromatina que modifican la conformación de la misma para permitir la transcripción génica (MacPherson *et al.*, 2006).

12.1.2.- Proteínas del cluster de zinc en *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae* se han identificado 55 miembros de la familia de proteínas del cluster de zinc que poseen el motivo $Zn(II)_2Cys_6$, siendo una de las mayores familias de factores de transcripción de levaduras. Estas proteínas pueden actuar como activadores o represores transcripcionales o incluso presentar ambas actividades en algunos casos (Akache *et al.*, 2004).

Las proteínas del cluster de zinc en *S. cerevisiae* cumplen funciones de diversa naturaleza como son la participación en el metabolismo de azúcares, en la gluconeogénesis, la respiración, el metabolismo de los aminoácidos, la síntesis de vitaminas, la mitosis, la meiosis, la remodelación de la cromatina, la utilización del nitrógeno, la proliferación de los peroxisomas, la respuesta al estrés y la resistencia a múltiples drogas (Todd y Andrianopoulos, 1997). Además muchas proteínas del cluster de zinc pueden actuar en la transducción de señales en respuesta a diferentes cambios externos. Por tanto, estos reguladores participan en procesos importantes tanto del metabolismo primario como secundario (Todd y Andrianopoulos, 1997).

12.1.2.1.- Reguladores transcripcionales implicados en la resistencia a drogas.

Las proteínas del cluster de zinc implicadas en la resistencia a drogas regulan positivamente los genes que codifican diversas bombas secretoras de drogas. Así la resistencia a drogas en *S. cerevisiae* se debe a mutaciones en estos factores de transcripción que provocan la sobreexpresión de estas proteínas transportadoras (Macpherson *et al.*, 2006).

Los genes diana de estos reguladores son principalmente transportadores de tipo ABC que contienen en sus promotores uno o varios elementos de respuesta PDRE (pleiotropic drug resistance element) junto con otras secuencias reguladoras. Un elemento regulador PDRE ideal consta de la secuencia consenso TCCGCGGA, en la que la secuencia CGG aparece repetida con una de las copias en orientación directa y la otra con orientación invertida y evertida (Delahodde *et al.*, 1995).

Los reguladores Pdr1p y Pdr3p son proteínas del cluster de zinc que son claves en la resistencia a drogas en *S. cerevisiae* (Moye-Rowley, 2003). Pdr1p y Pdr3p son activadores transcripcionales que controlan la expresión de diversos transportadores de tipo ABC

(Kolackowska y Goffeau, 1999). Para llevar a cabo su función, se unen a elementos PDRE de resistencia pleiotrópica a drogas que se encuentran en los promotores de los genes diana (Katzmann *et al.*, 1996). El promotor del gen *pdr3* contiene 2 elementos PDRE y está regulado positivamente por Pdr1P y por el propio Pdr3p (Delahhode *et al.*, 1995). La proteína Pdr1P es capaz de formar complejos heterodiméricos con diversas proteínas lo que le permite participar en la regulación de la expresión de gran cantidad de genes. De esta forma coordina la expresión de los mismos con las condiciones extra e intracelulares por lo que Pdr1p es un regulador en la resistencia a drogas (Akache *et al.*, 2004).

En *S. cerevisiae* aparte de Pdr1p y Pdr3p, existen otras proteínas del cluster de zinc que intervienen en el control de la respuesta a drogas, como por ejemplo Yrr1p y Rdr1p, lo que pone de manifiesto la regulación cruzada entre reguladores en este tipo de respuesta. El gen *yrr1p* presenta en su promotor elementos de respuesta PDRE y YRRE (yeast resistance response element) al que se une la propia proteína Yrr1p. Esto hace que la expresión de este gen pueda ser controlada por su propio producto (Zhang *et al.*, 2001).

Por otro lado, la proteína Rdr1p es un represor de los genes de resistencia a drogas que regula a varias proteínas de membrana o asociadas a la membrana que contienen elementos PDRE en sus promotores. El regulador Rdr1p se une a los elementos PDRE localizados en los promotores de los genes *pdr1* y *pdr3* reprimiendo su transcripción y pudiendo competir con dichas proteínas en la unión a dichos elementos PDRE. Además puede formar heterodímeros con Pdr1p o Pdr3p impidiendo la activación de Pdr5 (Hellauer *et al.*, 2002).

12.1.3.- Otras proteínas del cluster de zinc en hongos filamentosos.

Además de las proteínas descritas, existen otras proteínas del cluster de zinc que han sido identificadas en diversos hongos filamentosos. Estos organismos producen un amplio rango de metabolitos secundarios importantes para la medicina y la agricultura (Macpherson *et al.*, 2006).

A. flavus y *A. parasiticus* son dos hongos filamentosos que pueden colonizar en determinadas condiciones diferentes sustratos como las semillas de plantas, produciendo aflatoxinas. Las aflatoxinas son metabolitos secundarios muy tóxicos y carcinogénicos en animales y humanos (Yabe y Nakajima, 2004). Dentro de este grupo de compuestos se encuentra la aflatoxina B₁ que es uno de los carcinógenos y mutágenos más potentes producidos por estas dos especies de hongos filamentosos (Roebuck, 2004). En *A. flavus* y *A. parasiticus*, la producción de aflatoxinas está regulada por la proteína del cluster de zinc AfIR, aunque existen otras vías de control de la ruta de producción de aflatoxinas (Ehrlich *et al.*, 1999). De hecho, los factores ambientales y nutricionales como la temperatura, la disponibilidad de oxígeno y la fuente de carbono y de nitrógeno afectan de forma decisiva a la formación de aflatoxinas (Woloshuk *et al.*, 1994).

La proteína AfIR presenta un dominio de unión al ADN característico de las proteínas del cluster de zinc (Woloshuk *et al.*, 1994). Funciona como un activador transcripcional de la

biosíntesis de aflatoxinas siendo muy complejo el mecanismo por el que ejerce el control sobre dicha ruta biosintética (Payne *et al.*, 1993).

- La expresión del gen *afIR* está regulada por diversos factores ambientales y nutricionales que también afectan a la formación de aflatoxinas (Luchese y Harrigan, 1993).

Por último, la proteína AfIR está presente también en cepas no productoras de aflatoxinas del género *Aspergillus*, no conociéndose el papel de este regulador en estas cepas. En este caso, es probable que otras proteínas interaccionen con AfIR a través de su región carboxilo terminal acídica, regulando negativamente su funcionamiento y suprimiendo la formación de aflatoxinas (Johnston, 1987).

12.2.- Proteínas con cremalleras de leucinas básicas (bZip).

Una proteína de tipo bZip consta de un dominio bZip de entre 55-65 aminoácidos que da nombre a la proteína. Dicho dominio consta de una región básica amino terminal (que permite reconocer la secuencia diana en el ADN para la unión del factor de transcripción) junto con la cremallera de leucinas carboxilo terminal, (llamada de esta forma debido a la presencia de leucinas en su estructura), que es una hélice α responsable de la dimerización. Las cremalleras de leucina son motivos que constan de 5 o 6 heptadas (repeticiones de 7 aminoácidos) de forma habitual y de un máximo de 9 heptadas, que suelen tener 4 o 5 leucinas adoptando una estructura de hélice α . De esta forma, dos hélices α se unen mediante interacciones hidrofóbicas participando en la dimerización de este tipo de proteínas. Las cremalleras de leucinas pueden sufrir un proceso de desnaturalización reversible mediante calor y diferentes agentes químicos caotrópicos. Dicho proceso es cooperativo y ocurre en dos pasos (Vinson *et al.*, 2006).

La unión al ADN de este tipo de reguladores se realiza en forma de dímeros. De esta manera, el reconocimiento de una determinada secuencia depende tanto de los aminoácidos situados en la región básica como de los localizados en el extremo amino terminal (Metallo *et al.*, 1997). Finalmente cabe señalar que la formación de los dímeros puede ser previa a la unión al ADN o producirse tras dicha unión (Kohler y Schepartz, 2001).

Los factores de transcripción de la familia bZip suelen estar encargados principalmente de la regulación de proteínas transportadoras de membrana de la superfamilia MFS (Gulshan y Moye-Rowley, 2007), aunque existe algún caso en el que estas proteínas regulan algún transportador de la superfamilia ABC. Un ejemplo de este tipo de reguladores en *S. cerevisiae* es Yap1p implicado en la regulación de la respuesta frente al estrés y en la resistencia a drogas mediada por el transportador de tipo ABC Ycf1p (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004).

12.2.1.- Proteínas bZip en *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae* la familia Yap (Yeast-AP-1 factor) constituye un subgrupo diferente de proteínas bZip (factores AP-1) formado por ocho miembros (Yap1-8). Estas proteínas tienen el tamaño típico de las proteínas de levaduras y las características de las proteínas bZip. Sin embargo, la secuencia de unión al ADN de las proteínas bZip (TTACTAA) es diferente a la secuencia consenso de los sitios AP-1 presentes en otras proteínas bZip (TGACTCA). Por otro lado, las proteínas Yap son funcionalmente redundantes *in vivo* existiendo diferencias en cuanto a su concentración intracelular, localización nuclear, unión al ADN y actividad transcripcional. Este tipo de proteínas Yap responden de manera diferente a estímulos que intervienen en la viabilidad del microorganismo, siendo variable la capacidad de activación de los promotores que regulan (Fernandes *et al.*, 1997). Por último, las proteínas Yap pueden llevar a cabo interacciones con otras proteínas en las que participan secuencias de ADN diversas que alteran la especificidad de unión al ADN y el potencial de la transcripción (Gounalaki y Thireos, 1994).

De las ocho proteínas Yap presentes en *S. cerevisiae*, se ha determinado que Yap1 es el activador más potente (Fernandes *et al.*, 1997). La proteína Yap1p está implicada en la regulación de la resistencia a múltiples drogas y al estrés oxidativo en *S. cerevisiae* (Gounalaki y Thireos, 1994). Así Yap1 regula la expresión de las proteínas Flr1p y Atr1, dos transportadores de la superfamilia MFS que participan en la resistencia a azoles y derivados (Kolackowska y Goffeau, 1999). Para ejercer su función, el dominio bZip de esta proteína se une a varios elementos de respuesta denominados YRE (Yeast Response Elements) que se encuentran en los promotores de los genes diana (Toone y Jones, 1999). Además Yap1p presenta un dominio amino terminal (n-CRD) junto con un dominio carboxilo terminal (c-CRD) ricos en cisteínas que posee las señales de exportación nuclear. Ambos dominios intervienen en la localización nuclear de la proteína (Kuge *et al.*, 1997).

13.- OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.

El objetivo principal de esta tesis es estudiar el papel de los genes *cefM* y *cefR* en la ruta de biosíntesis de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum* C10. Los genes biosintéticos junto con las enzimas que codifican han sido clonados, secuenciados y caracterizados (Aharonowitz *et al.*, 1992; Martín *et al.*, 2004; Martín y Liras, 2009). Sin embargo, poco se sabe acerca de los sistemas de secreción tanto del producto final como de sus intermediarios (lo que supone una pérdida de intermediarios del producto final). El presente trabajo se centra en el gen *cefM* (*cefT2*) que codifica, al igual que el gen *cefT*, una proteína transportadora perteneciente a la superfamilia MFS. Sabemos que este gen está relacionado con la ruta biosintética de cefalosporinas ya que su sobreexpresión provoca una drástica disminución de dicha producción y un aumento de la secreción de penicilinas (IPN + PenN) (Martínez-Guerra, 2005). Estos datos parecen sugerir que la proteína CefM está implicada en la secreción de isopenicilina N y de penicilina N. La sobreexpresión del gen *cefM* deja sin suficiente sustrato a la expandasa/hidroxilasa y DAC acetiltransferasa lo que explica la drástica reducción de la producción de cefalosporinas. Teniendo en cuenta esto, nos planteamos clarificar el papel de la proteína CefM como exportador de IPN y/o PenN, en la ruta biosintética de cefalosporina C. Igualmente tratamos de localizar “in vivo” la proteína CefM, dado que sus características estructurales hacen pensar que se trata de una proteína de membrana. Por otro lado, nos planteamos buscar genes implicados en la regulación de los genes de secreción y/o de biosíntesis. Dicha búsqueda se realizó en el “cluster” temprano de biosíntesis de cefalosporinas (donde se encuentran también los genes *cefT* y *cefM*) encontrando un marco de lectura abierto denominado *cefR*. Una vez localizado nos propusimos estudiar el papel de la proteína CefR como posible regulador de los genes de secreción y/o de biosíntesis de cefalosporina C.

Los objetivos desarrollados en el siguiente trabajo fueron:

- 1.- Inactivación dirigida del gen *cefM* en *A. chrysogenum* C10.
- 2.- Estudio del efecto de la inactivación del gen *cefM* sobre la ruta biosintética de cefalosporina C.
- 3.- Complementación *en trans* del mutante interrumpido en el gen *cefM*.
- 4.- Localización “in vivo” de la proteína CefM en *A. chrysogenum* C10.
- 5.- Sobreexpresión del gen *cefM* y efecto sobre la biosíntesis de cefalosporinas en *A. chrysogenum* C10.
- 6.- Clonación y secuenciación del gen *cefR* de *A. chrysogenum* C10.
- 7.- Inactivación dirigida del gen *cefR* en *A. chrysogenum* C10.

8.- Estudio del efecto de la inactivación del gen *cefR* sobre la ruta biosintética de cefalosporina C en *A. chrysogenum* C10.

9.- Complementación *en trans* del mutante interrumpido en el gen *cefR*.

10.- Sobreexpresión del gen *cefR* y efecto sobre la biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum* C10.

11.- Estudio de la expresión de genes de secreción y de biosíntesis en los mutantes interrumpidos y en los que sobreexpresan el gen *cefR* de *A. chrysogenum* C10.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MICROORGANISMOS.

1.1.- Cepas bacterianas.

- ***Escherichia coli* DH5 α** (Hanahan, 1983). Cepa empleada en experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite obtener células competentes con elevada eficiencia de transformación (hasta 5×10^8 transformantes/ μg de ADN). Presenta una delección en el gen *Z* del operón *lac*, lo que permite seleccionar por su coloración azul, los clones que porten plásmidos que sean capaces de complementar dicha mutación. Genotipo: *deoR endA1 gyrA96 recA1 hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1 supE44 thi-1* Δ (*lacZYA-argFV169*) *f80* δ *lacZDM15 F' λ* .

- ***Escherichia coli* SURE-2** (*Stratagene*). Cepa utilizada en experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite la clonación de ADN eucariota difícil de manipular en la cepa arriba indicada. Esta cepa pierde los componentes que catalizan la reorganización y delección de estructuras secundarias y terciarias extrañas (cruciformes y ADN-Z) facilitando el empleo de estos fragmentos de ADN. Genotipo: *e14*-(*McrA*) Δ (*merCB-hsdSMR-mrr*)*171endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC:: Tn5*(*Kan^r*) *uvrC* [*F' proAB lac^hZ Δ M15Tn10* (*Tet^r*) *Amy Cam^r*].

- ***Escherichia coli* LE392**. Cepa susceptible de ser infectada por el bacteriófago lambda y sus derivados. Se utiliza en la amplificación de bibliotecas genómicas construidas en vectores de sustitución derivados del fago lambda. Genotipo: *F hsdR514* (*rk mk-*) *supE44 supF58 lacYlo*(*lacIZY*) *6 galK2 galT22 metB1 trp55 λ* .

- ***Escherichia coli* ESS-2231**. Cepa supersensible a antibióticos β -lactámicos. Se utiliza para la cuantificación de cefalosporinas mediante bioensayo.

1.2.- Cepas fúngicas.

- ***Acremonium chrysogenum* ATCC 48272**. Cepa de alta producción de cefalosporina C (2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en medio definido) liberada por Panlabs (Demain, 1983).

2.- VECTORES PLASMÍDICOS.

- **pBluescript (KS/SK)** (+/-) (2,961 kb): Plásmido derivado del pUC19 que presenta el origen de replicación *ColE1* y el origen de replicación *f1* del fago M13, lo que permite su replicación en *E. coli* y la obtención de ADN monocatenario. Porta un gen de resistencia a la ampicilina que permite su selección en el hospedador y un fragmento del gen *lacZ* subunidad α , útil para la transformación en cepas bacterianas que posean dicha subunidad

mutada. La complementación de dicha mutación provoca en un medio con IPTG (isopropil- β -tiogalactósido, inductor de la expresión del gen *lacZ*) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, sustrato cromogénico), coloración azul de las colonias. En marco de lectura con el gen *lacZ* existe un sitio múltiple de clonación (MSC), con sitios de reconocimiento para varias enzimas de restricción de corte único. La transformación con un pBluescript en el que se haya introducido en este sitio de clonación un fragmento de ADN, que interrumpa el marco de lectura del gen *lacZ*, ocasionará la aparición de colonias no coloreadas. Existen cuatro variantes de este vector, las cuáles dependen de: la dirección del origen de replicación *f1* (+ ó -, lo cuál determinará cuál de las dos hebras monocatenarias se obtendrá al infectar en el fago M13KO7) y, la orientación de los sitios de corte en el sitio de clonación (KS ó SK).

- **pZErO-2** (3,3 kb): Plásmido que posee el gen tóxico *ccdB* en marco de lectura con el sitio de clonación. Este gen codifica una proteína que interfiere en la actividad de la enzima ADN girasa, lo que ocasiona la rotura de las hebras del ADN, el desencadenamiento de la respuesta S.O.S. y la muerte celular. Esta característica permite realizar una selección positiva de los clones recombinantes al transformar en una cepa adecuada de *E. coli*, ya que solamente los clones en los cuáles el marco de lectura del gen tóxico haya sido alterado, por una inserción de un fragmento de ADN, permitirán el crecimiento de las células hospedadoras. La expresión del gen tóxico se encuentra bajo el control del promotor *lac* por lo que las estirpes celulares más adecuadas para la selección de clones recombinantes serán aquellas que porten la mutación *lacIq* (determinante de la sobreexpresión del inductor del operón *lac*). Además, puede inducirse la expresión (en caso de utilizar una cepa bacteriana que no posea la mutación mencionada) añadiendo IPTG al medio de crecimiento.
- **pJL43** (4,5 kb). Plásmido construido a partir del pBluescript KS⁺ por el Dr. J. L. Barredo en nuestro laboratorio (Gutiérrez *et al.*, 1991a.). En el policonector de este vector se encuentra el promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* fusionado a nivel del ATG con el gen *ble* de *Streptoalloteicus hindustanus* y con el terminador del gen *yc1* de *S. cerevisiae*. La expresión de este gen confiere resistencia a fleomicina a las células fúngicas hospedadoras.
- **pJL43b1** (4,5 kb). Plásmido muy similar al anterior construido por el Dr. J.L. Barredo en nuestro laboratorio (Gutiérrez *et al.*, 1991a). En este caso el promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans* se encuentra fusionado al ATG del gen *ble* de *Streptoalloteicus hindustanus* y con el terminador del gen *yc1* de *S. cerevisiae*. La expresión de este gen confiere también resistencia a fleomicina.
- **pAN7-1** (6,76 kb). Plásmido derivado del pUC18. En el policonector de este vector se encuentra el promotor del gen *gpdA* de *Aspergillus nidulans*, fusionado a nivel del ATG con el gen *hph* de *E. coli* y con el terminador del gen *trpC* de *A. nidulans*. La expresión de este gen confiere resistencia a higromicina B a las células fúngicas hospedadoras (Punt *et al.*, 1987).

- **php3B** (7,46 kb). Plásmido derivado del pAN7.1 construido por el Dr. Leopoldo Naranjo Briceño en nuestro laboratorio. Posee mutaciones puntuales realizadas mediante el sistema “Quick-Change” (*Stratagene*) que consisten en la eliminación de un sitio *EcoRI* y otro sitio *BamHI* del gen *hph* de *E. coli*, permitiendo obtener el casete de resistencia a higromicina B mediante un corte *BamHI*.
- **pCD1** (8,7 kb). Plásmido derivado del pC43 (Gutiérrez *et al.*, 1999) construido por el Dr. Ricardo Vicente Ullán en nuestro laboratorio. Contiene el gen *cefD1* bajo el control de su propio promotor. Se obtuvo por digestión parcial *SacI* y posterior religación del plásmido pCD1+2 (Ullán *et al.*, 2002a).
- **pcefT2** (6,4 kb). Plásmido que porta un fragmento de 3,1 kb que contiene el gen *cefT2* bajo el control de su propio promotor, subclonado en el sitio *EcoRV* del pZErO-2 (Martínez-Guerra, 2005).
- **pGEM-T Easy** (3,0 kb). Plásmido comercial (*Promega*) que contiene colas de timina 3'-terminal a ambos lados del sitio *EcoRV*. Dichas colas permiten la subclonación de productos de PCR que a su vez posean colas de poliA complementarias que forman ciertas polimerasas termoestables como la *Taq* DNA polimerasa (*Promega*).
- **pMCB15** (3,95 kb). Plásmido que contiene subclonada en el vector pGEM3Zf (+) (*Promega*) una versión de la proteína verde fluorescente de medusa (*Aequorea victoria*) funcional en hongos filamentosos que carece del codón de inicio (Fernández-Ábalos *et al.*, 1998), lo que permite la fusión en marco de proteínas al extremo amino-terminal de la misma y la localización “*in vivo*”.
- **pJ43Zf** (4,7 kb). Plásmido derivado del pGEM3Zf (+) que contiene el casete de resistencia a fleomicina subclonado en *BamHI/SalI*, el cuál puede ser liberado mediante una digestión con *HindIII* (Martín *et al.*, resultados no publicados).
- **pDT3.1** (11,7 kb). Plásmido derivado del pJL43 que contiene el gen *cefT3* de *A. chrysogenum* bajo el control de su propio promotor subclonado en *BamHI* (Ullán *et al.*, resultados no publicados).

2.1.- Construcciones plasmídicas.

2.1.1.- Construcción del plásmido pDM.

Con el fin de interrumpir el gen *cefM* de *A. chrysogenum* C10 se construyó el plásmido integrativo pDM (figura 2.1). Para ello se realizaron los siguientes pasos:

1. Subclonación de un fragmento *EcoRV-SalI* de 847 pb que contiene el promotor del gen *cefM* junto con pequeño fragmento de 60 pb de su zona codificante en el vector comercial pBSK⁺ digerido de igual forma. Dicho fragmento se obtuvo por digestión con estas enzimas del plásmido pcefT2 que contiene el gen *cefT2* (*cefM*) bajo el control de su propio promotor (Martínez-Guerra, 2005). El plásmido obtenido se denominó pI1.
2. Subclonación de un fragmento *EcoRV* de 1807 pb que contiene parte del gen *cefD1* en el sitio *EcoRV* del vector anterior pI1. Dicho fragmento se obtuvo tras una digestión *EcoRV-HindIII* del plásmido pCD1. Se obtuvo el plásmido pI2.
3. Introducción del casete de resistencia a fleomicina en el sitio *XhoI* del plásmido pI2 interrumpiendo el marco de lectura del gen *cefM*. El casete de resistencia a fleomicina se obtuvo del plásmido pJL43 digerido *XhoI-EcoRI* y rellenado con el fragmento Klenow. El plásmido obtenido se nombró como pI3.
4. Introducción de un fragmento *HindIII* del gen *cefM* de 2228 pb en el plásmido pI3. Este fragmento fue obtenido mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y utilizando los oligonucleótidos M13-reverse y T2IN (5'-**ataagc**ttaccccgacaatgccgtca) que lleva en su secuencia el sitio de restricción *HindIII* (en negrita) utilizando como ADN molde el plásmido pcefT2. El producto de PCR se subclonó en el vector pGEM-T Easy para poder ser digerido *HindIII*. La banda extraída de 2228 pb se ligó al pI3 digerido *HindIII*, obteniéndose el plásmido pI4.
5. Por último, se introdujo el casete de resistencia a higromicina B en el sitio *NotI* del plásmido pI4 obteniendo el plásmido pDM. Dicho casete de resistencia a higromicina B se obtuvo de la digestión *NotI* del plásmido phph3B.

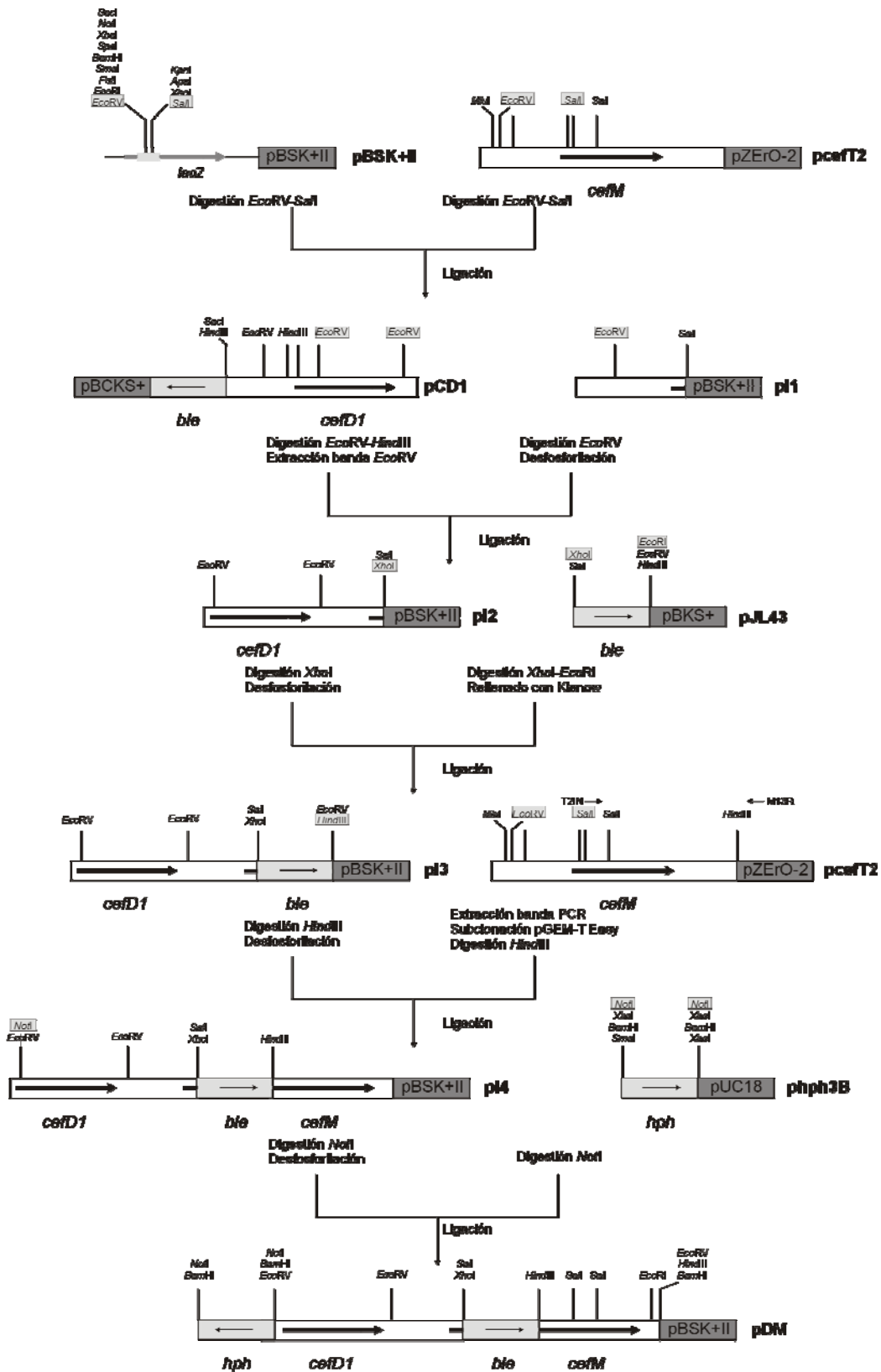


Figura 2.1. Construcción del plásmido pDM utilizado para la interrupción del gen *cefM* de *A. chrysogenum* C10.

2.1.2.- Construcción del plásmido pCM.

Con el fin de complementar en *trans* el transformante interrumpido en el gen *cefM* de *A. chrysogenum* C10, se construyó el plásmido integrativo pCM (Figura 2.2). Para la construcción de dicho plásmido se subclonó un fragmento *HindIII-XbaI* de 3220 pb (que contiene el gen *cefM* de *A. chrysogenum* C10 intacto bajo el control de su propio promotor) del plásmido pcefT2 en los sitios *HindIII-XbaI* del vector pAN7.1 (que contiene el casete de resistencia a higromicina B).

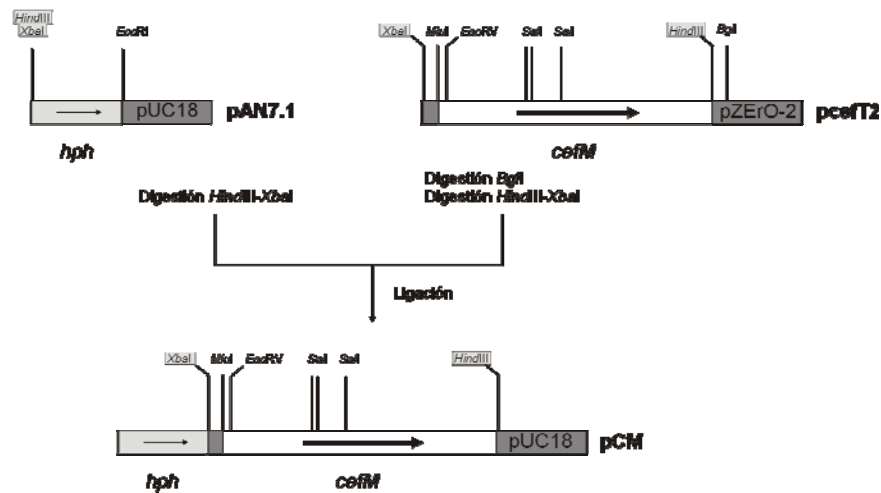


Figura 2.2. Construcción del plásmido pCM utilizado para la complementación en *trans* del transformante interrumpido en el gen *cefM* de *A. chrysogenum* C10.

2.1.3.- Construcción del plásmido pSM.

El plásmido pSM contiene el gen *cefM* bajo el control del promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada de *Aspergillus nidulans* y el terminador del gen de la citocromo oxidasa 1 (*cyc1*) de *S. cerevisiae*. Para la construcción de este plásmido se realizaron los siguientes pasos:

1. Subclonación de un fragmento del gen *cefM* *NcoI-SacI* rellenado de 1150 pb (proveniente del plásmido pcefT2) en el vector pJL43b1 digerido *NcoI-StuI*. El plásmido obtenido se denominó p1-SM.
2. Introducción de un fragmento *NcoI* de 500 pb del gen *cefM* en el sitio de corte *NcoI* del plásmido p1-SM. Este fragmento fue obtenido mediante una PCR en la que se utilizaron los oligonucleótidos SM-D y SM-R, y el plásmido pcefT2. El plásmido obtenido se llamó p2-SM.
3. Introducción del casete de resistencia a fleomicina en el sitio *HindIII* del plásmido p2-SM. Para ello, el casete de resistencia a fleomicina obtenido a partir del plásmido pJL43Zf tras digestión con *HindIII*, se ligó al plásmido p2-SM. El resultado fue la obtención del plásmido pSM (Figura 2.3).

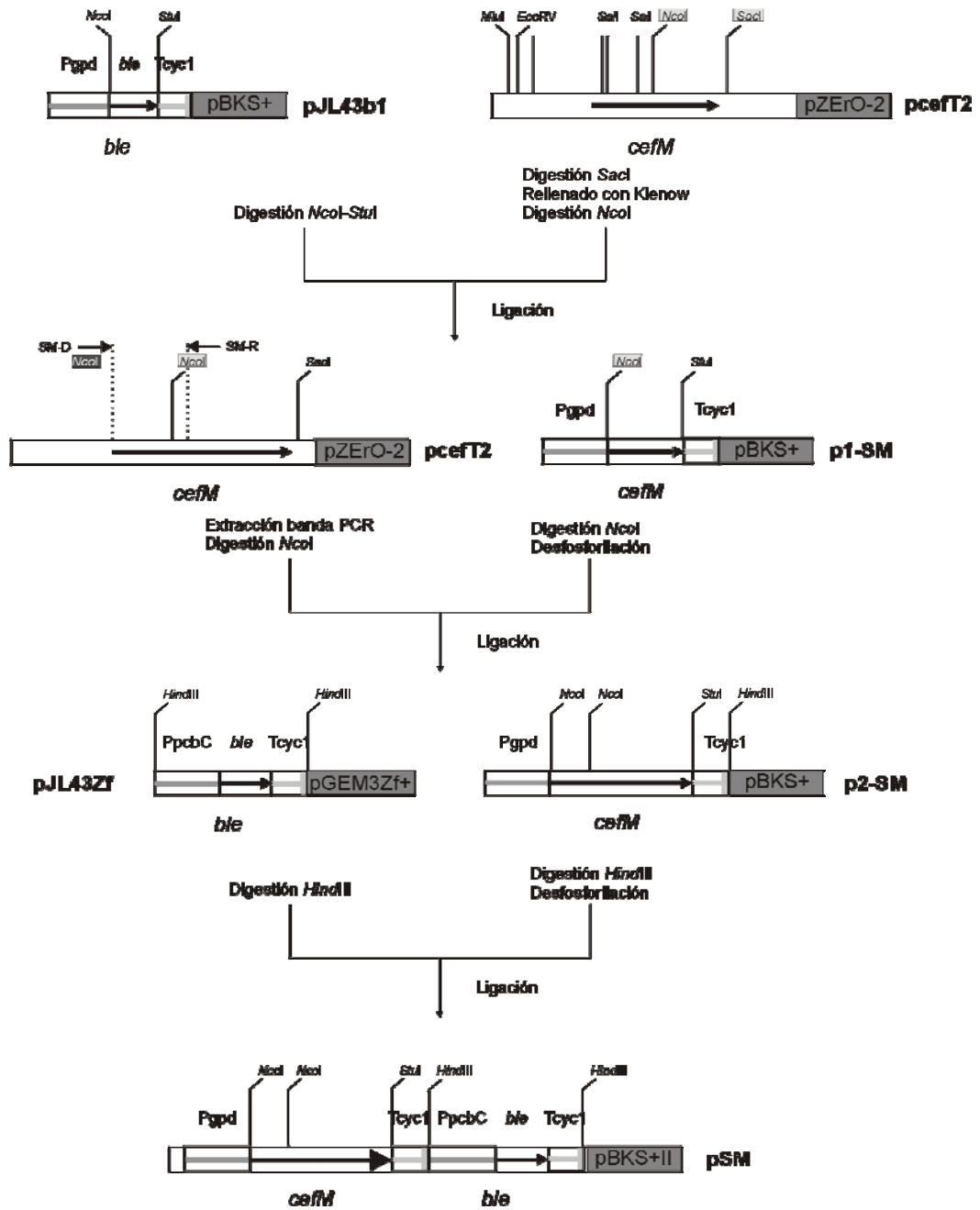


Figura 2.3. Construcción del plásmido pSM utilizado para la sobreexpresión del gen *cefM* en *A. chrysogenum* C10.

2.1.4.- Construcción del plásmido pDR.

Con el fin de interrumpir el gen *cefR* de *A. chrysoogenum* C10 se construyó el plásmido integrativo pDR (Figura 2.4) mediante los siguientes pasos:

1. Eliminación de los sitios *XhoI* y *ClaI* del vector comercial pBSK⁺ (*Stratagene*). En primer lugar, el vector pBSK⁺ se digirió con *XhoI* y se rellenó con el fragmento Klenow. Posteriormente, se cortó con *ClaI* y se volvió a rellenar con el fragmento Klenow. Este plásmido se denominó pIR-1.
2. Subclonación de un fragmento *BamHI-NotI* de 4507 pb del plásmido pB5,5R en el plásmido pIR-1 digerido de igual forma. Se obtuvo el plásmido pIR-2.
3. Introducción del casete de resistencia a fleomicina en los sitios *XhoI* y *ClaI* del plásmido pIR-2. Dicho casete se obtuvo a partir del plásmido pJL43 tras dos digestiones consecutivas *EcoRV* y *XhoI*. A continuación, el plásmido pIR-2 fue digerido primero con *ClaI* y tras ser rellenado con el fragmento Klenow, se digirió con *XhoI*. El fragmento de 6867 pb así obtenido, se ligó con el casete de resistencia a fleomicina. De esta forma, se deleccionó un fragmento de 601 pb del gen *cefR* y se insertó el casete de resistencia a fleomicina. El plásmido resultante se denominó pIR-3.
4. Subclonación de un fragmento *NotI-SmaI* de 4061 pb (que contiene el gen *cefT3* junto un su región promotora) del plásmido pDT3.1 en los sitios *NotI-SacI* rellenado del vector comercial pBSK⁺. Se obtuvo el plásmido pIR-4.
5. Subclonación de un fragmento *BamHI-NotI* de 5376 pb del plásmido pIR-3 en los sitios *BamHI* y *NotI* del plásmido pIR-4. Para ello se ligó el fragmento *BamHI-NotI* de 5376 pb del plásmido pIR-3 con el plásmido pIR-4 digerido de igual forma. El resultado de la ligación fue el plásmido pIR-5.
6. Por último, se introdujo el casete de resistencia a higromicina B en el sitio *BamHI* del plásmido pIR-5. Se digirió el plásmido phph3B con la enzima de restricción *BamHI* y se ligó en *BamHI* al plásmido pIR-5 obteniendo el plásmido pDR (Figura 2.4).

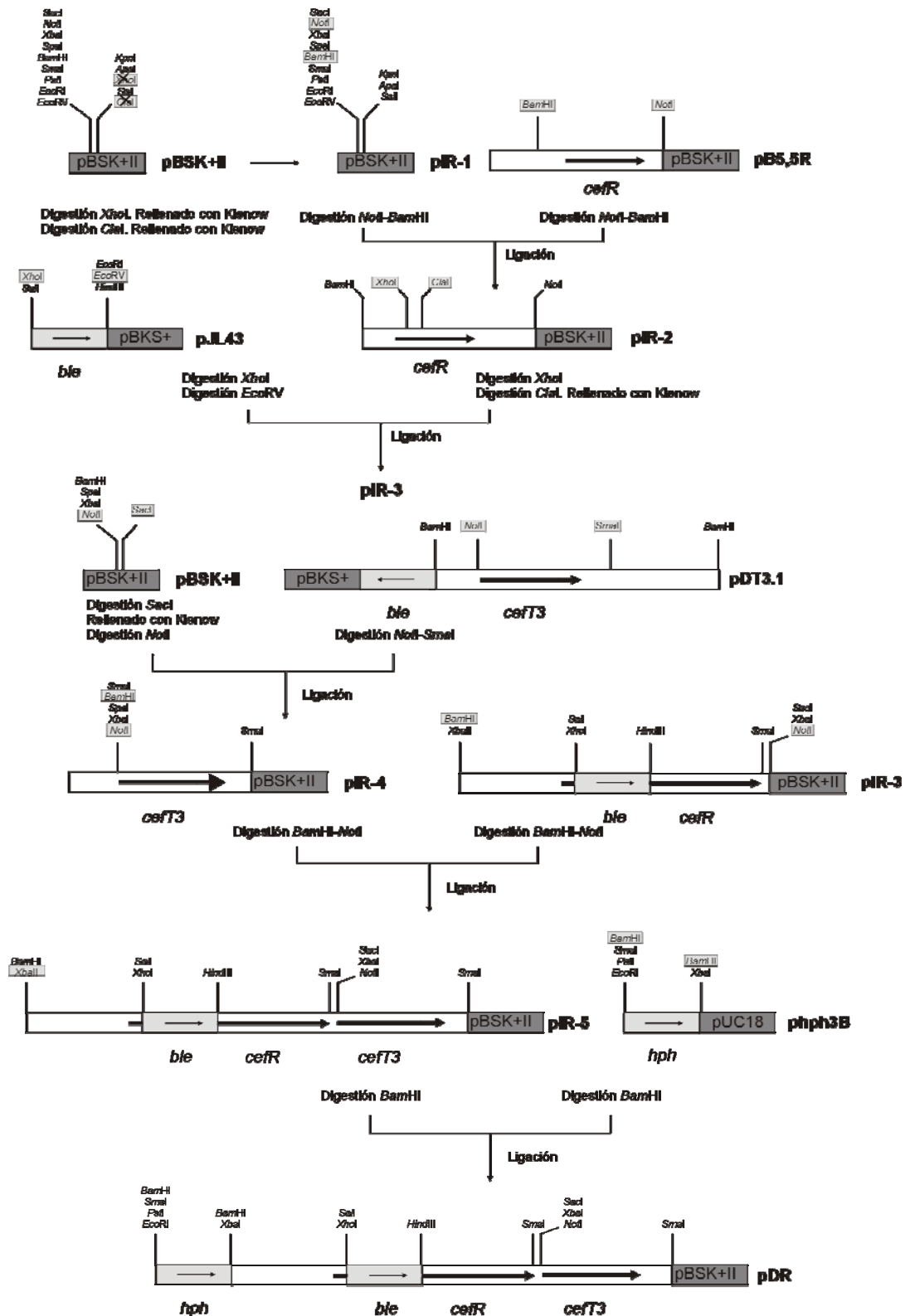


Figura 2.4. Construcción del plásmido pDR utilizado para la interrupción del gen *ceftR* en *A. chrysoenum* C10.

2.1.5.- Construcción del plásmido pCR.

Para llevar a cabo la complementación *en trans* de la cepa inactivada en el gen *cefR*, se construyó el plásmido pCR. Dicho plásmido lleva el gen *cefR* bajo el control de su propio promotor junto con el casete de resistencia a higromicina B. Para la construcción plasmídica se realizaron los siguientes pasos:

1. Delección de un fragmento *Bam*HI de 809 pb situado “aguas arriba” del gen *cefR*. En este paso, el plásmido pB5,5R fue digerido con *Bam*HI, extrayéndose la banda de 7468 pb y se religó. Se obtuvo el plásmido p1-CR.
2. Introducción del casete de resistencia a higromicina B en el sitio *Bam*HI del plásmido p1-CR. El casete de resistencia a higromicina B obtenido del plásmido phph3B digerido con *Bam*HI, se ligó al plásmido p1-CR en *Bam*HI. El plásmido resultante se denominó pCR (Figura 2.5).

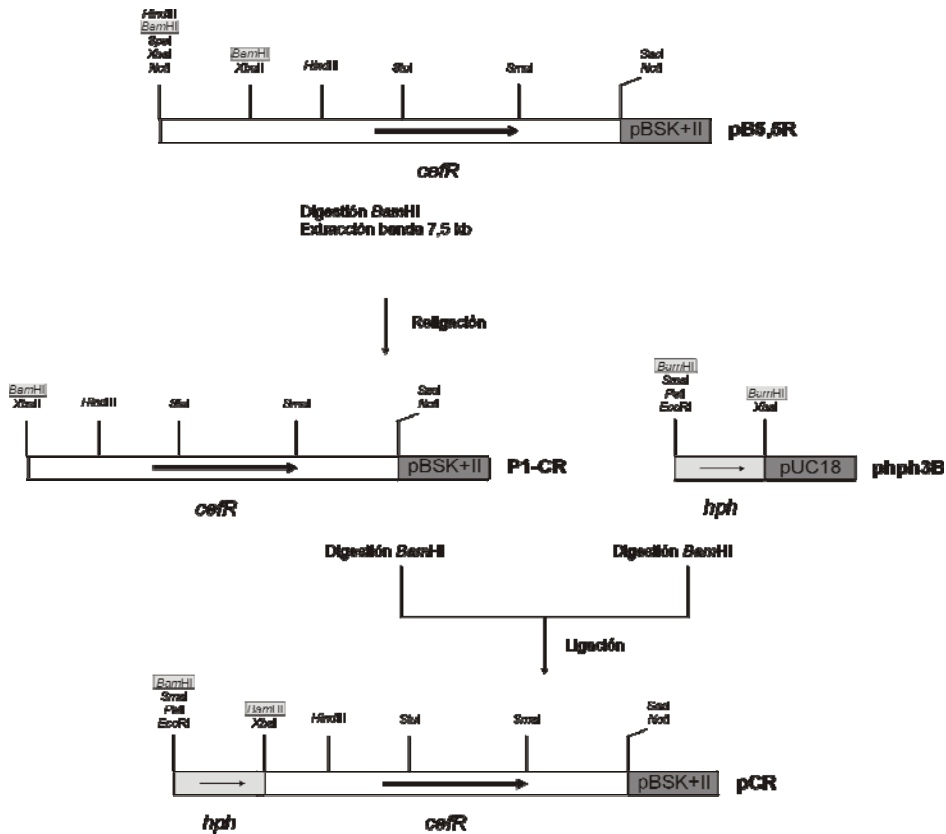


Figura 2.5. Construcción del plásmido pCR utilizado en la complementación *en trans* de la cepa interrumpida en el gen *cefR*.

2.1.6.- Construcción del plásmido pCR+T3.

Para llevar a cabo la complementación *en trans* de la cepa inactivada en el gen *cefR*, se construyó el plásmido pCR+T3. Dicho plásmido lleva un fragmento de ADN que incluye al gen *cefR* bajo el control de su propio promotor y el gen *cefT3* bajo el control de su propio promotor. Para la construcción de este plásmido se llevó a cabo la subclonación de un fragmento de ADN *Bam*HI-

NotI de 5316 pb procedente del plásmido pB5,5R en el plásmido pIR-4 digerido de igual forma. El plásmido obtenido se denominó pCR+T3 (Figura 2.6).

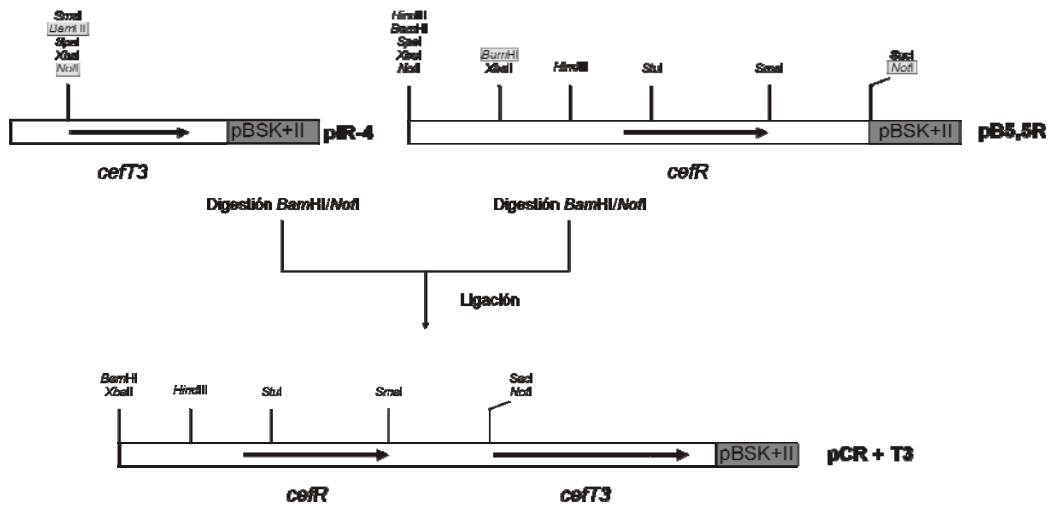


Figura 2.6. Construcción del plásmido pCR+T3 utilizado para la complementación *in trans* de la cepa interrumpida en el gen *ceftR* con los genes *ceftR* y *ceft3*.

2.1.6.- Construcción del plásmido pSCR.

El plásmido pSCR contiene el gen *ceftR* bajo el control del promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada de *Aspergillus nidulans* y con el terminador del gen de la citocromo oxidasa 1 (*cyt1*) de *S. cerevisiae*. Para la construcción de este plásmido se realizaron los siguientes pasos:

1. Subclonación de un fragmento *StuI-SmaI* de 2038 pb en el sitio *StuI* del vector pJL43b1. En este proceso, se digirió el plásmido pB5,5R con *HindIII* para posteriormente redigir el fragmento de 6,5 kb con *StuI* y *SmaI*. El fragmento resultante de 2038 pb se ligó con el vector pJL43b1 digerido *StuI* y desfosforilado con la fosfatasa alcalina. Se obtuvo el plásmido p1-SCR.
2. Introducción de un fragmento de 245 pb del gen *ceftR* en los sitios *NcoI* y *StuI* del plásmido p1-SCR. En este paso, se realizó una PCR utilizando como ADN molde el plásmido pB5,5R y los oligonucleótidos SCR-D (que lleva en su secuencia un sitio de corte *NcoI*) y SCR-R. El producto de PCR contiene la parte del gen *ceftR* que va desde el ATG inicial hasta el sitio *StuI* incluido en el plásmido p1-SCR. El producto de PCR se digirió con *NcoI*-*StuI* y se ligó al p1-SCR digerido de igual forma. El plásmido obtenido se nombró como pSCR (Figura 2.7).

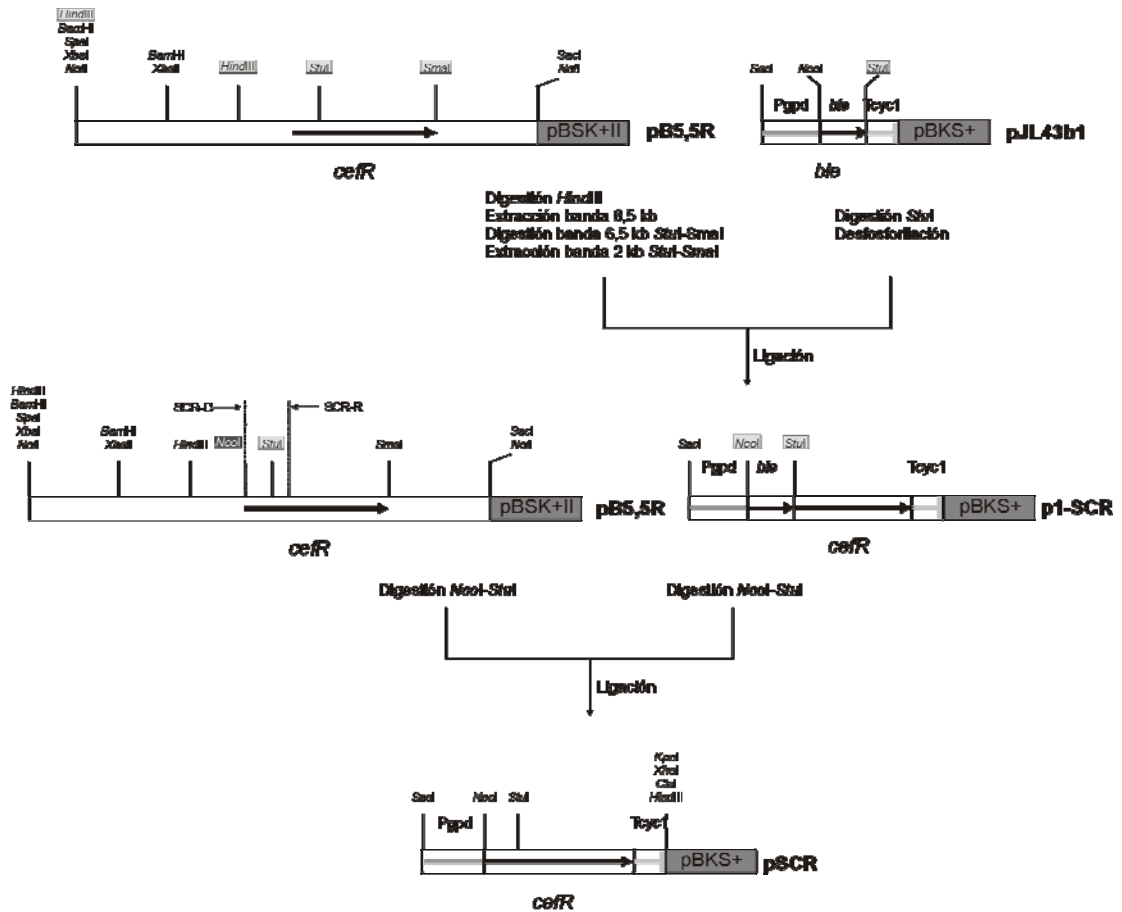


Figura 2.7. Construcción del plásmido pSCR utilizado en la sobreexpresión del gen *cefR* en *A. chrysoenum* C10.

2.1.7.- Construcción del plásmido p*cefM*-GFP.

Con el fin de localizar “*in vivo*” la proteína CefM se construyó el plásmido p*cefM*-GFP. El proceso de construcción contó con los siguientes pasos:

1. Obtención de un fragmento de 2600 pb correspondiente al gen *cefM* junto con su propio promotor pero sin el codón de fin. Para ello, se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos T2C (que lleva en su secuencia un sitio de restricción *Sac*I) y M13 forward, mientras el ADN molde fue el plásmido p*cefT*2. El fragmento de PCR obtenido se subclonó en el vector comercial pGEM-T Easy. Se obtuvo el plásmido pGEM-T-*cefM*.
2. Subclonación del fragmento de 2600 pb en el sitio de restricción *Sac*I del plásmido pMCB15 (Fernández-Ábalos *et al.*, 1998). En este segundo paso, se digirió el plásmido pGEM-T-*cefM* y el plásmido pMCB15 con *Eco*136II (isoesquizómero de *Sac*I). A continuación, tras la ligación de los fragmentos de interés se obtuvo el plásmido p*cefM*-GFP que contiene el gen *cefM* fusionado en marco al extremo 5' del gen *gfp* (Figura 2.8).

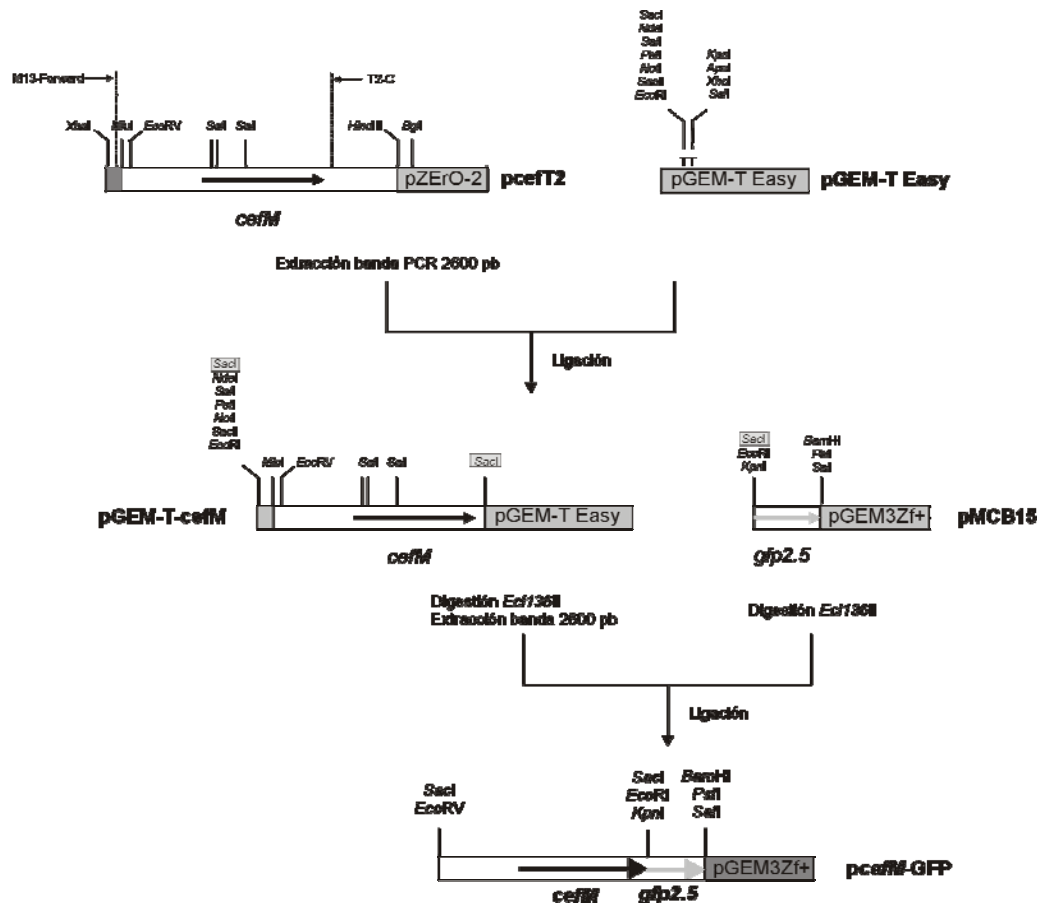


Figura 2.8. Construcción del plásmido *pcefM*-GFP utilizado en la localización *in vivo* de la proteína CefM en *A. chrysogenum*.

3. - REACTIVOS QUÍMICOS.

3.1.- Reactivos químicos de uso general.

Los reactivos empleados para la realización de los experimentos presentados en este informe fueron adquiridos a las siguientes casas comerciales: Aldrich Chemie GmbH & Co. (Steinheim, Alemania), Amersham Internacional (Reino Unido), Bethesda Research laboratorios (California, USA), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania), Carlo Erba (Milán, Italia), Difco (Detroit, Michigan, USA), ICN Biomedicals. Inc. (Irvine, California, USA), Merck (Darmstadt, Alemania), Panreac (Barcelona, España), Pharmacia (Uppsala, Suecia), Probus (Barcelona, España), Promega Co. (Madison, Wisconsin, USA), Quiagen (Crawley, Reino Unido), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA), USB (Cleveland, Ohio, USA), Stratagene (USA).

3.2.- Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos fueron utilizados como cebadores en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) y fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. Para la realización de reacciones de PCR se utilizaron cebadores de entre 18 y 30 pb, fosforilados en su extremo 5' cuando se quiso

clonar posteriormente el fragmento de ADN amplificado. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótidos	Secuencia Nucleotídica
M13-F	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13-R	5'-AGTACCAGTATCGACAAAGG-3'
T2F2	5'-TTCTGGGTAGGGTCGTATGTTAGC-3'
T2F4	5'-CGTTTGGCCCGTTGATG-3'
T2F6	5'-TATGGAGAGGCGATTAGGAC-3'
5-EcoRV	5'-TTGATATCTGAGTGGTTGTTCC-3'
5-SalI	5'-TCCGCGACGAGGGGGTTCGAC-3'
Distal	5'-CTTCATTAGGGTGCGGGAGAC-3'
pC-AC-F	5'-CCATGCCATGGGCGGTTCGAATCGTTCTGCTAC-3'
pC-AC-R	5'-CCATGCCATGGACAACACCGTGATGAGGGGAC-3'
actA-F	5'-GGTGATGATGCTCCCCGAGCTGTT-3'
actA-R	5'-ATGTCGACACGGGCAATGGC-3'
GPDA-F	5'-CGGAGAGACGGACGGACGCAG-3'
Tcyc-R	5'-GAAAAGGGGGACGGATCTCCG-3'
T2IN	5'-ATAAGCTTACCCCGACAATGCCGTCA-3'
T2N	5'-GAGCTCATGGTCAAGGCAGAAGA-3'
T2C	5'-GAGCTCCACAGCGCTGGCTGAA-3'
SM-D	5'-CCATGCCATGGTCAAGGCAGAAGAGGA-3'
SM-R	5'-CCCAAACACCCACCGCCAA-3'
R1IF	5'-AAGGCACTAGCGAAGCTCGA-3'
R2IR	5'-GCTGGCTCCGCTCCTGA-3'
RF1	5'-TTCAACAATTCACCCAC-3'
RF2	5'-TGCAGACGAATTTTACCG-3'
RF3	5'-TTCCAAAGCGAGGAGTCA-3'
RF4	5'-ATTGTTTTTCGGGGCTGGTC-3'
RF5	5'-ATTCATGTCACAAGCCCC-3'
RF6	5'-ATAGCAGGGATGGCGACAG-3'
RF7	5'-AGCATTCAGCTGTTGGG-3'
RF8	5'-ACCGAGACCTATTTCAA-3'
RF9	5'-ATGTCGCGCAACTACCAGCC-3'
RF10	5'-GGTTGTGGGATAAATCTT-3'
R1R	5'-ATGCAGCCAGGTTATAA-3'
R2R	5'-TTTCGCCGTTTCGATTGCC-3'
R3R	5'-CAGATTCTTACTGGAGGAG-3'
R4R	5'-ACACCATCCGAAAGCACA-3'
R5R	5'-GACAGGACGTTTCATGTGG-3'
R6R	5'-TGCGGTCGCAATACGGTA-3'
R7R	5'-TGCCCCCAGAGTTTCCCC-3'
R8R	5'-AGATATCCACACACCACGGT-3'
R9R	5'-TGTGTTAATGCGGCCGGC-3'
R10R	5'-TGAGAAGACCGTTGCCCT-3'
SCR-D	5'-CCATGCCATGGCGAGTCCAAAGACTTGC-3'
SCR-R	5'-AGGGCATCAACTTGGTGACG-3'
F1	5'-ATGGACATGAATGCGTATTTGACGA-3'
R1	5'-TCACTGCAACGCGCCCGGATAGTCC-3'
R2	5'-CCAACAGCTGGAATGCTTGGATAGA-3'

Tabla 2.1. Oligonucleótidos empleados en este trabajo y secuencia nucleotídica de los mismos.

4.- MEDIOS DE CULTIVO.

4.1.- Medios de cultivo para bacterias.

- **Medio Luria-Bertani (LB)** (Miller, 1972).

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
CaCl ₂	10 g
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 7,5	

Para conseguir medio sólido se añadió un 2 % de agar.

- **Medio Terrific-Broth (TB).**

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

Después de esterilizar se añaden 100 ml de la siguiente solución de sales

K ₂ HPO ₄	170 mM
KH ₂ PO ₄	720 mM

Para conseguir medio sólido se añadió un 2 % de agar.

- **Medio NZY.** (Miller, 1972).

NZ amina tipo A	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
MgCl ₂ ·7 H ₂ O	2 g
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 7,5	

Para medio sólido se añadió agar al 2 %. Cuando se utilizó este medio como cobertera la concentración de agar fue 0,7 %.

- **Medio SOB.** (Hanahan, 1983).

Bacto-triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,5 g
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 7,5	

Antes de su utilización se añaden 20 ml de una solución MgSO₄ y MgCl₂ 1 M.

- **Medio TSB.**

Peptona de caseína	20 g
Peptona de soja	5 g
Glucosa	2,5 g
NaCl	6 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 7,5	

Para la determinación de la concentración de antibióticos por bioensayo, se añade agar al 1%.

4.2.- Medios de cultivo para *Acremonium chrysogenum*.

- **Medio LPE** (Medio de esporulación y mantenimiento; modificado de Le Page y Campbell, 1946).

Glucosa	1 g
Extracto de levadura	2 g
NaCl	1,5 g
CaCl ₂	10 g
Agar	20 g
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 6,8	

- **Medio MMC** (Medio definido de crecimiento; modificado de Queener *et al.*, 1985).

Sacarosa	31,6 g
Glucosa	2,2 g
Sólidos de maceración del maíz	0,5 g
L-Asparagina	7,5 g
Acetato amónico	0,22 g
KH ₂ PO ₄	15 g
K ₂ HPO ₄	21 g
Na ₂ SO ₄	0,75 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,18 g
CaCl ₂	0,06 g
Solución de sales	1 ml
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 7,0	

Composición de la solución de sales en gramos por litro:

Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	15g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	3 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,8 g

- **Medio TSAS.**

Medio TSB (Tryptic Soy Broth) (Difco)	30 g
Sacarosa	103 g
Agar (Difco)	30 g
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 7,0	

- **MCFA** (medio complejo de fermentación de *Acremonium*):

CaCO ₃	1,5 g
Sólidos de maceración del maíz	5 g
Melazas de remolacha	30 g
Extracto de carne (Difco)	30 g
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 6,8	

- **MDIA** (medio definido de inóculo de *Acremonium*; Shen *et al.*, 1984):

Glucosa	10 g
CaCO ₃	5 g
Sólidos de maceración del maíz	30 g
Almidón	30 g
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 7,0	

- **MDFA** (medio definido de fermentación de *Acremonium*; Shen *et al.*, 1984):

Sacarosa	36 g
Glucosa	27 g
DL-metionina	3,2 g
L-Asparragina	12 g
Solución de sales N°1	8 ml
Solución de sales N°2	144 ml
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 7,4	

Composición de la solución de sales N°1 en gramos por 100ml:

Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	2g
--	----

Composición de la solución de sales N°2 en gramos por litro:

K ₂ HPO ₄	104 g
KH ₂ PO ₄	102 g
Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	11,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,4 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,2 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,05 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5 g

- **CCM** (medio complejo de cultivo; Minuth *et al.*, 1982)

Sacarosa	3 g
Medio TSB((Tryptic Soy Broth) (Difco)	5 g
Extracto de carne (Difco)	1 g
Extracto de levadura	1 g
NaCl	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,018 g
Dextrinas de patata (Fluka)	1,5 g
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 7,0	

5.- CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.

5.1.- Cepas bacterianas.

5.1.1.- Crecimiento de las cepas bacterianas.

El crecimiento en medio sólido de las diferentes cepas de *E. coli* empleadas, se realizó a 37 °C durante 16-18 horas. El cultivo en medio líquido tuvo lugar en matraces de 500 ml sin indentaciones a una temperatura de 37 °C y 250 rpm de agitación. Cuando se cultivaron clones resistentes a antibióticos, los medios fueron complementados con las siguientes concentraciones de los mismos:

- Ampicilina (Ap) 100 µg/ml
- Cloranfenicol (Cm) 30 µg/ml
- Kanamicina (Km) 50 µg/ml

5.1.2.- Mantenimiento de las cepas bacterianas.

La conservación de las cepas bacterianas se realizó de diferentes formas en función del tiempo de mantenimiento requerido:

- Siembra en placa Petri y selladas con Parafilm: (2-3 semanas).
- Suspensión en glicerol al 20 % y a -20 °C (1 año).
- Liofilización (varios años).

5.2.- Cepas fúngicas.

5.2.1.-Crecimiento de *Acremonium chrysogenum*.

Para el crecimiento sobre medio sólido de las diferentes estirpes de *A. chrysogenum* empleadas, se incubaron a 28 °C durante 7 días; utilizando medio LPE para crecimiento y esporulación.

