

INGENIERÍA METABÓLICA: APLICACIÓN A LA PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DEL PIGMENTO FLUORESCENTE RIBOFLAVINA

M^a de los Angeles Santos y José L. Revuelta

Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca.
Campus Miguel de Unamuno.

INGENIERIA METABOLICA

La ingeniería metabólica ha sido definida como la introducción de modificaciones específicas en las rutas metabólicas con el propósito de mejorar las propiedades celulares. La ingeniería metabólica utiliza diferentes técnicas experimentales y analíticas para determinar los flujos a través de rutas metabólicas críticas en la célula o tejido de interés. De esta forma, efectuando diversas alteraciones del sistema, se pueden determinar las interrelaciones entre distintos procesos metabólicos; por ejemplo entre crecimiento celular y formación de un producto, y el control ejercido por enzimas específicas o grupos de enzimas sobre el flujo hacia determinadas rutas. Este conocimiento proporciona una base racional para la optimización de la velocidad de crecimiento de un organismo y/o la formación de producto utilizando técnicas de DNA recombinante, por ejemplo, la superexpresión de ciertas enzimas en la célula hospedadora, o por medio de una aproximación nutricional, por ejemplo, alterando la composición del medio de cultivo.

En los últimos años la ingeniería metabólica ha conseguido importancia en la biotecnología, siendo utilizada en gran medida para la

mejora de procesos existentes en los que están implicados microorganismos. Las áreas de aplicación incluyen la mejora en la producción de compuestos químicos ya producidos de forma natural por el organismo, la ampliación del número de sustratos que se pueden utilizar para el crecimiento y formación del producto, la adición de nuevas actividades catabólicas para la degradación de compuestos químicos tóxicos, la producción de nuevos compuestos químicos en un organismo y la modificación de las propiedades celulares.

Una de las aplicaciones más importantes de la ingeniería metabólica, y probablemente en la que se han obtenido resultados más notables, es la mejora de procesos para la producción de compuestos metabólicos en los que están implicados microorganismos. El descubrimiento y desarrollo, a partir de principios de los años ochenta, de la tecnología de DNA recombinante ha convertido a la ingeniería metabólica y su contribución a la biotecnología en una de las áreas de mayor crecimiento. Si bien las primeras aplicaciones de la tecnología de DNA recombinante se centraron en la producción de proteínas de valor terapéutico, debido a su elevado valor comercial y la relativa simplicidad del sistema —las proteínas son el producto inmediato del gen— a medida que la ingeniería genética ha alcanzado un mayor desarrollo se han logrado objetivos mucho más complejos como la manipulación de todos los genes asociados a una ruta biosintética para la producción de un determinado compuesto. Algunos de los metabolitos de elevado valor comercial, cuya producción industrial se ha realizado tradicionalmente mediante síntesis química, son en la actualidad objetivo de procesos de producción por fermentación debido tanto al encarecimiento de las materias primas que se precisan para la síntesis química como a los niveles de productividad alcanzados mediante fermentación con microorganismos modificados genéticamente. Por su especial atractivo comercial, entre los compuestos metabólicos que pueden ser elaborados por fermentación destacan los destinados a las industrias alimentaria (vitaminas, colorantes y saborizantes) y cosmética.

Durante los últimos años, nuestro laboratorio ha dedicado sus esfuerzos al desarrollo de microorganismos superproductores de vitamina B₂. En este capítulo describimos el potencial de las técnicas de ingeniería

metabólica en la investigación del metabolismo de la vitamina B₂ y su aplicación al desarrollo de sistemas de producción biotecnológicos de este pigmento fluorescente.

VITAMINA B2

Importancia biológica

Las vitaminas son sustancias orgánicas que se necesitan en cantidades traza en muchas de las formas de vida encontradas en la naturaleza. Muchos organismos no poseen la capacidad de sintetizar estos compuestos y necesitan obtenerlos de fuentes externas. Son activas en dosis bajas y esenciales para el crecimiento y el funcionamiento normal del metabolismo. Las vitaminas se clasifican en dos grupos atendiendo a su solubilidad: vitaminas liposolubles (vitaminas A, D, E y K) y vitaminas hidrosolubles (todas las vitaminas del grupo B y vitamina C).

La vitamina B₂, o riboflavina, fue originalmente aislada en 1879 a partir de leche y no fue reconocida como una vitamina hasta 1920. Su estructura no fue determinada hasta 1933 y sintetizada químicamente hasta 1935 (1). La riboflavina es un compuesto fluorescente de color amarillo anaranjado, soluble en agua, termoestable y lábil a la acción de la luz. La estructura de la riboflavina resulta de la combinación de un anillo de dimetilisoaloxacina con un polialcohol, D-ribitol, derivado de D-ribosa. En la naturaleza se encuentra normalmente en la forma de dos coenzimas: flavín mononucleótido (FMN) o riboflavina 5'-fosfato y flavín adenín dinucleótido (FAD). Los coenzimas FMN y FAD son los grupos prostéticos de muchas enzimas (flavoenzimas o flavoproteínas) implicadas en el catabolismo oxidativo de piruvato, ácidos grasos, aminoácidos y en el mecanismo de transporte electrónico en la cadena respiratoria. La capacidad de estas enzimas de oxidar y reducir sustratos muy variados está basada en un sistema de dobles enlaces conjugados presente en el anillo flavínico. Otras funciones biológicas de la riboflavina están relacionadas con su capacidad de absorción de la luz. Así en algunos animales forma parte del *tapetum lucidum* donde potencia la absorción de

la luz por el ojo. Recientemente, se ha descubierto que la vitamina B₂ forma parte de fotorreceptores de luz azul denominados criptocromos que determinan los ritmos biológicos circadianos en mamíferos. Su espectro de absorción, 233-475 nm, le permite captar la luz a una longitud de onda y emitirla a longitud de onda mayor que ya entra dentro del espectro de acción de los receptores oculares. También se ha sugerido que la riboflavina interviene en la fototaxis de ciertas algas y dinoflagelados y en el fototropismo de algunos hongos. Otro fenómeno biológico intimamente ligado con la vitamina B₂ es la bioluminiscencia, presente en numerosas especies de bacterias, dinoflagelados, hongos, peces, insectos y algunos artrópodos como el camarón y el calamar. Las enzimas que catalizan la reacción de luminiscencia, luciferasas, así como los sustratos, luciferinas, son diferentes en los distintos organismos que presentan bioluminiscencia. Sin embargo, todas estas reacciones comparten el carácter anaerobio de la reacción y la utilización de FMNH₂, forma fosforilada y reducida de la riboflavina. La molécula de FMNH₂ se une de forma no covalente a la luciferasa catalizando la reacción emisora de luz, la cual implica la oxidación del FMNH₂ y de un aldehído alifático de cadena larga, con la consiguiente emisión de luz. El FMNH₂ unido a la enzima reacciona con el O₂ para dar 4-peroxiflavina. Este compuesto reacciona a su vez con el aldehído para formar un intermediario altamente estable que decae lentamente, dando lugar a la emisión de la luz junto con la oxidación de los sustratos.

