

UNIVERSIDAD DE LEON



**DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA, GENETICA Y
MICROBIOLOGIA**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DEL
METABOLISMO DEL ÁCIDO PIPECÓLICO EN
*Penicillium chrysogenum***

Leopoldo Naranjo Briceño

León, 2003

**Departamento de Ecología, Genética y Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales**



UNIVERSIDAD DE LEÓN

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DEL
METABOLISMO DEL ÁCIDO PIPECÓLICO EN
*Penicillium chrysogenum***

**Trabajo de Investigación que presenta para optar al Grado de Doctor en el Programa de
Doctorado de Alta Calidad: “BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA”**

LEOPOLDO NARANJO BRICEÑO

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco al Catedrático Dr. Juan Francisco Martín Martín el haberme permitido ingresar en el laboratorio del Área de Microbiología del Departamento de Ecología, Genética y Microbiología para desarrollar mi Trabajo de Tesis Doctoral y la dirección del mismo.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) por haberme otorgado una Beca del *Programa Mutis* para poder realizar el Programa de Doctorado de Alta Calidad denominado: “Biología Molecular y Biotecnología” en dicho Departamento.

Al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España por haberme otorgado una Beca para Movilidad de Estudiantes de Tercer Ciclo, en el Programa de Doctorado de Alta Calidad: "Biología Molecular y Biotecnología" de la Universidad de León.

Al Dr. Oscar Bañuelos Hortigüela por haber tenido la paciencia y la dedicación en la transmisión de sus conocimientos y guiar mis primeros pasos en el apasionante mundo de la Biología Molecular.

Al Dr. Javier Casqueiro Blanco por haberme guiado con sabiduría y precisión tanto a nivel académico como en el personal, además, de haber dirigido mi Trabajo de Tesis Doctoral.

A la Dra. Eva Martín de Valmaseda, la Dra. Mónica Lamas y al Dr. Ricardo Vicente Ullán por haberme apoyado en todo momento en el desarrollo de mis experimentos.

A María, Rosario, Héctor, Maribel y Geli por su desprendida colaboración en el laboratorio.

Al Sr. Cheché y la Sra. Chichía, a Carlos y Marisa, a Casi y Loreto, a Carlos y Mari Paz, a Javi y Eva, al Sr. Chano Badiola y la Sra. Mina, a Federico y Erika, y a mi Tío Asdrúbal y Tía Carmen Matilde por haber creído en mí y haber dibujado en mi rostro una sonrisa llena de luz, fraternidad y esperanza.

Y, muy especialmente, a Dios, por haberme permitido vivir a su manera, a mis Padres por haberme dado la vida, a mi esposa Mónica y a mis hijas Daniela y Aitana que son mi camino y el motivo para recorrerlo.

A mis Padres,

Mónica,

Daniela y

Aitana

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE <i>P. chrysogenum</i>	1
2. ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS	1
3. BIOSÍNTESIS DE PENICILINA	2
4. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PENICILINA	4
• Regulación por la fuente de carbono	4
• Regulación por la fuente de nitrógeno	4
• Regulación por la lisina	5
5. BIOSÍNTESIS DE LISINA	5
• Ruta del ácido diaminopimélico	6
• Ruta del α -aminoadipato	6
6. REGULACIÓN DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LISINA	13
6.1. Regulación por lisina	13
• Inhibición por lisina	13
• Represión por lisina	16
6.2. Regulación por el control general de síntesis de aminoácidos	16
6.3. Regulación por efectores específicos	18
7. EL ÁCIDO PIPECÓLICO Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO DE LISINA EN DIVERSOS ORGANISMOS	19
7.1. Metabolismo en Mamíferos	19
7.2. Metabolismo en Plantas	23
7.3. Metabolismo en Bacterias	24
7.4. Metabolismo en Hongos Filamentosos y Levaduras	25
• <i>Aspergillus nidulans</i>	25
• <i>Rhodotorula glutinis</i>	26
• <i>Neurospora crassa</i>	28
• <i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Rhizoctonia leguminicola</i>	28

8. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DEL ÁCIDO PIPECÓLICO	30
8.1. Obtención de ácido pipecólico y sus derivados por biotransformación	30
8.2. El ácido pipecólico como osmoprotector	32
8.3. Precursor de alcaloides octahidroindolizínicos	32
8.4. El ácido pipecólico como sustrato de péptidos sintetados no-ribosomales	33
9. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA	35
<u>MATERIALES y MÉTODOS</u>	37
1. MICROORGANISMOS	37
1.1. Cepas bacterianas	37
1.2. Cepas fúngicas	37
2. VECTORES PLASMÍDICOS Y LIBRERÍA GENÓMICA	38
3. CONSTRUCCIONES DE LOS PRINCIPALES PLÁSMIDOS UTILIZADOS	40
3.1. Construcción del plásmido p10PB (8,16 kb)	40
3.2. Construcción de los plásmidos p10BS y p10SB (5,16 kb)	42
3.3. Construcción del plásmido pF4L7 (18,96 kb)	42
3.4. Construcción del plásmido pDL7 (14,9 kb)	43
4. REACTIVOS QUÍMICOS	45
4.1. Reactivos químicos de uso general	45
4.2. Oligonucleótidos	45
5. MEDIOS DE CULTIVO	45
5.1. Medios de cultivo para bacterias y bacteriófagos	45
5.2. Medios de cultivo para <i>P. chrysogenum</i>	47
6. CULTIVO Y CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS	49
6.1. Cepas bacterianas	49
6.1.1. Crecimiento de las cepas bacterianas	49
6.1.2. Mantenimiento de las cepas bacterianas	49
6.2. Cepas fúngicas	49

6.2.1. Crecimiento de <i>P. chrysogenum</i>	49
6.2.2. Mantenimiento de las cepas de <i>P. chrysogenum</i>	50
7. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS	50
8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PENICILINA G EN CALDOS DE FERMENTACIÓN DE <i>P. chrysogenum</i> (BIOENSAYO)	50
9. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	51
9.1. Eliminación selectiva de ácidos nucleicos	51
9.2. Manipulación de ADN	51
9.2.1. Eliminación de proteínas en muestras de ADN mediante extracción con fenol-cloroformo	51
9.2.2. Digestión de ADN con enzimas de restricción	52
9.2.3. Eliminación de extremos protuberantes en fragmentos de ADN	52
• Eliminación de extremos 5' protuberantes	52
• Eliminación de extremos 3' protuberantes	53
• Rellenado de extremos 5' protuberantes	53
9.2.4. Desfosforilación de extremos 5' protuberantes de ADN mediante la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (<i>Boehringer Mannheim</i>)	53
9.2.5. Ligación de moléculas de ADN	54
9.2.6. Generación de deleciones unidireccionales	54
9.2.7. Reacción de la cadena de polimerasa (PCR)	55
9.3. Manipulación de ARN	57
9.3.1. Purificación de ARN total de <i>P. chrysogenum</i>	57
9.3.2. Retrotranscripción de ARN y amplificación por PCR (RT-PCR)	58
10. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>Escherichia coli</i> PARA TRANSFORMACIÓN	59
10.1. Método del TSS	59
10.2. Método del cloruro de rubidio	59
10.3. Preparación de células electrocompetentes	60
11. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i> Y OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO	60
11.1. Transformación de <i>E. coli</i>	60

11.2. Electroporación de <i>E. coli</i>	61
11.3. Minipreparaciones de ADN plasmídico (minipreps)	61
11.4. Obtención de ADN plasmídico a gran escala mediante lisis alcalina	62
12. MANIPULACIÓN DE GENOTECAS FÁGICAS DE ADN	63
12.1. Preparación de células de <i>E. coli</i> para infección	63
12.2. Infección en medio sólido	63
12.3. Transferencia de placas de lisis a filtros de nitrocelulosa	63
12.4. Amplificación de bacteriófagos en medio sólido	64
12.5. Obtención de ADN de fagos recombinantes	64
13. TRANSFORMACIÓN DE <i>Penicillium chrysogenum</i>	65
13.1. Sistemas de selección positiva de transformantes de <i>P. chrysogenum</i>	65
13.2. Obtención de protoplastos	66
13.3. Transformación	66
13.4. Selección de los transformantes	67
14. OBTENCIÓN DE ADN TOTAL DE <i>Penicillium chrysogenum</i>	68
15. ELECTROFORESIS DE MACROMOLÉCULAS	68
15.1. Electroforesis de ADN	68
15.2. Extracción de ADN de geles de agarosa	69
• Freeze squeeze	70
• GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (<i>Amersham Biosciences</i>)	70
15.3. Electroforesis de ARN	70
16. TRANSFERENCIA DE MACROMOLÉCULAS	70
16.1. Transferencia de ADN por capilaridad (<i>Southern</i>)	70
16.2. Transferencia de ADN mediante sistema de vacío	71
17. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	72
17.1. Marcaje no radiactivo de sondas	72
17.2. Prehibridación e hibridación	72
17.3. Lavado de los filtros	73
17.4. Detección inmunológica	73
18. SECUENCIACIÓN DE ADN	74

18.1. Obtención de ADN plasmídico monocatenario (ADN de cadena sencilla)	74
18.2. Reacciones para la secuenciación de ADN	75
18.3. Análisis de la secuencia de ADN	76
19. AISLAMIENTO DE MUTANTES DE <i>P. chrysogenum lys⁻/pip⁻</i>	76
20. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	77
20.1. Preparación de extractos libres de células	77
20.2. Determinación de la concentración de proteínas totales	77
20.3. Ensayo de la actividad sacaropina deshidrogenasa	77
20.4. Ensayo de la actividad sacaropina reductasa	78
20.5. Ensayo de la actividad pipecolato oxidasa	79
21. VALORACIÓN DE SACAROPINA, ÁCIDO α -AMINOADÍPICO, ÁCIDO PIPECÓLICO Y LISINA EN EXTRACTOS CRUDOS DE <i>P. chrysogenum</i>	79
21.1. Preparación de los extractos libres de células	80
21.2. Derivatización y cromatografía de los extractos	80

RESULTADOS 83

CAPÍTULO I.

▪ <u>CONVERSIÓN DE ÁCIDO PIPECÓLICO EN LISINA EN <i>P. chrysogenum</i></u>	83
1. EL ÁCIDO PIPECÓLICO SE CONVIERTE EN LISINA EN <i>P. chrysogenum</i>	83
2. AISLAMIENTO DE MUTANTES <i>P. chrysogenum lys⁻/pip⁻</i>	84
3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES <i>P. chrysogenum lys⁻/pip⁻</i>	85
3.1. Crecimiento	85
3.2. Tasa de reversión	85
4. ESTUDIO DE LA VÍA DE CONVERSIÓN DE ÁCIDO PIPECÓLICO EN LISINA EN <i>P. chrysogenum</i>	86

4.1. En <i>P. chrysogenum</i> el ácido pipercolico se convierte en lisina por acción de la sacaropina reductasa y de la sacaropina deshidrogenasa	86
4.2. El ácido pipercolico se incorpora en la ruta biosintética de lisina mediante su conversión en P6C por acción de la pipercolato oxidasa	87
4.2.1. Ensayo de la actividad pipercolato oxidasa en los mutantes <i>P. chrysogenum lys⁻/pip⁻</i>	88
4.2.2. Ensayo de la actividad pipercolato oxidasa en <i>P. chrysogenum</i> Wis 54-1255	88
5. CLONACIÓN DEL GEN <i>lys7</i> QUE CODIFICA LA SACAROPINA REDUCTASA DE <i>P. chrysogenum</i>	89
5.1. Complementación de la mutación <i>lys⁻/pip⁻</i> de <i>P. chrysogenum</i> 10.25	89
5.2. Recuperación de los plásmidos que complementan la mutación <i>lys⁻/pip⁻</i> de <i>P. chrysogenum</i> 10.25	90
5.3. Complementación de la mutación <i>lys⁻/pip⁻</i> de <i>P. chrysogenum</i> 10.25 con los plásmidos pLARA y p10T1	91
6. SECUENCIACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA LA SACAROPINA REDUCTASA DE <i>P. chrysogenum</i>	92
6.1. Estrategia de secuenciación del ORF1	92
6.2. Secuencia de nucleótidos	93
6.3. Confirmación del número, tamaño y localización de intrones en el ORF1	93
7. MOTIVOS ENCONTRADOS EN LA SACAROPINA REDUCTASA DE <i>P. chrysogenum</i> Y MECANISMO MOLECULAR DE SÍNTESIS DE SACAROPINA	95
7.1. Análisis de la secuencia aminoacídica deducida del ORF1	95
7.2. Predicción de la estructura secundaria y terciaria de la sacaropina reductasa de <i>P. chrysogenum</i>	97
7.2.1. Predicción de la estructura secundaria de la sacaropina reductasa	97
7.2.2. Predicción de la estructura terciaria de la sacaropina reductasa	99
7.3. Mecanismo molecular de síntesis de sacaropina por la sacaropina reductasa	100

CAPÍTULO II.

▪ <u>CONSTRUCCIÓN POR INTERRUPCIÓN GÉNICA DE UN MUTANTE INACTIVADO EN LA SACAROPINA REDUCTASA (SR)</u>	101
--	-----

1.	INTERRUPCIÓN DEL GEN <i>lys7</i> DE <i>P. chrysogenum</i> WIS 54-1255	101
1.1.	Clonación de la región del genoma de <i>P. chrysogenum</i> que contiene el gen <i>lys7</i>	101
1.2.	Estudio del número de copias del gen <i>lys7</i> presentes en el genoma de <i>P. chrysogenum</i>	102
1.3.	Diseño y construcción del plásmido a utilizar para la interrupción del gen <i>lys7</i> de <i>P. chrysogenum</i>	103
1.4.	Transformación y selección de transformantes	104
1.5.	Análisis del transformante auxótrofo de lisina <i>P. chrysogenum</i> TDL7-111	104
1.5.1.	Estudios genéticos mediante hibridación (<i>Southern</i>)	104
1.5.2.	Determinación de la actividad sacaropina reductasa de <i>P. chrysogenum</i> TDL7-111	106
1.5.3.	Complementación de la auxotrofia de lisina de <i>P. chrysogenum</i> SR ⁻ mediante la transformación con el gen <i>lys7</i>	107
1.5.4.	El gen <i>lys7</i> es esencial para restaurar la actividad sacaropina reductasa en el mutante <i>P. chrysogenum</i> SR ⁻	108
2.	CHARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL MUTANTE <i>P. chrysogenum</i> SR ⁻	109
2.1.	Tasa de reversión	109
2.2.	Crecimiento	110
2.3.	Producción de penicilina	110

CAPÍTULO III.

▪	<u>EL ÁCIDO PIPECÓLICO SE CONVIERTE EN LISINA A TRAVÉS DE UNA RUTA ADAPTATIVA EN <i>P. chrysogenum</i> SR⁻</u>	113
1.	Crecimiento del mutante <i>P. chrysogenum</i> SR ⁻ sobre medio mínimo suplementado con ácido pipecólico	113
2.	El ácido pipecólico induce el incremento de la actividad pipecolato oxidasa y la acumulación intracelular de P6C en <i>P. chrysogenum</i> SR ⁻	115
3.	<i>P. chrysogenum</i> SR ⁻ acumula sacaropina y lisina cuando crece con ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno	117

CAPÍTULO IV.

▪	<u>BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO PIPECÓLICO EN <i>P. chrysogenum</i></u>	119
---	---	-----

1. LA INTERRUPCIÓN DEL GEN <i>lys7</i> PROVOCA LA ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE P6C Y DE ÁCIDO PIPECÓLICO EN <i>P. chrysogenum</i> SR⁻	119
1.1. El ácido pipecólico no se forma a partir del catabolismo de L-lisina en <i>P. chrysogenum</i>	119
1.2. El ácido pipecólico no se forma a partir del catabolismo de D-lisina en <i>P. chrysogenum</i>	121
2. EL ÁCIDO PIPECÓLICO SE SINTETIZA A TRAVÉS DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE LISINA EN <i>P. chrysogenum</i> WIS 54-1255	123
2.1. La adición de ácido D,L-α-aminoadípico a los caldos de cultivo incrementa significativamente la acumulación de P6C y de ácido pipecólico <i>P. chrysogenum</i> SR⁻	123
2.2. El mutante auxótrofo de lisina <i>P. chrysogenum</i> TDX195 no acumula ácido pipecólico cuando se le añade ácido D,L-α-aminoadípico a los caldos de cultivo	125
 <u>DISCUSIÓN</u>	 129
 1. LA SACAROPINA REDUCTASA, UNA ENZIMA IMPLICADA EN LA CONVERSIÓN DE ÁCIDO PIPECÓLICO EN LISINA EN <i>P. chrysogenum</i>	 129
2. EN <i>P. chrysogenum</i> EL ÁCIDO PIPECÓLICO SE CONVIERTE EN LISINA VÍA α-AMINOADIPATO-δ-SEMIALDEHIDO Y SACAROPINA	133
3. INTERRUPCIÓN DEL GEN <i>lys7</i> POR LA TÉCNICA DE LA DOBLE RECOMBINACIÓN	136
4. EL ÁCIDO PIPECÓLICO SE CONVIERTE EN LISINA A TRAVÉS DE UNA RUTA ADAPTATIVA EN <i>P. chrysogenum</i> SR⁻	138
5. LA INTERRUPCIÓN DEL GEN <i>lys7</i> PROVOCA LA ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE P6C Y ÁCIDO PIPECÓLICO EN <i>P. chrysogenum</i> SR⁻	140
6. EL ÁCIDO PIPECÓLICO SE SINTETIZA A PARTIR DEL ÁCIDO α-AMINOADÍPICO EN <i>P. chrysogenum</i>	143
7. PAPEL BIOLÓGICO DEL ÁCIDO PIPECÓLICO EN <i>P. chrysogenum</i>	147

ABREVIATURAS

6-APA: ácido 6-aminopenicilánico	IPTG: isopropil β-D-galactopiranosido
α-AAA: ácido α-aminoadípico	kb: kilo pares de bases
ACV: δ-(L-α-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina	l: litro
ADNasa: desoxirribonucleasa	LAT: lisina aminotransferasa
ARNasa: ribonucleasa	M: molar
ADN: ADN complementario	Mb: mega pares de bases
ARNm: ARN mensajero	min: minuto
ATP: adenosina 5´trifosfato	MOPS: ácido morfolinopropanosulfónico
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-inolil fosfato	ORF: marco de lectura abierta
CIA: cloroformo-alcohol isoamílico	pb: pares de bases
CoA: coenzima A	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
Da: Dalton	PEG: polietilenglicol
DAC: desacetilcefalosporina C	PEN: penicilina
DAOC: desacetoxicefalosporina C	P6C: ácido piperideín-6-carboxílico
dATP: desoxiadenosina 5´trifosfato	P2C: ácido piperideín-2-carboxílico
dCTP: desoxicitidina 5´trifosfato	rpm: revoluciones por minuto
DEPC: dietilpirocarbonato	s: segundos
dGTP: desoxiguanosina 5´trifosfato	SDS: laurilsulfato sódico
DMSO: dimetilsulfóxido	TAE: Tris-acetato-EDTA
dNTPs: desoxinucleotidos trifosfato	TBE: Tris-borato-EDTA
DO: densidad óptica	Tris: tris(hidroximetil)aminometano
DTT: ditioneitol	TTP: timidina 5´trifosfato
dTTP: desoxitimidina 5´trifosfato	U: unidades
EDTA: ácido etilendiaminetetracético	ufp: unidades formadoras de placas de lisis
g: gramo	UV: ultravioleta
GTP: guanosina 5´trifosfato	V: Voltio
h: hora	W: Watio
IPN: isopenicilina N	X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosido

INTRODUCCIÓN

1. TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE *Penicillium chrysogenum*

Penicillium chrysogenum es un hongo filamentoso que carece de ciclo sexual conocido (Ball, 1983; Saunders y Holt, 1987). Presenta un ciclo parasexual caracterizado por la formación de heterocariontes (Pontecorvo y Sermonti, 1954; Caten, 1981) que le permite obtener, en parte, los beneficios de la reproducción sexual (Alexopoulos y Mims, 1985). *Penicillium chrysogenum* se clasifica dentro de los hongos imperfectos, en la subdivisión Deuteromicotina, clase Deuteromicetes, subclase *Moniliaeae*, orden de los Moniliales y familia Moniliaceae (Alexopoulos y Mims, 1985).

Las especies del género *Penicillium* poseen un ciclo vital caracterizado por la formación, a partir de las hifas, de conidióforos largos, erectos y ramificados que reciben el nombre de penicilo (del latín *Penicillium*: pincelito), en los cuales se forman los conidios (esporas asexuales). Los conidios, así como la fragmentación y dispersión del micelio constituyen las principales formas de reproducción de esta especie.

Desde el punto de vista agronómico, las especies del género *Penicillium* tienen una gran importancia debido a la omnipresencia de sus esporas en el ambiente, siendo éstas típicas contaminantes de cítricos y otras frutas, llegando a formar mohos verdes o azules que causan grandes pérdidas económicas en las cosechas. También, desde el punto de vista del ser humano, *Penicillium* tiene una importancia trascendental ya que algunas de las especies de este género tienen la capacidad de producir antibióticos β -lactámicos. Para profundizar sobre el descubrimiento, historia y origen de los antibióticos β -lactámicos ver las siguientes revisiones: Fleming (1929) y Queener (1986).

2. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Los antibióticos son sustancias químicas orgánicas de bajo peso molecular producidas por microorganismos que son capaces de inhibir selectivamente, a bajas concentraciones, el crecimiento de otros microorganismos (Waksman, 1947). Estos compuestos son sintetizados una vez que la densidad del cultivo del microorganismo llega a su valor máximo, coincidiendo con una velocidad específica de crecimiento (μ) baja. Debido a ello, y a que son compuestos que no son indispensables para la viabilidad del microorganismo productor, los antibióticos son considerados como idiolitos o metabolitos secundarios. La función biológica de estos compuestos se atribuye generalmente a que confieren una ventaja ecológica cuando el microorganismo productor de antibióticos debe competir con otros microorganismos por los nutrientes del medio (Martín y Demain, 1980).

Los antibióticos β -lactámicos pertenecen al grupo de antibióticos de tipo peptídico, los cuales, se forman por la condensación no ribosómica de tres aminoácidos: L- α -aminoadipato, L-cisteína y L-valina. La condensación de estos tres aminoácidos y posterior ciclación da lugar a la formación del grupo característico de las β -lactamas: el anillo β -lactámico de cuatro miembros. La estructura general de las β -lactamas la constituye un núcleo central, formado por el anillo β -lactámico unido a un segundo anillo (excepto en el caso de las monobactamas), y una cadena lateral que confiere a la molécula de antibiótico carácter hidrofílico o hidrófobo. La naturaleza del segundo anillo permite diferenciar los distintos antibióticos β -lactámicos. En el caso de las penicilinas, el núcleo central es el ácido 6-aminopenicilánico, formado por el anillo β -lactámico y un anillo tiazolidínico condensados. Por otro lado, las cefalosporinas y cefamicinas poseen el ácido 7-aminocefalosporánico como núcleo central, compuesto por el mencionado anillo β -lactámico y un anillo dihidrotiazínico (Martín *et al.*, 1994, 1997, 1999).

3. BIOSÍNTESIS DE PENICILINA EN *Penicillium chrysogenum*

La ruta biosintética de penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas (Fig. 1), comienza con la condensación no ribosómica de tres aminoácidos: ácido L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina para sintetizar el tripéptido δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (LLD-ACV). La enzima que cataliza esta reacción, es la ACV sintetasa. Dicha enzima, es característica de todos los microorganismos productores de penicilinas y cefalosporinas. La ACV sintetasa, es una enzima multifuncional que lleva a cabo la activación con ATP de los tres aminoácidos precursores, la isomerización de la valina del enantiómero L a su enantiómero D, y la formación de enlaces peptídicos entre los tres aminoácidos sintetizando la ACV. Esta enzima está codificada por el gen *pcbAB* (Díez *et al.*, 1990, Smith *et al.*, 1990; Mac Cabe *et al.*, 1991; Gutiérrez *et al.*, 1991; Coque *et al.*, 1991).

En un segundo paso el tripéptido ACV se cicla formando un enlace tiazolidínico, dando lugar a la formación de la isopenicilina N. Este intermediario de la ruta es el primero que tiene actividad antibiótica y, en él, está presente el anillo β -lactámico y el anillo tiazolidínico, característicos de las penicilinas. La enzima responsable de su síntesis es la isopenicilina N sintasa codificada por el gen *pcbC* (Carr *et al.*, 1986; Barredo *et al.*, 1989; Ramón *et al.*, 1987; Weigel *et al.*, 1988; Leskiw *et al.*, 1988; Coque *et al.*, 1991). Las rutas de síntesis de cefalosporinas y cefamicinas comparten los dos primeros pasos con la ruta de síntesis de penicilina.

A partir de la isopenicilina N, la cadena lateral hidrofílica de ácido L- α -aminoadípico puede remplazarse por una cadena lateral hidrofóbica, tal como ocurre en la biosíntesis de penicilinas o conservarse como ocurre en la biosíntesis de cefalosporinas y de cefamicinas.