Para el crecimiento de *A. chrysogenum* en medio líquido se utilizaron matraces de 500 ml con indentaciones, con 100 ml de medio e incubados a 25 °C y 250 rpm en agitadores orbitales. Las fermentaciones se iniciaron con un 10% de cultivo de inoculación. El cultivo de inoculación se obtuvo inoculando esporas (esporas de seis placas de medio LPE por cada 100 ml de medio de inóculo) en medio definido de inóculo, e incubando durante 48 h en las condiciones de crecimiento descritas anteriormente.

5.2.3.- Mantenimiento de las cepas de *A. chrysogenum*.

La conservación y el mantenimiento de las cepas de *Acremonium chrysogenum* se realizó a partir de esporas frescas de las siguientes formas:

- Siembra en placa Petri y selladas con parafilm y a 4 °C (3-4 semanas).
- Suspensión de esporas en glicerol al 40 % y a -20 °C (2 años).
- Liofilización (varios años).

5.3.- Determinación del crecimiento de los microorganismos.

El crecimiento bacteriano fue determinado midiendo la turbidez del medio de cultivo líquido utilizado. Esto se llevó a cabo mediante la lectura de la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro.

En hongos filamentosos el crecimiento se valoró mediante el cálculo del peso seco por volumen de medio. El micelio fue recogido de las muestras de fermentación (4 ml) tras centrifugación y dos lavados con NaCl 0,9 % (1 volumen). Finalmente el micelio se secó a 80 °C durante 7 días.

6.- PRODUCCION DE CEFALOSPORINA C POR *A. chrysogenum*.

Para estudiar la producción de cefalosporina C por *A. chrysogenum* se realizaron fermentaciones en condiciones de producción. Así se creció un pre-inóculo durante 48 horas a 25 °C y 250 rpm inoculando en un matraz indentado de 500 ml con 100 ml de medio MDIA las esporas procedentes de 6 placas de medio LPE crecidas durante 7 días a 28 °C. Una vez transcurridas las 48 horas, las fermentaciones se iniciaron inoculando con 10 ml de medio MDIA otro matraz indentado que contenía 100 ml de medio MDFA. Igualmente se incubaron a 25 °C y 250 rpm tomando muestras del caldo de fermentación cada 24 horas hasta las 144 horas.

Por último las muestras se bioensayaron frente a *E. coli* ESS 22-31 como se describe en el apartado siguiente.

7.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CEFALOSPORINAS EN CALDOS DE FERMENTACIÓN DE *A. chrysogenum* (BIOENSAYO).

La cuantificación de la producción de antibiótico en los caldos de cultivo de las fermentaciones de las diferentes cepas de *A. chrysogenum* se realizó por duplicado con triplicados (repetidas 3 veces). En este tipo de ensayo se utilizó un microorganismo sensible a cefalosporina C (*E. coli* ESS-22-31) se inocula en medio TSB con agar al 1 % (a 45 °C) con penicilinasa de *Bacillus cereus* UL1 que hidroliza el anillo penam de las penicilinas pero no el ceph-3-em de las cefalosporinas. Se prepararon placas Petri de 14 cm de diámetro con 40 ml de dicho medio. Una vez solidificado se perforan hasta 9 agujeros de 7 mm de diámetro. En estos agujeros se añaden 60 µl de las muestras de los caldos de fermentación y los patrones de cefalosporina C. Una vez cargadas las placas de bioensayo, se incuban a 4 °C durante al menos 1 hora para permitir la difusión del antibiótico a través del medio. Después, las placas de bioensayo se incubaron durante 12-15 horas a 37 °C para permitir el crecimiento del microorganismo testigo. El antibiótico presente en el medio inhibirá el crecimiento del microorganismo inoculado dando lugar a halos de inhibición del crecimiento. El diámetro del halo de inhibición de crecimiento del microorganismo es directamente proporcional en forma logarítmica a la concentración del antibiótico.

Los controles con diferentes concentraciones de cefalosporina C nos permitieron realizar una recta patrón que relaciona directamente el logaritmo de la concentración de cefalosporina C con el diámetro del halo de inhibición de crecimiento en el antibiograma. La interpolación en esta recta de los diámetros de los halos de inhibición de las muestras problema permitió determinar la concentración de cefalosporinas en los caldos de fermentación.

8.- MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

8.1.- Eliminación selectiva de ácidos nucleicos.

Los procesos de purificación de ADN o ARN conllevan habitualmente la contaminación de las muestras con ARN o ADN respectivamente. Para eliminar selectivamente alguno de los dos tipos de ácidos nucleicos, se utilizaron las enzimas ARNasa¹ y ADNasa², libres de ADNasa y ARNasa respectivamente. Ambas enzimas se utilizaron a una concentración final de 10 µg/ml, incubando la reacción 60 min a 37 °C.

¹ARNasa: Stock a 10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 15 mM. Las ADNasas presentes se eliminan hirviendo la solución durante 15 min. Se enfría lentamente y se almacena a -20 °C. ²ADNasaI: Solución de 10 mg/ml en agua.

8.2.- Manipulación de ADN.

8.2.1.- Eliminación de proteínas en muestras de ADN mediante extracción con fenol-cloroformo.

1. Se añade un volumen de fenol neutro a la muestra de ADN, se agita vigorosamente durante 20-30 segundos y se centrifuga a temperatura ambiente durante 5 minutos a 13.200 rpm.
2. Se recoge la fase acuosa superior con una micropipeta y se transfiere a un tubo limpio. Se añaden 0,5 volúmenes de fenol neutro³ y 0,5 volúmenes de CIA⁵. Se agita de nuevo vigorosamente durante 20-30 segundos y se centrifuga 5 minutos a 13.200 rpm igualmente a temperatura ambiente. La fase superior se recoge en un tubo limpio.
3. Se repite el paso 2 hasta que la interfase quede completamente libre de proteínas.
4. Se añade un volumen de CIA y se agita durante 20-30 segundos. Se centrifuga en idénticas condiciones que en los pasos anteriores y se recoge la fase superior acuosa.
5. Se precipita el ADN mezclando la fase acuosa con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2. Se incuba la mezcla a -20 °C durante 3-4 horas ó 14-16 horas si la cantidad de ADN en solución es pequeña.
6. Se centrifuga a 13.200 rpm y 4 °C durante 30 minutos, se desecha el sobrenadante y se lava el precipitado con etanol al 70 % en agua destilada. Se secan los restos de etanol al aire y se resuspende el ADN en agua destilada o en TE⁶.

³Fenol neutro: Se mezclan por agitación fuerte 3 volúmenes de fenol ácido con 1 volumen de Tris-HCl 1 M pH 8,0. Se deja reposar hasta que se separen las fases. ⁴Fenol ácido: Se mezclan por agitación fuerte 500 ml de fenol cristalino con 500 ml de agua destilada. Se deja reposar hasta que se separen las dos fases y se retira la fase superior acuosa. La fase orgánica se guarda a 4 °C. ⁵CIA: Cloroformo 24 volúmenes; alcohol isoamílico 1 volumen. ⁶TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.

8.2.2.- Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción empleadas para la realización de este trabajo fueron utilizadas siguiendo las recomendaciones de los proveedores (*Fermentas, Amershan, Promega, New England Biolabs, Takara*). La composición del tampón de reacción, pH y concentración de sales apropiado para cada enzima se respetó en todo momento, utilizando en cada caso el tampón de reacción suministrado por la casa comercial. Se siguieron las siguientes normas generales para la digestión de ADN:

- Añadir siempre menos de 1/10 de volumen de enzima con respecto al volumen final de reacción, para diluir el glicerol presente en las soluciones de conservación de las enzimas, evitando que este compuesto pueda inhibir la actividad enzimática.
- Si el ADN se encuentra disuelto en TE, realizar la reacción en un volumen 10 veces superior al volumen final de la digestión. De esta forma, el TE no altera significativamente las características del tampón de reacción.
- Incubar las reacciones a la temperatura descrita por el proveedor y durante un periodo de tiempo que no exceda el tiempo de actividad descrito para la enzima.

8.2.3.- Rellenado de extremos 5' protuberantes.

Para el relleno de extremos 5' protuberantes, se utilizó la actividad 5' → 3' polimerasa del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli*:

1. El ADN, disuelto en 15 µl de agua, se mezcla con 2 µl de tampón Klenow 10x⁷, 2 µl de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (50 mM), 1 µl de enzima (2 U/ µl). Esta mezcla de reacción se incubó a 25 °C durante 15 minutos.
2. Se inactiva la enzima mediante calentamiento a 75 °C durante un tiempo de 10 minutos.
3. Se eliminan las proteínas por fenolización y se precipita con etanol y acetato sódico 3 M pH 5,2, o bien mediante el kit "GFX PCR and Gel Band Purification Kit (*Amershan Biosciences*)".

⁷Tampón de Klenow 10x: *Tris-HCl* 0,4 M, *MgCl* 0,2 M, *NaCl* 0,5 M, pH 7,5.

8.2.4.- Desfosforilación de extremos 5' de fragmentos de ADN mediante la fosfatasa alcalina de intestino de ternera.

La desfosforilación de extremos 5' de fragmentos de ADN se utilizó para evitar la autoreligación de los extremos de una misma molécula lineal de ADN:

1. El ADN, disuelto en un volumen de 40 µl de agua, se mezcla con 5 µl de tampón fosfatasa 10x⁸ y 1 µl de fosfatasa alcalina (*NewEngland Biolabs*) (1 unidad de enzima).
2. Incubar a 37 °C durante 15 ó 60 minutos según se trate de cortes con extremos romos y 3' protuberantes, o bien extremos 5' protuberantes.
3. Inactivar la enzima mediante calentamiento a 65 °C durante 5 minutos.
4. Extraer el ADN con fenol/ CIA y precipitar con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,2 y etanol absoluto frío, o bien mediante el kit "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (*Amersham Biosciences*)".

⁸Tampón de fosfatasa alcalina 10x: *Bis-Tris-Propano-HCl* 0,5 M, 10mM *MgCl₂*, 1 mM *ZnCl₂*, pH 6,0.

8.2.5.- Ligación de moléculas de ADN.

Para la ligación de fragmentos lineales de ADN se utilizó la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (*Fermentas*)

1. Se mezcla bien entre 20-40 veces de inserto con respecto al vector en molaridad (fentomoles). Un fentomol equivale a 10⁻¹⁵ moles de extremos de ADN, siendo utilizada la siguiente fórmula para calcular la cantidad de ADN (ng) que equivale a dicha concentración en molaridad:

$$\text{cantidad de extremos de ADN} = \frac{\text{moles ADN} \times \text{tamaño ADN (pb)} \times 660 \text{ Da/pb}}{2}$$

2. La relación molar anteriormente aplicada se realiza teniendo en cuenta que la cantidad de vector está entre 1-10 fentomoles para ligaciones cohesivas y entre 5-20 fentomoles para ligaciones con extremos romos.
3. Se añade 1 µl de tampón de ligasa 10x⁹, se mezcla bien y se añade 1 µl de enzima (1 unidad Weiss para ligaciones cohesivas y 3 unidades Weiss para ligaciones con extremos romos).
4. La reacción se incuba un mínimo de 5-10 minutos para las ligaciones de extremos cohesivos o 2 horas para las ligaciones de extremos romos a temperatura ambiente (22 °C) o toda la noche a temperatura ambiente.
5. Inactivar la ligasa mediante calentamiento a 65 °C durante 10 minutos.
6. Finalmente, los productos de reacción se transforman en la cepa de *E. coli* adecuada.

⁹Tampón de ligasa 10x: *Tris-HCl* 0,4 M; *MgCl₂* 0,1 M; *DTT* 0,1 M; *dATP* 5 mM, pH 7,8.

8.2.6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa es un método de amplificación *in vitro* de ADN en el que se reproducen, en cierta medida, las condiciones de replicación del ADN en la célula (Mullis y Faloona, 1987). Toda PCR tiene los siguientes componentes básicos:

- **Oligonucleótidos (cebadores o “primers”)**: son moléculas lineales de ADN monocatenario que determinan un punto de inicio de la síntesis de ADN, a partir del cuál la ADN polimerasa sintetizará la cadena de ADN. Se utilizaron oligonucleótidos de 18-22 pb, con extremos 5' fosforilados cuando el fragmento de ADN se quiso clonar posteriormente en algún vector.
- **ADN polimerasa**: son enzimas termoestables puesto que en las reacciones de PCR se alcanzan temperaturas entre 94-98 °C en el paso de la desnaturalización. Estas enzimas proceden de microorganismos termófilos. Hoy en día, se emplean enzimas recombinantes producidas por ingeniería genética que poseen una gran procesividad y fidelidad, es decir, permiten amplificar fragmentos de ADN de gran tamaño con una gran fiabilidad.
- **Molde**: Molécula de ADN en la que existen regiones complementarias a la secuencia de los oligonucleótidos. El fragmento de ADN comprendido entre los dos cebadores será amplificado por la ADN polimerasa utilizando la información necesaria que existe en este ADN para sintetizar las nuevas hebras de ADN.
- **Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)**: Son los sustratos que utiliza la ADN polimerasa para sintetizar las nuevas hebras de ADN.

Todo ciclo de PCR consta de los siguientes pasos:

- 1) **Desnaturalización**: 94-96 °C durante 1 minuto. Consiste en favorecer la separación de los dos hebras del ADN (desnaturalización) con el fin de permitir que los oligonucleótidos anillen con sus secuencias nucleotídicas complementarias. De esta forma los cebadores pueden acceder a sus regiones complementarias.
- 2) **Hibridación o anillamiento**: 37-70 °C durante 1 minuto. La bajada de la temperatura favorece la unión de los oligonucleótidos a sus zonas de ADN complementarias. La temperatura de renaturalización debe diferir en 5 °C como máximo de la temperatura de fusión media (T_m) de los cebadores, establecida de forma empírica por su composición nucleotídica.
- 3) **Extensión o elongación**: 68-72 °C. El tiempo de extensión depende del tamaño del fragmento de ADN que se quiera amplificar. Las polimerasas utilizadas (Taq, Platinum Pfx) tienen una velocidad de síntesis entre 1 kb/minuto, por lo que los tiempos de extensión fueron entre 1 y 4 minutos para fragmentos de entre 1y 4 kb.

Todo ciclo de PCR consta de estos tres pasos fundamentales, duplicándose teóricamente la cantidad de ADN a amplificar en cada ciclo. El programa completo de PCR suele constar de entre 20-40 ciclos. Asimismo en el programa de PCR se suele incluir un paso inicial de desnaturalización a 94-98 °C durante 5 minutos, para asegurar que cuando comienza la PCR todo el ADN se encuentre completamente desnaturalizado. Después del último ciclo de PCR existe un paso final de extensión a 68-72 °C durante 5-10 minutos para que la ADN polimerasa pueda terminar de sintetizar aquellas hebras de ADN que no hubiera completado.

El procedimiento experimental que suele seguirse para realizar una reacción de PCR consiste en preparar una mezcla madre en la que se incluyen los siguientes componentes siguiendo fielmente las indicaciones del fabricante:

1. Se prepara la siguiente mezcla madre en un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml:
 - **Agua MilliQ ultrapura:** hasta el volumen final deseado. Se suele añadir entre 20-50 µl de mezcla madre por tubo.
 - **Tampón 10x de la polimerasa:** el 10 % del volumen final.
 - **dNTPs mix (stock a 2 mM):** se añade el volumen correspondiente para que queden a una concentración final entre 0,2-0,3 µM según el fabricante.
 - **MgCl (stock a 25 mM):** se añade el volumen correspondiente para que quede a 1,5 mM.
 - **Oligonucleótidos (stock a 20 µM):** se añade el volumen correspondiente de cada oligonucleótido (directo y reverso) para que queden a una concentración final de entre 0,2-0,3 µM.
 - **Molde:** se suelen añadir entre 10 pg-200 ng de ADN por cada 50 µl .
 - **Enzima:** se añaden 1 µl (2,5 unidades) por cada 50 µl.
 - **DMSO y/o “Enhancer solution” (Pfx50, Invitrogen):** se añaden entre 5-7 % de DMSO y/o entre 1-3x de Enhancer solution en el caso que el fragmento de ADN que se quiera amplificar tenga un alto contenido en G + C (mayor del 70 %).

2. Se mezclan bien todos los componentes, se reparten entre los tubos correspondientes y se colocan en el termociclador con su correspondiente programa.

¹⁰Tampón de Taq polimerasa 10x: *Tris-HCl 0,1 M; KCl 0,5 M, pH 8,3.* ¹¹Tampon de Pfx50 polimerasa 10x: *Tris-HCl 20 mM; 40 mM KCl; 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, estabilizadores, glicerol 50 %, pH 8,0.*

9.- PREPARACIÓN DE CÉLULAS DE *E. coli* COMPETENTES PARA TRANSFORMACIÓN.

9.1.- Método del cloruro de rubidio.

Descrito inicialmente por Hanahan (1983; 1985), se utiliza para obtener células competentes de la cepa DH5 α . Dichas células alcanzan eficiencias de transformación de hasta 5.10⁸ transformantes/ μ g ADN.

1. Se inocula una colonia aislada de medio SOB sólido en 5 ml de medio SOB líquido incubándolo toda la noche a 37 °C y con una agitación constante de 250 rpm.
2. Con 200-400 μ l del pre-inóculo anterior, se inoculan 100 ml de medio SOB líquido, y se incuba en las mismas condiciones de temperatura y agitación descritas en el apartado anterior.
3. Cuando el cultivo alcanza una DO_{600 nm} entre 0,4-0,5 unidades, se enfría rápidamente en hielo manteniéndose desde este momento a una temperatura constante de 4 °C.
4. Las células se recogen por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min y a 4 °C. El precipitado celular se resuspende en 30 ml de solución RF1¹² y se mantiene durante 30 minutos en hielo.
5. Nuevamente se recogen las células por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min y a 4 °C. Dichas células se resuspenden en 8 ml de solución RF2¹³ en hielo.
6. Por último las células se reparten en alícuotas de 100-200 μ l y pueden utilizarse en el momento o pueden almacenarse a -80 °C previa congelación en N₂ líquido.

¹²RF1: RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15 %, pH 5,8; ajustar el pH con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración. ¹³RF2: MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15 %, pH 6,8; ajustar el pH con NaOH 1 N. Esterilizar mediante filtración.

10.- TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli* Y OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.

10.1.- Transformación de *E. coli*.

En el presente trabajo se ha utilizado el protocolo descrito por Hanaham (1983) para la transformación de células competentes de *E. coli* obtenidas por métodos químicos.

1. Se descongelan las células en hielo durante 10 minutos.

2. Se mezclan suavemente 100 μ l de células con 1-10 μ l de solución de ADN y se incuban en hielo durante 30 minutos.
3. Se somete a la mezcla de reacción a un choque térmico mediante incubación a 42 °C durante 45 segundos. Posteriormente se mantiene la mezcla en hielo durante 3 minutos.
4. A continuación, se añaden 400 μ l de medio LB a la mezcla de transformación y se incuba a 37 °C y 250 rpm durante 45-60 minutos.
5. Finalmente, se siembra en el medio sólido selectivo para los clones transformados, habitualmente LB agar 2 % suplementado con el antibiótico adecuado para permitir únicamente el crecimiento de los clones transformados.

10.2.- Minipreparaciones de ADN plasmídico (Minipreps).

Se han seguido dos protocolos:

A) Zhou *et al.* 1990:

1. Se inocula una colonia aislada de *E. coli* en 1 ml de medio TB, suplementado con el antibiótico adecuado. Los cultivos se incuban durante 6-12 horas a 37 °C y con agitación (250 rpm).
2. Se recogen las células por centrifugación a 13.200 rpm durante 30 segundos y temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante dejando un poco para resuspender el precipitado mediante agitación fuerte.
3. Se añaden 300 μ l de solución TENS¹⁴ a cada tubo y se agita nuevamente durante 5 segundos.
4. Se añaden 150 μ l de acetato sódico 3 M pH 5,2 y se agita vigorosamente durante 5 segundos. Esto provocará la precipitación de las proteínas y los restos celulares.
5. Los restos celulares y las proteínas se concentran por centrifugación a 13.200 rpm durante 5 minutos y se eliminan del fondo del tubo mediante un palillo estéril libre de nucleasas.
6. El sobrenadante obtenido se mezcla con 900 μ l de etanol absoluto frío, precipitando de esta forma el ADN plasmídico. Este ADN se recoge mediante centrifugación a 13.200 rpm durante 5 minutos. Una vez descartado el sobrenadante el precipitado se lava con etanol al 70 % en agua.
7. Finalmente, el precipitado se seca al aire y se resuspende en 30-40 μ l de TE, almacenándose a 4 °C o a temperatura ambiente.

¹⁴**Solución TENS:** *NaOH 0,15 M; SDS 1% en TE.*

B) Holmes y Quigley, 1981:

1. Se inocula una colonia aislada de *E. coli* en un tubo eppendorf con 1 ml de medio TB, complementado con el antibiótico de selección. El cultivo se incuba durante 6-12 h a 37 °C y con una agitación de 250 rpm.
2. Se recogen las células por centrifugación durante 4 minutos a 8.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 300-350 µl de STET¹⁵. Se añaden 10 µl de una solución 10 mg/ml de lisozima en agua y se incuba 45 s con agitación fuerte.
3. Inmediatamente a la lisis de las células, la reacción se incuba en agua hirviendo durante 45 s. Mediante este tratamiento el ADN cromosómico y las proteínas se desnaturalizan, eliminándolas mediante un palillo estéril del fondo de los tubos tras una centrifugación durante 15 min a 13.200 rpm.
4. El sobrenadante obtenido se mezcla con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 1 volumen de isopropanol. Transcurridos 10 minutos el ADN plasmídico precipita por centrifugación durante 10 min a 13.200 rpm.
5. El precipitado se lava con etanol al 70 % en agua, se deja secar al aire y se resuspende en 40 µl de TE.

¹⁵**STET:** *Sacarosa 8 %, Tritón X-100 0,5 %; Tris-HCl 10 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0.*

10.3.- Obtención de ADN plasmídico a gran escala mediante lisis alcalina.

Se han seguido dos protocolos:

A) Basado en el protocolo descrito por Maniatis *et al.* 1982:

1. Se inoculan 100 ml de medio TB ó LB, complementado con el antibiótico adecuado, con una colonia aislada de *E. coli* y se incuba el cultivo durante 8-12 horas a 37 °C y agitación a 250 rpm.
2. Una vez crecido el cultivo, se recogen las células en tubos falcon por centrifugación durante 10 minutos a 4.800 r.p.m. y 4 °C, utilizando una centrífuga Beckmann Allegra R21. El precipitado obtenido se resuspende en 2 ml de solución GTE¹⁶.
3. Posteriormente a esta mezcla de células se le añaden con 2 ml de lisozima (10 mg/ml en GTE) y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.

4. Se añaden 8 ml de solución alcalina/SDS¹⁷, se mezcla suavemente por agitación y se incuba durante 5 minutos en hielo. Este proceso facilitará la desnaturalización selectiva del ADN cromosómico.
5. Se añaden 6 ml de una solución de acetato potásico pH 4,8¹⁸ y se agita vigorosamente hasta conseguir una mezcla homogénea, incubando posteriormente en hielo durante 10 minutos. Esto provocará la precipitación de las proteínas en solución.
6. A continuación se eliminan los restos precipitados centrifugando durante 25 minutos a 4.800 rpm y a 4 °C en una centrífuga Beckmann Allegra R21. El sobrenadante se recupera y se filtra a través de un filtro de nilón a un tubo Falcon limpio para eliminar los restos celulares que pudieran quedar en la solución.
7. Se añaden 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar los ácidos nucleicos y se mezclan suavemente por inversión varias veces.
8. Se centrifuga durante 30 minutos a 4.800 rpm y a 4 °C en una centrífuga Beckmann Allegra R21 para recoger los ácidos nucleicos, lavando posteriormente el precipitado con etanol al 70 % en agua. Se seca el tubo al aire para eliminar los restos de etanol y se resuspende el precipitado en 1 ml de TE.
9. Se trata la solución obtenida con ARNasa (concentración final 10 µg/ml) durante 30-90 minutos a 37 °C para eliminar el ARN. Se eliminan las proteínas por fenolización y se precipita el ADN en tubos eppendorf con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2
10. Después de recuperar el ADN por centrifugación durante 30 minutos a 13.200 rpm y 4 °C, se lava con etanol al 70 % en agua y se resuspende en 75-150 µl de TE.

¹⁶GTE: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0. ¹⁷Solución alcalina/SDS: NaOH 0,2 M; SDS 1 %.

¹⁸Acetato potásico pH 4,8: Acetato potásico 3M, ácido acético glacial 2 M, pH 4,8.

B) Basado en el protocolo descrito previamente por Zhou *et al.* 1990:

1. Se inoculan 100 ml de medio TB ó LB, complementado con el antibiótico adecuado, con una colonia aislada de *E. coli* y se incuba el cultivo durante 12-16 horas a 37 °C y agitación a 250 rpm.
2. Una vez crecido el cultivo, se recogen las células en tubos falcon mediante centrifugación durante 10 minutos a 4.800 rpm y 4 °C. Se deja un poco de medio para resuspender el precipitado.

3. Se añaden 6 ml de solución TENS¹⁴ y se mezcla suavemente por inversión varias veces (4-6 veces) hasta obtener una mezcla homogénea viscosa. Se incuba un máximo de 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se añaden 3 ml de acetato sódico 3 M pH 5,2 y se agita suavemente hasta obtener una mezcla homogénea fluída. Esto permite que precipiten las proteínas y los restos celulares.
5. A continuación, se eliminan los restos precipitados mediante centrifugación a 4.800 rpm durante 25 minutos y a 4 °C en una centrífuga Beckmann Allegra R 21. El sobrenadante se transfiere a un tubo falcon limpio.
6. Los ácidos nucleicos se precipitan añadiendo 18 ml de etanol absoluto frío y mezclando de manera suave por inversión.
7. Se centrifuga durante 30 minutos a 4.800 rpm y a 4 °C para recoger los ácidos nucleicos. A continuación, se lava el precipitado con etanol al 70 % en agua. Una vez seco el precipitado se resuspende en 1 ml de TE.
8. Se trata la solución obtenida con ARNasa (concentración final 10 µg/ml) durante 30-90 minutos a 37 °C para eliminar el ARN. Transcurrido este tiempo, se eliminan las proteínas por fenolización y se precipita el ADN en tubos tipo eppendorf con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2.
9. Después de recuperar el ADN por centrifugación durante 30 minutos a 13.200 rpm y 4 °C, se lava con etanol al 70 % en agua y se resuspende en 75-150 µl de TE.

11.- TRANSFORMACIÓN DE *Acremonium chrysogenum*.

Basado en el método descrito por Queener *et al.* (1985) permite la introducción de ADN en *A. chrysogenum*. Dicha introducción requiere una selección de transformantes mediante marcadores de selección. Los marcadores de selección utilizados fueron la resistencia a fleomicina mediante el gen *ble* y a higromicina B mediante el gen *hph*.

La fleomicina pertenece al grupo de los antibióticos metalo-glicopeptídicos de la familia de la bleomicina (Berdy, 1980). Estos antibióticos causan roturas en la cadena del ADN actuando sobre ADN monocatenario con secuencias repetidas invertidas o sobre ADN bicatenario no metilado (Hetzberg *et al.*, 1985). La resistencia a este antibiótico se adquiere mediante el producto del gen *ble*, el cuál produce un bloqueo físico de las moléculas de fleomicina. Este gen se ha encontrado en bacterias tanto Gram positivas (McKenzie *et al.*, 1986) como Gram negativas (Genilloud *et al.*, 1984; Collins y Hall, 1985). También se ha encontrado en el actinomiceto productor de fleomicina *Streptoalloteicus hindustanus* (Drocourt *et al.*, 1990).

La higromicina B es un antibiótico amino-ciclitol, sintetizado por *Streptomyces hygroscopicus*. Su actividad se centra en la inhibición de la síntesis de proteínas a través de las subunidades 70S y 80S de los ribosomas (Pardo *et al.*, 1985). La resistencia a este antibiótico, se adquiere mediante el gen *hph* (Zalacain *et al.*, 1987), que codifica la higromicina fosfotrasferasa. Dicha actividad enzimática inactiva la higromicina B mediante fosforilación.

Para la adquisición de resistencia a fleomicina, en la transformación se han utilizado plásmidos integrativos con el gen *ble* de *S. hindustanus* integrado en casetes de expresión compuestos por: un promotor fuerte (del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* y del gen *gpdA* de *A. nidulans*), el gen *ble* fusionado transcripcionalmente al promotor y el terminador del gen *cyt1* de *S. cerevisiae*. En el caso de la adquisición de resistencia a higromicina B, la transformación se realizó con plásmidos integrativos que contienen el gen *hph* de *S. hygroscopicus*; este gen se integró en un casete de expresión (Punt *et al.*, 1987) compuesto por el gen de resistencia fusionado transcripcionalmente al promotor del gen *gpdA* y al terminador del gen *trpC* de *Aspergillus nidulans*.

11.1.- Obtención de protoplastos.

1. Se inoculan 100 ml de medio MMC con las esporas procedentes de 6 placas de medio LPE, previamente incubadas a 28 °C durante 6 días. Dicho cultivo se incuba en un matraz indentado durante 20-24 h a 25 °C y con una agitación constante de 250 rpm.
2. Cuando el micelio esta suficientemente crecido, se le añaden 100 ml de NaCl 0,9 %. De la mezcla anterior, se recoge el micelio en un tubo GSA mediante centrifugación en la supercentrifuga (Sorvall) durante 30 min a 8.000 rpm y 20 °C. El micelio se resuspende en 100 ml de TPC¹⁹ con DTT 0,1 M, y se incuba en un matraz liso a 30 °C con una agitación de 250 rpm durante 2 horas. La incubación con DTT permite reducir las uniones disulfuro de la pared celular, facilitando la liberación posterior de protoplastos.
3. Finalizada la incubación a 30 °C, se vuelve a recoger el micelio como en el paso anterior y se lava con 100 ml de TPC. Posteriormente, el micelio se resuspende en un matraz liso que contiene 100 ml de TPC con una solución de enzimas líticas (Sigma Chemical Co.) a una concentración de 50 mg/ml. Dicha mezcla se incuba a 25 °C y con agitación moderada (150 rpm) durante un tiempo que oscila entre 3 y 4 h en función de la liberación de protoplastos. Dicha liberación se controla cada hora mediante observación al microscopio.
4. Los protoplastos se separan del resto de micelio mediante filtración de la suspensión a través de un filtro estéril de nilón de 30 µm de poro. La solución de protoplastos se reparte en dos tubos falcon y se precipitan mediante centrifugación en una centrífuga (Beckmann Allegra R21) a 2.500 rpm durante 2 min. A continuación se desecha el sobrenadante y se lava el precipitado tres veces consecutivas con 20 ml de NaCl 0,8M.
5. Tras la última centrifugación, se desecha el sobrenadante y se resuspenden los protoplastos en 20 ml de tampón NCM²⁰. Posteriormente se vuelve a centrifugar como en el paso anterior, se

desecha el sobrenadante. El precipitado de los protoplastos se resuspende en un volumen de NCM de manera que queden a una concentración final de $2,5 \times 10^8$ protoplastos/ml. Para ello, se hace un recuento en la cámara Thoma y se deja a 0,1 volúmenes de CCM²¹. Dicha mezcla se mantiene en hielo hasta el momento de la transformación.

¹⁹TPC: NaCl 0,8 M; Tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7. En el momento de utilizarlo se añaden 2 ml de MgSO₄ 1 M. ²⁰NCM: NaCl 0,8 M; CaCl₂ 50 mM, MOPS 10 mM, pH 7. ²¹CCM: Polietilenglicol 8.000 18 %, CaCl₂ 50 mM, MOPS 10 mM, pH 7.

11.2.- Transformación.

1. En el fondo de un tubo de 10 ml estéril, se mezclan los siguientes componentes:

Suspensión de protoplastos	100 µl
ADN (1 µg/µl)	1-10 µl

La mezcla se incuba en hielo durante 20 min.

2. A la mezcla anterior se le añaden 500 µl de solución CCM, se mezcla bien y se incuba a temperatura ambiente durante 20 min más.
3. El polietilenglicol presente en la solución (del CCM) se diluye mezclándolo con 600 µl de solución NCM. Se mantiene a temperatura ambiente hasta el momento del plaqueo.

11.3.- Plaqueo.

1. Se prepara la base de las placas de transformación con medio TSAS con el marcador de selección (concentración final de 10 µg/ml para fleomicina y 30 µg/ml para higromicina B).
2. La mezcla de transformación se reparte en tubos de 10 ml, en volúmenes de 300 µl. Posteriormente a cada tubo se le añaden 5 ml del medio TSAS (a 50 °C) para placas de 45 mm de diámetro, con el antibiótico de selección. Por último, la mezcla se añade como cobertera sobre la base de las placas de transformación y se incuban durante 7 días a 28 °C.

Se hacen los siguientes controles además de las mezclas de transformación:

1.-Control de regeneración de protoplastos: se siembran en medio TSAS: 300 µl de la mezcla de transformación.

2.- Control de reversión: se siembran en medio selectivo 300 µl de la mezcla de transformación.

12.- OBTENCIÓN DE ADN TOTAL DE *A. chrysogenum*.

Para la obtención de ADN total de *A. chrysogenum* se ha utilizado un método rápido en el cuál se obtiene poca cantidad de ADN pero suficiente para realizar análisis genéticos mediante hibridación de *Southern*, de cepas mutantes o transformantes. El protocolo fue desarrollado por F. J. Fernández en nuestro laboratorio, y es el siguiente:

1. Se inoculan 100 ml de medio MMC para *A. chrysogenum* con esporas frescas procedentes de medio LPE. El cultivo se incuba en un matraz de 500 ml indentado durante 48 h a 25 °C y agitación de 250 rpm. Se recoge el micelio a través de un filtro de nilón estéril (30-45 µm de poro), se lava con 100 ml de NaCl 0,9 %. El micelio obtenido se seca entre papeles de filtro, y se congela en nitrógeno líquido.
2. Se pulverizan 500 mg de micelio en un mortero con N₂ líquido. Se recogen en un tubo eppendorf (2,2 ml) y se mezcla con 1 ml de tampón de rotura²². Cuando la mezcla está homogénea, se le añaden 500 µl de fenol neutro y 500 µl de CIA. Se mezcla por agitación suave y se incuba en un baño con agua a 50 °C durante 30 min, agitándolo nuevamente cada 5 min.
3. Se centrifuga a 13.200 rpm y temperatura ambiente durante 5 min. Se recoge la fase acuosa (superior) y se extrae con fenol/CIA hasta que la interfase quede limpia de restos celulares (9-12 veces). Los restos de fenol se eliminan por una extracción final con CIA.
4. El ADN total se precipita con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C) y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y se incuba a -20 °C durante al menos 2 h. Transcurrido este tiempo, se centrifuga durante 30 min a 13.200 rpm y 4 °C. El precipitado obtenido se lava con etanol al 70 % en agua, se deja secar al aire y se resuspende en 40 µl de TE.

²²Tampón de Rotura: Tris-HCl 0,18 M; EDTA 10 mM, SDS 1 %, pH 8,2.

13.- ELECTROFORESIS DE ADN.

13.1.- Electroforesis de ADN.

Las condiciones de electroforesis para separar moléculas de ADN en geles de agarosa se basan en las descritas previamente por Maniatis *et al.*(1982) y Sambrook *et al.* (1989). Para la preparación del gel, se utilizó agarosa D1-electroendosmosis media (*Pronadisa*) a diferentes porcentajes (desde 0,8 hasta 2 % dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar), y TAE 1x como tampón y disolvente de la agarosa.

Las muestras de ADN se mezclaron con el volumen adecuado de tampón de carga 6x²⁴ y se calentaron durante 5 minutos en un baño a 65 °C. Posteriormente se enfriaron durante 5 minutos

en un baño con hielo y se cargaron en el gel. La electroforesis se desarrolló generalmente en geles del 0,8 % aplicando una diferencia de potencial entre 80-100 voltios durante 3 horas. Una vez finalizada la electroforesis, se tiñeron los geles sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio²⁵ durante 15-20 minutos. Los geles se observaron sobre un transiluminador de luz UV (*Vilber Lourmart* modelo ECX-26-M $\lambda = 312$ nm) y se fotografiaron con una cámara UVP Image Store 5000 (*Ultra Violet Products*) equipada con una video impresora (Video Graphic Printer UP-890CE, Sony).

El tamaño de las bandas de ADN en los geles de agarosa se estimó por comparación con varios marcadores de peso molecular. A continuación se citan algunos de ellos y el tamaño de las bandas que los componen:

- ADN del bacteriófago λ digerido con *Hind*III: 23.130; 9.416; 6.557; 4.361; 2.322; 2.027; 564; 125 pb.
- ADN del bacteriófago λ digerido con *Pvu*I: 14.167; 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; 210 pb.

²³TAE 50x: Tris base 242 g, ácido acético glacial 57,1 ml; EDTA 0,5 M, pH 8 100 ml, H₂O 1 litro. ²⁴Tampón de carga 6x para ADN: Azul de bromofenol 0,25 %, sacarosa 40 %, xileno cianol 0,25 %. ²⁵Bromuro de etidio: Se prepara un stock a 10 mg/ml; para la tinción de geles se prepara una solución diluida a 0,5 μ g/ml.

13.2.- Extracción de ADN de geles de agarosa.

Para la extracción y purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se han utilizado los siguientes métodos:

- **Freeze squeeze** (Polman y Larkin, 1989):

1. Se practica un agujero en el fondo de un tubo eppendorf y se cubre el orificio con lana de vidrio estéril. Se introduce en el eppendorf el fragmento de gel del cuál se quiere recuperar el ADN y se congela a -20 °C.
2. A continuación, se encaja el tubo eppendorf con el fragmento de gel en la boca de otro tubo eppendorf y se centrifuga el conjunto a 13.200 rpm durante 5 minutos. Después de la centrifugación se obtendrá en el tubo eppendorf inferior el tampón contenido en el gel de agarosa con el ADN disuelto en él. La agarosa habrá quedado retenida por la lana de vidrio del eppendorf superior.
3. Se añade 100 μ l de TE en el tubo superior que contiene los restos de agarosa y se centrifuga en idénticas condiciones. De esta forma se recuperan los posibles restos de ADN que pudieran quedar en los restos de agarosa.
4. Se limpia la solución obtenida mediante extracción con fenol-CIA y se precipita el ADN con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,2.

- **Sistema “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit”** (*Amersham Biosciences*):
 1. Colocar en un tubo eppendorf el fragmento de gel de agarosa que contiene el ADN que se desea purificar. El volumen máximo de las columnas es de 600 μ l.
 2. Añadir 10 μ l de *capture buffer*²⁶ por cada 10 mg de gel de agarosa. La cantidad máxima de ADN que son capaces de retener y eluir las columnas es de 25 μ g.
 3. Cerrar el tubo eppendorf y mezclar el contenido con vórtex vigorosamente. Incubar a 65 °C hasta que la agarosa se disuelva completamente (5-20 minutos).
 4. Centrifugar y transferir la muestra a una columna GFX²⁷ previamente colocada en tubo de *collection*. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se puede pasar varias veces a través de la columna sin que se sature, siempre y cuando la agarosa esté caliente y no se exceda la capacidad de unión de la columna anteriormente citada.
 5. Centrifugar a 13.200 rpm durante 30 segundos. Descartar la solución recogida en el tubo de *collection* y colocar la columna GFX en un tubo nuevo.
 6. Añadir 500 μ l de *wash buffer*²⁸ a la columna GFX. Centifugar a 13.200 rpm durante 30 segundos. Descartar la solución recogida en el tubo de *collection* y colocar la columna GFX en un tubo eppendorf de 1,5 ml.
 7. Añadir 50 μ l de *elution buffer*²⁹, agua destilada ultrapura (milliQ) o TE directamente a la matriz de fibra de vidrio de la columna GFX. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Para obtener el ADN más concentrado se debe reducir el volumen de elución, pero nunca debe ser menor de 10 μ l. Si queremos recuperar todo el ADN retenido en la columna eluiremos con un volumen de 100 μ l con alguna de las soluciones utilizadas para la elución. Asimismo se puede calentar la solución utilizada para eluir la columna puesto que aumenta considerablemente el rendimiento obtenido.
 8. Centrifugar a 13.200 rpm y a temperatura ambiente durante 1 minuto. Recuperar el ADN purificado.

²⁶**Capture Buffer:** Solución tamponada que contiene acetato y una sustancia caotrópica. ²⁷**Columnas GFX:** Columnas *MicroSpin*™ TM que contienen una matriz de fibra de vidrio. ²⁸**Wash Buffer:** Tampón Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). Es necesario diluir el wash buffer, por lo que se añaden a la botella 48 ml de etanol absoluto. ²⁹**Elution buffer:** 10 mM Tris-HCl pH 8,0.

14.- TRANSFERENCIA DE ADN.

14.1.- Transferencia de ADN mediante sistema de vacío.

Este sistema permite la transferencia del ADN, una vez digerido y desarrollado en geles de agarosa, a un filtro de nilón mediante vacío (VacuGene XL, *Amersham Biosciences*) siguiendo las instrucciones del fabricante que se detallan a continuación.

1. Una vez visualizado el gel de agarosa, se lava el gel con agua destilada.
2. Se monta el aparato de transferencia colocando un filtro de nilón (previamente incubado 1 minuto en agua destilada y 5 minutos en SSC20x) sobre la placa porosa de la cubeta de transferencia. Sobre el filtro se coloca una lámina de plástico que cubra toda la placa porosa y que posea una apertura rectangular en el centro y de un tamaño ligeramente inferior al gel. Debe colocarse de forma que el filtro quede centrado en la apertura de la lámina de plástico.
3. Se coloca el gel sobre la apertura de la lámina de plástico y se conecta la bomba de vacío. Una vez que comienza la succión se añade sobre el gel ácido clorhídrico 0,25 M, de forma que cubra toda la superficie del gel durante 15 minutos.
4. Seguidamente, se elimina el ácido clorhídrico y se sustituye por solución desnaturizante³⁰ durante 20 minutos.
5. A continuación, se elimina la solución desnaturizante y se añade solución neutralizante³¹ manteniéndola durante otros 20 minutos.
6. Se elimina la solución neutralizante y se cubre el gel con SSC 20x³² durante al menos 2 horas. Transcurrido ese tiempo, se apaga el aparato de transferencia, se retira el gel y se recoge el filtro.
7. Finalmente se eliminan el exceso de sales del filtro incubándolo en SSC6x durante 5 minutos. Una vez seco el filtro, el ADN se fija mediante luz ultravioleta.

³⁰Solución desnaturizante: NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M. ³¹Solución neutralizante: NaCl 3 M; Tris-HCl 1 M, pH 7,5. ³²SSC 20x: NaCl 3M; citrato sódico 0,3 M, pH 7,0.

15.- MANIPULACIÓN DE ARN TOTAL DE *A. chrysogenum*.

15.1.- Obtención de ARN total a gran escala.

Para extraer el ARN total de *A. chrysogenum* se ha desarrollado un protocolo basado en el propuesto por Chomczynski y Sacchi (1987). El protocolo es el siguiente:

1. Se crece *A. chrysogenum* en las condiciones deseadas. Se recoge el micelio a través de un filtro de nilón estéril (30 μm de diámetro de poro), se lava con 100 ml de NaCl 0,9 %. El micelio obtenido se seca entre papeles de filtro, y se congela inmediatamente en nitrógeno líquido. El micelio puede almacenarse a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción del ARN.
2. Se pulverizan 500 mg de micelio en un mortero (previamente tratado con cloroformo y etanol absoluto) con nitrógeno líquido hasta reducirlo a polvo fino. Se recogen en un tubo eppendorf (2,2 ml) y se añaden 1,3 ml de tampón EFA³⁴. Se homogeneiza en vórtex durante 1 minuto.
3. Posteriormente, se centrifuga a 13.200 rpm y a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. El sobrenadante se pasa a otro tubo eppendorf (2,2 ml) y se le añaden 130 μl de CIA. Se agita enérgicamente durante 15 segundos.
4. La mezcla anterior, se centrifuga a 13.200 rpm y a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. Se recoge la fase superior y se extrae de nuevo con fenol/CIA.
5. El ARN total se precipita añadiendo 0,5 volúmenes de LiCl 8 M³⁵ y se incuba a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 30 minutos.
6. A continuación, se centrifuga a 13.200 rpm y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Se elimina el sobrenadante con una pipeta teniendo cuidado de no arrastrar el precipitado.
7. Finalmente el precipitado se lava con 1 ml de etanol al 70 % en agua y se centrifuga a 13.200 rpm y a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se vuelve a lavar con 400 μl de etanol al 70 % en agua y se centrifuga en idénticas condiciones. El precipitado de ARN total se resuspende en 30 μl de H_2O libre de ARNasas³⁶.
8. La integridad del ARN puede visualizarse cargando una alícuota en gel de agarosa al 1 %. La concentración del ARN se valoró utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. El ARN se conserva a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

³³Tampón de extracción: Isotiocianato de guanidinio 4 M y lauril sarcosina al 5 % en tampón citrato sódico 25 mM pH 7.

³⁴Tampón EFA: 1 volumen de tampón de extracción suplementado con 7 μl de β -mercaptoetanol y 1 volumen de fenol neutro. ³⁵LiCl 8 M en agua milliQ doble autoclavada. ³⁶H₂O libre de ARNasas: H₂O milliQ recogida en una botella libre de ARNasas (tratada previamente con peróxido de hidrógeno y etanol absoluto) doble autoclavada.

15.2.- Obtención de ARN total a pequeña escala con el sistema RNeasy® (Qiagen).

Otra forma de extraer ARN total de *A. chrysogenum* utilizada fue el sistema RNeasy® (Qiagen) que permite obtener pequeñas cantidades de ARN de gran pureza y calidad (100 µg). Este sistema se basa en la retención del ARN en mini columnas y su posterior elución. El protocolo utilizado es el siguiente:

1. Paso 1 del apartado 15.1.
2. Se recogen 500 mg de micelio pulverizado en un tubo eppendorf estéril y se mezcla con 700 µl de tampón de lisis RTL³⁷ (al que se ha adicionado 10 µl de β-mercaptoetanol por cada ml de tampón).
3. Para eliminar los restos celulares, se centrifuga durante 3 min a 13.200 rpm, recogiendo el sobrenadante en un tubo limpio. Este paso se repite hasta que desaparezcan completamente dichos restos celulares.
4. Una vez limpio, se le añade un volumen de etanol al 70 % en H₂O libre de ARNasas. Se añaden 700 µl de la mezcla anterior a una columna de purificación y se centrifuga durante 30 s a 10.000-12.000 rpm, hasta que todo el sobrenadante atraviese la columna, repitiendo lo mismo con los 700 µl restantes.
5. La columna se lava con tampón RW1³⁸ (700 µl) y con tampón RPE³⁹ (2 veces con 500 µl), centrifugando 30 s a 10.000-12.000 rpm. En el último lavado con RPE se centrifuga durante 3 minutos para eliminar completamente los restos de etanol. Por último el ARN se eluye con 30 µl de agua libre de ARNasas³⁴.
6. Paso 7 del apartado 15.1.

³⁷Tampón de lisis RTL: *Tampón que contiene una sal de guanidina.* ³⁸Tampón RW1: *Tampón que contiene una sal de guanidina.*

³⁹Tampón RPE: *Tampón que se prepara añadiendo 4 volúmenes de etanol absoluto.*

15.3.- Retrotranscripción de ARN (RT-PCR) mediante el sistema Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen).

La presencia de intrones en ARN mensajeros se confirmó mediante la secuenciación del ADNc proveniente del ARNm maduro. La presencia o ausencia de intrones se determina por comparación de las secuencias nucleotídicas de ADN con las de ADNc. El sistema utilizado se basa en la síntesis de la hebra complementaria al ARN por la enzima retrotranscriptasa. Dicha enzima utiliza oligonucleótidos específicos como cebadores que se unen al ARN mensajero y lo elongan sintetizando ADNc a partir del ARN mensajero maduro.

El protocolo de reacción es el siguiente:

- En un tubo eppendorf estéril libre de ARNasas, se mezclan los siguientes componentes:

Tampón de reacción 2x ⁴⁰	25 µl
ARN molde (extraído por RNeasy)	10 pg-1 µg
Enzima RT/Platinum® Taq Mix	1 µl
Oligo directo (10 µM)	1 µl
Oligo reverso (10 µM)	1 µl
Agua libre de ARNasas	hasta 50 µl

- La síntesis de ADN complementario se realiza mediante la incubación a 45-55 °C durante 30 minutos. Para inactivar la retrotranscriptasa se incuba la mezcla a 94 °C durante 2 min.
- El fragmento de ADNc se amplifica mediante PCR según los parámetros indicados en el Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen).

⁴⁰Tampón de reacción 2x: *Tampón que contiene 0,4 mM dNTP, 2,4 mM MgSO₄.*

15.4.- Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes.

La electroforesis de moléculas de ARN puede realizarse en geles de TAE-agarosa cuando se necesita comprobar la integridad o en condiciones desnaturalizantes que permiten separar las moléculas de ARN en función de su tamaño. El método se basa en las indicaciones de Sambrook *et al.* (1989) y se desarrolla de la siguiente manera:

1. La composición del gel es de 1,2 % de agarosa; MOPS 1x y 6 % formaldehído disuelto en agua milliQ doble autoclavada. El gel se prepara en una botella estéril libre de ARNasas (tratada previamente con peróxido de hidrógeno y etanol absoluto) y con todos los componentes excepto el formaldehído. La mezcla se esteriliza y se deja enfriar lentamente hasta los 65°C, momento en el cuál se le añade el formaldehído. El gel se deja polimerizar en un molde y se predesarrolla a 70-80 voltios durante 10 min en tampón MOPS 1x.
2. A continuación se preparan las muestras de ARN con una composición de formaldehído al 6 %; formamida al 50 % y MOPS 1x en H₂O milliQ doble autoclavada. Se incuban a 65 °C un tiempo de 10 min y se enfrían rápidamente en hielo durante 3 minutos. Se añade el volumen apropiado de tampón de carga⁴² y se desarrolla la electroforesis a 70-80 voltios.

⁴¹MOPS 10x: *Ácido 3-(N-morfolino) propano-sulfónico 0,2 M; acetato sódico 0,05 M; EDTA 0,01 M, pH 7,0 ajustar pH con NaOH 10 M.* ⁴²Tampón de carga 6x para ARN: *Azul de bromofenol 4 %, xileno cianol 4 %, EDTA 1 mM, glicerol 50 %.*

15.5.- Transferencia de ARN por capilaridad (northern).

La técnica de Northern-blot fue desarrollada por Alwine *et al.* (1977) y Thomas (1980) y permite la transferencia de ARN a filtros de nilón. Se siguió el siguiente protocolo:

1. Concluida la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, se lava el gel con agua destilada durante 5 min. Transcurridos los 5 min, se incuba en SSC 20x durante 1 h con agitación moderada.
2. Se prepara el sistema de transferencia por capilaridad de la siguiente forma. Para ello se corta un taco de papeles de filtro y 4 papeles Whatman 3MM con la medida del gel. Igualmente se corta el filtro (nilón cargado positivamente) donde se va a transferir el ARN, con un tamaño de 1cm mayor que el gel. Los papeles Whatman y el filtro se incuban durante 1 min en agua destilada y posteriormente 2 min en solución SSC 20x. A continuación, se coloca en una bandeja un taco de 8-10 cm de alto de papeles de filtro y sobre ellos 2 papeles Whatman 3MM. Posteriormente se coloca el gel, el filtro y otros dos papeles Whatman 3MM en este orden. Por último se coloca otro taco (12-15 cm) de papeles de filtro y un peso (0,5-1 kg). Se añade solución SSC 20x a la bandeja hasta empear la torre inferior de papeles de filtro por debajo del gel. La transferencia se lleva a cabo durante 12 h.
3. Finalizado este tiempo, se marca sobre el filtro la posición de los pocillos. Finalmente, se deja secar al aire y se fija el ARN mediante luz ultravioleta.

16.- MANIPULACIÓN DE GENOTECAS FÁGICAS DE ADN.

Para la manipulación de genotecas de ADN construidas en fagos se requiere la realización de una serie de pasos que se detallan a continuación:

16.1.- Preparación de células de *E. coli* para infección.

1. Se siembra *E. coli* LE 392 en medio sólido NZY agar 2 %.
2. Se inocula una colonia aislada en NZY suplementado con maltosa al 0,2 % y MgSO₄ 10 mM; se incuba a 37 °C y 250 rpm hasta que alcanza una DO_{600nm} de 0,5-0,8.
3. El cultivo obtenido se reparte en tubos de 10 ml, se centrifuga y el precipitado (las células) se resuspende en 2,5 ml de MgSO₄ 10 mM (células 4x). Las células pueden almacenarse hasta 15 días a 4 °C.

16.2.- Infección en medio sólido.

1. Se infectan 100 µl de células 4x con 10 µl de la suspensión de fagos diluida en tampón SM⁴³. Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos más, a 37 °C.

2. Se añaden a la infección 3 ml de NZY agar 0,7 % a 48 °C para placas de 90 mm de diámetro y 7,5 ml para las de 150 mm de diámetro. Se mezcla y extiende sobre base de NZY agar 2 %. Se incuban a 37 °C hasta que los halos de lisis sean visibles. Finalmente las placas se almacenan a 4 °C hasta su uso.

⁴³**Tampón SM:** *NaCl* 0,1 M; *MgSO₄* 10 mM, *Tris-HCl* 50 mM pH 7,5; *gelatina* 0,01 %.

16.3.- Transferencia de placas de lisis a filtros de nitrocelulosa.

1. Transcurridos al menos 30 minutos de permanencia de las placas a 4 °C; se coloca un filtro de nitrocelulosa (*Amersham*) sobre la superficie de la placa durante 3 minutos y se realizan marcas asimétricas con tinta azul para orientar el filtro después de la hibridación. En el caso de réplicas se transfieren durante 4 minutos.
2. Posteriormente, el filtro se trata con solución desnaturalizante durante 3 minutos y se deja secar 1 minuto más. A continuación se coloca sobre solución neutralizante 2 veces durante 5 minutos cada vez. Se deja secar durante 1 minuto y se sumerge 10 minutos en SSC 2x.
3. Por último, se deja secar nuevamente y se fija el ADN al filtro mediante luz ultravioleta.

16.4.- Amplificación de bacteriófagos en medio sólido.

1. Se recoge con una punta de pipeta estéril la placa de lisis de la cuál se quiere obtener ADN. Se introduce en un tubo eppendorf con 100 µl de tampón SM y 2 µl de cloroformo, seguidamente se mantiene a 4 °C durante al menos 4 horas para permitir la difusión del fago y se infecta como se ha descrito en el apartado 16.2, para obtener placas con lisis confluyente.
2. A dichas placas se le añaden 5 ml de tampón SM y se incuban en agitación suave a 4 °C durante 4 horas. Se recoge el sobrenadante y la cobertera añadiendo un 2 % de cloroformo.
3. Se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. Con el sobrenadante se realizan varias infecciones con distintas diluciones de esta suspensión para calcular el título (número de unidades formadoras de halos de lisis, ufp/ml).

16.5.- Obtención de ADN de fagos recombinantes.

Está basado en el protocolo descrito por Malik *et al.* (1990).

1. Se infectan 10⁹ células con 10⁷ ufps (unidades formadoras de placas de lisis) y se incuba a 37 °C durante 10 minutos, transcurridos los cuáles se inocula la infección en un matraz de 500 ml que contiene 100 ml de NZY con maltosa al 0,2 % y *MgSO₄* 10 mM. Se incuba durante 6 horas a 37 °C y 250 rpm hasta que la lisis sea total.

2. Una vez lisado el cultivo se centrifuga a 8.000 rpm durante 20 minutos; el sobrenadante se pasa a otro tubo al que se le añaden 100 µl ADNasa I² y 100 µl ARNasa A⁴⁴, se incuba 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se añaden 10 g de PEG 8000 y 4 g de NaCl calentándolo a 65 °C hasta que se disuelva y se mantiene a 4 °C entre 1 y 12 horas.
3. Los fagos se recuperan por centrifugación a 8000 rpm durante 40 minutos y se resuspenden en 5 ml de tampón SM, se añade 50 µl ADNasa I y 50 µl ARNasa A, se incuba a 37 °C durante 30 minutos.
4. Para obtener el ADN se lisan los fagos con SDS y proteinasa K⁴⁵ se incuba a 37 °C durante 1 hora, se limpia por fenolización y se precipita a -20 °C con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se centrifuga 30 minutos a 4 °C, se lava el precipitado con etanol al 70 % y se resuspende en 100 µl de tampón TE.

⁴⁴ARNasa A: Solución 10 mg/ml en agua. ⁴⁵Proteinasa K: Solución 10 mg/ml en agua.

17.- HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

17.1.- Marcaje de sondas de ADN con digoxigenina.

El sistema de marcaje se basa en la utilización del desoxinucleótido dUTP, modificado por la unión de un hapteno esteroide denominado digoxigenina (DIG), que actúa como antígeno de los anticuerpos que posteriormente se utilizarán para la detección. Los nucleótidos modificados se introducen por medio de la amplificación, a partir de cebadores unidos al azar, de la molécula de ADN (*random primer*, Feinberg y Vogelstein, 1983). La reacción de marcaje con el sistema *DIG-High Prime* (Roche) se realiza de la siguiente forma:

1. Se utiliza 10 ng-3 µg de ADN disuelto en 15 µl de agua. Esta solución se hierve durante 10 minutos con objeto de desnaturalizar el ADN y se incuba posteriormente en hielo durante 2-3 minutos.
2. Se añaden 2 µl de hexanucleótidos marcados 10 x⁴⁶, 2 µl DIG-labelling mix⁴⁷, 1 µl fragmento Klenow (2U/ µl, *Fermentas*) y se incuba a 37 °C durante 1-20 horas.
3. Se purifica la sonda para eliminar los restos de sales y la enzima. Para ello, se añaden 2 µl de EDTA 0,2 M pH 8,0, 2,5 µl de LiCl 4 M y 75 µl de etanol absoluto frío. A continuación, se mezcla varias veces por inversión suave y se incuba toda la noche a -20 °C ó 30 minutos a -80 °C.
4. Se recupera el ADN de la sonda mediante centrifugación a 13.200 rpm durante 30 minutos y a 4 °C. El precipitado de ADN, se lava con etanol al 70 % en agua para eliminar los

restos de sales y se deja secar al aire. Finalmente, el ADN se resuspende en 400 µl de TE durante 30 minutos a 37 °C. La sonda se puede utilizar inmediatamente o puede almacenarse durante más de un año.

⁴⁶Hexanucleótidos marcados 10x: dATP/dCTP/dGTP cada uno 1 mM, dTTP 0,65 mM; ⁴⁷DIG-Labeling Mix: DIG-11-dUTP 0,35 mM; tampón de reacción 5 × 50 %.

17.2.- Prehibridación e hibridación.

▪ Prehibridación:

Los filtros tanto con ADN como con ARN, deben bloquearse para eliminar los sitios activos del filtro que pudieran retener la sonda y producir la aparición de señales inespecíficas de hibridación. En el caso de la hibridación con sondas no radiactivas se utiliza un producto bloqueante (Blocking reagent, *Roche*).

1. Se coloca el filtro entre dos trozos de plástico transparente para envasar y se sellan los cuatro lados dejando una solapa (10-15 cm de longitud) sin sellar en una de las esquinas.
2. Se añade el agente bloqueante al tampón de hibridación⁴⁸ quedando a una concentración final de 200 µg/ml. Se introduce el tampón de hibridación en la bolsa (como máximo 100 µl de tampón por cm² de superficie del filtro) y se sella completamente la bolsa evitando que queden burbujas de aire en su interior.
3. Se incuba en agitación a la temperatura de hibridación adecuada (normalmente 42 °C) durante 3-5 horas.

⁴⁸Tampón de hibridación no radiactiva para ADN: Formamida 40 %, SSC 5x, Sarcosina 0,1 %; SDS 0,02 %; agente bloqueante 2 %. ⁴⁹Tampón de hibridación DIG Easy Hyb para ARN (*Roche*).

▪ Hibridación:

1. Se abre la bolsa por la solapa y se elimina su contenido. Se añade tampón de hibridación fresco con la sonda desnaturalizada (hervida 10 minutos y enfriada 2-3 minutos en hielo). Tanto para hibridaciones con ADN como ARN se utilizó fragmentos ADN lineal como sonda
2. Se cierra la bolsa eliminando las burbujas de aire y se incuba durante 12-16 horas a la temperatura seleccionada y con agitación suave.

Las condiciones de astringencia de la hibridación se controlan mediante la temperatura de hibridación y mediante la composición del tampón de hibridación, principalmente atendiendo a la concentración de formamida. La hibridación estándar de filtros con ADN se realizó a 42 °C y con un 40 % de formamida. Para la hibridación de filtros con ARN se utilizó la misma temperatura y como tampón de hibridación el sistema DIG Easy Hyb (*Roche*)⁴⁹.

17.3.- Lavado de los filtros.

Una vez finalizada la hibridación, se elimina la sonda libre y el exceso de sonda unido inespecíficamente mediante el lavado de los filtros en varias soluciones. La intensidad del lavado y la temperatura dependerá de la especificidad de la sonda.

La composición de las soluciones de lavado para ADN y las condiciones estándar de incubación en ellas se describen a continuación:

1. SSC 2x; SDS 0,1 %. 15 minutos a la temperatura de hibridación.
2. SSC 0,1x; SDS 0,1 %. 25 minutos a la temperatura de hibridación.

En el caso de filtros de ARN los lavados se realizaron siguiendo las recomendaciones del sistema DIG Easy Hyb (Roche).

Una vez lavados los filtros se dejan secar al aire y se realiza la detección inmunológica.

17.4.- Detección inmunológica.

La detección en filtros hibridados con sondas marcadas con digoxigenina se realiza por métodos inmunológicos. La sonda se detecta por su unión a un anticuerpo anti-digoxigenina que lleva unida la enzima fosfatasa alcalina. La detección se realizó mediante quimioluminiscencia mediante las bandas de hibridación. El protocolo utilizado para la detección fue el siguiente:

1. Se lava el filtro a temperatura ambiente con solución 1⁵⁰ durante 5 minutos en agitación.
2. A continuación, el filtro se incuba durante 30 minutos en solución 2⁵¹ en agitación.
3. Se introduce el filtro en una bolsa transparente para envasado y se incuba al menos durante 1 hora en solución 2 (20-50 ml) con 2 µl de anticuerpo/10 ml de solución frente a la digoxigenina (anticuerpo conjugado a la fosfatasa alcalina, Roche). Finalizada la incubación, el filtro se lava 2 veces con solución 1 durante 15 minutos. Este lavado tiene como objetivo eliminar el exceso de anticuerpo conjugado. Posteriormente se incuba 5 minutos en solución 3⁵².
4. Se realiza la reacción de detección de las bandas de hibridación mediante quimioluminiscencia. El filtro se introduce en una bandeja con tampón 3 (20-50 ml) más 100 µl de CDP-Star (Roche) por cada 10 ml de tampón y se mantiene en oscuridad durante 5 minutos.

5. Se deja secar el filtro al aire y se expone durante 5 minutos en un casete de autoradiografía, frente a un film Hyperfilm-MP (*Amersham Biosciences*). Finalmente el film se revela pasando por las siguientes soluciones y en este orden: revelador⁵³, paro⁵⁵ y fijador⁵⁴.

⁵⁰**Solución 1 hibridación no radiactiva:** *Ácido maleico 11,61 g; NaCl 8,76 g; H₂O destilada hasta 1 litro, pH 7,5.* ⁵¹**Solución 2 hibridación no radiactiva:** *Solución 1 más agente bloqueante al 1 %.* ⁵²**Solución 3 hibridación no radiactiva:** *Tris base 12,11 g; NaCl 5,84 g; H₂O destilada hasta 1 litro, pH 9,5.* ⁵³**Revelador (Kodak Professional HC-110 Developer):** *Se prepara mezclando 1 parte de revelador y 30 de agua destilada.* ⁵⁴**Fijador (Kodak):** *Se mezclan 1 parte de fijador por cada 3 partes de H₂O destilada.* ⁵⁵**Paro:** *Solución de ácido acético al 2 % en H₂O destilada. Las soluciones CDP-Star, revelador, fijador y paro se conservan en oscuridad.*

17.5.- Reutilización de filtros de ADN marcados con digoxigenina.

La reutilización de los filtros hibridados con digoxigenina se basa en eliminar la sonda unida al filtro para poder ser utilizado para una nueva hibridación con otra sonda. Para eliminar la sonda (enlace lábil en medio alcalino), se trata con la solución A⁵⁶ durante 20 min a una temperatura mayor de 37 °C. A continuación, se lava varias veces la membrana con SSC 2x, pudiendo realizarse una nueva hibridación.

⁵⁶**Solución A:** *NaOH 0,2 M; SDS 0,1%.*

18.- SECUENCIACIÓN DE ADN.

El método utilizado para la secuenciación de ADN se basa en el método descrito por Sanger *et al.* (1977). El ADN que se va a secuenciar, sirve como molde para una PCR asimétrica en la que se utiliza un único cebador que amplifica la cadena de ADN complementaria de la cadena hibridada. En esta PCR, las cadenas de ADN sintetizadas incorporan cada uno de los cuatro didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) marcados con un fluoróforo diferente. A continuación, las cadenas se separan en el analizador genético 3130 Genetic Analyzer por su tamaño mediante electroforesis capilar. Cada cadena marcada con un fluoróforo diferente se excita por un haz láser, emitiendo una fluorescencia de una longitud de onda determinada según el fluoróforo con el que estén marcados. Esta emisión se recoge por el detector del analizador genético y se convierte en datos analizables mediante su software.

La secuenciación automática consta de los siguientes pasos:

1) Reacciones de secuencia:

La reacción de PCR asimétrica se realizó en el termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). En tubo se mezclan los siguientes componentes:

Premix	2 ó 4 μ l
Sequencing Buffer	2 μ l
Oligonucleótido (20 μ M)	1 μ l
ADN molde (200-500 ng)	X μ l
Agua MilliQ	hasta 20 μ l

El programa de PCR utilizado fue, en general, el siguiente:

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	98°C	3 minutos
Desnaturalización	96°C	10 segundos
Anillamiento	55°C	5 segundos
Elongación	60°C	4 minutos; 2·25 ciclos

Tabla 2.2. Programa del termociclador en una reacción de secuenciación.