La riboflavina solo es biosintetizada por bacterias, hongos y plantas, siendo para el hombre y animales un compuesto esencial que han de adquirir a través de la dieta. El proceso biosintético ha sido elucidado mediante diferentes estudios en algunos de los organismos flavinogenicos, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pichia guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ashbya gossypii* y espinacas (2). La ruta establecida presenta diferencias entre los organismos procariotas y eucariotas (Figura 1). En ambos, la biosíntesis de riboflavina utiliza como precursores un derivado de guanina, el GTP y ribosa 5'-fosfato. El GTP, por acción de la GTP-ciclohidrolasa II, es transformado en 2,5-diamino-6-ribosilamino-4(3H)-pirimidina-5'-fosfato (DRSP). En eucariotas, este

compuesto sufre una reducción para formar 2,5-diamino-6-ribitilamino-4(3H)-pirimidina-5'-fosfato (DRTP) mientras que en procariotas el DRSP sufre una desaminación originando 5-amino-6-ribosilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinediona-5'-fosfato (ARSP). El siguiente paso de la ruta también es diferente en organismos procariotas y eucariotas. En eucariotas el DRTP sufre la pérdida de un grupo amino para formar 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinediona-5'-fosfato (ARTP). En procariotas el ARTP se forma a partir de la reducción del grupo ribosilo del ARSP. La formación del precursor inmediato de la vitamina B₂, 6,7-dimetil-8-ribitil-lumazina (DMRL), tiene lugar en dos etapas idénticas en procariotas y en eucariotas. En primer lugar, se forma 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato (DBP) por la acción enzimática de la sintetasa 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato a partir de ribulosa 5'-fosfato y posteriormente tiene lugar la condensación de una molécula de ARTP y una molécula de DBP. La última etapa de la ruta, catalizada por la sintetasa de riboflavina, tiene lugar por la dismutación de dos moléculas de ARTP que origina una molécula de riboflavina y una molécula de ARTP que se incorpora de nuevo a la ruta.

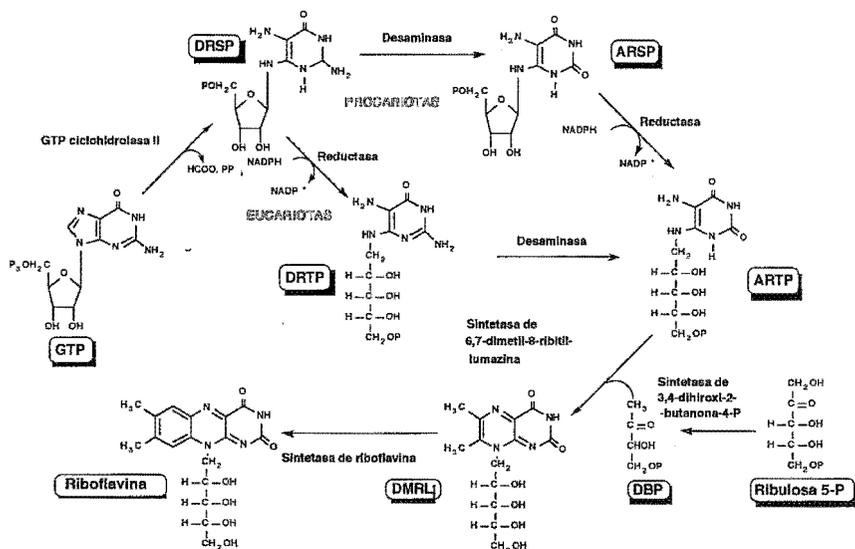


Figura 1. Ruta biosintética de la vitamina B₂ en organismos eucariotas y procariotas.

Importancia económica y producción industrial

El valor terapéutico de las vitaminas y sus necesidades como factores de crecimiento en la nutrición ha determinado que la producción de vitaminas adquiera una importancia cada vez mayor tanto para las industrias farmacéuticas como para las industrias alimentarias.

El valor global del mercado de vitaminas se estima en torno a 1000 millones de dólares, de los cuales 54 millones corresponden a la vitamina B₂. La producción mundial de esta vitamina se estima en un total de 2000 toneladas por año, de las cuales el 80% va destinada a alimentación animal y el otro 20% al consumo humano. Hasta fechas muy recientes la producción industrial de la vitamina B₂ se realizaba tanto por síntesis química, 60%, como por fermentación microbiana, 40%, empleando diferentes especies de organismos con capacidad de producir un exceso de vitamina B₂. En la actualidad, los sistemas de producción de vitamina B₂ mediante síntesis química han sido abandonados en beneficio de la producción fermentativa debido a que, como se describe posteriormente, se han logrado notables incrementos en la productividad y rentabilidad económica de este último método.

La vitamina B₂ esta presente en las células de los microorganismos que la biosintetizan en la forma de cofactores, FMN y FAD, pero cuando algunos de ellos crecen en medio líquido producen vitamina libre. Esta producción varía de unos organismos flavinogénicos a otros (3). Estos organismos flavinogénicos han sido clasificados en tres categorías: 1^a) aquellos que presentan una producción límite de 100 mg/l, en el que se encuentran especies del género *Clostridium*; 2^a) los organismos que producen hasta 500 mg/l de vitamina B₂, tales como ciertas especies de levaduras del género *Pichia* y por último, en la 3^a categoría, se encuentran dos hongos ascomicetos *Eremothecium ashbyii* y *A. gossypii*, y especies recombinantes de la bacteria *B. subtilis*, que llegan a producir hasta 10 g/l. De todos los organismos flavinogénicos fundamentalmente dos, *A. gossypii* y *B. subtilis*, son los utilizados por la industria para la producción de vitamina B₂. La producción alcanzada con ciertas cepas de *A. gossypii*, alrededor de 5 g/l, es inferior a la que se obtiene con ciertas cepas de *E. ashbyii*. Sin embargo, debido a la inestabilidad genética que presenta este

último organismo lo hace inviable para su crecimiento en los tanques de fermentación. En el caso de *B. subtilis*, los niveles de producción, 0.8 g/l, son inferiores a los de *A. gossypii*. Recientemente, sin embargo, se han desarrollado nuevas cepas de *B. subtilis* mediante técnicas de DNA recombinante con las que se declara la posibilidad de alcanzar niveles de producción llegan hasta 4.5 g/l.