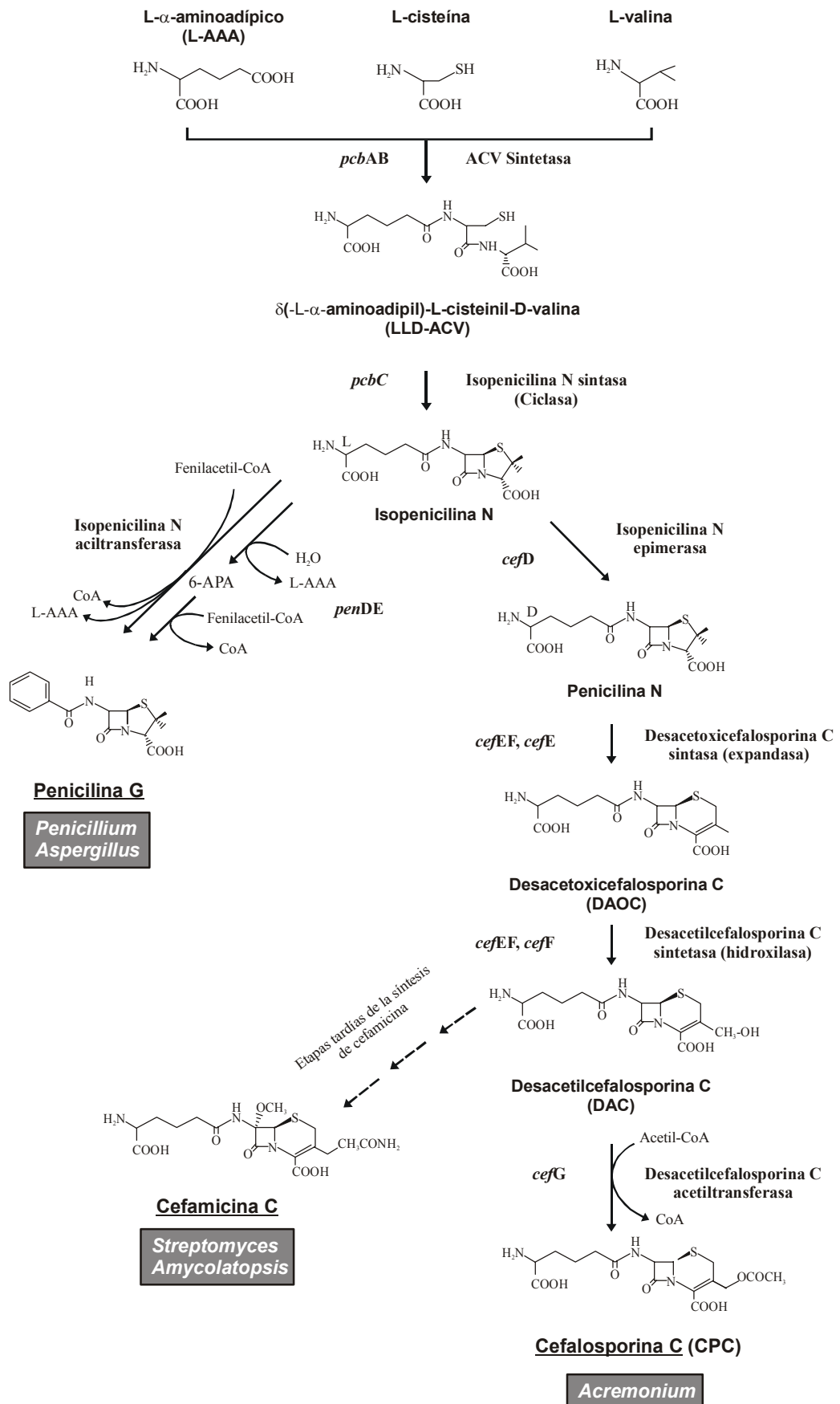


Fig. 1. Ruta de biosíntesis de los antibióticos β -lactámicos: penicilina G, cefalosporina C y cefamandole C.

En *P. chrysogenum*, la isopenicilina N sufre la sustitución de la cadena lateral de α -aminoadipato por ácido fenilacético o ácido fenoxiacético activando como CoA dando lugar a la formación de la penicilina G o la penicilina V, respectivamente. Este último paso es específico de especies productoras de penicilinas hidrófobas. Si se desea obtener más información al respecto, consultar las siguientes revisiones: Martín *et al.* (1994, 1997, 1999); Martín (1998); Martín y Liras (1989a, b); Martín y Gutiérrez (1995) y Gutiérrez *et al.* (1999a).

4. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PENICILINA

Existen muchos factores que estimulan o inhiben la producción de antibióticos β -lactámicos en los diferentes microorganismos productores. Entre estos factores se incluye la fuente de carbono, nitrógeno o azufre, el pH del medio de producción o la presencia de ciertos aminoácidos (Martín y Aharonowitz, 1983). En *P. chrysogenum*, son la fuente de carbono y de nitrógeno, así como la lisina, algunos de los elementos más importantes que regulan la síntesis de penicilina.

- **Regulación por la fuente de carbono**

La fuente de carbono presente en el medio de producción es una de las variables que afecta de manera más determinante a la producción de β -lactamas en varios microorganismos, como *P. chrysogenum* (Revilla *et al.*, 1984; Martín *et al.*, 1986; Gutiérrez *et al.*, 1999b), *A. chrysogenum* (Matsumura *et al.*, 1978; Hinnen y Nuesch, 1976), *A. nidulans* (Espeso y Peñalva, 1992; Brakhage *et al.*, 1992) y *S. clavuligerus* (Aharonowitz y Demain, 1978).

En *P. chrysogenum*, se conoce desde hace tiempo que la presencia de glucosa (Soltero y Johnson, 1953), fructosa, galactosa y sacarosa (Revilla *et al.*, 1986) en los caldos de cultivo provoca la inhibición de la síntesis de penicilina. Esta disminución en la producción de penicilina se debe a la represión de los genes de biosíntesis de penicilina *pcbAB* y *pcbC* (Revilla *et al.*, 1986; Feng *et al.*, 1994; Gutiérrez *et al.*, 1999b).

- **Regulación por la fuente de nitrógeno**

Algunos de los compuestos químicos que *P. chrysogenum* puede utilizar como fuente de nitrógeno han demostrado interferir en la capacidad de producir penicilina de este microorganismo (Sánchez *et al.*, 1981; Martín *et al.*, 1986). Una de las fuentes de nitrógeno que tiene un efecto más drástico sobre la síntesis de penicilina es el amonio (Sánchez *et al.*, 1988). En los últimos años se han clonado y caracterizado genes de *P. chrysogenum* que codifican proteínas reguladoras de la

transcripción génica dependientes de la fuente de nitrógeno (Haas *et al.*, 1995; 1997). Uno de estos genes, denominado *nre* y homólogo a los genes *nit-2* de *Neurospora crassa* (Stewart y Vollmer, 1986; Fu y Marzluf, 1987; Marzluf, 1997) y *areA* de *A. nidulans* (Kudla *et al.*, 1990), reconoce una secuencia diana que está presente en la región intergénica *pcbAB-pcbC* de *P. chrysogenum* (Haas y Marzluf, 1995).

Algunos aminoácidos, que pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno por *P. chrysogenum*, también han demostrado inhibir la síntesis de penicilina. Sin embargo, en este caso el mecanismo de inhibición parece deberse a que estos aminoácidos (tirosina, triptófano, fenilalanina y metionina) interfieren en el transporte de ácido fenilacético, necesario para su incorporación como cadena lateral de la penicilina G (Martínez-Blanco *et al.*, 1989).

- **Regulación por lisina**

En *P. chrysogenum* la síntesis de penicilina es fuertemente inhibida cuando se añade lisina al medio de producción (Demain, 1957). Este efecto se debe a la retroregulación de la primera enzima de la ruta de síntesis de lisina (Demain y Masurekar, 1974; Friedrich y Demain, 1977; Luengo *et al.*, 1979, 1980). Dado que el α -aminoadipato, precursor de la síntesis de penicilina, es un intermediario de la ruta de la lisina, la reducción en el flujo de metabolitos a través de esta ruta limita el suministro de α -aminoadipato para la síntesis de penicilina.

En *Aspergillus nidulans*, se ha descrito que la lisina reprime la transcripción de los genes de la ACV sintetasa e isopenicilina N sintasa, lo que puede constituir la causa de la disminución de la síntesis de penicilina por lisina en este microorganismo (Brakhage y Turner, 1992). En *P. chrysogenum*, sin embargo, la síntesis de las enzimas de la ruta de formación de penicilina en *P. chrysogenum* no se ve afectada por lisina (Masurekar y Demain, 1972). Los estudios sobre la inhibición de la homocitrato sintasa por lisina (Demain y Masurekar, 1974; Luengo *et al.*, 1980), junto con el hecho de que la adición de homocitrato o α -aminoadipato a los caldos de fermentación revertía la inhibición por lisina de la producción de penicilina (Somerson *et al.*, 1961; Friedrich y Demain, 1977), demostraron que la regulación negativa de la síntesis de penicilina es debida a la inhibición de la homocitrato sintasa, lo que induce un descenso en la concentración intracelular de α -aminoadipato.

5. BIOSÍNTESIS DE LISINA

La síntesis del aminoácido esencial lisina tiene lugar en la naturaleza por medio de dos rutas biosintéticas completamente distintas: la ruta del ácido diaminopimélico y la ruta del ácido α -aminoadípico.

- **Ruta del ácido diaminopimélico**

La ruta del ácido diaminopimélico es utilizada por bacterias, algunos hongos (los ficomicetos Hipoquitriales, Saprolegniales y Leptomicetales) y por plantas verdes (Bryan, 1980). Las características de las enzimas implicadas en esta ruta, así como los genes que las codifican y su regulación han sido investigadas profundamente en *E. coli* (Patte, 1983; Cohen y Saint-Girons, 1987) y en corinebacterias (Malumbres y Martín, 1996).

- **Ruta del α -aminoadipato**

La ruta del α -aminoadipato para la síntesis de lisina, por el contrario, se encuentra presente en organismos eucariotas (Bhattacharjee, 1985), en algunos hongos tales como: Quitridiales, Blastocladales y Mucorales (Vogel, 1960), ascomicetes, basidiomicetes y deuteromicetes (Vogel, 1960; Lejohn, 1971; Rothstein y Saffran, 1963), así como en euglenófitos (Rothstein y Saffran, 1963). A pesar de que se pensaba que esta ruta biosintética era específica de eucariotas (Bhattacharjee, 1985), recientemente se ha demostrado que la bacteria termófila *Thermus thermophilus* utiliza una vía del α -aminoadipato modificada para la síntesis de lisina. Dos grupos de investigadores han clonado y caracterizado genes implicados en la síntesis de lisina en esta bacteria que parecen codificar dos enzimas de la ruta del α -aminoadipato: la homocitrato sintasa y la homoaconitato hidratasa (Kosuge y Hoshino, 1998; Kobashi *et al.*, 1999).

El descubrimiento de que el α -aminoadipato era un metabolito implicado en la biosíntesis de lisina en algunos microorganismos se debió, en primer lugar, a que mutantes auxótrofos de lisina de *Neurospora crassa* eran capaces de crecer en presencia de α -aminoadipato (Mitchell y Houlahan, 1948). Así mismo, el α -aminoadipato se acumulaba en mutantes auxótrofos de lisina de *S. cerevisiae* y *N. crassa*, demostrándose, además, su conversión en lisina (Windsor, 1951; Bhattacharjee y Tucci, 1969). Finalmente, se demostró la existencia de actividades enzimáticas dependientes de α -aminoadipato implicadas en la formación de lisina en *Torulopsis utilis*, *S. cerevisiae* y *N. crassa* (Bhattacharjee, 1985).

La ruta del α -aminoadipato ha sido estudiada en detalle en *S. cerevisiae* (para una revisión ver Bhattacharjee, 1985), siendo tomada como modelo para el estudio de la síntesis de lisina en otros microorganismos. En esta levadura, la síntesis de lisina se realiza a través de 7 intermediarios y por medio de 8 reacciones enzimáticas (Fig. 2). Las enzimas implicadas en esta ruta han sido caracterizadas total o parcialmente, todas ellas en *S. cerevisiae* y algunas en *N. crassa* y *Yarrowia lipolytica* (Bhattacharjee, 1985). El estudio genético de la ruta del α -aminoadipato se ha realizado en gran medida mediante la complementación de mutantes auxótrofos y la utilización de sondas de ADN heterólogas. Durante los últimos años, algunos de los genes de la ruta de *S. cerevisiae* y

Schizosaccharomyces pombe han sido descubiertos gracias a los proyectos de secuenciación del genoma de estos microorganismos.

A continuación se describen cada una de las enzimas implicadas en la ruta del α -aminoadipato:

- **Homocitrato sintasa**

La homocitrato sintasa (acetil-CoA:2-cetoglutarato C-acetiltransferasa) es la primera enzima de la ruta del α -aminoadipato y lleva a cabo la condensación de α -cetoglutarato y acetil-CoA para dar lugar al ácido homocítrico (Fig. 2). Esta actividad enzimática se ha identificado en varios microorganismos en los cuales se sintetiza lisina a través de la ruta del α -aminoadipato, como *S. cerevisiae* (Strassman y Ceci, 1964; Maragoudakis y Strassman, 1966), *Candida pelliculosa* (Takenouchi *et al.*, 1981), *Y. lipolytica* (Gaillardin *et al.*, 1976), *Pichia guilliermondii* (Schmidt *et al.*, 1989) y *P. chrysogenum* (Demain y Masurekar, 1974; Luengo *et al.*, 1980; Bañuelos *et al.*, 1999). También se ha identificado actividad homocitrato sintasa en bacterias fijadoras de nitrógeno, donde el homocitrato es el componente orgánico del cofactor de hierro y molibdeno de la nitrogenasa, enzima que cataliza la conversión de N_2 a amonio (Wang *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 1991; Masepohl *et al.*, 1993; Meijer y Tabita, 1992; Stricker *et al.*, 1997; Hoover *et al.*, 1989; Madden *et al.*, 1992).

En *P. chrysogenum*, el gen que codifica la homocitrato sintasa ha sido clonado mediante hibridación heteróloga utilizando un fragmento del gen *LYS1* de *Y. lipolytica* (Bañuelos, 1999; Bañuelos *et al.*, 1999a, 2000). La secuencia de este gen, denominado *lys1*, consta de un marco de lectura de 1660 pb interrumpido por tres intrones. El marco de lectura abierta, una vez procesados los intrones, se compone de 1422 pb y codifica una proteína hipotética de 474 aminoácidos con un peso molecular de 52 kDa. El gen *lys1* se encuentra localizado en el cromosoma II en la cepa silvestre NRRL1951 y en el cromosoma III en la cepa Wisconsin 54-1255, en su derivado *npe10* y en la cepa AS-P-78. La interrupción de este gen generó tres mutantes auxótrofos de lisina, denominados *P. chrysogenum* HS1⁻, HS2⁻ y HS3⁻, con lo que se demostró que solamente existe un gen que codifica la homocitrato sintasa en *P. chrysogenum* y confirmó el papel que desempeña dicha enzima en la biosíntesis de lisina (Bañuelos *et al.*, 2002).

En *P. chrysogenum*, se ha descrito la existencia de dos isoenzimas de la homocitrato sintasa, una citoplasmática y otra mitocondrial (Demain y Masurekar, 1974; Luengo *et al.*, 1980; Jaklitsch y Kubicek, 1990). Bañuelos *et al.* (2002), utilizando una proteína quimérica bifuncional formada por la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) de la medusa *Aequorea victoria* y la homocitrato sintasa de *P. chrysogenum*, determinaron que la homocitrato sintasa en *P. chrysogenum* se localizaba mayoritariamente en el citoplasma tal y como habían descrito previamente Jaklitsch y Kubicek (1990) y no en el núcleo como se había descrito en *S. cerevisiae* (Féller *et al.*, 1999).

- **Homoaconitasa**

Anteriormente, se había descrito que la conversión del homocitrato en homoisocitrato la llevaban a cabo dos enzimas distintas: la homocitrato deshidratasa y la homoaconitato hidratasa. Aunque no se había demostrado, se creía que dichas enzimas estaban encargadas respectivamente de la transformación del homocitrato en homoaconitato y de la conversión de homoaconitato en homoisocitrato (Bhattacharjee, 1985). En la actualidad, se cree que la homoaconitasa es capaz de isomerizar directamente el homocitrato a homoisocitrato (Fig. 2), llevando a cabo una reacción enzimática en dos pasos (Gamonet y Lauquin, 1998; Weidner *et al.*, 1997; Teves *et al.*, 2003). Se ha visto que la homoaconitasa de diferentes microorganismos como: *S. cerevisiae*, *P. chrysogenum* y *A. nidulans* muestra alrededor de un 20-30 % de similitud con las aconitasas del mismo microorganismo. Esta última enzima posee un grupo Fe-S en su estructura y es capaz de isomerizar el citrato a isocitrato en el ciclo del ácido cítrico (Beinert y Kennedy, 1993). La similitud entre las secuencias de la homoaconitato hidratasa y la aconitasa sugiere que la homoaconitasa es la enzima encargada de isomerizar el homocitrato a homoisocitrato (Gamonet y Lauquin, 1998). La complementación de un mutante auxótrofo de lisina (LysF88) permitió la clonación del gen de la homoaconitasa de *A. nidulans*, denominado *lysF*. Este gen presenta un 55 % de similitud con la homoaconitasa de *S. cerevisiae*, y parece ser responsable de toda la actividad homoaconitasa presente en este hongo filamentoso (Weidner *et al.*, 1997; 2001).

En nuestro laboratorio, se ha caracterizado el mutante *P. chrysogenum* L2, un auxotrofo de lisina deficiente en la actividad homoaconitasa. El gen (denominado *lys3*) que complementa la mutación de L2 fue clonado por transformación utilizando una librería genómica de *P. chrysogenum* construida en un plásmido de replicación autónoma (Teves *et al.*, 2003). La proteína codificada por el gen *lys3* mostró una alta identidad con las homoaconitasas de *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *S. cerevisiae* y *S. pombe*. Además, se ha caracterizado el alelo *lys3* del mutante *P. chrysogenum* L2. Los resultados obtenidos determinaron que la proteína mutante Lys3 tiene alterada en una región imprescindible para unir la agrupación 4Fe-4S característica de las homoaconitasas. Dicha alteración induce auxotrofia y el incremento de los niveles de transcripción de algunos genes de la ruta biosintética de lisina, indicando que la homoaconitasa de *P. chrysogenum* posee actividad catalítica y reguladora. La propiedad bifuncional de la homoaconitasa de *P. chrysogenum* es similar a las encontradas en las aconitasas y otras proteínas hierro-azufre como las proteínas reguladoras de hierro (IRPs).

- **Homoisocitrato deshidrogenasa**

La enzima homoisocitrato deshidrogenasa es la encargada de catalizar la conversión de homoisocitrato en α -ceto adipato (Fig. 2). El mecanismo de esta transformación parece ser el siguiente: la homoisocitrato deshidrogenasa oxida el homoisocitrato, dando lugar a oxalglutarato, que espontáneamente se descarboxilaría generando α -ceto adipato (Bhattacharjee, 1985).

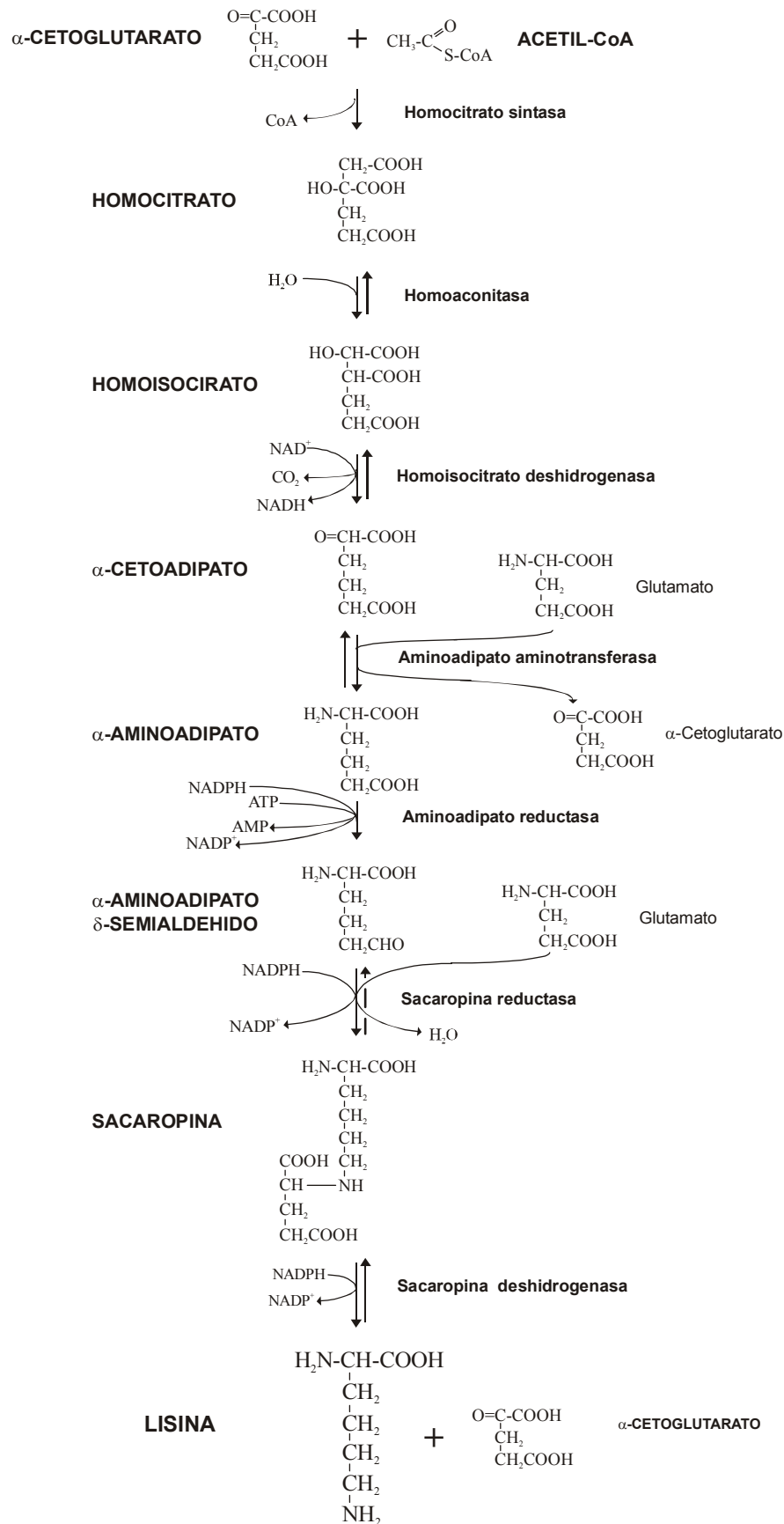


Fig. 2. Ruta biosintética del α-aminoadipato para la formación de lisina.

- **α -Aminoácido aminotransferasa**

La α -aminoácido aminotransferasa cataliza la reacción que convierte el α -cetoadipato en α -aminoácido (Fig. 2). En *S. cerevisiae* se han descrito dos isoenzimas, una mitocondrial y otra citoplasmática. Ambas han sido purificadas parcialmente, la isoenzima mitocondrial presenta un peso molecular de 100 kDa y es inactiva en la reacción reversa. La isoenzima citoplasmática posee un peso molecular de 140 kDa y es activa tanto en la reacción directa como en la reversa (Matsuda y Ogur, 1969a; 1969b). Esta es la parte menos conocida de la ruta de biosíntesis de lisina en hongos. Hasta los momentos, no se ha clonado el gen que codifica la α -aminoácido aminotransferasa en ninguna levadura y no se conocen mutantes de *S. cerevisiae* bloqueados específicamente en esta enzima.

- **α -Aminoácido reductasa**

La α -aminoácido reductasa (α -aminoácido semialdehído deshidrogenasa) es la primera enzima de la segunda parte de la ruta de síntesis de lisina y cataliza la única reacción no reversible de la ruta. Mediante la acción de esta enzima el α -aminoácido se convierte en α -aminoácido- δ -semialdehído (Fig. 2). Esta transformación tiene lugar en tres pasos consecutivos: En primer lugar, el α -aminoácido es activado mediante la unión de AMP (donado por una molécula de ATP) a su grupo δ -carboxilo. A continuación, el α -aminoácido- δ -AMP se reduce en presencia de NADPH. Por último, se libera el α -aminoácido- δ -semialdehído y el AMP. La reacción tiene lugar en presencia de ATP, NADPH y Mg^{+2} (Sagisaka y Shimura, 1960; 1962; Sinha y Bhattacharjee, 1971; Hijarrubia *et al.*, 2001, 2002).

En *S. cerevisiae* se han aislado dos *loci* (*lys2* y *lys5*) cuya mutación inactiva la α -aminoácido reductasa (Chattoo *et al.*, 1979; Zaret y Sherman, 1985). El gen de la α -aminoácido reductasa (de la subunidad con actividad reductasa) de *S. cerevisiae* se ha clonado mediante complementación de un mutante *lys2* (Eibel y Philippsen, 1983; Barnes y Thorner, 1986). La proteína deducida de este gen, denominado *LYS2*, tendría un peso molecular de 155,3 kDa (Morris y Jinks-Robertson, 1991). También se han clonado y secuenciado los genes homólogos de *Acremonium chrysogenum* (Hijarrubia *et al.*, 2001), *Pichia sorbitophila* (Bleykasten *et al.*, 2001), *S. pombe* (Ford y Bhattacharjee, 1995; Bhattacharjee y Bhattacharjee, 1998) y *Candida albicans* (Suvarna *et al.*, 1998) y *P. chrysogenum* (Casqueiro *et al.*, 1998),

En cuanto a la hipotética subunidad “hidrolítica” de la α -aminoácido reductasa, se ha clonado, caracterizado y secuenciado el gen *LYS5* responsable de esta actividad en *S. cerevisiae* (Borell y Bhattacharjee, 1988; Rajnarayan *et al.*, 1992; Miller y Bhattacharjee, 1996). La proteína deducida de este gen posee 272 aminoácidos y un peso molecular de 30,6 kDa, que junto a los 155,3 kDa de la subunidad codificada por el gen *LYS2* (Morris y Jinks-Robertson, 1991), parecen completar los 180 kDa descritos para la α -aminoácido reductasa nativa (Storts y Bhattacharjee, 1989). Recientemente,

se ha observado que el producto del gen *LYS5* actúa activando la proteína Lys2p mediante la unión de un grupo de fosfopantoteína (Ehmann *et al.*, 1999), actuando por lo tanto, como una fosfopantotenil transferasa, dicha reacción provoca un cambio conformacional en la Apo-Lys2 convirtiéndola en Holo-Lys2.

En *P. chrysogenum*, el gen que codifica la α -aminoadipato reductasa ha sido clonado mediante hibridación heteróloga utilizando un fragmento del gen *LYS2* de *S. cerevisiae*. La secuencia de este gen, denominado *lys2*, consta de un marco de lectura de 4330 pb interrumpido por dos intrones, que codifica una proteína de 1409 aminoácidos y un peso molecular de 154,86 kDa. Este gen está localizado en el cromosoma III de la cepa AS-P-78 y en el cromosoma IV de la cepa P2. El análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína deducida del gen *lys2* permitió identificar dominios de adenilación, unión de ATP, unión de brazos de fosfopantoteína y un dominio de reducción (Casqueiro *et al.*, 1998, 1997). La interrupción de este gen generó un mutante auxótrofo de lisina, denominado *P. chrysogenum* TDX195, lo que demostró su papel en la síntesis de lisina y que sólo existe un gen que codifique esta subunidad de la α -aminoadipato reductasa en *P. chrysogenum* (Casqueiro *et al.*, 1999b).