2) Purificación de los productos amplificados:

Una vez terminada la reacción de secuencia es necesario purificarla para eliminar las sales, la enzima y los ddNTPs no incorporados. Para ello, se pasa la reacción de secuencia a un tubo eppendorf, se añaden 5 μ l de EDTA 125 mM y 60 μ l de etanol absoluto frío y se mezcla por inversión suave. Se mantiene a temperatura ambiente durante 15 minutos o se guarda a -20 °C. Posteriormente se recoge el ADN mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido se lava con 60 μ l de etanol al 70 % en agua y se centrifuga durante 15 minutos en idénticas condiciones. Finalmente, una vez seco el precipitado se almacena a -20 °C hasta el momento de carga en el secuenciador.

3) Preparación de la reacción de secuencia y carga en el secuenciador:

Se saca la muestra seca del congelador y se deja atemperar unos minutos. Se añaden 15 μ l de Hi-Di Formamida y se agita unos segundos con vórtex. A continuación, se desnaturaliza durante 5 minutos a 95 °C y se carga en el secuenciador.

4) Análisis de los resultados:

Las secuencias se analizaron con los programas informáticos Chromas y Conting Express (vector NTI 9.0).

19.- VALORACIÓN DE DESACETILCEFALOSPORINA C (DAC), CEFALOSPORINA C (CPC), ISOPENICILINA N (IPN) Y PENICILINA N (PenN) POR HPLC (CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN).

Para la detección de DAC, CPC, IPN y PenN en los caldos de cultivo de *A. chrysogenum* mediante HPLC se siguió el protocolo descrito por Ullán *et al.* (2008a):

1. Las muestras de fermentación se centrifugan a 14.000 rpm durante 5 minutos para separar los restos de medio y de micelio.
2. Se analizan 100 μ l de muestra proveniente de los caldos de cultivo (con la dilución adecuada), mediante inyección en una columna RPC18 Lichrospher® 100 (*Merck*) de 250 x 4,6 mm, montada en un cromatógrafo Waters HPLC System (bomba binaria modelo 1525 y detector dual de longitud de onda variable modelo 2487). La elución se realizó con la mezcla de solventes A: formiato amónico 20 mM 5 % metanol pH 3,5 y B metanol; con un gradiente 0-50% del solvente B (0% a 0 minutos, 50% entre 21 y 23 minutos, y 50% a 27 minutos). El flujo aplicado es de 0,9 ml/min, midiendo la absorbancia a 214 nm (para detectar IPN y PenN) y a 260 nm (para detectar DAC y CPC).

Los patrones utilizados para la identificación de estos compuestos fueron proporcionados por el Dr. J.L. Barredo (CPC y DAC), la Dra. I. Vaca (IPN) y por el Dr. C. Schofield (PenN).

20.- VALORACIÓN DE ISOPENICILINA N (IPN) Y PENICILINA N (PenN) POR HPLC.

La detección de isopenicilina N y penicilina N en los caldos de cultivo de *A. chrysogenum*, se realizó mediante su derivatización con GITC (2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil isotiocianato). El GITC reacciona a través de su grupo isotiocianato con el grupo amino de la cadena lateral de α -aminoadípico, estableciendo un enlace amina secundaria. La reacción de derivatización se basa en el protocolo descrito previamente por Neuss *et al.* (1982) y Ullán *et al.* (2002b).

1. A un volumen de caldo de cultivo, se ajusta el pH a 8 con bicarbonato sódico.
2. A continuación, se mezcla con un volumen de solución de GITC⁵⁷ y se incuba a 25 °C durante 2 h.
3. Finalizada la reacción, se centrifuga durante 5 min a 13.200 rpm y se guarda el sobrenadante a 4 °C.

La reacción (100 μ l) se analiza siguiendo el protocolo descrito por Neuss *et al.* (1982) siendo inyectados en una columna RPC18 Lichrospher® 100 (*Merck*) de 250 x 4,6 mm, montada en un cromatógrafo Waters HPLC System (bomba binaria modelo 1525 y detector dual de longitud de onda variable modelo 2487). La elución se realizó con un gradiente isocrático de MeOH:CH₃CN:AcOH:H₂O (36:7:2:55) con un flujo de 0,8 ml/min; y midiendo con una absorbancia a 214 nm.

La isopenicilina N y la penicilina N fueron identificadas mediante la cromatografía de patrones derivatizados.

⁵⁷**Solución de GITC:** 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil isotiocianato 2 mg/ml en acetonitrilo.

21.- DETERMINACIÓN INTRACELULAR DE IPN y PenN MEDIANTE HPLC.

La detección intracelular de isopenicilina N y penicilina N se realizó a partir de micelio de *A. chrysogenum* crecido en las condiciones de interés. Se siguió el protocolo detallado a continuación:

1. En un mortero se pulverizan 500 mg de micelio con nitrógeno líquido y se resuspende en 500 μ l de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.
2. Se centrifuga a 13.200 rpm y a 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio y se precipitan las proteínas añadiendo 1 volumen de metanol e incubando 30 minutos a -20 °C. Otra opción utilizada en este punto fue transferir el sobrenadante a un tubo limpio e incubarlo a 25 °C y 250 rpm para estudiar la formación *in vitro* de CPC.
3. A continuación, se elimina el metanol mediante incubación en un Speed-Vac SC110 (*Savant*) a un rango de secado bajo, equipado con un refrigerador modelo RVT100 (*Savant*) y una bomba modelo RV3 (*Edwards*).
4. Se centrifuga a 13.200 rpm y temperatura ambiente durante 5 minutos.
5. Se analizan 100 μ l del sobrenadante en una columna RPC18 Lichrospher® 100 (*Merkel*) de 250 x 4,6 mm, montada en un cromatógrafo Waters HPLC System (bomba binaria modelo 1525 y detector dual de longitud de onda variable modelo 2487). Se siguieron los métodos descritos en los apartados 19 y 20 del presente capítulo.

22.- MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.

22.1.- Preparación de los extractos libres de células.

1. Se centrifuga el cultivo de *A. chrysogenum* crecido en las condiciones deseadas a 4.400 g durante 10 minutos y a 4 °C.
2. Se lava 3 veces con NaCl al 0,9 %, centrifugando en idénticas condiciones.
3. Se resuspende el precipitado celular en tampón TD⁵⁸ frío.

4. Se rompen las células mediante sonicación en hielo utilizando seis pulsos de 20 segundos con intervalos de 1 minuto entre cada pulso.

5. Se centrifuga la mezcla obtenida en las condiciones del apartado 1. Se separa la fracción insoluble de la soluble.

6. Se resuspende el precipitado con las proteínas integrales de membrana en tampón TD con SDS al 2 % mediante agitación a 15 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente.

7. Se centrifuga la mezcla anterior a 13.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido se analizó mediante Western-blotting.

⁵⁸**Tampón TD:** *Tris-HCl 50 mM, DTT 5 mM y solución Complete™ para inhibición completa de proteasas (Roche), pH 8,0.*

22.2.- Determinación de la concentración de proteínas totales.

Para la determinación de la concentración de proteínas totales se siguió el protocolo colorimétrico descrito por Bradford (1976), mediante el sistema Protein assay (BioRad):

1. Se preparan diferentes soluciones de concentración conocida de seroalbúmina bovina (20, 10, 5, 2, 1, 0 µg/ml) y diferentes diluciones del extracto libre de células (1:200; 1:500; 1:1.000).
2. Se mezclan 800 µl de las soluciones proteicas anteriores con 200 µl del reactivo de Bradford y se incuba durante 5-30 min a temperatura ambiente.
3. Se mide la absorbancia a 595 nm de todas las soluciones. Posteriormente con los patrones de concentración conocida, se realiza una recta patrón en la cuál la absorbancia a 595 nm es directamente proporcional a la concentración de proteínas. Finalmente mediante la interpolación de la absorbancia del extracto libre de células en esta recta patrón, se determina la concentración de proteínas.

22.3.- Electroforesis de proteínas.

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida y en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970). Así las proteínas se separan mediante un sistema discontinuo que emplea dos geles: un gel concentrador con un tamaño de poro no restrictivo que se forma sobre un segundo gel llamado separador. En este sistema cada uno de los geles se prepara con un tampón de diferente pH y fuerza iónica, utilizándose un tercer tipo de tampón de electroforesis. Las proteínas se concentran al pasar a través del gel concentrador y se cargan negativamente de forma proporcional a su masa. Posteriormente las proteínas se separarán en el gel separador según su masa molecular.

En la siguiente tabla se muestran los volúmenes de cada reactivo (ml) utilizados para preparar geles de poliacrilamida SDS-PAGE (10 ml) de diferentes concentraciones:

	Gel separador 7,5 %	Gel separador 10%	Gel separador 13%	Gel Concentrador
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5	4,07	2,5	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	2,5	-	1,25
Acilamida 30% bisacrilamida 0,8 %	2,5	3,33	4,3	0,65
SDS 10 %	0,1	0,1	0,1	0,05
Persulfato amónico 10 %	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,005	0,005	0,005	0,007
Agua destilada	4,85	4,07	3,04	3,05

Tabla 2.3. Componentes utilizados para la preparación de geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

Para llevar a cabo la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se siguió el protocolo que se describe a continuación:

1. Se monta la cubeta para la polimerización de los geles utilizando el sistema Mini-Protean III (*Bio-Rad*) para geles de 7 x 8 cm de acuerdo con las indicaciones del fabricante.
2. Se prepara el gel separador utilizando las cantidades necesarias según la tabla anterior. Por último, se añade el persulfato amónico y el TEMED que son los catalizadores de la polimerización. Dicha mezcla se añade entre los cristales hasta la altura deseada evitando la formación de burbujas.
3. Inmediatamente después se cubre el gel con isopropanol para evitar que el oxígeno del aire inhiba la polimerización. Se deja polimerizar durante 45-60 minutos.
4. Se prepara el gel concentrante y se añade sobre el gel separador, retirando previamente el isopropanol. A continuación, se coloca un peine entre los dos cristales para formar los pocillos. Se deja polimerizar durante 15 minutos y se retira el peine.
5. Se preparan las muestras añadiendo tampón de carga desnaturalizante⁵⁹ y se hierven durante 10 minutos.
6. Se monta el aparato de electroforesis y se llena las cubetas con tampón de electroforesis⁶⁰.
7. Se carga las muestras y se desarrolla la electroforesis a 150V durante 1 hora hasta que el colorante del tampón de carga se salga del gel.
8. Se retira el gel y se tiñe con solución de Coomassie⁶¹.

9. Se lava el exceso de colorante con abundante agua destilada.

10. Se sumerge el gel en solución de desteñido⁶² hasta que el fondo se decolore por completo.

El peso molecular de las proteínas se estimó mediante comparación con marcadores con un marcador de peso molecular (*BioRad*) de tamaño conocido.

⁵⁹**Tampón de carga desnaturalizante:** 1,2 ml de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 2 ml de SDS 10 %; 1 ml de glicerol; 0,5 ml de azul de bromofenol 0,5 % en agua milliQ. En el momento de su uso se añaden 50 µl de β-mercaptoetanol por cada 1 ml de tampón. ⁶⁰**Tampón de electroforesis:** 14,4 g de glicina, 3 g de Tris base y 10 ml de SDS al 10 %, pH 8,3. ⁶¹**Solución de Coomassie:** Azul de Coomassie 0,1 % en metanol al 40 % y ácido acético al 10 %. ⁶²**Solución de desteñido:** metanol al 20 % y ácido acético al 7 %.

22.4.- Transferencia de proteínas (Western-blotting).

La técnica conocida como Western-blot fue descrita por Towbin *et al.* (1979) y permite la transferencia de proteínas a una membrana de PVDF (ImmobilonR, *Millipore Co.*). Se siguió el protocolo:

1. Finalizada la electroforesis, se incuba el gel de poliacrilamida en tampón de transferencia durante 5-10 minutos. Se puede eliminar el gel concentrador.
2. Se sumerge el filtro en metanol durante 20 segundos y se lava dos veces en tampón de transferencia durante 3 minutos.
3. Se monta el aparato de electrotransferencia (*BioRad*) de la siguiente forma. Primero, se humedece en tampón de transferencia las esponjas y dos papeles Whatman 3MM previamente cortados de un tamaño ligeramente superior al gel. A continuación, se coloca sobre el soporte del aparato de transferencia y en este orden: una esponja, un papel Whatmann, el gel, el filtro, el otro papel Whatmann y la otra esponja. Se coloca todo con cuidado evitando que queden burbujas de aire. Se cierra el “sándwich” y se introduce en la cubeta de electrotransferencia, quedando el filtro entre el gel y el ánodo.
4. Se desarrolla la transferencia a 150 v durante 2 horas a temperatura ambiente y se coloca la cubeta de electrotransferencia en hielo para evitar que se caliente.
5. Se desmonta el sándwich y se retira el filtro. La eficiencia de la transferencia se puede comprobar tiñendo en solución Coomassie parte del filtro durante 20-30 minutos y posterior incubación en solución de desteñido durante otros 10-15 minutos.

22.5.- Detección inmunológica.

La detección inmunológica de filtros de proteínas inmovilizadas se realizó de la siguiente forma:

1. Finalizada la transferencia, se lava el filtro tres veces con tampón de lavado⁶³ en agitación suave durante 5 minutos cada vez.

2. Se incuba el filtro en tampón de saturación⁶⁴ durante 2-3 horas a temperatura ambiente y en agitación. De esta manera, se bloquean los sitios activos del filtro a los que podría unirse inespecíficamente el anticuerpo.
3. A continuación, se lava el filtro en tampón de lavado un número de tres veces durante 5 minutos cada vez.
4. Se incuba el filtro con el anticuerpo primario (frente a nuestra proteína o bien frente aquella a la que se encuentre unida) en 10-30 ml de tampón de saturación durante 14 horas a 4 °C.
5. Nuevamente se vuelve a lavar el filtro con tampón de lavado de la misma forma que en el paso 3.
6. Se incuba el filtro con el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, conjugado a la enzima fosfatasa alcalina) en una dilución 1:10.000 en tampón de lavado durante 30 minutos.
7. Seguidamente se lava el filtro como en el paso 5.
8. Se revela el filtro mediante incubación en tampón de revelado⁶⁵ suplementado con 33 µl de solución NBT (Roche)⁶⁶ y 33 µl de solución BCIP (Roche)⁶⁷ por cada 10 ml de tampón de revelado. Se realiza a temperatura ambiente y sin agitación. Una vez que aparecen las señales de hibridación, se para la reacción por dilución con abundante agua destilada. Se seca el filtro y se guarda a temperatura ambiente convenientemente envuelto.

⁶³Tampón de lavado: Tris-HCl 6,05 g; NaCl 8,76 g; 2 ml de Tween 20; agua destilada hasta 1 litro, pH 8. ⁶⁴Tampón de saturación: Tampón de lavado con leche en polvo desnatada al 5 %. ⁶⁵Tampón de revelado: Tris-HCl 12,12 g; NaCl 5,9 g; MgCl₂ 10,16 g; agua destilada hasta 1 litro, pH 9,5. ⁶⁶Solución NBT: 75 mg/ml en N,N-dimetilformamida al 70 %. ⁶⁷Solución BCIP: 50 mg/ml en N,N-dimetilformamida.

23.- MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA.

El concepto básico de microscopia confocal fue desarrollado por Marvin Minsky y patentado en 1957. Más tarde, M. David Egger desarrolló el primer microscopio confocal láser que realizaba un barrido mecánico, publicando las primeras imágenes de células en 1973. El físico G. Fred Brakenhoff desarrolló un microscopio de barrido confocal en 1979, mientras que Colin Sheppard contribuyó a la técnica con la teoría de la formación de la imagen. A finales de la década de 1980, Tony Wilson, Brad Amos y John White demostraron la utilidad de las imágenes confocales en el estudio de la fluorescencia de muestras biológicas. Finalmente, en 1987 apareció el primer microscopio confocal comercial. A partir de aquí el avance de este tipo de microscopía ha sido enorme siendo muy utilizados en la actualidad.

El principio de la microscopía confocal láser de epifluorescencia se basa en que la luz emitida por un láser (fuente de excitación) pasa a través de una fina apertura situada en un plano conjugado (confocal) con un punto barrido en la muestra, situándose una segunda apertura en frente del detector (tubo fotomultiplicador). El láser es reflejado por un espejo dicromático y barrido a través de la muestra en un plano focal definido. Posteriormente, la fluorescencia secundaria emitida por la muestra (en el mismo plano focal) pasa de nuevo a través del espejo dicromático y es focalizada en un punto confocal en la apertura del detector. Esta fluorescencia es convertida en una señal eléctrica analógica por un fotomultiplicador y transformada en una imagen digital en la unidad del escáner por un convertidor analógico-digital (A/D).

Actualmente existen dos técnicas diferentes que permite el barrido del láser en un microscopio confocal de fluorescencia. Por un lado, los microscopios que contienen un único láser que utiliza un par de espejos controlados por un galvanómetro mediante un ordenador o bien espejos oscilantes más rápidos. Por otro lado, los microscopios que contienen múltiples láseres equipados por un disco rotador Nipkow dentro del que existen múltiples aperturas y microlentes. Este tipo de microscopios utilizan lámparas de descarga de arco en vez de láseres para mejorar la detección de bajos niveles de fluorescencia y reducir el daño de las muestras. Estos microscopios permiten capturar rápidamente las imágenes mediante una cámara de carga acoplada.

Los microscopios confocales de fluorescencia están diseñados sobre un microscopio óptico convencional o invertido en los que se emplean uno o más láseres que permiten excitar los fluoróforos de la muestra. La imagen se forma punto por punto mediante un detector especializado (tubo fotomultiplicador o fotodiodo) siendo digitalizada mediante un ordenador que controla los diferentes dispositivos empleados en la adquisición de las imágenes.

Las imágenes de fluorescencia mostradas en este trabajo fueron obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia, utilizando un microscopio confocal de fluorescencia modelo RADIANCE 2000 (*BioRad*) acoplado a un microscopio de epifluorescencia (*Nikon Eclipse*).

Este microscopio permite obtener imágenes de fluorescencia mediante tres tipos de láseres para la excitación de fluoróforos. Cada láser tiene sus propios tubos fotomultiplicadores y una serie de filtros que permite seleccionar el tipo de láser utilizado.

Existen tres tipos de filtros de fluorescencia:

- PMT1: posee un láser de argón que excita con luz a una longitud de onda $\lambda = 488$ nm siendo recogida la luz emitida a una longitud de onda $\lambda = 500$ nm, utilizado para las imágenes de color verde como GFP (Green Fluorescent Protein), eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein).
- PMT2: posee un láser de helio verde-neón que excita con luz a una longitud de onda $\lambda = 547$ nm siendo recogida la luz emitida a una longitud de onda $\lambda = 560$ nm, permite

recoger las imágenes de fluorescencia de color rojo como la proteína roja fluorescente (DsRed2).

- PMT3: posee un láser de diodo rojo que excita con luz a una longitud de onda $\lambda = 647$ nm siendo recogida la luz emitida a una longitud de onda $\lambda = 660$ nm.

Los tubos fotomultiplicadores de este microscopio poseen unos prismas que permiten capturar la luz utilizando la reflexión total interna.

Por último, las imágenes obtenidas por dicho instrumento fueron procesadas con el programa informático LaserSharp2000.lnk.

RESULTADOS

RESULTADOS

SECCIÓN I: ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DEL GEN *cefM* EN LA BIOSÍNTESIS DE CEFALOSPORINA C EN *A. chrysogenum*.

1.- CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN ORF10 EN *A. chrysogenum*.

A pesar de que tanto los genes que participan en la ruta de biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum* como las enzimas que éstos codifican han sido ampliamente caracterizados, poco se sabe acerca de la mayor parte de los sistemas de secreción tanto de intermediarios como del producto final (cefalosporina C) de la ruta. Hasta la fecha, el único gen descrito era el gen *cefT*, situado “aguas arriba” del gen *pcbAB* y que codifica a una proteína de la superfamilia MFS (del inglés “Major Facilitator Superfamily”), denominada CefT, implicada en la secreción de cefalosporinas y penicilinas hidrofílicas (Ullán *et al.*, 2002a; 2008b). Sin embargo, la inactivación del gen *cefT* no afecta a la secreción de cefalosporinas, por lo que deben existir otros sistemas de secreción adicionales (Ullán *et al.*, 2002b).

Por este motivo, se buscaron otros marcos de lectura abiertos que codificaran para transportadores implicados en la secreción de antibióticos β -lactámicos, “aguas abajo” del gen *cefD1*. Para ello, se realizó una búsqueda en la genoteca λ -EMBL3-ble de la cepa *A. chrysogenum* C10 (Gutiérrez, 1994) utilizando como sonda un fragmento *SmaI-EcoRV* de 330 pb interno al gen *cefD1*. Se obtuvieron 6 fagos positivos (F2, F3, F4, F5, F6 y F8) con insertos de diferentes tamaños de ADN de *A. chrysogenum*. El análisis de la secuencia de la región “aguas abajo” del gen *cefD1* contenido en el fago F8, reveló la presencia de un nuevo marco de lectura abierto denominado ORF10 (*cefT2*) (Martínez-Guerra, 2005).

2.- ANÁLISIS DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DEDUCIDA DE LA PROTEÍNA ORF10.

El gen ORF10 presenta un marco de lectura abierto de 1620 pb interrumpido por la presencia de tres intrones (Martínez-Guerra, 2005), que una vez procesados, codificarían una proteína de 482 aminoácidos, con una masa molecular deducida de 52,23 kDa. La proteína deducida se envió a comparar con las bases de datos y mostró un elevado porcentaje de identidad en toda su secuencia con proteínas de membrana pertenecientes a la superfamilia MFS (“Major Facilitator Superfamily”) de *Penicillium chrysogenum* (51 %), *Neosartorya fischeri* (50 %), *Aspergillus fumigatus* (49 %) y *Aspergillus clavatus* (47 %). Además la proteína ORF10 presenta un 31,9 % de aminoácidos idénticos con la proteína CefT de *A. chrysogenum*.

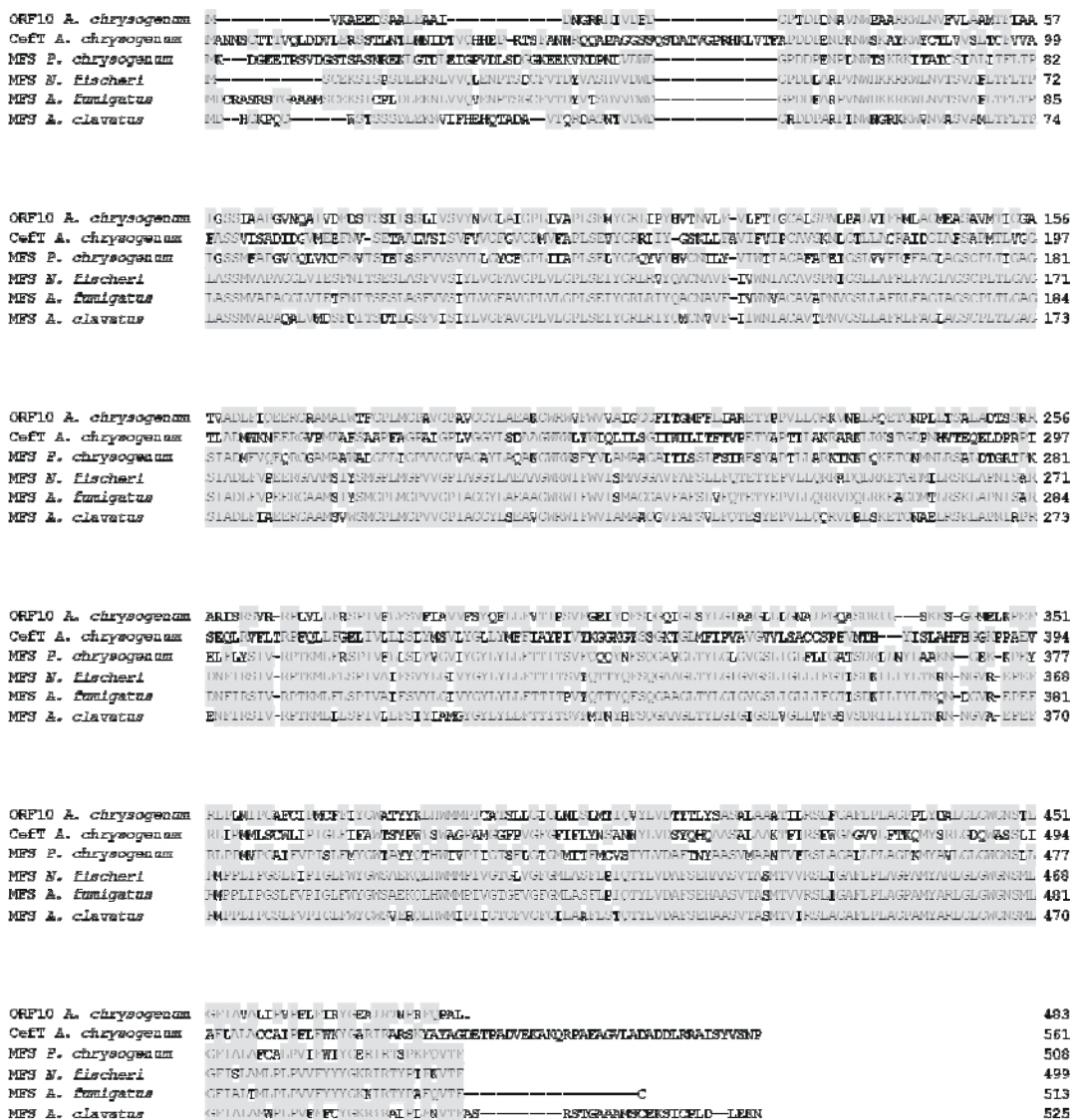


Figura 3.1. Alineamiento de la proteína deducida de la ORF10 de *Acremonium chrysogenum* y las proteínas deducidas de los genes que codifican MFS de *Acremonium chrysogenum*, *Penicillium chrysogenum*, *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus clavatus* obtenido mediante el algoritmo ClustalX (DNAsar. Lasergene v7.1.0. Proper-Edge). Los aminoácidos idénticos se han sombreado.

3.- INTERRUPCIÓN DEL GEN ORF10 EN *A. chrysogenum*.

Para estudiar el papel de la proteína codificada por el gen ORF10 en la ruta de biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum*, se llevó a cabo la inactivación dirigida del gen ORF10 mediante la técnica del doble marcador (Mansour *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 2001; Ullán *et al.*, 2002b). Dicha técnica se basa en la transformación con plásmidos integrativos que contienen dos marcadores de selección. El primer marcador de resistencia interrumpe el marco de lectura abierto del gen, mientras que el segundo marcador permite seleccionar aquellos transformantes en los que haya ocurrido el fenómeno de la doble recombinación homóloga.

3.1.- Transformación y selección de los transformantes.

Para llevar a cabo la inactivación dirigida del gen ORF10 de *A. chrysogenum*, se construyó el plásmido integrativo pDM (Figura 2.1). Este plásmido contiene el gen ORF10 inactivado a partir de los 60 primeros nucleótidos de su secuencia codificante mediante la inserción del casete de resistencia a fleomicina. Como segundo marcador se utilizó el casete de resistencia a higromicina B.

Para obtener los transformantes interrumpidos, se transformaron protoplastos de *A. chrysogenum* C10 con el plásmido integrativo pDM, seleccionando en primer lugar aquellos transformantes que eran resistentes a fleomicina. De esta forma, se obtuvieron un total de 100 transformantes. Posteriormente, estos transformantes fueron seleccionados por su sensibilidad a higromicina B. Finalmente, se obtuvieron 7 transformantes que cumplían con el patrón esperado, es decir, resistencia a fleomicina y sensibilidad a higromicina B.

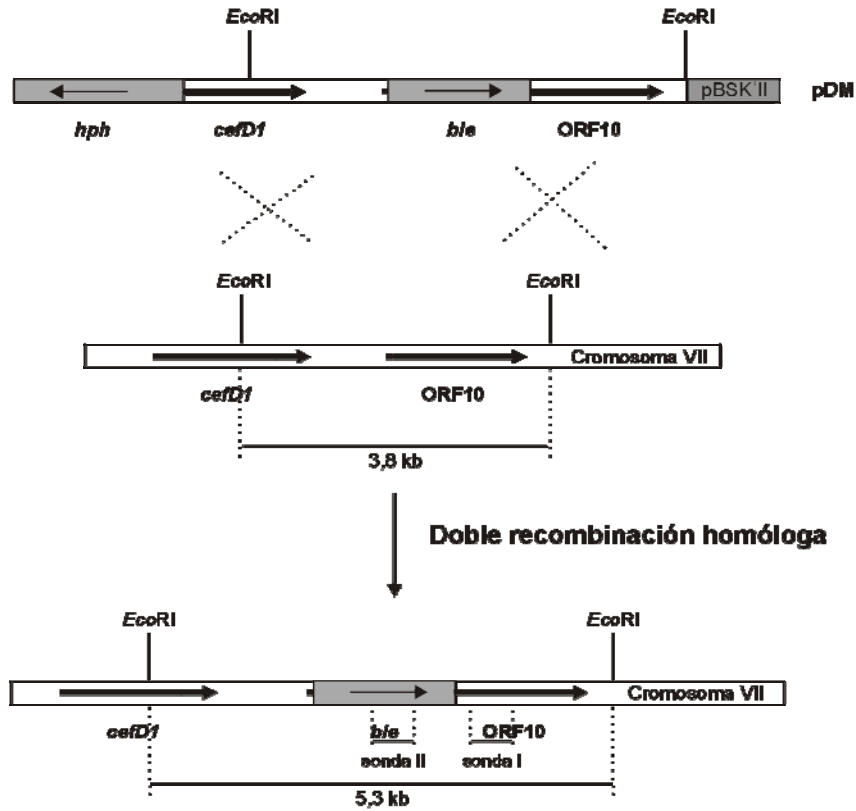
Por tanto, estos transformantes eran posibles candidatos a estar inactivados en el gen ORF10 puesto que habrían sufrido un proceso de doble recombinación homóloga entre la región del gen ORF10 contenida en el plásmido pDM y la región correspondiente de su genoma. Por este motivo, estos transformantes poseen el marcador de resistencia a fleomicina y carecen del marcador de resistencia a higromicina B.

3.2.- Análisis genético de los transformantes interrumpidos mediante hibridación de Southern.

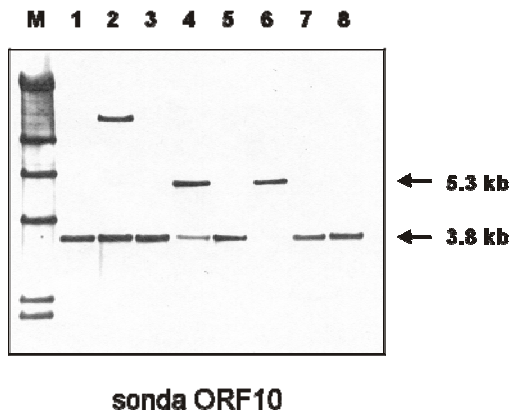
Para determinar si en alguno de los transformantes anteriores había ocurrido la interrupción del gen ORF10 se decidió realizar un análisis de hibridación de Southern. Para este propósito, se extrajo el ADN de los 7 transformantes que presentaban el patrón esperado: TDM 38, TDM 57, TDM 64, TDM 87, TDM 131, TDM 139, TDM 153 y el de la cepa parental C10.

El ADN genómico obtenido fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI*, se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y finalmente fue transferido a un filtro de nilón al que se fijó mediante luz ultravioleta. El ADN fue hibridado con dos sondas: un fragmento de ADN *SaII* de 608 pb correspondiente a una región interna del gen ORF10 y otro fragmento de ADN *NcoI-SmaI* de 425 pb que incluye el gen *ble* (casete de resistencia a fleomicina).

A



B



C

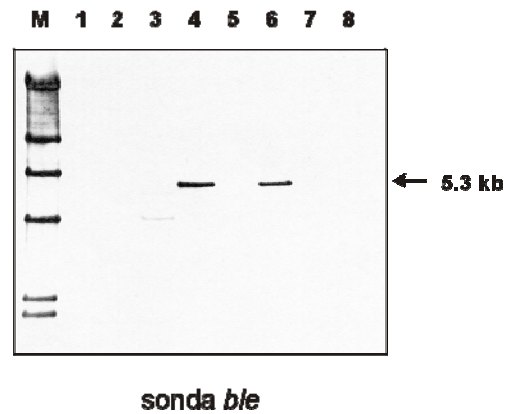


Figura 3.2. Interrupción del gen *ORF10* mediante la técnica del doble marcador. (A) Esquema del plásmido pDM utilizado en la inactivación dirigida del gen *ORF10*, en el cual el marco de lectura abierto del gen *ORF10* se haya interrumpido por la presencia del casete de resistencia a fleomicina. Se muestra el mapa físico de la región cromosómica que incluye al gen *ORF10* “aguas abajo” del gen *cefD1*. También se indica el resultado de la sustitución del gen *ORF10* intacto por el gen *ORF10* interrumpido del plásmido pDM tras la doble recombinación homóloga. (B) Hibridación del ADN total de los 7 transformantes y la cepa parental C10 con el fragmento *SalI* interno al gen *ORF10* de 608 pb y con el fragmento *NcoI-SalI* correspondiente al gen *ble* de 425 pb (C). En ambos casos, M, marcador de peso molecular λ *HindIII* marcado con digoxigenina; carril 1, TDM 38; carril 2, TDM 57; carril 3, TDM 64; carril 4, TDM 87; carril 5, TDM 131; carril 6, TDM 139; carril 7, TDM 153; carril 8, *A. chrysogenum* C10.

El resultado de la hibridación (Figura 3.2) mostró, con la sonda correspondiente al gen ORF10, la presencia de una banda de hibridación de 3,8 kb en la cepa parental C10 (Figura 3.2 B, carril 8) que corresponde a la región del genoma que contiene el gen ORF10 con su propio promotor. En los carriles 2 y 4 de la Figura 3.2 B correspondientes a los transformantes TDM 57 y TDM 87, además de la banda de hibridación endógena de 3,8 kb, aparece una banda adicional de 15 kb y de 5,3 kb respectivamente. En ambos casos se ha producido una integración ectópica del plásmido pDM en cualquier lugar del genoma. Sin embargo, en el carril 6 (transformante TDM 139) aparece una banda de hibridación de 5,3 kb que sustituye a la banda de 3,8 kb, indicando que en este transformante ha ocurrido un fenómeno de doble recombinación homóloga (Figura 3.2 A). Cuando se utiliza como sonda el gen *ble* (Figura 3.2 C), además de no haber señal de hibridación en la cepa parental C10 (Figura 3.2 C, carril 8), la banda de hibridación de 5,3 kb permanece en el transformante TDM 139 (Figura 3.2 C, carril 6). Por tanto, el transformante TDM 139 tiene interrumpido el gen ORF10.

3.3.- Análisis de la producción de cefalosporinas en el transformante TDM 139.

Para estudiar el efecto que la interrupción del gen ORF10 tiene sobre la ruta de biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum*, se fermentaron (ver apartado 6 de Materiales y Métodos) en condiciones de producción de cefalosporinas el transformante interrumpido TDM 139 y la cepa parental C10 como control. Se realizaron tres fermentaciones independientes en matraces por triplicado.

Las fermentaciones se iniciaron utilizando esporas frescas procedentes del transformante interrumpido y la cepa parental, que fueron crecidos en medio MDIA durante 48 horas en matraces indentados de 500 ml. Una vez que el micelio estaba crecido, se utilizó para inocular una fermentación en medio MDFA. Dicha fermentación, se realizó en matraces indentados de 500 ml tomando muestras cada 24 horas hasta las 144 horas de fermentación.

3.3.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en el transformante TDM 139 mediante bioensayo.

La producción de cefalosporinas en los caldos de cultivo del transformante TDM 139 y la cepa parental C10, se valoró mediante el bioensayo (ver apartado 7 de Materiales y Métodos) de los caldos de cultivo frente a *E. coli* ESS-22-31 en TSA al 1 % y utilizando penicilinasa de *B. cereus* UL1. El crecimiento se determinó como peso seco y permitió expresar la producción de cefalosporinas de forma específica (es decir μg de cefalosporina por mg de peso seco).

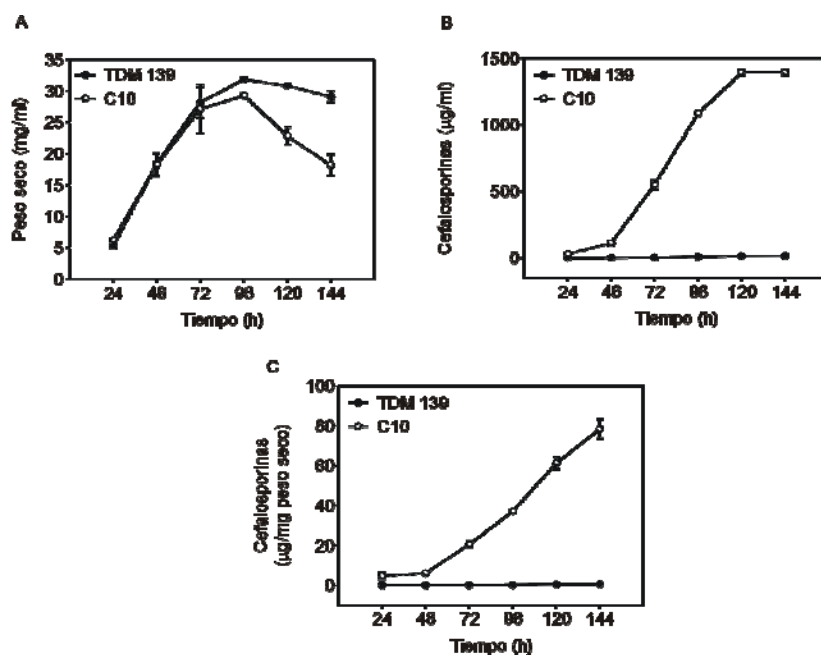


Figura 3.3. Crecimiento y producción de cefalosporinas en el transformante interrumpido TDM 139. (A) Curva de crecimiento expresada como peso seco. (B) Producción volumétrica de cefalosporinas. (C) Producción específica de cefalosporinas.

Los resultados del análisis del bioensayo de los caldos de cultivo, muestran una drástica reducción de la producción de cefalosporinas en el transformante interrumpido TDM 139 (Figura 3.3 B y C). Dicha reducción es de un 99 % en relación a la producción de la cepa parental C10. Asimismo la curva de crecimiento expresada como peso seco se encuentra alterada en la cepa interrumpida en el gen ORF10, puesto que a partir de las 72 horas de fermentación se hace patente la carencia de fase de lisis propia de la cepa parental (Figura 3.3 A), que además coincide con el momento de máxima síntesis de cefalosporinas.

3.3.2.- Análisis de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales mediante HPLC.

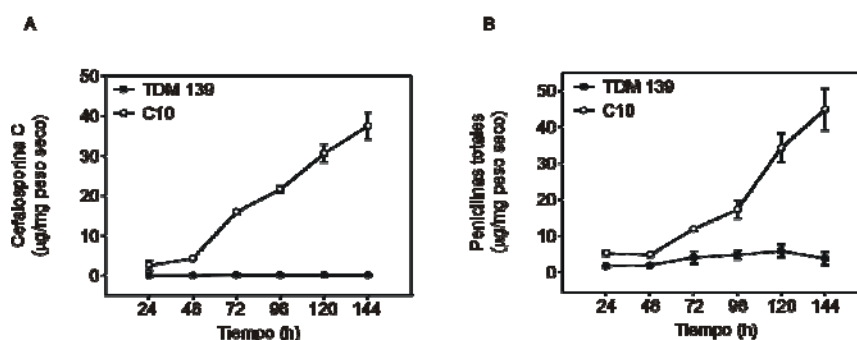


Figura 3.4. Análisis mediante HPLC de la producción de CPC y penicilinas totales (IPN + PenN) en los caldos de cultivo del transformante interrumpido TDM 139 y de la cepa parental C10. (A) Producción específica de CPC. (B) Producción específica de penicilinas totales.

El análisis mediante HPLC (ver apartado 19 de Materiales y Métodos) de los caldos de cultivo del transformante TDM 139 y la cepa parental C10 confirmó los resultados del bioensayo. Las gráficas correspondientes a la producción de CPC (Figura 3.4 A) y penicilinas totales (Figura 3.4 B),

muestran una drástica reducción tanto de la producción de CPC (de un 99,7 %) como de penicilinas totales (de un 91,5 %) en el transformante TDM 139, con respecto a la cepa parental C10.

La IPN y la PenN son dos isómeros cuya única diferencia radica en la disposición L o D de la cadena lateral de α -aminoadípico, respectivamente. La derivatización con GITC de los caldos de cultivo permite separar ambos isómeros mediante HPLC (apartado 20 de Materiales y Métodos) de tal forma que a partir de las 96 horas de fermentación el isómero mayoritario es la penicilina N (Figura 3.5 C y D). Como controles se utilizaron IPN (Figura 3.5 A) e IPN + PenN (Figura 3.5 B).

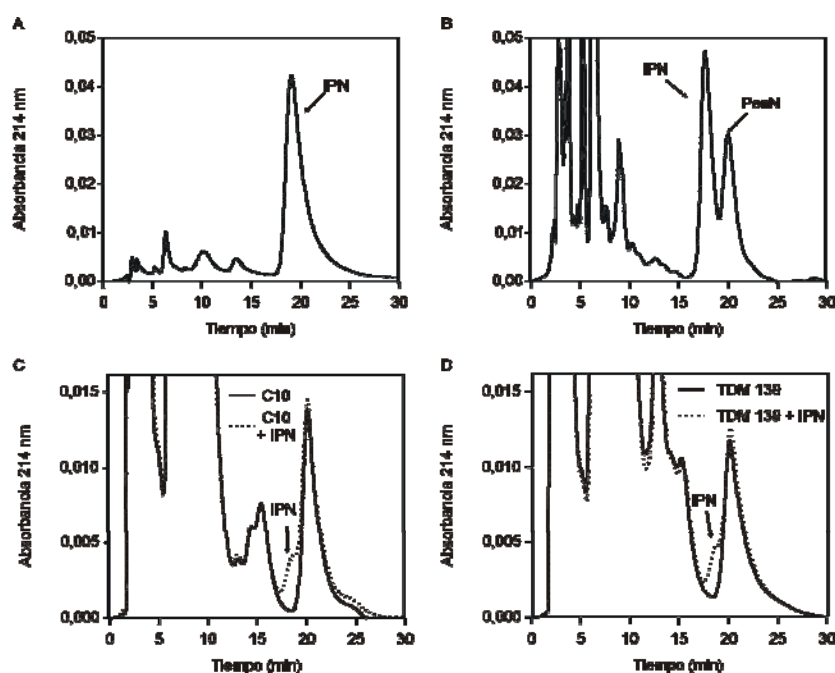


Figura 3.5. Identificación mediante HPLC de IPN y PenN en los caldos de cultivo del transformante TDM 139 y la cepa parental C10 a las 96 horas de fermentación. Las muestras fueron derivatizadas con GITC. (A) Cromatograma de IPN. (B) Cromatograma de IPN y PenN. (C) Superposición de los cromatogramas de la cepa parental C10 con y sin IPN añadida. (D) Superposición de los cromatogramas del transformante TDM 139 con y sin IPN añadida.

3.3.3.- El transformante TDM 139 acumula intracelularmente penicilina N.

Para determinar si la drástica reducción de la producción de cefalosporinas y de penicilinas extracelulares se debía a una falta de síntesis de las mismas o bien a una ineficiente secreción de estos metabolitos secundarios, se llevó a cabo un análisis de la concentración intracelular tanto de cefalosporinas como de penicilinas (apartado 21 de Materiales y Métodos). Para ello, la cepa parental C10 y el transformante TDM 139 (interrumpido en el gen ORF10) fueron fermentados en condiciones de producción de cefalosporinas con el fin de recoger el micelio de 96, 120 y 144 horas de fermentación.

El resultado de los análisis muestra que la concentración intracelular de CPC es prácticamente nula en el transformante TDM 139, siendo muy baja en el caso de la cepa parental C10 (Figura 3.12). Por tanto, el transformante TDM 139 apenas forma CPC porque se detecta a niveles muy bajos en los caldos de cultivo ni la acumula porque intracelularmente es prácticamente indetectable.

En cuanto a la concentración intracelular de penicilinas totales (IPN + PenN), el transformante TDM 139 acumula penicilinas a 96, 120 y 144 horas de fermentación. A las 120 horas de fermentación se registra el máximo acúmulo intracelular de penicilinas totales con respecto a la cepa parental C10, puesto que a este tiempo los niveles intracelulares de penicilinas totales llegan a ser 7 veces superiores en el transformante TDM 139. Para determinar cuál era la proporción relativa de cada isómero IPN y PenN en la mezcla de penicilinas totales, o bien si alguno de los isómeros era mayoritario, se llevó a cabo la derivatización de las muestras siguiendo el protocolo descrito en el apartado 20 de Materiales y Métodos. Los resultados experimentales muestran que a partir de las 96 horas de fermentación sólo se detecta PenN a nivel intracelular tanto en la cepa parental como en el transformante TDM 139 (Figura 3.6).

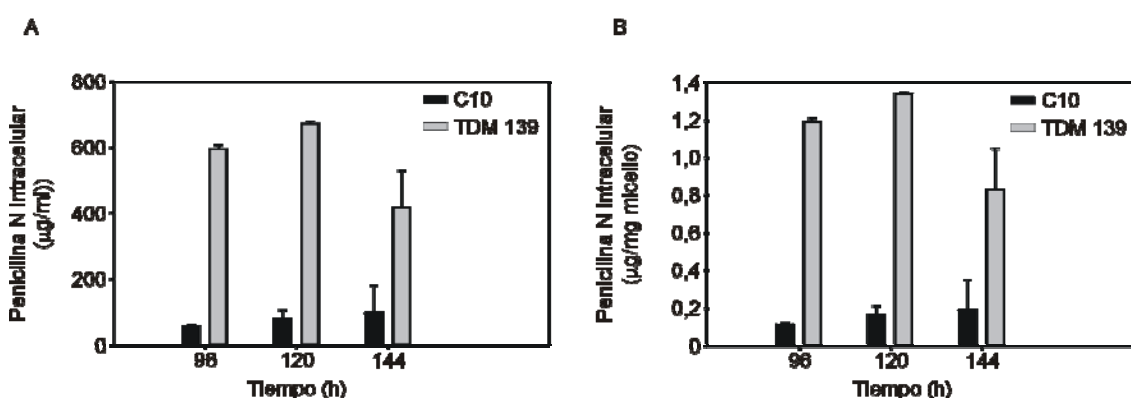


Figura 3.6. Análisis mediante HPLC de la cantidad de penicilina N intracelular a 96, 120 y 144 horas de fermentación en el transformante TDM 139 y en la cepa parental C10. Los valores representan la media de dos fermentaciones independientes. (A) Concentración volumétrica de penicilina N intracelular. (B) Concentración específica de penicilina N.

La conclusión de los análisis es que el transformante TDM 139 presenta una secreción ineficiente de cefalosporinas y de penicilinas. A nivel intracelular acumula una cantidad significativa de penicilina N, tanto desde un punto de vista volumétrico (Figura 3.6 A) como específico (Figura 3.6 B). Por otro lado, no existe ningún acúmulo de cefalosporinas, por lo que la falta de síntesis parece deberse a un defecto en la salida de penicilina N desde algún compartimento celular (probablemente algún tipo de microcuerpo) hasta el citosol donde continuaría la síntesis de cefalosporinas. Por tanto, la proteína ORF10 parece participar en el transporte de PenN desde algún tipo de microcuerpo hasta el citosol. Los resultados obtenidos implican a esta proteína en la ruta de biosíntesis de cefalosporinas, por lo que a partir de ahora la denominaremos CefM, “Cef” por ser un gen relacionado con la ruta de biosíntesis de cefalosporinas y “M” al ser una proteína de membrana.

4.- COMPLEMENTACIÓN EN *TRANS* DE LA CEPA INTERRUMPIDA TDM 139.

Una vez demostrado el papel esencial del gen *cefM* en la ruta de biosíntesis de cefalosporinas en *A. chrysogenum*, y con el fin de confirmar que el efecto de la inactivación dirigida del gen *cefM* era debido única y exclusivamente a la interrupción del gen *cefM*, se procedió a la complementación en *trans* de la cepa interrumpida TDM 139. Para ello, dicho mutante se transformó con el plásmido integrativo pCM (Figura 3.7 A). Dicho plásmido contiene el gen *cefM* bajo el control de su propio

promotor subclonado en el plásmido pAN7.1 (apartado 2.1.2 de Materiales y Métodos) que contiene el casete de resistencia a higromicina B para la selección de los transformantes por resistencia a dicho antibiótico.

4.1.- Transformación, selección y análisis genético de los transformantes complementados con el gen *cefM*.

Se transformaron protoplastos de la cepa interrumpida TDM 139 con el plásmido integrativo pCM y se seleccionaron aquellos transformantes resistentes a higromicina B. Se obtuvieron 5 transformantes resistentes que fueron analizados mediante hibridación de Southern, para demostrar la integración de una copia intacta del gen *cefM* con su propio promotor. Para ello, se obtuvo el ADN total de estos 5 transformantes junto con el de la cepa parental C10 y la cepa TDM 139 (interrumpido en el gen *cefM*) como controles. El ADN total fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI* e hibridado con una sonda correspondiente a un fragmento de ADN *SaI* de 608 pb interno al gen *cefM*. El resultado de la hibridación de Southern mostró que los 5 transformantes anteriormente seleccionados poseían dos bandas de hibridación: una banda de 5,3 kb correspondiente al gen *cefM* endógeno inactivado, y otra banda adicional de 4,8 kb debida al gen *cefM* intacto con su propio promotor portado por el plásmido pCM.

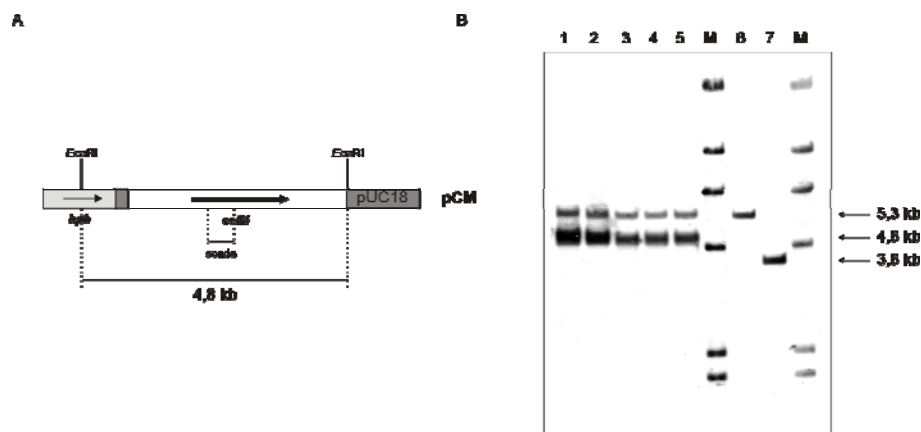


Figura 3.7. Complementación en *trans* de la cepa interrumpida TDM 139 con el gen *cefM*. (A) Mapa físico del plásmido integrativo pCM. Se indica el tamaño de la banda de hibridación correspondiente al gen *cefM* intacto con su propio promotor. (B) Hibridación de Southern con una sonda correspondiente a un fragmento de ADN *SaI* de 608 pb (nterno al gen *cefM*) del ADN total digerido con la enzima de restricción *EcoRI* de los transformantes TCM 9 (carril 1), TCM 10 (carril 2), TCM 27 (carril 3), TCM 28 (carril 4), TCM 35 (carril 5), TDM 139 (carril 6) y C10 (carril 7). M (marcador de peso molecular lambda *HindIII* marcado con digoxigenina).

4.2.- Análisis de la producción de cefalosporinas en los transformantes complementados con el gen *cefM*.

Para estudiar el efecto de la complementación en *trans* con el gen *cefM*, se escogieron al azar los transformantes TCM 27, TCM 28 y TCM 35. Dichos transformantes junto con la cepa interrumpida TDM 139 y la cepa parental C10 fueron fermentados en condiciones de producción de cefalosporinas. Las fermentaciones se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces.

Las fermentaciones se iniciaron utilizando esporas frescas procedentes de los transformantes TCM, del transformante interrumpido TDM 139 y de la cepa parental C10, que fueron crecidos en medio MDIA durante 48 horas en matraces indentados de 500 ml. Una vez que el micelio estaba crecido, fue utilizado para inocular una fermentación en medio MDFA en matraces indentados de 500 ml. Se tomaron muestras cada 24 horas hasta las 144 horas de fermentación.

4.2.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en los transformantes complementados con el gen *cefM* mediante bioensayo.

La producción de cefalosporinas en los caldos de cultivo de los transformantes complementados con el gen *cefM*, de la cepa interrumpida TDM 139 y de la cepa parental C10, se valoró mediante bioensayo de los caldos de cultivo frente a *E. coli* ESS-22-31 utilizando penicilinas de *B. cereus* UL1. El grado de crecimiento se obtuvo como peso seco y permitió expresar la producción de cefalosporinas de forma específica (μg antibiótico/mg peso seco)

Los resultados de las fermentaciones mostraron que se restaura por completo la producción de cefalosporinas en los transformantes complementados en el gen *cefM* (Figura 3.8), tanto cuando se expresa de forma volumétrica (Figura 3.8 B) como cuando se hace de forma específica (Figura 3.8 C). La curva de crecimiento de los transformantes complementados con el gen *cefM* sigue el mismo patrón que la de la cepa parental C10 (Figura 3.8 A).

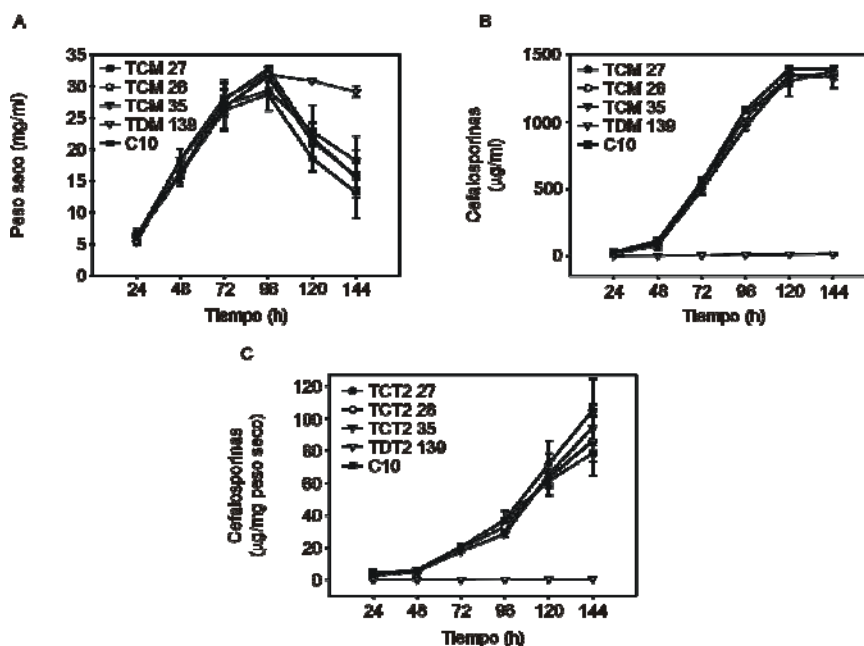


Figura 3.8. Curva de crecimiento y producción de cefalosporinas de los transformantes complementados en *trans* con el gen *cefM*. (A) Curva de crecimiento expresada como peso seco. (B) Producción volumétrica de cefalosporinas. (C) Producción específica de cefalosporinas.

4.2.2.- Análisis mediante HPLC de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales extracelulares en el transformante TCM 27.

El análisis mediante HPLC de los caldos de cultivo del transformante TCM 27 (complementado con el gen *cefM*), la cepa interrumpida TDM 139 y la cepa parental C10 confirmó los resultados del bioensayo. Las gráficas correspondientes a la producción de CPC y penicilinas totales muestran que en los transformantes complementados se restaura la síntesis de CPC [volumétrica (Figura 3.9 A y específica (Figura 3.9 B)] y penicilinas totales [volumétrica (Figura 3.9 C) y específica (Figura 3.9 D)] hasta alcanzar los niveles de la cepa parental C10.

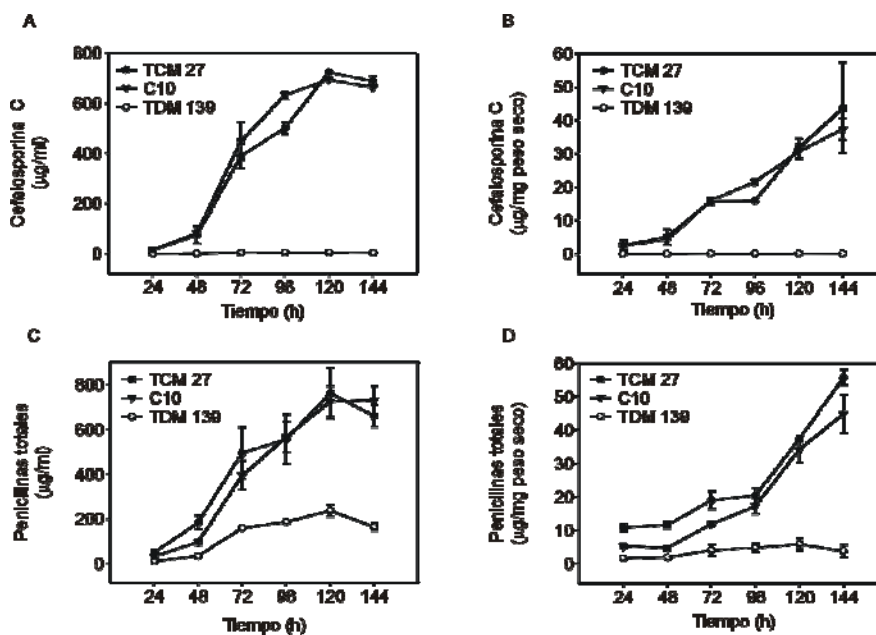


Figura 3.9. Análisis mediante HPLC de la producción extracelular de CPC y penicilinas totales (IPN + PenN) en los caldos de cultivo de TCM 27, TDM 139 y C10. (A) Producción volumétrica de CPC. (B) Producción específica de CPC. (C) Producción volumétrica de penicilinas totales. (D) Producción específica de penicilinas totales.

A continuación se muestra la superposición de los cromatogramas resultantes del análisis de los antibióticos presentes en los caldos de cultivo de 144 horas de fermentación de una de las cepas complementadas (TCM 27), la cepa interrumpida (TDM 139), y la cepa parental (C10). Dicha superposición es de cefalosporinas (CPC + DAC, Figura 3.10 A) y penicilina N (Figura 3.10 B).

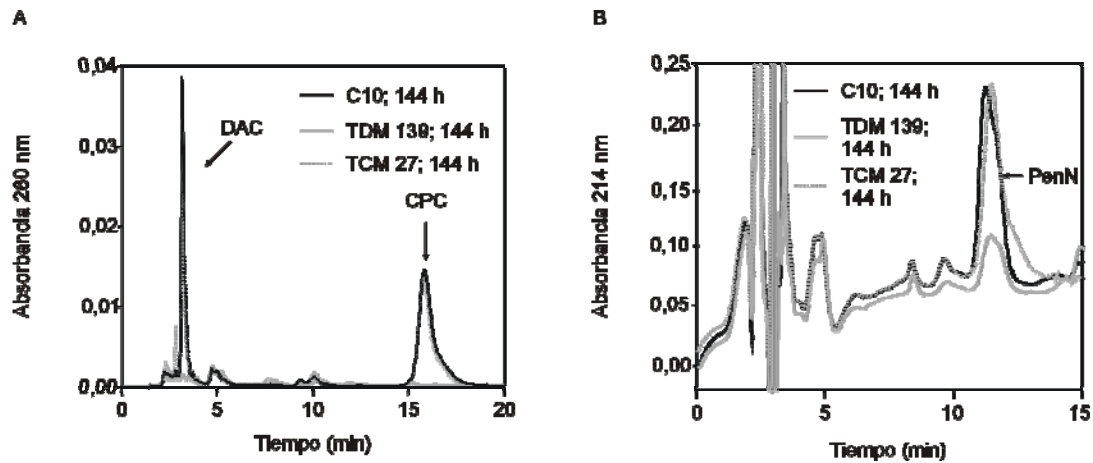


Figura 3.10. Identificación mediante HPLC de DAC, CPC, PenN en los caldos de cultivo del transformante complementado TCM 27, del transformante interrumpido TDM 139 y de la cepa parental C10 a las 144 horas de fermentación. (A) Superposición de los cromatogramas de DAC y CPC de C10, TDM 139 y TCM 27. (B) Superposición de los cromatogramas de penicilina N de C10, TDM 139 y TCM 27.

4.2.3.- El transformante TCM 27 restaura el nivel intracelular de penicilina N.

El análisis mediante HPLC de los niveles intracelulares de penicilina N (isómero detectado) a las 96, 120 y 144 horas de fermentación en el transformante TCM 27 (Figura 3.11 A y 3.11 B) permitió determinar que se restauran por completo hasta igualar los valores de la cepa parental C10.

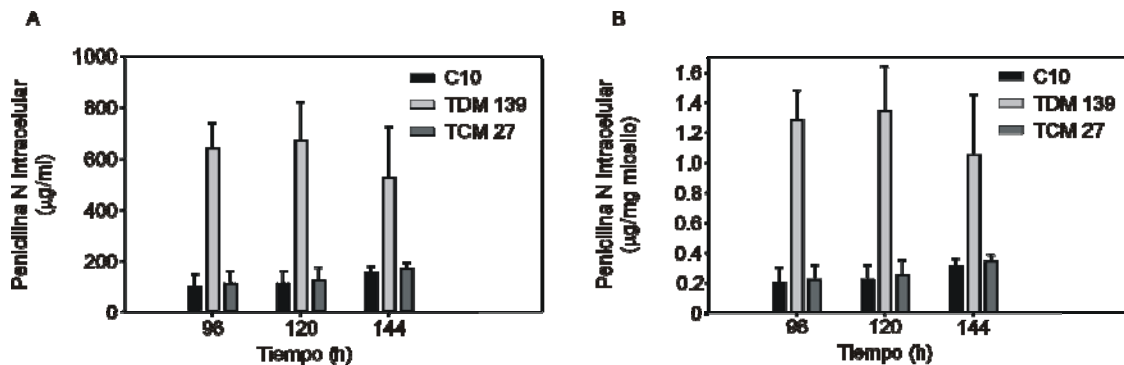


Figura 3.11. Análisis mediante HPLC de la cantidad intracelular de penicilina N a las 96, 120 y 144 horas de fermentación en el transformante TCM 27, en la cepa interrumpida TDM 139 y en la cepa parental C10. Los valores representan la media de dos fermentaciones independientes. (A) Concentración volumétrica de penicilina N intracelular. (B) Concentración específica de penicilina N.

Además la cantidad intracelular de CPC se encuentra a los niveles de la cepa parental C10, aunque estos valores son muy reducidos, lo que indica que la cepa parental C10 secreta, prácticamente, toda la CPC que forma.

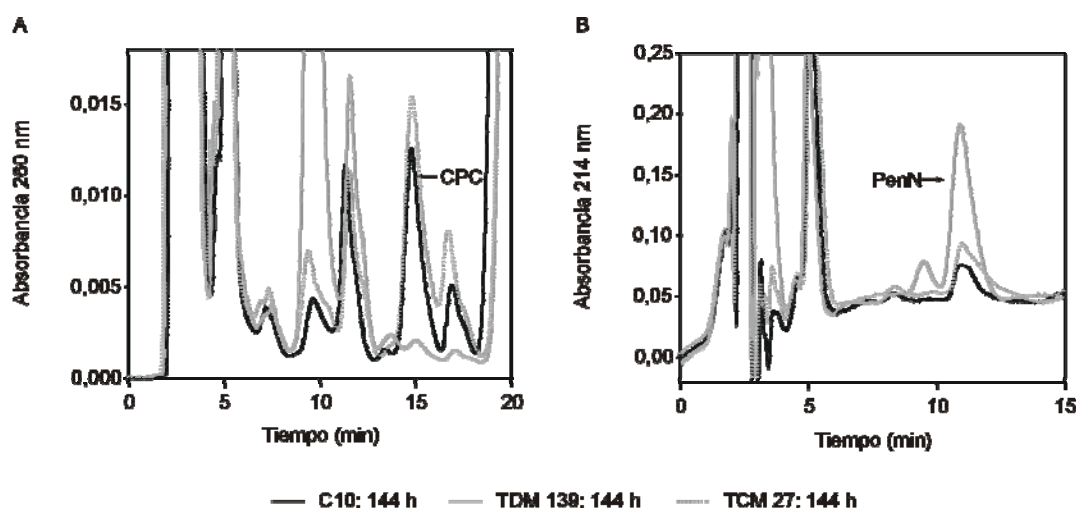


Figura 3.12. Identificación mediante HPLC de CPC y penicilina N intracelular en TCM 27, TDM 139 y C10 a las 144 horas de fermentación. (A) Superposición de los cromatogramas de CPC de C10, TDM 139 y TCM 27. (B) Superposición de los cromatogramas de penicilina N de C10, TDM 139 y TCM 27.

4.2.4.- El transformante TDM 139 es capaz de formar cefalosporina C *in vitro*.

Para confirmar que los otros genes de la ruta de biosíntesis de cefalosporinas son funcionales en el transformante interrumpido TDM 139, se llevó a cabo la conversión *in vitro* de penicilina N a cefalosporina C (apartado 21 de Materiales y Métodos) utilizando extractos libres de células de TDM 139, TCM 27 y de la cepa parental C10 previamente crecidos en condiciones de producción de cefalosporinas durante 144 horas. Los resultados (Tabla 3.1) mostraron que las actividades expandasa/hidroxilasa (que convierten PenN en DAC) y DAC acetiltransferasa (que transforma DAC en CPC) estaban presentes en la cepa interrumpida, así como en el transformante complementado y en la cepa parental, puesto que existía formación de CPC *in vitro*. La síntesis de CPC *in vitro* fue incluso mayor en el transformante interrumpido TDM 139 que en la cepa parental C10 y que en el transformante complementado TCM 27. Dicho incremento de la síntesis es resultado del mayor acúmulo intracelular de penicilina N en el transformante TDM 139. Tras la rotura de las membranas se libera la penicilina N contenida en los microcuerpos lo cuál permite una mayor síntesis de CPC, resultado de una mayor cantidad de sustrato para las enzimas expandasa-hidroxilasa y DAC acetiltransferasa.