FLAVINOGENESIS EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

Los genes flavinogénicos

Para proceder al estudio de la ruta de biosíntesis de la riboflavina se escogió como organismo modelo la levadura *S. cerevisiae* debido a su fácil manipulación en el laboratorio, así como su elevado grado de desarrollo en técnicas bioquímicas, genéticas y de DNA recombinante. La presencia en este organismo de cualidades muy atractivas desde el punto de vista industrial y comercial, como son su uso tradicional en alimentación y la existencia de métodos de fermentación muy eficaces, fueron también características determinantes que influyeron en su elección.

La identificación de los genes implicados en la biosíntesis de vitamina B₂ en la levadura se ha realizado por el método clásico de obtención de mutantes afectados en el proceso. Mediante mutagénesis de una cepa prototrófica para riboflavina se aisló una colección de mutantes auxotróficos incapaces de crecer en un medio sin riboflavina. Los estudios de acumulación de compuestos intermediarios, pruebas de crecimiento y análisis genéticos de complementación realizados con estos mutantes permitió su clasificación en seis grupos (Tabla I). El primer grupo de mutantes, incluye a los mutantes denominados *rib1*, estos mutantes no acumulan ningún compuesto específico ni se observa fluorescencia en el medio de cultivo por lo que se supuso que debían estar afectados en la primera etapa de la ruta. La mayoría de los intermediarios de la ruta biosintética de riboflavina son muy inestables pero la condensación con diacetilo permite su estabilización. Además, algunos de los derivados de

los intermediarios biosintéticos presentan un patrón de fluorescencia característico que permite diferenciar fenotípicamente a los mutantes que acumulan un compuesto intermediario de la ruta específico. Gracias a la determinación del compuesto acumulado se pudo determinar que un segundo grupo de mutantes están afectados en el segundo paso de la ruta. Estos mutantes, denominados *rib7*, acumulan DRSP. En un tercer grupo de mutantes se agrupan aquellos que presentan una fluorescencia azul verdosa cuando crecen en un medio con diacetilo. La caracterización del compuesto acumulado, DRTP, permitió determinar que este tipo de mutantes están afectados en la tercera etapa de la ruta, la síntesis de ARTP, y fueron denominados *rib2*. Los mutantes de los grupos *rib3* y *rib4* acumulan el mismo compuesto intermediario, ARTP, y ambos crecen en un medio sin riboflavina suplementado con diacetilo. El diacetilo es capaz de condensarse espontáneamente con el intermediario ARTP para formar DMRL, precursor inmediato de la riboflavina. De esta manera, la presencia de DMRL soslaya los defectos enzimáticos de estos mutantes y permite su crecimiento en un medio carente de riboflavina. La diferencia de crecimiento en un medio de cultivo sin riboflavina pero suplementado con 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato (DBP) permite diferenciar los mutantes afectados en la síntesis de 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato (DBP), mutantes *rib3*, de los mutantes afectados en el paso de formación de DMRL, mutantes *rib4*. El último grupo de mutantes, denominados *rib5*, presentan una fluorescencia verdosa debido a la acumulación de DMRL, y representa aquellos mutantes afectados en la última etapa de la ruta.

Tabla I.

Gen	Enzima	Crecimiento				Producto acumulado
		MM	MMD	MMB	MMR	
RIB1	GTP ciclohidrolasa	-	-	-	+	ninguno
RIB7	DRSP reductasa	-	-	-	+	DRSP 2,5-diamino-6-ribosilamino-4(3H) pirimidina-5'-fosfato
RIB2	DRTP deaminasa	-	-	-	+	DRTP 2,5-diamino-6-ribitilamino-4(3H) pirimidina-5'-fosfato
RIB3	DHBP sintetasa	-	+	+	+	ARTP 5-amino-6-ribitilamino-4(3H) pirimidinediona-5'-fosfato
RIB4	DMRL sintetasa	-	+	-	+	
RIB5	Riboflavina sintetasa	-	-	-	+	DMRL 6,7-dimetil-8-ribitil-lumazina

La obtención de mutantes alterados en cada una de las seis etapas biosintéticas de riboflavina posibilita el empleo de técnicas de DNA recombinante y el aislamiento de los genes que codifican las enzimas implicadas. El aislamiento del DNA total de un organismo, su digestión con restrictasas apropiadas y la posterior clonación de los fragmentos resultantes en un vector de clonación ha permitido la construcción de genotecas genómicas en las que se encuentran representados todos los genes del organismo. El uso de este tipo de genotecas es muy frecuente para la identificación y aislamiento de genes implicados en un determinado proceso biológico cuando se dispone de las oportunas cepas mutantes en dicho proceso. La introducción en la célula mutante de una molécula de DNA portadora del gen funcional da lugar a la aparición de clones transformantes con un fenotipo idéntico a las cepas de tipo silvestre, no mutantes. En esta estrategia de clonación, denominada complementación funcional, la incorporación en las células mutantes de un plásmido recombinante con el gen funcional es capaz de restaurar la disfunción biológica. El uso de una genoteca genómica de *S. cerevisiae* en la transformación de las seis cepas mutantes *rib*, defectivas en cada una de las etapas biosintéticas de la riboflavina, y la posterior selección de transformantes en un medio carente de riboflavina permitió la obtención de clones transformantes prototróficos (4). De cada uno de estos clones transformantes, capaces de crecer en ausencia de riboflavina, se rescataron los plásmidos y se analizó su capacidad de complementar de nuevo la mutación. La subclonación y secuenciación de los insertos de DNA genómico contenidos en los diferentes plásmidos recombinantes reveló la presencia de cada uno de los genes *RIB* (*RIB1* a *RIB5* y *RIB7*). La identidad funcional de cada gen aislado fue además comprobada mediante la construcción de cepas delecionadas en los respectivos fragmentos de DNA clonado. En todos los casos el fenotipo de estas cepas deletantes es idéntico al que presentan las cepas mutantes originales.