- **Sacaropina reductasa**

La sacaropina reductasa, también conocida como sacaropina deshidrogenasa (formadora de glutamato) o α -aminoadípico semialdehído-glutamato reductasa, es una enzima dependiente de NADPH que cataliza la penúltima reacción de la ruta del ácido α -aminoadípico para la formación de lisina. En dicha reacción, el α -aminoadipato- δ -semialdehído y el glutamato se convierten en sacaropina (Fig. 2), que es el precursor inmediato de la lisina (Bhattacharjee, 1985).

La enzima de *S. cerevisiae* ha sido parcialmente purificada por dos grupos independientes de investigadores. El resultado de estos estudios indica que la sacaropina reductasa posee un peso molecular de entre 73 y 69 kDa, con un pH óptimo de actividad de 7,0 para la reacción directa y 9,5-9,75 para la reacción reversa. La K_m para la sacaropina se estimó en 2,32 mM y en 0,054 mM para el NAD^+ (Jones y Broquist, 1966; Storts y Bhattacharjee, 1987).

En *S. cerevisiae*, se habían descrito dos *loci* (*lys9* y *lys14*) cuya mutación inactivaba este paso enzimático (Bhattacharjee, 1985). Los primeros estudios de complementación parecían indicar que eran necesarios los productos de dos genes (*LYS9* y *LYS14*) para la síntesis de la sacaropina reductasa (Borell *et al.*, 1984). Estudios posteriores determinaron que el gen *LYS9* era el responsable de la actividad enzimática, pero también se le atribuía un papel regulador, ya que mutantes inactivados en la sacaropina reductasa exhibían una clara desrepresión de algunos de los genes de la ruta (Winston y Bhattacharjee, 1987). Tuvo que esperarse hasta que se caracterizó la proteína reguladora Lys14p para poder comprobar que el gen *LYS9* no posee una doble función (biosintética y reguladora), sino que el

efecto que se observaba en los mutantes *lys9* se debía a la acumulación de α -aminoadipato- δ -semialdehído, un intermediario de la ruta del α -aminoadipato que actúa como co-inductor, junto con la proteína Lys14p, de la transcripción de los genes de la ruta de biosíntesis de lisina (Ramos *et al.*, 1988).

La sacaropina reductasa de *Magnaphorte grisea* ha sido purificada y cristalizada (Johansson *et al.*, 2000a). Dicha enzima esta constituida por 450 aminoácidos y tiene un peso molecular deducido de 48,9 kDa. Esta enzima muestra una marcada preferencia por NADPH como co-sustrato, aunque también puede utilizar NADH pero muestra una menor eficiencia catalítica (Johansson *et al.*, 2000a). El análisis estructural descrito recientemente indica que la sacaropina reductasa de *M. grisea* es un homodímero y cada sub-unidad está constituida por tres dominios. El dominio I, contiene una variante del dominio Rossmann fold que une NADPH, el dominio II, contiene una mezcla de 7 láminas β flanqueadas por α -hélices y esta implicado en la unión de sustrato y en la formación del dímero, el dominio III, es todo α -hélices. El sitio activo se localiza entre el dominio de unión a NADPH y el segundo dominio constituido por β/α (para revisión ver Johansson *et al.*, 2000b).

- **Sacaropina deshidrogenasa**

La última enzima de la ruta del α -aminoadipato es la sacaropina deshidrogenasa formadora de lisina (Fig. 2). Esta enzima se ha purificado a homogeneidad de *S. cerevisiae*, observándose que posee un peso molecular de 39 kDa, una K_m de 1,4 mM para el α -cetoglutarato y 25 mM para el NADH, y un pH óptimo mayor de 9 para la reacción directa y 7,0 para la reversa (Ogawa y Fujioka, 1978). La proteína homóloga de *Y. lipolytica* se ha purificado parcialmente, determinándose un peso molecular (40 kDa) similar al de *S. cerevisiae* (Xuan *et al.*, 1990).

Existen mutantes bloqueados en la sacaropina deshidrogenasa en *S. cerevisiae* (Bhattacharjee, 1985) y *S. pombe* (Bhattacharjee, 1985; Ye y Bhattacharjee, 1988). Se ha clonado el gen que codifica la sacaropina deshidrogenasa de *S. cerevisiae* (Ramos *et al.*, 1988); *Y. lipolytica* (Xuan *et al.*, 1990) y *C. albicans* (Garrad y Bhattacharjee, 1992; Garrad *et al.*, 1994). Las proteínas deducidas de estos genes poseen pesos moleculares entre 40,5 y 45,5 kDa, lo que coincide con el peso molecular de 39 kDa y 40 kDa establecido para las proteínas purificadas en *S. cerevisiae* y *Y. lipolytica* (Ogawa y Fujioka, 1978; Xuan *et al.*, 1990).

Tanto en plantas como en animales, el catabolismo de lisina tiene lugar vía sacaropina a través de dos reacciones enzimáticas consecutivas llevadas a cabo por la sacaropina deshidrogenasa (SDH) y la sacaropina reductasa (SR), las cuales son codificadas a partir de un único polipéptido bifuncional (Tang *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000a, b). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la planta *Arabidopsis thaliana* posee no solamente una proteína bifuncional SR/SDH, sino que también posee una enzima SDH monofuncional, la cual está codificada por un gen distinto (Tang *et al.*, 2000; Zhu *et*

al, 2000a, b; Epelbaum *et al.*, 1997). Aunque no todas las especies vegetales poseen un gen activo que codifique una SDH monofuncional, se conoce que la producción de esta enzima está directamente relacionada con un incremento del flujo de lisina vía catabólica (Tang *et al.*, 2000).

6. REGULACIÓN DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LISINA

La síntesis de lisina, incluyendo los metabolitos intermediarios de la ruta del α -aminoadipato, se encuentra fuertemente regulada. Algunos mecanismos implicados en la regulación de la ruta del α -aminoadipato son comunes en diferentes microorganismos. Algunos de estos mecanismos son: la inhibición enzimática y la represión génica por lisina, el control general de síntesis de aminoácidos y la actividad de reguladores específicos (Fig. 3).

Además de los tipos de regulación que se han mencionado en el párrafo anterior, se ha observado en algunos estudios que en presencia de glucosa, *P. chrysogenum* exhibe mayores niveles de actividad homocitrato sintasa y sacaropina deshidrogenasa (Revilla *et al.*, 1986), aunque este resultado no ha sido confirmado por otros investigadores (Jaklitsch *et al.*, 1987). También se ha descrito que la actividad de una de las α -cetoalopato aminotransferasas de *S. cerevisiae* podría estar influenciada por los niveles de glucosa del medio (Bhattacharjee, 1985). Otro factor nutricional, como la presencia de amonio como única fuente de nitrógeno, induce en *S. cerevisiae* una reducción en la concentración intracelular de lisina, que se localiza casi completamente en las vacuolas en estas condiciones (Wiemken y Durr, 1974; Bhattacharjee, 1985). Otro mecanismo de regulación de la síntesis de lisina parece ser la inhibición de la homocitrato sintasa por CoA. Este tipo de inhibición se ha observado en *S. cerevisiae* (Tracy y Kohlhaw, 1975) y *P. chrysogenum* (Jaklitsch y Kubicek, 1990), y parece estar relacionado con el control del flujo de acetyl-CoA hacia rutas biosintéticas (Tracy y Kohlhaw, 1975; Bhattacharjee, 1985).

6.1. Regulación por lisina

Como producto final de la ruta del α -aminoadipato, la lisina regula la actividad de algunas de las enzimas involucradas en su síntesis. Esta regulación se establece en dos niveles: inhibición de la actividad enzimática y represión de la síntesis de enzimas.

- **Inhibición por lisina**

La lisina regula su propia síntesis, en parte, por medio de la inhibición de la primera enzima de la ruta biosintética: la homocitrato sintasa. Este efecto inhibitorio se ha observado en *P. chrysogenum*

en estudios *in vivo* (Demain y Masurekar, 1974) e *in vitro* (Luengo *et al.*, 1980), y parece estar afectado por el pH del medio (Jaklitsch y Kubicek, 1990). La efectividad *in vivo* de este tipo de regulación de la homocitrato sintasa ha sido abordada en varios estudios. Jaklitsch *et al.* (1986) apuntaban que la inhibición por lisina de la homocitrato sintasa no podría darse en condiciones fisiológicas. Posteriormente, Jaklitsch y Kubicek (1990) afirmaron que debía existir una fuerte inhibición de la homocitrato sintasa durante la fase exponencial de crecimiento; no obstante, el descenso en el pH intracelular durante la fase estacionaria podría provocar la insensibilidad de la homocitrato sintasa frente a la inhibición por lisina.

En *S. cerevisiae*, se ha observado que las dos isoenzimas son fuertemente inhibidas por lisina (Maragoudakis *et al.*, 1967; Tucci y Ceci, 1972a; 1972b). Sin embargo, la isoenzima codificada por el gen *LYS21* muestra una constante de inhibición mucho menor que la isoenzima codificada por el gen *LYS20*. Esto parece indicar que la isoenzima responsable de la producción de homocitrato es predominantemente la proteína Lys20p, “activándose” la homocitrato sintasa Lys21p únicamente en condiciones extremas de déficit de lisina (Feller *et al.*, 1999). También se ha observado inhibición por lisina de la homocitrato sintasa en *N. crassa* (Hogg y Broquist, 1968), *Candida pelliculosa* (Takenouchi *et al.*, 1981), *Pichia guilliermondii* (Schmidt *et al.*, 1989), *Rhodototula glutinis* (Glass y Bhattacharjee, 1971) y en *Y. lipolytica* (Gaillardin *et al.*, 1976). En este último microorganismo se ha demostrado que la lisina inhibe la homocitrato sintasa competitivamente frente al α -cetoglutarato, pero uniéndose a la enzima en un sitio distinto del sitio de unión de los sustratos (Gaillardin *et al.*, 1976).

La importancia de la inhibición por lisina de la homocitrato sintasa, como factor clave de la regulación de la síntesis de lisina, se ve claramente en los mutantes desensibilizados en este tipo de regulación. Existen mutantes con homocitrato sintasas que no responden a la inhibición por lisina en *S. cerevisiae* (Sinha *et al.*, 1971; Haidaris y Bhattacharjee, 1978; Gasent-Ramirez y Benitez, 1997) y *Y. lipolytica* (Gaillardin *et al.*, 1975), y que superproducen lisina debido a esta desregulación. En *S. cerevisiae*, se han identificado algunas sustituciones aminoacídicas en las dos isoenzimas de este microorganismo que originan este fenotipo insensible a inhibición por lisina (Feller *et al.*, 1999).

La única enzima en la que se ha observado inhibición por lisina, además de la homocitrato sintasa, es la α -aminoadipato reductasa de *P. chrysogenum*, *S. cerevisiae* y *S. pombe*. En *P. chrysogenum*, Affenzeller *et al.* (1989) determinaron una constante de inhibición para la lisina, competitivamente frente al α -aminoadipato, de 0,26 mM y determinaron que este tipo de inhibición podría darse en condiciones fisiológicas. En el caso de las enzimas de *S. cerevisiae* y *S. pombe*, se observó que concentraciones de 4 mM de lisina inhibían más del 80 % de la actividad α -aminoadipato reductasa (Ford y Bhattacharjee, 1995). Sin embargo, este tipo de regulación parece no ser muy efectivo *in vivo* en *S. cerevisiae*, ya que la eliminación de la regulación al nivel de la homocitrato sintasa induce una sobreproducción de lisina, por lo que se puede comprobar que la inhibición de la α -aminoadipato reductasa no es un mecanismo capaz de reducir la síntesis de lisina en condiciones de

exceso de este aminoácido (Feller *et al.*, 1999). A diferencia de *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *P. chrysogenum*; *Pichia guilliermondii* posee una α -aminoadipato reductasa que no es inhibida por lisina (Schmidt *et al.*, 1989).

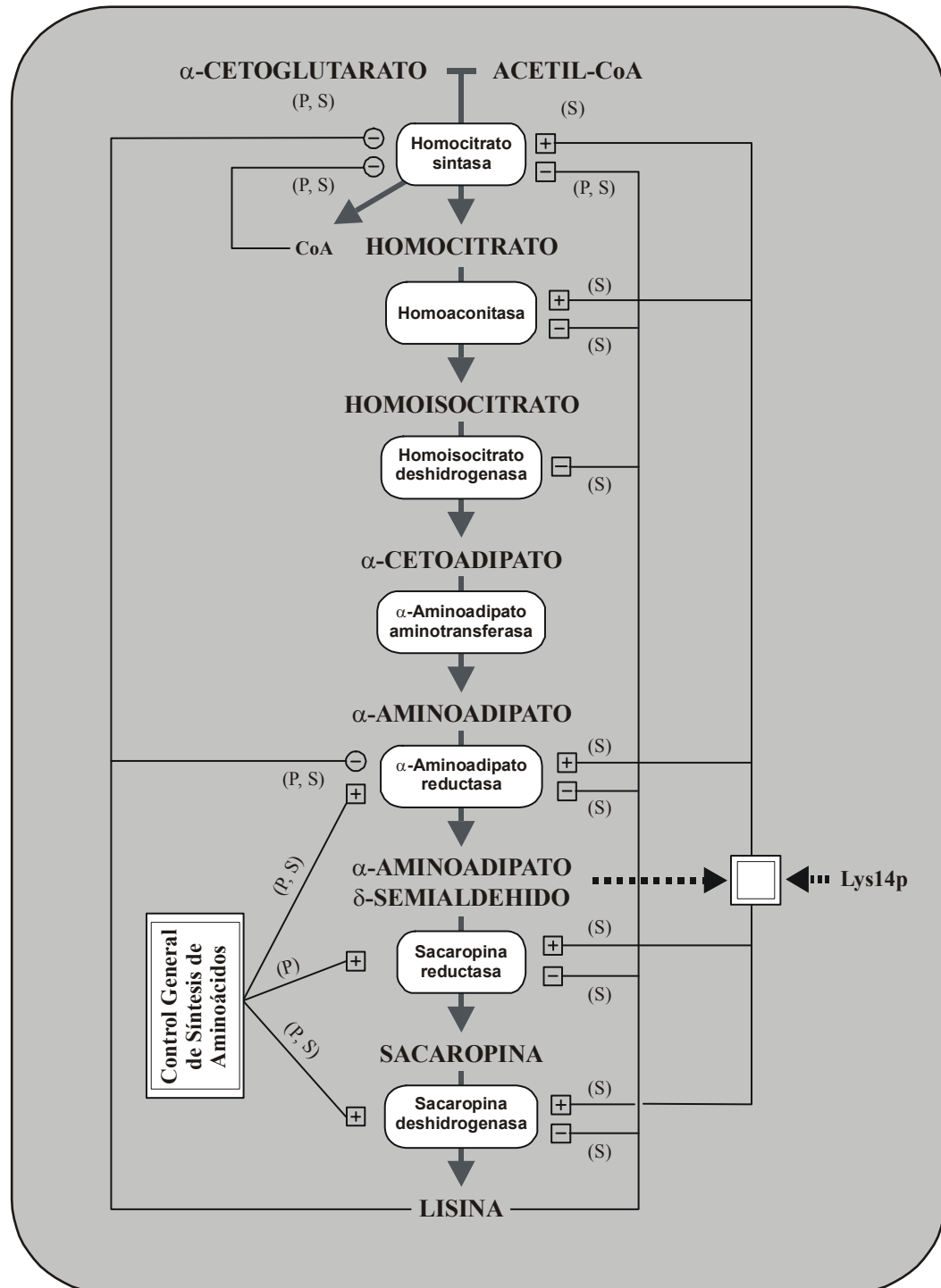


Fig. 3. Regulación de la ruta de síntesis de lisina en *S. cerevisiae* (S) y *P. chrysogenum* (P). Los círculos indican regulación sobre la actividad enzimática y los cuadrados regulación sobre la síntesis de la enzima o transcripción del gen correspondiente.

- **Represión por lisina**

Otro mecanismo mediante el cual la lisina regula su propia síntesis, es la represión de la formación de las enzimas de la ruta del α -aminoadipato. En *P. chrysogenum* existen pocos estudios acerca de la represión por lisina de la síntesis de las enzimas de la ruta. Uno de estos estudios es el realizado por Jaklitsch *et al.* (1987), en el que se afirma que la síntesis de las enzimas implicadas en la formación de lisina no es reprimida por este aminoácido. El interés de los investigadores se ha centrado sobre todo en la homocitrato sintasa. Existen varios estudios publicados que tratan la represión por lisina de la síntesis de esta enzima (Demain y Masurekar, 1974; Luengo *et al.*, 1980; Jaklitsch *et al.*, 1987). Recientemente Bañuelos *et al.* (1999a) han demostrado que la represión por lisina del gen *lys1*, tiene lugar únicamente con concentraciones elevadas de lisina en los caldos de cultivo, por lo que parece ser un mecanismo poco activo para la regulación de la homocitrato sintasa en *P. chrysogenum*. De manera similar, se ha observado que la transcripción del gen *lys2* que codifica la α -aminoadipato reductasa de *P. chrysogenum* es ligeramente reprimida por lisina (Casqueiro, 1997).

En *S. cerevisiae* se ha establecido que una de las isoenzimas de la homocitrato sintasa es reprimida por lisina (Tucci y Ceci, 1972b; Urrestarazu *et al.*, 1985). En esta levadura, los experimentos de Urrestarazu *et al.* (1985) parecen demostrar que la homoaconitato hidratasa, homoisocitrato deshidrogenasa, α -aminoadipato reductasa, sacaropina reductasa y sacaropina deshidrogenasa son también reprimidas por lisina, mientras que se ha observado que la transcripción del gen *LYS7* (gen de la homocitrato deshidratasa; Horecka *et al.*, 1995) y la síntesis de la α -ceto adipato aminotransferasa no son reprimidas por lisina (Bhattacharjee, 1985).

En otros microorganismos se ha observado que la lisina reprime la transcripción de algunos genes de la ruta. Es el caso del gen que codifica la homoaconitasa de *A. nidulans* (Weidner *et al.*, 1997); el gen que codifica la homocitrato sintasa de *N. crassa* (Hogg y Broquist, 1968) y de *P. guilliermondii* (Schmidt *et al.*, 1989), así como la síntesis de la sacaropina deshidrogenasa de *Y. lipolytica* (Gaillardin y Heslot, 1979), la síntesis de la α -aminoadipato reductasa de *S. pombe* (Ford y Bhattacharjee, 1995) y la transcripción del gen de la α -aminoadipato reductasa de *C. albicans* (Suvarna *et al.*, 1998).

6.2. Regulación por el control general de síntesis de aminoácidos

En *S. cerevisiae*, la formación de varias enzimas de las rutas biosintéticas de histidina, arginina, lisina, triptófano, isoleucina-valina, tirosina, glutamina, leucina y fenilalanina se encuentran reguladas por el control general de síntesis de aminoácidos (Niederberger *et al.*, 1981; Hinnebusch, 1988). Este sistema de regulación también se ha observado en *N. crassa*, *A. nidulans* (Hinnebusch, 1988) y *P. chrysogenum* (Hönlinger *et al.*, 1988; Hönlinger y Kubicek, 1989b). Dicho sistema induce la desrepresión de los genes regulados cuando existe deficiencia de ciertos aminoácidos en la célula. Uno

de estos aminoácidos es la histidina, por lo que se puede inducir la transcripción de los genes regulados por el control general mediante la incubación del microorganismo en presencia de 3-amino-1,2,4-triazol (amitrol), un inhibidor de la imidazolglicerol-fosfato deshidratasa, enzima de la ruta de síntesis de histidina (Flint y Kemp, 1981).

La regulación por el control general de síntesis de aminoácidos está mediada en *S. cerevisiae* por el producto del gen *GCN4*. La proteína codificada por este gen es un regulador positivo, que activa la transcripción de los genes regulados por el control general, uniéndose a secuencias reguladoras de los promotores de estos genes. El sitio de unión de esta proteína está formado por el hexanucleótido TGATCT (Donahue *et al.*, 1983). La transcripción del gen *GCN4* parece estar regulada por un mecanismo complejo (Fig. 4), en el que intervienen los productos de una serie de genes denominados *GCD*, que actúan como reguladores negativos de la transcripción del gen *GCN4*. Los genes *GCD* son a su vez regulados negativamente por los productos de los genes *GCN1*, *GCN2* y *GCN3*. La transcripción de los genes *GCN1*, *GCN2* y *GCN3* es activada por la deficiencia en la concentración intracelular de algunos aminoácidos, lo que provocaría la represión de los genes *GCD* y por lo tanto la desrepresión del gen *GCN4*, que activaría la transcripción de los genes de síntesis de aminoácidos (para una revisión ver Hinnebusch, 1988). No se han descrito genes homólogos al *GCN4* en otros microorganismos, a pesar de que se ha comprobado que el control general es un sistema activo en *N. crassa*, *A. nidulans* y *P. chrysogenum* (Hinnebusch, 1988; Hönlinger *et al.*, 1988; Hönlinger y Kubicek, 1989b).

En *P. chrysogenum*, existen estudios que indican que las enzimas de la segunda parte de la ruta de biosíntesis de lisina: α -aminoadipato reductasa, sacaropina reductasa y sacaropina deshidrogenasa; se encuentran reguladas por el control general; sin embargo, este tipo de regulación no se observa en el caso de la homocitrato sintasa (Jaklitsch *et al.*, 1987; Hönlinger *et al.*, 1988).

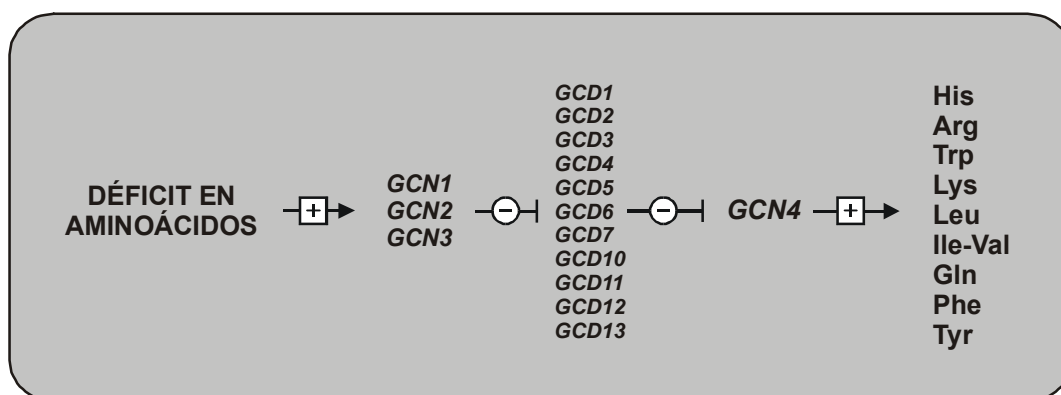


Fig. 4. Cascada reguladora de los genes implicados en la regulación del sistema general de síntesis de aminoácidos en *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae*, también se había visto que las enzimas de la segunda parte de la ruta de biosíntesis de lisina están reguladas por el control general (Wolfner *et al.*, 1975; Ramos y Wiame, 1985; Urrestarazu *et al.*, 1985). Sin embargo, durante los últimos años se ha comprobado que el gen *LYS9* (sacaropina reductasa) no se encuentra bajo este sistema de regulación (Feller *et al.*, 1994). La regulación de la homocitrato sintasa se ha abordado pero, mientras algunos estudios apuntan a que la síntesis de esta enzima no responde al control general (Urrestarazu *et al.*, 1985), los resultados de otros experimentos parecen indicar que sí (Ramos y Wiame, 1985). En *Y. lipolytica* y *C. maltosa* son las enzimas de la primera parte de la ruta las que parecen encontrarse reguladas por el control general (Gaillardin y Heslot, 1979; Schmidt *et al.*, 1985), mientras que en *P. guilliermondii* este tipo de regulación no se ha observado (Schmidt *et al.*, 1989).

6.3. Regulación por efectores específicos

Ramos y Wiame (1985) identificaron un mutante de *S. cerevisiae* (*lys80-1*) que parecía ser un mutante en una proteína reguladora de la transcripción de los genes de la ruta del α -aminoadipato. La transcripción de los genes de la homocitrato sintasa, sacaropina reductasa y sacaropina deshidrogenasa era mayor en el mutante *lys80-1* que en la cepa silvestre y, además, la transcripción de estos genes era menos sensible a represión por lisina, lo que indujo a pensar que la proteína Lys80p era un represor de los genes de la ruta. Sin embargo, posteriormente se demostró que la mutación *lys80* tiene un efecto pleiotrópico sobre los genes de la ruta de biosíntesis de lisina, ya que induce un mayor flujo de α -cetoglutarato a través de esta ruta (Feller *et al.*, 1997). También se ha tratado de asignar un papel regulador al gen *LYS9*, que codifica la sacaropina reductasa (Borell *et al.*, 1984; Winston y Bhattacharjee, 1987). Sin embargo, el efecto que ejercen las mutaciones *lys80* y *lys9* sobre la transcripción de los genes de la ruta de biosíntesis de lisina de *S. cerevisiae*, debe buscarse en el papel que juegan en relación con la actividad de la proteína reguladora codificada por el gen *LYS14*.

La proteína Lys14p, que en un principio se pensaba que estaba relacionada con la síntesis de la sacaropina reductasa (Borell *et al.*, 1984), es un activador transcripcional de los genes de la ruta de *S. cerevisiae*, cuyo mecanismo de acción es independiente del control general de síntesis de aminoácidos (Ramos *et al.*, 1988; Feller *et al.*, 1994). El gen *LYS14* se ha clonado y secuenciado, observándose que presenta un dominio de unión a ADN del tipo “dedos de Zn” (Feller *et al.*, 1994). Esta proteína se une a una secuencia de 9 nucleótidos (TCCRNYGGA) que se ha localizado en los promotores de los genes *LYS9* (sacaropina reductasa), *LYS1* (sacaropina deshidrogenasa), *LYS2* (α -aminoadipato reductasa), *LYS4* (homoaconitato hidratasa), *LYS20* y *LYS21* (homocitrato sintasas) de *S. cerevisiae* (Becker *et al.*, 1998). La proteína Lys14p induce la transcripción de estos genes en presencia de α -aminoadipato- δ -semialdehído, que actúa como co-inductor (Ramos *et al.*, 1988; Feller *et al.*, 1994).