Cepa	Genotipo	Actividad expandasa-hidrolasa y DAC acetiltransferasa (ng CPC/mg de micelio)
<i>A. chrysogenum</i> C10	<i>cefM</i>	7,25
<i>A. chrysogenum</i> TDM 139	<i>cefM::ble</i>	17,79
<i>A. chrysogenum</i> TCM 27	<i>cefM</i>	7,06

Tabla 3.1. Síntesis de CPC *in vitro* en los extractos libres de células de TDM 139, TCM 27 y la cepa parental C10. Los valores representan la media de tres determinaciones y se expresan teniendo en cuenta la cantidad de micelio pulverizado (500 mg).

4.2.5.- El transformante TDM 139 presenta alteraciones en la morfología de colonia.

La alteración en la curva de crecimiento que muestra el transformante interrumpido TDM 139, que consiste en la inexistencia de la fase de lisis característica de la cepa parental C10,

hicieron que nos propusiéramos comparar la morfología de la colonia de esta cepa con respecto a la de la cepa C10 (cepa parental). Con este fin se sembraron en medio MCFA (con un 2 % de agar) y se incubaron durante 5 días a una temperatura de 28 °C el transformante interrumpido TDM 139, el transformante complementado TCM 27 y la cepa parental C10. El resultado (Figura 3.13) mostró que la colonia del transformante interrumpido TDM 139 tiene un aspecto más rugoso y un perfil menos definido, así como una mayor pigmentación amarillenta de la misma. Por otro lado, el transformante complementado TCM 27 presenta una morfología de la colonia y una pigmentación muy similares a las de la cepa parental C10, confirmando que la complementación en *trans* con el gen *cefM* restaura los efectos originados por la interrupción del gen *cefM*.

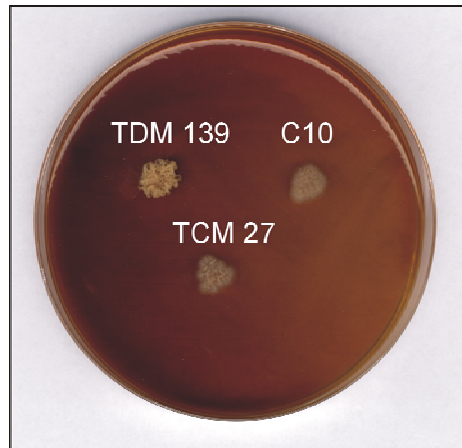


Figura 3.13. Morfología de la colonia del transformante interrumpido TDM 139, el transformante complementado TCM 27 y la cepa parental C10.

4.2.6.- El crecimiento en medio líquido del transformante TDM 139 es diferente al de la cepa parental.

Cuando se estudió el crecimiento del transformante TDM 139 a lo largo de una fermentación en medio MDFA se observó una alteración del crecimiento en forma de levaduras (Figura 3.14) a partir de las 144 horas de fermentación. Sin embargo, este tipo de crecimiento representa un tipo de micelio alterado en el que existen fragmentos esféricos que puede estar relacionado con la falta de disminución de peso seco (Figura 3.3 A) Aunque existe formación de artrosporas que no se lisan, éstas sufren una transformación con un crecimiento anómalo en forma de levaduras. En la figura 3.14 se observa la diferenciación del transformante TDM 139 desde las 48 hasta las 144 horas de fermentación comparándola con el de la cepa parental C10. Como muestran las imágenes el desarrollo del micelio de la cepa TDM 139 es claramente diferente al de la cepa parental C10.

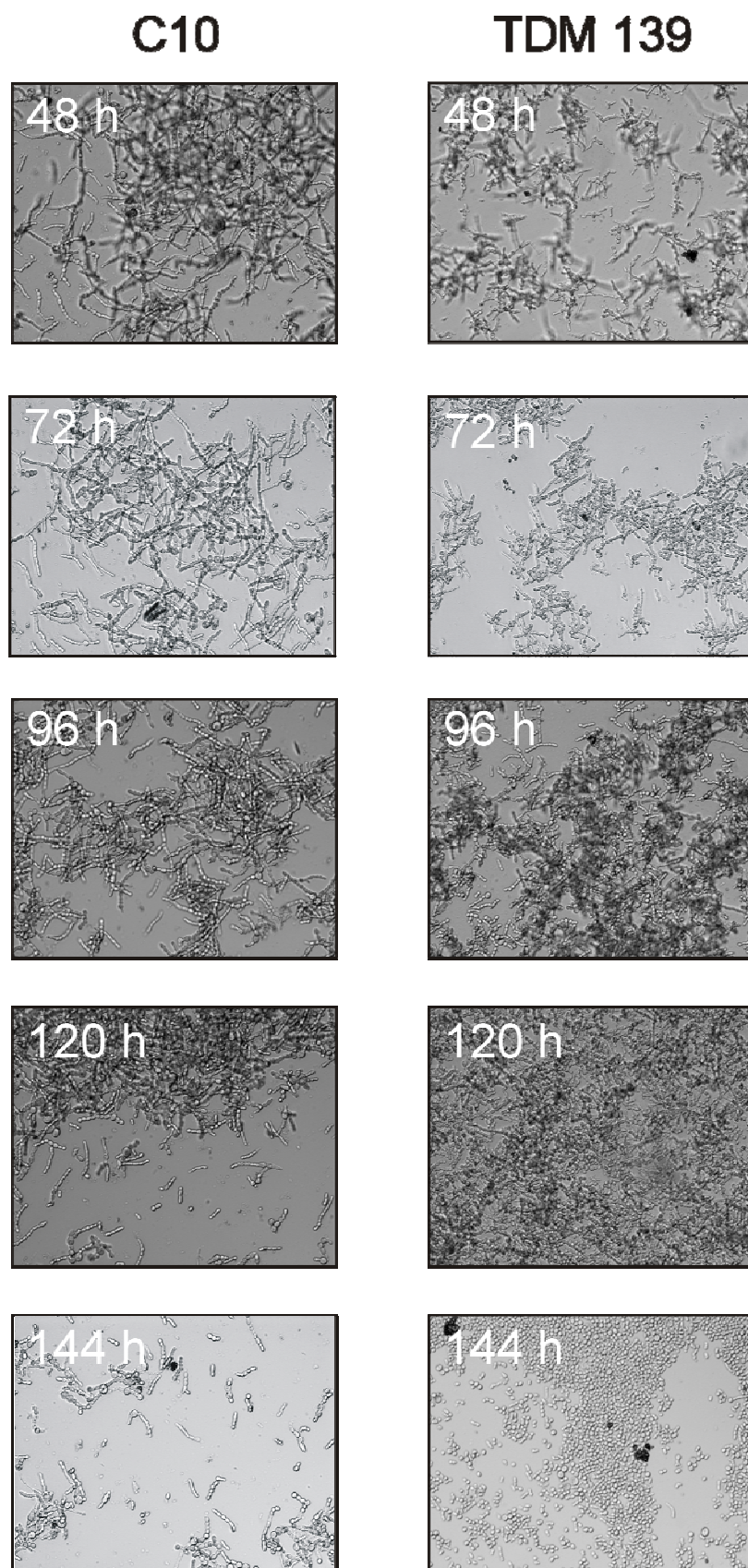


Figura 3.14. Diferenciación del micelio de la cepa parental C10 y el transformante TDM 139 a lo largo de la fermentación en medio MDFA.

5.- SOBREEXPRESIÓN DEL GEN *cefM* EN *Acremonium chrysogenum* C10.

Para estudiar el efecto que la sobreexpresión del gen *cefM* tiene sobre la ruta de biosintética de cefalosporina C en *A. chrysogenum*, se llevó a cabo el incremento de su nivel de expresión colocándolo bajo el control de un promotor fuerte de expresión constitutiva. Otra forma utilizada para conseguir una mayor expresión de un gen consiste en el incremento de su dosis génica por el aumento del número de copias. Esta estrategia fue utilizada en un trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio (Martínez-Guerra, 2005); sin embargo, los resultados obtenidos fueron similares a los de la interrupción del gen *cefM*. Este hecho nos hizo pensar que tal vez el incremento del número de copias del gen podría ocasionar un fenómeno de autorregulación del gen a partir de su promotor, impidiendo la transcripción o que el transcrito generado fuera aberrante. Por todo ello, decidimos utilizar la estrategia anteriormente indicada. Con este fin, se construyó el plásmido pSM (apartado 2.1.3 de Materiales y Métodos) en el cuál el gen *cefM* se encuentra bajo el control del promotor de expresión constitutiva de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans*.

5.1.- Transformación, selección y análisis genético de los transformantes.

Con el fin de incrementar la expresión del gen *cefM*, se transformaron protoplastos de la cepa *A. chrysogenum* C10 con el plásmido integrativo pSM (Figura 3.15 A). Se obtuvieron un total de 100 transformantes que presentaban resistencia a fleomicina. A partir de estos transformantes, se seleccionaron aleatoriamente 8 que fueron utilizados para su posterior análisis mediante hibridación de Southern. El ADN total de estos transformantes junto con el de la cepa parental C10 fue digerido con la enzima de restricción *SacI* y se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADN total digerido fue transferido a un filtro de nilón, fijado e hibridado con una sonda *SacI* de 608 pb correspondiente a un fragmento interno al gen *cefM*. Los resultados de hibridación de Southern indican que los transformantes TSM 4 (carril 1, Figura 3.15 B), TSM 15 (carril 3, Figura 3.15 B), TSM 24 (carril 4, Figura 3.15 B), TSM 26 (carril 5, Figura 3.15 B), TSM 80 (carril 7, Figura 3.15 B) y TSM 98 (carril 8, Figura 3.15 B) presentaban una copia adicional del casete de expresión *Pgdp-cefM-T_{cyt1}*, tal y cómo indica la presencia de una banda adicional de 3,3 kb.

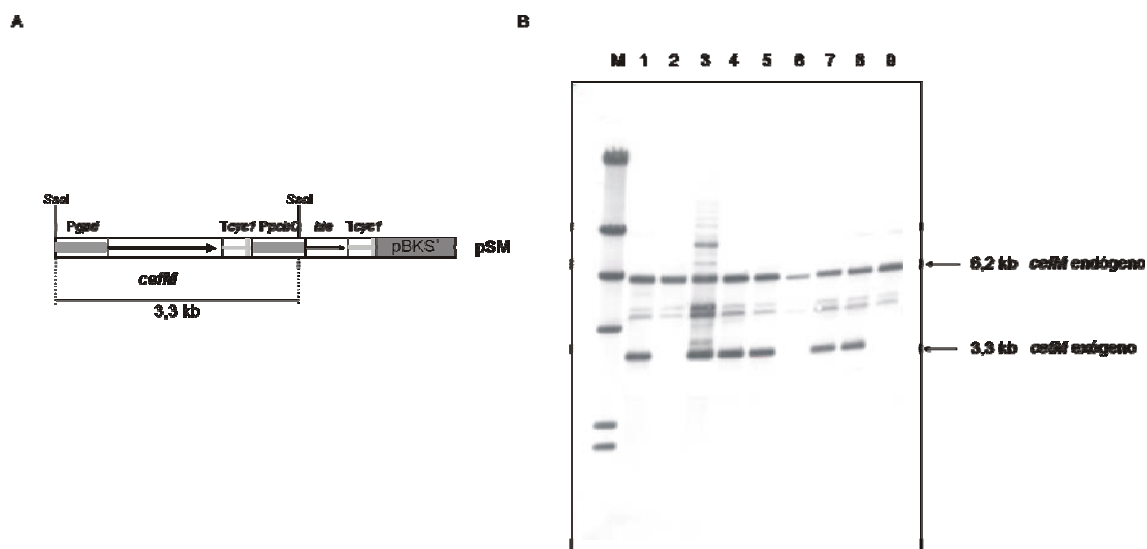


Figura 3.15. Sobreexpresión del gen *cefM* en *A. chrysogenum* C10. (A) Mapa físico del plásmido pSM. Se indica el tamaño de la banda de hibridación del casete de expresión *Pcpd-cefM-Tcy1*. (B) Hibridación de Southern con una sonda *SacI* de 608 pb (correspondiente a un fragmento interno al gen *cefM*), del ADN total digerido con la enzima *SacI* de los transformantes: TSM 4 (carril 1); TSM 11 (carril 2); TSM 15 (carril 3); TSM 24 (carril 4); TSM 26 (carril 5); TSM 28 (carril 6); TSM 80 (carril 7); TSM 98 (carril 8) y de la cepa parental C10 (carril 9). M: marcador de peso molecular lambda *HindIII* marcado con digoxigenina.

5.2.- Análisis de la producción de cefalosporinas en los transformantes TSM.

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión del gen *cefM* sobre la ruta de biosíntesis de cefalosporina C, se fermentaron en condiciones de producción de cefalosporinas los transformantes TSM 4, TSM 26 y TSM 80 junto con la cepa parental C10 como control. Se realizaron tres fermentaciones por triplicado.

Las fermentaciones se iniciaron utilizando esporas frescas procedentes de los transformantes TSM y la cepa parental, que fueron crecidos en medio MDIA durante 48 horas en matraces indentados de 500 ml. Una vez que el micelio estaba crecido, fue utilizado para inocular una fermentación en medio MDFA en matraces indentados de 500 ml. Se tomaron muestras cada 24 horas hasta las 144 horas de fermentación.

5.2.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en los transformantes TSM mediante bioensayo.

Para valorar la producción de cefalosporinas en los caldos de cultivo de los transformantes TSM y la cepa parental C10, se bioensayaron los caldos de cultivo siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 7 de materiales y métodos. El crecimiento se determinó como peso seco y permitió expresar la producción de cefalosporinas de forma específica. La determinación del crecimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones del apartado 5.3 de materiales y métodos.

Los resultados de los bioensayos mostraron que no se modifica de manera significativa la producción de cefalosporinas en ninguno de los transformantes TSM con respecto a la cepa

parental C10 (Figura 3.16 B y C). Además el crecimiento de los transformantes TSM no se encuentra alterado y es muy similar al de la cepa parental (Figura 3.16 A).

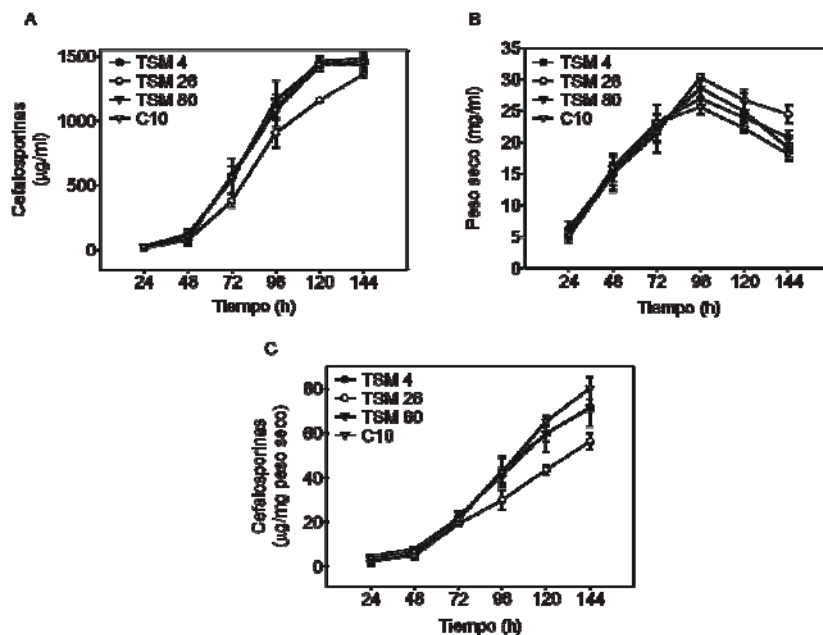


Figura 3.16. Producción de cefalosporinas y curva de crecimiento de los transformantes TSM. (A) Curva de crecimiento expresada como peso seco. (B) Producción volumétrica de cefalosporinas. (C) Producción específica de cefalosporinas.

5.2.2.- Análisis mediante HPLC de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales extracelulares en los transformantes TSM.

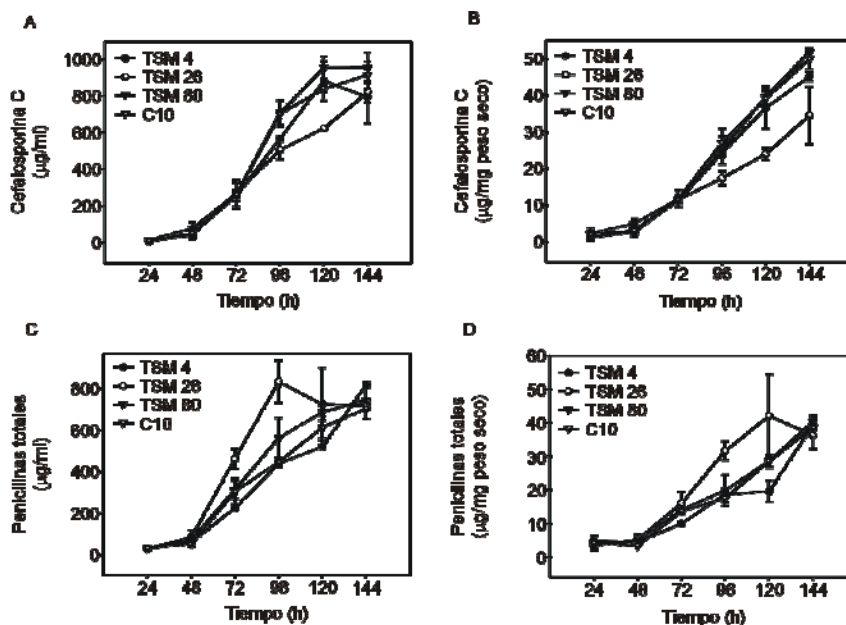


Figura 3.17. Análisis mediante HPLC de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales (IPN + PenN) en los caldos de cultivo de los transformantes TSM 4, TSM 26, TSM 80 y C10. (A) Producción volumétrica de CPC. (B) Producción específica de CPC. (C) Producción volumétrica de penicilinas totales. (D) Producción específica de penicilinas totales.

El análisis mediante HPLC para ver la cefalosporina C y las penicilinas totales presentes en los caldos de cultivo de los transformantes TSM 4, TSM 26, TSM 80 y la cepa parental C10; confirmó

los resultados del bioensayo. Se muestran las gráficas correspondientes a la producción de CPC (Figuras 3.17 A y B) y penicilinas totales (Figuras 3.17 C y D), observando que no se modifican significativamente las producciones en comparación con las de cepa parental C10.

5.2.3.- Los transformantes TSM poseen una concentración intracelular de penicilina N similar a la cepa parental C10.

Con el fin de ver si en los transformantes TSM se restauran bien los niveles intracelulares de penicilina N, se analizó la concentración intracelular siguiendo el protocolo descrito en el apartado 21 de Materiales y Métodos. Los resultados mostraron que los niveles de penicilina N presentes en los transformantes TSM eran muy similares a los de la cepa parental C10 (Figura 3.18). Igualmente se comprobó que intracelularmente sólo se detectaba penicilina N.

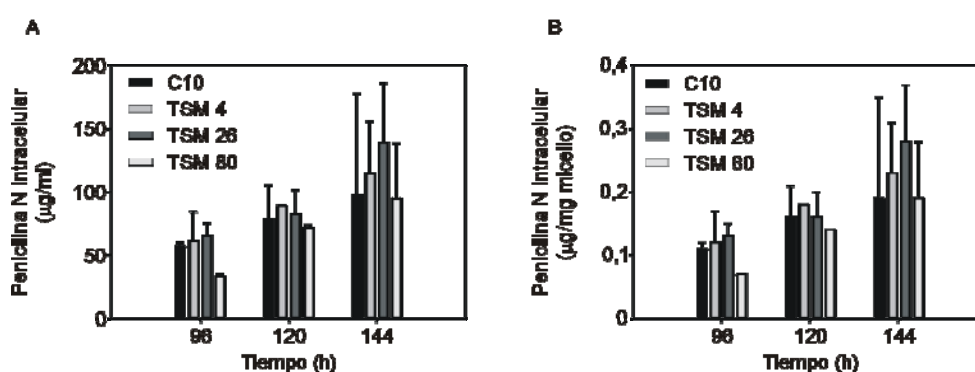


Figura 3.18. Análisis mediante HPLC de la cantidad intracelular de PenN a las 96, 120 y 144 horas de fermentación en los transformantes TSM 4, TSM 26, TSM 80 y en la cepa parental C10. Los valores representan la media de dos fermentaciones independientes. (A) Cantidad de penicilina N intracelular. (B) Cantidad de penicilina N intracelular expresada de acuerdo con la cantidad de micelio pulverizado (500 mg).

6.- LOCALIZACIÓN *in vivo* DE LA PROTEÍNA CefM.

Para llevar a cabo la localización subcelular de la proteína CefM en *A. chrysogenum* se diseñó una proteína de fusión que reunía la proteína CefM y la proteína verde fluorescente (GFP, Green Fluorescent Protein) de *Aquorea victoria*. Esta proteína se introdujo en la cepa interrumpida TDM 139 que carece de la proteína CefM, de forma que la localización de la proteína de fusión CefM-GFP fuera la adecuada.

6.1.- Transformación, selección y análisis genético de los transformantes.

Con el fin de obtener transformantes que presentaran integrada la proteína CefM-GFP, se cotransformaron protoplastos de la cepa interrumpida TDM 139 con los plásmidos pcefM-GFP (Figura 2.8) y pAN7.1 (confiere resistencia a higromicina B). El plásmido pcefM-GFP (apartado 2.1.7 de Materiales y Métodos) contiene el gen *cefM*, bajo el control de su propio promotor, fusionado en marco y sin el codon de fin al gen *gfp2.5* (Fernández-Ábalos *et al.*, 1998), una versión del gen *gfp* funcional en hongos filamentosos que carece del codon de inicio. De esta forma se

traducirá la proteína de fusión CefM-GFP que nos permitirá determinar la situación exacta dónde se encuentra CefM en la célula.

Tras la transformación se obtuvieron un total de 37 transformantes resistentes a higromicina B que fueron analizados mediante bioensayo en taco de agar. Este método permite de forma rápida y cualitativa determinar la producción de cefalosporinas de varios transformantes simultáneamente. Básicamente, consiste en crecer los transformantes en tacos de medio MCFA durante 5 días a 28 °C. Una vez crecidos, se bioensayaron frente a *E. coli* ESS-22-31 y con penicilinas de *B. cereus* UL1 (degrada penicilinas pero no cefalosporinas), para estudiar la producción de cefalosporinas. Como controles se utilizaron la cepa parental C10 y la cepa interrumpida TDM 139. El bioensayo se realizó por duplicado.

Los resultados mostraron que dos transformantes, TcefM-GFP 36 y TcefM-GFP 37, presentaban un diámetro de halo de inhibición de crecimiento de *E. coli* muy similar al de la cepa parental C10. El ADN total de estos transformantes junto con el de la cepa parental C10 y el del transformante interrumpido TDM 139 fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI-*Mlu*I y se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADN total fue transferido a un filtro de nilón, el cuál fue fijado e hibridado con una sonda *Sal*I de 608 pb correspondiente a un fragmento de ADN interno al gen *cefM*. El resultado de la hibridación mostró la presencia de una banda de 3,3 kb en los dos transformantes seleccionados (Figura 3.19 B, carriles 1 y 2), indicando que el gen *cefM*-GFP híbrido se había integrado correctamente (Figura 3.17 A). Además aparecía otra banda adicional de 7,4 kb (Figura 3.19 B, carriles 1 y 2) que corresponde a la banda de hibridación endógena del transformante TDM 139 (Figura 3.19 B, carril 3) del que proceden (Figura 3.19 A). Como control se muestra la cepa C10, cuyo tamaño de banda de hibridación de 8,3 kb es el esperado (Figura 3.19 B, carril 4).

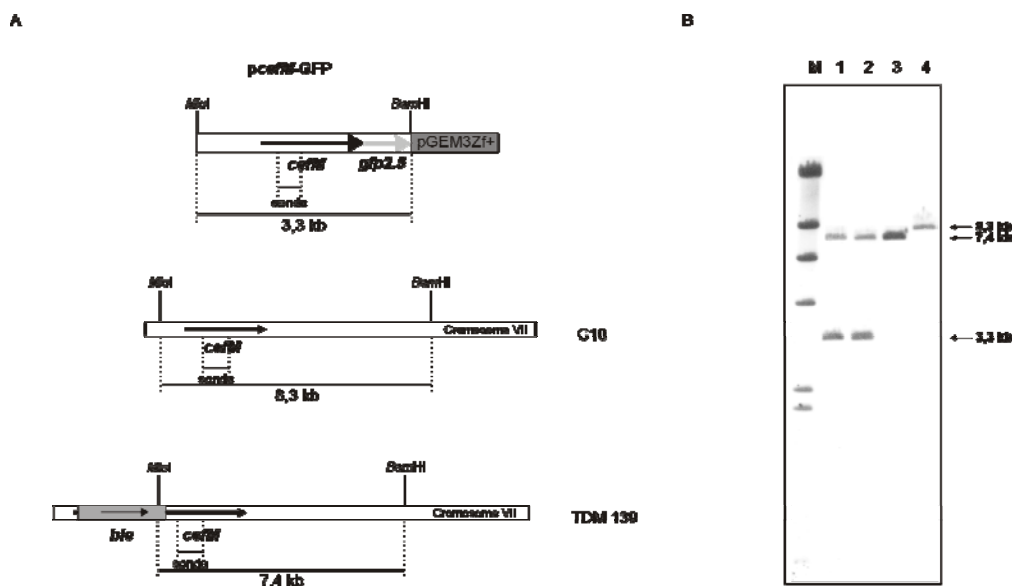


Figura 3.19. Hibridación de Southern de la integración del gen *cefM*-GFP en la cepa TDM 139. (A) Mapa físico del plásmido *pcefM*-GFP. Se muestra el tamaño de la banda de hibridación del casete que contiene el gen *cefM*-GFP bajo el control de su promotor. Se indican los tamaños de las bandas al digerir con *Bam*HI-*Mlu*I en C10 y en TDM 139. (B) Hibridación de Southern con una sonda *Sal*I de 608 pb correspondiente a un fragmento interno al gen *cefM*, del ADN total de los transformantes TcefM-GFP 36 (carril 1), TcefM-GFP 37 (carril 2), TMD 139 (carril 3) y C10 (carril 4) digerido con las enzimas *Bam*HI-*Mlu*I. M: marcador de peso molecular lambda *Hind*III marcado con digoxigenina.

El transformante TcefM-GFP 36 fue seleccionado para llevar a cabo los estudios de microscopia confocal de fluorescencia. Como controles negativos se utilizaron el transformante TDM 139 y la cepa C10.

6.2.- Análisis de la expresión de la proteína CefM-GFP en el transformante TcefM-GFP 36.

Para excluir la posibilidad de que la proteína GFP pudiera escindirse de la proteína de fusión CefM-GFP y quedar libre, se realizó un análisis de Western-blot del precipitado proteico que incluye las proteínas integrales de membrana de los extractos crudos del transformante TcefM-GFP 36, del transformante interrumpido TDM 139 y de la cepa parental *A. chrysoenum* C10. Se utilizaron anticuerpos antiGFP. Los resultados (Figura 3.20) mostraron que la proteína de fusión CefM-GFP permanece intacta en el transformante TcefM-GFP 36 (Figura 3.20, carril 3), mostrando un peso molecular deducido de 79,23 kDa (Figura 3.20, carriles 1 y 2). El transformante TDM 139 y la cepa parental C10 carecen de señal como era de esperar. Como control positivo se incluyó GFP libre (*Roche*) cuyo peso molecular es de 27 kDa (Figura 3.20, carril 4) para saber si existía escisión de la GFP de la proteína de fusión.

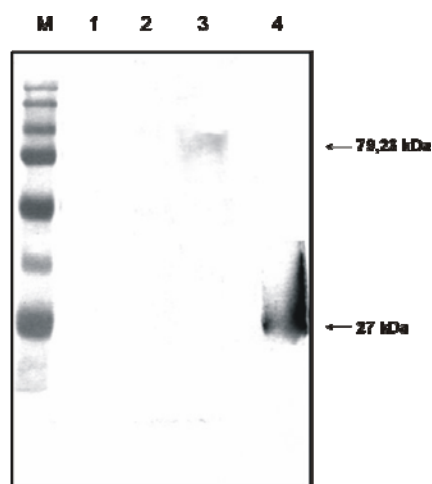


Figura 3.20. Western-blot de los extractos del transformante TDM 139 (carril 1), la cepa parental C10 (carril 2), el transformante TcefM-GFP 36 (carril 3) y la proteína GFP libre (carril 4). M: marcador de peso molecular (*BioRad*). Se muestra el tamaño de la proteína de fusión CefM-GFP (79,23 kDa) y de la proteína GFP libre (27 kDa).

6.3.- La proteína de fusión CefM-GFP se localiza intracelularmente en microcuerpos.

Para determinar la localización subcelular de la proteína de fusión CefM-GFP se utilizó el transformante TcefM-GFP 36, siendo los controles negativos la cepa parental C10 y el transformante interrumpido TDM 139. Los transformantes y la cepa parental C10 fueron crecidos en medio CCM realizando un preinóculo de 60 horas a 27 °C y 180 rpm en matraces indentados de 500 ml. Una vez crecido el micelio se utilizó para inocular al 5 % otro matraz indentado de 500 ml en idénticas condiciones de crecimiento. Se tomaron muestras cada 24 horas hasta las 96 horas de cultivo. Se colocaron muestras de cada cultivo en un portaobjetos, sobre ellos un cubreobjetos y se sellaron con acetona para evitar su deshidratación. Para determinar dónde se encontraba la fluorescencia se utilizó un microscopio confocal de fluorescencia modelo RADIANCE 2000

(BioRad). Para la fluorescencia procedente de la GFP se utilizó el filtro PMT-1 que posee un láser que excita con luz $\lambda = 488 \text{ nm}$ y emite una luz $\lambda = 500 \text{ nm}$.

Los resultados mostraron que la proteína CefM-GFP se localiza en microcuerpos de tamaño medio en el transformante TcefM-GFP 36 como se puede observar en las siguientes imágenes de la figura 3.19 C. Además no hay fluorescencia ni en la cepa parental C10 ni en el transformante interrumpido TDM 139 (Figura 3.21 A y B). Las imágenes fueron tomadas a las 96 horas de cultivo. Es importante destacar que durante las 48 primeras horas de cultivo no se observó fluorescencia en las muestras, manifestándose ésta a partir de las 72 horas de cultivo.

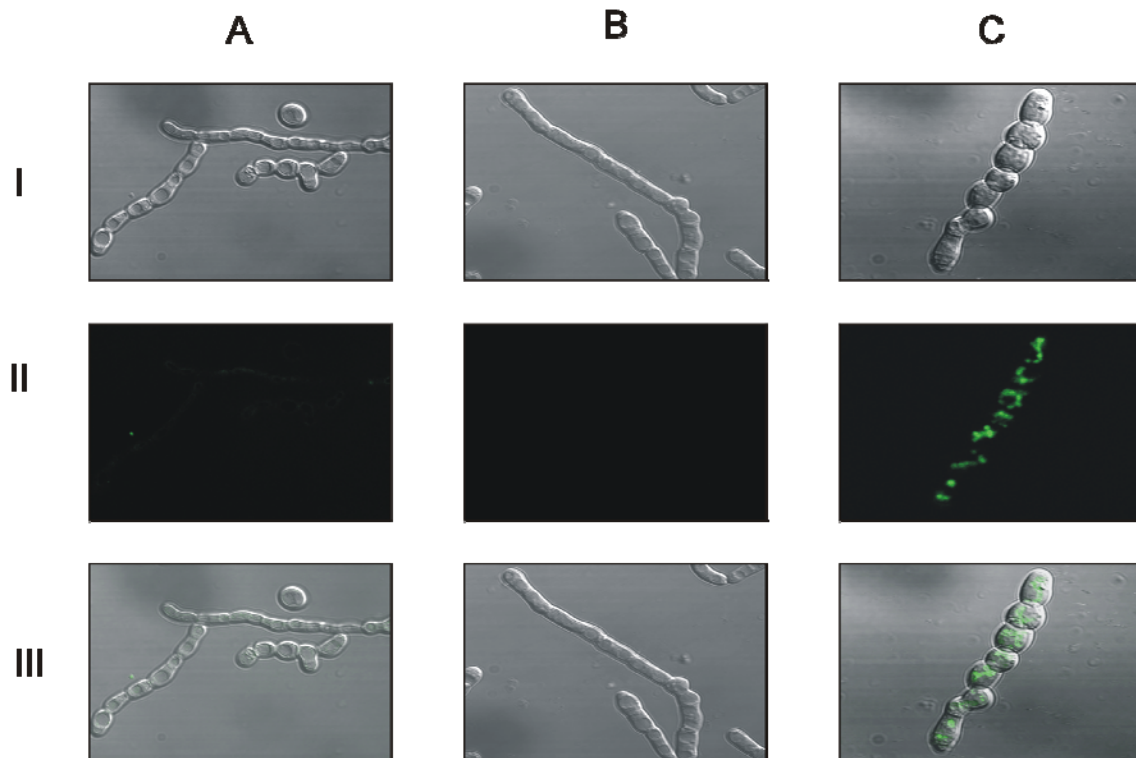


Figura 3.21. Localización subcelular de la proteína CefM-GFP mediante microscopía confocal de fluorescencia a las 96 horas de cultivo. Las imágenes situadas en las columnas A, B y C corresponden a la cepa parental C10, el transformante interrumpido TDM 139 y el transformante TcefM-GFP 36 respectivamente. Las imágenes de las fila I son de contraste de fases, las de la fila II de fluorescencia y las de la fila III corresponden a la superposición de las dos imágenes anteriores.

Cuando se muestra una imagen aumentada de una región de una hifa del transformante TcefM-GFP 36 se observa la distribución puntual de la fluorescencia a lo largo de la misma (Figura 3.20). Este tipo de fluorescencia es similar a la obtenida con proteínas cuyo destino final son los peroxisomas (van der Klei y Veenhuis, 2006). Por tanto, podemos concluir que la proteína híbrida CefM-GFP se encuentra en microcuerpos de tamaño medio.

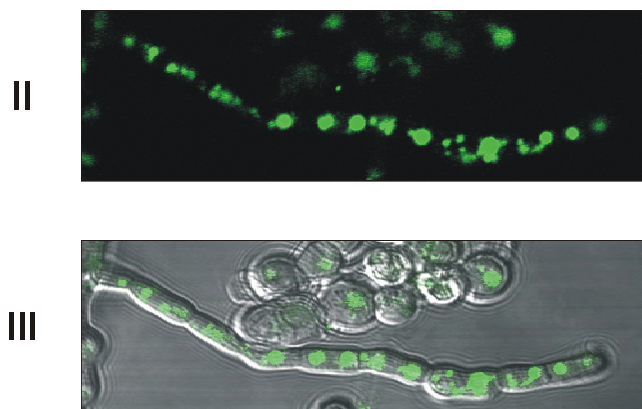


Figura 3.22. Detalle de una hifa del transformante TcefM-GFP 36 mostrando una fluorescencia puntual distribuida a lo largo de una hifa. (II) Imagen de fluorescencia. (III) Superposición de contraste de fases y fluorescencia.

SECCIÓN II: CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DEL GEN *cefR* EN LA BIOSÍNTESIS DE CEFALOSPORINA C EN *A. chrysogenum*.

7.- CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN ORF8 EN *A. chrysogenum*.

Otro de los objetivos que nos planteamos al inicio de la presente Tesis Doctoral fue la búsqueda de genes reguladores de la ruta biosintética de CPC en *A. chrysogenum*, en concreto genes que regulasen a los genes de secreción. Hasta la fecha se han descrito algunos reguladores específicos implicados en la regulación de la ruta de biosíntesis de cefalosporina C como CPR1 (Schmitt *et al.*, 2000; 2004a) y AcFKH1 (Schmitt *et al.*, 2004b). Además existen otros reguladores globales que actúan de manera indirecta sobre la biosíntesis de CPC como CRE1 (Jekosch y Kück, 2000) y AcVeA (Dreyer *et al.*, 2007). Puesto que los genes de secreción *cefM* y *cefT* están localizados en el cluster temprano de biosíntesis de CPC, se decidió buscar, en dicho cluster, marcos de lectura abierta que codificaran proteínas reguladoras que pudieran estar implicadas en la regulación de dichos genes de secreción. En dicha búsqueda se empleó la genoteca de ADN genómico λ -EMBL3-*ble* (Gutiérrez, 1994) de *A. chrysogenum* C10 (ATCC 48272)

7.1.- Rastreo en la genoteca λ -EMBL3-*ble*.

Se realizaron varias infecciones en la cepa de *E. coli* LE-392 con la genoteca de fagos λ -EMBL3-*ble* (Gutiérrez, 1994), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 16 de Materiales y Métodos. En dicho proceso, una vez fijado el ADN de los fagos al filtro de nilón, las hibridaciones se realizaron con dos sondas marcadas con digoxigenina: una sonda positiva (fragmento de ADN *Bam*HI-*Eco*RI de 330 pb) y una sonda negativa (fragmento de ADN *Hind*III-*Eco*RI de 1800 pb). Ambos fragmentos de ADN provienen de un fragmento de 7,2 kb que contiene el gen *cefT3* que procede del plásmido pDT3.1 (Figura 3.23 A, Ullán RV, Teijeira F y Martín JF, resultados no publicados). Dado que se desconocía la secuencia de la región previa (“aguas arriba”) del gen *cefT3*, la búsqueda se realizó en dicha zona, siendo la sonda negativa un fragmento situado en la región posterior (“aguas abajo”) de dicho gen, mientras que la sonda positiva fue un fragmento situado en la región anterior (“aguas arriba”) del mismo.

Se obtuvieron un total de 6 fagos que hibridaban con la sonda positiva y no con la negativa. El ADN de dichos fagos fue digerido con la enzima de restricción *Not*I que liberaba los brazos del fago y el inserto. El resultado de la hibridación de Southern con la sonda positiva mostró que sólo 3 de los fagos eran realmente positivos (Figura 3.23 B, carriles 2, 3 y 6). El fago F06R (Figura 3.23, carril 6) presentaba una banda de hibridación de 5,3 kb, que fue subclonada en el plásmido comercial pBluescript SK⁺ (Stratagene) para su posterior secuenciación y análisis.

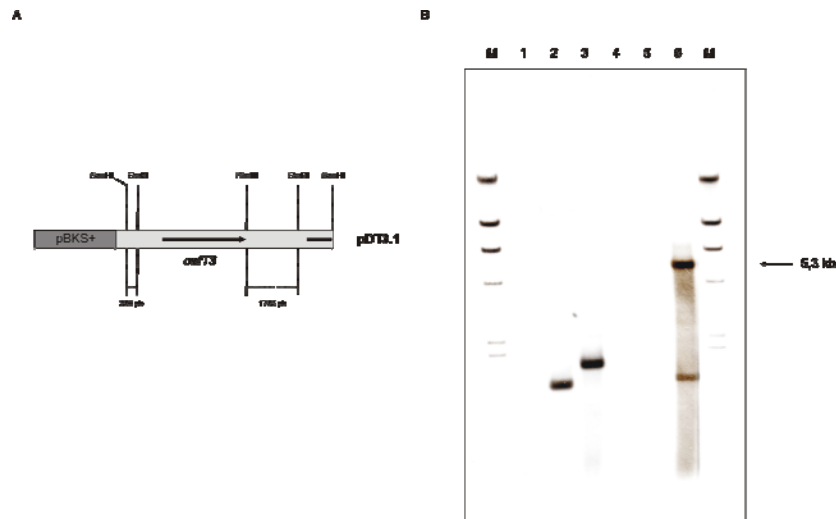


Figura 3.23. Búsqueda del gen ORF8 en la genoteca de λ -EMBL3-*ble* de *A. chrysogenum* C10. (A) Esquema del plásmido pDT3.1 del que proceden tanto la sonda positiva de 330 pb como la negativa de 1733 pb. (B) Hibridación de Southern con una sonda *Bam*HI-*Eco*RI de 330 pb del ADN total digerido con la enzima *Not*I de: fago F01R (carril 1); fago F02R (carril 2); fago F03 (carril 3); fago F04 (carril 4); fago F05R (carril 5) y fago F06R (carril 6). M: marcador de peso molecular lambda *Hind*III marcado con digoxigenina. Se indica el tamaño de la banda de hibridación seleccionada para su posterior clonación y secuenciación.

7.2.- Secuenciación del gen ORF8 en *Acremonium chrysogenum*.

Un fragmento de ADN *Not*I de 5,3 kb procedente del fago F06R fue clonado en el vector comercial pBluescriptSK⁺ (Stratagene) en ambas orientaciones, originando los plásmidos pB5,5Ra y pB5,5Rb (Figura 3.24). Los insertos contenidos en ambos plásmidos fueron secuenciados en ambas orientaciones utilizando la técnica descrita en Materiales y Métodos. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con los paquetes informáticos DNASTar y Vector NTI 9.0.

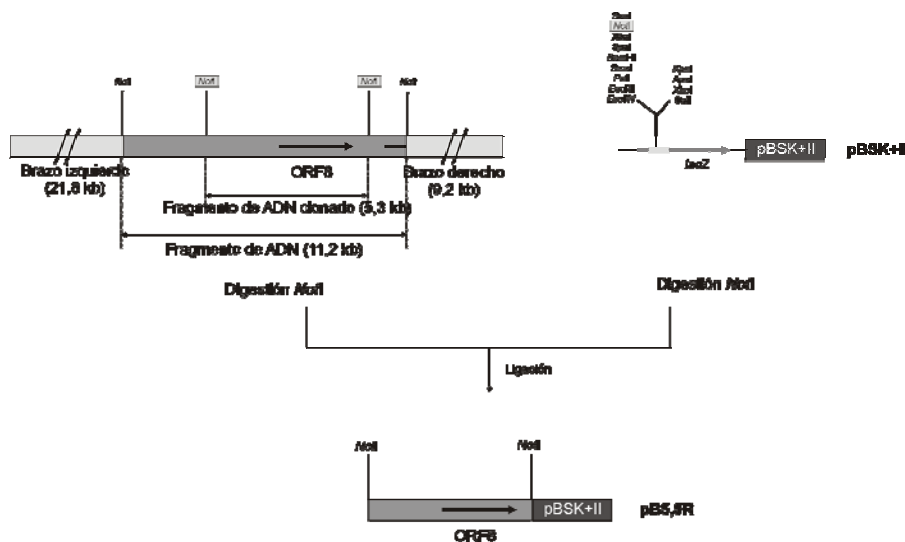


Figura 3.24. Construcción del plásmido pB5,5R.

7.2.1.-Secuencia de nucleótidos.

La secuencia de nucleótidos reveló la presencia de un marco de lectura abierto al que se denominó ORF8 de 2221 pb e interrumpido por la presencia de tres intrones.


```

GTCTCAGGGGCAATCGAAOAGGGGAAAGTTCCAGOGGGGGGGGGGGGAAOGAGCAOGTGGACTTCAATCCGTCCTTGGACTTTGAGGGTCTGCGAGCAG 4600
s q g q s n g e s s s a g a g a n e h v d f n p s s d f e g l q q
CTGCGAGCAGCOGTGCGCAAGGGGATGAGGGTAGAOGCTCAGTTCTCGTTTAOGCOGAGCTGCOOCTGGGGGGCTGTGCGOCTCTGGCOGTGCOGTTCTCTGC 4700
l q q p s r k r m r v d a q f s f t p t c p g a l s p s g l p f l
CGTOSTCGTTTCTTGGAGGCTTGGCTGGOGATGATGOCATGTTTCTGTAOCTGGGGGGGATGACGGGAOCCAGCTTCCAGTGGGACTATCCGGGGGGTT 4800
p s s f l e g l a g d d a m f p d l a g m t d p s f q w d y p g a l
GCAGTCGACAGACTGGGCGAOGATGGGCOOCCGGGGGGTTTTATOGOGATGTGCAAGTGGGGAGTATAAOGGGCTTGGTGGGAATCGGTTGTGGGATA 4900
q .
AATCTTGTATTCTAGGTTTCGTTTGGGAACITGGGCTGATGATGGATCTGCTGGAGGCGGCGGACATCTGTTTGGCATAAAACACATAAATGCATAAACTC 5000
TCGATGTGTATAAOCCTGGGCTGCATGAAGAACCAOGAGGGATGCATTACACGTGCATTAGCATAAATGCACAAAGGGGACCAOCTGGCTAGCAGGATAATAI 5100
ACGTACACCAGGTGGGATACGTAAGGTAGGTAGGTACCCGAGGCCOCCACTGGATCGGGCTTGGTGGGCAAGAGCTCCOAGAGCCGACGACGGCGAOGA 5200
TTCACGGCCACCGCCAGCTTCCATTCGACATCATCTCTTGGGGAGGCCGGGCGATCCACAGTCTTCAGGCCACCATGTTTCGGGATCTAGAGATGGGGAATGGGACC 5300
CCGGGAGTACCTGGC

```

Figura 3.25. Secuencia nucleotídica de 5316 pb que en la que se encuentra el marco de lectura abierto ORF8. La flecha indica el sentido de la transcripción del gen ORF8. Se señalan los tres intrones que interrumpen el marco de lectura abierto del gen ORF8. En negrita se encuentran las secuencias de entrada y salida de los intrones, así como los codones de inicio y fin del gen ORF8.

7.2.2.- Determinación de la presencia de intrones mediante RT-PCR.

Para confirmar la presencia de intrones en el gen ORF8 se utilizó la técnica de RT-PCR (*Invitrogen*) descrita en el apartado 15.3 de Materiales y Métodos. Para ello, se obtuvo ARN total de 48, 72 y 96 horas de fermentación de *A. chrysogenum*. Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

- Oligonucleótido R1IF: 5'-AAGGCACTAGCGAAGCTCGA-3'
- Oligonucleótido R2IR: 5'-GCTGGCTCCGCTCCTGA-3'

La pareja de primers R1IF-R2IR amplificó dos bandas de ADNc de 857 pb y 744 pb. Ambas bandas fueron clonadas y secuenciadas, determinándose la presencia de tres intrones en esa región. La secuencia de la banda de 857 pb se corresponde con el ARNm en el que se ha eliminado los fragmentos correspondientes a los tres primeros intrones como se muestra en la secuencia de la figura 3.25. El alineamiento de la secuencia de la banda de 744 pb con la secuencia del gen ORF8 permitió determinar la existencia de otros dos intrones localizados entre las posiciones 3490-3696 y 3825-3955 respectivamente (Figura 3.25). Este nuevo intrón que no se había detectado en el análisis inicial de la secuencia, se procesa de forma alternativa al intrón 3. En la figura 3.26 A se observan tres bandas de amplificación utilizando ARN de C10 a las 48, 72 y 96 horas que corresponden al pre-ARNm (1080 pb), a la eliminación de los intrones 1, 2 y 3 (857 pb) y a la eliminación de los cuatro intrones (727 pb) (Figura 3.26 A). La presencia de estos intrones diferentes a los mayoritarios que hacían pensar en la existencia de un posible mecanismo de procesamiento alternativo motivó la búsqueda de otros intrones en las regiones inicial y final del gen *cefR*. Con este fin se realizó una RT-PCR utilizando como molde ARN total de C10 de 48, 72 y 96 horas y las parejas de oligos F1-R2, que permiten amplificar un transcrito que va desde el inicio del gen hasta la posición 818 en su forma no procesada. El resultado de la RT-PCR (Figura 3.26 B) mostró la existencia de tres bandas: una de 818 pb correspondiente al ARNm mayoritario en el que no existen ningún intrón adicional, otra de 783 pb y dos bandas adicionales de menor que permitieron confirmar que existen intrones que se procesarían de forma alternativa en esta región. Por otro lado, cuando se realizó una RT-PCR con los oligonucleótidos RF9-R1 (Figura 3.26 C) permiten

amplificar una banda de 422 pb mayoritaria y otra de menor tamaño (390 pb) que indican la posible existencia de algún intrón que se procese de manera alternativa en la región final del gen.

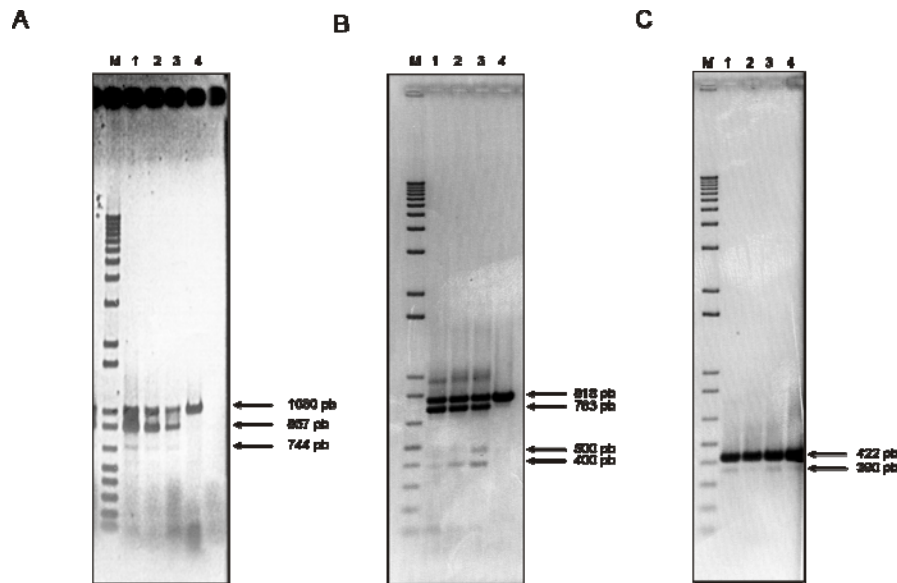


Figura 3.26. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % de los productos de RT-PCR obtenidos utilizando ARN total de C10 de 48 (carril 1), 72 (carril 2) y 96 horas de fermentación (carril 3) junto con ADN total de C10 como control negativo (carril 4). M: marcador de peso molecular 1 kb ladder (*Invitrogen*). (A) Bandas amplificadas con la pareja de oligonucleótidos R11F y R21R (B) Bandas resultantes de la amplificación utilizando la pareja de oligonucleótidos F1 y R2. (C) Bandas amplificadas empleando la pareja de oligonucleótidos RF9 y R1.

Teniendo en cuenta estos resultados y debido a la dificultad de saber qué intrones existen en cada transcrito que se procesarían de forma alternativa, decidimos tratar de amplificar el gen *cefR* completo mediante RT-PCR utilizando los oligonucleótidos F1 y R1. Se han clonado diversas bandas como producto de esta RT-PCR de aproximadamente 300 pb, 400 pb, 500 pb, 700 pb y 1000 pb. Además se han obtenido toda una variedad de bandas entre 1000 pb y 2200 pb (pre-ARNm). La obtención del transcrito mayoritario que tendría en torno a 2 kb es tremendamente complicada puesto que el gen *cefR* se expresa muy poco y además la ADN polimerasa amplifica con más facilidad fragmentos de menor tamaño que otros fragmentos mayores. El análisis de la secuencia ha permitido determinar que no existe ninguna coherencia en la secuencia de los fragmentos subclonados, por lo que probablemente las otras bandas que se observaban cuando se analizaba las regiones que incluían a los tres intrones ya identificados son productos de procesamiento del ARNm por ARNasas específicas.

8.- ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DEDUCIDA DE LA PROTEÍNA ORF8.

El gen ORF8 presenta un marco de lectura abierto de 2221 pb interrumpido por la presencia de tres intrones, que una vez procesados, codificarían una proteína de 687 aminoácidos, con un peso molecular deducido de 76,73 kDa. La proteína deducida se comparó con las bases de datos de proteínas y mostró un diferentes porcentajes de aminoácidos idénticos en toda su secuencia con

9.- INTERRUPCIÓN DEL GEN ORF8 EN *A. chrysogenum*.

Para estudiar el papel de la proteína codificada por el gen ORF8 en la ruta de biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum*, se llevó a cabo la inactivación del gen ORF8 mediante la técnica del doble marcador (Mansour et al., 1988; Liu et al., 2001; Ullán et al., 2002b). Esta técnica es la misma que se utilizó para la inactivación dirigida del gen *cefM* (Teijeira et al., 2009).

9.1.- Transformación y selección de los transformantes.

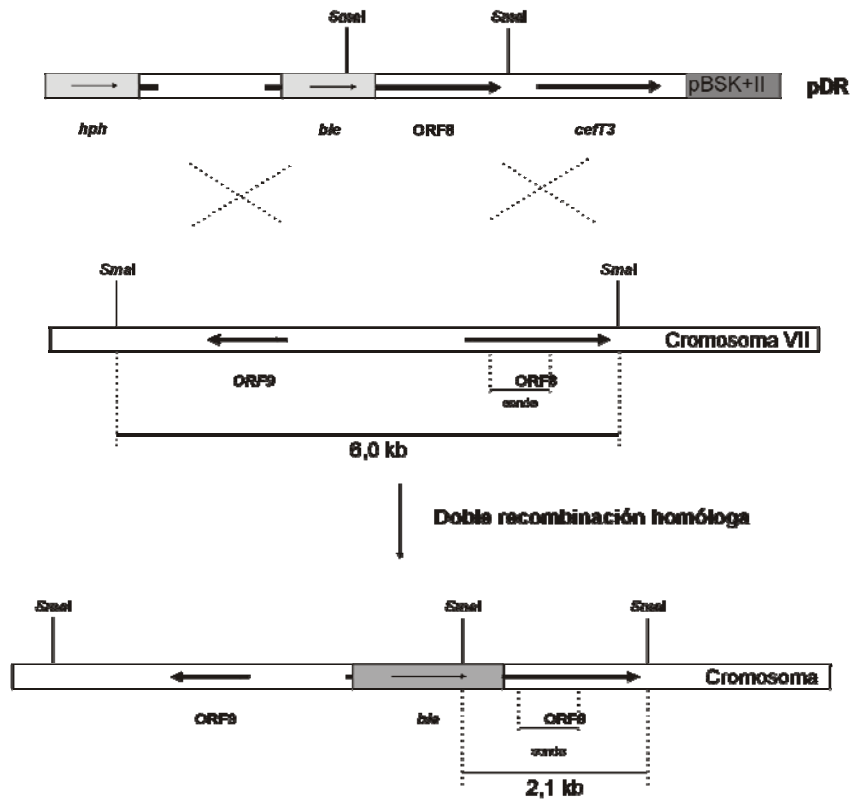
Para llevar a cabo la inactivación dirigida del gen ORF8 de *A. chrysogenum*, se construyó el plásmido integrativo pDR (Figura 2.5). Este plásmido (apartado 2.1.4 de Materiales y Métodos) contiene el gen ORF8 al que se ha eliminado un fragmento *XhoI-ClaI* de 601 pb siendo sustituido por el casete de resistencia a fleomicina. Como segundo marcador se utilizó el casete de resistencia a higromicina B. Para obtener los transformantes interrumpidos en el gen ORF8, se transformaron protoplastos de *A. chrysogenum* C10 con el plásmido integrativo pDR y se seleccionaron los transformantes resistentes a fleomicina y sensibles a higromicina B. Se obtuvieron un total de 9 transformantes que eran posibles candidatos a estar inactivados en el gen ORF8 puesto que probablemente habrían sufrido un proceso de doble recombinación homóloga entre la región del plásmido pDR que contiene el gen ORF8 inactivado (Figura 3.28 A) y la región homóloga de su genoma que contiene el gen ORF8 intacto.

9.2.- Análisis genético de los transformantes interrumpidos mediante hibridación de Southern.

Para determinar si en alguno de los 9 transformantes había ocurrido la interrupción del gen ORF8 se extrajo el ADN total de los mismos junto con el de la cepa parental C10 y se digirió con la enzima de restricción *SmaI*. Una vez digerido, se separó mediante electroforesis en gel de agarosa, se transfirió y se fijó a un filtro de nilón. Finalmente, el ADN del filtro fue hibridado con una sonda *EcoRI* de 759 pb (marcada con digoxigenina) correspondiente a una región interna del gen ORF8 (Figura 3.26 A)

El resultado de la hibridación de Southern (Figura 3.28 B) mostró la presencia de una banda de hibridación de 6,0 kb en la cepa parental C10 (Figura 3.28 B, carril 10), dos bandas de hibridación de 6,0 kb (endógena) y de 2,1 kb (correspondiente al gen ORF8 interrumpido) en aquellos transformantes en los que el plásmido pDR se había integrado de forma ectópica y aleatoria en el genoma (Figura 3.28 B, carriles 2, 3, 4, 7 y 8). En el transformante TDR 34 (Figura 3.28 B, carril 1) aparece únicamente una banda de 2,1 kb que sustituye a la banda de 6,0 kb. Esto indica que el transformante TDR 34 tiene el gen ORF8 interrumpido.

A



B

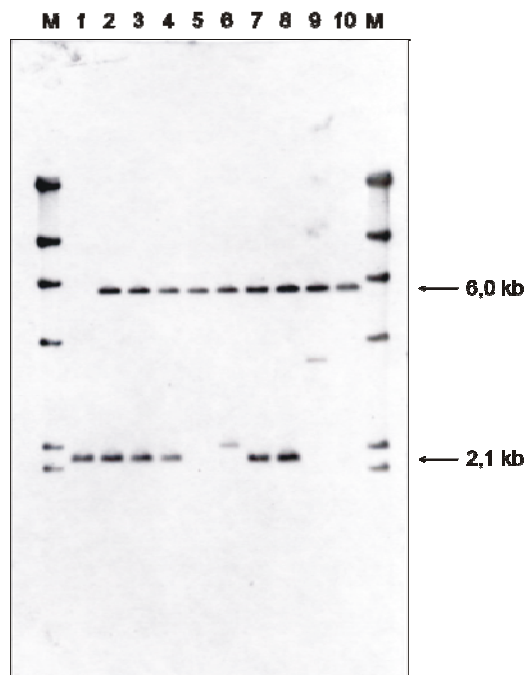


Figura 3.28. Interrupción del gen ORF8 mediante la técnica del doble marcador. (A) Esquema del plásmido pDR utilizado en la inactivación dirigida del gen ORF8, en el cual el marco de lectura abierto del gen ORF8 se halla interrumpido por la presencia del casete de resistencia a fleomicina. Mapa físico de la región cromosómica que incluye al gen ORF8. Esquema en el que se muestra el resultado de la sustitución del gen ORF8 intacto por el gen ORF8 interrumpido en el plásmido pDR. (B) Hibridación del ADN total, digerido con la enzima de restricción *Sma*I, de los 9 transformantes y la cepa parental C10 con el fragmento *Eco*RI interno al gen ORF8 de 759 pb. M, marcador de peso molecular lambda *Hind*III marcado con digoxigenina; carril 1, TDR 34; carril 2, TDR 55; carril 3, TDR 56; carril 4, TDR 68; carril 5, TDR 71; carril 6, TDR 111; carril 7, TDR 149; carril 8, TDR 171; carril 9, TDR 178; carril 10, *A. chrysogenum* C10.

9.3.- Análisis de la producción de cefalosporinas en el transformante TDR 34.

Para determinar el papel que el gen ORF8 desempeña en la ruta de biosíntesis de cefalosporina C, se fermentaron (en condiciones de producción de cefalosporinas) el transformante interrumpido TDR 34 y la cepa parental C10. Se realizaron tres fermentaciones por triplicado siguiendo las instrucciones indicadas en el apartado 6 de Materiales y Métodos.

9.3.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en el transformante TDR 34 mediante bioensayo.

La producción de cefalosporinas en los caldos de cultivo del transformante TDR 34 y la cepa parental C10, se valoró mediante el bioensayo de los caldos de cultivo frente a *E. coli* ESS-22-31 con penicilinas de *B. cereus* UL1. El crecimiento se determinó como peso seco y permitió expresar la producción de cefalosporinas de forma específica. Los resultados (Figura 3.29 A) mostraron una curva de crecimiento en el transformante TDR 34 diferente a la cepa parental C10 puesto que se encuentra retrasada y alcanza su punto máximo a las 120 horas de fermentación. Sin embargo, en la cepa parental el máximo crecimiento del micelio se sitúa en torno a las 72-96 horas de fermentación, momento en el cuál comienza a partir de aquí la fase de lisis. A las 144 presentan una lisis similar del micelio.

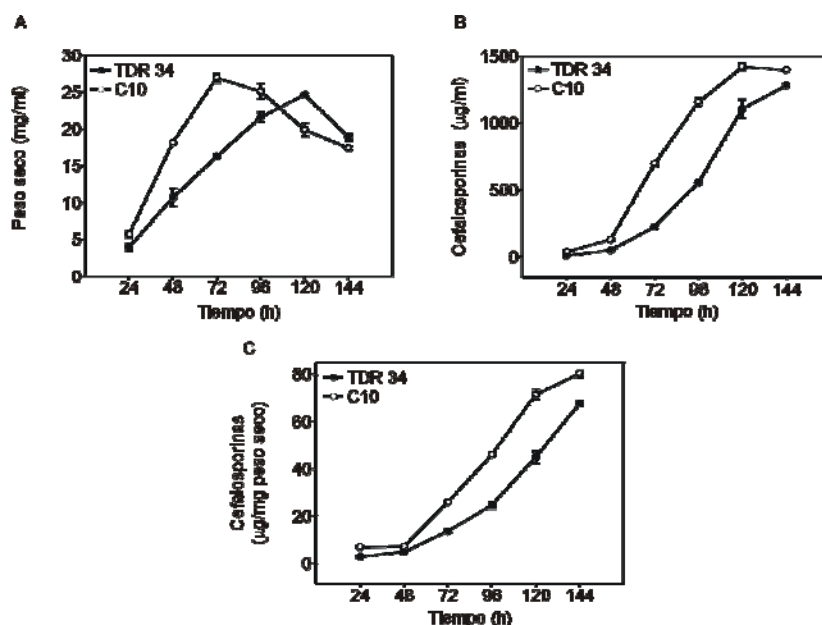


Figura 3.29. Curva de crecimiento y de producción de cefalosporinas en el transformante interrumpido TDR 34. (A) Curva de crecimiento expresada como peso seco. (B) Producción volumétrica de cefalosporinas. (C) Producción específica de cefalosporinas.

Los resultados del bioensayo de los caldos de cultivo (Figura 3.29 B y C) muestran un entretardamiento de la producción de cefalosporinas (menor velocidad de producción: antibiótico/tiempo) en el transformante interrumpido TDR 34 con respecto a la cepa parental C10. Así la producción volumétrica de cefalosporinas (Figura 3.29 B) del transformante TDR 34 entre las 72 y 120 horas indica una menor secreción de las mismas. Por otro lado, si bien dicha producción volumétrica de cefalosporinas prácticamente se iguala con la de la cepa parental a las

144 horas de fermentación, se aprecia la diferencia cuando se analiza la producción específica (Figura 3.29 C).

9.3.2.- Análisis mediante HPLC de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales extracelulares en el transformante TDR 34.

El análisis mediante HPLC (apartado 19 de Materiales y Métodos) de los caldos de cultivo del transformante TDR 34 y la cepa parental C10 confirmó los resultados del bioensayo (Figura 3.30 A y B). La gráfica correspondiente a la evolución de la producción de CPC del transformante TDR 34 muestra que ésta se encuentra retrasada con respecto a la de la cepa parental C10 (Figura 3.30 A y B). Además como en el caso del bioensayo existe una menor producción de CPC, nuevamente que es más clara cuando se refleja como producción específica (Figura 3.30 B). Por otro lado, la producción de penicilinas totales en el transformante TDR 34 aumenta con respecto a la cepa parental llegando casi a duplicarla (Figura 3.30 C y D). Cabe indicar que el isómero detectado en los caldos de cultivo a partir de las 96 horas de fermentación es únicamente penicilina N. En conclusión, el transformante TDR 34 muestra una mayor secreción de penicilina N y una disminución en la producción de CPC en los caldos de cultivo.

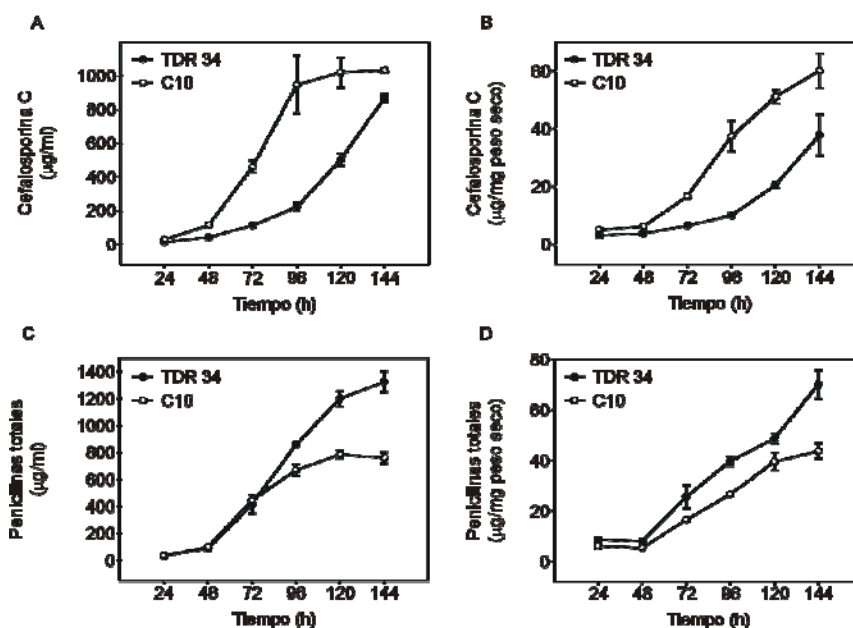


Figura 3.30. Análisis mediante HPLC de la producción extracelular de cefalosporina C y penicilinas totales (IPN + PenN) en los caldos de cultivo del transformante TDR 34 y la cepa parental C10. (A) Producción volumétrica de CPC. (B) Producción específica de CPC. (C) Producción volumétrica de penicilinas totales. (D) Producción específica de penicilinas totales.