Las secuencias codificantes de los genes *RIB* no presentan desviación en el uso de codones, característica de los genes de bajo nivel de expresión en *S. cerevisiae* (5). Todos los genes comparten en su secuencia 3' una de las secuencias (UAG... UAUGU...UUU) descrita en la levadura como secuencia implicada en el proceso de terminación de la

transcripción (6). Aunque no se ha realizado un estudio profundo sobre la importancia de esta triple secuencia en el procesamiento de los transcritos de los genes *RIB*, sí se tienen resultados experimentales que apoyan su importancia en el caso del gen *RIB5*. El análisis de los transcritos obtenidos a partir de una cepa en la que el gen *RIB5* no contiene la triple secuencia de terminación, muestra la existencia de especies de transcritos heterogéneas, y de tamaño considerablemente mayor que los transcritos producido por el gen silvestre, y que sugiere la ausencia de proceso de terminación de la transcripción correcto (Figura 2).

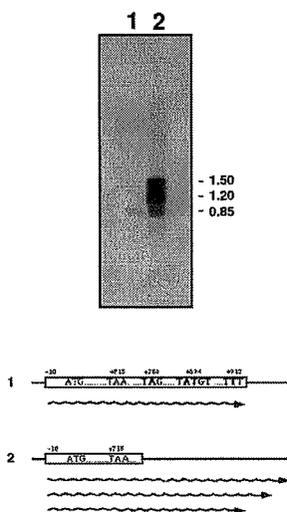


Figura 2. Análisis Northern con el extremo 3' no codificante intacto y delecionado. 1) ARN poli (A)⁺ de la cepa JC2a, *RIB5* y 2) ARN poli (A)⁺ de la misma cepa transformada con un plásmido episómico portador del gen *RIB5* con parte de la secuencia del extremo 3' delecionada.

Los genes flavinogénicos en *S. cerevisiae* han sido mapeados (7,8). Estos genes no presentan ligamiento, aunque tres de ellos (*RIB1*, *RIB7* y *RIB5*) están localizados en el mismo cromosoma (cromosoma II). El gen *RIB2* se localiza en el cromosoma VII mientras que los genes *RIB3* y *RIB4* mapean en los cromosomas IV y XV respectivamente. La ausencia de

ligamiento físico de los genes flavinogénicos es una característica compartida por otras levaduras y ciertas bacterias como *E. coli*. Por el contrario, en *B. subtilis* todos los genes flavinogénicos se encuentran ligados y organizados en forma de operón (9). En las bacterias bioluminiscentes *Vibrio harveyii* y *Photobacterium leiognathii*, algunos de los genes flavinogénicos se encuentran formando parte del operón *LUX*, que contiene además los genes que codifican para las diferentes proteínas implicadas en el fenómeno de bioluminiscencia.

Proteínas flavinogénicas

Como se detallará posteriormente, los niveles de expresión de los genes flavinogénicos en la levadura son extremadamente bajos y las enzimas flavinogénicas están presentes en cantidades mínimas en las células. La superexpresión de un gen en la bacteria *E. coli* es una estrategia sencilla y eficaz que permite la obtención y purificación de grandes cantidades de la proteína codificada por dicho gen en aquellos casos en que es difícil su obtención en el organismo nativo. Para avanzar en el estudio de las enzimas implicadas en la ruta biosintética de la riboflavina se procedió a la clonación de las secuencias codificantes de los diferentes genes *RIB* en vectores de expresión basados en el sistema de la RNA polimerasa del fago T7 y su superexpresión en células de *E. coli*. Aunque en la mayoría de los casos las proteínas purificadas a partir de los extractos celulares bacterianos eran enzimáticamente inactivas, debido probablemente al plegamiento incorrecto de la proteína en la bacteria, se logró la obtención de cantidades suficientes de proteína para inducir la formación de anticuerpos policlonales contra cada una de las proteínas Rib de la levadura. La disponibilidad de estos anticuerpos ha hecho posible la purificación hasta aparente homogeneidad de las proteínas flavinogénicas Rib3p, Rib4p, Rib5p y Rib7p así como la obtención de fracciones muy enriquecidas de las proteínas Rib1p y Rib2p a partir de extractos celulares de la propia levadura. Estos trabajos nos han permitido una caracterización enzimática y estructural bastante detallada de estas proteínas cuyas propiedades más relevantes se presentan en la Tabla II.

Tabla II. Características de las enzimas flavinogénicas de la levadura

Enzima	Gen	Mr (kDa)	Localización celular	Estructura cuaternaria
GTP ciclohidrolasa II	RIB1	38	Citoplasma	Dímero?
Reductasa	RIB7	27	Citoplasma	Dímero
Deaminasa	RIB2	67	Citoplasma	?
Sintetasa DHBP	RIB3	24	Citoplasma	Monómero
Sintetasa DMRL	RIB4	18	Citoplasma	Pentámero
Sintetasa de riboflavina	RIB5	24.5	Citoplasma	Trímero

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas flavinogénicas con las secuencias conocidas de proteínas homologas en otros organismos ha revelado la existencia de un elevado grado de conservación y ha resultado de gran utilidad en la definición de residuos y dominios relevantes para la actividad enzimática. Este tipo de análisis ha sido también fundamental en la caracterización de la organización de los genes flavinogénicos en procariotas. La proteína *ribA* de *B. subtilis* muestra homología en su mitad amino-terminal con la proteína Rib3p, que codifica sintetasa de 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato, y en su mitad carboxilo-terminal con la proteína Rib1p, con actividad GTP ciclohidrolasa II. Este resultado indica la existencia en *Bacillus* de una proteína flavinogénica bifuncional que también es compartida por algunas especies de procariotas como *Mycobacterium*, *Azotobacter*, *Photobacterium*, pero no por otras como *E. coli* o *V. harveyii* en las que igual que en los organismos eucarióticos todos los genes y proteínas flavinogénicas son monofuncionales.

Las diferencias entre las proteínas flavinogénicas de los organismos procarióticos y las de la levadura también se extienden a la propia organización de su estructura cuaternaria. Así, en *B. subtilis*, la sintetasa de riboflavina es un complejo multiproteico icosaédrico muy estable que contiene 60 subunidades de un péptido de 16.2 kDa con actividad sintetasa de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina, que forman la denominada

sintetasa de riboflavina pesada, y 3 subunidades de un péptido de 23.5 kDa, con actividad sintetasa de riboflavina propiamente dicha, que recibe el nombre de sintetasa de riboflavina ligera. En *Saccharomyces*, la sintetasa de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina consiste en un pentámero formado por cinco subunidades idénticas del péptido codificado por el gen *RIB4* y no se encuentra asociada a la sintetasa de riboflavina (10, 11).