La represión por lisina y la activación por la proteína Lys14p habían sido descritas como hechos independientes en un primer momento (Ramos *et al.*, 1988). Sin embargo, un estudio más profundo ha revelado que la represión por lisina de los genes de la ruta del α -aminoadipato de *S. cerevisiae* se debe a la inhibición que este aminoácido ejerce sobre las isoenzimas de la homocitrato sintasa. En presencia de altas concentraciones de lisina, el flujo de metabolitos a través de la ruta de síntesis de lisina se reduce, con lo cual la concentración intracelular de α -aminoadipato- δ -semialdehído desciende, evitando la activación de los genes de la ruta por la proteína Lys14p (Feller *et al.*, 1994; 1997; 1999). Estos resultados llevan a considerar el efecto represor que la lisina ejerce sobre algunos genes de la ruta del α -aminoadipato de *S. cerevisiae*, como un mecanismo de represión indirecta mediado por la modulación de la actividad de la proteína Lys14p.

El papel del α -aminoadipato- δ -semialdehído como co-inductor explica las características de los mutantes *lys80* y *lys9* (transcripción incrementada de los genes de la ruta que, además, son reprimidos en menor medida por lisina). Estos dos mutantes poseen altos niveles de α -aminoadipato- δ -semialdehído (el mutante *lys80* posee un elevado flujo metabólico a través de la ruta y el mutante *lys9* esta bloqueado en la sacaropina reductasa), por lo que presentan una mayor actividad de la proteína Lys14p (Feller *et al.*, 1997). Además, la inhibición de las homocitrato sintasas por lisina no reduce drásticamente la concentración de co-inductor, con lo que incluso en presencia de lisina la proteína Lys14p puede activar la transcripción de los genes de la ruta en estos dos mutantes (Feller *et al.*, 1994). Mecanismos de regulación específicos, como el descrito en *S. cerevisiae*, no se han encontrado en ninguno de los otros microorganismos en los cuales se ha estudiado la ruta del α -aminoadipato.

7. EL ÁCIDO PIPECÓLICO Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO DE LISINA EN DIVERSOS ORGANISMOS

El ácido pipecólico es un iminoácido de seis átomos de carbono que se caracteriza por desempeñar distintas funciones metabólicas en diversos organismos. Se ha descrito que el ácido pipecólico es un intermediario del catabolismo de lisina en mamíferos, plantas, bacterias, levaduras y hongos. A continuación se describe el metabolismo de este importante iminoácido en algunos organismos:

7.1. Metabolismo en Mamíferos

En mamíferos, la lisina puede ser catabolizada por dos vías distintas: por la ruta de la sacaropina o por la ruta del ácido pipecólico (IJlst *et al.*, 2000; Dodt *et al.*, 2000). Aunque la lisina se cataboliza

principalmente a través de la ruta de la sacaropina en la mayoría de los tejidos, en el cerebro, la ruta del ácido pipecólico es la más activa. En la ruta del catabolismo de lisina vía sacaropina, la lisina se transforma en ácido piperideín-6-carboxílico (P6C) a través de dos reacciones consecutivas llevadas a cabo por la sacaropina deshidrogenasa y la sacaropina reductasa. Como sucede en plantas (Goncalves-Butruille *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000a, b), estas dos reacciones son catalizadas por una única enzima bifuncional (Fig. 5A). Sin embargo, en el cerebro, la actividad de esta enzima bifuncional es muy baja, por lo cual, la lisina se cataboliza predominantemente vía ácido pipecólico a través de dos reacciones enzimáticas usando ácido piperideín-2-carboxílico (P2C) y su cadena abierta 2-ceto-6-aminocaproato como intermediarios (IJst *et al.* 2000; Dodt *et al.*, 2000), tal como muestra la Figura 5.

La primera pipecolato oxidasa caracterizada y purificada en mamíferos fue descrita en primates por Mihalik *et al.* (1991). Dicha proteína, un monómero amarillo, posee un peso molecular deducido de 46 kDa. En primates y humanos, Mihalik *et al.* (1991), demostraron que el ácido pipecólico se oxida mediante dos reacciones consecutivas de deshidrogenación para formar ácido α -aminoadípico (Mihalik y Rhead, 1989). Los resultados obtenidos por este grupo de investigación sugerían que la oxidación del ácido pipecólico en primates y humanos se llevaba a cabo a través de una ruta similar a la encontrada en *Pseudomonas putida* (Baginsky y Rodwell, 1967). En esta bacteria, se había descrito que el ácido pipecólico se oxida inicialmente a P6C a través de una pipecolato oxidasa (ácido pipecólico + O₂ → P6C + H₂O₂). El P6C se encuentra en equilibrio químico constante con el α -aminoadipato- δ -semialdehído, de tal manera, que el P6C se abre espontáneamente al pH fisiológico para formar α -aminoadipato- δ -semialdehído. A continuación, la oxidación del aminoadipato- δ -semialdehído produce ácido α -aminoadípico (Fig. 5).

Posteriormente, Reuber *et al.* (1997), aislaron y purificaron la pipecolato oxidasa de conejos. Esta proteína, constituida por 390 aminoácidos, se caracteriza por tener en el extremo amino terminal un dominio de unión a ADP formado por una alternancia $\beta\alpha\beta$, un motivo altamente conservado en flavoproteínas. Además, Reuber *et al.* (1997) establecieron que la sarcosina, el ácido pipecólico y la prolina eran buenos sustratos para ésta enzima.

Más adelante, IJst *et al.* (2000) describieron la clonación del gen que codifica la pipecolato oxidasa en humanos a partir de ADNc usando la información de la secuencia de nucleótidos de genes que codifican pipecolato/sarcosina oxidasas descritas previamente en conejos y ratones. La hipotética pipecolato oxidasa de humanos presentó una alta homología con la sarcosina oxidasa de ratones y algunas de las sarcosinas oxidasas monoméricas descritas en bacterias. Además, la proteína deducida también mostraba un dominio de unión a ADP- $\beta\alpha\beta$ similar a la pipecolato oxidasa de conejos.

En paralelo, Dodt *et al.* (2000) describieron la clonación del gen que codifica la pipecolato oxidasa de humanos por genética reversa usando la secuencia de aminoácidos de la pipecolato oxidasa purificada de primates. El ADNc clonado presentó un marco de lectura abierta de 1170 pares de bases

que codifica una proteína de 390 aminoácidos con una alta identidad con todas las sarcosinas oxidasas y deshidrogenasas descritas, especialmente, con la sarcosina oxidasa monomérica de *Bacillus* sp. NS-129. Además, Dodt *et al.* (2000), también demostraron que esta enzima oxidaba tanto el ácido pipecólico como la sarcosina, tal como lo habían descrito previamente Reuber *et al.* (1997) con la pipecolato oxidasa de conejos.

Con relación a la localización subcelular, en humanos, ratones y primates el ácido pipecólico se metaboliza en los peroxisomas (IJlst *et al.*, 2000; Dodt *et al.*, 2000). En conejos, perros, cerdos y ovejas la oxidación del ácido pipecólico es predominantemente mitocondrial (Singh *et al.*, 1989; Mihalik y Rhead, 1991) mientras que, en ratas, este compuesto puede ser metabolizado tanto en mitocondrias como en peroxisomas (Rao *et al.*, 1993).

La identificación y caracterización de la pipecolato oxidasa humana tiene una gran importancia desde el punto de vista sanitario, ya que en el ámbito clínico se ha descrito que la acumulación de ácido pipecólico es una de las principales anomalías bioquímicas asociada con pacientes que sufren un desorden generalizado en la biogénesis de los peroxisomas (*peroxisome biogenesis disorder* o PBD), entre los que destacan: el síndrome cerebro-hepato-renal de Zellweger, una enfermedad genética que se caracteriza por la ausencia de peroxisomas morfológicamente distinguibles; la adrenoleucodistrofia neonatal y la hiperpipecólico acidemia (Wanders *et al.*, 1989, 1988; Mihalik y Rhead, 1989; Mihalik *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1993). También, se ha descrito que pacientes con enfermedades crónicas, especialmente, con encefalopatía hepática, presentan niveles altos de ácido pipecólico en plasma sanguíneo (Fujita *et al.*, 1999).

Los pacientes con PBD se caracterizan por presentar un profundo retraso mental, una migración neuronal anormal y una degeneración excesiva del sistema nervioso central. En los pacientes con PBD los peroxisomas se encuentran ausentes con la deficiencia concomitante de todas las enzimas peroxisomales. La acumulación de ácido pipecólico en estos pacientes se debe a una actividad deficiente de la enzima pipecolato oxidasa, lo que indica que esta enzima se encuentra fuertemente implicada en la degradación del ácido pipecólico a ácido α -aminoadípico y que podría ser peroxisomal al menos en humanos y monos (IJlst *et al.*, 2000; Mihalik y Rhead, 1989; Wanders *et al.*, 1988).

Aunque se ha caracterizado la pipecolato oxidasa e identificado el producto de su reacción, el mecanismo exacto de oxidación del ácido pipecólico no está aún totalmente claro. Sin embargo, se ha descrito que la pipecolato oxidasa cataliza la conversión de ácido pipecólico en P6C el cual, de manera espontánea, se encuentra en equilibrio con su forma lineal el α -aminoadipato- δ -semialdehído (IJlst *et al.*, 2000; Wanders *et al.*, 1989a, b; Kramar *et al.*, 1989; Mihalik y Rhead, 1989; Dodt *et al.*, 2000; Rao y Chang, 1990). Posteriormente, el α -aminoadipato- δ -semialdehído se convierte a su vez en ácido α -aminoadípico a través de una reacción de deshidrogenación dependiente de NAD (Chang *et al.*, 1990).

CATABOLISMO DE LISINA EN HUMANOS

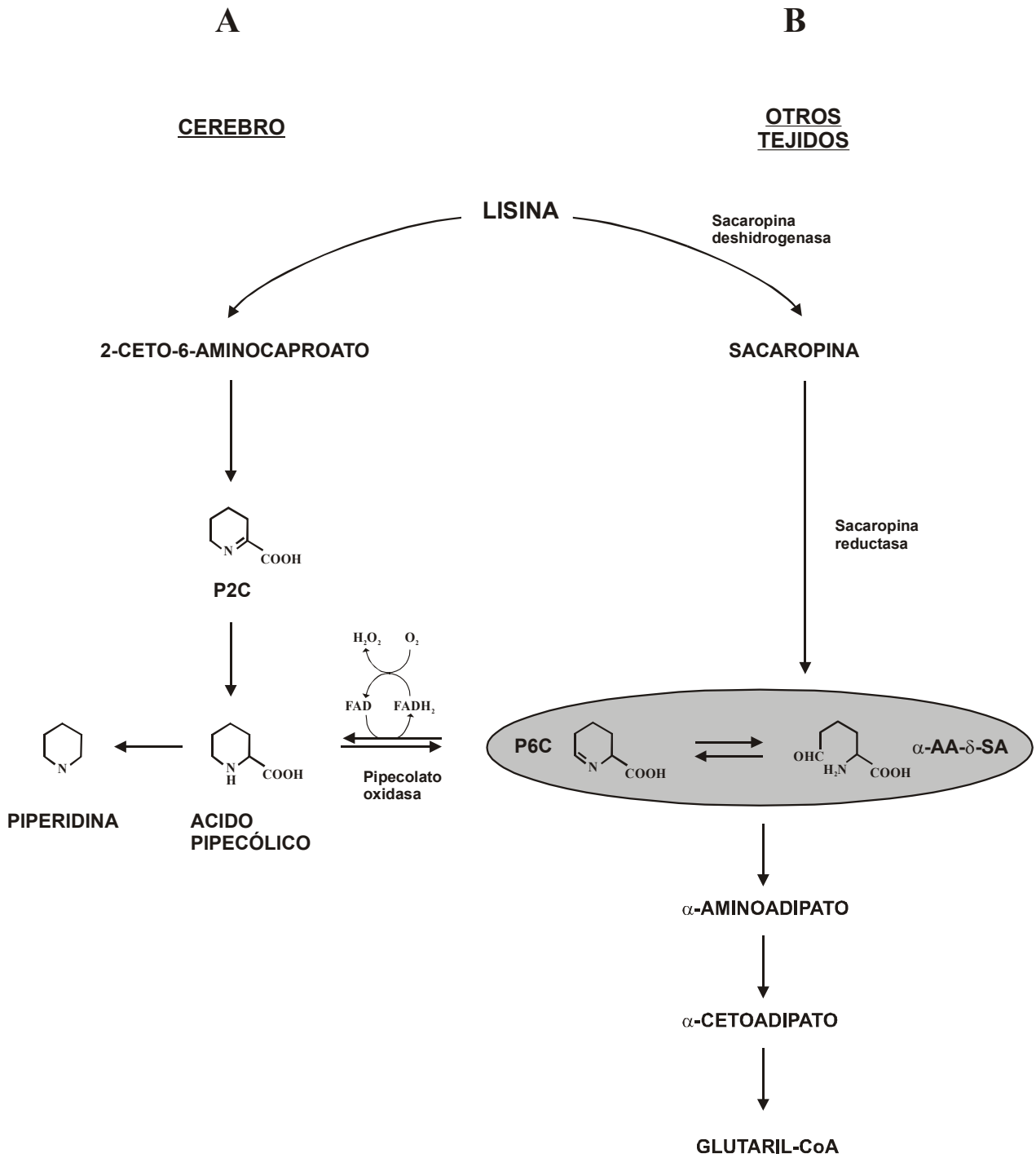


Fig. 5. Representación esquemática de las dos rutas catabólicas de lisina presentes en mamíferos: (A) Ruta del catabolismo de lisina vía sacaropina y (B) Ruta del catabolismo de lisina vía ácido pipecólico. Aunque la lisina se cataboliza principalmente a través de la ruta de la sacaropina en la mayoría de los tejidos, en el cerebro, la ruta del ácido pipecólico es la más activa (IJlst *et al.*, 2000). α-AA-δ-SA: α-aminoadipato-δ-semialdehído; P6C: ácido piperideín-6-carboxílico; P2C: ácido piperideín-2-carboxílico.

7.2. Metabolismo en Plantas

Las plantas producen una inmensa cantidad y variedad de compuestos orgánicos, de los cuales, la gran mayoría parecen no estar implicados directamente con los procesos de crecimiento y desarrollo de las mismas, es decir, son metabolitos secundarios (Croteau *et al.*, 2003). En plantas, el ácido pipercolico se considera un metabolito secundario, mientras que su análogo, el aminoácido prolina, se considera como un metabolito primario. En plantas, se ha descrito que el ácido pipercolico deriva del catabolismo de lisina vía α -aminoadipato- δ -semialdehído (Goncalves-Butruille *et al.*, 1996), el cual, se encuentra en equilibrio químico con el P6C (Fig. 6). Posteriormente, el P6C podría reducirse a ácido pipercolico mediante una reacción análoga a la catalizada por la pipercolina-5-carboxilato (P5C) reductasa (EC 1.5.1.2) (Stewart y Larher, 1980; Rosenthal, 1982; Galili, 1985).

CATABOLISMO DE LISINA EN SEMILLAS

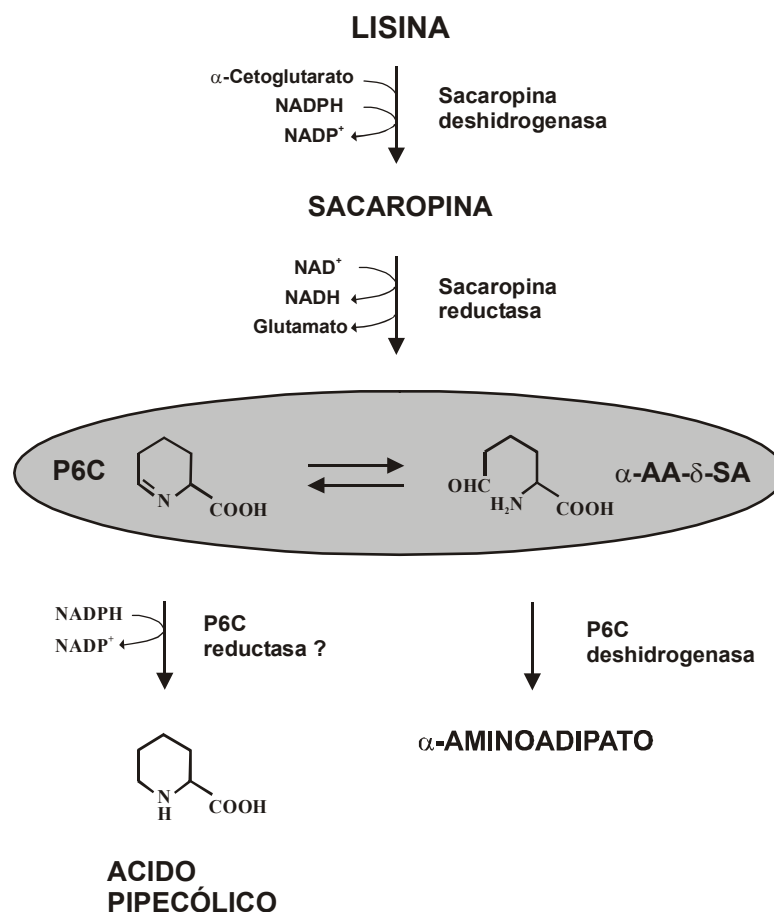


Fig. 6. Catabolismo de lisina en semillas de plantas, donde el ácido pipercolico es un intermediario importante (Galili *et al.*, 1985). En algunas especies vegetales el ácido pipercolico se acumula en grandes cantidades y se encuentra vinculado con diversas propiedades tales como: actividad insectida, fitotóxica y osmoprotectora, entre otras. α -AA- δ -SA: α -aminoadipato- δ -semialdehído; P6C: ácido piperideín-6-carboxílico

Momordica charantia (bitter melon), una planta de la familia *Cucurbitaceae* de gran interés en la medicina tradicional china y africana, contiene en sus frutos y semillas, entre otros aminoácidos libres, ácido pipecólico (Salawu *et al.*, 1999). Esta planta presenta propiedades antibióticas, antimutagénicas, antioxidantes, antivirales, antitumorales, astringentes, depurativas, afrodisíacas, inmunomodulares, citotóxicas, así como actividad inmunosupresora e insecticida, entre otras (Leung *et al.*, 1987; Romeo, 1984). Tradicionalmente, se recomienda para combatir problemas de la piel (dermatosis, quemaduras, erupciones, soriasis, etc.), la gonorrea, el reumatismo, la artritis, el lupus, la diabetes, como estimulante del apetito, para la regulación de la fertilidad, para tratamientos gastrointestinales y como insecticida. Recientemente, *M. charantia* ha sido utilizada para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer e infecciones virales (Leung *et al.*, 1987) y se ha encontrado que el extracto hexánico de esta planta posee actividad inhibitoria sobre amastigotes y promastigotes de diversas especies de *Leishmania* (Jaramillo, 2000).

Así mismo, el ácido pipecólico es un fitoquímico que se acumula en grandes cantidades en algunos miembros de la familia *Fabaceae* y se ha descrito que es el principal constituyente de la reserva de aminoácidos libres en el género *Medicago* (Steward y Larher, 1980; Rosenthal, 1982). Además, el ácido pipecólico, se ha detectado en frutos inmaduros (pericarpio y semillas) de *Coffea arabica* y *Camellia sinensis* (Higuchi *et al.*, 1995), mientras que, en *Sophora secundiflora*, *Cycas circinalis* y *Phaseolus vulgaris* se ha identificado en semillas (Izaddoost *et al.*, 1976; Li *et al.*, 1996).

Las plantas conviven con una población depredadora muy activa que esta constituida por bacterias, insectos, hongos y animales herbívoros, por lo cual, han desarrollado diversos mecanismos de defensa que le han permitido su supervivencia en este medio tan hostil (Norton, 2002). El estudio de factores tóxicos y anti-nutritivos en las leguminosas *Albizia lebbek* y *Calliandra calothyrsus* permitió identificar la presencia de ácido pipecólico en sus hojas (Marlier *et al.*, 1979; Romeo, 1984; Romeo, 1998). Es importante destacar que el ácido pipecólico y sus derivados que han sido aislados de las hojas de *C. calothyrsus* poseen propiedades insecticidas y fitotóxicas (Romeo, 1984), por lo cual, estos compuestos podrían tener un gran interés comercial en el campo de la industria agroalimentaria.

Por otro lado, se ha observado que pequeñas concentraciones de ácido pipecólico inhiben el crecimiento de la radícula de semillas germinadas en *Astragalus sinicus* y *M. alba*, y se ha demostrado que la conversión de lisina a ácido pipecólico induce floración en *Lemna paucicostata* 151 (Fujioka *et al.*, 1987). También, se ha descrito que el ácido pipecólico es un soluto asociado con la adaptación osmótica en plantas de la especie *Ptelea*, una planta xerófita que se desarrolla en hábitats áridos y semiáridos (Steward y Larher, 1980; Romeo, 1998).

7.3. Metabolismo en Bacterias

En algunas especies de *Pseudomonas* se ha descrito que el ácido pipecólico proviene del catabolismo de lisina (Baginsky y Rodwell, 1967; Hartline y Rodwell, 1971). En *P. putida*, la L-lisina

se convierte inicialmente en D-lisina y P2C. Posteriormente, el P2C se convierte en ácido pipercolico por acción de la P2C reductasa (Payton y Chang, 1982). Por otro lado, en *Streptomyces hygroscopicus*, el ácido pipercolico también deriva del catabolismo de L-lisina. Esta bacteria produce rapamicina, un inmunosupresor que contiene en su estructura una molécula de ácido pipercolico (Khaw *et al.*, 1998). Además, se ha descrito que en el genoma de *E. coli* existe una “P6C reductasa” que cataliza la reducción de P6C en ácido pipercolico. Fujii *et al.* (2002a) demostraron con experimentos *in vivo* e *in vitro* que la actividad P6C reductasa la lleva a cabo la pirrolina-5-carboxilato (P5C) reductasa (EC 1.5.1.2) codificada por el gen *proC*. La P5C reductasa cataliza la reducción de P5C en L-prolina, una actividad enzimática encontrada en una gran variedad de organismos (Leisinger, 1987).

Por otro lado, se ha estudiado la capacidad osmoprotectora de ácido pipercolico en *E. coli* (Gouesbet *et al.*, 1994) y *Sinorhizobium meliloti* (Gouffi *et al.*, 2000), donde se ha demostrado que es un compuesto efectivo capaz de optimizar el crecimiento de estos microorganismos bajo condiciones inhibitorias de osmolaridad.

7.4. Metabolismo en Hongos Filamentosos y Levaduras

Al igual que en otros organismos, en levaduras y hongos filamentosos el ácido pipercolico es un intermediario importante que se encuentra estrechamente relacionado con el metabolismo de lisina. El ácido pipercolico tiene un papel nutricional importante en *Aspergillus nidulans* (Aspen y Meister, 1962) y *Rhodotorula glutinis* (Kurtz y Bhattacharjee 1975); sin embargo, se ha descrito que no posee ninguna función en la ruta biosintética de lisina de *Saccharomyces cerevisiae* (Glass y Bhattacharjee, 1971; Kurtz y Bhattacharjee, 1975). A continuación se menciona el papel que desempeña el ácido pipercolico en el metabolismo de lisina en diferentes especies:

- *Aspergillus nidulans*

Se ha descrito en varios organismos que el ácido pipercolico se forma a través del catabolismo de lisina. Sin embargo, Aspen y Meister (1962), demostraron en *Aspergillus nidulans* que el ácido pipercolico deriva de la ruta biosintética de lisina (vía anabólica) y no de su catabolismo (Fig. 7A). Aspen y Meister (1962), identificaron algunos mutantes auxótrofos de lisina de *A. nidulans* que eran capaces de acumular ácido pipercolico cuando crecían sobre medio mínimo con cantidades limitantes de lisina. Así mismo, Aspen y Meister (1962), usando ácido α -aminoadípico marcado con C^{14} y N^{15} y lisina marcada con C^{14} , demostraron que la cadena carbonada del ácido pipercolico procedía mayoritariamente del ácido α -aminoadípico y que el átomo de nitrógeno del ácido α -aminoadípico provenía del ácido pipercolico. Por lo tanto, los resultados obtenidos determinaron que el ácido pipercolico producido por los mutantes de *A. nidulans* procedía principalmente del ácido α -aminoadípico.

Es interesante resaltar, que la primera y única evidencia descrita en hongos filamentosos de que el ácido pipecólico deriva de la ruta biosintética de lisina, específicamente del ácido α -aminoadípico, procede del trabajo inicial de Aspen y Meister, (1962).

- ***Rhodotorula glutinis***

La biosíntesis de lisina en *Rhodotorula glutinis*, una levadura roja aeróbica obligada, se lleva a cabo a través de la ruta del α -aminoadípico como ocurre en levaduras y otros hongos filamentosos (Broquist, 1971). Kurtz y Bhattacharjee (1975), demostraron que algunos mutantes auxótrofos de lisina de *R. glutinis* podían crecer en medio mínimo suplementado con ácido pipecólico, sugiriendo la importancia nutricional del ácido pipecólico en este microorganismo. Además, demostraron en la cepa silvestre de *R. glutinis* que el ácido pipecólico se convierte en α -aminoadipato- δ -semialdehído. Por otro lado, Kurtz y Bhattacharjee (1975) también demostraron que en *S. cerevisiae*, a diferencia de los resultados obtenidos en *R. glutinis*, el ácido pipecólico no jugaba ningún papel en la biosíntesis de lisina.