9.3.3.- El transformante interrumpido TDR 34 posee una cantidad intracelular de penicilina N similar a la cepa parental C10.

El análisis intracelular de la cantidad de penicilina N (sólo se detectó este isómero) mediante HPLC (apartado 21 de Materiales y Métodos) a 96 y 120 horas de fermentación en el transformante interrumpido TDR 34 (Figura 3.31 A y B) permitió determinar que sus niveles son muy similares a los de la cepa parental C10. Sin embargo, a las 144 horas se observa una menor cantidad de PenN intracelular (Figura 3.31 A y B) en el transformante interrumpido en el gen

ORF8 frente a la cepa parental C10. Las diferencias existentes en la cantidad intracelular de penicilina N entre el transformante interrumpido TDR 34 y la cepa parental C10 no se consideraron significativas a ninguno de los tiempos analizados.

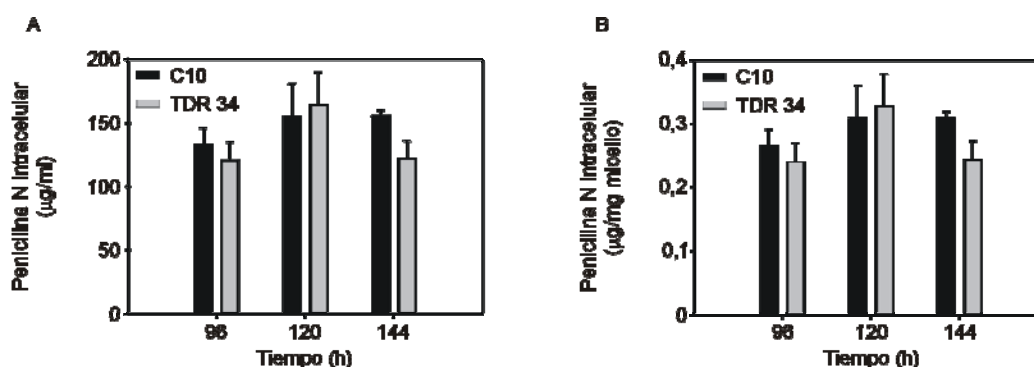


Figura 3.31. Análisis mediante HPLC de la cantidad intracelular de penicilina N a las 96, 120 y 144 horas de fermentación en el transformante interrumpido TDR 34 y en la cepa parental C10. Los valores representan la media de dos fermentaciones independientes. (A) Concentración volumétrica de penicilina N intracelular. (B) Concentración específica de penicilina N.

Los resultados obtenidos implican directa o indirectamente a la proteína ORF8 con la biosíntesis de cefalosporinas. Este hecho unido a la homología de dicha proteína con otras proteínas reguladoras, hace que a partir de ahora llamemos a la proteína ORF8 como CefR, “Cef” de genes relacionados con la producción de cefalosporinas y “R” debido a su papel como regulador de los genes de biosíntesis y/o de secreción de cefalosporinas (véase posteriormente).

10.- COMPLEMENTACIÓN EN *TRANS* DE LA CEPA INTERRUMPIDA TDR 34.

Una vez estudiado el papel del gen *cefR* en la ruta de biosíntesis de cefalosporinas en *A. chrysogenum*, y con el fin de confirmar que el efecto de la inactivación dirigida del gen *cefR* era debido única y exclusivamente a su interrupción, se procedió a la complementación en *trans* de la cepa interrumpida TDR 34. Para ello, dicho mutante se transformó con el plásmido integrativo pCR (Figura 2.5 de Materiales y Métodos). Dicho plásmido contiene el gen *cefR* bajo el control de su propio promotor y como marcador de selección el casete de resistencia a higromicina B.

10.1.- Transformación, selección y análisis genético de los transformantes complementados con el gen *cefR*.

Se transformaron protoplastos de la cepa interrumpida TDR 34 con el plásmido integrativo pCR (Figura 3.32 A) y se seleccionaron aquellos transformantes resistentes a higromicina B. Se obtuvieron 5 transformantes resistentes que fueron analizados mediante hibridación de Southern, para demostrar la integración de una copia intacta del gen *cefR* con su propio promotor. Para ello, se obtuvo el ADN total de estos 5 transformantes junto con el de la cepa parental C10 y la cepa TDR 34 (interrumpido en el gen *cefR*) como controles. El ADN total fue digerido con la enzima de restricción *SmaI* e hibridado con una sonda correspondiente a un fragmento de ADN *EcoRI* de 759 pb interno al gen *cefR* (Figura 3.32 A). El resultado de la hibridación de Southern (Figura 3.32 B)

mostró que el transformante TCR 42 (Figura 3.32 B, carril 3) presentaba una banda de 8,4 kb debida al gen *cefR* intacto con su propio promotor además de la banda de 2,1 kb correspondiente a la inactivación del gen *cefR*. Asimismo los transformantes TCR 70 (Figura 3.32, carril 4) y TCR 71 (Figura 3.32, carril 5) presentaban junto con la banda de 2,1 kb otra banda adicional de aproximadamente 9,4 kb debida a una posible reorganización del plásmido pCR.

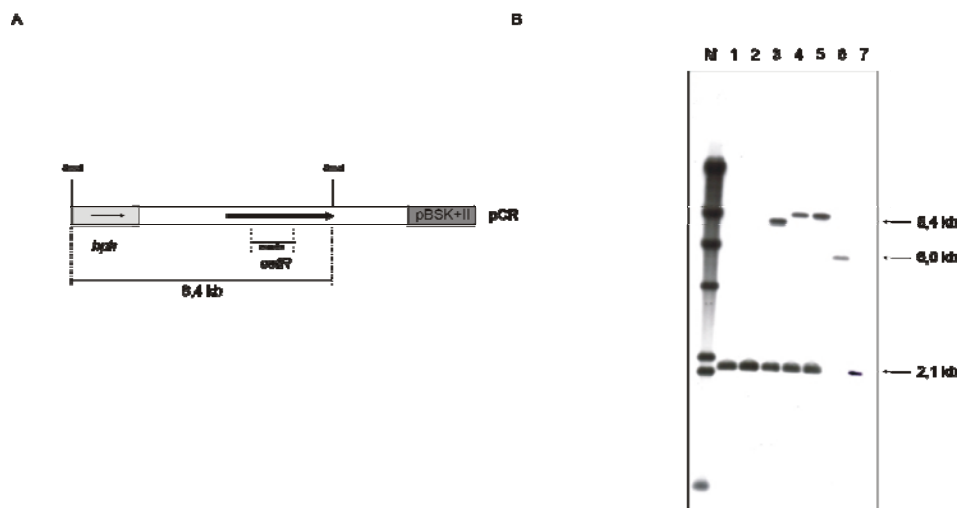


Figura 3.32. Complementación *in trans* de la cepa interrumpida TDR 34 con el gen *cefR*. (A) Mapa físico del plásmido integrativo pCR. Se indica el tamaño de la banda de hibridación correspondiente al gen *cefR* intacto con su propio promotor. (B) Hibridación de Southern con una sonda correspondiente a un fragmento de ADN *EcoRI* de 759 pb interno al gen *cefR* del ADN total digerido con la enzima de restricción *SmaI* de los transformantes TCR 7 (carril 1), TCR 13 (carril 2), TCR 42 (carril 3), TCR 70 (carril 4), TCR 71 (carril 5), C10 (carril 6) y TDR 34 (carril 7). M (marcador de peso molecular lambda *HindIII* marcado con digoxigenina).

10.2.- Análisis de la producción de cefalosporinas en los transformantes complementados con el gen *cefR*.

Para estudiar el efecto de la complementación *in trans* de la mutación en el gen *cefR*, se fermentaron el transformante complementado TCR 42 junto con la cepa interrumpida TDR 34 y la cepa C10 en condiciones de producción de cefalosporinas. Las fermentaciones se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces.

Las fermentaciones se iniciaron utilizando esporas frescas procedentes de los transformantes TCR, del transformante interrumpido TDR 34 y de la cepa parental C10, que germinaron en medio MDIA tras 48 horas de incubación. Una vez que el micelio estaba optimamente crecido, se inoculó un 10 % en medio MDFA en matraces indentados de 500 ml que se incubaron a 25 °C y 250 rpm. Se tomaron muestras cada 24 horas hasta las 144 horas de fermentación.

10.2.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en los transformantes complementados con el gen *cefR* mediante bioensayo.

La producción de cefalosporinas en los caldos de cultivo de los transformantes complementados con el gen *cefR*, de la cepa interrumpida TDR 34 y de la cepa control C10, se valoró mediante el bioensayo de los caldos de cultivo frente a *E. coli* ESS-22-31 utilizando

penicilinas de *B. cereus* UL1. El grado de crecimiento se obtuvo como peso seco y permitió expresar la producción de cefalosporinas de forma específica (μg antibiótico/mg peso seco)

Los resultados del bioensayo mostraron que en el transformante TCR 42 (posee el gen *cefR* correctamente integrado) se restaura la producción volumétrica de cefalosporinas (Figura 3.33 B). Sin embargo, el transformante TCR 42 muestra un perfil de crecimiento y de la producción de cefalosporinas idénticos al de la cepa interrumpida TDR 34 (Figura 3.33 A) por lo cuál, la producción específica de cefalosporinas no se restaura en dicho transformante complementado con el gen *cefR* (Figura 3.33 C).

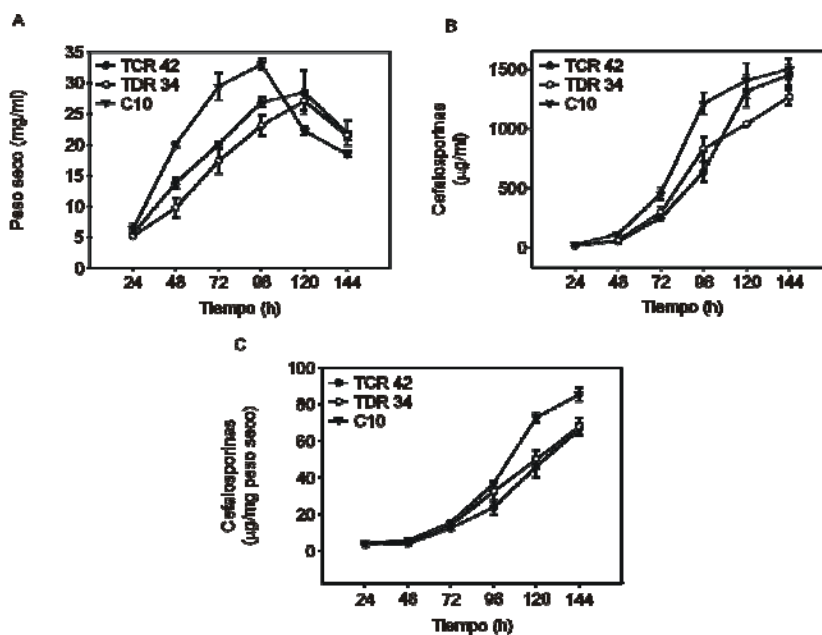


Figura 3.33. Curva de crecimiento y de producción de cefalosporinas en los transformantes complementados en *trans* con el gen *cefR*. (A) Curva de crecimiento expresada como peso seco. (B) Producción volumétrica de cefalosporinas. (C) Producción específica de cefalosporinas.

10.2.2.- Análisis mediante HPLC de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales extracelulares en los transformantes TCR.

El análisis mediante HPLC de los caldos de cultivo del transformante TCR 42 (complementado con el gen *cefR*), la cepa interrumpida TDR 34 y la cepa parental C10 confirmó los resultados del bioensayo. Las gráficas correspondientes a la producción de CPC y penicilinas totales muestran que no se restaura ni la síntesis de CPC [(expresada tanto de forma volumétrica (Figura 3.34 A) como específica (Figura 3.34 B)] ni la de penicilinas totales [volumétrica (Figura 3.34 C) y específica (Figura 3.34 D)] en el transformante complementado.

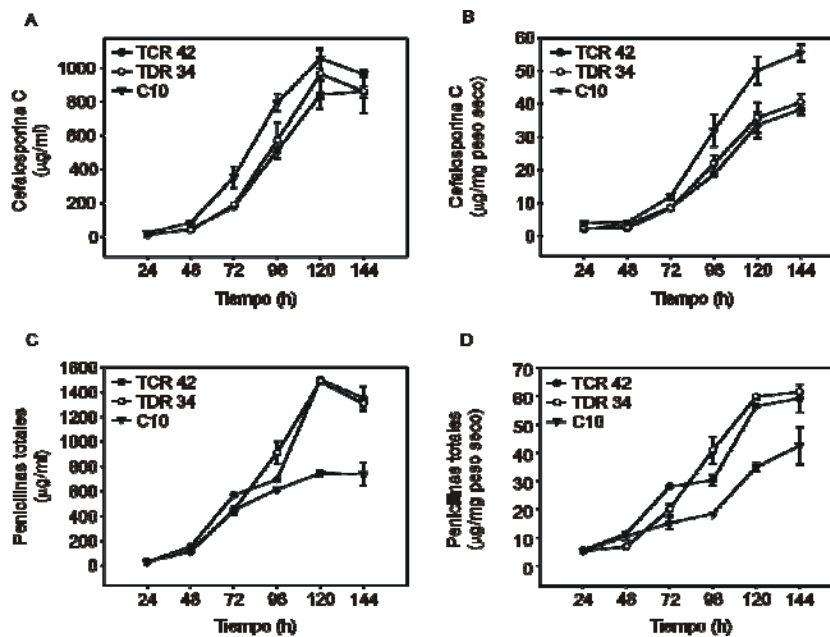


Figura 3.34. Análisis mediante HPLC de la producción extracelular de cefalosporina C y penicilinas totales (IPN + PenN) en los transformantes complementados en *trans* con el gen *cefR*, en el transformante interrumpido TDR 34 y en la cepa parental C10. (A) Producción volumétrica de CPC. (B) Producción específica de CPC. (C) Producción volumétrica de penicilinas totales. (D) Producción específica de penicilinas totales.

10.3.- Transformación, selección y análisis genético de los transformantes complementados con los genes *cefR* y *cefT3*.

Corriente abajo del gen *cefR* se localiza el gen *cefT3* que codifica una hipotética proteína de membrana que parece estar implicada en el transporte del intermediario IPN en *A. chrysoogenum* (Ullán RV, Teijeira F, Martín JF; resultados no publicados). La interrupción del gen *cefR* no afecta a la expresión del gen *cefT3*; sin embargo la interrupción de éste último (*cefT3*) sí afecta a la expresión del primero (Ullán RV, Teijeira F, Martín JF; resultados no publicados). En este último caso ambos genes *cefT3* y *cefR* son necesarios para la complementación en *trans* de la mutación en el gen *cefT3*. Dado que la complementación en *trans* del transformante interrumpido TDR 34 con el gen *cefR* (bajo el control de su propio promotor) no consiguió restaurar el crecimiento ni la producción de cefalosporinas y de penicilinas, se procedió a llevar a cabo la complementación en *trans* con un fragmento de ADN que incluía los dos genes *cefR* y *cefT3* bajo el control de sus propios promotores. Para ello, se cotransformaron protoplastos de la cepa interrumpida TDR 34 con el plásmido integrativo pCR+T3 y con el plásmido pAN7.1 (sin inserto; otorga resistencia a higromicina B), seleccionando aquellos transformantes resistentes a higromicina B. Se obtuvieron 2 transformantes resistentes que fueron analizados mediante hibridación de Southern, para demostrar la integración de una copia intacta de los genes *cefR* y *cefT3* con sus regiones promotoras. Se obtuvo el ADN total de estos 2 transformantes junto con el de la cepa parental C10 y la cepa TDR 34 (interrumpido en el gen *cefR*) como controles. El ADN total fue digerido (con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Fse*I) e hibridado con una sonda *Eco*RI de 759 pb (Figura 3.35 A) del gen *cefR*. El resultado de la hibridación de Southern mostró que el transformante TCRT3 34 (Figura 3.35 B, carril 1) presentaba una banda de hibridación de 8,5 kb correspondiente a los genes *cefR* y *cefT3* junto con sus regiones promotoras (Figura 3.35 A). Además presenta la banda de hibridación de 10 kb correspondiente a la inactivación del gen *cefR*. La cepa parental C10 (Figura 3.35 B, carril 4) presenta la banda de

8,5 kb que sirve como control positivo de la hibridación, mientras que el transformante TCRT3 36 (Figura 3.35 B, carril 2) únicamente posee la banda de 10 kb debida a la inactivación del gen *cefR*.

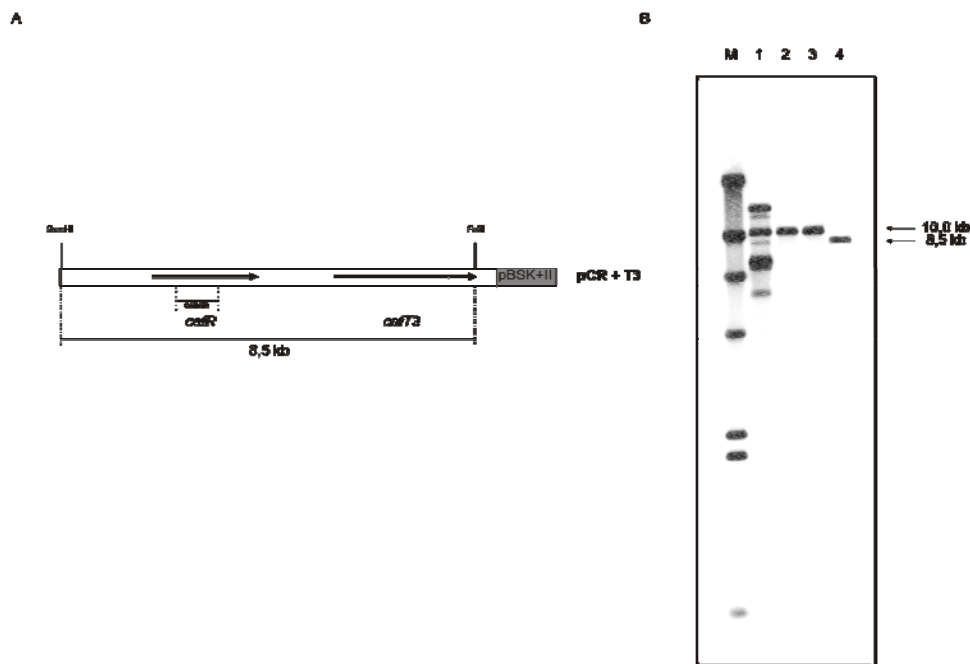


Figura 3.35. Complementación *in trans* de la cepa interrumpida TDR 34 con los genes *cefR* y *cefT3*. (A) Mapa físico del plásmido integrativo pCR+T3. Se indica el tamaño de la banda de hibridación correspondiente a un fragmento de ADN que incluye a los genes *cefR* y *cefT3* junto con sus regiones promotoras. (B) Hibridación de Southern con una sonda correspondiente a un fragmento de ADN *EcoRI* de 759 pb interno al gen *cefR*, del ADN total digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *FseI* de los transformantes TCRT3 34 (carril 1), TCRT3 36 (carril 2), TDR 34 (carril 3) y C10 (carril 4). M, marcador de peso molecular lambda *HindIII* marcado con digoxigenina.

10.4.- Análisis de la producción de cefalosporinas en los transformantes complementados con los genes *cefR* y *cefT3*.

Para estudiar el efecto de la complementación *in trans* con los genes *cefR* y *cefT3*, se fermentaron el transformante TCRT3 34, la cepa interrumpida TDR 34 y la cepa parental C10 en condiciones de producción de cefalosporinas. Las fermentaciones se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 6 de Materiales y Métodos. Se tomaron muestras cada 24 horas hasta las 144 horas de fermentación.

10.4.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en el transformante complementado con los genes *cefR* y *cefT3* mediante bioensayo.

La producción de cefalosporinas en los caldos de cultivo del transformante TCRT3 34 (complementado con los genes *cefR* y *cefT3*), de la cepa interrumpida TDR 34 y de la cepa parental C10, se valoró mediante el bioensayo siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 7 de Materiales y Métodos. El crecimiento se obtuvo como peso seco y permitió expresar la producción de cefalosporinas de forma específica (μg cefalosporinas/mg peso seco)

El análisis de los resultados del bioensayo muestra que en el transformante TCRT3 34 se restaura la producción de cefalosporinas expresada tanto de forma volumétrica (Figura 3.36 B)

como específica (Figura 3.36 C). Además, el perfil de crecimiento del transformante TCRT3 34 es idéntico al de la cepa parental C10 (Figura 3.36 A).

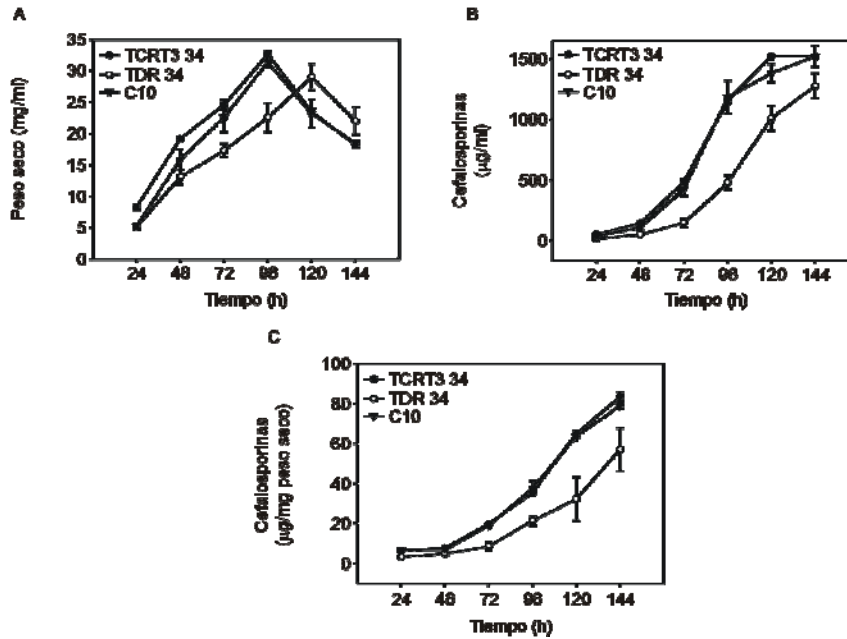


Figura 3.36. Curva de crecimiento y de producción de cefalosporinas en el transformante complementado en *trans* con los genes *cefR* y *cefT3*. (A) Curva de crecimiento expresada como peso seco. (B) Producción volumétrica de cefalosporinas. (C) Producción específica de cefalosporinas.

10.4.2.- Análisis mediante HPLC de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales extracelulares en el transformante TCRT3 34.

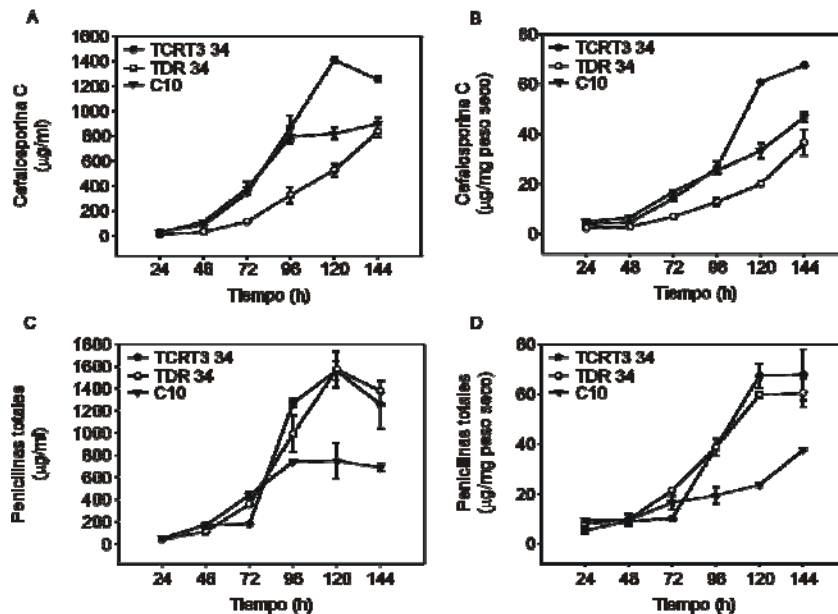


Figura 3.37. Análisis mediante HPLC de la producción extracelular de cefalosporina C y penicilinas totales (IPN + PenN) en el transformante complementado con los genes *cefR* y *cefT3*, en el transformante interrumpido TDR 34 y en la cepa parental C10. (A) Producción volumétrica de CPC. (B) Producción específica de CPC. (C) Producción volumétrica de penicilinas totales. (D) Producción específica de penicilinas totales.

El análisis mediante HPLC de los caldos de cultivo del transformante TCRT3 34 (complementado con los genes *cefR* y *cefT3*), la cepa interrumpida TDR 34 y la cepa parental C10 apoya los resultados del bioensayo. Las gráficas correspondientes a la producción de CPC y penicilinas totales muestran que se produce un incremento tanto en la síntesis de CPC [volumétrica (Figura 3.37 A) y específica (Figura 3.37 B)] como en la de penicilinas totales [volumétrica (Figura 3.37 C) y específica (Figura 3.37 D)] en el transformante TCRT3 34 con respecto a los niveles de la cepa parental C10.

10.5.- El transformante TDR 34 secreta un pigmento amarillento al medio de cultivo.

Durante el proceso experimental en el transcurso de las fermentaciones, (en condiciones de producción de CPC) se observó que a partir de las 120 horas de fermentación los caldos de cultivo presentaban un color amarillento en el transformante interrumpido TDR 34 (Figura 3.38, número 3). Esta coloración no está presente en los caldos de cultivo de la cepa parental (Figura 3.38, número 4) ni en la cepa complementada *in trans* con los genes *cefR* y *cefT3* (TCRT3 34, Figura 3.38, número 1). Por el contrario, dicha coloración sigue presente en el transformante complementado únicamente con el gen *cefR* (TCR 42, Figura 3.38, número 2). Por tanto, la interrupción del gen *cefR* desencadena o incrementa la secreción de un pigmento amarillento que no se ha identificado previamente en *A. chrysogenum*. De alguna manera el gen *cefR* regula la producción de este pigmento amarillento.

Por otro lado, cuando se cuantificó la producción del pigmento amarillento mediante la medida de la densidad óptica se pudo comprobar que existía una máxima absorbancia en torno a 368 nm, lo cual hacía suponer que tal vez el tipo de pigmento amarillento puede ser algún tipo de carotenoide (Codner y Polatt, 1959). De acuerdo con estos datos (Figura 3.38 B) la producción del pigmento amarillento es incluso ligeramente superior en el transformante TCR 42 que en el transformante interrumpido TDR 34, siendo muy parecidos los valores de densidad óptica obtenidos para el caso del transformante TCRT3 34 a los de la cepa parental C10.

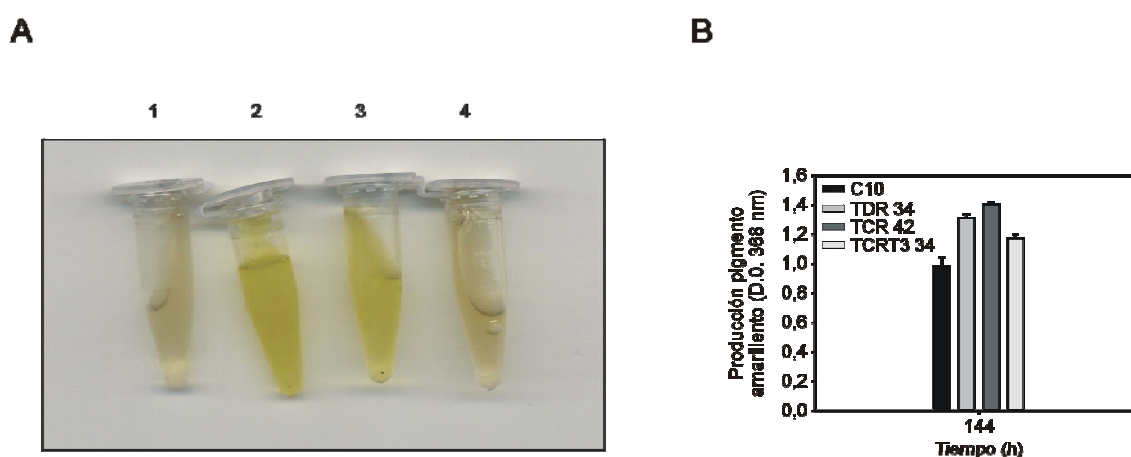


Figura 3.38. (A) Pigmentación de los caldos de cultivo tras 144 horas de fermentación del transformante TCRT3 34 (1), TDR 34 (3), TCR 42 (2) y la cepa parental C10 (4). (B) Cuantificación de la producción del pigmento amarillento a las 144 horas de fermentación mediante la medida de la densidad óptica a 368 nm en los transformantes TDR 34, TCR 42, TCRT3 34 y la cepa parental C10.

Para determinar la longitud de onda a la cuál era máxima la absorbancia del pigmento amarillento y dado que no se disponían de datos previos en la bibliografía, se realizó un espectro de la absorbancia a las longitudes de onda entre 300 y 500 nm al sospecharse que el pigmento producido puede ser algún tipo de carotenoide. Cuando se realizó este espectro (Figura 3.39) se observó que el perfil obtenido en el caso de la cepa parental C10 y el transformante TCRT3 34 era muy similar. Sin embargo, el perfil de dicho espectro en el caso de los transformantes TDR 34 y TCR 42 que presentan una mayor secreción del pigmento amarillento a los caldos de cultivo es muy parecido entre ellos y claramente diferente al del transformante TCRT3 34 y la cepa parental C10.

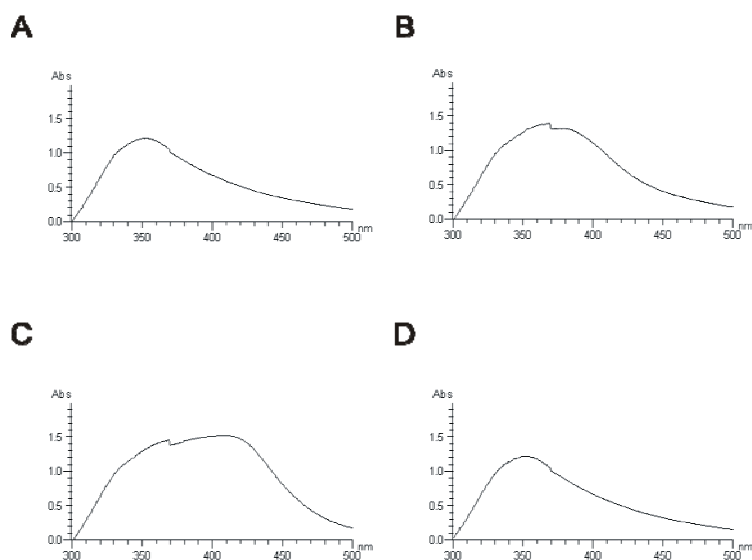


Figura 3.39. Espectro de absorbancia entre 300 y 500 nm de longitud de onda de los caldos de cultivo de la cepa parental C10 (A), el transformante TDR 34 (B), el transformante TCR 42 (C) y el transformante TCRT3 34 (D).

10.6.- La morfología de la colonia del transformante TDR 34 es muy diferente a la de la cepa parental C10.

Teniendo en cuenta que la interrupción del gen *cefR* provoca un enlentecimiento en el crecimiento y una mayor secreción de un pigmento amarillento a los caldos de cultivo, llevamos a cabo un estudio de la morfología de la colonia del transformante interrumpido TDR 34, el transformante TCR 42, el transformante TCRT3 34 y la cepa parental C10. Para ello se crecieron colonias de estos transformantes junto con la cepa parental C10 en medio MCFA a 28 °C durante 5 días. Los resultados (Figura 3.40) mostraron que la colonia del transformante interrumpido TDR 34 y del transformante TCR 42 eran más rugosas, de menor tamaño y presentaban una mayor pigmentación amarillenta con respecto a la observada en la cepa parental C10. Por otro lado, la colonia del transformante complementado TCRT3 34 era de mayor tamaño que la de la cepa parental C10 y con una menor pigmentación amarillenta comparada con los transformantes TDR 34 y TCR 42.

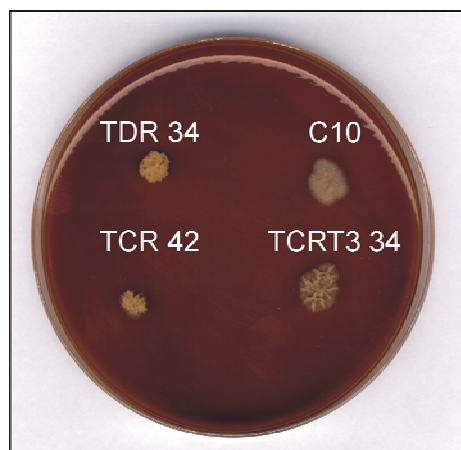


Figura 3.40. Morfología de la colonia del transformante interrumpido TDR 34, el transformante complementado con el gen *cefR* TCR 42, el transformante complementado con los genes *cefR* y *cefT3* TCRT3 34 y la cepa parental C10.

11.- SOBREEXPRESIÓN DEL GEN *cefR* EN *A. chrysogenum*.

Para determinar el efecto de la sobreexpresión del gen *cefR* sobre la ruta de biosíntesis de cefalosporina C, se llevó a cabo el incremento de su expresión mediante el uso de un promotor de expresión constitutiva. Así de esta manera se evitan posibles fenómenos de autorregulación del propio gen *cefR* a partir de su promotor o fenómenos de “quelling” (Nakayashiki, 2005). Con este objetivo, se construyó el plásmido pSCR (Figura 3.40 A) en el cual el gen *cefR* se encuentra bajo el control del promotor de expresión constitutiva de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans* y el terminador del gen *cyc1* de *S. cerevisiae* (apartado 2 de Materiales y Métodos).

11.1.- Transformación, selección y análisis genético de los transformantes.

Con el fin de incrementar la expresión del gen *cefR*, se cotransformaron protoplastos de la cepa *A. chrysogenum* C10 con los plásmidos integrativos pSCR (Figura 2.6) y pJL43 (que otorga resistencia a fleomicina). Se obtuvieron 60 transformantes resistentes a fleomicina. A partir de estos transformantes se seleccionaron aleatoriamente 8 que fueron utilizados para analizar, mediante PCR, la correcta integración del casete de expresión de 3,3 kb (comprende el promotor del gen *gpd*, el gen *cefR* y el terminador del gen *cyc1*). En este caso, se decidió no utilizar el análisis de hibridación de Southern puesto que los tamaños de la banda correspondiente al *cefR* exógeno y al *cefR* endógeno eran prácticamente idénticos, siendo muy difícil ver la correcta integración del casete de sobreexpresión. El ADN total de estos transformantes junto con el de la cepa parental C10 fue extraído y utilizado como molde para realizar una PCR utilizando los oligonucleótidos GPDA-F (5'-CGGAGAGACGGACGGACGCAG-3') y TcycR (5'-GAAAAGGGGGACGGATCTCCG-3') y la enzima la GoTaq ADN polimerasa (*Promega*). Como control positivo se utilizó el ADN del plásmido pSCR (Figura 3.41 B, carril 10) y como control negativo el ADN total de la cepa parental C10 (Figura 3.41 B, carril 1).

Se obtuvieron 3 transformantes positivos [Figura 3.41 B, carriles 2 (TSR 4), 4 (TSR 10) y 9 (TSR 63)] que únicamente amplificaban la banda de 3,3 kb correspondiente a la integración correcta del casete de sobreexpresión del gen *cefR*. El tamaño de dicha banda era idéntico al del producto amplificado utilizando como ADN molde el plásmido pSCR (Figura 3.41, carril 10). Ninguna banda de amplificación se observó utilizando el ADN de la cepa parental C10 como molde (Figura 3.41 B, carril 1). Estas bandas fueron secuenciadas comprobando la correcta integración del casete de sobreexpresión del gen *cefR* en los transformantes TSR.

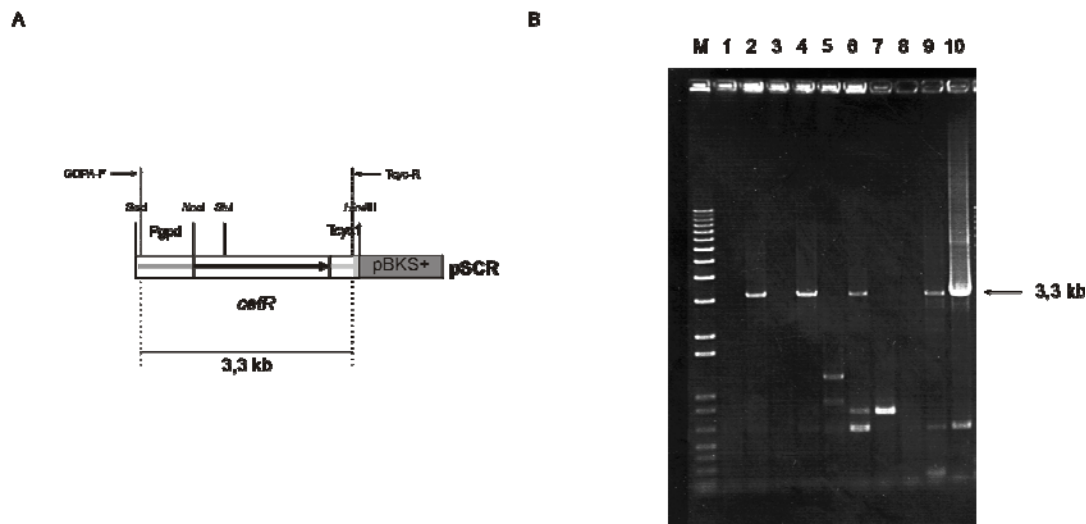


Figura 3.41. Análisis de la integración del casete de sobreexpresión del gen *cefR* en los transformantes TSR mediante PCR. (A) Mapa físico del plásmido pSCR. Se indican los oligonucleótidos utilizados en la PCR y el tamaño de la banda amplificada. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (teñido con bromuro de etidio) de la PCR realizada con el ADN total de la cepa parental C10 (carril 1) y de los transformantes TSR 4 (carril 2), TSR 5 (carril 3), TSR 10 (carril 4), TSR 33 (carril 5), TSR 55 (carril 6), TSR 74 (carril 7), TSR 91 (carril 8), TSR 63 (carril 9) y el plásmido pSCR (carril 10). M: marcador de peso molecular 1 kb ladder (*Invitrogen*).

11.2.- Análisis de la producción de cefalosporinas en los transformantes TSR.

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión del gen *cefR* sobre la ruta de biosíntesis de cefalosporina C, se escogieron 2 transformantes (TSR 10 y TSR 63) que fueron fermentados en condiciones de producción de cefalosporinas junto con la cepa parental C10 como control. Se realizaron tres fermentaciones por triplicado.

Las fermentaciones se realizaron siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 6 de Materiales y Métodos. Se tomaron muestras cada 24 horas hasta las 144 horas de fermentación.

11.2.1.- Estudio de la producción de cefalosporinas en los transformantes TSR mediante bioensayo.

Los caldos de cultivo procedentes de las diferentes fermentaciones de las cepas TSR y C10, fueron analizados mediante bioensayo (apartado 7 de Materiales y Métodos) para determinar la producción de cefalosporinas totales. Además, se determinó el crecimiento como peso seco, permitiendo expresar la producción de cefalosporinas de forma específica.

Los resultados de las fermentaciones mostraron un claro incremento de la producción de cefalosporinas en los transformantes TSR con respecto a la cepa control (C10). Este incremento fue de un 80 % a las 144 horas de fermentación (Figura 3.42 B y C). Si bien el crecimiento de los transformantes TSR no se encuentra alterado y es muy similar al de la cepa parental, el punto máximo de crecimiento lo alcanzan a las 96 horas y no a las 72 horas como la cepa parental C10 (Figura 3.41 A)

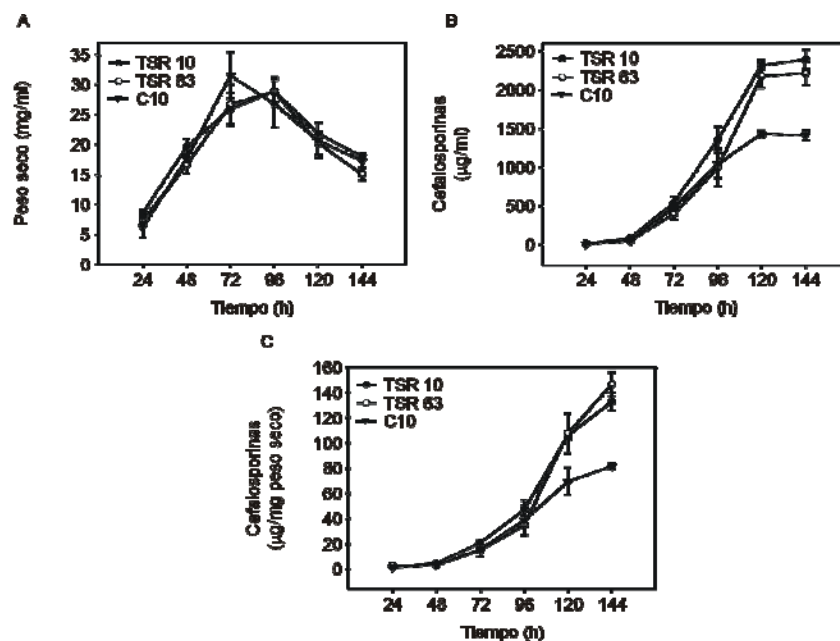


Figura 3.42. Producción de cefalosporinas en los transformantes TSR. (A) Curva de crecimiento expresada como peso seco. (B) Producción volumétrica de cefalosporinas. (C) Producción específica de cefalosporinas.

11.2.2.- Análisis mediante HPLC de la producción de cefalosporina C y penicilinas totales extracelulares en los transformantes TSR.

El análisis mediante HPLC de los caldos de cultivo de los transformantes TSR 10 y TSR 63 junto con el de la cepa parental C10, confirmó los resultados del bioensayo (Figura 3.43). De esta manera, los resultados mostraron un incremento de la producción tanto de CPC (Figura 3.43 A y B) como de DAC (Figura 3.43 E y F) en los transformantes TSR. Dicho incremento fue máximo a las 144 horas de fermentación y de en torno a un 80 % para CPC y de un 60 % para DAC. Además la producción de penicilinas totales se ve disminuída en los transformantes TSR a lo largo de la fermentación (Figura 3.43 C y D), siendo a las 144 horas un 40 % menor que en la cepa parental C10. La identificación del isómero de penicilina (IPN o PenN) presente en el caldo de cultivo permitió determinar que esta disminución era sólo de PenN a partir de las 96 horas de fermentación. En tiempos anteriores a 96 horas es una mezcla de ambos (IPN + PenN).

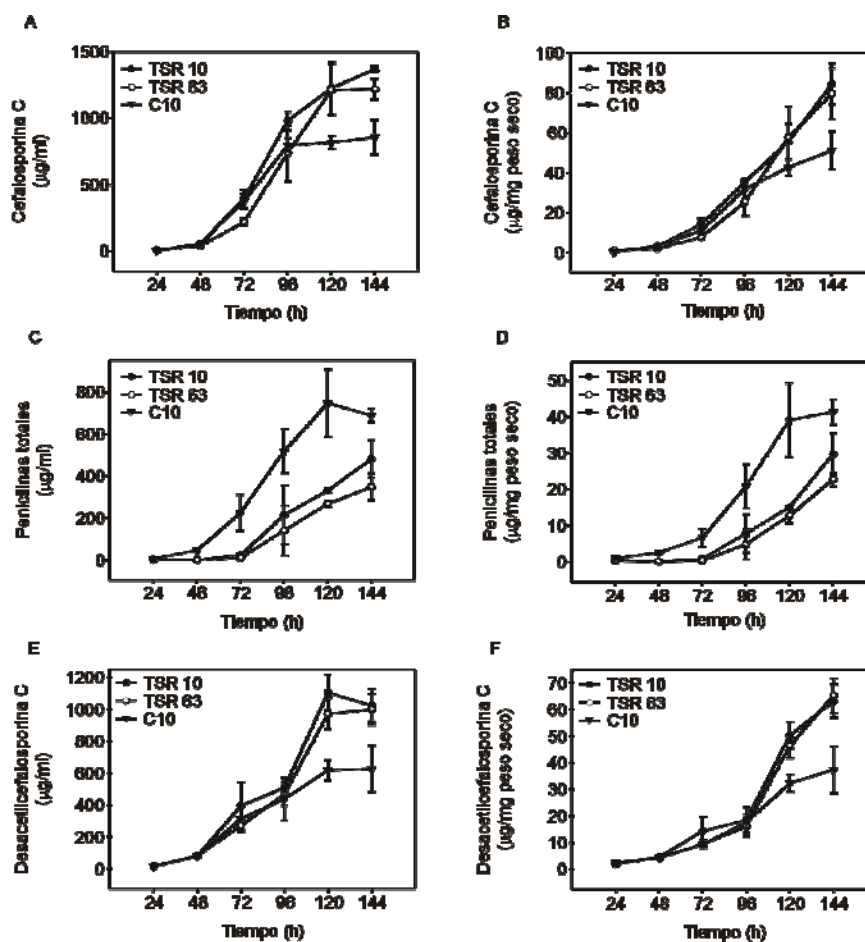


Figura 3.43. Análisis mediante HPLC de la producción extracelular de CPC, DAC y penicilinas totales (IPN + PenN) en los caldos de cultivo de los transformantes TSR y la cepa parental C10. (A) Producción volumétrica de CPC. (B) Producción específica de CPC. (C) Producción volumétrica de penicilinas totales. (D) Producción específica de penicilinas totales. (E) Producción volumétrica de DAC. (F) Producción específica de DAC.

11.2.3.- El transformante TSR 63 posee una concentración intracelular de penicilina N similar a la cepa parental C10.

El análisis para determinar la concentración de penicilinas totales intracelulares a las 96, 120 y 144 horas de fermentación en el transformante TSR 63 y la cepa parental C10 se realizó siguiendo las instrucciones descritas en el apartado 21 de Materiales y Métodos. Nuevamente, la derivatización con GITC de las muestras permitió comprobar que el isómero presente era penicilina N en todos los tiempos de fermentación analizados. Los resultados del análisis muestran que la concentración intracelular de penicilina N apenas varía con respecto a la cepa parental C10 (Figura 3.44) en todos los tiempos de fermentación analizados. Es decir el aumento de la producción de cefalosporina C y la disminución de la concentración de penicilina N extracelular (Figura 3.43) se debe a un mayor flujo de intermediarios a través de la vía sin alteración significativa de la concentración intracelular de penicilina N.

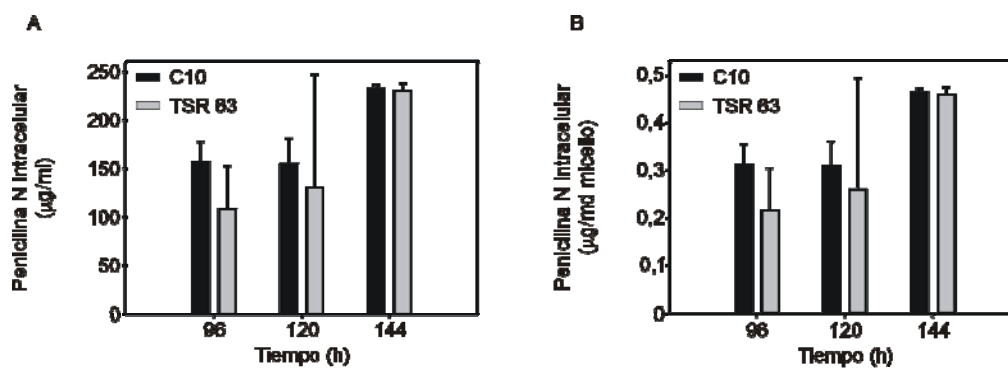


Figura 3.44. Análisis mediante HPLC de la cantidad intracelular de penicilina N a las 96, 120 y 144 horas de fermentación en el transformante TSR 63 y en la cepa parental C10. Los valores representan la media de dos fermentaciones independientes. (A) Concentración volumétrica de penicilina N intracelular. (B) Concentración específica de penicilina N.

SECCIÓN III: EL GEN *cefR* COMO UN MODULADOR DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE SECRECIÓN *cefM* Y *cefT*.

12.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE BIOSÍNTESIS Y DE SECRECIÓN DE LA RUTA DE CEFALOSPORINA C EN LAS CEPAS C10, TSR 63 Y TDR 34 DE *Acremonium chrysogenum* MEDIANTE NORTHERN.

Una vez analizado el efecto que tiene tanto la interrupción como la sobreexpresión del gen *cefR* sobre la ruta biosintética de CPC en *A. chrysogenum*, se decidió estudiar el perfil de expresión de este gen en la cepa parental, en TDR 34 (interrumpido en el gen *cefR*) y en TSR 63 (sobreexpresado en el gen *cefR*). Por otro lado, teniendo en cuenta los efectos de la interrupción y la sobreexpresión del gen *cefR* sobre los niveles extracelulares de penicilinas y CPC, se decidió estudiar la expresión de los genes de secreción *cefT* (Ullán *et al.*, 2002a), *cefM* (Teixeira *et al.*, 2009), y *cefT3* (Ullán R.V., Teixeira F. y Martín J.F., resultados no publicados) en los transformantes anteriormente mencionados. Además en este estudio de expresión se incluyeron los genes biosintéticos *pcbC* y *cefEF*. Como control para normalizar los datos, se utilizó el gen *actA* que codifica la γ -actina que se expresa constitutivamente en *A. chrysogenum* (Díez *et al.*, 2000).

12.1.- Análisis de la expresión de los genes *pcbC*, *cefEF*, *cefT*, *cefM*, *cefT3* y *cefR* en los transformantes TDR 34, TSR 63 y la cepa parental C10 mediante northern.

Para realizar este estudio de expresión, se crecieron los transformantes TDR 34 y TSR 63 junto con la cepa parental C10 en condiciones de producción de cefalosporinas. Se recogió el micelio de los transformantes y la cepa parental C10 a las 48, 72 y 96 horas de fermentación. A continuación, se obtuvo el ARN total de los transformantes y de la cepa C10 utilizando el método descrito en el apartado 15.1 de Materiales y Métodos. Una vez obtenido dicho ARN total se utilizó para realizar un estudio de la expresión de los genes mediante hibridación de northern (Figura 3.41) y como sondas se utilizaron los siguientes fragmentos lineales de ADN:

- **Sonda *pcbC*:** fragmento de ADN de 350 pb obtenido mediante PCR con los oligonucleótidos pC-AC-F y pC-AC-R (ver apartado 3.2 de Materiales y Métodos).
- **Sonda *cefEF*:** fragmento de ADN *NcoI* de 360 pb obtenido del plásmido *pcefEF-RNAi* (Ullán *et al.*, 2008a).
- **Sonda *cefR*:** fragmento de ADN de 622 pb mediante PCR de ADN total de *A. chrysogenum* C10 con los oligonucleótidos RF6 y R4R (ver apartado 3.2 de Materiales y Métodos).
- **Sonda *cefT*:** fragmento de ADN *XhoI-HindIII* de 1400 pb obtenido del plásmido *pORF7* (Ullán *et al.*, 2002a).
- **Sonda *cefM*:** fragmento de ADN *SalI* de 608 pb obtenido del plásmido *pcefT2* (Martínez-Guerra, 2005).
- **Sonda *cefT3*:** fragmento de ADN *EcoRI* de 1079 pb obtenido del plásmido *pDT3.1* (Ullán RV, Teixeira F, Martín JF, resultados no publicados).
- **Sonda *actA*:** fragmento de ADN de 657 pb obtenido mediante PCR de ADN total de *A. chrysogenum* C10 utilizando los oligonucleótidos *actA-F* y *actA-R* (ver apartado 3.2 de Materiales y Métodos).

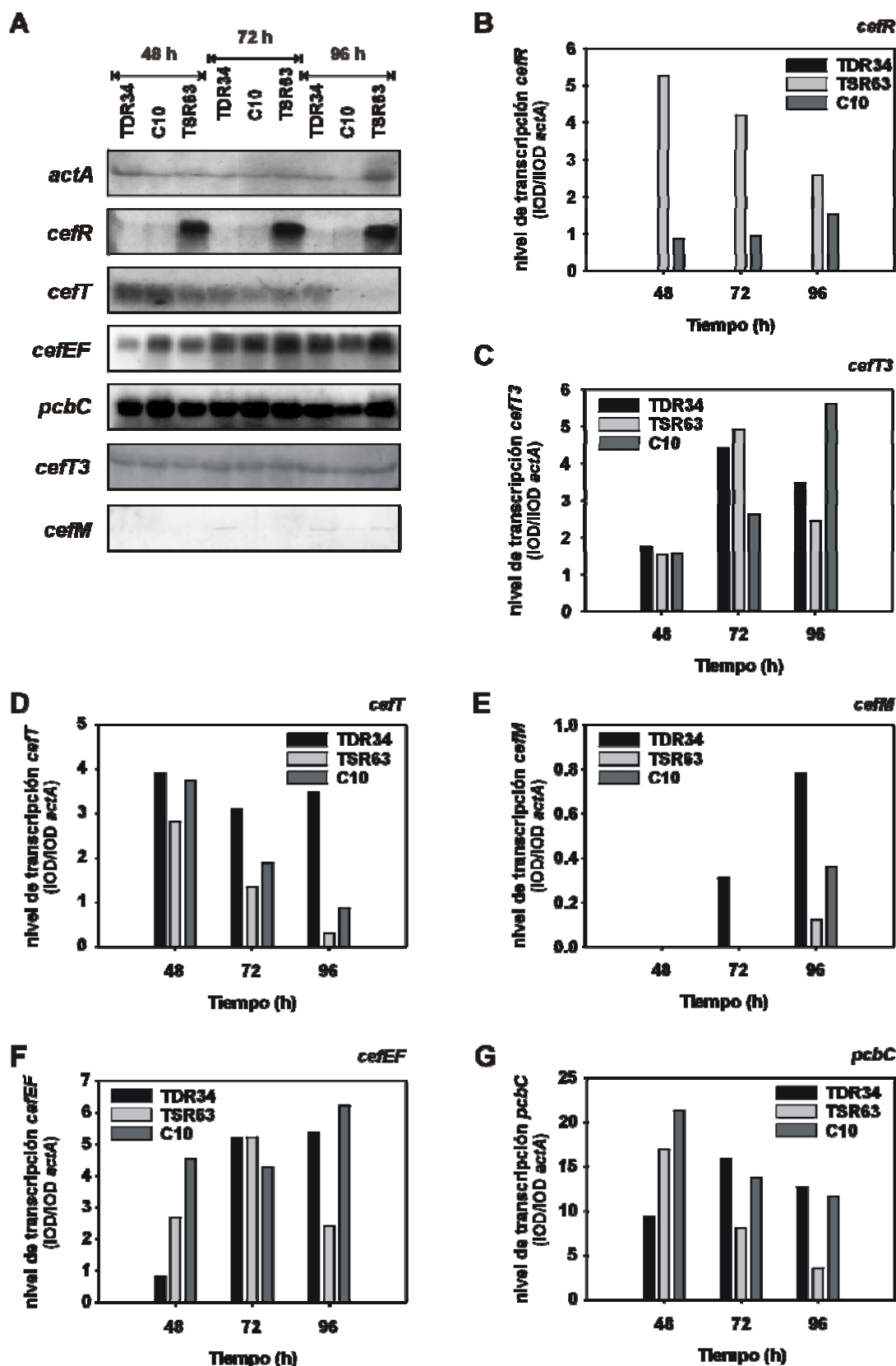


Figura 3.45. Estudio de la expresión de genes de biosíntesis y de secreción en los transformantes TDR 34 y TSR 63 junto con la cepa parental C10 mediante hibridación de northern. La cuantificación de las bandas de hibridación se realizó midiendo la densidad óptica integral (IOD) utilizando el programa Gel-Pro Analyzer 3.1 (*Media Cybernetics*) y normalizándola con los valores obtenidos de la γ -actina. (A) Hibridación de northern del ARN total de los transformantes TDR 34 y TSR 63 junto con la cepa parental C10 con sondas de ADN correspondientes a los genes *actA*, *cefR*, *cefT*, *cefT3* y *cefEF*, *pcbC* y *cefM* a 48, 72 y 96 horas de fermentación. Niveles de expresión del gen *cefR* (B), *cefT3* (C), *cefT* (D), *cefM* (E), *cefEF* (F) y *pcbC* (G) en las cepas TDR 34, TSR 63 y C10.

12.2.- El análisis de northern confirmó la ausencia de expresión del gen *cefR* en el transformante TDR 34 junto con un mayor nivel de transcrito en el transformante TSR 63.

Los resultados del análisis de northern (Figura 3.45 A y B) confirmaron que efectivamente el gen *cefR* no se expresa en el transformante interrumpido TDR 34 y que tiene un mayor nivel de expresión en el transformante sobreexpresado TSR 63. Además el nivel de expresión en la cepa parental C10 es bajo y aumenta ligeramente con el tiempo de fermentación (Figura 3.45 B). De esta forma, se demostró que tanto la inactivación como la sobreexpresión del gen *cefR* eran correctas (Figura 3.45 B).

12.3.- La proteína CefR actúa como un represor de los genes de secreción *cefT* y *cefM*.

El análisis de la expresión de los genes de secreción *cefT* y *cefM* en los transformantes TDR 34 y TSR 63, demostraron que el gen *cefR* regula de manera negativa la expresión de estos dos genes (Figura 3.45 A, D y E). Así la inactivación del gen *cefR* provoca una mayor expresión de los genes de secreción *cefT* (Figura 3.45 D) y *cefM* (Figura 3.45 E) sobre todo a 96 horas de fermentación. Por el contrario, la sobreexpresión del gen *cefR* reprime la expresión de los genes de secreción *cefT* (Figura 3.45 D) y *cefM* (Figura 3.45 E), siendo más evidente dicha represión a 96 horas de fermentación.

Igualmente, los resultados del análisis de northern demostraron que la expresión del gen *cefM* es muy baja en la cepa parental C10 (Figura 3.45 E), siendo únicamente detectable a las 96 horas de fermentación. Además el gen *cefT* tiene una mayor expresión que el gen *cefM*, disminuyendo dicha expresión a medida que transcurre la fermentación (Figura 3.45 D).

12.4.- La expresión del gen *cefT3* se modifica de igual forma tanto por la interrupción como por la sobreexpresión del gen *cefR*.

Los resultados del análisis de la expresión del gen *cefT3* (Figura 3.45 C) mostraron que dicha expresión es mayor que la de los otros dos genes que codifican los transportadores CefM y CefT (Figura 3.45 E y D). En la cepa parental C10 la expresión del gen *cefT3* aumenta con el tiempo de fermentación, siendo máxima a las 96 horas. En la Figura 3.44 B se puede observar que a las 48 horas la expresión del gen *cefT3* es similar en las tres cepas estudiadas. La interrupción y la sobreexpresión del gen *cefR* provocan efectos prácticamente idénticos. En un primer lugar se puede observar un incremento de la expresión del gen *cefT3* a las 72 horas tanto en la cepa interrumpida como en la sobreexpresada. Posteriormente la expresión del gen *cefT3* disminuye ligeramente, aunque prácticamente se mantiene en la cepa interrumpida. Sin embargo, en el transformante sobreexpresado TSR 63 se produce una disminución importante en la expresión del gen *cefT3*.

12.5.- El cambio en el nivel de expresión del gen *cefR* afecta indirectamente al nivel de transcripción de los genes de biosíntesis *pcbC* y *cefEF*.

Cuando se analizó el nivel de expresión de los genes de biosíntesis *pcbC* y *cefEF* (Figura 3.45 A, G y F) se comprobó, en primer lugar, que el nivel de expresión es mayor que el de los genes de secreción analizados anteriormente y mucho más elevado en el caso del gen *pcbC* (Figura 3.45 G). Asimismo se demostró que la expresión de estos genes varía con el tiempo de fermentación.

Los efectos observados en los cambios de expresión de estos genes biosintéticos en la cepa interrumpida TDR 34 y sobreexpresada TSR 63 en el gen *cefR* pueden ser consecuencia de las alteraciones en los niveles de los intermediarios de la ruta, siendo improbable que el gen *cefR* actúe directamente sobre estos genes.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1.- CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *cefM* DE *Acremonium chrysogenum*.

Los genes de la ruta de biosíntesis de cefalosporinas han sido clonados, secuenciados y caracterizados (Samson *et al.*, 1985, 1987; Gutiérrez *et al.*, 1991b; Gutiérrez *et al.*, 1992; Ullán *et al.*, 2002b, Martín *et al.*, 2004), así como las enzimas que estos genes codifican (Dotzlaf y Yeh, 1987; Aharonowitz *et al.*, 1992; Zhang y Demain, 1992; Schofield *et al.*, 1997; Kreisberg-Zakarin *et al.*, 1999; Velasco *et al.*, 1999; Martín, 2000; Lejon *et al.*, 2008). Los genes biosintéticos se agrupan en dos agrupaciones (clusters): el “cluster” temprano, en el que se incluyen los genes *pcbAB*, *pcbC*, *cefD1* y *cefD2*, y el “cluster” tardío que agrupa a los genes *cefEF* y *cefG* (Gutiérrez *et al.*, 1999; Ullán *et al.*, 2002b). Sin embargo, poco se sabe acerca de la secreción del producto final de la ruta, CPC, así como de los diferentes intermediarios de la misma. Normalmente los genes de secreción están unidos a los genes biosintéticos, situándose en la misma agrupación génica (Martín y Liras, 1989). Las enzimas biosintéticas forman los diferentes intermediarios y el producto final CPC, mientras que las proteínas transportadoras se encargan de la secreción del mismo (Martín y Liras, 1989; Martín *et al.*, 2005). Hasta la fecha el único caso descrito de proteínas implicadas en la secreción de β -lactamas es la proteína CefT que presenta homología con la superfamilia MFS y parece estar implicada en la secreción de DAC y penicilinas hidrofílicas, como se ha demostrado recientemente tras su expresión heteróloga en *P. chrysogenum* (Ullán *et al.*, 2008b). El hecho de que su inactivación no modificara la producción de cefalosporinas, hizo pensar en la existencia de otros sistemas de secreción adicionales y quizás redundantes, que colaborarían en dicho proceso de secreción (Ullán *et al.*, 2002a).

Por este motivo, se buscaron posibles marcos de lectura abiertos en la región “aguas abajo” del gen *cefD1* que codificaran proteínas transportadoras implicadas en la secreción de los diferentes intermediarios y/o del producto final de la ruta biosintética de CPC en *A. chrysogenum*. Siguiendo esta estrategia Martínez-Guerra (2005) clonó y secuenció el gen *cefT2* a partir de una genoteca de ADN genómico de *A. chrysogenum* C10 ATCC 48272 (C10) construida en el vector fágico λ -EMBL3-*ble* (Gutiérrez, 1994). El gen *cefT2* presenta un marco de lectura abierto de 1620 pb interrumpido por la presencia de 3 intrones. Posteriormente, como resultado del trabajo experimental de esta tesis el gen *cefT2* se renombró como *cefM* y está depositado en la base de datos EMBL con el número de acceso AM231815.

2.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA PROTEÍNA DEDUCIDA DEL GEN *cefM*.

El gen *cefM* codifica una proteína de 482 aminoácidos con un peso molecular deducido de 52,23 kDa. La proteína CefM presenta una fuerte homología a lo largo de toda su secuencia con transportadores de secreción de múltiples drogas pertenecientes a la superfamilia MFS, cuyos porcentajes de aminoácidos idénticos aparecen reflejados en la tabla 4.1. El bajo porcentaje de aminoácidos idénticos (32-49 %) indica especificidades diferentes en cuanto al sustrato transportado (Saier *et al.*, 1999).

		CefM I	CefT II	MFS III	MFS IV	MFS V	MFS VI
<i>A. chrysogenum</i>	CefM (I)		31,9	48,7	48,9	47,8	46,4
<i>A. chrysogenum</i>	CefT (II)			32,5	32,9	31,4	31,2
<i>P. chrysogenum</i>	MFS(III)				56,1	54,7	54,7
<i>N. fischeri</i>	MFS (IV)					95,0	77,2
<i>A. fumigatus</i>	MFS (V)						73,9
<i>A. clavatus</i>	MFS (VI)						

Tabla 4.1. Porcentaje de aminoácidos idénticos entre la proteína deducida del gen *cefM* de *A. chrysogenum* y proteínas de la superfamilia MFS de varios hongos filamentosos. Se compararon la proteína CefM de *A. chrysogenum* (AM231815) con proteínas de tipo MFS de *P. chrysogenum* (AM920436), *N. fischeri* (XP_001258746), *A. fumigatus* (XP_748433), *A. clavatus* (XP_001273827) y la proteína CefT de *A. chrysogenum* (AJ487683).

La comparación de la proteína CefM con diferentes proteínas de la superfamilia MFS mediante el algoritmo “Clustal X” (DNASTar. Lasergene v7.1.0. Proper-Edge) permitió construir el árbol filogenético presentado en la Figura 4.1. Los resultados mostraron que la proteína CefM se parece más a las proteínas de tipo MFS de diferentes hongos filamentosos (en torno a un 50 % de similitud), que a la proteína CefT con la que sólo muestra un 32 % de similitud. Estos datos sugieren que la proteína CefM puede transportar sustratos diferentes al de la proteína CefT, ya que aunque ambas proteínas pertenecen a la misma familia dentro de la misma especie, el grado de similitud es más bajo que al encontrado con otras especies, que parecen tener transportadores con función específica semejante a la de CefM.

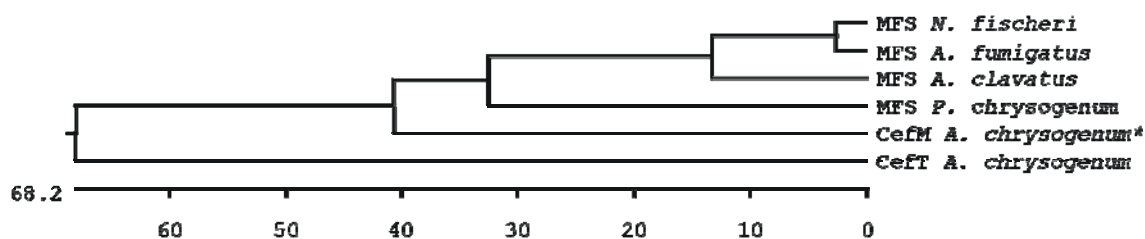


Figura 4.1. Árbol filogenético entre la proteína CefM (*) y proteínas de tipo MFS de diferentes hongos filamentosos. Las secuencias aminoacídicas fueron comparadas mediante el algoritmo ClustalX (DNASTar. Lasergene v7.1.0. Proper-Edge).