Nuestros estudios sobre las proteínas flavinogénicas de la levadura también se han dirigido a la comprensión de su organización estructural y funcional. Por ejemplo, los resultados obtenidos sobre la sintetasa de riboflavina muestran que la enzima activa esta formada por péptidos idénticos codificados por el gen *RIB5* que se organizan en forma de homotrímero. En este organismo, los estudios de especificidad de sustrato como de cinética de reacción han revelado que la sintetasa de riboflavina posee dos sitios de unión diferentes para la molécula de sustrato DMRL. Por otra parte, las mitades N-terminal y C-terminal de la proteína Rib5p presentan una marcada homología cuando se tienen en cuenta sustituciones conservativas de aminoácidos. Estas características nos han permitido definir la presencia en Rib5p de dos dominios de unión al sustrato DMRL localizados en los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína. El mecanismo de reacción de la sintetasa de riboflavina consistente en la dismutación de dos moléculas idénticas de DMRL implica que una molécula de sustrato unida al dominio donador de la enzima cede cuatro átomos de carbono a otra molécula de sustrato unida al sitio aceptor de la enzima. De esta forma, la molécula de sustrato unida en el dominio donador se transforma en una molécula de ARTP mientras que la molécula de sustrato del sitio aceptor se convierte en una molécula de riboflavina. Si se compara la estructura de los dominios N-terminal y C-terminal de la proteína Rib5p con la de la proteína Rib4p, que utiliza ARTP como sustrato, se advierte que solamente el extremo C-terminal muestra un grado relevante de homología estructural. Este hecho permite profundizar en la organización funcional de la sintetasa de riboflavina y proponer la identificación del dominio aceptor con el dominio N-terminal y el dominio donador con el dominio C-terminal. Los resultados obtenidos mediante experimentos de complementación intragénica entre distintas proteínas Rib5p mutantes demuestran además que el centro

activo de la sintetasa de riboflavina resulta de la interacción del dominio N-terminal de un monómero Rib5p con el dominio C-terminal de otro monómero Rib5p distinto. Los resultados disponibles hasta el momento sugieren un modelo estructural y funcional para la sintetasa de riboflavina en el que las tres subunidades de proteína Rib5p se organizan en un antiprisma trigonal que contiene tres centros catalíticos formados por el centro N-terminal-aceptor de una subunidad y el centro C-terminal-donador de la subunidad adyacente (Figura 3).

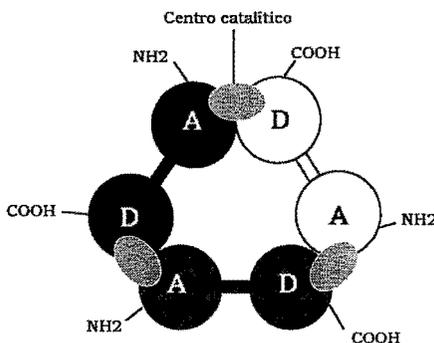


Figura 3. Modelo de la estructura funcional de la sintetasa de riboflavina. A dominio aceptor y D dominio donador.

El estudio de proteínas mutantes con sustituciones de aminoácidos resulta una herramienta muy útil en la identificación de los residuos esenciales para la actividad de la proteína. Por ejemplo, en la proteína Rib5p se ha logrado identificar mediante experimentos de mutagénesis aleatoria dos residuos aminoácidos localizados en el dominio N-terminal, en las posiciones 54 y 72, esenciales para la actividad catalítica de la sintetasa de riboflavina. Estos residuos aparecen conservados en todas las proteínas homólogas a Rib5p por lo que se ve apoyada su importancia funcional. En la posición 54 se encuentra un residuo de cisteína cuya sustitución por un residuo de tirosina en la proteína mutante provoca una pérdida total de actividad enzimática. Los estudios realizados con la proteína mutante muestran que este residuo no está implicado en la estructura trimérica de la enzima ya que la proteína mutante cuando se

somete a electroforesis en condiciones nativas presenta la misma movilidad electroforética que la proteína silvestre. Por el contrario, los resultados sugieren que Cys⁵⁴ se encuentra implicado directamente en la reacción y podría proporcionar el grupo SH que algunos autores proponen como grupo de abstracción de protones en la primera etapa del mecanismo de reacción de la sintetasa de riboflavina (12). El otro residuo implicado en la funcionalidad de la enzima es el Glu⁷², cuya sustitución por lisina produce una pérdida drástica, aunque no total, de la actividad enzimática. Esta pérdida de actividad ha podido ser demostrada *in vivo* mediante experimentos de complementación genética en los que se ha observado que la presencia en las células de una única copia del alelo mutante causa auxotrofia total para riboflavina mientras que la presencia de un número de copias elevado del mismo alelo restaura la actividad sintetasa de riboflavina a los niveles de actividad que presenta el alelo silvestre. La disminución de actividad puede ser explicada por la diferencia de carga entre los aminoácidos Glu y Lys que son de carácter ácido y básico respectivamente. Las características que presenta esta mutación hacen mas probable que el residuo Glu⁷² esté implicado en la unión de la molécula de sustrato que en el propio centro catalítico de la enzima.

Transcripción de los genes flavinogénicos

La regulación de la biosíntesis de riboflavina ha sido estudiada en diferentes organismos flavinogénicos en los que se ha podido definir tres modelos diferentes de regulación. En un grupo de organismos, como *P. guilliermondii* o ciertas especies de *Clostridium*, la síntesis de riboflavina se encuentra regulada negativamente por iones de hierro de forma que la flavinogénesis únicamente tiene lugar en condiciones limitantes de hierro en el medio de cultivo. Aunque se desconoce el mecanismo exacto de regulación, los datos disponibles apuntan a que ésta se efectúa a nivel transcripcional. Otro modelo de regulación corresponde a aquellos organismos tales como *B. subtilis* en los que la flavinogénesis está regulada a nivel transcripcional siendo en este caso las moléculas efectoras riboflavina u otros derivados flavínicos como el FMN. El tercer

modelo corresponde a aquellos organismos tales como *E. coli* en los que la síntesis de riboflavina tiene lugar de forma constitutiva.