Posteriormente, Kinzel y Bhattacharjee (1979), presentaron por primera vez evidencias genéticas y bioquímicas de los pasos específicos implicados en la ruta de conversión de ácido pipecólico en lisina en *R. glutinis*, demostrando que el ácido pipecólico se convertía en lisina vía α -aminoadipato- δ -semialdehído y sacaropina (Fig. 7B). Así mismo, determinaron que, en presencia de la pipecolato reductasa, el ácido pipecólico se convertía en α -aminoadipato- δ -semialdehído (en equilibrio con el P6C), un intermediario de la ruta del ácido α -aminoadípico para la formación de lisina. Además, demostraron que la reacción llevada a cabo por la pipecolato oxidasa no requería ningún cofactor externo y el producto de su reacción, el α -aminoadipato- δ -semialdehído, se convertía enzimáticamente en sacaropina y lisina. Por otro lado, Kinzel y Bhattacharjee (1979), concluyeron que el ácido pipecólico era un precursor circunstancial de lisina en *R. glutinis* y que éste no era un intermediario de la ruta biosintética de lisina.

Posteriormente, Kinzel y Bhattacharjee (1982), describieron por primera vez la purificación parcial y las propiedades de la pipecolato oxidasa de *R. glutinis*. La pipecolato oxidasa de *R. glutinis* presenta un peso molecular aproximado de 43 kDa, se caracteriza por ser soluble y tener un grupo sulfhidrilo esencial para su actividad. La detección de peróxido de hidrógeno indicó que la reacción de oxidación podía ser escrita como se indica a continuación: ácido pipecólico + O₂ → α -aminoadipato- δ -semialdehído + H₂O₂. Además, la capacidad que tiene la enzima purificada de oxidar el ácido pipecólico *in vitro* indicaba que, a diferencia de la pipecolato oxidasa de *Pseudomonas*, no requería de aceptores de electrones internos o de una cadena transportadora de electrones.

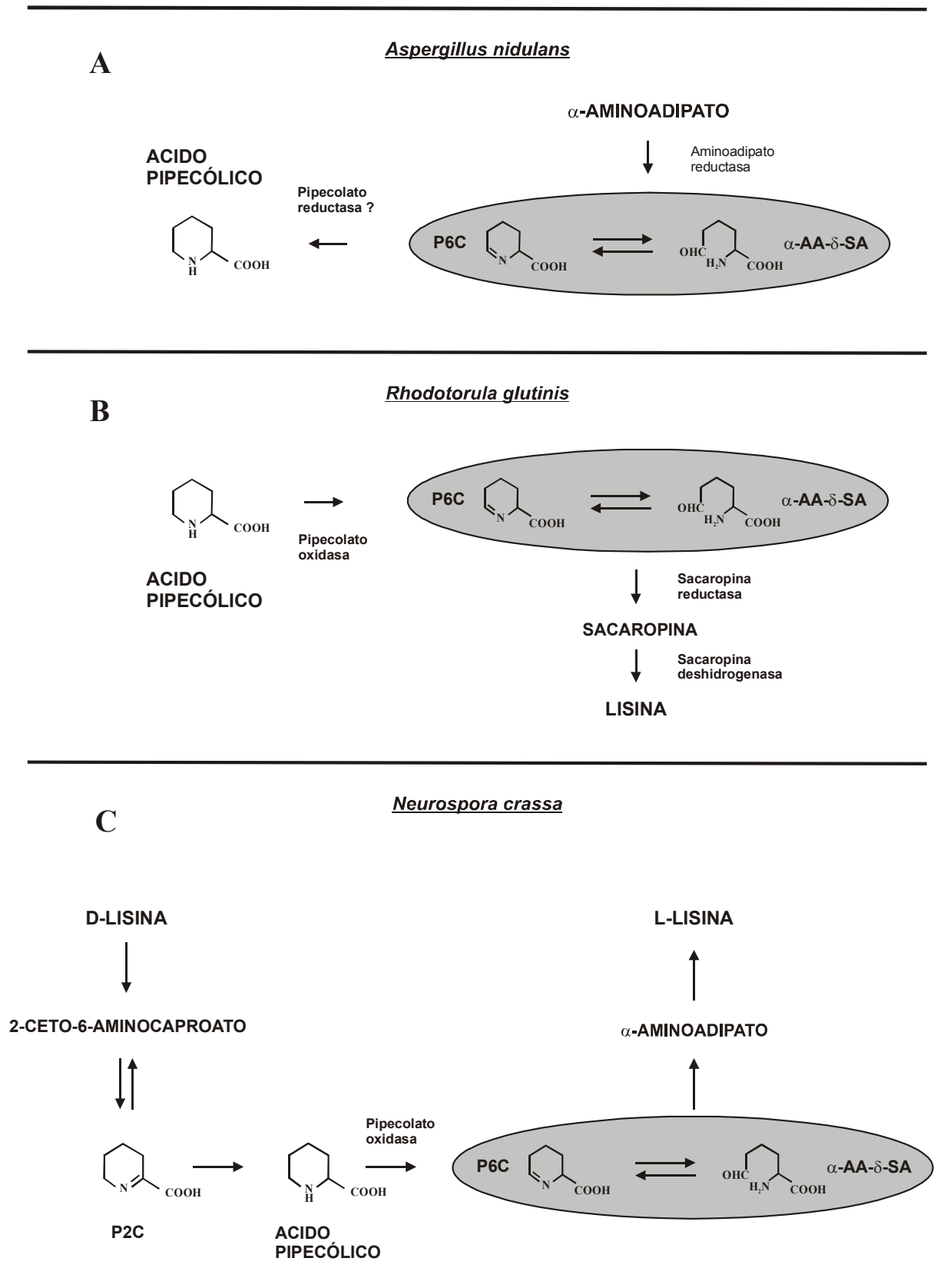


Fig. 7. El ácido piperidínico y su relación con el metabolismo de lisina en hongos filamentosos y levaduras: (A) *Aspergillus nidulans* (Aspen y Meister, 1962); (B) *Rhodotorula glutinis* (Kinzel y Bhattacharjee, 1979; 1982) y en (C) *Neurospora crassa* (Fangmeier y Leistner, 1980). α -AA- δ -SA: α -aminoadipato- δ -semialdehído; P6C: ácido piperidín-6-carboxílico; P2C: ácido piperidín-2-carboxílico.

Aunque para ese momento se había descrito que el ácido pipecólico estaba implicado en la biosíntesis de lisina en *A. nidulans* y en el alga *E. gracilis*, las bases bioquímicas, genéticas y enzimáticas de la conversión de ácido pipecólico en lisina solamente se habían determinado en *R. glutinis*.

- ***Neurospora crassa***

En *Neurospora crassa*, Schweet *et al.* (1954), inicialmente describieron que el ácido pipecólico era un catabolito de L-lisina. Posteriormente, Müller y Leistner (1975), propusieron una ruta en la cual indicaban que la D-lisina y el P2C eran respectivamente los precursores del ácido pipecólico en este hongo filamentoso (Fig. 7C).

Sin embargo, Fangmeier y Leistner (1980), llevaron a cabo estudios cinéticos para dilucidar la contribución relativa de D y L-lisina en la biosíntesis de ácido pipecólico en *N. crassa*. Los resultados obtenidos por Fangmeier y Leistner (1980) demostraron claramente que la D-lisina y no la L-lisina era el precursor del ácido pipecólico en este microorganismo y que el ácido pipecólico era un intermediario en la conversión de D-lisina a L-lisina. Por otro lado, en mutantes de *N. crassa* observaron que el ácido pipecólico no era degradado, a diferencia de mutantes de otros organismos donde se había demostrado que se oxidaba.

- ***Metarhizium anisopliae* y *Rhizoctonia leguminicola***

El interés de estudiar el metabolismo de lisina y del ácido pipecólico en *Metarhizium anisopliae* y el hongo parásito *Rhizoctonia leguminicola*, se basa en que estos aminoácidos están implicados en la biosíntesis de alcaloides octahidroindolizínicos en estos microorganismos (Sim y Perry, 1997; Wickwire *et al.*, 1990a; b). A diferencia de *N. crassa*, donde la D-lisina es el precursor del ácido pipecólico (Fangmeier y Leistner, 1980), se ha descrito que en *M. anisopliae* y *R. leguminicola* la L-lisina es el precursor en la biosíntesis de ácido pipecólico (Wickwire *et al.*, 1990a; Guengerich y Broquist, 1973; Sim y Perry, 1997).

En estos hongos filamentosos, el ácido pipecólico es un producto del catabolismo de lisina y un precursor inmediato para la formación de alcaloides octahidroindolizínicos tales como: la slaframina (1S,6S,8aS-1-acetoxi-6-aminooctahidroindolizina) y la swainsonina (1,2,8-trihidroxi octahidroindolizina), tal como muestra la Figura 8.

La slaframina es un alcaloide con actividad parasimpatomimética, mientras que la swainsonina es un potente inhibidor de α -manosidasas que tiene una importante actividad antitumoral y es usado como agente quimioterapéutico en pacientes con cáncer (Sim y Perry, 1997; Goss *et al.*, 1995; Dennis *et al.*, 1990; Dennis, 1986; Humphries *et al.*, 1986). Mientras que *R. leguminicola* es capaz de sintetizar ambos alcaloides, *M. anisopliae* solamente es capaz de producir swainsonina.

Los resultados obtenidos por Wickwire *et al.* (1990a, b) demostraron que en *R. leguminicola* el P6C se forma a partir del catabolismo de L-lisina; además, el P6C es el precursor inmediato del ácido piperólico. Experimentos biológicos, bioquímicos y la identificación de los productos de las reacciones por espectrometría de masas o RMN, permitieron determinar inequívocamente que el P6C, y no el P2C, se encuentra implicado en la conversión de L-lisina en ácido piperólico en *R. leguminicola*. Por otro lado, Wickwire *et al.* (1990a, b) también demostraron en *R. leguminicola* que la conversión de sacaropina en P6C no era catalizada por la acción de una sacaropina reductasa dependiente de NADP como se esperaba, sino, que se llevaba a cabo por acción de una flavo-enzima no descrita anteriormente a la que denominaron sacaropina oxidasa. La reacción llevada a cabo por la sacaropina oxidasa se resume a continuación: Sacaropina + O₂ → P6C + Glutamato + H₂O₂.

Metarhizium anisopliae* y *Rhizoctonia leguminicola

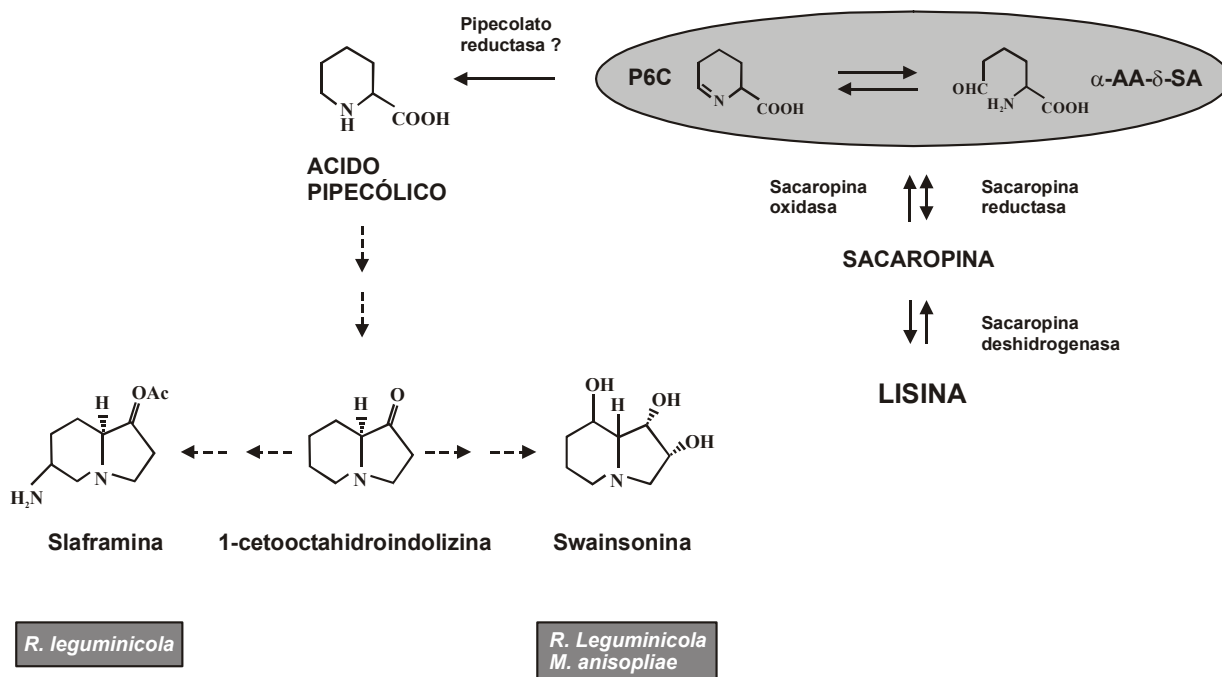


Fig. 8. En los hongos filamentosos *Rhizoctonia leguminicola* y *Metarhizium anisopliae*, el ácido piperólico deriva del catabolismo de lisina y es un precursor inmediato para la síntesis de alcaloides octahidroindolizínicos (Wickwire *et al.*, 1990a, b; Sim y Perry, 1997). Mientras que *R. leguminicola* es capaz de sintetizar ambos alcaloides, *M. anisopliae* solamente es capaz de producir swainsonina, un metabolito secundario que tiene una potente actividad antitumoral. α-AA-δ-SA: α-aminoadipato-δ-semialdehído; P6C: ácido piperideín-6-carboxílico.

8. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DEL ÁCIDO PIPECÓLICO

A continuación se describen algunas aplicaciones biotecnológicas que se pueden obtener de este importante compuesto:

- **Obtención de Ácido Pipecólico y Sus Derivados por Biotransformación**

La industria química fina (*Fine Chemicals Industry*) ha tenido un gran auge durante los últimos años. La manufactura de sustancias químicas puras es cada vez mayor, sobre todo en el área biofarmacéutica y de la agricultura. Algunos indicativos señalan que en el año 2001 las ventas de los productos originados de la química fina alcanzaron dividendos que sobrepasaron los de 52 billones de dólares (Stinson, 2000). Sin embargo, según la Corporación Internacional de Tecnología Catalítica (*Technology Catalysts International Corp.*; TCI), se estima que las ventas de productos químicos finos para el año 2003 alcanzarán los 146 billones de dólares (Stinson, 2001).

Mercian's y Lonza, entre otras, son dos compañías farmacéuticas que se dedican a manufacturar químicos finos, tal como: ácido pipecólico. El proceso de obtención de ácido pipecólico que emplea la compañía Mercian's es un claro ejemplo del poder enantioselectivo de las bacterias. Este proceso se basa en utilizar una cepa recombinante de *E. coli* y L-lisina como iniciador para llevar a cabo la biotransformación de L-lisina a ácido pipecólico. Para lo cual, Fujii *et al.* (2002a), insertaron en *E. coli* JM109 el gen *lat* de *Flavobacterium lutescens* que codifica la L-lisina-6-aminotransferasa (LAT) descrito previamente por Fujii *et al.* (2000). En este sistema, la LAT convierte L-lisina en P6C y éste se reduce a ácido pipecólico por acción de la P5C reductasa presente en el genoma de la bacteria. Los resultados obtenidos por Fujii *et al.* (2002a), demostraron que ambas enzimas son necesarias para llevar a cabo la bioconversión de L-lisina a ácido pipecólico en *E. coli*. Por otro lado, el proceso de obtención de ácido pipecólico que emplea la compañía Lonza, consiste en utilizar picolinonitrilo como iniciador de la biotransformación, el cual, se convierte sucesivamente en picolinamida, pipecolamida racémico y finalmente en ácido pipecólico. El método usado en el último paso de la conversión es la fermentación con especies de *Pseudomonas*.

Un aspecto que se debe considerar se refiere al desarrollo del denominado "*P6C World*" usando biotransformación (Asano y Ito, 2002). Aunque la actividad enzimática implicada en la reducción de P6C a ácido pipecólico ha sido encontrada en varios microorganismos, no se ha podido caracterizar la enzima que cataliza dicha conversión, ya que su sustrato, el P6C, es un compuesto químicamente inestable (Fujii *et al.*, 2002a). Sin embargo, la compañía farmacológica Mercian's (Fujii *et al.*, 2002a; Asano y Ito, 2002) actualmente esta explorando el "*P6C World*" y obteniendo una colección de productos químicos útiles para la farmacología derivados del P6C usando biotransformación, entre dichos productos se encuentran: el ácido α -aminoadípico y ácido pipecólico (Fig. 9).

P. chrysogenum, posee una vía de biosíntesis de α -aminoadípico muy activa, ya que este compuesto es un precursor esencial de la penicilina. Aunque se conoce que cepas de *P. chrysogenum* interrumpidas en el gen *lys2* que codifica la α -aminoadipato reductasa acumulan niveles altos de ácido α -aminoadípico (Casqueiro *et al.*, 1999b; 2001; 2002), se desconoce totalmente si *P. chrysogenum* tiene la capacidad de acumular P6C o de sintetizar ácido piperólico.

Exploración del "P6C World"

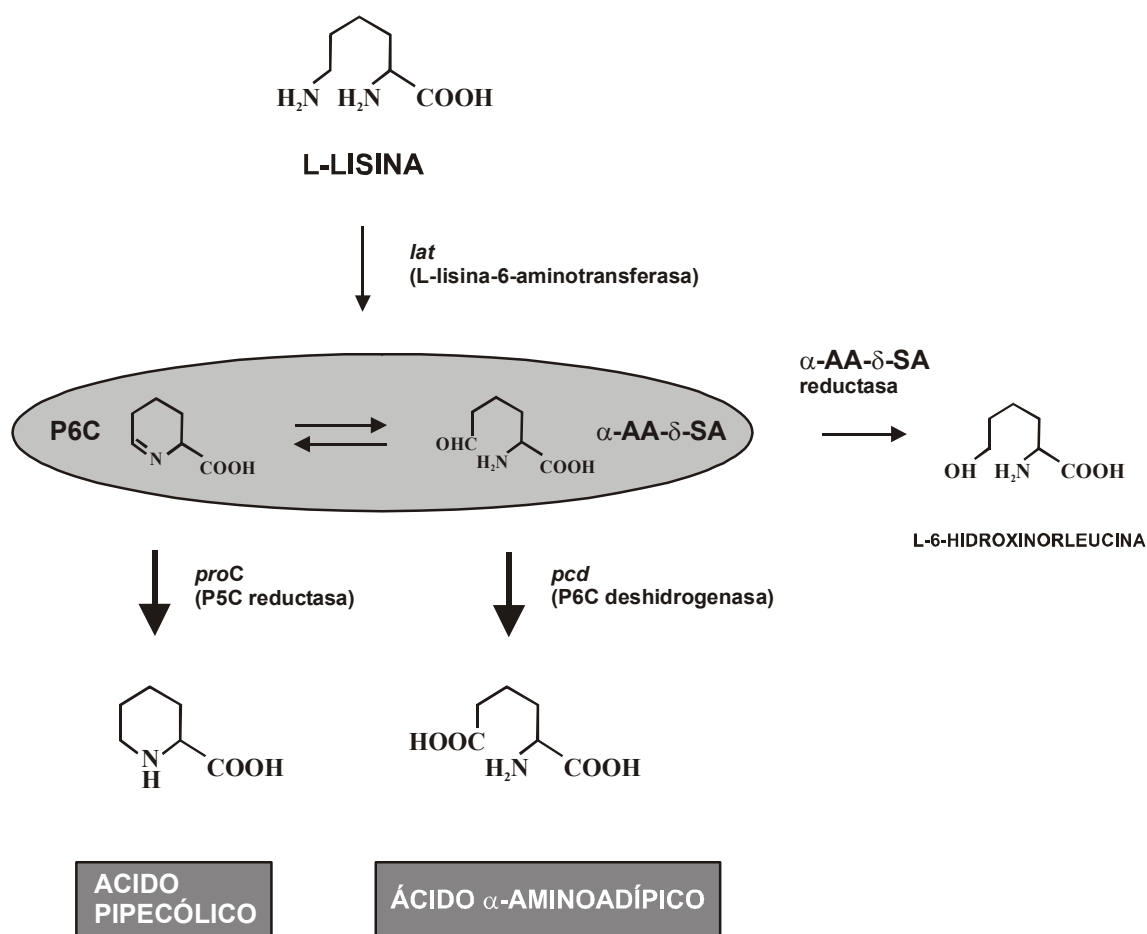


Fig. 9. Exploración del "P6C World" usando biotransformación (Asano y Ito, 2002). α -AA- δ -SA: α -aminoadipato- δ -semialdehído; P6C: ácido piperidein-6-carboxílico; *lat*: gen que codifica la L-lisina-6-aminotransferasa de *Flavobacterium lutescens* IFO3084, que convierte L-lisina en P6C; *proC*: gen que codifica la P5C reductasa, enzima que cataliza la reducción de P5C a L-prolina en diversos organismos; *pcd*: gen que codifica la P6C deshidrogenasa de *F. lutescens* IFO3084, enzima que convierte α -aminoadipato- δ -semialdehído en ácido α -aminoadípico.

- **El Ácido Pipecólico como Osmoprotector**

Osmoprotectores son aquellos compuestos que son capaces de optimizar el crecimiento celular bajo condiciones inhibitorias de osmolaridad. Los mecanismos de osmoregulación son muy similares en todos los organismos vivos, incluyendo plantas, animales y bacterias. En respuesta a la elevada osmolaridad del ambiente, ellos acumulan concentraciones intracelulares relativamente altas de iones inorgánicos y solutos compatibles. Los solutos compatibles son moléculas orgánicas de bajo peso molecular recién sintetizadas, entre los se encuentra el ácido pipecólico. Luego de haber disminuido la osmolaridad ambiental, los compuestos compatibles pueden ser liberados al ambiente y subsecuentemente ser utilizados como osmoprotectores por otros organismos que se encuentren bajo estrés hiperosmótico (Gouffi *et al.*, 2000; Bayles y Wilkinson, 2000).

En plantas, se ha descrito que el ácido pipecólico y sus derivados están relacionados con la adaptación osmótica en algunas leguminosas y especies xerófitas que se desarrollan en hábitats secos y alcalinos, sometidas a altas temperaturas y a severas y prolongadas épocas de sequía (Stewart y Larher, 1980; Romeo, 1998). En bacterias, la capacidad osmoprotectora de ácido pipecólico ha sido solamente estudiada en *E. coli* (Gouesbet *et al.*, 1994) y *Sinorhizobium meliloti* (Gouffi *et al.*, 2000), donde se ha demostrado que la osmoprotección de las células al estrés salino solamente es efectivo cuando están presentes los dos isómeros del ácido pipecólico, mientras, que otros estudios señalan que es preferible usar un solo enantiómero de la molécula como osmoprotector. Se desconoce si en *P. chrysogenum* el ácido pipecólico actúa como osmoprotector bajo condiciones inhibitorias de osmolaridad.

- **El Ácido Pipecólico como Precursor de Alcaloides Octahidroindolizínicos**

Se ha mencionado anteriormente que el ácido pipecólico es un intermediario del catabolismo de lisina en hongos filamentosos (Fig. 8). En *R. leguminicola* y *M. anisopliae* se ha descrito que el ácido pipecólico es un precursor inmediato en la síntesis de alcaloides octahidroindolizínicos (Sim y Perry, 1997; Wickwire *et al.*, 1990a; b). Estos alcaloides tienen interesantes aplicaciones en el campo de la salud humana, como la swainsonina, que tiene una potente actividad antitumoral ya que se ha demostrado experimentalmente que inhibe la tasa de crecimiento de melanomas y metástasis humanos produciendo una mínima toxicidad cuando es administrada en pacientes con cáncer (Sim y Perry, 1997; Goss *et al.*, 1995; Dennis *et al.*, 1990; Dennis, 1986; Humphries *et al.*, 1986).

En estos hongos filamentosos, el catabolismo de lisina procede vía sacaropina. Se ha observado que la adición de L-lisina a los caldos de cultivo de *M. anisopliae* incrementa significativamente la producción de swainsonina, lo cual, indica que modificaciones genéticas en la ruta biosintética de lisina podrían inducir un aumento de la síntesis de dicho alcaloide en este microorganismo. Con el objetivo de monitorizar el efecto que producen los cambios en las condiciones de cultivo o las

provocadas por modificaciones genéticas sobre la producción del metabolito secundario swainsonina, Sim y Perry (1997) desarrollaron métodos analíticos con los que es posible estudiar los niveles intracelulares de cada uno de los metabolitos precursores de la swainsonina: lisina, sacaropina, ácido α -aminoadípico y ácido pipercolico. Actualmente, también se desconoce si *P. chrysogenum* tiene la capacidad de sintetizar este tipo de compuestos.

- **El Ácido Pipercolico como Sustrato de Péptidos Sintetasas No-Ribosomales**

Los péptidos sintetasas no ribosomales son proteínas que están organizadas en unidades funcionales interactivas denominadas módulos, los cuales catalizan un conjunto de reacciones catalíticas que llevan a la formación de un péptido (Doekel y Marahiel, 2001). La arquitectura modular entre los péptidos sintetasas no ribosomales (NRPS) y los poliquétidos sintetasas (PKS) presenta una fuerte analogía. De hecho, ambos sistemas se han encontrado combinados de manera natural (NRPS-PKS), representando biofactorías que permiten obtener una diversidad estructural enormemente extendida de productos naturales (Cane y Walsh, 1999).

La primera mezcla NRPS-PKS fue identificada en la agrupación de genes biosintéticos de rapamicina en *Streptomyces hydroscopius* (Schwecke *et al.*, 1995; Molnar *et al.*, 1996). Esta mezcla NRPS-PKS consiste en un módulo de NRPS para la incorporación de ácido pipercolico integrada en un PKS. Una organización análoga ha sido encontrada en la agrupación de genes biosintéticos de FK506 en *Streptomyces* sp. MA6548 (Motamedi y Shafiee, 1998).

Se ha descrito que *S. hydroscopius* es capaz de sintetizar ácido pipercolico a partir de L-lisina (Paiva *et al.*, 1993). Además, se ha descrito en este microorganismo que el ácido pipercolico es un precursor de la rapamicina (Molnar *et al.*, 1996; Cheng y Demain 1995). La adición de L-lisina a los caldos de cultivo de *S. hydroscopius* incrementa la producción de rapamicina en un 150 %, lo cual, puede ser debido a su conversión en ácido pipercolico. En la actualidad, el ácido pipercolico se utiliza como sustrato de algunas PKS en *S. hydroscopius* con los que se obtienen metabolitos secundarios (análogos de la rapamicina) con nuevas o incrementadas actividades farmacológicas, tales como: inmunosupresores, antitumorales y antifúngicos (Reynolds y Demain, 1997).