2.1.- Composición aminoacídica de la proteína CefM.

El análisis de la secuencia aminoacídica y la estructura primaria de la proteína CefM se realizó mediante la herramienta bioinformática “ProtParam” del servidor ExPASy (us.expasy.org/tools). Dicho programa analiza la secuencia primaria de una proteína y proporciona diversos datos acerca de la misma. En el caso de la proteína CefM los datos más relevantes aportados por el programa se reflejan en la siguiente tabla:

Características de la proteína CefM	
Número de residuos	482
Peso molecular (Da)	52224,6
pI teórico	8,97
Nº de residuos con carga positiva (Arg + Lys)	33
Nº de residuos con carga negativa (Asp + Glu)	28
Índice de inestabilidad	32,59
Índice alifático	113,98
Grado medio de hidrofobicidad	0,666

Tabla 4.2. Parámetros deducidos a partir de la secuencia primaria de la proteína CefM.

Cuando se estudió la composición aminoacídica de la proteína CefM se obtuvo que los aminoácidos más abundantes eran leucina (12,9 %), alanina (11,4 %), glicina (8,9 %) y valina (7,5 %). Todos estos aminoácidos son de naturaleza hidrofóbica, lo cual denota que la proteína CefM es bastante hidrofóbica, lo que está en consonancia con el hecho de que se trate de una proteína de membrana.

2.2.- Predicción de la estructura secundaria y terciaria de la proteína CefM.

Otro aspecto quizás más importante incluso que la secuencia primaria de una proteína es la estructura terciaria (tridimensional) que adopta dicha proteína en el espacio, la cual depende en gran medida de su estructura secundaria. Existen diversos programas informáticos que permiten obtener la estructura secundaria deducida a partir de la secuencia aminoacídica de una proteína (MultiPredict <http://kestrel.ludwig.ucl.ac.uk/zpred.html>; PSA <http://bmerc-www.bu.edu/psa/> y SSPRED <http://coot.embl.de/~fmilpetz/SSPRED/sspred.html> entre otros. En este caso, la proteína CefM fue analizada empleando la herramienta bioinformática “Psi-Pred” <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>. Este programa permite determinar, a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína, la estructura secundaria que ésta adopta en el espacio, proporcionando para cada aminoácido la fiabilidad de dicha predicción. En la figura 4.2 se muestra la estructura secundaria deducida para la proteína CefM. Los resultados mostraron que la proteína CefM está constituida básicamente por hélices α .



Figura 4.2. Predicción de la estructura secundaria de la proteína CefM de *A. chrysoyenum* mediante Psi-Pred. Los cilindros indican regiones dispuestas en hélice α , mientras que las flechas se refieren a regiones dispuestas en láminas β . El término “Conf” indica la fiabilidad de la predicción de la estructura para cada aminoácido de la proteína (Conf, confianza), mientras que “Pred” (Pred, predicción) hace referencia a la estructura secundaria predicha para cada región de la proteína.

La estructura terciaria (tridimensional) de la proteína CefM se dedujo mediante comparación con las estructuras terciarias de las proteínas depositadas en las bases de datos. Para ello, se utilizó la herramienta bioinformática Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) que realiza un modelado de la estructura tridimensional de una proteína mediante el alineamiento entre secuencias y estructuras. Aquellos alineamientos significativos son seleccionados para el modelado (Arnold *et al.*, 2006). En el caso de la proteína CefM se obtuvo un modelo de la proteína empleando la región entre los residuos 46-340, obteniéndose un E-value de $8,4 \cdot 10^{-27}$ y un porcentaje de identidad del 14,6 % con la estructura 2gfpA.pbd. Dicha estructura corresponde con la proteína transportadora de múltiples drogas EmrD de *E. coli* perteneciente a la superfamilia MFS, que exporta compuestos anfipáticos a través de la membrana interna (Yin *et al.*, 2006). En la figura 4.3 se muestra un modelo hipotético de la región de la proteína CefM que comprende los residuos 46-340. Esta región está constituida por 13 hélices α .

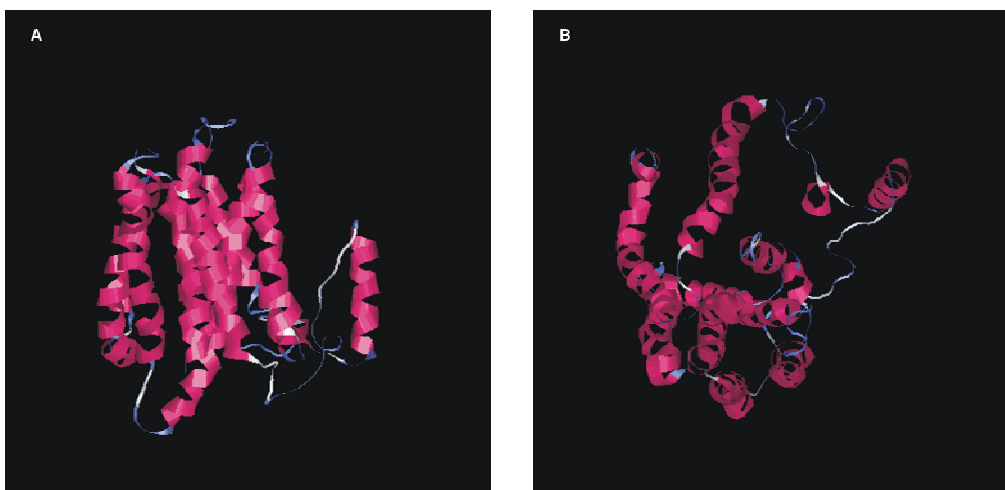


Figura 4.3. Modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína CefM de *A. chrysoenum* obtenido mediante la herramienta bioinformática Swiss Model. (A) Vista en planta de la estructura tridimensional de la proteína CefM. (B) Vista apical de la estructura tridimensional de la proteína CefM.

2.3.- Topología de la proteína CefM y estudio del perfil de hidrofobicidad.

La topología de la proteína CefM se analizó a través del estudio del perfil de hidrofobicidad utilizando el programa informático TopPred2_Topology <http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=toppred>. Dicho programa determinó la presencia de 12 segmentos transmembrana a lo largo de la proteína CefM. Además la proteína CefM parece tener los extremos carboxilo y amino terminales orientados hacia el interior de la membrana en el citoplasma, hecho característico de las proteínas MFS. En la figura 4.4 se muestra el gráfico del perfil de hidrofobicidad media de la proteína CefM.

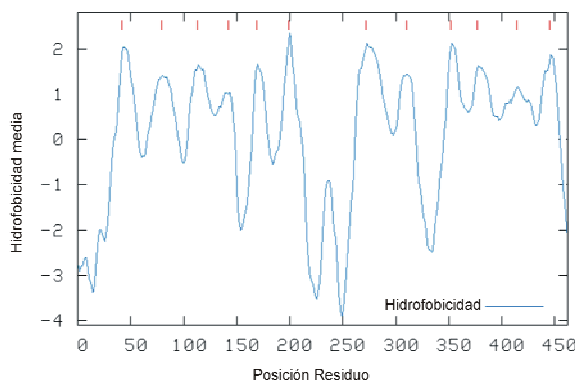


Figura 4.4. Perfil de hidrofobicidad media de la proteína CefM. Se muestran los valores de hidrofobicidad correspondientes a los 12 TMS de la proteína (señalados con líneas rojas) junto con la posición en la secuencia aminoacídica de cada segmento. La proteína presenta dos mitades de 6 TMS separados por un lazo citoplasmático.

2.4.- Motivos y dominios encontrados en la proteína CefM.

La búsqueda de dominios y motivos se realizó utilizando la herramienta bioinformática Pfam (Protein families database of alignments; <http://www.sanger.ac.uk/Pfam>). Pfam es una base de datos de familias de proteínas que permite asignar dominios a una determinada proteína basándose en las agrupaciones de estructuras secundarias que presenta. La posesión de ciertos dominios podría

dar una idea acerca de la función biológica específica de la proteína analizada. Pfam asignó a la proteína CefM un multidominio MFS-1 presente entre los residuos 49 y 422 de la proteína (E-value: 2,7.10⁻⁴⁸). Este multidominio es característico de la superfamilia de proteínas transportadoras MFS, e indica claramente que la proteína CefM puede considerarse un miembro de la superfamilia MFS.

La proteína deducida del gen *cefM* presenta los motivos conservados A, B, C, D2 y G característicos del grupo de proteínas transportadoras de la superfamilia MFS que tienen 12 segmentos transmembrana (TMS). La presencia de estos motivos y los 12 segmentos transmembrana en la proteína CefM la incluyen en la familia 3 dentro de la superfamilia MFS (Figura 4.2). Dichas proteínas actúan mediante un mecanismo de antiporte protón motriz. Las secuencias consenso de estos motivos son las siguientes:

- Motivo A: GxLaDrxGrKxxI
- Motivo B: IxxxRxxqGxgaa
- Motivo C: gxxxGPxxGGxI
- Motivo D2: IgxxxxxPvxP
- Motivo G: GxxxGPL

Asimismo el análisis bioinformático de la proteína CefM en la base de datos del PDB (Peroxisome Data Base) (<http://www.peroxisomedb.org/>) permitió determinar que si bien no presenta sitios PTS-1 (Peroxisomal Targeting Signal-1) ni PTS-2 (Peroxisomal Targeting Signal-2) de proteínas de la matriz peroxisomal, sí que presenta un posible sitio de unión a la proteína Pex19 situado entre los aminoácidos 212-221 (E-value: 0,38). Pex19 es una proteína citosólica que actúa como un receptor soluble de proteínas de membrana peroxisomal, o que colabora en la inserción de las mismas en la membrana peroxisoma (Fransen *et al.*, 2001). Se ha demostrado que el sitio de unión a Pex19p es una región conservada de 11 aminoácidos caracterizada por la presencia de aminoácidos hidrofóbicos y con carga positiva, que forman parte de una secuencia de señalización de proteínas de membrana peroxisomal de tipo I (mPTS-1). Esta mPTS-1 está asociado a uno o más segmentos transmembrana. Sin embargo, no existe una secuencia consenso definida para el sitio de unión a Pex19, sino más bien una matriz de predicción de dichos sitios (Rottensteiner *et al.*, 2004). En la figura 4.5 se muestra el resultado del alineamiento de la proteína CefM con la base de datos del PDB. El sitio probable de unión de Pex19p de la proteína CefM presenta algunos aminoácidos idénticos con los del sitio de unión a Pex19 de la proteína Pat de *S. cerevisiae*. En este microorganismo dos proteínas monoméricas Pat (Pat 1 y Pat 2) han de asociarse para constituir un transportador de tipo ABC heterodimérico que actúa como una acil-CoA “flipasa” de la membrana peroxisomal, que participa en la importación de ácidos grasos de cadena muy larga activados fuera del peroxisoma (Hetteima y Tabak, 2000).

Pat (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) 5	*** *	14
	TAQIFFLVMR	
	III I	
CefM (<i>Acremonium chrysogenum</i>) 212	ITGmFFLIAR	221

Figura 4.5. Alineamiento del sitio de unión a Pex19 de la proteína Pat de *S. cerevisiae* y la proteína CefM de *A. chrysogenum*. En mayúscula se indican los aminoácidos conservados, mientras que en minúscula se muestran los aminoácidos menos conservados. Los asteriscos indican aminoácidos idénticos.

En resumen, la proteína CefM pertenece a la superfamilia MFS y posee toda una serie de motivos conservados característicos de la misma. Es una proteína de membrana que presenta 12 segmentos transmembranales (TMS) distribuidos a lo largo de la misma. Consta de dos mitades similares con 6 TMS cada uno, separados por un gran lazo citosólico. La presencia de un posible sitio de unión a la proteína Pex19p hace pensar una probable localización en la membrana peroxisomal. En la figura 4.6 se muestra la secuencia aminoacídica de la proteína indicando los motivos conservados de la misma (A, B, C, D2 y G), los 12 TMS y el posible sitio de unión a Pex19 (residuos 212-221 de la proteína).



Figura 4.6. Secuencia aminoacídica de la proteína CefM. Se muestran los motivos conservados con su secuencia consenso, los 12 segmentos transmembrana y el sitio de unión a Pex19 (aminoácidos 212-221).

2.5.- Localización celular de la proteína CefM.

Las características de hidrofobicidad y la presencia de un sitio de unión a Pex19 en la proteína CefM hacen pensar que probablemente sea una proteína de membrana peroxisomal, en la que ejercería su función como transportador de la superfamilia MFS. Sin embargo, para determinar otras posibles localizaciones de la proteína CefM, se empleó la herramienta bioinformática Psort II Server (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/runpsort.pl>). Dicha herramienta permite realizar una predicción de la localización subcelular de la proteína analizada basándose en su secuencia aminoacídica y estudiando la localización de la proteína en diversos orgánulos. En el caso de la proteína CefM los resultados del análisis muestran que se localiza en la membrana plasmática con una probabilidad del 78,3 %, siendo improbable su localización en el retículo endoplasmático (RE, 17,4 %) o en las mitocondrias (4,3 %). Por otro lado este programa proporcionó los siguientes datos:

Características de la proteína CefM	
Péptido señal N-terminal	Ninguno
Topología de membrana	Tipo 3a. Extremos N y C terminales hacia el citoplasma
Señal de localización mitocondrial	Ninguna
Señal de localización nuclear	Ninguna
Motivo KDEL de retención en el RE	Ninguno
Señal de localización peroxisomal-1 (PTS-1)	No
Señal de localización peroxisomal-2 (PTS-2)	No
Motivos de localización vacuolar	Ninguno
Motivos de unión a ARN	Ninguno
Motivos de unión a actina tipo actinina	Ninguno
Motivos de N-miristoilación	Ninguno
Motivos de prenilación	Ninguno
Motivos de transporte al aparato de Golgi	Ninguno
Tirosinas en la cola	Ninguno
Motivos de dileucinas en la cola	Ninguno
Motivos de unión a ADN	Ninguno
Motivos de unión a proteínas ribosomales	Ninguno

Tabla 4.3. Señales y motivos de localización de la proteína CefM.

Teniendo en cuenta todos estos datos, la proteína CefM podría ser una proteína de membrana plasmática o de algún orgánulo subcelular, probablemente algún tipo de microcuerpo como peroxisomas o similar. En cuanto al compuesto que esta proteína de membrana podría estar transportando, Martínez-Guerra (2005) indicaba que podrían ser penicilinas (IPN + PenN) lo cuál es lógico al encontrarse el gen *cefM* situado junto al gen *cefD1* en el cluster temprano de biosíntesis de cefalosporinas. Sin embargo, para aclarar cuál es la función del gen *cefM*, se decidió llevar a cabo su interrupción.

3.- ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR LA INTERRUPCIÓN DEL GEN *cefM*.

El objetivo de la interrupción del gen *cefM* era determinar el papel de dicho gen en la ruta de biosíntesis de cefalosporina C. Al ser un transportador podría estar implicado en el transporte de algún intermediario de la ruta o incluso del producto final. Como ya se ha indicado, el gen *cefM* parecía estar implicado en la secreción de isopenicilina N o penicilina N hacia el exterior celular, como se deduce del efecto que tiene el incremento del número de copias de este gen en *A. chrysogenum* (Martínez-Guerra, 2005).

La técnica del doble marcador fue la elegida para la inactivación del gen *cefM* (Mansour *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 2001). Esta técnica fue puesta a punto en nuestro laboratorio para la interrupción de otros genes en *A. chrysogenum* como *mecB* (Liu *et al.*, 2001), *cefT* (Ullán *et al.*, 2002a), *cefD1* y *cefD2* (Ullán *et al.*, 2002b). Sin embargo, la interrupción génica en este hongo filamentoso es difícil de alcanzar, requiriéndose zonas de homología de unas 3 kb a ambos lados del gen a inactivar para garantizar el éxito la doble recombinación homóloga (Walz y Kück, 1993). En esta técnica el primer marcador de resistencia interrumpe el marco de lectura abierto del gen, mientras que el segundo marcador permite seleccionar únicamente aquellos transformantes en los que se haya producido un

fenómeno de doble entrecruzamiento (Liu *et al.*, 2001). Con el fin de utilizar esta técnica se construyó el plásmido pDM. Dicho plásmido contiene un fragmento de ADN de unas 5 kb en el cual se encuentra parte del gen *cefD1* y la región “aguas abajo” que incluye al gen *cefM* inactivado por el casete de resistencia a fleomicina, procedente del vector pJL43 (Gutiérrez *et al.*, 1991a). Como segundo marcador de resistencia se utilizó el casete de resistencia a higromicina B (Punt *et al.*, 1987).

Tras la transformación de protoplastos de *A. chrysogenum* C10, se seleccionaron aquellos transformantes resistentes a fleomicina y sensibles a higromicina B. La eficiencia de la interrupción del gen *cefM* fue de un 4 %. Esta eficiencia fue muy inferior a la de la inactivación del gen *cefT* (33 %), puesto que en este caso, el fragmento de ADN utilizado fue muy pequeño (de en torno a 5 kb), mientras que para el gen *cefT* el tamaño del fragmento de ADN homólogo empleado estaba en torno a 7 kb. Esto confirma que en la aplicación de esta técnica la eficiencia es mayor cuanto mayor es el fragmento de ADN homólogo utilizado en el vector de interrupción.

3.1.- El transformante interrumpido en el gen *cefM* tiene alterada la curva de crecimiento.

Cuando se determinó la curva de crecimiento del transformante interrumpido (TDM 139) como peso seco, se observó que a partir de las 72 horas de crecimiento dicha curva se encuentra alterada. La alteración es el resultado de la inexistencia de la fase de lisis característica de la cepa parental. El hecho de que la interrupción de un gen que codifica una proteína transportadora altere la diferenciación normal de un microorganismo es muy interesante aunque el mecanismo puede ser variado. En este transformante si bien se forman artrosporas (Figura 3.14) no tiene lugar la lisis normal de las mismas. De hecho, el número de artrosporas que no se fragmentan es elevado posiblemente debido a algún fallo en la maquinaria encargada de la rotura de la pared celular de las mismas.

La morfogénesis de *A. chrysogenum* es un proceso muy complejo que pasa por diferentes etapas, existiendo una clara relación entre la diferenciación morfológica y la biosíntesis de cefalosporinas (Bartoshevich, 1990). Ya ha sido descrito que la máxima síntesis de cefalosporinas coincide de manera clara con la fase de lisis del micelio (Nash y Huber, 1971), habiéndose caracterizado proteínas relacionadas con la biosíntesis de cefalosporinas implicadas en la fragmentación de las artrosporas como son los reguladores CPC1 y AcFKH1 (Schmitt *et al.*, 2004a; Hoff *et al.*, 2005). Sin embargo, es muy probable que existan muchas más proteínas implicadas aún por caracterizar que participan en dicha fragmentación.

Precisamente, la síntesis ineficiente de cefalosporinas en el transformante interrumpido (TDM 139) podría ser la causa de la alteración del crecimiento en este microorganismo. Otra opción que no se descarta puede ser que la proteína CefM interacte con alguna otra proteína que participa en la fragmentación de las artrosporas, siendo necesaria dicha interacción para que tenga lugar dicho proceso. El desconocimiento de las proteínas implicadas en la diferenciación de *A. chrysogenum* sólo nos permite especular acerca de cómo la proteína CefM participa en la

morfogénesis, siendo, probablemente, a través de una interacción indirecta, dada la conexión entre la biosíntesis de cefalosporinas y la diferenciación morfológica.

3.2.- En el transformante interrumpido en el gen *cefM* se reduce drásticamente la producción de cefalosporinas.

Una vez obtenido el transformante interrumpido en el gen *cefM* (TDM 139), era necesario estudiar el efecto que tenía dicha interrupción sobre la ruta de biosíntesis de cefalosporinas con el objeto de determinar el sustrato transportado por la proteína CefM. Para ello, el transformante interrumpido fue fermentado en condiciones de producción de cefalosporinas. Los resultados obtenidos tanto mediante bioensayo (Figura 3.3) como mediante el análisis por HPLC (Figura 3.4) mostraron una disminución drástica en la formación de cefalosporinas (CPC y DAC) tanto a nivel extracelular como intracelular. Este resultado ha permitido sugerir que la proteína CefM se encuentra en la membrana de algún orgánulo celular transportando cefalosporina C o algún intermediario de la ruta. La existencia de una síntesis residual de cefalosporinas puede deberse a la presencia de algún sistema, que de manera inespecífica y poco eficiente, permita dicha síntesis al suplir parcialmente la función de la proteína CefM.

3.3.- El transformante interrumpido acumula intracelularmente penicilina N.

Los resultados tanto del bioensayo como del análisis mediante HPLC mostraron que en el transformante interrumpido en el gen *cefM* la secreción de penicilinas está disminuida en un 91,5 % con respecto a la de la cepa parental C10 (Figura 3.4 B).

La IPN y la PenN son dos isómeros cuya diferencia radica en la disposición, L ó D respectivamente, de la cadena lateral del ácido α -aminoadípico. Por este motivo ambos compuestos coeluyen en un análisis cromatográfico convencional, por lo cuál es preciso derivatizarlos con GITC. La derivatización con GITC permite discernir entre ambos isómeros al reaccionar el grupo isotiocianato del GITC con la cadena lateral del ácido (L ó D) α -aminoadípico, formando un enlace de tipo amina secundaria (Neuss *et al.*, 1982), lo que permite su separación.

La derivatización de los caldos de cultivo tanto de la cepa parental como del transformante TDM 139 (Figura 3.5) mostró que a partir de las 96 horas la única penicilina detectada era PenN. Esta disminución en la secreción de penicilina N podía ser consecuencia de que su propia síntesis estuviera disminuída o que estuviese retenida intracelularmente en algún orgánulo. Para clarificar cuál de estas dos hipótesis era la correcta, se llevó a cabo un análisis de la cantidad y el tipo de penicilinas presentes a nivel intracelular a las 96, 120 y 144 horas. Igualmente se identificó el isómero presente (IPN, PenN o ambos). Los resultados del análisis mostraron que sólo se detecta PenN en todos los tiempos analizados y que la cepa TDM 139 presenta una cantidad de PenN unas 7 veces superior a la de la cepa parental C10. Esto significa que la cepa TDM 139 acumula PenN.

Estos resultados indican que la proteína CefM participa activamente en la secreción de PenN desde algún orgánulo (probablemente algún tipo de microcuerpo), hasta el citoplasma. Esto explica

que la síntesis de cefalosporinas quede prácticamente bloqueada en la cepa interrumpida en el gen *cefM* al no existir una salida eficiente de PenN al citoplasma. La existencia de una síntesis residual de cefalosporinas puede ser debida a la presencia de otros sistemas adicionales que de forma inespecífica secreten PenN al citoplasma donde pueda ser utilizada para continuar hacia la producción de cefalosporinas.

4.- LA COMPLEMENTACIÓN EN *TRANS* DE LA CEPA TDM 139 CON EL GEN *cefM*, RESTAURA LA SÍNTESIS DE CEFALOSPORINAS Y LOS NIVELES EXTRACELULARES E INTRACELULARES DE PENICILINA N.

Para determinar que el efecto observado en la síntesis de cefalosporinas era debido únicamente a la inactivación del gen *cefM*, se llevó a cabo la complementación en *trans* del transformante interrumpido (TDM 139). Con este propósito, se transformaron protoplastos del transformante interrumpido con el plásmido integrativo pCM (Figura 2.2) que contiene el gen *cefM* bajo el control de su propio promotor. Tras la transformación y la selección posterior se fermentaron en condiciones de producción de cefalosporinas, tres transformantes complementados: TCM 27, TCM 28 y TCM 35. Los análisis tanto mediante bioensayo como mediante HPLC demostraron que se restaura por completo la síntesis de cefalosporinas y penicilinas (Figuras 3.8 y 3.9), así como la curva de crecimiento y la cantidad intracelular de penicilinas (Figuras 3.8 y 3.11).

La estrategia de complementación en *trans* se ha utilizado en otras interrupciones génicas en *A. chrysogenum*, como en la del gen *cefT* (Ullán *et al.*, 2002a) o en la de los genes *cefD1* y *cefD2* (Ullán *et al.*, 2002b). El hecho de que recupere totalmente tanto la curva de crecimiento como la biosíntesis de cefalosporinas, indica que los efectos fenotípicos generados con la interrupción génica fueron debidos exclusivamente a la alteración del gen *cefM*. Este mismo resultado se obtuvo tras la complementación en *trans* con los genes *cefD1* y *cefD2* en la cepa TD189 (*cefD1*⁻, *cefD2*⁻) en *A. chrysogenum* (Ullán *et al.*, 2002b).

5.- EL TRANSFORMANTE INTERRUMPIDO TDM 139 ES CAPAZ DE FORMAR CPC *IN VITRO*.

Para demostrar que en el transformante TDM 139 los genes de la ruta biosintética de cefalosporinas son funcionales, se midió la formación de CPC “*in vitro*”. Para llevar a cabo este experimento, se utilizaron extractos celulares de micelio de crecido en condiciones de producción de cefalosporinas hasta las 144 horas. Los resultados (Tabla 3.1) mostraron síntesis de CPC en la cepa TDM 139, lo cuál indica que las enzimas de la ruta biosintética de este antibiótico son funcionales. La síntesis “*in vitro*” de CPC es posible al poner en contacto la PenN acumulada en los microcuerpos con las enzimas citoplasmáticas expandasa/hidroxilasa (Samson *et al.*, 1987) y la DAC acetiltransferasa citosólicas (Gutiérrez *et al.*, 1992). Además la formación de CPC por parte del

transformante TDM 139 duplicó a la de la cepa parental C10 y a la complementada en *trans* TCM 27, como consecuencia del acúmulo intracelular de PenN en el transformante interrumpido. Existe en la literatura científica otros ejemplos similares de formación de CPC “*in vitro*” como son la medición de las actividades DAC acetiltransferasa (Gutiérrez *et al.*, 1992, 1997) e IPN epimerasa (Ullán *et al.*, 2002b, 2004).

6.- EL TRANSPORTE DE PENICILINA N NO ES LIMITANTE EN LA RUTA BIOSINTÉTICA DE CPC EN *A. chrysogenum*.

En la ruta biosintética de CPC en *A. chrysogenum* se han descrito dos etapas limitantes que son la conversión de DAC en CPC (Gutiérrez *et al.*, 1997) y la de IPN en PenN (Ullán *et al.*, 2004). Con el objeto de determinar si el transporte de PenN estaba limitado por la falta de la proteína CefM, se procedió a la sobreexpresión del gen *cefM*. Para ello, se cambió el promotor nativo del gen *cefM* por el de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*Pgpd*) de *A. nidulans*. Este promotor ya había sido utilizado en la sobreexpresión del gen *cefG* en *A. chrysogenum* (Gutiérrez *et al.*, 1997). En cuanto al terminador se utilizó el de la citocromo oxidasa de *S. cerevisiae* (*Tcyc1*) (Russo *et al.*, 1991). Se construyó el plásmido pSM (Figura 2.3) con el que se transformaron protoplastos de *A. chrysogenum* C10. De los tres transformantes analizados ninguno de ellos mostraba un incremento en la producción de cefalosporinas ni en la de penicilinas (Figuras 3.16 y 3.17). Igualmente el análisis intracelular de los niveles de PenN no mostró ninguna variación significativa con respecto a la cepa parental (Figura 3.18), lo que indica que los niveles de la proteína CefM en la cepa parental sin transformar son suficientes para los niveles de CPC producidos por esta cepa.

Durante las fermentaciones de *A. chrysogenum* C10 se produce un acúmulo de penicilina N en los caldos de cultivo, lo cuál implica una pérdida de precursores para la producción de cefalosporinas (Nüess *et al.*, 1987). El hecho de que en la ruta de biosíntesis de CPC la conversión de IPN en PenN constituya una etapa limitante (Ullán *et al.*, 2004), da sentido a la ausencia de un incremento de la producción de PenN en los transformantes que sobreexpresan *cefM*. A pesar de sobreexpresar el transportador de dicho intermediario, la disponibilidad limitada de PenN no permite modificar su secreción con respecto a la cepa parental.

7.- LA PROTEÍNA CefM SE LOCALIZA EN MICROCUERPOS DE TAMAÑO MEDIO.

El análisis bioinformático de la proteína CefM mostró que es una proteína de membrana con un posible sitio de unión a Pex19 para su integración en la membrana peroxisomal. Además los resultados de su interrupción le otorgan un claro papel en el transporte de PenN desde el interior de algún orgánulo al citoplasma.

Para determinar la localización celular de la proteína CefM en *A. chrysogenum* se llevó a cabo la fusión traduccional del extremo carboxilo terminal de esta proteína con el extremo amino terminal

de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aquorea victoria*. Para dicha fusión se utilizó el gen *gfp2.5* que es una versión funcional de la GFP en hongos filamentosos (Fernández-Ábalos *et al.*, 1998). Como resultado de la integración de la fusión *cefM-gfp2.5* en la cepa TDM 139 se obtuvieron dos transformantes, TcefM-GFP 36 y TcefM-GFP 37. Ambos transformantes demostraron tener una producción de cefalosporinas similar a la de la cepa C10 cuando se analizaron mediante bioensayo en cilindros de agar, lo cuál indicaba que la proteína de fusión es funcional. Además la proteína de fusión CefM-GFP permanece intacta en la fracción de proteínas integrales de membrana, como demuestran los estudios de Western-blot realizados utilizando anticuerpos policlonales frente a la proteína GFP (Figura 3.20).

Los estudios de microscopia confocal de fluorescencia mostraron que la proteína de fusión CefM-GFP se localiza en microcuerpos de tamaño medio, tal y cómo se puede observar en las imágenes presentadas (Figuras 3.21 y 3.22). Este tipo de fluorescencia puntual a lo largo de las hifas es característica de las proteínas localizadas en peroxisomas como es el caso de la proteína EGFP-SKL cuando se expresa en *P. chrysogenum* (van der Klei y Veenhuis, 2006). Dicha proteína posee la señal PTS-1 (SKL) de localización en peroxisomas (Erdmann y Blobel, 1996; Mukay y Fujiki, 2006). Este resultado sumado a los obtenidos anteriormente nos indica que la proteína CefM está localizada en microcuerpos que posiblemente son peroxisomas. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis sería necesario un estudio mediante microscopía electrónica utilizando anticuerpos frente a la proteína CefM marcados con oro coloidal.

8.- PAPEL DE LA PROTEÍNA CefM EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE CPC EN *A. chrysogenum*.

La compartimentalización de la ruta de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos es una forma de controlar y optimizar dicha ruta, ya que permite la separación espacial de las enzimas y sus sustratos (van de Kamp *et al.*, 1999; Evers *et al.*, 2004). En *P. chrysogenum* la biosíntesis de penicilinas está compartimentalizada; así los dos primeros pasos tienen lugar en el citoplasma (Ramos *et al.*, 1985; Müller *et al.*, 1991), mientras que el paso final ocurre en el interior de los peroxisomas (Müller *et al.*, 1991, 1992, 1995).

Los peroxisomas son orgánulos esféricos de membrana simple, cuyo número y composición proteica es variable. Están presentes en células eucariotas, cumpliendo diversas funciones específicas según el organismo y el tipo de tejido (Wanders y Waterham, 2006). Las funciones principales de estos orgánulos son la oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga, de compuestos aromáticos y cíclicos y la protección frente al estrés oxidativo (Parsons *et al.*, 2001). Además participan en una serie de procesos como el ciclo del glioxato en plantas (Kamada *et al.*, 2003) o la biosíntesis de penicilinas en hongos filamentosos (Müller *et al.*, 1991, 1992, 1995).

La existencia de una compartimentalización en diversas rutas tanto del metabolismo primario como del secundario, en las que participan los peroxisomas, hace que deban entrar diversos sustratos y salir los productos correspondientes. Por tanto, se deben integrar aquellos procesos que

tienen lugar en diferentes compartimentos celulares para que las rutas biosintéticas sean eficientes (Rottensteiner y Theodoulou, 2006). La presencia de proteínas canal en la membrana peroxisomal hace que los peroxisomas sean permeables a moléculas de bajo peso molecular como solutos hidrofílicos, aunque los cofactores y moléculas más complejas, como ácidos grasos de cadena muy larga, no pueden atravesar espontáneamente la membrana peroxisomal. Por este motivo, deben existir sistemas de transporte especializados que se encarguen tanto de la importación de sustratos como de la secreción de los productos formados en la matriz peroxisomal (Hetteima y Tabak, 2000).

En *A. chrysogenum* se pensaba hace unos años que todas las enzimas de la ruta de biosíntesis de cefalosporinas tenían una localización citoplasmática no existiendo ningún tipo de compartimentalización de la ruta (van de Kamp *et al.*, 1999; Evers *et al.*, 2004). Sin embargo, evidencias recientes sugieren que el paso central de epimerización de IPN a PenN ocurre, probablemente, en el interior del peroxisoma o algún otro tipo de microcuerpo. Así la proteína CefD1 posee una señal de localización en peroxisomas PTS-1, mientras la proteína CefD2 tiene las señales de localización en peroxisomas PTS-1 y PTS-2. Por este motivo, es probable que el paso de epimerización de IPN en PenN tenga lugar en la matriz peroxisomal (Vaca-Cerezo, 2008).

En el proceso de epimerización, en primer lugar se produce la activación de la IPN mediada por la proteína CefD1, formándose isopenicilinil N-CoA (Ullán *et al.*, 2002b). La proteína CefD1 pertenece a la familia de acil-coenzima A sintetasa ACVS/FATP y podría participar no sólo en la activación de la IPN como éster de coenzima A, sino también en su transporte hacia el interior de la matriz peroxisomal una vez activada (Vaca-Cerezo, 2008).

Posteriormente, la isopenicilinil N-coenzima A puede ser epimerizada en el interior de la matriz peroxisomal por la proteína CefD2 formándose penicilinil N-CoA. Por último, una tioesterasa inespecífica puede hidrolizar la penicilinil N-CoA para formar penicilina N (Ullán *et al.*, 2002b). Todo este proceso tiene relación con el metabolismo de ácidos grasos en el peroxisoma.

En este orgánulo, los ácidos grasos son transportados de forma directa o bien como ésteres de coenzima A. Por el contrario, en otros orgánulos como las mitocondrias dicho proceso de transporte se realiza activando los ácidos grasos como ésteres de carnitina mediante un transportador de tipo carnitina/acilcarnitina (Indiveri *et al.*, 1997). El hecho de que los ácidos grasos sean transportados esterificados o no en peroxisomas, depende de las propiedades fisicoquímicas del ácido graso como la solubilidad en un solvente no polar. Asimismo la especificidad de sustrato y la localización de las acil-coenzima A sintetasa son muy importantes. En este sentido, se ha descrito que algunos transportadores de tipo ABC actúan coordinadamente con acil-coenzima A sintetasa (Fulda *et al.*, 2004). Por tanto, es probable que la proteína CefD1 actúe junto con algún tipo de transportador aún no identificado, teniendo en cuenta que la IPN es una molécula hidrofílica poco permeable a través de la membrana peroxisomal (García-Estrada *et al.*, 2007).

El valor del pH de la matriz peroxisomal es variable según el organismo estudiado. Así puede ser ácido en *S. cerevisiae* (Lasorsa *et al.*, 2004) o básico como en fibroblastos humanos (Dansen *et al.*, 2000). En hongos filamentosos filogenéticamente relacionados con *A. chrysogenum* y *P. chrysogenum* el

pH de la matriz del peroxisoma tiene un valor entre 7-7,5 que favorece la última reacción de la biosíntesis de penicilinas (van der Lende *et al.*, 2002). En el caso de *A. chrysogenum* este valor de pH cercano a la neutralidad facilitaría la reacción de epimerización de IPN a PenN, puesto que se ha visto que dicha conversión es óptima en estas condiciones de pH (Baldwin *et al.*, 1981; Jayatilake *et al.*, 1981; Lübbe *et al.*, 1986). Por tanto, estos datos apoyan la idea de que la epimerización de IPN a PenN transcurre en la matriz peroxisomal. Una vez formada, la PenN saldría del interior del peroxisoma hacia el citoplasma, donde sería utilizada para continuar con el resto de reacciones de la ruta de biosíntesis de cefalosporinas, puesto que el resto de enzimas parecen ser citosólicas (van de Kamp *et al.*, 1999; Evers *et al.*, 2004).

En cuanto a la salida de los ácidos grasos del peroxisoma, en eucariotas superiores existen dos vías: una vía dependiente de carnitina (Jakobs y Wanders, 1995) y otra vía que requiere una tioesterasa (Westin *et al.*, 2005). El empleo de una vía u otra está determinado por la capacidad del acilcoenzima A para convertirse en un éster de carnitina y de la presencia de la actividad carnitina aciltransferasa o acilcoenzima A tioesterasa (Hettema y Tabak, 2000). Podría ser la segunda vía la de la tioesterasa la que permitiera la salida de PenN desde los peroxisomas al citoplasma en *A. chrysogenum*.

Los resultados mostrados en esta memoria, indican que la proteína CefM parece estar implicada en la salida de PenN desde el interior de los peroxisomas hacia el citoplasma celular. En la cepa interrumpida se acumula PenN intracelularmente lo que indica que la PenN no se transporta cuando está en forma éster CoA, sino que se transporta directamente como PenN. Los peroxisomas de mamíferos contienen diversas acil-coenzima A tioesterasas capaces de hidrolizar una gran variedad de sustratos como ésteres de cadena larga, media y corta, ácidos biliares, ácidos grasos ramificados y succinato (Westin *et al.*, 2005). Además la existencia del marco de lectura abierto ORF3 “aguas abajo” del gen *cefG* que posee el motivo conservado “GX SXG” característico de tioesterasas (Dayhoff *et al.*, 1976), hace pensar que tal vez dicha proteína lleve a cabo la hidrólisis del intermediario penicilínico N-coenzima A (Ullán, 2002).

En cuanto al mecanismo de transporte, la proteína CefM es un transportador de tipo MFS con características que permiten asignarlo a la familia 3 de la superfamilia MFS, en la que se encuentran proteínas que actúan mediante un mecanismo antiporte protón motriz. La existencia de un gradiente de pH en los peroxisomas que facilita el importe de ácidos grasos mediante la vía de formas no esterificadas (van Roermund *et al.*, 2004), podría ser la fuente de energía utilizada también por la proteína CefM para transportar la PenN.

Los transportadores peroxisomales descritos hasta la fecha son todos de tipo ABC. Así pueden ser transportadores monoméricos funcionales como Pxa1 de *Arabidopsis thaliana* (Fulda *et al.*, 2004) o “mitad transportadores” que forman homo o heterodímeros que para ser activos que requieren la asociación de 2 subunidades que por sí mismas no funcionan como transportadores como en el caso de los complejos Pxa1/Pxa2 de *S. cerevisiae* (Hettema *et al.*, 1996) y los transportadores peroxisomales ABCD1-4 de mamíferos que transportan ésteres de coenzima A de ácidos grasos de cadena muy larga (Wanders *et al.*, 2007).

El análisis bioinformático de la proteína CefM sugiere una probable localización en la membrana peroxisomal debido a la presencia de un posible sitio de unión a Pex19p entre los aminoácidos 212-221 (Figuras 4.4 y 4.5). Las proteínas de membrana peroxisomal (PMPs, Peroxisomal Membrane Proteins) son sintetizadas en el citosol y transportadas e insertadas post-traduccionamente en la membrana peroxisomal (Rottensteiner *et al.*, 2004; Heiland y Erdmann, 2005). Este transporte puede realizarse directamente o a través del retículo endoplasmático (RE), el cual contribuye a la formación de los peroxisomas. Así los peroxisomas comienzan su formación en el retículo endoplasmático donde se originan finalmente peroxisomas maduros, existiendo una continuidad entre las membranas de ambos orgánulos (Tabak *et al.*, 2003; Subramani, 1998). La importación de las proteínas de membrana peroxisomal es un proceso en el que las proteínas Pex19p y Pex3p desempeñan un papel clave, formando una unidad estructural (Fujiki *et al.*, 2006). Pex19p es una proteína citosólica que actúa como un receptor cíclico de PMPs encargado de su adecuada integración en la membrana del peroxisoma (Shibata *et al.*, 2004). Por otro lado, la proteína Pex3p se encuentra en la membrana peroxisomal, siendo transportada a través del RE mediante una vía independiente de Pex19p, donde actúa como un factor de anclaje de Pex19p (Fang *et al.*, 2004). Las PMPs que van directamente desde el citoplasma hasta la membrana peroxisomal interaccionan con la proteína Pex19p. En este tipo de PMPs el sitio de unión a Pex19p forma parte integral de las señales de localización peroxisomal de membrana de tipo 1 (mPTS-1) (Rottensteiner *et al.*, 2004). El modelo propuesto para la integración de este tipo de PMPs (Figura 4.6) sugiere que, una vez sintetizadas dichas proteínas en el citoplasma, Pex19p se une a las mismas estabilizándolas. Posteriormente, este complejo PMP-Pex19p viaja hasta la membrana del peroxisoma donde tiene lugar el anclaje de dicho complejo a la proteína Pex3p, precisando dicho proceso gasto de energía. Esta asociación permite la adecuada inserción de la proteína PMP en la membrana peroxisomal y la liberación de Pex19p que queda disponible en el citoplasma para participar en un nuevo ciclo de transporte (Fujiki *et al.*, 2006).

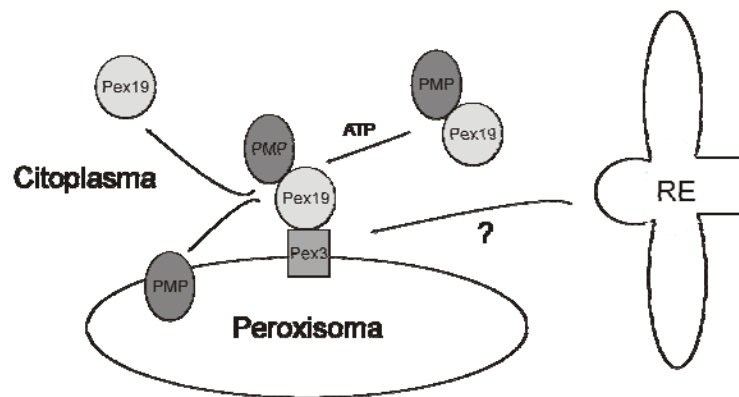


Figura 4.6. Modelo de la integración de las proteínas de membrana peroxisomal. PMP: proteína de membrana peroxisomal; RE: retículo endoplasmático. Pex3: peroxina 3. Pex19: peroxina 19.

Los resultados presentados en esta memoria sugieren que la proteína CefM está implicada en la secreción de PenN desde el interior de algún tipo de microcuerpo hasta el citoplasma celular, describiendo, por primera vez, la compartimentalización de la ruta biosintética de CPC en *A. chrysogenum*. Este hecho nos indica que al menos la etapa de epimerización de IPN a PenN transcurre en algún compartimento celular diferente al citoplasma. Teniendo en cuenta estos datos,

en la figura 4.7 proponemos el siguiente modelo teórico de compartimentalización de la ruta de biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum*. En este modelo los dos primeros pasos de la ruta, desde la formación del tripéptido ACV hasta la síntesis de la IPN, primer intermediario bioactivo de la ruta, transcurrirían en el citoplasma, puesto que no existen evidencias de que las enzimas ACV sintetasa ni IPN sintasa se localicen en algún orgánulo celular. Posteriormente la IPN entraría dentro del peroxisoma para formar PenN, que sería exportada al citoplasma, donde tendrían lugar el resto de reacciones hasta originar CPC como producto final de la vía biosintética.

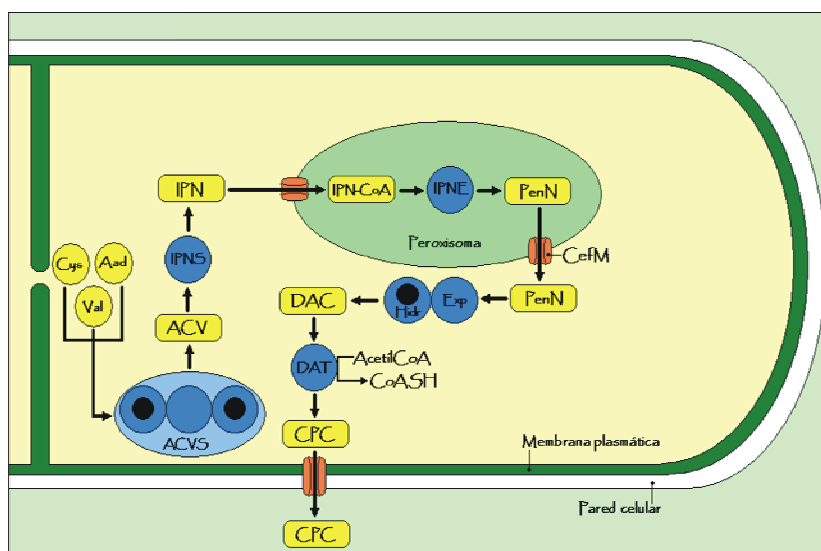


Figura 4.7. Modelo teórico de la compartimentalización de la ruta de biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum*. Aad: ácido L- α -aminoadípico; ACV: δ -(L- α -aminoadipil)-L-cistenil-D-valina; ACVS: ACV sintetasa; IPNS: isopenicilina N sintasa; IPNE: isopenicilina N epimerasa; Exp.: expandasa; Hid.: hidroxilasa; DAT: desacetilcefalosporina C acetiltransferasa.

9.- ORIGEN EVOLUTIVO DE LA PROTEÍNA CefM DE *A. chrysogenum*.

La proteína CefM es esencial para la biosíntesis de cefalosporinas en *A. chrysogenum* como demuestran los resultados obtenidos en la presente memoria. Aparte del papel que desempeña en la ruta de biosíntesis de CPC, un aspecto muy importante sobre el que cabe especular es su posible origen evolutivo.

El gen *cefM* se encuentra en el cluster temprano de biosíntesis de cefalosporinas, adyacente a los genes *cefD1* y *cefD2*, implicados en la conversión de IPN a PenN, un paso clave en la biosíntesis de cefalosporinas. Las proteínas CefD1 y CefD2 de ambos genes presentan un elevado porcentaje de homología con enzimas relacionadas con la oxidación de ácidos grasos de cadena larga, proceso que tiene lugar en el interior de peroxisomas. Además estas proteínas tienen señales PTS de localización peroxisomal. Teniendo esto en cuenta, el origen de los genes *cefD1* y *cefD2* podría ser resultado de la especialización para la conversión de IPN en PenN de genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos al microorganismo poseedor, conferiría una ventaja evolutiva con respecto a otros microorganismos al producir una sustancia con mayor actividad antibiótica (Ullán, 2002).

Recientemente tras la secuenciación del genoma de *P. chrysogenum* (van der Berg *et al.*, 2008), se han encontrado dos genes que codifican 2 proteínas, Pc-CefD1 y Pc-CefD2, ortólogos de las proteínas CefD1 y CefD2 de *A. chrysogenum* respectivamente. Dichas proteínas Pc-CefD1 y Pc-CefD2 fueron fusionadas en su extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal de la proteína EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), mostrando una localización en la matriz peroxisomal tras su expresión en *P. chrysogenum* (Kiel *et al.*, 2009). Posiblemente, a falta de confirmar experimentalmente su localización precisa, las proteínas CefD1 y CefD2 se localizan en la matriz peroxisomal en *A. chrysogenum* en vista de la localización que exhiben sus proteínas ortólogas en *P. chrysogenum*. Además estudios previos mostraron la presencia de cierta actividad IPN epimerasa en *P. chrysogenum*, que podría ser resultado de la actividad enzimática de las proteínas Pc-CefD1 y Pc-CefD2 (Alvi *et al.*, 1995).

La presencia del gen *cefM* adyacente a los genes *cefD1* y *cefD2* hace pensar que tal vez la proteína CefM estuvo originariamente implicada en el transporte de algún ácido graso sintetizado por la acción de las proteínas ancestrales de CefD1 y CefD2. Este hecho viene apoyado por la presencia en CefM de un posible sitio de unión a Pex19p muy similar al encontrado en la proteína Pat de *S. cerevisiae*, un transportador de tipo ABC de ácidos grasos de cadena muy larga (Hettema y Tabak, 2000).

Por otro lado, el árbol filogenético presentado en la figura 4.1 del presente capítulo muestra claramente que la proteína CefM presenta una mayor similitud con transportadores de tipo MFS de diferentes hongos filamentosos que con la proteína CefT. De hecho, el mayor porcentaje de similitud corresponde a una proteína de tipo MFS de *P. chrysogenum* (48,9 % de aminoácidos idénticos). Si relacionamos esto con la presencia de los genes Pc20g13500 y Pc22g13680 ortólogos de los genes *cefD1* y *cefD2* de *A. chrysogenum*, se justificaría la existencia de un ancestro común a ambos hongos filamentosos donde todos estos genes estarían originariamente relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos. La transferencia horizontal de los genes bacterianos *pcbAB* y *pcbC* hicieron que este antepasado común fuera capaz de formar IPN. Posteriormente, la presión selectiva probablemente hizo que dicho ancestro se especializara en la producción de PenN, debido a la mayor actividad antibiótica de esta molécula como consecuencia de la evolución de los genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos hacia genes implicados en la producción de este antibiótico. Finalmente, ambas especies de hongos filamentosos divergieron especializándose las estirpes de *Acremonium* en la producción de cefalosporinas y conservando las estirpes de *Penicillium* la capacidad de producir penicilinas.

10.- CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *cefR* DE *A. chrysogenum*.

El conocimiento actual de la regulación de la ruta de biosíntesis de cefalosporinas en *A. chrysogenum* es muy reducido. Así únicamente se han caracterizado cinco proteínas implicadas en este proceso de regulación, tres de las cuáles PacC, Cre1 (Jekosch y Kück, 2000) y AcVeA (Dreyer *et al.*, 2007) son factores transcripcionales globales que también participan en la regulación de la

biosíntesis de otros antibióticos β -lactámicos en otros hongos filamentosos. Las otras dos proteínas, AcFKH1 (Schmitt *et al.*, 2004b) y CPR1 (Schmitt y Kück, 2000; Schmitt *et al.*, 2004a) y AcVeA, son reguladores específicos, que además de en la ruta de biosíntesis de cefalosporinas intervienen en la morfogénesis del micelio de *A. chrysogenum*.

Por otro lado, existe un gran desconocimiento no sólo de las proteínas implicadas en la secreción de cefalosporinas y sus intermediarios, sino también en la regulación de las mismas. Teniendo en cuenta que los transportadores caracterizados hasta la fecha [CefT (Ullán *et al.*, 2002a); CefM (Teijeira *et al.*, 2009) y CefT3 (Ullán RV, Teijeira F, Martín JF; resultados no publicados)] están localizados en el cluster temprano de biosíntesis de CPC, se decidió llevar a cabo la búsqueda de un gen regulador de los mismos en dicho cluster. Para este propósito se utilizó la genoteca de ADN genómico de *A. chrysogenum* ATCC 48272 (C10) construida en el vector fágico λ -EMBL3-*ble* (Gutiérrez, 1994). Utilizando el protocolo descrito en el apartado 16 de Materiales y Métodos se obtuvieron varios fagos positivos. Finalmente el fragmento de ADN que contenía el fago F06R fue subclonado y secuenciado. El análisis de la secuencia reveló la presencia de un marco de lectura abierto que presenta homología con proteínas que son hipotéticos reguladores de diferentes hongos filamentosos al que se denominó *cefR* (Figura 3.25). La presencia de intrones en el gen *cefR* fue determinada mediante la técnica de RT-PCR, descrita en el apartado 15.3 de Materiales y Métodos.

11.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA PROTEÍNA CefR.

Cuando se procesan los tres intrones del ARNm codificado por el gen *cefR* la proteína resultante consta de 687 aminoácidos con un peso molecular deducido de 76,73 kDa. La proteína CefR presenta cierta homología a lo largo de su secuencia con proteínas que son hipotéticos reguladores, cuyos porcentajes de aminoácidos idénticos aparecen reflejados en la tabla 4.4 y oscilan entre un 26-40 %. Dicho porcentaje es bastante bajo probablemente por tratarse hongos filamentosos poco emparentados evolutivamente con *A. chrysogenum*.

		CefR I	PH II	PH III	PH IV
<i>A. chrysogenum</i>	CefR (I)		39,3	30,4	25,8
<i>P. tritici</i>	PH (II)			49,4	35,7
<i>G. zeae</i>	PH (III)				
<i>P. anserina</i>	PH (IV)				

Tabla 4.4. Porcentaje de aminoácidos idénticos entre la proteína CefR de *A. chrysogenum* e hipotéticas proteínas reguladoras de *Pirenophora tritici* (XP_001940618), *Gibberella zeae* (XP_381554) y *Podospora anserina* (XP_001904954).

Por otro lado, la proteína CefR posee un bajo porcentaje de homología con factores de transcripción relacionados con el metabolismo del nitrógeno de hipotéticas proteínas NirA de *N. fischeri* (28 %, XP_001259495), *A. fumigatus* (28 %, EDP51939), *P. chrysogenum* (24 %, CAP91269) y *A. nidulans* (27 %, XP_657702) (Burger *et al.*, 1991).

El árbol filogenético presentado en la figura 4.8 se construyó a partir de la comparación de la proteína CefR con diferentes proteínas que actúan como hipotéticos reguladores mediante el algoritmo Clustal X (DNASTar. Lasergene v7.1.0. Proper-Edge). Los resultados de dicho árbol filogenético permitieron determinar que la proteína CefR se parece poco a estas proteínas hipotéticas (en torno un 40 % de similitud), y que las proteínas de los hongos filamentosos *Gibberella zeae* y *Podospora anserina* tienen un mayor parecido entre sí que con las otras de las dos especies utilizadas en la construcción del árbol. En conclusión, la proteína CefR cumple funciones probablemente bastante diferentes a las de estas proteínas puesto que se parece muy poco a las hipotéticas proteínas reguladoras con las que se le ha comparado.

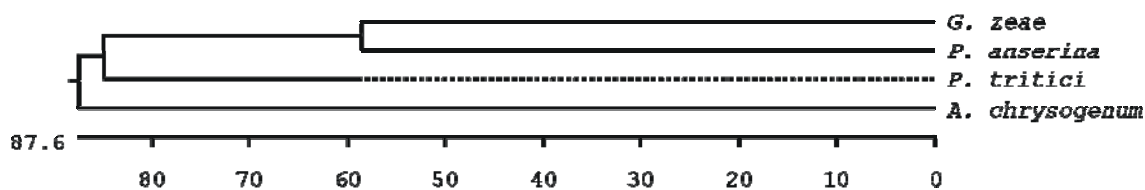


Figura 4.8. Árbol filogenético entre la proteína CefR de *A. chrysogenum* e hipotéticas proteínas reguladoras de diferentes hongos filamentosos. Las secuencias aminoacídicas fueron comparadas mediante el algoritmo ClustalX (DNASTar. Lasergene v7.1.0. Proper-Edge).

11.1- Composición aminoacídica de la proteína CefR.

El análisis de la secuencia aminoacídica y la estructura primaria de la proteína CefR se realizó, al igual que para la proteína CefM, mediante la herramienta bioinformática “ProtParam” del servidor Expasy (<http://us.expasy.org/tools>). En este caso, los datos más relevantes obtenidos se muestran en la tabla 4.5:

Características de la proteína CefR	
Número de residuos	687
Peso molecular (Da)	76730,6
pI teórico	5,97
Nº de residuos con carga positiva (Arg + Lys)	61
Nº de residuos con carga negativa (Asp + Glu)	73
Índice de inestabilidad	50,22
Índice alifático	74,86
Grado medio de hidrofobicidad	-0,374

Tabla 4.5. Parámetros deducidos a partir de la secuencia primaria de la proteína CefR empleando la herramienta bioinformática “ProtParam” (<http://us.expasy.org/tools>).

El análisis de la secuencia primaria de la proteína CefR determinó que los aminoácidos más abundantes eran serina (9,6 %), leucina (9,6 %), alanina (7,9 %) y glutamina (7,0 %). A partir de los datos presentados en la tabla 4.6 se puede deducir que la proteína CefR es bastante inestable y su índice alifático así como el bajo grado medio de hidrofobicidad indican que esta proteína no se encuentra asociada a membrana. Además la serina, el aminoácido más abundante de la proteína CefR es polar con carga neutra, que puede ser fosforilado durante la señalización celular en eucariotas.

11.2.- Predicción de la estructura secundaria y terciaria de la proteína CefR.

La estructura secundaria de la proteína CefR fue estudiada mediante la herramienta bioinformática “Psi-Pred” <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> como en el caso de la proteína CefM. En la figura 4.9 se muestra la estructura secundaria deducida para la proteína CefR. Los resultados mostraron que la proteína CefR, al igual que la proteína CefM, está constituida básicamente por hélices α .

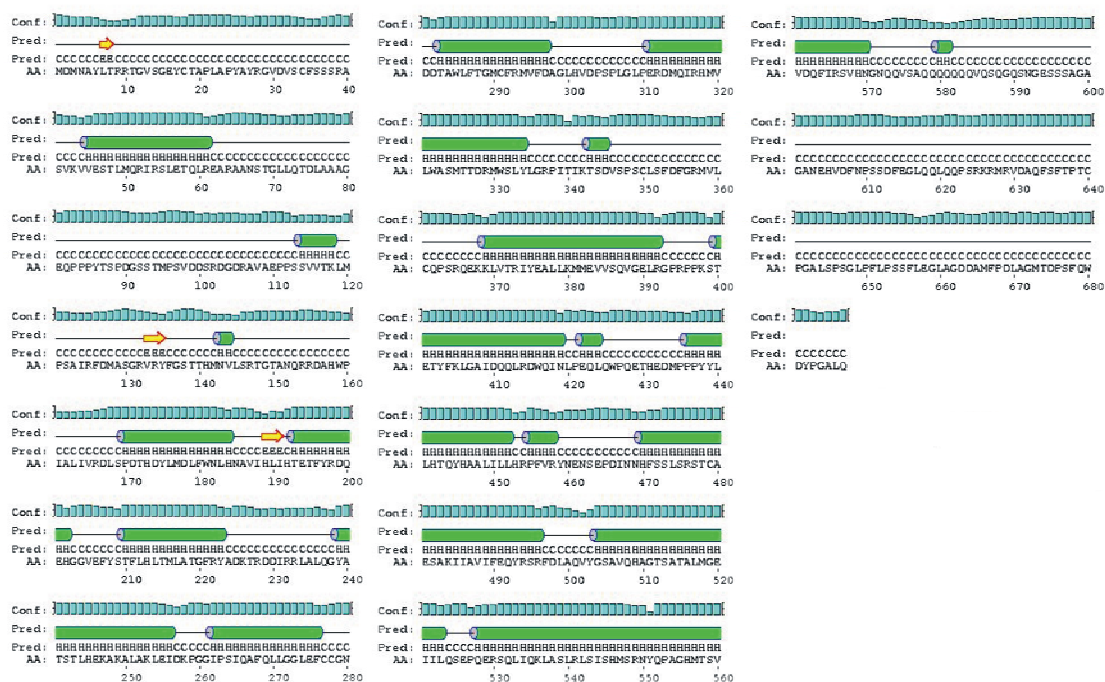


Figura 4.9. Predicción de la estructura secundaria de la proteína CefR de *A. chrysogenum* por Psi-Pred. En la línea Pred. se representa los diferentes tipos de estructuras secundarias: los cilindros indican regiones dispuestas en hélice α , mientras que las flechas se refieren a regiones dispuestas en láminas β . En la línea Conf. se indica la fiabilidad de la predicción para cada aminoácido de la proteína.

En el caso de la proteína CefR se intentó determinar, al igual que para la proteína CefM, la estructura tridimensional utilizando la herramienta bioinformática Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>). Sin embargo, no se pudo obtener un modelo teórico de su estructura terciaria debido a la falta de una estructura cristalizada que fuera similar a nuestra proteína.

11.3.- Motivos y dominios encontrados en la proteína CefR.

La búsqueda de dominios y motivos en la proteína CefR se realizó, al igual que para la proteína CefM, mediante la herramienta bioinformática Pfam (Protein families database of alignments; <http://www.sanger.ac.uk/Pfam>). En el caso de la proteína CefR, la predicción (E-value: 3.10^{-15}) determinó la presencia de un dominio “Fungal_trans” (pfam04082) entre los aminoácidos 261 y 359 de la proteína, característico de la familia de factores de transcripción fúngicos pfam04082. En

la figura 4.10 se muestra un alineamiento de la secuencia aminoacídica del dominio Fungal_trans de la proteína CefR con la secuencia consenso de dicho dominio.

```

CefR      256  IDKPGGIFSIQA FQLLGGLEFCC  GNDDTANL FLGMCFRMVFDAGLLE VDFSPLGL-PERD 313
Fungal_trans 2  LSEPNDIETVQA LLLLTLYLLGT  GDTSSANL LLGLAIRMAQDLGLLE RESSYWS LSPDEE 60

CefR      314  M  QRHMVLWASMTT DRMWSLYLGRP  ITIKTS DVSPSC LSFDE 355
Fungal_trans 61  A  EL RRRIFWSCYIL DR FISL ILGRP  FSLSDD DIIDC LPEDV 102
    
```

Figura 4.10. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del dominio “Fungal_trans” de la proteína CefR de *A. chrysogenum* con la secuencia consenso del mismo. En negrita se indican los aminoácidos idénticos.

La mayoría de las proteínas que contienen este dominio Fungal_trans son de función desconocida, aunque algunas han sido caracterizadas funcionalmente. En la tabla 4.6 se indican algunos ejemplos de factores de transcripción con el dominio Fungal_trans implicados en la regulación de una gran variedad de procesos celulares y metabólicos. Este tipo de proteínas suelen ser reguladores transcripcionales con funciones dispares que se unen al ADN a través de un dominio con dedos de zinc del tipo Zn₍₂₎-Cys₍₆₎. No existe ningún artículo en el que se caracterice el dominio Fungal_trans, lo que impide asociar este dominio a una función biológica concreta que a su vez permita catalogar a proteínas recientemente descubiertas que posean este dominio (Shelest, 2008).

Proteína	Organismo	Función	Dominios	Referencia
Dal81p	<i>S. cerevisiae</i>	Activador de genes implicados en vías de degradación del nitrógeno.	Gal4 (cd00067) equivalente a Zn ₍₂₎ Cys ₍₆₎ (149-188); consta de 2 hélices α alrededor de un motivo Zn ₍₂₎ Cys ₍₆₎ Fungal_trans (pfam 04082) (401-524)	Marzluf, 1997
Gal4p	<i>S. cerevisiae</i>	Regulador del metabolismo de la galactosa	Gal4 de dimerización (pfam 03902) (50-106) Fungal_trans (pfam04082) (322-416)	Bhat y Murthy, 2001
Pdr8p	<i>S. cerevisiae</i>	Regulador de transportadores ABC y MFS y otros genes implicados en resistencia pleiotrópica a múltiples drogas.	Gal4 (cd00067) (26-62) Fungal_trans (pfam04082) (281-369)	Hikkel <i>et al.</i> , 2003
Sef1p	<i>S. cerevisiae</i>	Regulador del crecimiento y de la esporulación	Gal4 (cd00067) (52-90) Fungal_trans (pfam04082) (421-508)	Groom <i>et al.</i> , 1998
Fum21p	<i>Fusarium oxysporum</i>	Activador de los genes de biosíntesis de fumonisinas.	Gal4 (cd00067)(25-49) Fungal_trans (pfam04082) (354-438)	Proctor <i>et al.</i> , 2008
XlnR	<i>Aspergillus niger</i>	Activador de los genes del sistema xilanolítico	Gal4 (cd00067)(50-83) Fungal_trans (pfam04082) (541-577)	Tamayo <i>et al.</i> , 2008

Tabla 4.6. Descripción de varias proteínas de diversos organismos que contienen el dominio Fungal_trans (pfam04082) presente en CefR.

En el caso de la proteína CefR, cuando se llevó a cabo la búsqueda de motivos empleando la herramienta bioinformática Pfam, no se encontraron dominios de unión al ADN. De hecho, si la proteína se envía a bases de datos que determinan la presencia de dominios de unión al ADN como DNAbinder (<http://www.imtech.res.in/raghava/dnabinder/submit.html>), el programa no predice ningún dominio de unión al ADN, por lo que la proteína no tendría dicha capacidad. Puesto que la

proteína CefR parece ser un regulador de la ruta de biosíntesis de CPC se realizó una búsqueda más dirigida de posibles regiones de la proteína implicadas en la unión al ADN. Para ello, se utilizaron las herramientas bioinformáticas BindN (<http://bioinfo.ggc.org/bindn/>) y DP-Bind (<http://lcg.rit.albany.edu/dp-bind/>) para predecir una posible región de unión al ADN en la proteína CefR.

En la figura 4.11 se muestran los resultados proporcionados por la herramienta bioinformática BindN para la proteína CefR. Este programa predice si un residuo concreto de una proteína participa o no en la unión al ADN basándose en algoritmos llamados SVM (Support Vector Machines) que emplean tres parámetros para cada residuo de la proteína: valor del pK(a) de la cadena lateral, el índice de hidrofobicidad y la masa molecular. De esta forma, a partir de una determinada secuencia aminoacídica, se construye una matriz de datos, que permite determinar si un aminoácido se une o no al ADN, dando un valor de 1 o -1 en cada caso. El resultado del análisis proporciona una serie de valores como son el rigor, la especificidad y la sensibilidad del análisis (Wang y Brown, 2006). En el caso de la proteína CefR se obtuvieron 162 residuos que posiblemente están implicados en la unión al ADN con una especificidad en el análisis del 80 % y una sensibilidad estimada del 56,96 %.