Tabla III. Expresión de los genes flavinogénicos en *S. cerevisiae*

Gen	Enzima	Transcripción	Abundancia celular (% RNA total)
<i>RIB1</i>	GTP cyclohydrolasa II	Constitutiva	0.009
<i>RIB7</i>	Reductasa	Constitutiva	0.0005
<i>RIB2</i>	Deaminasa	Constitutiva	0.0007
<i>RIB3</i>	Sintetasa DHPB	Constitutiva	0.002
<i>RIB4</i>	Sintetasa DMRL	Constitutiva	0.01
<i>RIB5</i>	Sintetasa riboflavina	Constitutiva	0.001
<i>URA3</i>	Orotidín 5'-P decarboxilasa	Constitutiva	0.05

Para determinar los posibles mecanismos de control de la flavinogénesis en *Saccharomyces* se cuantificaron los niveles de mensajero específico para cada uno de los genes *RIB* en diferentes condiciones de cultivo. Los resultados obtenidos muestran claramente que los seis genes se expresan constitutivamente. Además, aunque con variaciones, la tasa de transcripción de estos genes es bastante baja, llegando en algunos casos a representar menos del 0.001% del RNA total celular (Tabla III). Esta baja tasa transcripcional se ve reflejada en unos niveles de actividad enzimática mínimos. Así pues, la baja tasa transcripcional podría estar limitando el flujo biosintético de riboflavina en la levadura. Esta hipótesis ha sido confirmada mediante sustitución de los promotores nativos *RIB* por promotores de fuerte expresión en la levadura. Los primeros resultados obtenidos con el gen *RIB5* mostraron que tanto con el aumento de la dosis génica como con el reemplazamiento del promotor nativo por un promotor de fuerte expresión, como el promotor del gen *PGK*, se consiguen fuertes incrementos en el nivel de expresión, transcripcional y traduccional, del gen. La abundancia de

transcrito determinada por análisis densitométrico, y normalizada frente al gen constitutivo *ACT1*, en células con diferentes modificaciones del gen reveló que es factible obtener diferentes grados de incremento en su nivel de transcripción (Figura 4). El nivel de transcripción del gen *RIB5* se incrementa aproximadamente 20 veces respecto al tipo silvestre cuando se encuentra en un número de copias alto en la célula. Este incremento resulta ser de 80 veces cuando el gen, además de estar presente en un plásmido multicopia, esta gobernado por el promotor fuerte del gen *PGK*. El gen *RIB5* controlado por su propio promotor y en una única copia por célula presenta un nivel de transcripción 4 veces inferior a cuando se encuentra bajo el control del promotor del gen *PGK*.

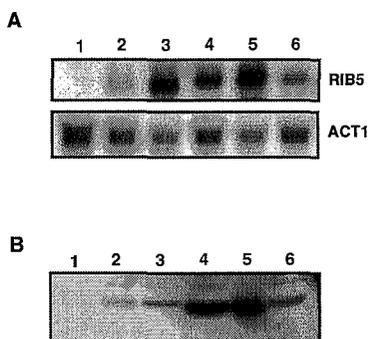


Figura 4. Expresión del gen *RIB5* en cepas de levadura con diferentes modificaciones del gen. **A.** Análisis Northern del transcrito del gen *RIB5*: 1) cepa de delección A53 ($\Delta RIB5$), 2) cepa silvestre X218-1A (*RIB5*), 3) cepa AJ113 con dosis altas del gen *RIB5* (AJ53/pJR235, plásmido episómico portador del gen *RIB5*), 4) cepa AJ111 con una única copia del gen *RIB5* (AJ53/pJR375, plásmido centromérico portador del gen *RIB5*), 5) cepa AJ112 con el gen *RIB5* bajo el control del promotor del gen *PGK*, FUSION pPGK-*RIB5* y dosis altas de dicha fusión (AJ53/pJR376, plásmido episómico portador de la fusión), 6) cepa AJ93 con una única copia de la fusión pPGK-*RIB5* interada en el locus *RIB5*($\Delta RIB5::pPGK-RIB5$). **B.** Western blot de extractos celulares de las cepas: 1) AJ53, cepa de delección, 2) X2180-1A cepa silvestre *RIB5* en varias copias, 3) AJ93, fusión pPGK-*RIB5* en copia única, 4) AJ113, el gen *RIB5* en varias copias, 5) AJ112, fusión pPGK-*RIB5* en dosis altas, 6) AJ111, gen *RIB5* en copia única.

En todos los casos, los niveles de transcripción están correlacionados tanto con los niveles celulares de proteína Rib5p determinada por Western blotting como con la actividad específica sintetasa de riboflavina

determinada en extractos celulares totales (Figura 4). El análisis densitométrico revela que la concentración celular de proteína Rib5p es 3.5 veces superior cuando el gen esta bajo el control del promotor *PGK* que cuando el gen está con su propio promotor. Los máximos niveles de proteína se presentan en células portadoras de la fusión génica *PGK-RIB5* en un plásmido multicopia. La actividad enzimática detectada en las diferentes cepas recombinantes guarda una relación directa con los niveles de transcripción y con los niveles intracelulares de proteína detectada (Tabla IV).

TABLA IV

Cepa	Actividad sintetasa de riboflavina (nmoles de riboflavina / mg de proteína)
X2180-1A	5.59
AJ53	—
AJ113	91.60
AJ111	31.40
AJ112	404.01
AJ93	32.20

Modificaciones genéticas similares a las realizadas con el gen *RIB5* se han ensayado en los otros cinco genes de la ruta flavinogénica de la levadura. Así, el gen *RIB1* ha sido fusionado al promotor del gen *ENO1*; *RIB7* al promotor *TPI*; *RIB2* al promotor *G3P*; *RIB3* al promotor *PGK* y *RIB4* al promotor *TEF1*. Las diferentes fusiones génicas fueron analizadas para ver el efecto en la expresión del gen fusionado obteniéndose, como en el caso del gen *RIB5*, fuertes incrementos en la expresión génica a nivel de transcripción y de traducción.

CONSTRUCCION DE CEPAS DE LEVADURA PRODUCTORAS DE VITAMINA B₂

El caracter de expresión génica constitutiva de bajo nivel de la ruta flavinogénica en la levadura sugería que no había ningún cuello de botella limitante y que sería factible un incremento en el flujo metabólico de la ruta si se aumentaba la actividad enzimática específica de cada una de las etapas enzimáticas individuales. Los notables incrementos en la expresión génica conseguidos mediante la sustitución de los promotores nativos de los genes *RIB* por promotores de fuerte expresión parecían, por tanto, proporcionar un mecanismo eficaz para lograr un incremento en la producción de riboflavina si todos los genes se encontrasen superexpresados en la misma célula. Con esta finalidad se construyó un plásmido episómico multicopia, pJR619, que es portador de los seis genes *RIB* y se introdujo por transformación en una cepa de levadura. Como era de esperar, el aumento de la dosis génica de los genes *RIB* en las células transformantes provoca un incremento en la producción de riboflavina alcanzándose valores que oscilan en torno a los 200 mg/l y que hacen visible con coloración amarilla la presencia de vitamina en el medio de cultivo (Figura 5). Un mayor aumento de la expresión génica de los genes flavinogénicos se logra cuando las células son transformadas con un plásmido multicopia portador de los seis genes *RIB* bajo el control de diferentes promotores de fuerte expresión que determina un incremento adicional en la producción de riboflavina (Figura 6). La cantidad de riboflavina acumulada en estas cepas transformantes es aproximadamente 1000 veces superior a de la cepa silvestre. Esto supone una producción de 0.5 g/l; valor próximo al de alguno de los sistemas microbianos utilizados para la producción industrial por fermentación de esta vitamina.