Por otro lado, Nielsen *et al.* (1991), han descrito en *S. hydroscopius* var. *ascomyeticus* una enzima que activa ácido pipercolico que se encuentra implicada en la biosíntesis de la inmunomicina, un inmunosupresor relacionado con FK506 en este microorganismo.

En los últimos años se ha incrementado el número de secuencias descritas de NRPS. Basados en estos datos y en estudios bioquímicos avanzados, se puede obtener una sólida interpretación sobre los principios básicos de organización y arquitectura de los NRPS. El potencial de la maquinaria biosintética se ha visto desarrollado por la reciente identificación de dominios enzimáticos integrados (Doekel y Marahiel, 2001). El estudio del principio de los mecanismos que integran los NRPS podría

permitir la modificación racional de sus multi-dominios, lo cual, abriría un camino lleno de posibilidades para “rediseñar” productos naturales existentes y ampliar la complejidad química que nos ofrece la naturaleza (Doekel y Marahiel, 2001). Todo ello, permitiría enriquecer las alternativas terapéuticas actuales en la lucha contra las enfermedades en general.

P. chrysogenum posee una ruta de lisina altamente activa a través de la cual suministra ácido α -aminoadípico para la biosíntesis del tripéptido no ribosomal δ (-L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (Casqueiro *et al.*, 1999b; Martín, 2000; Bañuelos *et al.*, 2002). La enzima que cataliza esta reacción es la ACV sintetasa y está codificada por el gen *pcbAB* (Díez *et al.*, 1990, Smith *et al.*, 1990; Mac Cabe *et al.*, 1991; Gutiérrez *et al.*, 1991b; Coque *et al.*, 1991).

Finalmente, debido a lo mencionado en los párrafos anteriores, podemos concluir que es altamente viable la posibilidad de usar *P. chrysogenum* como una biofactoria para producir metabolitos secundarios que contengan ácido pipecólico con nuevas e interesantes propiedades farmacológicas. En *P. chrysogenum*, se podría plantear el diseño de un nuevo péptido no ribosomal híbrido, que consistiría en la sustitución del módulo para la incorporación del ácido α -aminoadípico (A) en el extremo amino del tripéptido ACV (5' del gen *pcbAB*), por un módulo para la incorporación de ácido pipecólico (P). Sin embargo, para poder llevar a cabo el funcionamiento del hipotético péptido no ribosomal híbrido (PCV), se hace estrictamente necesario: (i) en primer lugar, caracterizar detalladamente el metabolismo del ácido pipecólico en *P. chrysogenum* y, (ii) en segundo lugar, obtener una cepa recombinante que pueda suministrar ácido pipecólico para la biosíntesis del hipotético péptido híbrido PCV, es decir, que tenga la capacidad de sintetizar ácido pipecólico.

9. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Como se ha mencionado anteriormente, el ácido piperídico es un iminoácido que está relacionado con el metabolismo de lisina en diversos organismos. Además, el ácido piperídico tiene una importancia trascendental en la industria farmacológica y en el campo de la salud humana, ya que es un componente y un precursor importante de numerosos metabolitos secundarios de microorganismos y plantas tales como: inmunosupresores, péptidos no-ribosomales, poliquétidos y alcaloides.

P. chrysogenum es un microorganismo utilizado industrialmente para la producción de penicilina y en el que, por tanto, las técnicas de fermentación están muy desarrolladas. En *P. chrysogenum*, la ruta biosintética de lisina está a su vez estrechamente relacionada con la ruta de biosíntesis de penicilina. Existen numerosas evidencias de que ciertos organismos son capaces de metabolizar ácido piperídico; sin embargo, el papel que desempeña este iminoácido en *P. chrysogenum* es absolutamente desconocido. Por lo tanto, en el presente Proyecto de Investigación Científica, se decidió estudiar el metabolismo del ácido piperídico en este hongo filamentoso de significativa importancia industrial.

Esta memoria reúne una serie de experimentos cuya realización tuvo como objetivo general:

Conocer el metabolismo del ácido piperídico en *P. chrysogenum*.

Para poder llevarlo a cabo, nos propusimos desarrollar los siguientes objetivos específicos:

- 1. Obtener mutantes de *P. chrysogenum* auxótrofos de lisina y que no sean capaces de crecer con ácido piperídico (mutantes *lys⁻/pip⁻*).**
- 2. Caracterizar bioquímicamente de los mutantes *lys⁻/pip⁻* 10.25 y 7.2 para estudiar la conversión de ácido piperídico en lisina en *P. chrysogenum*.**
- 3. Clonar y caracterizar el gen que complementa la mutación *pip⁻* de *P. chrysogenum* 10.25.**
- 4. Interrumpir dicho gen en *P. chrysogenum*.**
- 5. Conocer el efecto de la interrupción sobre la producción de penicilina, la conversión de ácido piperídico en lisina y la síntesis de ácido piperídico en *P. chrysogenum*.**
- 6. Caracterizar la biosíntesis de ácido piperídico en *P. chrysogenum*.**

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 la obtención de células competentes con alta 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 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* DH10B**. Cepa empleada para experimentos de electroporación y permite recuperar plásmidos de gran tamaño a partir del ADN genómico de *P. chrysogenum*. Genotipo: *deoR endA1 gyrA96 recA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) relA1 supE44 thi-1 Δ (*lacZYA-argFV169*) f80 δ *lacZDM15*.*
- ***Escherichia coli* WK6 mutS**. Cepa empleada para la obtención de ADN circular monocatenario a partir de plásmidos bicatenarios que posean el origen de replicación del bacteriófago M13. Genotipo: F' *lacI*^q*ZDM15 proA+B+ galE strA Δ (lac-proAB) mutS215::Tn10*.
- ***Escherichia coli* LE392**. Cepa susceptible de ser infectada por el bacteriófago lambda y sus derivados. Se utiliza en la amplificación de librerías genómicas construidas en vectores de sustitución derivados del fago lambda. Genotipo: F' *hsdR514 (r_k m_k⁻) supE44 supF58 lacYlo(lacIZY) 6 galK2 galT22 metB1 trp55 λ ⁻*.
- ***Micrococcus luteus* ATCC 9341** (Álvarez *et al.*, 1987). Cepa sensible a la penicilina G. Se ha utilizado para la valoración de dicho antibiótico mediante bioensayo.

1.2. Cepas fúngicas:

- ***Penicillium chrysogenum* NRRL1951**. Cepa silvestre aislada de un melón en Peoria, Illinois. (Raper *et al.*, 1944; Raper, 1978; Normansell *et al.*, 1979).
- ***Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255**. Cepa de baja producción de penicilina (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Posee una sola copia de la agrupación de genes biosintéticos de penicilina. Cepa de referencia en muchos laboratorios, obtenida por mutación y selección de la cepa *P. chrysogenum* NRRL1951.

Cedida por el Dr. A.L. Demain (Luengo *et al.*, 1979; López-Nieto *et al.*, 1985; Cantoral *et al.*, 1987; 1993; Díez *et al.*, 1987; Fierro *et al.*, 1995).

- ***Penicillium chrysogenum* AS-P-99**. Cepa de alta producción de penicilina. Cedida por Antibióticos S.A.U. (Bañuelos *et al.*, 1999b).
- ***Penicillium chrysogenum* HS⁻**. Cepa auxótrofa de lisina obtenida por interrupción del gen *lys1* de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (Bañuelos *et al.*, 2002).
- ***Penicillium chrysogenum* TDX195**. Cepa auxótrofa de lisina obtenida por interrupción del gen *lys2* de la cepa Wisconsin 54-1255 *pyrG⁻* (auxótrofa de uridina) (Casqueiro *et al.*, 1999b).
- ***Penicillium chrysogenum* L2**. Cepa auxótrofa de lisina bloqueada en la primera parte de la ruta del ácido α -aminoadípico, obtenida por mutación con etilmetano-sulfonato y defectuosa en la homoaconitasa (Luengo *et al.*, 1980; Teves *et al.*, 2003).

2. VECTORES PLASMÍDICOS Y LIBRERÍA GENÓMICA

- **pBluescript (KS/SK) (+/-)** (2,964 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 ampicilina que permite su selección en el hospedador y un fragmento del gen *lacZ* de *E. coli* 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 (isopropiltiogalactósido, 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 dentro del gen *lacZ* se encuentra un sitio múltiple de clonación (MCS), 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 cuales dependen de: (i) la dirección del origen de replicación f1 (+ o -; lo que determina cual de las dos hebras monocatenarias se obtendrá al infectar con el fago M13KO7) y, (ii) de la orientación de los sitios de corte en el sitio de clonación KS ó SK (Fig. 1A).
- **pBC** (3,399 kb): Plásmido de similares características al pBluescript, salvo en que el gen de resistencia a ampicilina se ha sustituido por un gen de resistencia a cloranfenicol.
- **pAMPF9L** (7,5 kb): Plásmido funcional tanto en *P. chrysogenum* como en *E. coli*, construido en nuestro laboratorio por Fierro *et al.* (1996). Es un derivado del pBC KS+, contiene el brazo izquierdo

del fragmento *AMA1* de *Aspergillus nidulans* lo que le confiere la capacidad de replicarse autónomamente en *Penicillium* y posee el ColE1 que le confiere la capacidad de replicación en *E. coli*. Además, porta el gen *pyrG* de *P. chrysogenum* como marcador de transformación en cepas fúngicas *pyrG*⁻ auxótrofas de uridina (Fig. 1D).

- **LIBRERÍA GENÓMICA DE *P. chrysogenum* AS-P-78:** La librería genómica utilizada en este trabajo de investigación fue construida en nuestro laboratorio por Bañuelos O. La cepa *P. chrysogenum* AS-P-78 se caracteriza por ser de alta producción y presentar la agrupación de genes biosintéticos de penicilina repetida en tandem hasta 7 veces (Fierro *et al.*, 1993). Para construir la librería genómica, el ADN genómico de *P. chrysogenum* AS-P-78 se digirió parcialmente con *Sau3AI* y se ligó en el sitio *BglIII* de pAMPF9L. Los fragmentos de ADN *Sau3AI* se fraccionaron previamente en gradientes de sacarosa para seleccionar el tamaño óptimo del ADN (entre 4 y 6 kb). Para que una librería genómica se considere representativa, debe existir un número de clones igual o mayor al calculado teóricamente mediante la fórmula siguiente: $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$; donde: *N*, es el número mínimo de clones que debe existir para que en la genoteca esté representado todo el genoma del organismo; *P*, es la probabilidad de que un conjunto de *N* clones contenga un fragmento de un tamaño medio determinado y, *f*, es el cociente entre el tamaño del inserto y el tamaño del genoma dado en pares de bases.

Siendo el tamaño del genoma de *P. chrysogenum* ASP-78 de aproximadamente 25 Mb (Fierro *et al.*, 1993) y el tamaño medio del inserto de 5,35 kb, para que un fragmento de ADN de dicho tamaño tenga una probabilidad de estar representado al menos una vez (*P* = 0,99) en la genoteca, se debe obtener un número mínimo de clones (*N*) de 43.894. Como la genoteca es producto de la unión de varias genotecas parciales, se determinó que el porcentaje de recombinantes totales era del 78,5 %; por tanto, la librería genómica de *P. chrysogenum* ASP-78 empleada poseía un total de 44.803 clones recombinantes (Bañuelos, comunicación personal).

- **pLARA** (10,6 kb): Plásmido de replicación autónoma derivado del pAMPF9L, contiene el gen *lys1* bajo el control de su propio promotor (Bañuelos *et al.*, 2000) (Fig. 1B).
- **pC43** (4,9 kb): Plásmido integrativo construido a partir de un pBC KS⁺, contiene un casete de resistencia a la fleomicina como marcador de selección. En el policonector de este vector se encuentra el gen *ble* de *Streptoalloteicus hindustanus* bajo el control del promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* y el terminador CYC1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 1C). La expresión de este gen confiere resistencia a fleomicina a las células fúngicas hospedadoras (Gutiérrez *et al.*, 1999).

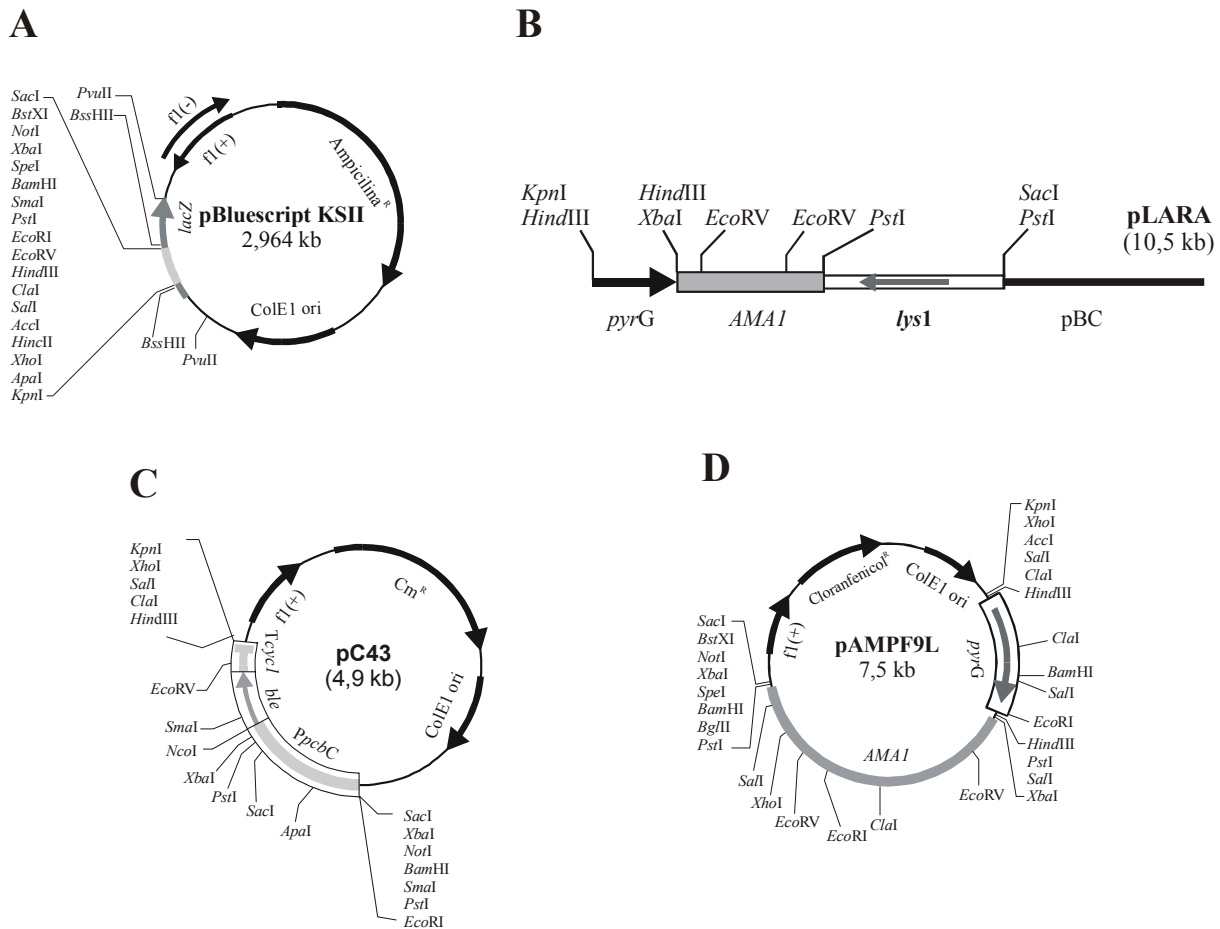


Fig. 1. Mapas de restricción de los plásmidos pBluescript KS II (A), pLARA (B), pC43 (C) y pAMPF9L (D).

3. CONSTRUCCIONES DE LOS PRINCIPALES PLÁSMIDOS UTILIZADOS

Para la realización del presente trabajo de investigación se llevaron a cabo diversas construcciones plasmídicas. A continuación se describen los principales plásmidos utilizados:

3.1. Construcción del plásmido p10PB (8,16 kb):

Esta construcción se realizó con la finalidad de facilitar el mapeo de restricción del fragmento de ADN clonado de 6 kb clonado en el plásmido de replicación autónoma p10T1. Dicho plásmido proviene de la librería genómica de *P. chrysogenum* y fue rescatado del ADN genómico del transformante T1 (descrito en el Capítulo I, apartado 5.2 de *Resultados*).

El plásmido p10T1 contiene un inserto de ADN de 6 kb en el que se encuentra el gen *lys7* de la sacaropina reductasa y complementa la mutación *pip⁻* presente en la cepa *P. chrysogenum* 10.25. Para la construcción del plásmido p10PB se siguieron los siguientes pasos:

1. Se realizó un mapeo de restricción detallado del plásmido p10T1.
2. Se extrajo un fragmento *Bam*HI/*Pst*I de 5,2 kb del plásmido p10T1.
3. A continuación, el fragmento *Bam*HI/*Pst*I de 5,2 kb se ligó en un pBluescript SK+ previamente digerido *Bam*HI/*Pst*I. Al plásmido obtenido se le denominó p10PB (Fig. 2).

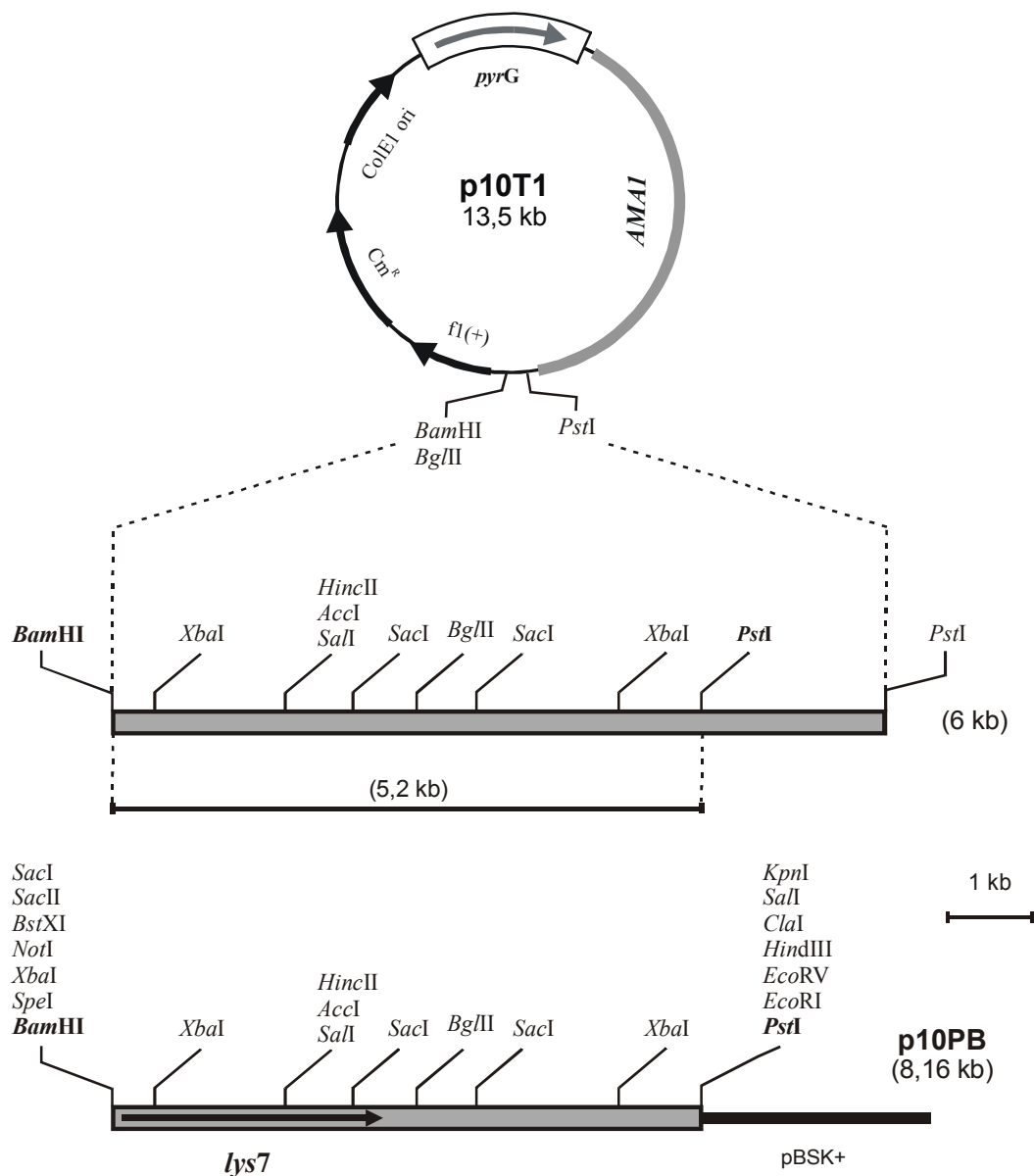


Fig. 2. Construcción del plásmido p10PB.

3.2. Construcción de los plásmidos p10BS y p10SB (5,16 kb):

Estas construcciones se realizaron a partir del plásmido p10PB con la finalidad de obtener clones de secuencia del inserto de ADN de 6 kb clonado en p10T1. El sistema utilizado para la obtención de clones fue el de *Erase-a-base* que se basa en la generación de deleciones unidireccionales de ADN (Promega Co., Madison, WI). Se siguieron los siguientes pasos:

1. Se extrajo un fragmento *SacI* de 2,2 kb del plásmido p10PB.
2. Posteriormente, se ligó el fragmento en un vector pBluescript SK+ digerido *SacI*.
3. Los plásmidos obtenidos se seleccionaron según la orientación del fragmento de ADN clonado, los cuales, se denominaron: p10BS y p10SB (Fig. 3).

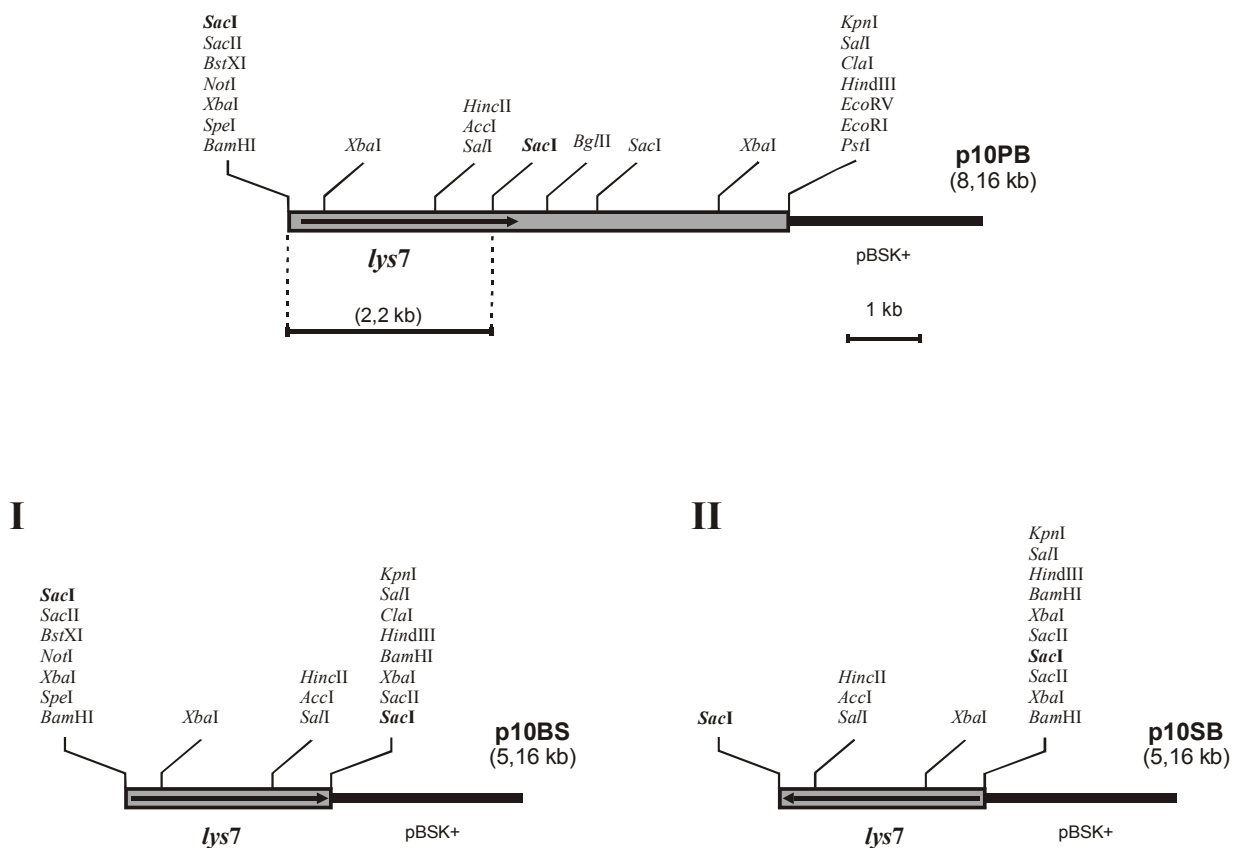


Fig. 3. Construcción de los plásmidos p10BS (I) y p10SB (II) a partir del plásmido p10PB.

3.3. Construcción del plásmido pF4L7 (18,96 kb):

Esta construcción se realizó con la finalidad de insertar un fragmento *NotI* de 16 kb en un vector de clonación pBluescript SK+ y facilitar su posterior manipulación. Dicho fragmento de ADN fue

clonado de una genoteca de ADN genómico de *P. chrysogenum* construida en el vector fágico λ EMBL3. La construcción se realizó como se detalla a continuación:

1. Se extrajo un fragmento *NotI* de 16 kb del Fago 4 purificado mediante el rastreo de una genoteca de ADN genómico utilizando como sonda un fragmento interno *BglIII* de 0,9 kb del gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa (descrito en el Capítulo II, apartado 1.1 de *Resultados*).