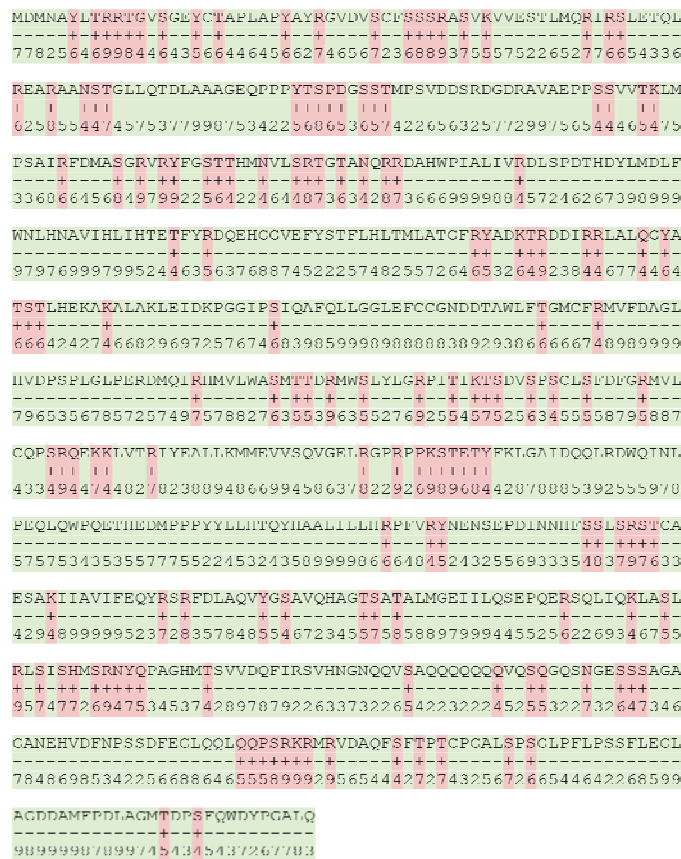


Figura 4.11. Predicción de aminoácidos implicados en la unión al ADN en la proteína CefR mediante BindN. En rojo se indican aquellos aminoácidos que posiblemente participan en la unión al ADN, mientras que en verde se encuentran los aminoácidos que no intervienen en dicha unión. Se indica, para cada aminoácido, con un signo + ó - si el aminoácido se une o no al ADN, y la confianza de dicha predicción mediante un valor numérico (1-99).

Este análisis de los residuos de la proteína CefR implicados en la unión al ADN fue realizado también empleando la herramienta bioinformática DP-Bind, como una forma de contrastar los

resultados obtenidos. El programa DP-Bind (Hwang *et al.*, 2007) utiliza además del algoritmo SVM, otros como KLR (Kernel Logistic Regression) y PLR (Penalized Logistic Regression). Las predicciones se realizan directamente a partir de la secuencia o de una matriz de datos proporcionada por el alineamiento Psi-Blast que da una idea del grado de conservación evolutiva. Los resultados obtenidos en este caso indican que la mayor parte de los residuos implicados en la unión al ADN se localizan en la región amino terminal de la proteína (los primeros 56 aminoácidos), mientras que los otros aminoácidos implicados en la unión proporcionados por BindN en la región más próxima al extremo carboxilo terminal de la proteína CefR no son reconocidos como positivos por DP-Bind. Por tanto, las herramientas bioinformáticas BindN y DP-Bind predicen una probable región de unión al ADN en la proteína CefR que se localizaría en la región amino terminal de la misma. Sin embargo, la comparación con las bases de datos no permitieron determinar homología con ningún dominio de unión al ADN propio de hongos como Gal4 (pfam00172) o bZip (ps00036) en la proteína CefR.

11.4.- Localización celular de la proteína CefR.

Para determinar la posible localización de la proteína CefR se empleó, al igual que para la proteína CefM, la herramienta bioinformática Psort II Server (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/runpsort.pl>). En el caso de la proteína CefR (Tabla 4.7) se obtuvo que se encuentra muy probablemente en el núcleo con una probabilidad del 56,5 %, mientras que la localización en otros orgánulos como mitocondrias (13 %) o en el citoplasma (21,7 %) es muy baja.

Características de la proteína CefR	
Péptido señal N-terminal	Ninguno
Topología de membrana	Proteína periférica
Señal de localización mitocondrial	Ninguna
Señal de localización nuclear	Pat7, PSRKMR (623)
Motivo KDEL de retención en el RE	Ninguno
Señal de localización peroxisomal-1	No
Señal de localización peroxisomal-2	RIRSLETQL (52) KLGAIQQL (405)
Motivos de localización vacuolar	Ninguno
Motivos de unión a ARN	Ninguno
Motivos de unión a actina tipo actinina	Ninguno
Motivos de N-miristoilación	Ninguno
Motivos de prenilación	Ninguno
Motivos de transporte al aparato de Golgi	Ninguno
Tirosinas en la cola	Ninguno
Motivos de dileucinas en la cola	Ninguno
Motivos de unión a ADN	Ninguno
Motivos de unión a proteínas ribosomales	Ninguno

Tabla 4.7. Señales y motivos de localización de la proteína CefR.

La presencia de una probable señal de localización nuclear “Pat7” (Hicks y Raikhel, 1995) cuya secuencia es ⁶²³PSRKMR⁶²⁸, hace pensar que la proteína CefR es nuclear. Por otro lado, las dos señales de localización peroxisomal de tipo 2 (⁵²RIRSLETQL⁶⁰ y ⁴⁰⁵KLGAIQQL⁴¹⁴) detectadas en la proteína CefR son consideradas por el programa Psort Server II como no significativas. Al ignorar las señales de localización peroxisomal el programa considera que la localización más probable de la proteína CefR es el núcleo celular.

12.- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA INTERRUPCIÓN DEL GEN *cefR*.

El objetivo de la interrupción génica del gen *cefR* era, al igual que para el gen *cefM*, determinar el papel de dicho gen en la ruta de biosíntesis de cefalosporina C, analizando tanto el efecto sobre la producción de cefalosporinas como sobre la expresión de los genes de secreción y de biosíntesis.

Para llevar a cabo la inactivación dirigida del gen *cefR* de *A. chrysogenum* se empleó, como en el caso de la interrupción génica del gen *cefM* (Teixeira *et al.*, 2009), la técnica del doble marcador (Mansour *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 2001; Ullán *et al.*, 2002a, 2002b) cuyo fundamento fue explicado anteriormente (apartado 3 del presente capítulo). Con este propósito, se diseñó el plásmido pDR (Figura 2.4 de Materiales y Métodos) en el cual el gen *cefR* está inactivado mediante la delección de parte de su secuencia y la inserción, en su lugar, del casete de resistencia a fleomicina. El segundo marcador empleado fue el casete de resistencia a higromicina B (Punt *et al.*, 1987).

Con el plásmido pDR se transformaron protoplastos de *A. chrysogenum* C10, seleccionando aquellos transformantes resistentes a fleomicina. Tras esta selección, se eligieron sólo los transformantes que eran también sensibles a higromicina B. En este caso, la eficiencia de la interrupción del gen *cefR* fue de un 11,1 % (se analizaron 8 transformantes de los cuáles 1 estaba interrumpido). Esta eficiencia fue superior a la obtenida para el caso de la interrupción del gen *cefM* (4 %, se analizaron 25 transformantes estando 1 únicamente interrumpido), ya que el fragmento de ADN homólogo utilizado para la interrupción era de un mayor tamaño (7,9 kb).

12.1.- El transformante interrumpido TDR 34 muestra un enlentecimiento en la curva de crecimiento y secreta un pigmento amarillento al caldo de cultivo.

Cuando se comparó la curva de crecimiento del transformante interrumpido TDR 34 con la de la cepa parental C10, se pudo observar un claro enlentecimiento del crecimiento del que resulta un retraso en la lisis del micelio (Figura 3.29 A). Este efecto puede ser resultado al igual que en el caso de la interrupción del gen *cefM* (Teixeira *et al.*, 2009), de las alteraciones que se producen en los flujos metabólicos debidos a modificaciones en la secreción de cefalosporinas y penicilinas en este transformante. Dicha alteración de la secreción se justifica por la acción represora que ejerce el producto del gen *cefR* sobre los genes *cefM* (Teixeira *et al.*, 2009) y *cefT* (Ullán *et al.*, 2008b) como muestran los análisis de hibridación de northern (Figura 3.45). Otra hipótesis es que el producto del gen *cefR* puede estar interaccionando con otras proteínas relacionadas con el proceso de crecimiento y que desconocemos.

En *A. chrysogenum*, se ha identificado la proteína reguladora CPR1 que controla la fragmentación de las hifas y la formación de las artrosporas (Hoff *et al.*, 2005). Esta proteína interacciona con la proteína AcFKH1 que permite conectar la biosíntesis de cefalosporinas con el desarrollo (Schmitt *et al.*, 2004a) mediante fosforilación reversible debido a la participación simultánea en ambos procesos. Se piensa que las proteínas serina/treonina quinasa pueden ser importantes reguladores de la morfogénesis en hongos filamentosos. En *N. crassa* se ha identificado el gen *cot1* que codifica una proteína serina/treonina quinasa que es esencial para el crecimiento

(Bidlingmaier *et al.*, 2001). Sin embargo, no se ha podido determinar ninguna conexión entre este tipo de proteínas y la maquinaria de lisis de la pared celular (Adams, 2004).

Por otro lado, la interrupción del gen *cefR* retrasa la fragmentación y la formación de artrosporas, proceso que está claramente relacionado con la composición de la pared celular (una mezcla de manoproteínas, quitina y β -1,3 glucanos) (Bowman y Free, 2006) y la maquinaria de enzimas que se encargan de su degradación como quitinasas y glucanasas, encargadas de mantener su carácter dinámico (Adams, 2004).

En conclusión, es probable que la proteína CefR establezca su efecto sobre el crecimiento debido a la interacción con las proteínas CefM y CefI, las cuáles pueden actuar como un sensor de señales o interactuar con alguna proteína de la cascada de transducción de señales. La proteína CefR podría interactuar con otras proteínas que participan en la cascada de transducción de señales que permiten conectar la biosíntesis de cefalosporinas con el desarrollo. Otra opción sería que los efectos de la interrupción del gen *cefR* sobre el crecimiento se deban a la alteración de la producción de cefalosporinas tras dicha inactivación (Figuras 3.29 y 3.30).

Cabe destacar que la interrupción del gen *cefR* provoca la aparición de una pigmentación amarilla en los caldos de cultivo del transformante TDR 34 a partir de las 120 horas de fermentación (Figura 3.38 A). Dicha pigmentación desaparece al revertir la mutación del gen *cefR* (Figura 3.38 A). Es sabido que las colonias de *A. chrysogenum* presentan una coloración amarillenta cuando son crecidas en medio sólido MEA (Peberdy, 1987). Sin embargo, hasta la fecha no se ha determinado la naturaleza de este compuesto coloreado. La presencia de este pigmento extracelular en condiciones de producción de cefalosporinas hace pensar que pueda estar relacionado de alguna forma con la biosíntesis de CPC. De hecho, en las fermentaciones de la cepa parental de *A. chrysogenum* se observa en ciertas ocasiones una pigmentación amarillenta de los caldos de cultivo, aunque esta coloración no es tan intensa como la observada en los caldos de cultivo del transformante interrumpido TDR 34. En *P. chrysogenum* se ha identificado la crisogenina, un pigmento de color amarillento, soluble en diversos solventes orgánicos y que posee varios anillos aromáticos en su estructura (Clutterbuck *et al.*, 1932; García-Rico *et al.*, 2008). Existen diversos pigmentos de color amarillento que han sido identificados en otras especies del género *Penicillium* como son la atrovenetina en *P. berquei* (Ishikawa *et al.*, 1991) un potente antioxidante y la mitorubrina en *P. purpurogenum* (Buchi *et al.*, 1965). Sin embargo, la ausencia de pigmentos caracterizados en *A. chrysogenum* no ha permitido identificar este compuesto amarillento que secreta a los caldos de cultivo durante su fermentación.

Los pigmentos son compuestos no esenciales para el crecimiento del hongo, siendo considerados como metabolitos secundarios. Están asociados con las esporas, las ascosporas o estructuras relacionadas, por lo que mutaciones que alteran su formación pueden modificar la función reproductora (Griffin, 1996). En *A. chrysogenum* las hifas, los conidióforos y los conidios no son pigmentados y se piensa que el pigmento amarillento se desarrolla en el micelio y difunde al medio (Pisano, 1970). Muchos pigmentos de color amarillento, anarajando o rojizo son carotenoides, carotenos o xantofilas. Todos ellos son compuestos terpenoides derivados del acetato

y de la biosíntesis del ácido mevalónico que poseen en torno a 40 átomos de carbono, dependiendo el color de la molécula del sistema de dobles enlaces conjugados (Griffin, 1996). La producción de pigmentos por el género *Acremonium* (llamado antes *Cephalosporium*) permite clasificarlo en tres grupos según sean capaces o no de producir pigmentos en respuesta a la luz: el grupo 1 que carece de pigmentos en presencia y ausencia de luz; el grupo 2 que producen pigmentos rosas o anarajandos con luz pero no en oscuridad y el grupo 3 que tienen pigmentos tanto con luz como en oscuridad, aunque la pigmentación es mayor con luz (Codner y Platt, 1959). En *A. chrysogenum* la producción de este pigmento amarillento ocurre tanto con luz como en oscuridad (datos no mostrados), y aunque no existe ningún trabajo que describa la naturaleza de este pigmento, los estudios realizados con la especie *Cephalosporium diospyri* por Parn y Seviour (1974) muestran la inducción de la producción de carotenoides al añadir compuestos orgánicos con mercurio los cuales son inhibidores de grupos SH. Por otro lado, Kozma *et al.* (1993) demostraron que la producción de este pigmento amarillento en *A. chrysogenum* es mayor en medio mínimo que en medio de fermentación (ZEN-1) con metionina. En este último caso, la formación del pigmento comienza a partir de las 96 horas de fermentación, siendo máxima a las 120 y 144 horas de fermentación, lo mismo que ocurre en medio mínimo, aunque la cantidad de pigmento formado en este medio es mucho mayor. Por tanto, es muy probable que este pigmento amarillento formado en *A. chrysogenum* sea algún tipo de carotenoide y que su formación esté relacionada con la biosíntesis de cefalosporinas, al coincidir ambos procesos en el tiempo. Por otro lado, es probable que la metionina tenga algún efecto inhibitor sobre la formación del pigmento, como demostraron los trabajos realizados por Kozma *et al.* (1993), al ser mucho menor la producción de este pigmento en medio con metionina que en medio mínimo sin metionina.

12.2.- La interrupción del gen *cefR* provoca un incremento de la expresión de los genes *cefM* y *cefT*.

Los resultados del análisis de la producción de cefalosporinas en el transformante TDR 34 (interrumpido en el gen *cefR*), mostraron un claro enlentecimiento en la producción de cefalosporinas tanto en los análisis mediante bioensayo como mediante HPLC (Figura 3.29 B y C; Figura 3.30 A y B). Asimismo dicho retraso en la producción de cefalosporinas estaba acompañado por un incremento en la secreción de penicilinas totales, concretamente penicilina N a partir de las 96 horas de fermentación (Figura 3.30 C y D).

El análisis de northern permitió demostrar que la inactivación del gen *cefR* provoca un incremento de la expresión de los genes *cefM* y *cefT* (Figura 3.45) al no ejercer su efecto represor. La expresión heteróloga de la proteína CefT en *P. chrysogenum* TA98 (Ullán *et al.*, 2008b) ha permitido determinar que actúa como un exportador de penicilinas hidrofílicas (Ullán *et al.*, 2008b). Además, la proteína CefM es esencial en la ruta de biosíntesis de cefalosporinas en *A. chrysogenum*, participando como un exportador de penicilina N desde el interior de algún tipo de microcuerpo (probablemente peroxisomas) hacia el citoplasma (Teijeira *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta todo esto, un incremento de la expresión de los genes *cefM* y *cefT*, provocaría una mayor secreción de penicilina N desde los microcuerpos al citoplasma y desde éste hacia el exterior celular. Debido a esto, la enzima DAC-expandasa/hidroxilasa quedaría sin suficiente sustrato para formar DAC

(Samson *et al.*, 1987), y por este motivo la DAC-acetiltransferasa quedaría sin DAC para formar CPC (Gutiérrez *et al.*, 1992). Este razonamiento explica el enlentecimiento en la producción de cefalosporinas en el transformante TDR 34.

El incremento en la expresión del gen *cefM* no afecta a la producción de cefalosporinas (Figuras 3.14 y 3.15), lo cuál es lógico ya que en las fermentaciones de *A. chrysogenum* se acumula penicilina N en los caldos de cultivo (Martin-Zanca y Martín, 1983; Nüesch *et al.*, 1987). Sin embargo, el hecho de que al final de la fermentación la producción de cefalosporinas de la cepa TDR 34 alcance a la de la cepa parental (Figuras 3.29 y 3.30) puede ser fruto de esta mayor expresión del gen *cefM*. La mayor disponibilidad de penicilina N en el citosol (a pesar de la mayor secreción de la misma) unido a que no se acumula intracelularmente (Figura 3.31) facilita su conversión en DAC y de ésta última en CPC. En conclusión podemos decir que el producto del gen *cefR* reprime la expresión de los genes *cefM* y *cefT* en *A. chrysogenum*.

12.3.- La inactivación dirigida del gen *cefR* acelera la expresión del gen *cefT3*.

El gen *cefT3* codifica una proteína de membrana de posible localización peroxisomal que parece estar implicada en el transporte de isopenicilina N desde el citosol hacia la matriz peroxisomal (Ullán RV, comunicación personal). El análisis de la hibridación de northern de la figura 3.41 muestra que mientras que en la cepa parental (*A. chrysogenum* C10) la expresión del gen *cefT3* aumenta a lo largo del tiempo, en la cepa TDR34 el máximo de expresión se alcanza a las 72 horas de fermentación. Este adelanto puede ser un efecto indirecto producto de la mayor secreción de penicilina N en el transformante TDR 34 (Figura 3.30 C y D) para incrementar la entrada de isopenicilina N al peroxisoma y por lo tanto la síntesis de penicilina N. En resumen, el incremento de la expresión del gen *cefT3* podría ser el resultado de la pérdida de penicilina N y no de la falta del gen *cefR* en el transformante TDR 34.

El análisis mediante HPLC de los caldos de cultivo del transformante interrumpido TDR 34 permitió determinar un incremento en la secreción de penicilinas, siendo penicilina N el isómero presente a partir de las 96 horas de fermentación (Figura 3.30). Para determinar si dicho aumento afectaba a la cantidad intracelular de penicilinas, se llevó a cabo un estudio de la cantidad intracelular de penicilinas mediante HPLC a las 96, 120 y 144 horas de fermentación. El resultado de dicho estudio mostró que en el transformante TDR 34, por un lado, el isómero presente era penicilina N, y que no se modificaba la cantidad intracelular de penicilina N (Figura 3.31). El incremento en la expresión del gen *cefM* no alteraba la cantidad intracelular de penicilinas (Figura 3.18), puesto que el sustrato a transportar, la penicilina N, tenía una síntesis limitada, al ser la conversión de IPN en PenN una etapa limitante en la ruta de biosíntesis de cefalosporinas (Ullán *et al.*, 2002b, 2004). Por tanto, es lógico pensar que si la inactivación del gen *cefR* provoca un incremento en la expresión del gen *cefM*, no se altere la cantidad intracelular de penicilina N. Además, en el transformante TDR 34 el incremento en la expresión del gen *cefT3* (Figura 3.45 A y C) puede aumentar la entrada de IPN en los microcuerpos compensando la pérdida de penicilina N hacia el exterior celular, consiguiendo más tarde alcanzar prácticamente los niveles de producción de cefalosporinas de la cepa parental C10.

12.4.- La interrupción del gen *cefR* altera de manera indirecta la expresión de los genes biosintéticos *pcbC* y *cefEF*.

Con el objeto de determinar si la inactivación dirigida del gen *cefR* afectaba a la expresión de los genes biosintéticos, se realizó un análisis de la expresión de los genes *pcbC* y *cefEF* mediante la técnica de northern (apartado 15.5 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos mostraron que se produce una menor expresión de ambos genes (*pcbC* y *cefEF*) a las 48 horas de fermentación, restableciéndose los niveles de transcrito de ambos conforme avanza el tiempo de fermentación. La inactivación del gen *cefR* provoca un enlentecimiento del crecimiento (Figura 3.29 A), lo que hace pensar que los cambios en la expresión génica mencionados puedan estar relacionados con dicho enlentecimiento (Figura 3.45 A, F y G), al existir en *A. chrysogenum* una clara conexión entre la morfogénesis y la biosíntesis de cefalosporinas (Hoff *et al.*, 2005).

13.- LA COMPLEMENTACIÓN EN *TRANS* DE LA CEPA TDR 34 CON EL GEN *cefR* NO RESTAURA LA SÍNTESIS DE CEFALOSPORINAS NI LA PIGMENTACIÓN DEL CALDO DE CULTIVO.

Para demostrar que los efectos observados sobre la producción de cefalosporinas, la secreción de penicilinas y los cambios en la expresión de los genes de secreción eran debidos únicamente a la interrupción del gen *cefR*, se llevó a cabo la complementación en *trans* del transformante interrumpido (TDR 34), como se indica en el apartado 10.1 de Resultados.

Los análisis tanto mediante bioensayo como mediante HPLC del caldo de cultivo del transformante TCR 42 complementado en *trans*, demostraron que no se restauraba ni la síntesis de cefalosporinas ni de penicilinas (Figuras 3.33 y 3.34). Además la curva de crecimiento de este transformante era idéntica a la del transformante TDR 34, encontrándose la curva de crecimiento retrasada así como la fase de lisis del micelio (Figura 3.29 A). Además los caldos de cultivo del transformante complementado TCR 42 no perdían la coloración amarillenta presente en los caldos de cultivo del transformante interrumpido en el gen *cefR*.

El hecho de que la complementación en *trans* con el gen *cefR* no fuera capaz de restaurar la mutación originada por la interrupción del gen *cefR*, sugería que para permitir la apropiada expresión de la proteína CefR tal vez, era necesaria la colaboración de alguna otra proteína adyacente. Como ya se indicó en el apartado 10.3 de Resultados, corriente arriba del gen *cefR* se localiza un marco de lectura abierto denominado *cefT3*. Para la complementación en *trans* de la mutación en el gen *cefT3* es necesario no sólo este gen sino también el gen *cefR* (Ullán RV, comunicación personal). Por este motivo, se llevó a cabo la complementación en *trans* con un fragmento de ADN de mayor tamaño que incluía al gen *cefT3* situado “aguas abajo” del gen *cefR* con el fin de determinar si dicha hipótesis era correcta.

14.- LA COMPLEMENTACIÓN EN *TRANS* CON LOS GENES *cefR* Y *cefT3* RESTAURA TOTALMENTE LA SÍNTESIS DE CEFALOSPORINAS Y LA PIGMENTACIÓN EN LOS CALDOS DE CULTIVO.

Con el objeto de demostrar si el gen *cefR* necesita la presencia del gen *cefT3* para ser funcional, se llevó a cabo la transformación de protoplastos de la cepa interrumpida TDR 34 con el plásmido pCR+T3 (Figura 2.6) que porta los genes *cefT3* y *cefR* bajo el control de sus propios promotores. Una vez realizada la transformación y la selección de los transformantes, se fermentaron en condiciones de producción de cefalosporinas, un transformante complementado con ambos genes TCRT3 34, el transformante interrumpido TDR 34 y la cepa parental C10.

El análisis de los antibióticos presentes en el caldo de cultivo de la cepa TCRT3 34 muestra que se restaura por completo la producción de cefalosporinas a los niveles de la cepa C10 (Figura 3.36). Por otro lado, el análisis de la producción de CPC mediante HPLC revela un incremento del mismo en la cepa TCRT3 34 con respecto a C10, al igual que ocurre en la cepa TSR 63 (Figura 3.43 A y B) (sobreexpresada en el gen *cefR*). Dicho incremento se sitúa en torno a un 55 % (Figura 3.37 A y B). Sin embargo, la secreción de penicilinas no se restaura a los niveles de la cepa control (C10), fruto probablemente de la introducción de copias adicionales del gen *cefT3*. Precisamente estas copias adicionales podrían explicar el hecho de que los análisis de la producción de cefalosporinas totales mediante bioensayo de la cepa TCRT3 34 muestren valores idénticos a los de la cepa C10 aunque haya una menor secreción de DAC. Esta menor secreción de DAC incrementaría la producción de CPC, lo cuál compensa el análisis de cefalosporinas mediante bioensayo en el que se valora la suma de DAC y CPC.

Por otro lado, en lo que respecta a la pigmentación amarillenta observada en los caldos de cultivo de los transformantes TDR 34 y TCR 42, desaparece en los caldos de cultivo de la cepa TCRT3 34 restaurándose la coloración observada en la cepa control C10. Este resultado nos indica que el producto del gen *cefR* está implicado de alguna manera en la regulación de la secreción de este pigmento y su ausencia hace que se excrete al medio de cultivo.

En conclusión, los genes *cefR* y *cefT3* son necesarios conjuntamente para restaurar tanto la producción de cefalosporinas como la pigmentación de los caldos de cultivo en la cepa interrumpida TDR 34, para lo que es necesaria la integración de una copia intacta de la región completa que englobe a ambos genes. La expresión del gen *cefT3* no parece depender estrictamente de la expresión del gen *cefR*, puesto que en el transformante interrumpido en el gen *cefR* se observa transcrito del gen *cefT3* (Figuras 3.45 A y C). Sin embargo, la expresión del gen *cefR* depende de la expresión del gen *cefT3* puesto que en el transformante interrumpido en el gen *cefT3* no se expresa el gen *cefR* (Ullán RV, comunicación personal). La existencia de un transcrito policistrónico que englobara a ambos genes explicaría el hecho de que sea necesario integrar un fragmento de ADN intacto para llevar a cabo la complementación en *trans* de la cepa interrumpida TDR 34. Las pruebas realizadas demostraron que este transcrito o no existe o es muy inestable y se procesa muy rápidamente (datos no mostrados). La explicación más lógica es que ambos genes den origen a transcritos monocistrónicos, a partir de promotores independientes.

15.- LA EXPRESIÓN DEL GEN *cefR* CONSTITUYE UN PASO LIMITANTE EN LA PRODUCCIÓN DE CEFALOSPORINAS EN *A. chrysogenum*.

La sobreexpresión del gen *cefR* se realizó, al igual que en el caso del gen *cefM*, mediante el incremento de su expresión utilizando un promotor de expresión fuerte en hongos como es el de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans* (Pgpd) (Gutiérrez *et al.*, 1997). El objetivo de esta sobreexpresión era determinar si la expresión del gen *cefR* es limitante en la producción de cefalosporinas en *A. chrysogenum*. Con este fin se construyó el plásmido pSCR, en el cual el promotor del gen *cefR* fue reemplazado por el promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *A. nidulans* y el fin de transcripción del gen lo marca el terminador de la citocromo oxidasa de *S. cerevisiae* (Tcyc1) (Russo *et al.*, 1991). Con el plásmido pSCR obtenido (Figura 2.7) se transformaron protoplastos de *A. chrysogenum* C10. Los transformantes obtenidos TSR 10 y TSR 63 fueron fermentados en condiciones de producción de cefalosporinas, analizándose mediante bioensayo y HPLC tanto la producción del producto final (CPC) como la de los diferentes intermediarios de la ruta. Los resultados mostraron un claro incremento en la producción de CPC y DAC [Figuras 3.42 (B y C) y 3.33 (A, B, E y F)] a tiempos tardíos de fermentación y una clara disminución en la secreción de penicilina N a lo largo de toda la fermentación. Por otro lado, la cantidad intracelular de penicilina N así como el crecimiento de los transformantes sobreexpresados no se vió alterada con respecto a la cepa parental control C10 [Figuras 3.38 A y 3.40 (A y B)].

Los datos de producción se pueden relacionar con el análisis de la expresión de los genes de secreción (*cefM*, *cefT* y *cefT3*) y biosintéticos (*pcbC* y *cefEF*). Así en el transformante sobreexpresado TSR 63 analizado (Figura 3.41) la expresión de los genes *cefM* y *cefT* se encuentra disminuída, lo cuál explica la menor salida de penicilina N hacia el exterior. Aunque la expresión del gen *cefM* se encuentra reducida en este transformante, es suficiente para conseguir una salida adecuada de penicilina N desde el interior de los microcuerpos hacia el citoplasma. De hecho, este transporte de penicilina N no es limitante para la producción de cefalosporinas, como demostró la sobreexpresión del gen *cefM* (Figuras 3.14 y 3.15), y aunque la expresión del gen *cefM* en la cepa parental es casi indetectable, es suficiente para producir cefalosporinas eficientemente. Al existir una menor salida de penicilina N al exterior celular mediante CefT y no modificarse la cantidad intracelular de la misma, dicho intermediario se dirige hacia la producción DAC y CPC. La expresión del gen *cefT3* se ve modificada debido a los cambios en las concentraciones de los intermediarios en el transformante sobreexpresado TSR 63. En un principio aumenta dicha expresión para aumentar el flujo de intermediarios hacia la formación de la penicilina N al existir una menor pérdida de este intermediario, disminuyendo una vez que los niveles de este intermediario son los suficientes para una formación eficiente de cefalosporinas (Figura 3.45 A y C).

Por otro lado, la disminución de la expresión de los genes de biosíntesis *pcbC* y *cefEF* se puede explicar debido a la menor salida de isopenicilina N y penicilina N (Figura 3.45 C), lo cuál hace que al existir una mayor disponibilidad de dichos intermediarios no sea necesario un nivel tan elevado de ambos transcritos. En conclusión, el incremento de la expresión del gen *cefR* disminuye la pérdida y el acúmulo de penicilina N, un hecho habitual en las fermentaciones de *A. chrysogenum*

(Martin-Zanca y Martín, 1983; Nüesch *et al.*, 1987), permitiendo una síntesis más eficiente de cefalosporinas.

16.- PAPEL DEL GEN *cefR* COMO UN MODULADOR DE TRANSPORTADORES DE β -LACTAMAS EN *A. chrysogenum*.

Las cefalosporinas son antibióticos β -lactámicos de gran importancia industrial en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio (bronquitis, neumonía), de la piel y del tracto urinario (Kalman y Barriere 1990). Además, el mercado de las cefalosporinas movió en el año 1996 en Estados Unidos la cifra de 3600 millones de dólares (Elander, 2003), lo cuál indica que el uso de estos antibióticos está ampliamente extendido. Por otro lado, existen también diversos mecanismos de resistencia a estos antibióticos debidos a la producción de β -lactamasas y a la alteración de la permeabilidad de la membrana de bacterias Gram negativas, que constituyen un serio problema desde el punto de vista clínico (Martens, 1989).

Los genes biosintéticos junto con las enzimas que codifican, han sido ampliamente estudiados, habiéndose caracterizado la ruta de biosíntesis de cefalosporinas en *A. chrysogenum* tanto bioquímica como genéticamente (Samson *et al.*, 1985, 1987; Gutiérrez *et al.*, 1991b; Gutiérrez *et al.*, 1992; Ullán *et al.*, 2002b). Sin embargo, existe un gran desconocimiento en cuanto a la localización de las enzimas y la secreción de los diferentes intermediarios y del producto final de la ruta. Se supone que todos los pasos de la ruta transcurren en el citoplasma celular al no existir una evidencia experimental que apoye lo contrario (van de Kamp *et al.*, 1999; Evers *et al.*, 2004). Los resultados presentados en esta memoria sugieren que, al menos, la etapa de epimerización de IPN en PenN está compartimentalizada, al ocurrir, probablemente, en microcuerpos concretamente en peroxisomas. La existencia de una compartimentalización de la ruta exige la presencia de proteínas transportadoras a través de las cuáles se produzcan la entrada de sustratos y la salida de productos entre los diferentes compartimentos (van de Kamp *et al.*, 1999; Evers *et al.*, 2004).

En organismos procariotas se han descrito diversos sistemas de secreción de antibióticos que implican a un conjunto de proteínas transportadoras encargadas de dicha función, y que también confieren resistencia a múltiples drogas, como son las proteínas de tipo MDR (Putman *et al.*, 2000). Este tipo de proteínas aparecieron primero en actinomicetos siendo posteriormente dispersadas a otras bacterias (Blanc *et al.*, 1995). Normalmente los genes de biosíntesis de un determinado antibiótico se encuentran en una misma agrupación génica, en la cuál también se localizan los genes encargados de su secreción (proteínas transportadoras) y los genes reguladores de la biosíntesis y el transporte (Martín y Liras, 1989).

Los sistemas de secreción bacterianos están regulados de forma transcripcional, tanto a nivel local como global, haciendo que existan unos niveles determinados de proteínas transportadoras, ya que un número excesivo de las mismas podría tener consecuencias incluso letales para la célula (Hickman *et al.*, 1990). Los reguladores locales suelen localizarse en la misma agrupación génica

junto con los genes biosintéticos y de secreción a los que modulan, mientras que los reguladores globales se sitúan en lugares diferentes del genoma donde controlan y coordinan procesos como la secreción de los antibióticos ante la respuesta a determinadas señales externas (Grkovic *et al.*, 2002). Es destacable el gran número de proteínas encargadas de la regulación de los sistemas de secreción de antibióticos y de drogas, indicando que es muy importante la adecuada expresión de las proteínas transportadoras según las condiciones ambientales (Grkovic *et al.*, 2001).

Por otro lado, en organismos eucariotas como los hongos, los sistemas de secreción que han sido mejor caracterizados están implicados en la resistencia a múltiples drogas, siendo muy escasos los casos descritos de proteínas transportadoras que participan en la secreción de antibióticos como son las proteínas AtrD en *A. nidulans* (Andrade *et al.*, 2000) o CefT en *A. chrysogenum* (Ullán *et al.*, 2002a, 2008). La presencia de compuestos tóxicos en el ambiente en el que se encuentran estos organismos ha enmascarado su posible función fisiológica anterior al haber hecho que estas proteínas evolucionaran en la secreción de estos tóxicos (Neyfakh, 1997).

Estos sistemas de secreción fúngicos están regulados principalmente por dos tipos de factores de transcripción como son las proteínas del cluster de zinc (Macpherson *et al.*, 2006) y las proteínas bZip para poder participar (Gulshan y Moye-Rowley, 2007), actuando ambos tipos de reguladores como activadores o represores, o incluso con ambas funciones dependiendo del organismo, las condiciones ambientales y la cascada concreto de regulación. En general, las proteínas del cluster de zinc regulan la expresión de transportadores de tipo ABC (Macpherson *et al.*, 2006), mientras que las proteínas bZip controlan a las proteínas transportadoras de la superfamilia MFS (Gulshan y Moye-Rowley, 2007).

En *A. chrysogenum* los genes de biosíntesis se encuentran en dos agrupaciones génicas llamadas “cluster temprano” (Skatrud y Queener, 1989; Skatrud, 1992; Gutiérrez *et al.*, 1991b; Ullán *et al.*, 2002b) y “cluster tardío” (Samson *et al.*, 1987; Gutiérrez *et al.*, 1992). Dentro del cluster temprano se encuentran otros genes encargados de la secreción de diferentes intermediarios como son los genes *cefM* (Teijeira *et al.*, 2009), *cefT* (Ullán *et al.*, 2002a) y *cefT3* (Ullán RV, Teijeira F, Martín JF, resultados no publicados) junto con el gen *cefR* que parece actuar como un modulador de la expresión de estos genes que codifican proteínas transportadoras de β -lactamas, según los resultados obtenidos en este trabajo. Así el gen *cefM* se localiza “aguas abajo” del gen *cefD1*, mientras que “aguas arriba” del gen *pcbAB* se localizan por este orden los genes ORF3, *cefT*, *cefT3* y *cefR* (Figura 4.12).

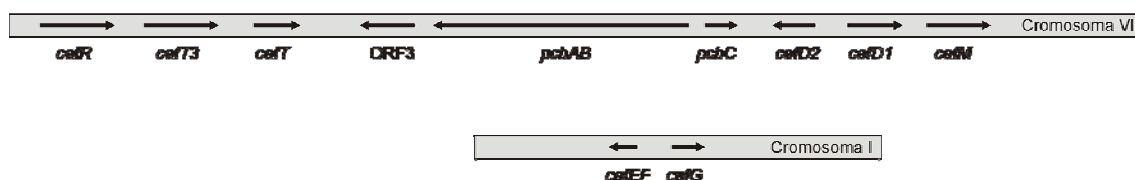


Figura 4.12. Organización de los genes de biosíntesis y de secreción de la ruta de biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum*.

Este conjunto de genes parece constituir un sistema de secreción de los diferentes intermediarios de la ruta de biosíntesis de cefalosporina C (Figura 4.13). En este sistema, la proteína

CefM parece estar implicada en el transporte de PenN desde el interior de los microcuerpos hacia el citoplasma celular (Teijeira *et al.*, 2009), como demuestran los resultados expuestos en la presente memoria. Por otro lado, la proteína CefT3 podría estar implicada en la entrada de isopenicilina N al interior de dichos microcuerpos como demuestran estudios realizados con este gen (Ullán RV, comunicación personal). De esta forma, las proteínas CefT3 y CefM estarían específicamente implicadas en el transporte del sustrato (IPN) y el producto (PenN) de la reacción enzimática catalizada por las proteínas CefD1 y CefD2 (Ullán *et al.*, 2002b) de posible localización en la matriz peroxisomal (Vaca-Cerezo, 2008). Por último, la proteína CefT se encontraría en la membrana plasmática (Nijland *et al.*, 2008) donde se encargaría de la exportación de IPN, PenN y DAC hacia el exterior celular (Ullán *et al.*, 2008b).

En este sistema de secreción de los intermediarios de la ruta de biosíntesis de CPC, la proteína CefR parece actuar como un modulador de la expresión de los genes que codifican estas proteínas transportadoras. En la figura 4.13 se muestra esquemáticamente una hifa de *A. chrysogenum* indicando el posible modelo de compartimentalización de la etapa de epimerización de IPN en PenN y la localización probable de los transportadores CefM, CefT y CefT3. También se indica el intermediario que secretan. En este modelo la proteína CefR actuaría regulando transcripcionalmente, al menos, a los transportadores CefT y CefM anteriormente citados. El análisis de la expresión de los genes de secreción mediante northern (Figura 3.45) sugiere que la proteína CefR actúa como un represor de la expresión de los genes *cefM* y *cefT*. Dicha regulación permite controlar la salida de PenN y DAC hacia el exterior celular, ejerciendo así un control indirecto de la síntesis de cefalosporinas ya que dichos intermediarios son sustratos de la expandasa-hidroxilasa (codificada por el gen *cefEF*) y de la DAC-acetiltransferasa (codificada por el gen *cefG*) respectivamente.

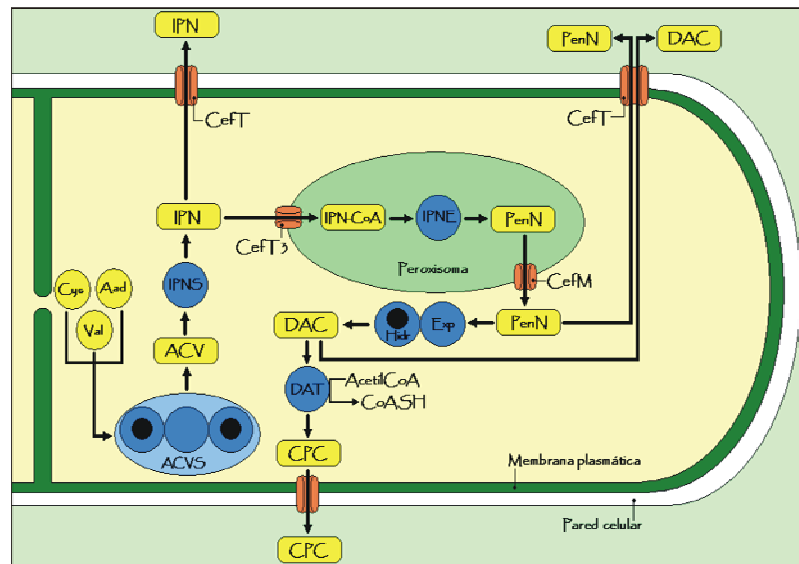


Figura 4.13. Modelo teórico de la compartimentalización de la ruta de biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum*. Papel de la proteína CefR como modulador de la expresión de los transportadores de β -lactamas CefM, CefT y CefT3. Aad: ácido L- α -aminoadípico; ACV: δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina; ACVS: ACV sintetasa; IPNS: isopenicilina N sintasa; IPNE: isopenicilina N epimerasa; Exp.: expandasa; Hidr.: hidroxilasa; DAT: desacetilcefalosporina C acetiltransferasa.

En cuanto al gen *cefT3* el hecho de que tanto la interrupción como la sobreexpresión del gen *cefR* tengan efectos similares en su expresión, nos permite intuir que dichos cambios podrían deberse a los desbalances de intermediarios originados en los cambios en la expresión del gen *cefR*.

El hecho de que los genes *cefR* y *cefT3* se encontraran adyacentes en el genoma hizo pensar que tal vez ambos genes se transcribieran en un único transcrito. Sin embargo, no se ha podido demostrar la presencia de dicho transcrito policistrónico. Asimismo los experimentos realizados para llevar a cabo la complementación *in trans* del transformante interrumpido TDR 34 pusieron de manifiesto una dependencia de ambos genes, puesto que la presencia de un fragmento de ADN que contenga los genes *cefT3* y *cefR* parece ser necesario para poder restaurar la producción de cefalosporinas, así como los efectos fenotípicos observados sobre el crecimiento y la pigmentación de los caldos de cultivo. Asimismo experimentos realizados mediante RT-PCR permitieron determinar que en el transformante interrumpido en el gen *cefT3* no se expresa el gen *cefR* (Ullán RV, comunicación personal), mientras que en el transformante interrumpido en el gen *cefR* sí que se expresa el gen *cefT3* (Figura 3.45).

Por otro lado, la presencia del dominio Fungal_trans en la proteína CefR apoya el que actúe como un modulador, puesto que este dominio se ha encontrado en diferentes factores de transcripción (Tabla 4.7), aunque no existe ninguna caracterización funcional descrita en la bibliografía (Shelest, 2008). Normalmente las proteínas que presentan este dominio poseen también otro dominio de unión al ADN (Shelest, 2008). Las predicciones bioinformáticas realizadas utilizando las herramientas BindN y DP-Bind indican que en la región amino terminal de la proteína se encontrarían residuos implicados en la unión al ADN.

Los factores de transcripción actúan regulando la expresión de genes que codifican proteínas transportadoras que integran diferentes sistemas de secreción a través de elementos reguladores localizados en sus promotores y que presentan diferentes tipos de secuencias más o menos conservadas (Toone y Jones, 1999; Macpherson *et al.*, 2006). En el caso de las proteínas MDR que participan en la resistencia a múltiples drogas, estos elementos reguladores se sitúan tanto en los promotores de los genes que codifican estas proteínas como en los promotores de los genes que codifican los factores de transcripción, de forma que se autorregulan, interaccionando en muchos casos con otras proteínas, por lo que se establecen complejas redes regulatorias (Toone y Jones, 1999; Macpherson *et al.*, 2006). En la tabla 4.8 se encuentran algunos ejemplos de este tipo de elementos reguladores de *C. albicans* y *S. cerevisiae* que participan en la regulación de la resistencia a múltiples drogas, indicándose en cada caso el tipo de elemento y su secuencia junto con el regulador que reconoce este elemento y la proteína transportadora a la que regula.

Elemento regulador y secuencia consenso	Microorganismo	Transportador	Regulador	Referencia
YRE (Yap1 Response Element) TTA(C/G)TAA	<i>S. cerevisiae</i>	Frl1p	Yap1p	Fernandes <i>et al.</i> , 1997
BRE (Benomil Response Element) TCCMMWTTWGKAAAKTYHCCG	<i>C. albicans</i>	Mdr1p	Cap1p	Rognon <i>et al.</i> , 2006
DRE (Drug Response Element) CGGA(A/T)ATCGGATATTTTTTTT	<i>C. albicans</i>	Cdr1p Cdr2p	Tac1p	de Micheli <i>et al.</i> , 2002
PDRE (Pleiotropic Drug Response Element) TCCGCGGA	<i>S. cerevisiae</i>	Pdr5p	Pdr1p Pdr3p	Delahodde <i>et al.</i> , 1995

Tabla 4.8. Elementos implicados en la regulación de la resistencia a múltiples drogas.

En las regiones promotoras de los genes *cefM*, *cefT*, *cefT3* y *cefR* no se encontró ninguna secuencia similar a la de los elementos reguladores de la resistencia a múltiples drogas presentados anteriormente. En la tabla 4.9 se indican los sitios de unión a diferentes factores de transcripción encontrados en los promotores de los genes anteriores, siendo algunos sitios comunes entre diferentes promotores. Estos sitios de unión se han identificado empleando la herramienta bioinformática Alibaba 2.1 disponible en la página web (http://darwin.nmsu.edu/~molb470/fall2003/Projects/solorz/aliBaba_2_1.htm). En dicha tabla se indican algunos de los sitios encontrados, los promotores en los que aparece y las características de los mismos.

Sitio de unión y promotor	Características
Sp1. Promotores de los genes <i>cefM</i> , <i>cefT</i> , <i>cefT3</i> y <i>cefR</i> .	Sitio de unión de la proteína estimuladora 1 con dedos de zinc de tipo C ₂ H ₂ necesaria para interaccionar con sitios GATA-1.
GCN4. Promotor del gen <i>cefR</i> .	Sitio de unión de la proteína de hongos AP-1 de la familia bZip.
AP-1. Promotores de los genes <i>cefM</i> y <i>cefR</i> .	Sitio de unión de la proteína activadora 1 de la familia bZip.
GATA-1. Promotores de los genes <i>cefM</i> y <i>cefR</i> .	Sitio de unión de la proteína con dedos de zinc C4 de la familia de factores GATA.
TFIIH. Promotores de los genes <i>cefT</i> y <i>cefT3</i> .	Sitio de unión de factores de transcripción con dedos de zinc de tipo C ₂ H ₂ de la familia de factores ubicuos.
GAL4. Promotor del gen <i>cefM</i> .	Sitio de unión de una proteína del cluster de zinc de reguladores del metabolismo de la galactosa en levaduras.
CRE BP1. Promotores de los genes <i>cefM</i> , <i>cefR</i> y <i>cefT</i> .	Sitio de unión de la proteína Cre que es un factor de tipo bZip de la subfamilia CRE-BP.

Tabla 4.9. Sitios de unión de diferentes factores de transcripción presentes en los promotores de los genes *cefM*, *cefT*, *cefT3* y *cefR*.

De los sitios encontrados en los diferentes promotores de los genes *cefM*, *cefT*, *cefT3* y *cefR*, cabe destacar la presencia de los sitios de unión a GCN4, GAL4, Cre-1 y GATA-1. Así el sitio de unión para GCN4 encontrado en el promotor del gen *cefR*, indica el posible papel de regulador de este gen en el metabolismo del nitrógeno y en la biosíntesis de algún aminoácido. Asimismo el sitio de unión para GAL4 en el promotor del gen *cefM* implica que puede participar en el transporte de carbohidratos, estando regulado por alguna proteína homóloga a Gal4 siendo esta regulación dependiente de la galactosa. Por otro lado, la presencia del sitio de unión para Cre-1 en los promotores de los genes *cefM*, *cefR* y *cefT* indica que estos genes pueden estar sometidos a una represión por catabolito. Este hecho tiene su lógica puesto que se ha descrito que aquellas fuentes de carbono que promueven un crecimiento rápido como la glucosa inhiben la síntesis de cefalosporinas (Martín-Zanca y Martín, 1983), estando ejercido dicho efecto a través de la proteína Cre1. Se han descrito sitios de unión para la proteína Cre1 para los genes biosintéticos *pcbC* y *cefEF*

(Jekosch y Kück, 2000). Parece lógico que tanto los genes de secreción como de biosíntesis implicados en la misma ruta estén sometidos a un mismo tipo de regulación: en presencia de glucosa que inhibe a los genes *pcbC* y *cefEF* a través del sistema Cre1, tampoco es necesario que se expresen los genes *cefM* y *cefT* ni el gen que los regula *cefR*, que estarían también regulados mediante el sistema Cre1. Este hecho implica nuevamente a estos genes con la ruta de biosíntesis de cefalosporinas. Por último, la presencia de sitios de unión para GATA-1 en los promotores de los genes *cefM* y *cefR* indica que ambos genes probablemente estén sometidos a una regulación por la fuente de nitrógeno, de tal forma que el nitrógeno presente en el medio reprimiría la expresión de los genes *cefM* y *cefR* al igual que la de los genes biosintéticos *pcbAB* y *pcbC*, a través de proteínas que funcionan como reguladores negativos que reconocen la secuencia GATA, disminuyendo finalmente la biosíntesis de cefalosporinas (Menne *et al.*, 1994; Brakhage *et al.*, 1998).

En conclusión, el análisis de las regiones promotoras de los genes *cefM*, *cefT*, *cefT3* y *cefR* indica que probablemente éstos formen parte de un sistema de secreción de los diferentes intermediarios de la ruta de biosíntesis de cefalosporinas, y que están sometidos a un control por parte de diferentes señales como son la fuente de carbono y de nitrógeno, que comparten con los diferentes genes de biosíntesis de cefalosporinas. Además los genes *cefR* y *cefM* descritos en la presente memoria estarían implicados en el metabolismo del nitrógeno (en el caso del gen *cefR*) y en el transporte de carbohidratos (en el caso del gen *cefM*). Esta afirmación se fundamenta en el hecho de que su inactivación además de provocar la alteración de la producción de cefalosporinas y la modificación de la expresión de genes de secreción y de biosíntesis, tenía otros efectos sobre el crecimiento y la secreción de un pigmento amarillento a los caldos de cultivo, observándose claramente el nexo de unión entre la morfogénesis y la producción de cefalosporinas (Schmitt *et al.*, 2004a).

Los estudios futuros deberían centrarse en caracterizar y comprobar mediante ensayos de retraso la unión de la proteína CefR tanto a los promotores de los diferentes genes de secreción como a su propio promotor y analizar mediante Western-blot la posible existencia de diferentes proteínas en las condiciones de producción de cefalosporinas analizadas. Por último, la localización *in vivo* de las diferentes proteínas derivadas del gen *cefR* junto con los ensayos de retraso nos permitiría saber dónde se encuentran y si a pesar de carecer de un claro dominio de unión al ADN actúan a nivel de núcleo o modulan de otro modo la expresión de los genes de secreción.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) El gen *cefM* de *Acremonium chrysogenum* codifica una proteína de 482 aminoácidos con un peso molecular deducido de 52,23 kDa. Esta proteína presenta alta homología con transportadores de la superfamilia MFS, y posee los dominios y motivos característicos de la familia 3 de estas proteínas.
- 2) La interrupción del gen *cefM* mediante doble recombinación homóloga, provoca tanto una alteración del crecimiento como una drástica reducción de la producción de cefalosporinas y la secreción de penicilinas, junto con un acúmulo intracelular de penicilina N.
- 3) La complementación en *trans* con el gen *cefM* restaura por completo la curva de crecimiento, la producción de cefalosporinas, la secreción de penicilinas, y los niveles intracelulares de penicilina N en los transformantes complementados.
- 4) La proteína CefM se localiza intracelularmente en microcuerpos de tamaño medio, posiblemente peroxisomas.
- 5) La proteína CefM es esencial en la biosíntesis de cefalosporinas, ya que participa en la secreción de penicilina N desde el interior de algún tipo de microcuerpos hacia el citoplasma celular.
- 6) El incremento de la expresión del gen *cefM* demuestra que el transporte de penicilina N desde el interior de microcuerpos hacia el citoplasma no es limitante en la ruta de biosíntesis de cefalosporinas.
- 7) Se ha clonado un fragmento de ADN *NotI* de 5,3 kb del “cluster” temprano de biosíntesis de cefalosporina C de *Acremonium chrysogenum*, en el que se encuentra el marco de lectura abierto del gen *cefR*. El marco de lectura abierto del gen *cefR* consta de 2221 pb y presenta 3 intrones.
- 8) El gen *cefR* codifica una proteína de 687 aminoácidos con un peso molecular deducido de 76,73 kDa. Esta proteína presenta homología con reguladores hipotéticos de diferentes hongos filamentosos y posee un dominio “Fungal_trans” característico de factores de transcripción fúngicos.
- 9) La interrupción del gen *cefR* mediante doble recombinación homóloga, origina un enlentecimiento del crecimiento y de la producción de cefalosporinas, junto con un aumento de la secreción de penicilina N y la aparición de una pigmentación amarillenta en los caldos de cultivo.

- 10) Los genes *cefR* y *cefT3* son necesarios para complementar la mutación del transformante interrumpido, restaurándose la curva de crecimiento, la pigmentación de los caldos de cultivo y la producción de cefalosporinas en los transformantes complementados.
- 11) El incremento de la expresión del gen *cefR* aumenta la secreción de cefalosporina C y disminuye la secreción de penicilina N.
- 12) El gen *cefR* actúa como un represor de los genes de secreción *cefM* y *cefT*, regulando el tránsito de penicilina N al citosol y al exterior celular respectivamente. Además ejerce efectos indirectos sobre la expresión de los genes de biosíntesis *pcbC* y *cefEF* y el gen de secreción *cefT3*.

ANEXO I

ANEXO I: Clasificación de la superfamilia MFS.

La superfamilia MFS se divide en 29 familias (Saier *et al.*, 1999). Cada familia reconoce y transporta una clase distinta de compuestos estructuralmente relacionados con igual especificidad de sustrato. Los miembros de cada familia presentan la misma especificidad de sustrato, al reconocer y transportar un determinado tipo de compuestos estructuralmente relacionados y diferentes de los que transportan otras familias.

- **Familia 1: Familia de proteínas portadoras de azúcar (SP):**

Esta familia engloba miembros que aparecen en bacterias, arqueas y eucariotas (levaduras, hongos, tripanosomas, plantas y animales) (Saier *et al.*, 1999). Se incluyen transportadores muy diversos en función y secuencia, aunque presentan dos residuos (G y E) que están conservados, sugiriendo que poseen un papel estructural o funcional muy importante. Desde el punto de vista filogenético existen dos “clusters” o agrupaciones: uno que engloba a los miembros de bacterias, plantas y animales, y otro a los representantes de hongos y levaduras. Actúan en condiciones fisiológicas mediante uniporte o simporte- H^+ . Si los sustratos a transportar están presentes en ambos lados de la membrana, el transporte puede ser mediante antiporte. Los sustratos transportados por la familia 1 son azúcares en general. Un ejemplo de esta familia es la proteína AraE de *E. coli* que codifica una arabinosa protón simporter (Maiden *et al.*, 1988).

- **Familia 2: Familia antiporter Droga: H^+ (DHA14):**

En esta familia se incluyen miembros que pertenecen a bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras y hongos (Paulsen *et al.*, 1996). Se caracterizan por poseer una topología de 14 TMS. Actúan mediante antiporte protón motriz y transportan específicamente algunas drogas, aunque el rango de sustratos reconocidos puede ser más amplio. Un ejemplo de esta familia es la proteína QacA de *Staphylococcus aureus* (Pao *et al.*, 1998).

- **Familia 3: Familia antiporter Droga: H^+ (DHA12):**

Agrupar a proteínas encontradas en levaduras, Gram negativos, Gram positivos, animales, humanos y arqueas. Es muy difícil determinar la especificidad de sustrato de los integrantes de esta familia. Un ejemplo de proteínas que pertenecen a esta familia es la proteína CefT de *A. chrysogenum* (Ullán *et al.*, 2002a).

- **Familia 4: Familia antiporter fosfato orgánico: fosfato inorgánico (OPA):**

Los miembros de esta familia aparecen en bacterias Gram negativas y Gram positivas y eucariotas (Pao *et al.*, 1998). Las proteínas de bacterias se agrupan en un “cluster” mientras que los miembros eucariotas forman otro. La gran diferencia que existe entre ambos, puede deberse a que después de la separación entre eucariotas y procariotas se produjo transmisión vertical desde procariotas a eucariotas. Posteriormente los eventos de duplicación génica provocaron las

diferencias entre los miembros de ambos grupos. Los integrantes de esta familia transportan azúcares fosforilados, glicerol fosfato y fosfoenolpiruvato. El mecanismo de transporte en condiciones fisiológicas parece ser el antiporte de un éster de organofosfato con un fosfato inorgánico. Aunque también pueden catalizar simporte protón motriz. Un ejemplo de esta familia es la proteína UhpT de *E. coli* (Pao *et al.*, 1998).

- **Familia 5: Familia simporter oligasacárido: H⁺ (OHS):**

Dentro de esta familia se incluyen transportadores que realizan simporte-H⁺ de bacterias Gram negativas. Poseen una organización topológica de 12 TMS y una región bien conservada. Un ejemplo de esta familia es la lactosa permeasa LacY de *E. coli* (Varela y Wilson, 1996).

- **Familia 6: Familia simporter metabolito: H⁺ (MHS):**

Aparecen en bacterias y actúan mediante H⁺-simporte. Poseen una topología de 12 TMS. Los metabolitos transportados por esta familia son compuestos variados que poseen un grupo carboxilo en su estructura. Algunas de las proteínas son específicas para los intermediarios del ciclo de Krebs. Un ejemplo de esta familia es la proteína KgtP de *E. coli* (Seol y Skatkin, 1991).

- **Familia 7: Familia simporter fucosa-galactosa-glucosa:H⁺ (FGHS):**

Incluye a proteínas de pequeño tamaño que pertenecen a bacterias, poseen una topología de 12 TMS y presentan una gran diversidad en su secuencia (Saier *et al.*, 1999). Un ejemplo de esta familia es la fucosa permeasa FucP de *E. coli* (Gunn *et al.*, 1994).

- **Familia 8: Familia porter nitrito-nitrato (NNP):**

Aparecen en bacterias Gram positivas y Gram negativas y en eucariotas como levaduras, plantas, hongos y algas (Slot y Hibbett, 2007). Se agrupan en dos “cluster”: uno que incluye a procariotas y otro que incluye a eucariotas. Las nitrito permeasas excretan su sustrato mientras que las nitrato permeasas lo captan del medio. Un ejemplo de esta familia sería la proteína CrnA de *A. nidulans* (Unkles *et al.*, 1991).

- **Familia 9: Familia simporte fosfato: H⁺ (PHS):**

Incluye únicamente a miembros de levaduras, plantas y hongos (Saier *et al.*, 1999). Todas las proteínas tienen un tamaño bastante similar y un grado muy elevado de similitud en su secuencia. Un ejemplo de esta familia incluye al transportador de fosfato Pho84 de *S. cerevisiae* (Bunn-Ya *et al.*, 1991).

- **Familia 10: Familia simporter nucleósido: H⁺(NHS):**

Incluye a proteínas que aparecen tanto en eucariotas (mamíferos y levaduras) como procariotas (*E. coli*) que son muy similares entre sí y que se han generado por duplicación génica de manera reciente en la escala evolutiva (Griffith y Jarvis, 1996; Mackey *et al.*, 1998). Su función es el transporte de nucleósidos. Como ejemplo de esta familia está la proteína NupG que es una xantosina permeasa (Xie *et al.*, 2004).

- **Familia 11: Familia antiporter oxalato: formiato (OFA):**

Esta familia está ampliamente distribuida en la naturaleza apareciendo en bacterias, eucariotas y arqueas si bien no existe mucha homología entre los transportadores que aparecen en unos organismos y en otros (Saier *et al.*, 1999). Transportan oxalato mediante antiporte con formiato. Constituye un ejemplo claro de esta familia la proteína OxIT de *Oxalobacter formigenes* (Fu y Maloney, 1997; Hirai y Subramaniam, 2004).

- **Familia 12: Familia simporter sialato: H⁺ (SHS):**

Incluye a proteínas de bacterias que transportan ácido siálico mediante simporte (Saier *et al.*, 1999). Un ejemplo sería NanT que codifica una ácido siálico permeasa de *E. coli* (Martínez *et al.*, 1995).

- **Familia 13: Familia porter monocarboxilato (MCP):**

Los miembros de esta familia aparecen tanto en eucariotas como en procariotas. Actúan mediante simporte protón motriz y transportan ácidos monocarboxílicos como son lactato, piruvato o mevalonato. Poseen una topología de 12 TMS. Un ejemplo de esta familia es la proteína AmcA de *A. nidulans* encargada del transporte de acetato, piruvato y algunas drogas como hidroxiurea, óxido 4-nitroquinolido o menadiona (Semighini *et al.*, 2004).

- **Familia 14: Familia simporter anión: catión (ACS):**

En esta familia se incluyen proteínas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza por lo que aparecen tanto en procariotas (bacterias Gram negativas y positivas) como en eucariotas (animales y hongos). Transportan aniones orgánicos como phtalato y tartrato (Crouzet y Otten, 1995). Un ejemplo de esta familia es la proteína ExuT de *E. coli*, un transportador de hexuronato (Portalier *et al.*, 1980).

- **Familia 15: Familia simporter ácidos aromáticos: H⁺ (AAHS):**

En esta familia las proteínas transportan ácidos aromáticos y están presentes en bacterias Gram negativas (Saier *et al.*, 1999). Un ejemplo es la proteína BenK de *Acinetobacter calcoaceticus* (Collier *et al.*, 1997).

- **Familia 16: Familia de transportadores de sideróforos de hierro (SIT):**

Esta familia de proteínas transportadoras evolucionó a partir de otra familia primordial de la superfamilia MFS con el fin de desempeñar una función especializada en levaduras (Saier *et al.*, 1999). Un ejemplo de proteínas de este tipo es el transportador SIT1 (Siderophore-Iron-Transport 1) de *S. cerevisiae* (gen Yel065w) (Lesuisse *et al.*, 1989), cuya función fisiológica es catalizar la entrada de complejos hierro-sideróforo hidroximato, en función de la disponibilidad de hierro. Esta levadura es capaz de utilizar sideróforos fúngicos y bacterianos de tipo hidroximatos aunque no los forma (Lesuisse *et al.*, 1989).

- **Familia 17: Familia de cianato permeasa (CP):**

Aparecen en bacterias y transportan cianato. Un ejemplo de esta familia lo constituye la proteína CynX de *E. coli* (Sung *et al.*, 1988).

- **Familia 18: Familia poliol permeasa (PPP):**

Aparecen en bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas y su función es el transporte de polioles. Este tipo de proteínas poseen 12 TMS organizados en dos tándem de 6 TMS separados por un lazo hidrofílico siendo las hélices α la estructura secundaria predominante. La región amino terminal del transportador es responsable de la especificidad de sustrato y las propiedades cinéticas del transporte, mientras que la región carboxilo terminal participa en el transporte del protón. Además se han encontrado aminoácidos implicados en la unión del azúcar a transportar tanto en la región amino como carboxilo terminal (Varela y Wilson, 1996). La proteína DalT de *Klebsiella pneumoniae* (Heuel *et al.*, 1997) que actúa mediante simporte protón motriz está implicada en la translocación de D-arabinitol y se incluye en esta familia.

- **Familia 19: Familia de transportadores de cationes orgánicos (OCT):**

Característicos de mamíferos, son transportadores de cationes orgánicos y aniones, siendo similares a las proteínas de la familia 1 (proteínas portadoras de azúcar). Se caracterizan por poseer 12 TMS altamente conservados, que están organizados de la forma 1+5+6 TMS y separados por lazos hidrofílicos con estructura secundaria en α hélice menos conservados. La proteína Oct de *Pseudopleuronectes americanus* constituye un ejemplo de proteínas de esta familia estando implicada en el transporte (a nivel renal) de cationes orgánicos y aniones (Koepsell, 1998).

- **Familia 20: Familia de transportadores implicados en la secreción de azúcares (SET):**

Son proteínas bacterianas implicadas en el transporte de moléculas hidrofílicas mediante antiporte H^+ -motriz. Poseen una amplia especificidad de sustrato y cuentan con una topología de 12 TMS. Tanto el extremo amino como el carboxilo terminal quedan en el citoplasma. Los lazos inter TMS citoplasmáticos son más largos que los lazos inter TMS periplásmicos. Además, la región

amino terminal de estos transportadores está más conservada que la región carboxilo terminal y están constituidas fundamentalmente por hélices α (Saier *et al.*, 1999). La proteína SetA de *E. coli* pertenece a esta familia y está implicada en el transporte de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido), lactosa y glucosa (Liu *et al.*, 1999).

- **Familia 21: Familia antiporter Droga: H⁺ (DHA3):**

Aparecen fundamentalmente en bacterias Gram positivas y participan en la secreción de drogas mediante un mecanismo antiporte protón motriz. Poseen 12 TMS, estando mejor conservados los segmentos transmembranales que los lazos inter TMS (Saier *et al.*, 1999). Un ejemplo de esta familia es la proteína MefA de *Streptococcus pyogenes* (Clancy *et al.*, 1996) encargada del transporte de macrólidos.

- **Familia 22: Familia de transportadores de neurotransmisores vesiculares (VNT):**

En esta familia se encuadran transportadores vesiculares de neurotransmisores antes incluidos dentro de la familia 1 (SP). Un ejemplo dentro de esta familia es la proteína SV2 de *Homo sapiens* (Bajjalieh *et al.*, 1992) que posee una topología de 12 TMS.

- **Familia 23: Familia de transportadores de sales biliares conjugadas (BST):**

Son proteínas con 12 TMS encargadas del transporte de sales biliares conjugadas, como es el caso de la proteína Bsh de *Lactobacillus johnsonii* (Elkins y Savage, 1998).

- **Familia 24: Familia de transportadores desconocidos 1 (UMF-1):**

Esta familia está constituida únicamente por dos proteínas de levaduras, Aut4p y Atg22p, de *S. cerevisiae* y *S. pombe* (Suriapranata *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2006; 2007) respectivamente, junto con una proteína de *Bacillus subtilis* denominada YxiO (Begley *et al.*, 2002). Son proteínas de un tamaño similar que poseen 12 TMS organizados de la forma 4+2+6, siendo los lazos entre los segmentos transmembranales 4-5 y 6-7 intercitoplasmáticos y los lazos entre los segmentos transmembranales 1-2 extracitoplasmáticos. Los extremos tanto carboxilo como amino terminales de estas proteínas son hidrofílicos. Sin embargo, la región carboxilo terminal está más conservada que la región amino terminal.