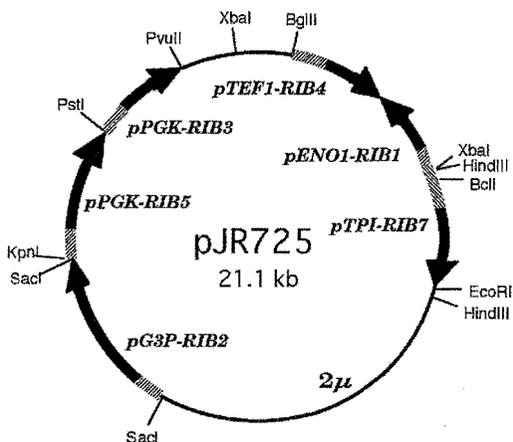


Figura 5. Plásmido que porta los seis genes flavinogénicos bajo el control de promotores de fuerte expresión en la levadura.

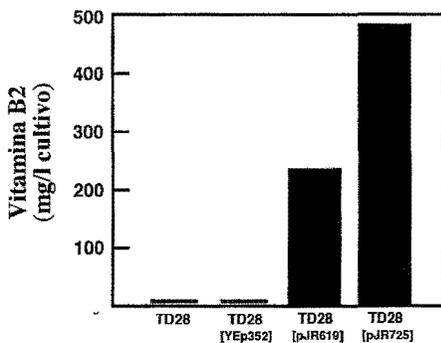


Figura 6. Producción de riboflavina de las cepas: TD28; TD28 transformada con el plásmido episómico, YEp352; TD28 transformada con el plásmido episómico, pJR619 portador de los seis genes RIB con sus propios promotores y TD28 transformada con el plásmido episómico con los genes RIB bajo el control de promotores de fuerte expresión.

FLAVINOGENESIS EN *Ashbya gossypii*

Aunque los incrementos en la producción de riboflavina conseguidos en *Saccharomyces* son notables y pueden tener su aplicación comercial en la elaboración de alimentos, por ejemplo pan, enriquecidos en esta vitamina, los niveles de producción son inferiores a los que se obtienen en la industria con ciertos microorganismos. Uno de los sistemas industriales de producción de vitamina B₂ mas eficaces se basa en la fermentación del hongo *A. gossypii*. Los incrementos en la producción de riboflavina conseguidos en la levadura mediante la manipulación génica de los genes flavinogénicos nos estimuló a abordar el estudio de la ruta flavinogénica y su posterior modificación metabólica en dicho hongo.

A. gossypii es un ascomiceto que presenta un tipo de crecimiento micelial. Sus hifas son septadas y contienen un número variable de núcleos haploides. En ciertas condiciones de cultivo ciertos fragmentos de las hifas esporulan dando lugar a la formación de esporas en su interior. Estas esporas, de las que se desconoce si derivan de un verdadero proceso meiótico, se agrupan en número de ocho, presentan una morfología acicular con un apéndice filiforme en cada extremo y un único núcleo. Las esporas cuando son liberadas de la hifa comienzan la emisión del tubo germinativo a través de un engrosamiento central de la espora. El tubo germinativo se prolonga en una única dirección; formandose posteriormente la primera hifa, que se ramifica y da lugar a nuevas hifas.

A diferencia de *S. cerevisiae*, en *Ashbya* no se ha encontrado ningún plásmido nativo que permita la construcción de vectores episómicos para este organismo. Los plásmidos que se han empleado en la transformación derivan de los de la levadura y tanto aquellos que están basados en el origen de replicación del plásmido de 2 μ como los que contienen secuencias de replicación autónoma (ARS) y/o centroméricas (CEN) son muy inestables. La transformación con fragmentos lineales de DNA da lugar a transformantes integrativos y tiene lugar por recombinación homóloga. El método de transformación, basado en la obtención de protoplastos, da un número muy bajo de transformantes (1-10 transformantes/ μ g DNA). Mediante el uso de técnicas de electroporación

con esporas germinadas es posible aumentar la eficacia de transformación llegando a obtenerse alrededor de 200 transformantes por μg de DNA.

El bajo número de transformantes que se consigue en *Ashbya*, así como la ausencia de vectores estables, hace muy difícil la posibilidad de clonar genes por complementación en este organismo. Sin embargo, la estrecha relación filogenética existente entre la levadura y *Ashbya* nos indujo a pensar que los genes de este último organismo pueden ser funcionales en la levadura si se consigue que se expresen eficientemente. Para que la expresión de un gen heterólogo sea eficaz es necesario poner la secuencia codificante del gen a expresar bajo el control de promotores propios del organismo huésped, asegurando así la correcta transcripción de la secuencia de interés. La obtención de las secuencias de DNA de la población los genes que se transcriben en una célula puede conseguirse a partir de la reacción de transcripción reversa de la población de RNA mensajero. La clonación de la población de DNAs copia en un vector de expresión y su posterior transformación permite expresar de forma eficaz los genes del organismo del cual deriva el DNA copia en el organismo huésped. Siguiendo esta aproximación, para aislar los genes flavinogénicos de *Ashbya* se construyó una genoteca de cDNA de este organismo en un vector de expresión de la levadura, pYEUra3, en el que los insertos de cDNA quedan controlados por el promotor inducible *GAL10*. La transformación de cada una de las cepas mutantes *rib* de la levadura con la genoteca de cDNA resultó en la obtención de clones transformantes prototróficos para riboflavina en cada una de las cepas mutantes *rib*. Los plásmidos portadores de los insertos de cDNA fueron rescatados y estos insertos secuenciados. La secuenciación reveló que los plásmidos transformantes portaban los correspondientes cDNA copia de los genes *RIB* de *Ashbya*. El cDNA de un gen carece tanto de la secuencia promotora como de la secuencia terminadora o aquellas otras secuencias, como intrones, que no se transcriben. Así para obtener las copias genómicas de los genes fue necesario recurrir a otras estrategias.