2. A continuación, el inserto *NotI* de 16 kb se ligó en el sitio *NotI* del vector pBluescript SK+. Al plásmido obtenido se le denominó pF4L7 (Fig. 4).

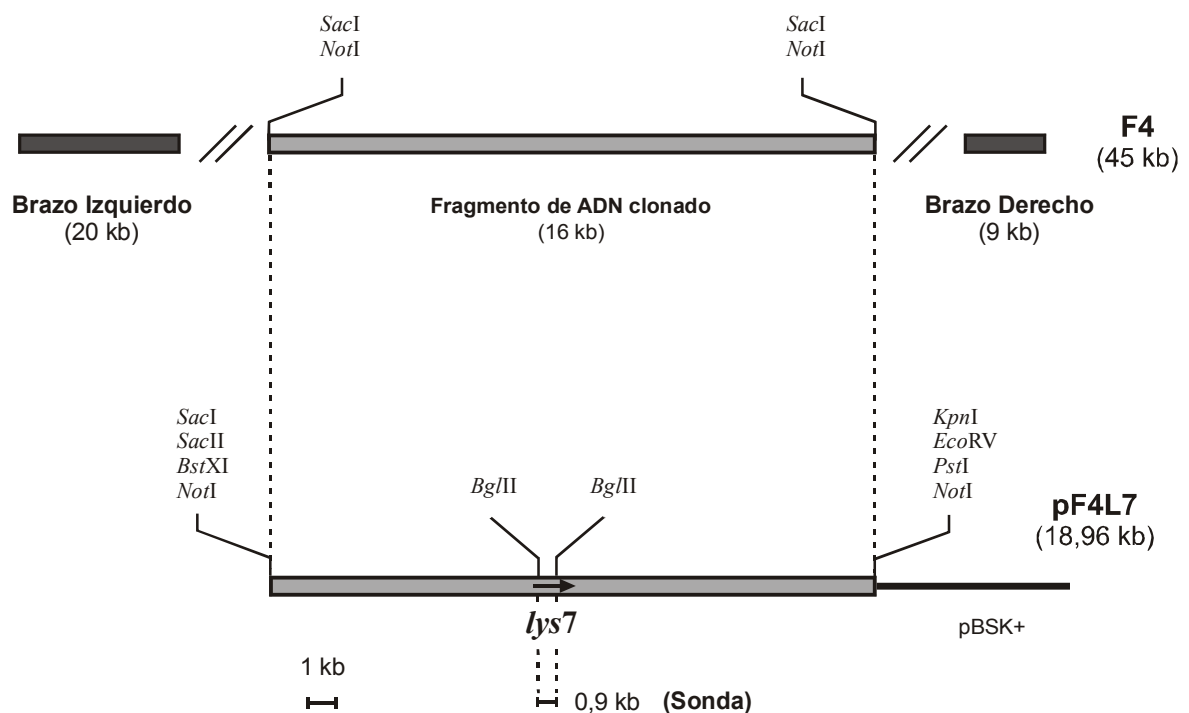


Fig. 4. Construcción del plásmido pF4L7.

3.4. Construcción del plásmido pDL7 (14,9 kb):

Esta construcción se llevó a cabo para interrumpir el gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum*. Se partió del plásmido pF4L7 (Fig. 4) que porta un fragmento de ADN genómico *NotI* de 16 kb que contiene el gen *lys7* y del plásmido pC43 (Fig. 1C) que porta el casete de resistencia a fleomicina como marcador de selección (descrito en el apartado 13.1 de *Materiales y Métodos*). Para la construcción del plásmido pDL7 se siguieron los siguientes pasos:

1. Se extrajo un fragmento de 5,9 kb *ClaI/BgIII^R* aguas arriba del gen *lys7* del plásmido pF4L7 (Fig. 4), y se ligó en el sitio *HindIII^R/ClaI* del plásmido pC43. El extremo *BgIII* del fragmento de 5,9 kb extraído del plásmido pF4L7 y el extremo *HindIII* del plásmido pC43 fueron rellenados previamente. Al plásmido resultante se le denominó pDL7-A.

2. A continuación, se extrajo un fragmento de 4,1 kb *BgIII^R/NotI* aguas abajo del gen *lys7* del plásmido pF4L7, y se ligó en el sitio *EcoRI^R/NotI* del plásmido pDL7-A. El extremo *BgIII* del fragmento de 4,1 kb proveniente del plásmido pF4L7 y el extremo *EcoRI* del plásmido pDL7-A fueron rellenados previamente. Al plásmido obtenido se le denominó pDL7 (Fig. 5).

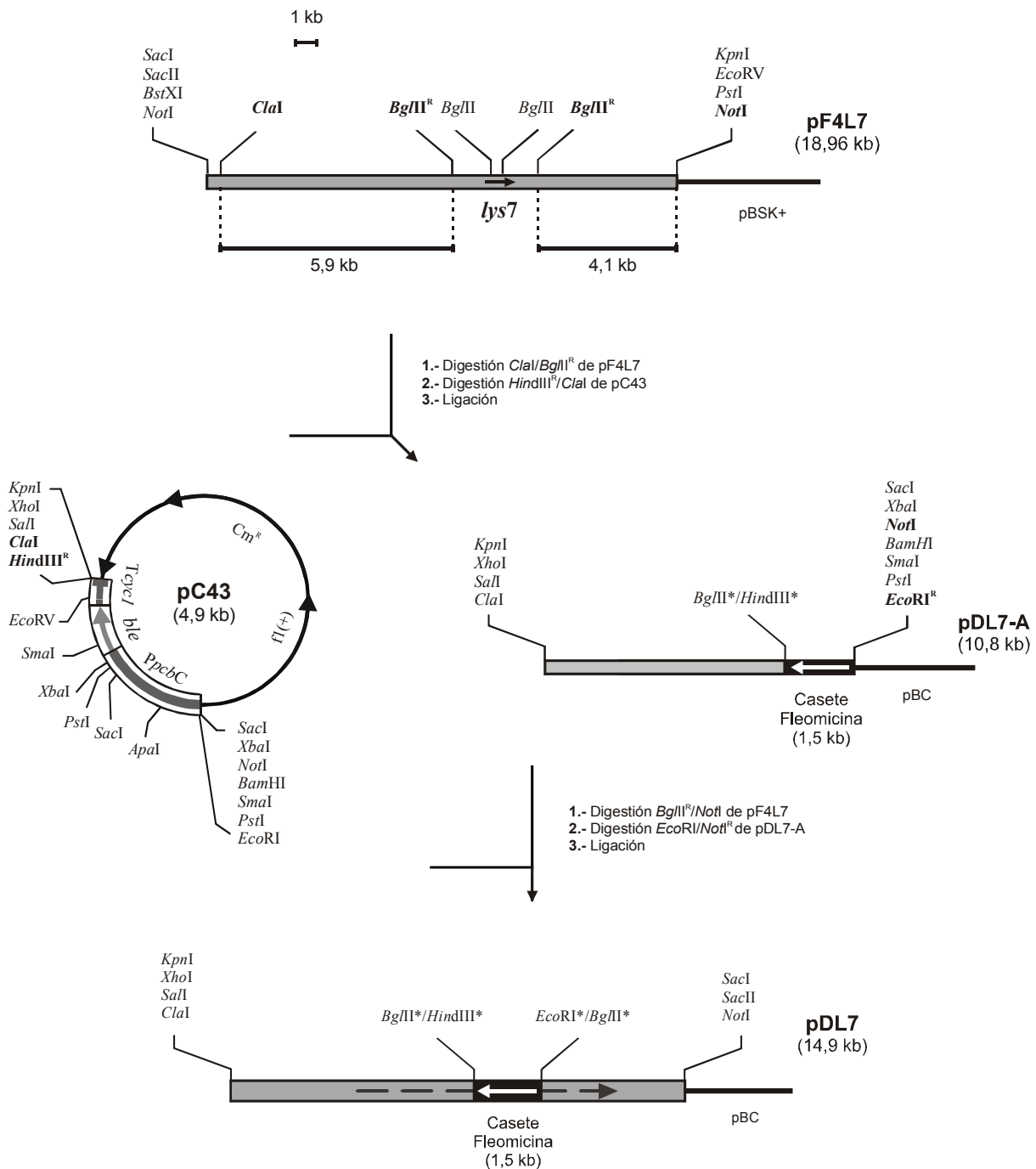


Fig. 5. Construcción del plásmido pDL7.

4. REACTIVOS QUÍMICOS

4.1. Reactivos químicos de uso general:

Los reactivos empleados para la realización de los experimentos presentados en esta memoria han sido adquiridos a las siguientes casas comerciales: Aldrich Chemie GmbH & Co. (Steinheim, Alemania), Amersham International (Reino Unido), Bethesda Research laboratories (California, USA), BioRad (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).

4.2. Oligonucleótidos:

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) fueron adquiridos a las casas comerciales Pharmacia o Sigma Chemical. Para la realización de reacciones de PCR estándar se han utilizado como cebadores oligonucleótidos entre 18 y 22 pb, fosforilados en su extremo 5' cuando se quiso clonar posteriormente el fragmento de ADN amplificado.

5. MEDIOS DE CULTIVO

5.1. Medios de cultivo para bacterias y bacteriófagos:

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

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	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
Agua destilada	0,9 litros

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

KH_2PO_4	170 mM
K_2HPO_4	720 mM

▪ **Medio NZY.** (Miller, 1972).

NZ amina tipo A	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2 g
Agua destilada	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 2xTY.** (Maniatis *et al.*, 1982).

Bacto-triptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
Agua destilada	1 litro
pH 7,2.	

▪ **Medio SOB.** Hanahan, 1983.

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

Antes de su utilización se añaden 20 ml de una solución MgSO_4 1 M.

▪ **Medio TSB.**

Peptona de caseína	16 g
Peptona de soja	3 g

Glucosa	2,5 g
NaCl	6 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Agua destilada	1 litro
pH 7,0	

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

5.2. Medios de cultivo para *Penicillium chrysogenum*:

▪ Medio Power.

PM1	0,5 litros
Czapek + KCl 0,7 M	0,5 litros

▪ Medio Czapek.

Sacarosa	30 g
NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 litro

Cuando se utiliza como medio de regeneración de protoplastos se añade un estabilizador osmótico (sorbitol 1M o KCl 0,7 M).

▪ Medio MPPY. Modificado de Anné, 1977.

Glucosa	40 g
NaNO ₃	3 g
Extracto de levadura	2 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
Agua destilada	1 litro
pH 6,0	

- **Medio MDIP.** Medio definido de inóculo de *Penicillium* (Casqueiro *et al.*, 1999a).

Solución A:

Ácido cítrico	10 g
Ácido acético	2,5 g
Etilamina	3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,01 g
CoSO ₄	0,005 g
NaCl	0,001 g
Agua destilada	0,8 litros
pH 5,5	

Solución B:

Glucosa	40 g
Agua destilada	0,2 litros

Las soluciones A y B se esterilizan por separado y se mezclan antes de su uso. Para 80 ml de medio MDIP se añaden 20 ml de solución B.

- **Medio MDFP.** Medio definido de producción de *Penicillium*.

Solución A:

Misma solución que en el MDI, añadiendo en este caso 1 g de fenilacetato potásico.

Solución B:

Lactosa	30 g
Agua destilada	0,1 litro

Solución C:

Sacarosa	10 g
Agua destilada	0,1 litro

Las soluciones A, B y C se esterilizan por separado y se mezclan antes de su uso. Para 80 ml de medio MDFP se añaden 10 ml de solución B y 10 ml de solución C.

6. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

6.1. Cepas bacterianas

6.1.1. Crecimiento de las cepas bacterianas

Para el crecimiento en medio sólido de las diferentes estirpes de *E. coli* empleadas se incubaron a 37 °C durante 16-18 h. El cultivo en medio líquido se realizó en matraces de 500 ml sin indentaciones incubando a 37 °C y 250 r.p.m. de agitación. Cuando se cultivaron clones resistentes a antibióticos los medios fueron complementados para presentar las siguientes concentraciones de antibióticos: Ampicilina (Ap) 100 µg/ml; Cloranfenicol (Cm) 30 µg/ml; Tetraciclina (Tc) 12,5 µg/ml y Kanamicina (Km) 50 µg/ml.

6.1.2. Mantenimiento de las cepas bacterianas

La conservación de las cepas bacterianas se realizó de diferentes formas, dependiendo del período de tiempo de almacenamiento requerido:

- Siembra en placa petri, selladas con parafilm y a 4 °C (2-3 semanas).
- Suspensión en glicerol al 20 % y a -20 °C (1 año).
- Liofilización (varios años).

6.2. Cepas fúngicas

6.2.1. Crecimiento de *P. chrysogenum*

Para el crecimiento sobre medio sólido de las diferentes estirpes de *P. chrysogenum* empleadas se incubaron a 28 °C durante 4-5 días, utilizando medio Power para crecimiento y esporulación, y medio Czapek exclusivamente para el crecimiento micelial del hongo. Para el crecimiento de *P. chrysogenum* en medio líquido se utilizaron matraces de 500 ml sin indentaciones, con 100 ml de medio MPPY e incubados a 25 °C y 250 r.p.m. en agitadores orbitales. Las fermentaciones se iniciaron con un 10% de cultivo de inóculo. El cultivo de inóculo se obtuvo añadiendo esporas frescas (esporas de una placa de medio Power para cada 100 ml de medio de inóculo) en medio definido de inóculo (MDIP), e incubando durante 24-48 h en las condiciones de crecimiento descritas anteriormente. Las cepas auxótrofas de lisina fueron crecidas en medios que contenían lisina a una concentración final 1,75 mM.

6.2.2. Mantenimiento de las cepas de *P. chrysogenum*:

Para el mantenimiento de *P. chrysogenum* se utilizaron esporas frescas en todos los tipos de conservación que siguen:

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

7. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

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

En *P. chrysogenum*, la tasa de crecimiento en medio líquido se valoró mediante el cálculo de peso seco por volumen de medio. Para ello, se recogieron muestras de fermentación (1-5 ml) y se lavaron varias veces con NaCl 0,9 %. El micelio fue recogido por centrifugación y secado a 80 °C en condiciones de vacío en cestillos de papel de aluminio hasta peso seco constante. Posteriormente fueron pesados y se calculó el peso seco restando el peso de los cestillos vacíos.

8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PENICILINA G EN CALDOS DE FERMENTACIÓN DE *P. chrysogenum* (BIOENSAYO)

La determinación de la producción de antibiótico en fermentaciones de *P. chrysogenum* se realizó por duplicado a partir de muestras del caldo de fermentación. Para ello, un microorganismo sensible a la penicilina G (*M. luteus*) se inoculara en medio TSB con agar al 1 % (a 45 °C), y este medio se extiende en placas petri de 15 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio de cultivo, se perforan de 6 a 8 agujeros con un sacabocados. En dichos huecos se añadirán las muestras (60 µl) de caldo de fermentación y los patrones de penicilina G. Una vez cargadas las placas de bioensayo, se incuban a 4 °C durante al menos 1 hora, tiempo en el que el antibiótico difundirá a través del medio. Después, las placas de bioensayo se incubarán durante 12-15 horas a 37 °C. El antibiótico presente en el medio inhibirá el crecimiento del microorganismo inoculado, dando lugar a halos de inhibición del crecimiento. El diámetro de dichos halos de inhibición es proporcional a la concentración de antibiótico.

Los controles con diferentes concentraciones de penicilina G nos permitirán realizar una recta patrón que relaciona directamente el logaritmo de la concentración de penicilina 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 permitirá determinar la concentración de penicilina G en los caldos de fermentación.

9. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

9.1. 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 ARNasa y ADNasa, libres de ADNasa y ARNasa para cada caso. Ambas enzimas se utilizaron a una concentración final de 10 µg/ml, incubando la reacción 90 minutos a 37 °C.

ARNasa: 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. **ADNasaI:** Solución de 10 mg/ml en agua.

9.2. Manipulación de ADN

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

1. Se añade un vol. de fenol neutro a la muestra de ADN, se agita vigorosamente durante 20-30 s y se centrifuga 5 minutos a 14.000 r.p.m. y a temperatura ambiente.

2. Se recoge la fase acuosa (superior) con una pipeta o micropipeta y se pasa a un tubo limpio. Se añaden 0,5 vol. de fenol neutro y 0,5 vol. de CIA. Se agita vigorosamente de nuevo durante 20-30 s. Se centrifuga 5 minutos a 14.000 r.p.m. y a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfiere a un tubo limpio.

3. Se repite el paso 2 hasta que la interfase queda completamente libre de proteínas.

4. Se añade 1 vol. de CIA y se agita durante 20-30 s. Se centrifuga de igual manera que en los pasos anteriores, recogiendo la fase acuosa al final del proceso.

5. Se precipita el ADN mezclando la fase acuosa con 2,5 vol. de etanol absoluto y 0,1 vol. de acetato sódico 3 M pH 5,2. Esta mezcla se incuba a -20 °C durante 3-4 h ó 14-16 h si la cantidad de ADN en solución es pequeña.

6. Se centrifuga a 14.000 r.p.m. y 4 °C durante 30 minutos, se desecha el sobrenadante y se limpia el precipitado con etanol al 70 % en agua destilada. Se secan los restos de etanol al aire y se resuspende el ADN en agua o en TE.

Fenol neutro: Se mezclan por agitación fuerte 4 vol. de fenol ácido con 1 vol. de Tris-HCl 1 M pH 8,0. Se deja reposar hasta que se separan las fases. **Fenol ácido:** Se mezclan por agitación fuerte 500 ml de fenol cristalino con 500 ml de agua destilada. Se deja reposar hasta que se separen dos fases y se retira la fase superior (acuosa). La fase orgánica se somete a una atmósfera de N₂ durante 15 minutos y se guarda a 4 °C. **CIA:** Cloroformo 24 vol.; alcohol isoamílico 1 vol. **TE:** Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.

9.2.2. 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 (Fermenta's, Boehringer Mannheim, Amersham, Promega, England Biolabs). 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. Las normas seguidas a la hora de realizar una reacción de digestión de ADN fueron:

- Añadir siempre menos de 1/10 de vol. de enzima con respecto al vol. final de reacción, con objeto de diluir suficientemente 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 vol. 10 veces superior al vol. de solución de ADN que se va a digerir. De esta forma el TE no altera significativamente las características del tampón de reacción.
- Incubar las reacciones a la temperatura especificada por el proveedor y durante un período de tiempo que no exceda el tiempo de actividad descrito para la enzima.

9.2.3. Eliminación de extremos protuberantes en fragmentos de ADN:

En algunos casos fue necesario eliminar o rellenar los extremos protuberantes (tanto 5' como 3') que dejan algunos enzimas de restricción después de digerir el ADN. Para ello, se utilizó la nucleasa Mung Bean (Boehringer Mannheim) y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*.

➤ Eliminación de extremos 5' protuberantes:

La nucleasa Mung Bean posee actividad exonucleásica 3'→5' y 5'→3', por lo que puede utilizarse para la eliminación tanto de extremos 5' protuberantes como extremos 3' protuberantes. La reacción para eliminar extremos protuberantes se realizó de la siguiente forma:

1. Se mezclan en un tubo eppendorf 10 μ l de tampón 10x para Mung Bean, el ADN, acetato de zinc (concentración final 1 mM) y se lleva a un vol. final de 100 μ l con agua.
2. Se añade 1 μ l de enzima (50 U/ μ l) y se incuba a 37 °C durante 1 h.
3. Se detiene la reacción por adición de 5 μ l de EDTA 0,5 M; se eliminan las proteínas por fenolización y se precipita el ADN con 2,5 vol. de etanol y 0,1 vol. de acetato sódico 3 M pH 5,2.

➤ **Eliminación de extremos 3' protuberantes:**

Para eliminar este tipo de extremos mediante la enzima Mung Bean se siguió el mismo protocolo descrito para extremos 5'. En este caso también se empleó el fragmento Klenow (Boehringer Mannheim), aprovechando su actividad 3'→5' exonucleasa. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. El ADN (en 17 μ l) se mezcla con 2 μ l de tampón de Klenow 10x y 1 μ l de enzima (2 U/ μ l), y se incuba a 37 °C durante 30 min.
2. Se añade 1 μ l de cada nucleótido tri-fosfato (*stock* a 0,3 mM), 1 μ l de tampón de Klenow 10x, 4 μ l de agua y 1 μ l de enzima. Se incuba a 28 °C durante 20 min.
3. Se eliminan las proteínas de la reacción y se precipita con etanol absoluto y acetato sódico 3 M pH 5,2.

➤ **Rellenado de extremos 5' protuberantes:**

Para rellenar los extremos 5' protuberantes se utilizó la actividad 5'→3' polimerasa del fragmento Klenow.

1. El ADN, disuelto en 13 μ l de agua, se mezcla con 2 μ l de tampón de Klenow 10x, 1 μ l de cada nucleótido tri-fosfato (*stock* a 0,3 mM) y con 1 μ l de enzima (2 unidades). Esta reacción se incuba a 28 °C durante 20 min.
2. Se eliminan las proteínas por fenolización y se precipita con etanol y acetato sódico 3 M pH 5,2.

Tampón de Mung Bean 10x: Acetato de sodio 300 mM, NaCl 500 mM, acetato de zinc 10 mM, Triton X-100 0,01 %; pH 4,6. **Tampón de Klenow 10x:** Tris-HCl 0,4 M, MgCl₂ 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 7,5.

9.2.4. Desfosforilación de extremos 5' de fragmentos de ADN mediante la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (*Boehringer Mannheim*):

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

1. El ADN, en un vol. de 40 μ l de agua, se mezcla con 5 μ l de tampón de fosfatasa 10x. Se calienta 10 minutos a 65 °C para favorecer la disolución del ADN y la separación de sus extremos.
2. Después de dejar enfriar la mezcla durante 4-5 minutos, se añaden 5 μ l de enzima (5 U/ μ l, Boehringer Mannheim) y se incuba a 37 °C durante 30 minutos.
3. Se calienta a 65 °C durante 15 minutos para inactivar la enzima, se eliminan las proteínas mediante fenolización y se precipita el ADN con 2,5 vol. de etanol absoluto y 0,1 vol. de acetato sódico 3 M pH 5,2.

Tampón fosfatasa 10x: Tris-HCl 0,5 M; EDTA 1 mM, pH 8.

9.2.5. Ligación de moléculas de ADN:

Para la ligación de extremos de moléculas lineales de ADN se utilizó la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4.

1. Se mezclan cantidades equimolares de los fragmentos de ADN que se quieren ligar, aproximadamente 25-50 ng, en un vol. final de 8 μ l.
2. Se calienta a 65 °C durante 30 s y se deja enfriar durante 2-3 minutos a temperatura ambiente.
3. Se añade 1 μ l de tampón de ligasa 10x, se mezcla bien y se añade 0,1-1 μ l de enzima (5 unidades/ μ l, *Boehringer Mannheim*).
4. La reacción se incuba 1 h a 37 °C en caso de que los fragmentos de ADN tengan extremos cohesivos, ó 12 h a 13-14 °C si los extremos son romos.
5. Finalmente, los productos de la reacción de ligación se transforman en una cepa apropiada de *E. coli*.

Tampón de ligasa 10x: Tris-HCl 0,5 M; MgCl₂ 0,1 M; DTT 0,2 M; dATP 10 mM, Seroalbumina bovina 500 μ g/ml, pH 7,8.

9.2.6. Generación de deleciones unidireccionales:

Este sistema, basado en el procedimiento desarrollado por Henikoff (1984), se utiliza generalmente para la obtención de colecciones de clones para secuenciación, y se fundamenta en la utilización de la enzima exonucleasa III (*Exo III*). Esta enzima es capaz de degradar una de las hebras del ADN bicatenario cuando hay accesible un extremo 5' protuberante o romo. Sin embargo, la enzima no es activa sobre extremos 3' protuberantes o extremos 5' protuberantes con nucleótidos modificados (con grupos α -fosforotioatos). La longitud del fragmento de ADN degradado por la

ExoIII depende de la cantidad de enzima, ADN, temperatura y tiempo de incubación; describiéndose una actividad teórica a 37 °C de 500 pb/min con 40 unidades de enzima/μg de ADN.

El sistema *Erase-a-base*, desarrollado por Promega Co. (Madison, WI), ha sido utilizado en el presente trabajo para la generación de deleciones en fragmentos de ADN clonados en el vector pBluescript. El procedimiento seguido para la utilización de este sistema se detalla a continuación:

1. Se digiere el vector con dos enzimas de restricción de corte único en el plásmido, que dejen un extremo 3' protuberante (extremo protegido de la acción de la *ExoIII*) y un extremo 5' protuberante (extremo que será degradado por la *ExoIII*).

2. Se resuspende el ADN en tampón de la *ExoIII* 1x, pudiendo llegar hasta 100 μg/μl y teniendo en cuenta que se requieren 2,5 μl de esta mezcla para cada tiempo de reacción. A continuación se incuba a 37 °C durante 3 min. Se añaden 40 U de enzima *ExoIII* (200 U/μl) por μg de ADN y se mantiene a 37 °C.

3. A intervalos de 30 s se toman alícuotas de 2,5 μl y se mezclan con 7,5 μl de mezcla de reacción para la enzima S1. Se mantienen todas las alícuotas en hielo hasta que se toma el último tiempo de reacción.

4. Se incuban todos los tiempos 30 minutos a temperatura ambiente para dejar actuar a la enzima S1. Una vez transcurrido este tiempo, se añade 1 μl de tampón de paro para S1 y se calienta a 65 °C durante 10 min.

5. Se incuban las muestras a 37 °C y se añade 1 μl de mezcla de reacción de Klenow. Se incuba durante 3 minutos y en ese momento se añade 1 μl de mezcla de nucleótidos tri-fosfato (concentración final 0,125 mM) y se incuba otros 5 minutos a 37 °C. En este paso se habrán rellenado los extremos protuberantes 5' o degradado los extremos protuberantes 3', generándose extremos romos.

6. Se enfrían las mezclas a temperatura ambiente y se añaden 40 μl de mezcla de reacción de la ligasa, con objeto de recircularizar los productos plasmídicos del proceso. Se incuba 1-2 h a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se transforma *E. coli* con 20 μl de cada tiempo de reacción.