- **Familia 25: Familia de transportadores péptido-acil-CoA (PAT):**

Esta familia engloba a miembros de bacterias, levaduras y animales. Este tipo de transportadores secundarios actúan mediante antiporte acilCoA: CoA. Las proteínas poseen un tamaño entre 425-632 aminoácidos siendo los transportadores de procariotas unos 100 aminoácidos más pequeños que los de eucariotas. Presentan 12 TMS organizados en dos tándem de 6 segmentos transmembranales (Saier *et al.*, 1999). Un ejemplo de esta familia es AcCoAT

[antiporter de acetilcoenzima A: CoA de la membrana de retículo endoplasmático de *H. sapiens* (Kanamori *et al.*, 1997)].

- **Familia 26: Familia de transportadores desconocidos 2 (UMF-2):**

Dentro de esta familia se encuentra la proteína bacteriana YfkF de *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997). Poseen una topología de 12 TMS y su función es desconocida.

- **Familia 27: Familia fenilpropionato permeasa (PPP):**

Esta familia está formada únicamente por una fenilpropionato permeasa de *E. coli* (Diaz *et al.*, 1998) que posee una topología de 12 TMS y transporta 3-fenilpropionato.

- **Familia 28: Familia de transportadores desconocidos 3 (UMF-3):**

Son proteínas de función desconocida que poseen 12 TMS. Un ejemplo es el receptor C de superficie del virus que induce leucemia en felinos del subgrupo C (Tailor *et al.*, 1999).

- **Familia 29: Familia de transportadores desconocidos 4 (UMF-4):**

Esta familia está formada únicamente por proteínas de arqueas que poseen 12 TMS como una proteína desconocida de *Archaeoglobus fulgidus*.

Además de estas familias existen otras cinco familias de transportadores cuyos miembros están menos relacionados con la superfamilia MFS (Saier *et al.*, 1999). Esta amplia clasificación indica la gran diversidad de proteínas que se incluyen en la superfamilia MFS de transportadores. De hecho, la mayor parte de los transportadores secundarios encontrados en la naturaleza pertenecen a esta superfamilia.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A

Abraham E (1990). Selective reminiscences of beta-lactam antibiotics: early research on penicillin and cephalosporins. *Bioessays*. 12(12):601-606.

Abraham EP, Newton GGF, Crawford K, Burton HS, Hale CW (1953). Cephalosporin N: a new type of penicillin N. *Nature* 171: 343.

Adams DJ (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150(Pt 7):2029-35.

Aharonowitz Y, Cohen G, Martín JF (1992). Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:461-95.

Akache B, MacPherson S, Sylvain MA, Turcotte B (2004). Complex interplay among regulators of drug resistance genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279(27):27855-60.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2007). *Molecular Biology of the Cell*. Fifth Edition. Garland Science, London.

Alonso J, Barredo JL, Díez B, Mellado E, Salto F, García JL, Cortés E (1998). D-amino-acid oxidase gene from *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*) ATCC 26217. *Microbiology*. 144 (Pt 4): 1095-101.

Álvarez E, Meesschaert B, Montenegro E, Gutierrez S, Díez B, Barredo JL, Martín JF (1993). The isopenicillin-N acyltransferase of *Penicillium chrysogenum* has isopenicillin-N amidohydrolase, 6-aminopenicillanic acid acyltransferase and penicillin amidase activities, all of which are encoded by the single *penDE* gene. *Eur. J. Biochem.* 215(2):323-32.

Alvi KA, Reeves CD, Peterson J, Lein J (1995). Isolation of a new cephem compound from *Penicillium chrysogenum* strains expressing deacetoxycephalosporin C synthase activity. *J. Antibiot.* 48: 338-340.

Andrade AC, Van Nistelrooy JG, Peery RB, Skatrud PL, De Waard MA (2000). The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production. *Mol. Genet. Genomics*. 263(6):966-77.

Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74(12):5350-4.

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 22(2):195-201.

Asano Y, Hagiwara D, Yamashino T, Takeshi M (2007). Characterization of the bZip-type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (7), 1800-1803.

B

Baldwin JE, Abraham E (1988). The biosynthesis of penicillins and cephalosporins. *Nat. Prod. Rep.* 5(2):129-45.

Baldwin JE, Keeping JW, Singh PD, Vallejo CA (1981). Cell-free conversion of isopenicillin N into deacetoxycephalosporin C by *Cephalosporium acremonium* mutant M-0198. *Biochem. J.* 194(2):649-51.

Bajjalieh SM, Peterson K, Shinghal R, Scheller RH (1992). SV2, a brain synaptic vesicle protein homologous to bacterial transporters. *Science*. 257(5074):1271-3.

Barber MS, Giesecke U, Reichert A, Minas W (2004). Industrial enzymatic production of cephalosporin-based β -lactams. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 88: 179-215.

Barredo JL, Cantoral JM, Alvarez E, Díez B, Martín JF (1989a). Cloning, sequence analysis and transcriptional study of the isopenicillin N synthase of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78. *Mol. Gen. Genet.* 216(1):91-8.

Barredo JL, van Solingen P, Díez B, Álvarez E, Cantoral JM, Kattevilder A, Smaal EB, Groenen MA, Veenstra AE, Martín JF (1989b). Cloning and characterization of the acyl-coenzyme A: 6-aminopenicillanic-acid-acyltransferase gene of *Penicillium chrysogenum*. *Gene*. 83(2):291-300.

- Bartoshevich YuE, Zaslavskaya PL, Novak MJ, Yudina OD** (1990). *Acromonium chrysogenum* differentiation and biosynthesis of cephalosporin. *J. Basic Microbiol.* 30(5):313-20.
- Begley M, Gahan CG, Hill C** (2002). Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12):6005-12.
- Berdy J** (1980). Bleomycin type antibiotics. En: Amino acid and peptide antibiotics. Handbook of antibiotic compounds. Boca Raton FL (Ed.). CRC Press., vol. IV, pp. 459-491.
- Bhat PJ, Murthy TV** (2001). Transcriptional control of the GAL/MEL regulon of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of galactose-mediated signal transduction. *Mol. Microbiol.* 40(5):1059-66.
- Bidlingmaier S, Weiss EL, Seidel C, Drubin DG, Snyder M**. The Cbk1p pathway is important for polarized cell growth and cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 21(7):2449-62.
- Blanc V, Salah-Bey K, Folcher M, Thompson CJ** (1995). Molecular characterization and transcriptional analysis of a multidrug resistance gene cloned from the pristinamycin-producing organism, *Streptomyces pristinaespiralis*. *Mol. Microbiol.* 17(5):989-99.
- Bowman SM, Free SJ** (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays.* 28(8):799-808.
- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Brotzu G** (1948). Recherche su di un nuovo antibiotico. *Lav. Ist. d'Igiene Cagliari.* 1-11.
- Büchi G, White JD, Wogan N** (1965). The structures of mitorubin and mitorubinol. *J. Am. Chem. Soc.* 87(15): 3484-3489.
- Bun-Ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y** (1991). The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol. Cell. Biol.* 1991 11(6):3229-38.
- Burger G, Strauss J, Scazzocchio C, Lang BF** (1991). *nirA*, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Mol. Cell. Biol.* 11(11):5746-55.
- Burton HS, Abraham EP** (1951). Isolation of antibiotics from a species of *Cephalosporium*. Cephalosporins P1, P2, P3, P4 and P5. *Biochem. J.* 50:164-174.
- ## C
- Caltrider PG, Niss HF** (1966). Role of methionine in cephalosporin synthesis. *Appl. Microbiol.* 14(5):746-53.
- Carr LG, Skatrud PL, Scheetz ME, Queener SW, Ingolia TD** (1986). Cloning and expression of the isopenicillin N synthetase gene from *Penicillium chrysogenum*. *Gene.* 48(2-3):257-66.
- Casqueiro J, Gutiérrez S, Bañuelos O, Hijarrubia MJ, Martín JF** (1999). Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction. *J. Bacteriol.* 181(4):1181-8.
- Chang G** (2003). Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Lett.* 555(1):102-5.
- Chin HS, Sim J, Seah KI, Sim TS** (2003). Deacetoxycephalosporin C synthase isozymes exhibit diverse catalytic activity and substrate specificity. *FEMS Microbiol. Lett.* 218(2):251-7.
- Chomczynski P, Sacchi N** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162(1):156-9.
- Chung YJ, Saier MH Jr** (2001). SMR-type multidrug resistance pumps. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 4(2):237-45.
- Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath AV, Bergeron J, Retsema JA** (1996). Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* 22(5):867-79.
- Clutterbuck PW, Lovell R, Raistrick H** (1932). Studies in the biochemistry of micro-organisms: The formation from glucose by members of the *Penicillium chrysogenum* series of a pigment, an alkali-soluble protein and penicillin-the antibacterial substance of Fleming. *Biochem. J.* 26(6):1907-18.

- Codner RC, Polatt BC** (1959). Light-induced production of carotenoid pigments by *Cephalosporia*. *Nature*. 184 (Suppl 10): 741-742.
- Cohen G, Argaman A, Schreiber R, Mislovati M, Aharonowitz Y** (1994). The thioredoxin system of *Penicillium chrysogenum* and its possible role in penicillin biosynthesis. *J. Bacteriol.* 176(4):973-84.
- Cole L, Orlovich DA, Ashford AE** (1998). Structure, function, and motility of vacuoles in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 24(1-2):86-100.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG** (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 258(5088):1650-4.
- Collier LS, Nichols NN, Neidle EL** (1997). *benK* encodes a hydrophobic permease-like protein involved in benzoate degradation by *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* 179(18):5943-6.
- Collins CM, Hall RM** (1985). Identification of a Tn5 determinant conferring resistance to phleomycins, bleomycins and tallysomycins. *Plasmid*. 14:143-151.
- Connerton IF, Fincham JRS, Sanderman RA, Hynes MJ** (1990). Comparison and cross-species expression of the acetyl-CoA synthetase genes of the ascomycete fungi, *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 4: 451-460.
- Coque JJ, Martin JF, Liras P** (1993). Characterization and expression in *Streptomyces lividans* of *cefD* and *cefE* genes from *Nocardia lactamdurans*: the organization of the cephamycin gene cluster differs from that in *Streptomyces clavuligerus*. *Mol. Gen. Genet.* 236(2-3):453-8.
- Couture L, Nash JA, Turgeon J** (2006). The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. *Pharmacol. Rev.* 58(2):244-58.
- Crawford K, Heatley NG, Boyd PF, Hale CW, Kelley BK, Miller GA, Smith N** (1952). Antibiotic production by a species of *Cephalosporium*. *J. Gen. Microbiol.* 6(1-2):47-59.
- Crawford L, Stepan AM, McAda PC, Rambosek JA, Conder MJ, Vinci VA, Reeves CD** (1995). Production of cephalosporin intermediates by feeding adipic acid to recombinant *Penicillium chrysogenum* strains expressing ring expansion activity. *Biotechnology (N Y)*. 13(1):58-62.
- Croop JM** (1998). Evolutionary relationships among ABC transporters. *Methods Enzymol.* 292:101-16.
- Crouzet P, Otten L** (1995). Sequence and mutational analysis of a tartrate utilization operon from *Agrobacterium vitis*. *J. Bacteriol.* 177(22):6518-26.
- ## D
- Davies J** (1990). What are antibiotics? Archaic functions for modern activities. *Mol. Microbiol.* 4(8):1227-32.
- Dayhoff MO, Barker WC, Hardman JK** (1976). Atlas of protein sequencing and structure. National Biomedical Research Foundation, Washington DC, vol 5, pp: 53-66.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G** (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* 42(7):1007-17.
- Decottignies A, Goffeau A** (1997). Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat. Genet.* 15(2):137-45.
- Deeley RG, Westlake C, Cole SP** (2006). Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol. Rev.* 86(3):849-99.
- del Carmen Mateos R, Sánchez S** (1990). Transport of neutral amino acids and penicillin formation in *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1713-1716
- Delahodde A, Delaveau T, Jacq C** (1995). Positive autoregulation of the yeast transcription factor Pdr3p, which is involved in control of drug resistance. *Mol. Cell. Biol.* 15(8):4043-51.
- Delepelaire P, Wandersman C** (1991). Characterization, localization and transmembrane organization of the three proteins PrtD, PrtE and PrtF necessary for protease secretion by the gram-negative bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* 5(10):2427-34.
- del Sorbo G, Schoonbeek H, de Waard MA** (2000). Fungal transporters involved in efflux of

natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet. Biol.* 30(1):1-15.

Demain AL (1963b). Biosynthesis of cephalosporin C and its relation to penicillin formation. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 25:731-40.

Demain AL (1983). Biosynthesis of β -lactam antibiotics. En "Antibiotics containing the β -lactam structure". Demain AL, Solomon NA (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp: 189-228.

Demain AL, Elander RP (1999). The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek.* 75(1-2):5-19.

Demain AL, Kennel YM, Aharonowitz Y (1979). Carbon catabolite regulation of secondary metabolism. En: "Microbial technology: current state, future prospects". Bull AT, Ellwood DC, Ratledge C (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, vol 29, pp. 163-185.

Demain AL, Newkirk JF, Hendlin D (1963a). Effect of methionine, norleucine, and lysine derivatives on cephalosporin C formation in chemically defined media. *J. Bacteriol.* 85:339-44.

Demain AL, Zhang J (1998). Cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium*. the methionine story. *Crit. Rev. Biotechnol.* 18(4):283-94.

Dementhon K, Saupe SJ, Clavé C (2004). Characterization of IPI-4, a bZIP transcription factor inducing autophagy and cell death in the fungus *Podospora anserina*. *Mol. Microbiol.* 53 (6): 1625-1640.

de Micheli M, Bille J, Schueller C, Sanglard D (2002). A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol. Microbiol.* 43(5):1197-214.

de Waard MA, Andrade AC, Hayashi K, Schoonbeek HJ, Stergiopoulos I, Zwieters LH (2006). Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest. Manag. Sci.* 62(3):195-207.

Díaz E, Ferrández A, García JL (1998). Characterization of the hca cluster encoding the dioxygenolytic pathway for initial catabolism of 3-phenylpropionic acid in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* (11):2915-23.

Díez B, Gutiérrez S, Barredo JL, van Solingen P, van der Voort LH, Martín JF (1990). The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. *J. Biol. Chem.* 265(27):16358-65.

Díez B, Velasco J, Marcos AT, Rodríguez M, de la Fuente JL, Barredo JL (2000). The gene encoding gamma-actin from the cephalosporin producer *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 786-791.

Doolittle RF, Anderson KL, Feng DF (1989). Estimating the prokaryote-eukaryote divergence time from protein sequences. En: "The Hierarchy of life". Fernholm B, Bremer K, Jornvall H (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 73-85.

Doolittle RF, Feng DF, Johnson MS, McClure MA (1986). Relationships of human protein sequences to those of other organisms. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 (Pt 1):447-55.

Dotzlaf JE, Yeh WK (1987). Copurification and characterization of deacetoxycephalosporin C synthetase/hydroxylase from *Cephalosporium acremonium*. *J. Bacteriol.* 169(4):1611-8.

Drew SW, Demain AL (1973). Methionine control of cephalosporin C formation. *Biotechnol. Bioeng.* 15(4):743-54.

Dreyer J, Eichhorn H, Friedlin E, Kümsteiner H, Kück U (2007). A homologue of the *Aspergillus* velvet gene regulates both cephalosporin C biosynthesis and hyphal fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(10):3412-22.

Drocourt D, Camels T, Reynes JP, Baron M, Tiraby G (1990). Cassettes of the *Streptoalloteicus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 18:4009.

E

Elander RP (2003). Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61(5-6):385-92.

Elkins CA, Savage DC (1998). Identification of genes encoding conjugated bile salt hydrolase and transport in *Lactobacillus johnsonii* 100-100. *J. Bacteriol.* 180(17):4344-9.

- Ehrlich KC, Montalbano BG, Cary JW** (1999). Binding of the C6-zinc cluster protein, AfIR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. *Gene*. 230(2):249-57.
- Erdmann R, Blobel G** (1996). Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *J. Cell. Biol.* 135(1):111-21.
- Esmahan C, Alvarez E, Montenegro E, Martín JF** (1994). Catabolism of lysine in *Penicillium chrysogenum* leads to formation of 2-amino adipic acid, a precursor of penicillin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(6):1705-10.
- Etxebeste O, Ni M, Garzia A, Kwon N-K, Fischer R, Yu J-H, Espeso EA, Ugalde U.** Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell*. 7(1): 38-48.
- Evers ME, Trip H, van den Berg MA, Bovenberg RA, Driessen AJ** (2004). Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotics biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 88:111-35.
- F**
- Fang Y, Morrell JC, Jones JM, Gould SJ** (2004). PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J. Cell. Biol.* 164(6):863-75.
- Fath MJ, Kolter R** (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57(4):995-1017.
- Feinberg AP, Vogelstein B** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132(1):6-13.
- Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K** (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell. Biol.* 17(12):6982-93.
- Fernández FJ, Cardoza RE, Montenegro E, Velasco J, Gutiérrez S, Martín JF** (2003). The isopenicillin N acyltransferases of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum* differ in their ability to maintain the 40-kDa alpha heterodimer in an undissociated form. *Eur. J. Biochem.* 270(9):1958-68.
- Fernández-Ábalos JM, Fox H, Pitt C, Wells B, Doonan JH** (1998). Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 27(1):121-30.
- Florey HW** (1955). Antibiotic products of a versatile fungus. *Ann. Intern. Med.* 43(3):480-90.
- Fransen M, Wylin T, Brees C, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP** (2001). Human pex19p binds peroxisomal integral membrane proteins at regions distinct from their sorting sequences. *Mol. Cell. Biol.* 21(13):4413-24.
- Fu D, Maloney PC** (1997). Evaluation of secondary structure of OxIT, the oxalate transporter of *Oxalobacter formigenes*, by circular dichroism spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 272(4):2129-35.
- Fulda M, Schnurr J, Abbadi A, Heinz E, Browse J** (2004). Peroxisomal Acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 16(2):394-405.
- Fujiki Y, Matsuzono Y, Matsuzaki T, Fransen M** (2006). Import of peroxisomal membrane proteins: the interplay of Pex3p- and Pex19p-mediated interactions. *Biochim. Biophys. Acta*. 1763(12):1639-46.
- Fujisawa Y, Kanzaki T** (1975). Occurrence of a new cephalosporinate in a culture broth of a *Cephalosporium acremonium* mutant. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 28(5):372-8.
- G**
- Gams W** (1971). *Cephalosporium*-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Fischer Verlag G (Ed.). Stuttgart, 262 pp.
- García-Estrada C, Vaca I, Lamas-Maceiras M, Martín JF** (2007). In vivo transport of the intermediates of the penicillin biosynthetic pathway in tailored strains of *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76(1):169-82.
- García-Rico RO, Fierro F, Mauriz E, Gómez A, Fernández-Bodega MA, Martín JF** (2008). The heterotrimeric Galpha protein pga1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology*. 154(Pt 11):3567-78.

- Genilloud O, Garrido MC, Moreno F** (1984). The transposon Tn5 carries a bleomycin-resistance determinant. *Gene* 32:225-233.
- Glaser P, Sakamoto H, Bellalou J, Ullmann A, Danchin A** (1988). Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 7(12):3997-4004.
- Glenn AE, Bacon CW, Price R, Hanlin RT** (1996). Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia*. 88:369-383.
- Gottesman MM, Pastan I** (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62:385-427.
- Gottesman MM, Pastan I, Ambudkar SV** (1996). P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6(5):610-7.
- Gounalaki N, Thireos G** (1994). Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response. *EMBO J.* 13(17):4036-41.
- Gouka RJ, van Hartingsveldt W, Bovenberg RAL, van Zeijl CMJ, van den Hondel CAMJJ, van Gorcom RFM** (1993) Development of a new transformant selection system for *Penicillium chrysogenum*: isolation and characterization of the *P. chrysogenum* acetyl-coenzyme A synthetase gene (*facA*) and its use as a homologous selection marker. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 38:514-519.
- Gow NAR, Gadd GM** (1995). The Growing Fungus. Gow NAR, Gadd GM (Eds). Chapman & Hall, London.
- Griffin DH** (1996). Fungal physiology. Wiley J y Sons (Eds). New York.
- Griffith JK, Baker ME, Rouch DA, Page MG, Skurray RA, Paulsen IT, Chater KF, Baldwin SA, Henderson PJ** (1992). Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4(4):684-95.
- Griffith DA, Jarvis SM** (1996). Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1286(3):153-81.
- Grkovic S, Brown MH, Skurray RA** (2001). Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 12(3):225-37.
- Grkovic S, Brown MH, Skurray RA** (2002). Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(4):671-701.
- Groom KR, Heyman HC, Steffen MC, Hawkins L, Martin NC** (1998). *Kluyveromyces lactis* SEF1 and its *Saccharomyces cerevisiae* homologue bypass the unknown essential function, but not the mitochondrial RNase P function, of the *S. cerevisiae* RPM2 gene. *Yeast*. 14(1):77-87.
- Guarro J, Gams W, Pujol I, Gené J** (1997). *Acremonium* species: new emerging fungal opportunists—in vitro antifungal susceptibilities and review. *Clin. Infect. Dis.* 25:1222-1229.
- Guarro J, Gené J, Stchigel AM** (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(3):454-500.
- Gunn FJ, Tate CG, Henderson PJ** (1994). Identification of a novel sugar-H⁺ symport protein, FucP, for transport of L-fucose into *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 12(5):799-809.
- Gulshan K, Moye-Rowley WS** (2007). Multidrug resistance in fungi. *Eukaryot. Cell.* 6(11):1933-42.
- Gutiérrez S** (1994). Tesis Doctoral. "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".
- Gutiérrez S, Díez B, Álvarez E, Barredo JL, Martín JF** (1991a). 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(1):56-64.
- Gutiérrez S, Díez B, Montenegro E, Martín JF** (1991b). Characterization of the *Cephalosporium acremonium pcbAB* gene encoding alpha-aminoadipyl-cysteinyl-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, Fierro F, Casqueiro J, Martín JF** (1999). Gene organization and plasticity of the beta-lactam genes in different filamentous fungi. *Antonie van Leeuwenhoek.* 75(1-2):81-94.

Gutiérrez S, Velasco J, Fernández FJ, Martín JF (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, Velasco J, Marcos AT, Fernández FJ, Fierro F, Barredo JL, Díez B, Martín JF (1997). Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48(5):606-14.

H

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*. DNA cloning: a practical approach. Glover DM (Ed.). IRL Press, Oxford, pp. 109-135.

Heiland I, Erdmann R (2005). Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J.* 272(10):2362-72.

Hellauer K, Akache B, MacPherson S, Sirard E, Turcotte B (2002). Zinc cluster protein Rdr1p is a transcriptional repressor of the PDR5 gene encoding a multidrug transporter. *J. Biol. Chem.* 277(20):17671-6.

Henderson PJ, Maiden MC (1990). Homologous sugar transport proteins in *Escherichia coli* and their relatives in both prokaryotes and eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 326(1236):391-410.

Henriksen CM (1996). Metabolic characterization of *Penicillium chrysogenum*. PhD thesis. Technical University of Denmark, Lyngby.

Henriksen CM, Nielsen J, Villadsen J (1998). Cyclization of α -amino adipic acid into the δ -lactam 6-oxopiperidine-2-carboxylic acid by *Penicillium chrysogenum*. *J. Antibiot.* 51: 99-106.

Hensel R, Zwickl P, Fabry S, Lang J, Palm P (1989). Sequence comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the three kingdoms: evolutionary implication. *Can. J. Microbiol.* 35(1):81-5.

Herbasch GJM, van der Beek CP, van Dijk PWM (1984). The penicillins: properties, biosynthesis and fermentation. En: "Biotechnology of industrial antibiotics". Vandamme E (Ed.). Marcel Dekker, New York.

Hettema EH, Tabak HF (2000). Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1486(1):18-27.

Hettema EH, van Roermund CW, Distel B, van den Berg M, Vilela C, Rodrigues-Pousada C, Wanders RJ, Tabak HF (1996). The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15(15):3813-22.

Hetzberg RP, Caranfa MJ, Hecht SM (1985). DNA methylation diminishes bleomycin-mediated strand scission. *Biochemistry.* 24:5285-5289.

Heuel H, Turgut S, Schmid K, Lengeler JW (1997). Substrate recognition domains as revealed by active hybrids between the D-arabinitol and ribitol transporters from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 179(19):6014-9

Hickman RK, McMurry LM, Levy SB (1990). Overproduction and purification of the Tn10-specified inner membrane tetracycline resistance protein Tet using fusions to beta-galactosidase. *Mol. Microbiol.* 4(8):1241-51.

Hicks GR, Raikhel NV (1995). Nuclear localization signal binding proteins in higher plant nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(3):734-8.

Higgins CF (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8:67-113.

Higgins CF (1995). The ABC of channel regulation. *Cell.* 82(5):693-6.

Higgins CF (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res. Microbiol.* 152(3-4):205-10.

Higgins CF, Gottesman MM (1992). Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem. Sci.* 17(1):18-21.

Hikkel I, Lucau-Danila A, Delaveau T, Marc P, Devaux F, Jacq C (2003). A general strategy to uncover transcription factor properties

identifies a new regulator of drug resistance in yeast. *J. Biol. Chem.* 278(13):11427-32.

Hirai T, Subramaniam S (2004). Structure and transport mechanism of the bacterial oxalate transporter OxlT. *Biophys J.* 87(5):3600-7.

Hoff B, Schmitt EK, Kück U (2005). CPCr1, but not its interacting transcription factor AcFKH1, controls fungal arthrospore formation in *Acremonium chrysogenum*. *Mol. Microbiol.* 56(5):1220-33.

Hönlinger C, Kubicek CP (1989). Metabolism and compartmentation of α -amino adipic acid in penicillin-producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta* 993: 204–211.

Holmes DS, Quigley M (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal. Biochem.* 114:193-197.

Hoskins JA, O'Callaghan N, Queener SW, Cantwell CA, Wood JS, Chen VJ, Skatrud PL (1990). Gene disruption of the *pcbAB* gene encoding ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*. *Curr. Genet.* 18: 523-530.

Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature.* 346(6282):362-5.

Hwang S, Gou Z, Kuznetsov IB (2007). DP-Bind: a web server for sequence-based prediction of DNA-binding residues in DNA-binding proteins. *Bioinformatics.* 23(5):634-6.

I

Indiveri C, Iacobazzi V, Giangregorio N, Palmieri F (1997). The mitochondrial carnitine carrier protein: cDNA cloning, primary structure and comparison with other mitochondrial transport proteins. *Biochem. J.* 321 (Pt 3):713-9.

Ishikawa Y, Morimoto K, Iseki S (1991). Atrovenetin as a potent antioxidant compound from penicillium species. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68(9): 666-669.

Isogai T, Fukagawa M, Aramori I, Iwami M, Kojo H, Ono T, Ueda Y, Kohsaka M, Imanaka H (1991). Construction of a 7-aminocephalosporanic acid (7ACA) biosynthetic

operon and direct production of 7ACA in *Acremonium chrysogenum*. *Biotechnology (N Y).* 9(2):188-91.

J

Jakobs BS, Wanders RJ (1995). Fatty acid beta-oxidation in peroxisomes and mitochondria: the first, unequivocal evidence for the involvement of carnitine in shuttling propionyl-CoA from peroxisomes to mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213(3):1035-41.

Jayatilake GS, Huddleston JA, Abraham EP (1981). Conversion of isopenicillin N into penicillin N in cell-free extracts of *Cephalosporium acremonium*. *Biochem. J.* 194(2):645-7.

Jekosch K, Kück U (2000). Glucose dependent transcriptional expression of the *cre1* gene in *Acremonium chrysogenum* strains showing different levels of cephalosporin C production. *Curr Genet.* 37(6):388-95.

Jensen SE, Westlake DWS, Wolfe S (1983). Partial purification and characterization of isopenicillin N epimerase activity from *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.* 29:1526-1531.

Jensen SE, Westlake DW, Wolfe S (1985). Deacetoxycephalosporin C synthetase and deacetoxycephalosporin C hydroxylase are two separate enzymes in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Antibiot. (Tokyo).* 38(2):263-5.

Johnston M (1987). Genetic evidence that zinc is an essential cofactor in the DNA binding domain of GAL4 protein. *Nature (London)* 328:353-355

Jørgensen H, Nielsen J, Villadsen J, Møllgaard H (1995). Metabolic flux distributions in *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng* 46: 117–131.

K

Kallow W, Neuhof T, Arezi B, Jungblut P, von Döhren H (1997). Penicillin biosynthesis: intermediates of biosynthesis of delta-L-alpha-amino adipyl-L-cysteinyl-D-valine formed by ACV synthetase from *Acremonium chrysogenum*. *FEBS Lett.* 414(1):74-8.

Kalman D, Barriere SL (1990). Review of the pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use of cephalosporins. *Tex. Heart Inst. J.* 17(3):203-15.

- Kamada T, Nito K, Hayashi H, Mano S, Hayashi M, Nishimura M** (2003). Functional differentiation of peroxisomes revealed by expression profiles of peroxisomal genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell. Physiol.* 44(12):1275-89.
- Kanamori A, Nakayama J, Fukuda MN, Stallcup WB, Sasaki K, Fukuda M, Hirabayashi Y** (1997). Expression cloning and characterization of a cDNA encoding a novel membrane protein required for the formation of O-acetylated ganglioside: a putative acetyl-CoA transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(7):2897-902.
- Katzmann DJ, Hallstrom TC, Mahé Y, Moye-Rowley WS** (1996). Multiple Pdr1p/Pdr3p binding sites are essential for normal expression of the ATP binding cassette transporter protein-encoding gene PDR5. *J. Biol. Chem.* 271(38):23049-54.
- Kerppola RE, Shyamala VK, Klebba P, Ames GF** (1991). The membrane-bound proteins of periplasmic permeases form a complex. Identification of the histidine permease HisQMP complex. *J. Biol. Chem.* 266(15):9857-65.
- Kiel JA, van den Berg MA, Fusetti F, Poolman B, Bovenberg RA, Veenhuis M, van der Klei IJ** (2009). Matching the proteome to the genome: the microbody of penicillin-producing *Penicillium chrysogenum* cells. *Funct. Integr. Genomics.* 9(2):167-84.
- Kiel JA, van der Klei IJ, van den Berg MA, Bovenberg RA, Veenhuis M** (2005). Overproduction of a single protein, Pc-Pex11p, results in 2-fold enhanced penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet. Biol.* 42(2):154-64.
- Kim C, Jung H, Kim YO, Shin CS** (2006). Antimicrobial activities of amino acid derivatives of monascus pigments. *FEMS Microbiol. Lett.* 264(1):117-24.
- Kleinkauf H, von Dohren H** (1990). Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur. J. Biochem.* 192(1):1-15.
- Kleinkauf H, von Dohren H** (1996). A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 236(2):335-51.
- Koepsell H** (1998). Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annu. Rev. Physiol.* 60:243-66.
- Koetsier MJ, Jekel PA, van den Berg MA, Bovenberg RA, Janssen DB** (2009). Characterization of a phenylacetate-CoA ligase from *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. J.* 417(2):467-76.
- Kohsaka M, Demain AL** (1976). Conversion of penicillin N to cephalosporin(s) by cell-free extracts of *Cephalosporium acremonium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70(2):465-73.
- Kohler JJ, Schepartz A** (2001). Effects of nucleic acids and polyanions on dimer formation and DNA binding by bZIP and bHLHZip transcription factors. *Bioorg. Med. Chem.* 9(9):2435-43.
- Köhler T, Dumas JL, Van Delden C** (2007). Ribosome protection prevents azithromycin-mediated quorum-sensing modulation and stationary-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1(12):4243-8.
- Kolaczowska A, Goffeau A** (1999). Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resist. Updat.* 2(6):403-414.
- Kolaczowska A, Kolaczowski M, Delahodde A, Goffeau A** (2002). Functional dissection of Pdr1p, a regulator of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics.* 267(1):96-106.
- Komatsu KI, Mizuno M, Kodaira R** (1975). Effect of methionine on cephalosporin C and penicillin N production by a mutant of *Cephalosporium acremonium*. *J. Antibiot.* 28(11):881-8.
- Kovacevic S, Tobin MB, Miller JR** (1990). The beta-lactam biosynthesis genes for isopenicillin N epimerase and deacetoxycephalosporin C synthetase are expressed from a single transcript in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Bacteriol.* 172(7):3952-8.
- Kozma J, Lucas L, Schügerl K** (1993). Alternative respiration and antibiotic production of *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 463-465.

Kreisberg-Zakarin R, Borovok I, Yanko M, Aharonowitz Y, Cohen G (1999). Recent advances in the structure and function of isopenicillin N synthase. *Antonie van Leeuwenhoek*. 75(1-2):33-9.

Kuge S, Jones N, Nomoto A (1997). Regulation of γ AP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J*. 16(7):1710-20.

Kuhn PJ, Trinci APJ, Jung MJ, Goosey MW, Copping LG (1990). The biochemistry of cell walls and membranes in fungi. Kuhn PJ, Trinci APJ, Jung MJ, Goosey MW, Copping LG (Eds.). Springer Verlag, Berlin.

Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessières P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Danchin A, et al (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. 390(6657):249-56.

Kupka J, Shen Y-Q, Wolfe S, Demain AL (1983). Studies on the ring-cyclization and ring-expansion enzymes of beta-lactam biosynthesis in *Cephalosporium acremonium*. *Can. J. Microbiol*. 29(5):488-496.

L

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-5.

Laity JH, Lee BM, Wright PE (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 11(1):39-46.

Láiz L, Liras P, Castro JM, Martín JF (1990). Purification and characterization of the isopenicillin N epimerase from *Nocardia lactamdurans*. *J. Gen. Microbiol*. 136:663-671.

Lamas-Maceiras M, Vaca I, Rodríguez E, Casqueiro J, Martín JF (2006). Amplification and disruption of the phenylacetyl-CoA ligase gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an aryl-capping enzyme that supplies phenylacetic acid to the isopenicillin N-acyltransferase. *Biochem. J*. 395(1):147-55.

Landan G, Cohen G, Aharonowitz Y, Shuali Y, Graur D, Shiffman D (1990). Evolution of isopenicillin N synthase genes may have involved horizontal gene transfer. *Mol. Biol. Evol*. 7(5):399-406.

Lasorsa FM, Scarcia P, Erdmann R, Palmieri F, Rottensteiner H, Palmieri L (2004). The yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter: characterization of two transport modes and involvement in DeltapH formation across peroxisomal membranes. *Biochem. J*. 381(Pt 3):581-5.

Le Page GA, Campbell E (1946). Preparation of streptomycin. *J. Biol. Chem*. 162: 163-171.

Lendenfeld T, Ghali D, Wolschek M, Kubicek-Pranz EM, Kubicek CP (1993). Subcellular compartmentation of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. The amino acid precursors are derived from the vacuole. *J. Biol. Chem*. 268(1):665-71.

Lejon S, Ellis J, Valegård K (2008). The last step in cephalosporin C formation revealed: crystal structures of deacetylcephalosporin C acetyltransferase from *Acremonium chrysogenum* in complexes with reaction intermediates. *J. Mol. Biol*. 377(3):935-44.

Lesuisse E, Simon-Casteras M, Labbe P (1998). Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the SIT1 gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. *Microbiology*. 144 (Pt 12):3455-62.

Lewis K (2001). In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. 3(2):247-54.

Liras P, Martín JF (2006). Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate?. *Int. Microbiol*. 9(1):9-19.

Liu G, Casqueiro J, Bañuelos O, Cardoza RE, Gutiérrez S, Martín JF (2001). Targeted inactivation of the *mecB* gene, encoding cystathionine-lyase, shows that the reverse transsulfuration pathway is required for high-level cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum* C10 but not for methionine induction of the cephalosporin genes. *J. Bacteriol*. 183:1765-1772.

Liu JY, Miller PF, Willard J, Olson ER (1999). Functional and biochemical characterization of *Escherichia coli* sugar efflux transporters. *J. Biol. Chem.* 274(33):22977-84.

López-Nieto MJ, Ramos FR, Luengo JM, Martín JF (1985). Characterization of the biosynthesis *in vivo* of α -aminoadipyl-cysteinyl-valine in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 343-351.

Lübbe C, Wolfe S, Demain, AL (1986) Isopenicillin N epimerase activity in a high cephalosporin-producing strain of *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 367-368

Luchese RH, Harrigan WF (1993). Biosynthesis of aflatoxin--the role of nutritional factors. *J Appl Bacteriol.* 74(1):5-14.

M

MacCabe AP, van Liempt H, Palissa H, Unkles SE, Riach MB, Pfeifer E, von Döhren H, Kinghorn JR (1991). Delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. Molecular characterization of the *acrV* gene encoding the first enzyme of the penicillin biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 266(19):12646-54.

Mackey JR, Baldwin SA, Young JD, Cass CE (1998). Nucleoside transport and its significance for anticancer drug resistance. *Drug Resist. Updat.* 1(5):310-24.

Mackman N, Baker K, Gray L, Haigh R, Nicaud JM, Holland IB (1987). Release of a chimeric protein into the medium from *Escherichia coli* using the C-terminal secretion signal of haemolysin. *EMBO J.* 6(9):2835-41.

MacPherson S, Larochelle M, Turcotte B (2006). A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70(3):583-604.

Maiden MC, Jones-Mortimer MC, Henderson PJ (1988). The cloning, DNA sequence, and overexpression of the gene *araE* coding for arabinose-proton symport in *Escherichia coli* K12.J. *Biol. Chem.* 263(17):8003-10.

Malik AN, McLean PM, Roberts A, Barnett PS, Demaine AG, Banga JP, McGregor AM (1990). A simple high yield method for the preparation of lambda gt10 DNA suitable for

subcloning, amplification and direct sequencing. *Nucleic Acids Res.* 18(13):4031-2.

Mamane, Y., K. Hellauer, M. H. Rochon, and B. Turcotte (1998). A linker region of the yeast zinc cluster protein Leu3p specifies binding to everted repeat DNA. *J. Biol. Chem.* 273:18556-18561.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR (1988). Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature.* 336: 348-352.

Marger MD, Saier MH Jr (1993). A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* 18(1):13-20.

Martens MG (1989). Cephalosporins. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 16(2):291-304.

Martín JF (1992). Clusters of genes for the biosynthesis of antibiotics: regulatory genes and overproduction of pharmaceuticals. *J. Ind. Microbiol.* 9(2):73-90.

Martín JF (2000). Alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetases in beta-lactam producing organisms. From Abraham's discoveries to novel concepts of non-ribosomal peptide synthesis. *J. Antibiot. (Tokyo).* 53(10):1008-21.

Martín JF, Casqueiro J, Liras P (2005). Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. *Curr. Opin. Microbiol.* 8 (3): 282-293.

Martín JF, Demain AL (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 44(2):230-51.

Martín JF, Demain AL (2002). Unraveling the methionine-cephalosporin puzzle in *Acremonium chrysogenum*. *Trends Biotechnol.* 20(12):502-7.

Martín JF, Gutierrez S (1995). Genes for beta-lactam antibiotic biosynthesis. *Antonie van Leeuwenhoek.* 67(2):181-200.

Martín JF, Gutierrez S, Fernandez FJ, Velasco J, Fierro F, Marcos AT, Kosalkova K (1994). Expression of genes and processing of enzymes

for the biosynthesis of penicillins and cephalosporins. *Antonie van Leeuwenhoek*. 65:227-243.

Martín JF, Liras P (1989). Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:173-206.

Martín JF, Ullán RV, Casqueiro J (2004). Novel genes involved in cephalosporin biosynthesis: the three-component isopenicillin N epimerase system. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 88: 91-109.

Martín JF, Ullán RV, García-Estrada C (2009). Regulation and compartmentalization of β -lactam biosynthesis. *Microbial Biotechnology*. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00123.x.

Martin-Zanca D, Martín JF (1983). Carbon catabolite regulation of the conversion of penicillin N into cephalosporin C. *J. Antibiot (Tokio)*. 36 (6): 700-708.

Martínez J, Steenbergen S, Vimr E (1995). Derived structure of the putative sialic acid transporter from *Escherichia coli* predicts a novel sugar permease domain. *J. Bacteriol.* 177(20):6005-10.

Martínez-Guerra S (2005). Tesina. "Clonación, secuenciación y caracterización del gen *cefT2* de *Acremonium chrysogenum* C10".

Marzluf GA (1997) Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annu Rev Microbiol* 51: 73–96.

Mathison L, Soliday C, Stepan T, Aldrich T, Rambosek J (1993). Cloning, characterization, and use in strain improvement of the *Cephalosporium acremonium* gene *cefG* encoding acetyl transferase. *Curr. Genet.* 23:33-41.

Matsuda A, Sugiura H, Matsuyama K, Matsumoto H, Ichikawa S, Komatsu K (1992). Cloning and disruption of the *cefG* gene encoding acetyl coenzyme A: deacetylcephalosporin C o-acetyltransferase from *Acremonium chrysogenum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186(1):40-6.

McKenzie T, Hocino T, Tanaka T, Sueoka N (1986). The nucleotide sequence of pUB110; some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid*. 14:93-103.

Menne S, Walz M, Kück U (1994). Expression studies with the bidirectional *pcbAB-pcbC*

promoter region from *Acremonium chrysogenum* using reporter gene fusions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42(1):57-66.

Metallo SJ, Paoletta DN, Schepartz A (1997). The role of a basic amino acid cluster in target site selection and non-specific binding of bZIP peptides to DNA. *Nucleic Acids Res.* 25(15):2967-72.

Miller, JH (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, New York, pp. 352-355.

Minuth W, Tudzynski P, Esser K (1982). Extrachromosomal genetics of *Cephalosporium acremonium*. *Curr. Genet.* 5:227-231

Moye-Rowley WS (2003). Transcriptional control of multidrug resistance in the yeast *Saccharomyces*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 73:251-79.

Montenegro E, Barredo JL, Gutiérrez S, Díez B, Álvarez E, Martín JF (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(3):322-330.

Mukai S, Fujiki Y (2006). Molecular mechanisms of import of peroxisome-targeting signal type 2 (PTS2) proteins by PTS2 receptor Pex7p and PTS1 receptor Pex5pL. *J. Biol. Chem.* 281(49):37311-20.

Müller WH, Bovenberg RA, Groothuis MH, Kattevilder F, Smaal EB, Van der Voort LH, Verkleij AJ (1992). Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1116(2):210-3.

Müller WH, Essers J, Humbel BM, Verkleij AJ (1995). Enrichment of *Penicillium chrysogenum* microbodies by isopycnic centrifugation in nycodenz as visualized with immuno-electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1245(2):215-20.

Müller WH, van der Krift TP, Krouwer AJ, Wosten HA, van der Voort LH, Smaal EB, Verkleij AJ (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.* 10(2):489-95.

Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-350.

N

Näär AM, Ryu S, Tjian R (1998). Cofactor requirements for transcriptional activation by Sp1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 63:189-99.

Nakayashiki H (2005). RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. *FEBS Letters.* 579:5950-5957.

Nash CH, Huber FM (1971). Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Microbiol.* 22(1):6-10.

Neuss N, Berry DM, Kupka J, Demain AL, Queener SW, Duckworth DC, Huckstep LL (1982). High performance liquid chromatography (HPLC) of natural products V. The use of HPLC in the cell-free biosynthetic conversion of alpha-aminoadipyl-cysteiny-valine (LLD) into isopenicillin N. *J. Antibiot. (Tokyo).* 35(5):580-4.

Newton GGF, Abraham EP (1955). Cephalosporin C: a new antibiotic containing sulphur and D- α -aminoadipic acid. *Nature.* 175:548.

Neyfakh AA (1997). Natural functions of bacterial multidrug transporters. *Trends Microbiol.* 5(8):309-13.

Neyfakh AA (2002). Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. *Mol. Microbiol.* 44(5):1123-30.

Nijland JG, Kovalchuk A, van den Berg MA, Bovenberg RA, Driessen AJ (2008). Expression of the transporter encoded by the *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* increases cephalosporin production in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet. Biol.* 45(10):1415-21.

Nüesch J, Heim J, Treichler H-J (1987). The biosynthesis of sulfur-containing β -lactam antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:51-75.

O

O'Sullivan J, Bleaney RC, Huddleston JA, Abraham EP (1979). Incorporation of 3H from δ -(L- α -amino[4,5-3H]adipyl)-L-cysteiny-D-[4,4-3H]valine into isopenicillin N. *Biochem. J.* 184:421-426.

P

Pao SS, Paulsen IT, Saier MH Jr (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(1):1-34.

Pardo JM, Malpartida F, Rico M, Jiménez A (1985). Biochemical basis of resistance to hygromycin B in *Streptomyces hygroscopicus*--the producing organism. *J. Gen. Microbiol.* 131 (Pt 6):1289-1298.

Parn P, Serviour RJ (1974). Pigments induced by organomercurial compounds in *Cephalosporium diospyri*. *J. Gen. Microbiol.* 85: 229-236.

Parsons M, Furuya T, Pal S, Kessler P (2001). Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115(1):19-28.

Payne GA, Nystrom GJ, Bhatnagar D, Cleveland TE, Woloshuk CP (1993). Cloning of the *afl-2* gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(1):156-62.

Paul GC, Thomas CR (1996). A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* 51(5):558-72.

Paulsen IT (2003). Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(5):446-51.

Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60(4):575-608.

Paulsen IT, Skurray RA (1993). Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes--an analysis. *Gene.* 124(1):1-11.

Peberdy JF (1987). *Penicillium* and *Acremonium*. En: *Biotechnology Handbooks*. Peberdy JF (Ed.). Plenum Press, Springer, vol. 1, New York.

Peñalva MA, Moya A, Dopazo J, Ramón D (1990). Sequences of isopenicillin N synthetase genes suggest horizontal gene transfer from prokaryotes to eukaryotes. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 241:164-169.

Peñalva MA, Vian A, Patiño C, Pérez Aranda A, Ramón D (1989). Molecular biology of penicillin production in *Aspergillus nidulans*. En: "Genetics and molecular biology of industrial microorganisms". Hershberger CL, Queener SV, Hegeman G (Eds.). American Society of Microbiology, Washington DC, pp 256-262.

Pisano MA (1970). Physiological and biochemical properties of two strains of *Cephalosporium chrysogenum*. Antonie van Leeuwenhoek. 36:445-454.

Pöggeler S, Hoff B, Kück U (2008). Asexual cephalosporin C producer *Acronium chrysogenum* carries a functional mating type locus. Appl. Environ. Microbiol. 74(19):6006-16.

Polman JK, Larkin JM (1989). Purification of DNA from agarose gels. Biotechnol. Tech. 3:329-332.

Portalier R, Robert-Baudouy J, Stoeber F (1980). Regulation of *Escherichia coli* K-12 hexuronate system genes: exu regulon. J. Bacteriol. 143(3):1095-107.

Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. Microbiol. Rev. 57(3):543-94.

Prasad R, De Wergifosse P, Goffeau A, Balzi E (1995). Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. Curr. Genet. 27(4):320-9.

Pringle JR, Broach JR, Jones EW (1997). Molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. En: "Cell cycle and cell biology". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, vol. III, New York.

Proctor RH, Busman M, Seo JA, Lee YW, Plattner RD (2008). A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production. Fungal Genet. Biol. 45(6):1016-26.

Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH, Van den Hondel (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. Gene. 56: 117-124.

Putman M, van Veen HW, Konings WN (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64(4):672-93.

Q

Queener SW, Ingolia TD, Skatrud PL, Chapman JL, Kaster KR (1985). A system for genetic transformation of *Cephalosporium acremonium*. En: "Microbiology". Leive L (Ed.). American society for microbiology, Washington DC, pp: 468-472.

R

Rahmati S, Yang S, Davidson AL, Zechiedrich EL (2002). Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. Mol. Microbiol. 43(3):677-85.

Ramón AM, Porta A, Fonzi WA (1999). Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. J. Bacteriol. 181(24):7524-30.

Ramón D, Carramolino L, Patiño C, Sánchez F, Peñalva MA (1987). Cloning and characterization of the isopenicillin N synthetase gene mediating the formation of the beta-lactam ring in *Aspergillus nidulans*. Gene. 57(2-3):171-81.

Ramos FR, López-Nieto MJ, Martín JF (1985). Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. Antimicrob. Agents Chemother. 27(3):380-7.

Reumann S (2004). Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. Plant Physiol. 135(2):783-800.

Roach PL, Clifton IJ, Fülöp V, Harlos K, Barton GJ, Hajdu J, Andersson I, Schofield CJ, Baldwin JE (1995). Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes. Nature. 375(6533):700-4.

- Rodrigues-Pousada CA, Nevitt T, Menezes R, Azevedo D, Pereira J, Amaral C** (2004). Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Lett.* 567(1):80-5.
- Roebuck BD** (2004). Hyperplasia, partial hepatectomy, and the carcinogenicity of aflatoxin B1. *J Cell Biochem.* 91(2):243-9.
- Rognon B, Kozovska Z, Coste AT, Pardini G, Sanglard D** (2006). Identification of promoter elements responsible for the regulation of MDR1 from *Candida albicans*, a major facilitator transporter involved in azole resistance. *Microbiology.* 152(Pt 12):3701-22.
- Roos W, Schulze R, Steighardt J** (1997). Dynamic compartmentation of vacuolar amino acids in *Penicillium cyclopium*. Cytosolic adenylates act as a control signal for efflux into the cytosol. *J. Biol. Chem.* 272(25):15849-55.
- Rosenberg MF, Velarde G, Ford RC, Martin C, Berridge G, Kerr ID, Callaghan R, Schmidlin A, Wooding C, Linton KJ, Higgins CF** (2001). Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *EMBO J.* 20(20):5615-25.
- Rottensteiner H, Kramer A, Lorenzen S, Stein K, Landgraf C, Volkmer-Engert R, Erdmann R** (2004). Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19p-binding sites that are an integral part of their targeting signals. *Mol. Biol. Cell.* 15(7):3406-17.
- Rottensteiner H, Theodoulou FL** (2006). The ins and outs of peroxisomes: co-ordination of membrane transport and peroxisomal metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763(12):1527-40.
- Rubin RA, Levy SB, Heinrichson RL, Kézdy FJ** (1990). Gene duplication in the evolution of the two complementing domains of Gram-negative bacterial tetracycline efflux proteins. *Gene* 87: 7-13.
- Russo P, Li WZ, Hampsey DM, Zaret KS, Sherman F** (1991). Distinct cis-acting signals enhance 3' endpoint formation of CYC1 mRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 10(3):563-71.
- S**
- Saier MH Jr** (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(2):354-411.
- Saier MH Jr, Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WH, Huang SC, Jack DL, Jähn PS, Lew K, Liu J, Pao SS, Paulsen IT, Tseng TT, Virk PS** (1999). The major facilitator superfamily. *J Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(2):257-79.
- Saier MH Jr, Paulsen IT** (2001). Phylogeny of multidrug transporters. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 12(3):205-13.
- Saier MH Jr, Paulsen IT, Sliwinski MK, Pao SS, Skurray RA, Nikaido H** (1998). Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J.* 12(3):265-74.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samson SM, Belagaje R, Blankenship DT, Chapman JL, Perry D, Skatrud PL, VanFrank RM, Abraham EP, Baldwin JE, Queener SW** (1985). Isolation, sequence determination and expression in *Escherichia coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium*. *Nature.* 318(6042):191-4.
- Samson SM, Dotzlaw JE, Slisz ML, Becker GW, van Frank RM, Veal LE, Yeh W-K, Miller JE, Queener SW, Ingolia TD** (1987). Cloning and expression of the fungal expandase/hydroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis. *Bio/Technology.* 5:1207-1214.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Saurin W, Hofnung M, Dassa E** (1999). Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J. Mol. Evol.* 48(1):22-41.
- Sawada Y, Konomi T, Solomon NA, Demain AL** (1980). Increase in activity of β -lactam synthetases after growth of *Cephalosporium acremonium* with methionine or norleucine. *FEMS Microbiol. Lett.* 9: 281-284.
- Schjerling P, Holmberg S** (1996). Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc

cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* 24(23):4599-607.

Schofield CJ, Baldwin JE, Byford MF, Clifton I, Hajdu J, Hensgens C, Roach P (1997). Proteins of the penicillin biosynthesis pathway. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7(6):857-64.

Schmitt E, Hoff B, Kück U (2004a). AcFKH1, a novel member of the forkhead family, associates with the RFX transcription factor CPC1 in the cephalosporin C-producing fungus *Acremonium chrysogenum*. *Gene.* 342: 269-281.

Schmitt EK, Hoff B, Kück U (2004b). Regulation of cephalosporin biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 88:1-43.

Schmitt EK, Kück U (2000). The fungal CPC1 protein, which binds specifically to beta-lactam biosynthesis genes, is related to human regulatory factor X transcription factors. *J. Biol. Chem.* 275(13):9348-57.

Schneider E, Hunke S (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* 22(1):1-20.

Schwecke T, Aharonowitz Y, Palissa H, von Döhren H, Kleinkauf H, van Liempt H (1992). Enzymatic characterisation of the multifunctional enzyme delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyld-valine synthetase from *Streptomyces clavuligerus*. *Eur. J. Biochem.* 205(2):687-94.

Sellick CA, Reece RJ (2005). Eukaryotic transcription factors as direct nutrient sensors. *Trends Biochem. Sci.* 30(7):405-12.

Semighini CP, Goldman MH, Goldman GH (2004). Multi-copy suppression of an *Aspergillus nidulans* mutant sensitive to camptothecin by a putative monocarboxylate transporter. *Curr. Microbiol.* 49(4):229-33.

Seol W, Shatkin AJ (1991). *Escherichia coli* *kgiP* encodes an alpha-ketoglutarate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(9):3802-6.

Shelest E (2008). Transcription factors in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 286(2):145-51.

Shen Y.-Q, Heim J, Solomon NA, Wolfe S, Demain AL (1984). Repression of β -lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources. *J. Antibiot.* 37:503-511.

Shibata H, Kashiwayama Y, Imanaka T, Kato H (2004). Domain architecture and activity of human Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 279(37):38486-94.

Sikkema J, de Bont JA, Poolman B (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59(2):201-22.

Skatrud PL (1992). Genetic engineering of beta-lactam antibiotic biosynthetic pathways in filamentous fungi. *Trends Biotechnol.* 10(9):324-9.

Skatrud PL, Queener SW (1989). An electrophoretic molecular karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium*. *Gene.* 78(2):331-8.

Skatrud PL, Tietz AJ, Ingolia TD (1989). Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. *Bio/Technology.* 7:476-485.

Slot JC, Hibbett DS (2007). Horizontal transfer of a nitrate assimilation gene cluster and ecological transitions in fungi: a phylogenetic study. *PLoS ONE.* 2(10):e1097.

Smith MW, Feng D-F, Doolittle RF (1992). Evolution by acquisition: the case of horizontal gene transfer. *Trends Biochem. Sci.* 17: 489-493.

Suriapranata I, Epple UD, Bernreuther D, BrEds.chneider M, Sovarasteanu K, Thumm M (2000). The breakdown of autophagic vesicles inside the vacuole depends on Aut4p. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 22):4025-33.

Subramani S (1996). Protein translocation into peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 271(51):32483-6.

Subramani S (1998). Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol. Rev.* 78(1):171-88.

Sung YC, Fuchs JA (1988). Characterization of the *cyn* operon in *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 263(29):14769-75.

Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA, Subramani S (1991). A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J.* 10(11):3255-62.

T

Tabak HF, Murk JL, Braakman I, Geuze HJ (2003). Peroxisomes start their life in the endoplasmic reticulum. *Traffic*. 4(8):512-8.

Tailor CS, Willett BJ, Kabat D (1999). A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup C is a member of a transporter superfamily. *J. Virol.* 73(8):6500-5.

Tamayo EN, Villanueva A, Hasper AA, de Graaff LH, Ramón D, Orejas M (2008). CreA mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 45(6):984-93.

Teijeira E, Ullán RV, Guerra SM, García-Estrada C, Vaca I, Martín JF (2009). The transporter CefM is essential for cephalosporin production. *Biochem. J.* 418(1):113-24.

Theilgaard HB, Kristiansen KN, Henriksen CM, Nielsen J (1997). Purification and characterization of delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. J.* 327 (Pt 1):185-91.

Thomas PS (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:2501-2505.

Tobin MB, Fleming MD, Skatrud PL, Miller JR (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 *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172(10):5908-5994.

Todd RB, Andrianopoulos A (1997). Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet. Biol.* 21(3):388-405.

Toone WM, Jones N (1999). AP-1 transcription factors in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9(1):55-61.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(9):4350-4.

Trown PW, Sharp M, Abraham EP (1963a). alpha-Oxoglutarate as a precursor of the D-alpha-aminoadipic acid residue in cephalosporin C. *Biochem. J.* 86:280-4.

Trown PW, Smith B, Abraham EP (1963b). Biosynthesis of cephalosporin C from amino acids. *Biochem. J.* 86:284-91.

Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A, Saier MH Jr (1999). The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(1):107-25.

U

Ullán RV (2002). Tesis doctoral. "Caracterización bioquímica y molecular de la conversión de isopenicilina N en penicilina N en *Acremonium chrysogenum*. Descripción de un nuevo sistema de epimerización en la biosíntesis de antibióticos".

Ullán RV, Casqueiro J, Bañuelos O, Fernandez FJ, Gutierrez S, Martín JF (2002b). A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in *Acremonium chrysogenum*. *J. Biol. Chem.* 277(48):46216-25.

Ullán RV, Casqueiro J, Naranjo L, Vaca I, Martín JF (2004). Expression of *cefD2* and the conversion of isopenicillin N into penicillin N by the two-component epimerase system are rate-limiting steps in cephalosporin biosynthesis. *Mol. Genet. Genomics.* 272(5):562-70.

Ullán RV, Godio RP, Teijeira E, Vaca I, García-Estrada C, Feltrer R, Kosalkova K, Martín JF (2008a). RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using beta-lactam genes expression. *J. Microbiol. Methods.* 75(2):209-18.

Ullán RV, Liu G, Casqueiro J, Gutiérrez S, Bañuelos O, Martín JF (2002a). The *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a multidrug efflux pump protein that significantly increases cephalosporin C Production. *Mol. Gen. Genomics.* 267:673-683.

Ullán RV, Teijeira E, Martín JF (2008b). Expression of the *Acremonium chrysogenum* *cefT* gene in *Penicillium chrysogenum* indicates that it encodes an hydrophilic beta-lactam transporter. *Curr. Genet.* 54(3):153-61.

Urnov FD (2002). A feel for the template: zinc finger protein transcription factors and chromatin. *Biochem. Cell. Biol.* 80(3):321-33.

V

Vaca-Cerezo I (2008). Tesis doctoral. "Desarrollo de un sistema de purificación de isopenicilina N. Caracterización del transporte de éste y otros intermediarios de la ruta biosintética de β -lactamas en los hongos productores *Acremonium chrysogenum* y *Penicillium chrysogenum*".

Valenciano S, De Lucas JR, Van der Klei I, Veenhuis M, Laborda F (1998). Characterization of *Aspergillus nidulans* peroxisomes by immunoelectron microscopy. *Arch. Microbiol.* 170(5):370-6.

van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.* 15;60(4):457-70.

van de Kamp M, Driessen AJ, Konings WN (1999). Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. *Antonie van Leeuwenhoek.* 75(1-2):41-78

van den Berg MA, Albang R, Albermann K, Badger JH, Daran JM, Driessen AJ, García-Estrada C, Fedorova ND, Harris DM, Heijne WH, Joardar V, Kiel JA, Kovalchuk A, Martín JF, Nierman WC, Nijland JG, Pronk JT, Roubos JA, van der Klei IJ, van Peij NN, Veenhuis M, von Döhren H, Wagner C, Wortman J, Bovenberg RA. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat. Biotechnol.* 26(10):1161-8.

van der Klei IJ, Veenhuis M (2006). Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763(12):1364-73.

van der Lende TR, van de Kamp M, Berg M, Sjollem K, Bovenberg RA, Veenhuis M, Konings WN, Driessen AJ (2002). delta-(L-alpha-Amino adipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, that mediates the first committed step in penicillin biosynthesis, is a cytosolic enzyme. *Fungal Genet. Biol.* 37(1):49-55.

van der Rest ME, Kamminga AH, Nakano A, Anraku Y, Poolman B, Konings WN (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 59(2):304-22.

van Liempt H, von Döhren H, Kleinkauf H (1989). delta-(L-alpha-amino adipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. The first enzyme in penicillin biosynthesis is a multifunctional peptide synthetase. *J. Biol. Chem.* 264(7):3680-4.

van Roermund CW, de Jong M, IJlst L, van Marle J, Dansen TB, Wanders RJ, Waterham HR (2004). The peroxisomal lumen in *Saccharomyces cerevisiae* is alkaline. *J. Cell. Sci.* 117(Pt 18):4231-7.

Varela MF, Wilson TH (1996). Molecular biology of the lactose carrier of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1276(1):21-34.

Velasco J, Gutierrez S, Campoy S, Martín JF (1999). Molecular characterization of the *Acremonium chrysogenum* *cefG* gene product: the native deacetylcephalosporin C acetyltransferase is not processed into subunits. *Biochem. J.* 337 (Pt 3):379-85.

Velasco J, Gutiérrez S, Fernández FJ, Marcos AT, Arenos C, Martín JF (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(4):985-891.

Velasco J, Luis Adrio J, Angel Moreno M, Díez B, Soler G, Barredo JL (2000). Environmentally safe production of 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA) using recombinant strains of *Acremonium chrysogenum*. *Nat. Biotechnol.* 18(8):857-61.

Vereb G, Szollosi J, Matko J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, Matyus L, Waldmann TA, Damjanovich S (2003). Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(14):8053-8.

Vining LC (1992). Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity--a review.

Vinson C, Acharya A, Taparowsky EJ (2006). Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* 1759(1-2):4-12.

Visser WF, van Roermund CW, IJlst L, Waterham HR, Wanders RJ (2007). Metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Biochem. J.* 401(2):365-75.

Vousden W, Turner G (2001). Localisation of ACV synthetase of *Aspergillus nidulans*. Fungal Genetics Conference. Fungal Genet. Newsletter. 48 (Suppl.) 160.

W

Wanders RJ, Visser WF, van Roermund CW, Kemp S, Waterham HR (2007). The peroxisomal ABC transporter family. Pflugers Arch. 453(5):719-34.

Wandersman C, Delepelaire P (1990). TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87(12):4776-80

Wanders RJ, Waterham HR (2006). Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. Biochim. Biophys. Acta. 1763(12):1707-20.

Wang FQ, Liu J, Dai M, Ren ZH, Su CY, He JG (2007). Molecular cloning and functional identification of a novel phenylacetyl-CoA ligase gene from *Penicillium chrysogenum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 360(2):453-8.

Wang L, Brown SJ (2006). BindN: a web-based tool for efficient prediction of DNA and RNA binding sites in amino acid sequences. Nucleic Acids Res. 34(Web Server issue):W243-8.

Weigel BJ, Burgett SG, Chen VJ, Skatrud PL, Frolik CA, Queener SW, Ingolia TD (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of isopenicillin N synthetase genes from *Streptomyces lipmanii* and *Aspergillus nidulans*. J. Bacteriol. 170(9):3817-26.

Westin MA, Hunt MC, Alexson SE (2005). The identification of a succinyl-CoA thioesterase suggests a novel pathway for succinate production in peroxisomes. J. Biol. Chem. 280(46):38125-32.

Westlake CJ, Cole SP, Deeley RG (2005). Role of the NH₂-terminal membrane spanning domain of multidrug resistance protein 1/ABCC1 in protein processing and trafficking. Mol. Biol. Cell. 16(5):2483-92.

Whiteman PA, Abraham EP, Baldwin JE, Fleming MD, Schofield CJ, Sutherland JD, Willis AC (1990). Acyl coenzyme A: 6-aminopenicillanic acid acyltransferase from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans*. FEBS Lett. 262(2):342-4.

Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO (2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29:183-212.

Woloshuk CP, Foutz KR, Brewer JF, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA (1994). Molecular characterization of *afIR*, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. Appl. Environ. Microbiol. 60(7):2408-14.

Wong KH, Hynes MJ, Todd RB and Davis MA (2007). Transcriptional control of *nmrA* by the bZip transcription factor MeaB reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*. Mol. Microbiol. 66(2): 534-551.

X

Xie H, Patching SG, Gallagher MP, Litherland GJ, Brough AR, Venter H, Yao SY, Ng AM, Young JD, Herbert RB, Henderson PJ, Baldwin SA (2004). Purification and properties of the *Escherichia coli* nucleoside transporter NupG, a paradigm for a major facilitator transporter sub-family. Mol. Membr. Biol. 21(5):323-36.

Y

Yabe K, Nakajima H (2004). Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64(6):745-55.

Yang R, Cui L, Hou Y-X, Riordan JR, Chang X-B (2003) ATP binding to the first nucleotide binding domain of multidrug resistance-associated protein plays a regulatory role at low nucleotide concentration, whereas ATP hydrolysis at the second plays a dominant role in ATP-dependent leukotriene C₄ transport. J. Biol. Chem. 33:30764–30771.

Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ (2006). Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. Mol. Biol. Cell. 17(12):5094-104.

Yang Z, Klionsky DJ (2007). Permeases recycle amino acids resulting from autophagy. Autophagy. 3(2):149-50.

Yin Y, He X, Szewczyk P, Nguyen T, Chang G (2006). Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*. Science. 312(5774):741-4.

Yoshida M, Konomi T, Kohsaka M, Baldwin JE, Herchen S, Singh P, Hunt NA, Demain AL (1978). Cell-free ring expansion of penicillin N to deacetoxycephalosporin C by *Cephalosporium acremonium* CW-19 and its mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75(12):6253-7.

Z

Zalacaín M, Malpartida F, Pulido D, Jiménez A (1987). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygroscopicus*. Eur. J. Biochem. 162(2):413-418.

Zhang J, Demain AL (1992). ACV synthetase. Crit Rev Biotechnol. 245-60.

Zhang JY, Demain AL (1990). Purification from *Cephalosporium acremonium* of the initial enzyme unique to the biosynthesis of penicillins and cephalosporins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 169(3):1145-52.

Zhang X, Cui Z, Miyakawa T, Moye-Rowley WS (2001). Cross-talk between transcriptional regulators of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 276(12):8812-9.

Zhou C, Yang Y, Jong AY (1990). Mini-prep in ten minutes. Biotechniques. 8(2):172-3.