Uno de los sistemas desarrollado en técnicas de genética molecular para la clonación del genoma completo de un organismo es la construcción de cosmidotecas. Estas cosmidotecas constan de una colección de clones de bacteria cada uno de los cuales alberga un cósmido portador de un fragmento de 30-40 kb de DNA genómico del organismo a partir del cual fue construida la cosmidoteca. Tras la construcción de una cosmidoteca de *Ashbya*, y mediante técnicas de hibridación de colonias utilizando como sondas los insertos de cDNA de los genes *RIB*, se pudieron aislar varios cósmidos portadores de insertos de DNA genómico conteniendo cada uno de los genes *RIB*. A partir de estos cósmidos y tras un proceso de subclonación para delimitar la posición del gen *RIB* en el inserto original se procedió a su secuenciación.

El análisis de las secuencias de los seis genes flavinogénicos de *Ashbya* ha mostrado que presentan un elevado grado de homología con los correspondientes genes de la levadura, según se esperaba de su proximidad en la escala filogenética. Las proteínas flavinogénicas de *Ashbya* y *Saccharomyces* son prácticamente idénticas si se consideran sustituciones conservativas y pequeñas deleciones o inserciones.

La deleción por técnicas de ingeniería genética de cada uno de los genes *RIB* de *Ashbya* origina clones transformantes auxotróficos para riboflavina que presentan una pérdida total de actividad enzimática codificada por el gen delecionado. Esto demuestra que los genes flavinogénicos de *Ashbya* se encuentran en una única copia en el genoma. Queda así puesto de manifiesto que la alta tasa de producción de riboflavina que presenta este organismo no se debe a un efecto de dosis génica, con la presencia de mas de una copia génica por complemento genómico, como sucede en algunos organismos que sobreproducen diferentes metabolitos secundarios.

El análisis de las secuencias promotoras de los genes *RIB* de *Ashbya*, al igual que los genes de la levadura, no presentan homología ni comparten secuencias o elementos que pudiesen estar involucrados en la regulación de la ruta flavinogénica. Los genes *RIB* de *Ashbya* presentan

un nivel de transcripción intermedio equivalente al del gen *LEU2*, gen estructural de la ruta biosintética de la leucina. El nivel de transcritos *RIB* permanece constante desde la fase de crecimiento exponencial inicial hasta la fase estacionaria, fase en la que tiene lugar la acumulación de riboflavina tanto en el micelio como en el medio.

Los primeros trabajos orientados a incrementar el nivel de expresión de los genes *RIB* en *Ashbya* se han realizado con el gen *RIB5*. Con este propósito fue necesario en primer lugar el aislamiento de promotores de expresión en este organismo. Un promotor que reúne estas características es el del gen *PGK*, que codifica la enzima glicolítica 3-fosfoglicerato quinasa. Utilizando este promotor se ha construido una fusión génica con la secuencia codificante del gen *RIB5* de *Ashbya*. La integración estable de este gen quimérico *PGK-RIB5* produce un incremento aproximado de 8 veces en el nivel de transcrito *RIB5* celulares y que se aproxima en abundancia a los del propio transcrito *PGK* (Figura 7). Los resultados conseguidos con esta fusión génica son esperanzadores sobre la base de que un incremento en la expresión de todos los genes *RIB* en *Ashbya* se traduzca en un incremento en la producción de riboflavina en este organismo de forma similar a los resultados obtenidos previamente en *Saccharomyces*. En esta línea se está trabajando actualmente en nuestro laboratorio.

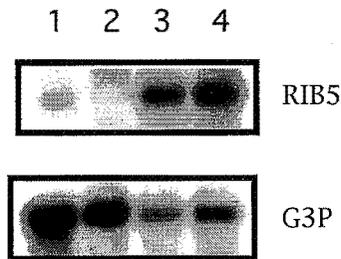


Figura 7. Análisis Northern de la expresión de los genes *RIB5* y *PGK* en cepas de *Ashbya gossypii* con diferentes modificaciones del locus *RIB5*. 1) cepa silvestre, 2) cepa de delección, 3) y 4) clones con la fusión *pPGK_RIB5* integrada en el locus *RIB5*.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Jean Flogrent. 1986. Vitamins in *Biotechnology* Vol. 4 pp116-158. edited by H.-J. Rehm and G. Keed, VCH Verlagsgesellschaft mbU, D-6940 (Federal Republic of Germany).
- (2) Bacher, A. 1991. In: *Chemistry and Biochemistry of Flavoproteins* (Müler, F., ed.). Vol. 1, pp. 215-259, Chemical Ruber Co, Boca Raton, FL.
- (3) Demain, A. L., 1972. "Riboflavin Oversynthesis". *Ann. Rev. Microbiol.* 26:369.
- (4) Rose, M. A., P. Novick, J. M. Thomas, D. Botstein and G. Fink. 1987. "A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector". *Gene* 60:237.
- (5) Sharp, P. M., and W. H. Li. 1987. "The codon adaptation index-A measure of directional synonymous codon usage, and its potential applications". *Nucl. Acids Res.* 15:1281.
- (6) Zaret, K. S. And F. Sherman. 1982. "DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast". *Cell* 28:563.
- (7) Santos, M. A., E. A. Iturriaga and A. P. Eslava. 1988. "Mapping of the *RIB5* gene in *Saccharomyces cerevisiae* using UV light as an enhancer of *rad52*-mediated chromosomal loss". *Curr. Genet.* 14:419.
- (8) Buitrago, M. J., G. A. González, J. E. Saiz and J. L. Revuelta. 1993. "Mapping of *RIB1* and *RIB7* genes involved in the biosynthesis of riboflavin in *Saccharomyces crevisiae*". *Yeast* 9:1099.
- (9) Mironov, V. N., M. L. Chikindas, A. S. Kraev, A. I. Stepanov and K. G. Skryabin. 1989. "Operon organization of genes of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis*". *Mol. Biol. (Moscow)* 312:237.
- (10) García-Ramírez, J.J., M. A. Santos and J.L. Revuelta. 1995. "The *Saccharomyces cerevisiae RIB4* gene codes for 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase involved in riboflavin biosynthesis". *J. Biol. Chem.* 270:23801.

- (11) Santos, M. A., J.J. García-Ramírez and J. L. Revuelta. 1995. "Riboflavin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.* 270: 437.
- (12) Plaut, G. W. E. and L. Beach. 1976. "Substrate specificity and stereospecific mode of action of riboflavin synthase" in *Flavins and Flavoproteins*, p 737, T. P. Singer Ed., Elsevier, Amsterdam.
- (13) Revuelta, J. L., M. J. Buitrago, and M. A. Santos. 1995. Riboflavin Synthesis in Yeast. WO patent 95/26406.