Tampón de *ExoIII* 10x: Tris-HCl 660 mM, MgCl₂ 6,6 mM; pH 8,0. **Mezcla de S1:** Tampón de S1 1x, enzima S1 2,5 U/μg de ADN. **Tampón de S1 7,4x:** Acetato potásico 0,3 M; NaCl 2,5 M; ZnSO₄ 10 mM, Glicerol 50 %, pH 4,6. **Tampón de paro para S1:** Tris-HCl 0,3 M; EDTA 50 mM. **Mezcla de Klenow:** Tampón de Klenow 1x, enzima Klenow 0,2 U/μg de ADN. **Tampón 1x de Klenow:** Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 100 mM, pH 8,0. **Mezcla de ligasa:** Tampón de ligasa 1x, PEG 5%, DTT 1 mM, enzima ligasa 0,2 U/μg de ADN. **Tampón de ligasa 10x:** Tris-HCl 0,5 M; MgCl₂ 0,1 M; ATP 10 mM, pH 7,6.

9.2.7. 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. Los constituyentes principales de una PCR son:

- Cebadores (primers): moléculas lineales de ADN monocatenario que determinan el punto de inicio de síntesis de ADN, a partir de los cuales la polimerasa sintetizará la cadena de ADN. Habitualmente se utilizaron oligonucleótidos de 18-22 pb, con extremos 5' fosforilados cuando el fragmento a amplificar se quiso clonar posteriormente en algún vector.
- ADN polimerasa: la característica principal de estas enzimas es ser termoestables, ya que la PCR implica la incubación a altas temperaturas (94-96 °C) en la fase de desnaturalización. Estas enzimas proceden de microorganismos termófilos. Actualmente se utilizan enzimas modificadas por ingeniería genética con las que se puede amplificar fragmentos de ADN de gran tamaño y con gran fiabilidad.
- Molde: Molécula de ADN en la cual existen secuencias nucleotídicas complementarias a la secuencia de los cebadores. El fragmento de ADN comprendido entre los dos cebadores será el fragmento que se amplificará. Esta molécula es la que porta la información necesaria para que la polimerasa sintetice las nuevas hebras de ADN.
- Nucleótidos tri-fosfato: Sustratos de la polimerasa para la síntesis de nuevas hebras de ADN.

El esquema general de una PCR consta de tres pasos:

✓ Desnaturalización: 94-96 °C, 60 s. En este punto se desnaturaliza completamente el ADN molde, haciéndolo accesible para la unión de los cebadores a sus zonas complementarias.

✓ Hibridación o anillamiento: 37-70 °C, 60 s. La disminución de la temperatura favorece la unión de los cebadores a sus zonas complementarias en el ADN molde. La temperatura de renaturalización debe diferir 5 °C como máximo de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores, establecida empíricamente por su composición nucleotídica.

✓ Extensión o elongación: 70-72 °C. El tiempo de elongación dependerá del tamaño del fragmento de ADN que se quiera amplificar. Las polimerasas (Taq, Pfu, Platinum Pfx) que se han utilizado para la realización de este trabajo tenían una velocidad de síntesis entre 2 y 4 kb/min, por lo que los tiempos de extensión fueron de 1-2 min para fragmentos de entre 1 y 4 kb.

El conjunto de estos tres pasos constituye un ciclo de PCR. Las reacciones completas pueden constar de entre 20 y 40 ciclos, duplicándose, teóricamente, la cantidad de ADN correspondiente al fragmento a amplificar en cada ciclo. Adicionalmente se suele realizar un paso inicial de desnaturalización, a 94-96 °C durante 2-5 min, para asegurarse de que en el primer ciclo todo el ADN molde se encuentre completamente desnaturalizado. Igualmente, después de finalizar el último ciclo de PCR se puede programar un paso de extensión, a 70-72 °C durante 5-10 min, en el que se permite que la polimerasa termine de sintetizar todas las hebras que no hubiera completado.

El procedimiento experimental seguido para la amplificación mediante PCR fue el siguiente:

1. Se mezclan los siguientes componentes en un tubo eppendorf de 500 μ l en el orden indicado:

Agua estéril	46 μ l
Tampón de Taq polimerasa 10x	10 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	8 μ l
Cebador 1 (20 μ M)	5 μ l
Cebador 2 (20 μ M)	5 μ l
dNTPs (1,25 mM de cada uno)	16 μ l
Molde	10 μ l
Enzima (5U/ μ l)	0,5 μ l

2. Se añaden 75-100 μ l de aceite mineral esterilizado y se coloca la mezcla de reacción en el termociclador (DNA Thermal Cyclor, Perkin Elmer Cetus).

3. Se recoge la reacción, descartando la fase superior de aceite mineral, se eliminan las proteínas y se precipita con etanol y acetato sódico 3 M pH 5,2.

Tampón de Taq polimerasa 10 x: Tris-HCl 0,1 M; KCl 0,5 M; pH 8,3.

9.3. Manipulación de ARN

9.3.1. Purificación de ARN total de *P. chrysogenum*:

Para la purificación de ARN total de *P. chrysogenum* se utilizó el sistema RNeasyTM (Qiagen), basado en la retención del ARN en columnas de cromatografía y su posterior elución. El protocolo utilizado es el siguiente:

1. Se crece el microorganismo en las condiciones deseadas y se cosecha el micelio por filtración a través de filtros de nilón (30-45 μ m de diámetro de poro). Se lava el micelio con NaCl 0,9 %; se seca entre papeles de filtro y se congela rápidamente con N₂ líquido. El micelio puede ser utilizado en este momento o almacenado a -80 °C.

2. Se toman 0,4-0,6 g de micelio y se pulverizan con ayuda de un mortero de porcelana, añadiendo N₂ líquido para evitar la descongelación de la muestra. El polvo obtenido se introduce en un tubo eppendorf y se mezcla bien con 600-700 μ l de tampón de lisis RTL (al que se ha adicionado 10 μ l de β -mercaptoetanol por cada ml de tampón).

3. Se centrifuga durante 3 minutos a 14.000 r.p.m., recogiéndose el sobrenadante en un tubo limpio. Este paso se repite hasta que no aparezca ningún resto celular en el fondo del eppendorf.

4. Se mezclan con una pipeta 700 μ l de etanol al 70 % en H₂O-DEPC con el sobrenadante.

5. Se cargan 700 µl de la mezcla anterior en una columna de purificación y se centrifuga durante 30 s a 10.000-12.000 r.p.m., de forma que todo el sobrenadante atraviese la columna. Se cargan los 700 µl restantes de sobrenadante en la misma columna y se vuelve a centrifugar.

6. Se lava la columna con tampón RW1 (700 µl) y con tampón RPE (2 veces con 500 µl), centrifugando 30 s a 10.000-12.000 r.p.m.. En el último lavado se centrifuga durante 3 minutos para eliminar completamente el etanol que contiene el tampón RPE.

7. Se eluye el ARN dos veces, con 30 µl de agua libre de ARNasas cada vez. El ARN puede conservarse a -20 ó -80 °C. La concentración de ARN y su integridad puede visualizarse en un gel de agarosa al 1 %, cargando 3 µl de muestra de ARN.

H₂O-DEPC: Se disuelve dietilpirocarbonato al 0,1 % en agua destilada mediante agitación durante 12-15 h. Se esteriliza en autoclave.

9.3.2. Retrotranscripción de ARN y amplificación por PCR (RT-PCR):

La confirmación de la presencia de intrones en el ADN puede realizarse mediante la secuenciación del ARNm maduro. Sin embargo, generalmente los protocolos de secuenciación están diseñados para la secuenciación de ADN, por lo que es necesario llevar a cabo la retrotranscripción de las moléculas de ARN a moléculas de ADN, antes de su secuenciación. Además, es mucho más cómodo manipular ADN que ARN ya que éste último se degrada fácilmente. La retrotranscripción de ARN se llevó a cabo utilizando el sistema *SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq* (Life Technologies), basado en la síntesis de la hebra complementaria al ARN por medio de una retrotranscriptasa.

La reacción se preparó de la siguiente manera:

1. Se mezclan en un tubo eppendorf libre de ARNasas los siguientes componentes:

Tampón de reacción 2x (Mix)	5 µl
Enzima RT/ <i>Platinum</i> Taq Mix	1 µl
Oligo A (10 µM)	1 µl
Oligo B (10 µM)	1 µl
10pg-1µg ARN molde (extraído por <i>RNeasy</i>)	2-5 µl
Agua DEPC	hasta 50 µl

2. Se añaden 50 µl de aceite mineral.

3. Se programa el termociclador tomando en cuenta las condiciones óptimas de temperatura para la síntesis de cDNA, la cual dependerá de los oligos utilizados en la reacción. Se introducen las muestras y posteriormente se analiza el producto de la amplificación por PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa.

Tampón de transcriptasa reversa 10 x: Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, Triton X-100 1 %, pH 8,8.

10. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *Escherichia coli* PARA TRANSFORMACIÓN

10.1. Método del TSS: (Chung et al., 1989).

Es un método sencillo que se empleó cuando no fue indispensable obtener eficiencias altas de transformación. Este método se ha utilizado para obtener células competentes de la cepa WK6mutS.

1. Se inocula una colonia de *E. coli* en 100 ml de medio LB. Se incuba a 37 °C hasta que el cultivo alcanza una DO_{600 nm} de 0,5 unidades.

2. Después de enfriar en hielo el cultivo, se recogen las células por centrifugación a 5000 r.p.m. durante 10 min. y a 4 °C.

3. El precipitado obtenido se resuspende en 10 ml de solución TSS y se reparte la suspensión en tubos eppendorf (400 µl/tubo).

4. Las células pueden ser usadas en el momento o ser almacenadas a -80 °C, después de ser congeladas en N₂ líquido o en hielo seco/etanol.

TSS: se prepara en LB: Polietilenglicol 3350/8000 10 %, DMSO 5 %, MgCl/MgSO₄ 20-50 mM, pH 6,5.

10.2. Método del cloruro de rubidio: (Hanahan, 1983; 1985).

Este método se ha utilizado para obtener eficiencias de transformación elevadas (hasta 5 x 10⁸ transformantes/µg ADN). Con este método se han obtenido células competentes de la cepa DH5α, cepa empleada en la mayoría de los protocolos de manipulación de ADN.

1. Se inocula una colonia en 10 ml de medio SOB y se incuba durante 6 horas a 37 °C.

2. Se inoculan 100 ml de medio SOB con 1 ml del inóculo, incubando a 37 °C hasta que el cultivo alcanza una DO_{600 nm} de 0,4-0,5 unidades.

3. El cultivo se enfría en hielo y se recogen las células por centrifugación durante 5 min. (3000 r.p.m., 4 °C). A partir de este punto, es muy importante conservar las células a una temperatura de 4 °C en todo momento.

4. El precipitado se resuspende en un pequeño vol. de solución RF1, mediante agitación suave, y se lleva la suspensión a un vol. final de solución RF1 de 33 ml, incubándose posteriormente 15 min. en hielo.

5. Se recogen las células por centrifugación a 3.000 r.p.m. y 4 °C durante 5 min. El precipitado se resuspende en 8 ml de solución RF2. Una vez resuspendidas las células se mantienen 15 min. en hielo.

6. Las células así obtenidas se reparten en alícuotas de 100-200 µl y pueden utilizarse bien directamente para transformar o pueden ser congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -80 °C.

RF1: RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, Acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, Glicerol 15 %, pH 5,8 con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración. **RF2:** MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, Glicerol 15 %, pH 6,8 con NaOH. Esterilizar por filtración.

10.3. Preparación de células electrocompetentes:

La sencillez de preparación de células electrocompetentes, así como la alta eficiencia de transformación que se obtiene mediante este método de transformación (hasta 10⁹-10¹⁰ transformantes/ μ g de ADN) ha hecho que se haya utilizado este sistema para transformar *E. coli* en algunos experimentos. La cepa bacteriana elegida para obtener células electrocompetentes fue *E. coli* DH10B.

1. Se inoculan 100 ml de medio LB con una colonia aislada de *E. coli* DH10B, y se incuba a 37°C y 250 r.p.m. hasta obtener una DO_{550nm} entre 0.4 y 0.5.

2. Se recogen las células por centrifugación en una supercentrífuga Sorvall (Du Pont Instruments) a 5.000 r.p.m. y 4 °C durante 10 min.

3. Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 100 ml de glicerol al 10 % en agua Milli-Q.

4. Se recogen las células de nuevo como en el primer paso.

5. Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 100 ml de glicerol al 10 %.

6. Se recogen las células y se resuspenden en 330 μ l de glicerol al 10%. Esta suspensión de células puede ser utilizada inmediatamente o repartida en alícuotas de 30 μ l y almacenadas a -80 °C.

11. TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli* Y OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

11.1. Transformación de *E. coli*:

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

1. Se descongelan las células en un baño con hielo.

2. Se mezclan suavemente 100 μ l de solución de células con 1-10 μ l de solución de ADN y se incuban en hielo durante 20 min.

3. Se somete a la mezcla de reacción a un choque térmico, incubando a 42 °C durante 45 s. Posteriormente se incuba la mezcla en hielo durante 2 min.

4. Se añaden 600-900 μ l de medio LB a la mezcla de transformación y se incuba a 37 °C y en agitación durante 45-60 min.

5. Se siembra en un medio sólido selectivo para clones transformados, habitualmente medio LB suplementado con algún antibiótico.

11.2. Electroporación de *E. coli*:

El protocolo de electroporación que se ha utilizado es el siguiente:

1. Se descongelan en hielo las células electrocompetentes DH10B y se mezclan con el ADN, utilizando 30 μ l de suspensión de células y 1-5 μ l de ADN.
2. Se transfiere la mezcla de células y ADN a una cubeta de electroporación de 0,2 cm previamente enfriada en hielo. La mezcla debe estar en contacto con las dos láminas metálicas de la cubeta y sin formar burbujas.
3. Se seca bien el exterior de la cubeta y se coloca en el soporte, previamente enfriado a -20°C , del aparato de electroporación.
4. Se ajustan las condiciones (25 μ F, 2.500 V y 200 Ω) y se realiza la electroporación. La duración del pulso debe ser de 4-5 milisegundos para obtener una buena eficiencia de transformación. Se coloca la cubeta en hielo hasta que se recojan las células.
5. Se añade 1 ml de medio LB en la cubeta de transformación, se mezcla con una micropipeta, se recoge el medio y se incuba en un tubo eppendorf a 37°C y 250 r.p.m. durante 1 h.
6. Se siembra en un medio sólido adecuado para la selección de clones transformantes.

11.3. Minipreparaciones de ADN plasmídico (minipreps):

Se ha seguido el protocolo descrito por Holmes y Quigley (1981):

1. Se realizan cultivos a pequeña escala en tubos eppendorf con 1 ml de medio TB, complementado con el antibiótico apropiado, inoculando dichos cultivos con colonias aisladas de *E. coli*. Los cultivos se incuban durante 8-12 h a 37°C y con agitación (250 r.p.m.).
2. Se recogen las células por centrifugación durante 10 minutos a 10.000 r.p.m. y temperatura ambiente. Después de descartar el sobrenadante, se resuspende el precipitado en 300-350 μ l de STET mediante agitación fuerte.
3. Se añaden 10 μ l de una solución de lisozima alcalina en agua (10 mg/ml) y se incuba 45 s con agitación fuerte.
4. Una vez lisadas las células, se incuban las reacciones en agua hirviendo durante 45 s. Este proceso provocará la coagulación de los restos celulares, ADN cromosómico y proteínas; que serán concentrados por centrifugación durante 15 minutos a 14.000 r.p.m.. El precipitado formado por estos componentes celulares se retira del fondo de los tubos con un palillo estéril libre de nucleasas.
5. El sobrenadante obtenido se mezcla con 40 μ l de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 400 μ l de 2-propanol, precipitando con este procedimiento el ADN plasmídico. Dicho ADN se recoge por centrifugación durante 10 minutos a 14.000 r.p.m., y una vez descartado el sobrenadante, se lava con etanol al 70 % en agua.
6. El precipitado se seca al aire y se resuspende en 30-40 μ l de TE, almacenándose a 4°C o a temperatura ambiente.

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

11.4. Obtención de ADN plasmídico a gran escala mediante lisis alcalina:

Se ha seguido el protocolo descrito por Maniatis *et al.* (1982):

1. Se inoculan 100 ml de medio TB, complementado con el antibiótico apropiado, con una colonia aislada de *E. coli* y se incuba el cultivo durante 8-12 horas a 37 °C y agitación a 250 r.p.m.

2. Una vez crecido el cultivo, se recogen las células en un tubo GSA por centrifugación durante 5 minutos a 5.000 r.p.m., utilizando una super centrífuga Sorvall (DuPont Instruments). El precipitado obtenido se resuspende en 2 ml de solución GTE, y se transfiere a un tubo SS34.

3. La solución de células se mezcla con 2 ml de lisozima alcalina (10 mg/ml en GTE) y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.

4. Se añaden 8 ml de solución alcalina/SDS, se mezcla suavemente por agitación y se incuba durante 10 minutos en hielo. Este proceso facilitará la desnaturalización selectiva del ADN cromosómico.

5. Se añaden 6 ml de una solución de acetato potásico pH 4,8 y se agita vigorosamente hasta conseguir una mezcla homogénea, incubando posteriormente en hielo durante 10 min. Esto provocará la precipitación de las proteínas en la solución.

6. A continuación, se eliminan los restos precipitados centrifugando durante 15 minutos a 15.000 r.p.m. y 4 °C en una súper centrífuga Sorvall. El sobrenadante se recupera y se filtra a través de un filtro de nilón a un tubo SS34 limpio para eliminar restos celulares que pudieran quedar en la solución.

7. Se añaden 0,7 volúmenes de 2-propanol y 0,1 vol. de acetato sódico 3 M pH 5,2 para precipitar los ácidos nucleicos. Esta mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 10-15 min.

8. Se centrifuga durante 10 minutos a 8.000 r.p.m. en una centrífuga Sorvall para recoger los ácidos nucleicos, lavando posteriormente el precipitado con etanol al 70 % en agua. Se seca el tubo al aire para eliminar 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 60-90 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 vol. de etanol absoluto frío y 0,1 vol. de acetato sódico 3 M pH 5,2.

10. Después de recuperar el ADN por centrifugación durante 30 minutos a 14.000 r.p.m. y 4 °C, se lava con etanol al 70 % y se resuspende en 75-150 µl de TE.

GTE: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8. **Solución alcalina/SDS:** NaOH 0,2 M; SDS 1 %. **Acetato potásico pH 4,8:** Acetato potásico 3 M, ácido acético glacial 2 M.

12. MANIPULACIÓN DE GENOTECAS FÁGICAS DE ADN

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

12.1. Preparación de células de *E. coli* para infección:

1. Se siembra la cepa *E. coli* LE-392 en medio NZY sólido. Se incuba a 37 °C durante 12-16 h y se toma una colonia aislada para inocular 100 ml de medio NZY-maltosa-MgSO₄ (0,2 % y 10 mM respectivamente). Se incuba a 37 °C con agitación orbital hasta obtener una DO_{600 nm} de 0,5-0,8; lo que equivale a 4×10^8 - $6,4 \times 10^8$ células/ml.

2. Se recogen las células por centrifugación a 4.000 r.p.m. en tubos de 10 ml, se elimina el sobrenadante y las células de cada tubo se resuspenden en 1 ml (células 10x) o en 2,5 ml (células 4x) de MgSO₄ 10 mM. Esta suspensión de células puede almacenarse a 4 °C durante 15 días.

12.2. Infección en medio sólido:

1. Se mezclan en un tubo de 10 ml 100-500 µl de células 4x con 10-100 µl de suspensión de fagos (diluida en tampón SM cuando sea necesario) y se incuba a temperatura ambiente 10 min y 30 min a 37 °C.

2. Se añade al tubo 3 ml (para placas de 90 mm de diámetro) ó 7,5 ml (para placas de 150 mm) de NZY al 0,7 % de agar a 48 °C. Se mezcla el medio con la infección y se extiende sobre una placa con una base de NZY al 2 % de agar.

3. Se incuba a 37 °C hasta la aparición de halos de lisis (7-8 h). Una vez observados los halos de lisis se almacenan las placas a 4 °C hasta su uso.

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

12.3. Transferencia de placas de lisis a filtros de nitrocelulosa:

1. Se coloca un filtro de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) sobre la placa, evitando dejar burbujas de aire, y se deja la transferencia durante 3 min. Se marca el filtro con un bolígrafo para identificar la cara que ha estado en contacto con las placas de lisis. Si se realiza una segunda copia, se mantiene el filtro durante 4 min.

2. Se retira el filtro y se incuba durante 3 min en solución desnaturalizante con la cara que ha estado en contacto con las placas de lisis hacia arriba. Se seca el filtro 1 min sobre papel de filtro y se

sumerge dos veces en solución neutralizante durante 5 min. Se seca de nuevo y se incuba en solución SSC 2x durante 10 min.

3. Se retira el filtro de la última solución, se seca al aire y se fija el ADN al filtro mediante vacío a +80 °C durante 2 h o mediante luz ultravioleta.

Solución desnaturalizante: NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M. **Solución neutralizante:** NaCl 3 M, Tris-HCl 1 M, pH 7,5. **SSC 20x:** NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 7.

12.4. Amplificación de bacteriófagos en medio sólido:

1. Se recoge con una punta de pipeta estéril la placa de lisis seleccionada y se introduce en un tubo eppendorf con 100 µl de tampón SM y 2 µl de cloroformo. Se incuba a 4 °C durante 2-4 h para facilitar la difusión del fago. Se utilizan 10 µl de la suspensión obtenida para realizar una infección como se ha descrito en el apartado 12.2.

2. Una vez obtenidas las placas de lisis se seleccionan aquellas placas en las cuales se haya obtenido lisis confluyente. Si no se ha obtenido ninguna placa con esta característica, se recogen los fagos mediante el método que se describe a continuación y se repite la infección.

3. Se recogen los fagos añadiendo sobre las placas 5 ml de tampón SM. Se incuba con agitación suave a 4 °C durante 2-4 h y se recoge en un tubo de 10 ml el sobrenadante y la cobertera de la placa. A este medio se le añade un 2 % (v/v) de cloroformo, se mezcla y se centrifuga a 4 °C y 10.000 r.p.m. durante 10 min. Se recoge el sobrenadante y se realiza una infección con distintas diluciones de esta suspensión para estimar el número de unidades formadoras de placas de lisis (ufp) que se han obtenido.

12.5. Obtención de ADN de fagos recombinantes:

Se ha seguido el protocolo descrito por Malik *et al.* (1990):

1. Se infectan 10^9 células con 10^7 ufp y se incuban a 37 °C sin agitación.

2. Se inocula la infección en un matraz de 500 ml con 100 ml de NZY-maltosa-MgSO₄ (2 % maltosa y 10 mM MgSO₄). Se incuba a 37 °C y 250 r.p.m. durante 4-6 h con objeto de obtener una lisis total del cultivo bacteriano.

3. Se centrifuga el medio a 8.000 r.p.m. durante 20 min y se recoge el sobrenadante, desechando el precipitado de restos celulares.

4. El sobrenadante se traspa a un tubo limpio y se añaden 100 µl de ADNasa I, 100 µl de ARNasa y se incuba a 37 °C durante 1 h. Se añaden 10 g de polietilenglicol 8.000, 4 g de NaCl y se calienta a 65 °C hasta que se disuelvan estos componentes. Se incuba a 4 °C durante más de 1 h (incluso toda la noche).

5. Se centrifuga a 8.000 r.p.m. y 4 °C durante 40 min y se desecha el sobrenadante. El precipitado de fagos se resuspende en 5 ml de tampón SM, se añaden 50 µl de ADNasa I y 50 µl de ARNasa y se incuba durante 30 min a 37 °C.

6. Se lisan los fagos mediante la adición de SDS a una concentración final del 0,2 % y se eliminan las proteínas incubando simultáneamente con 50 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Se incuba esta reacción a 37 °C durante 1 h.

7. Se limpia la solución mediante fenolización y se precipita el ADN con 2,5 vol de etanol frío y 0,1 vol de acetato sódico 3 M pH 5,2. Se centrifuga a 14.000 r.p.m. y 4 °C durante 30 min, se lava el precipitado con etanol al 70 % y se resuspende el ADN en 100 µl de tampón TE.

Proteinasa K: solución 10 mg/ml en agua. **ADNasa I y ARNasa:** solución 10 mg/ml en agua.

13. TRANSFORMACIÓN DE *Penicillium chrysogenum*

La introducción de ADN en *P. chrysogenum* se ha realizado siguiendo los procedimientos descritos por Cantoral *et al.* (1987) y Díez *et al.* (1987).

13.1. Sistemas de selección positiva de transformantes en *P. chrysogenum*:

Generalmente, los marcadores de transformación empleados para la selección de transformantes en *P. chrysogenum* han sido la complementación de auxotrofías en cepas mutantes deficientes en algún gen esencial. En nuestro caso, la complementación de la auxotrofia de lisina ha sido el sistema de selección positiva de transformantes más utilizado. Sin embargo, la utilización del gen *ble* de *Streptoalloteicus hindustanus*, que confiere resistencia frente al antibiótico fleomicina, también se utilizó como sistema de selección positiva de transformantes. La fleomicina es un antibiótico metalo-glucopeptídico de la familia de la bleomicina (Berdy, 1980). Es un antibiótico de amplio espectro cuyo mecanismo de acción se basa en la rotura del ADN actuando sobre ADN monocatenario con secuencias repetidas invertidas o sobre ADN bicatenario no metilado (Hetzberg *et al.* 1985). La resistencia frente a este antibiótico se puede producir por bloqueo físico de las moléculas de fleomicina mediante el producto del gen *ble*. Este gen se ha encontrado en bacterias Gram negativas (Genilloud *et al.* 1984; Collins y Hall, 1985), en bacterias Gram positivas (McKenzie *et al.* 1986) y en el actinomiceto productor de fleomicina *S. hindustanus* (Drocourt *et al.* 1990). En nuestros experimentos de transformación para la interrupción del gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum*, se utilizó un plásmido (denominado pDL7) que contiene el gen *ble* de *S. hindustanus* integrado en un casete de expresión compuestos por: (i) el promotor del gen *pcbC* de

P. chrysogenum; (ii) el gen *ble y*; (iii) el terminador del gen *CYCI* de *S. cerevisiae* (Bañuelos *et al.*, 2003).

13.2. Obtención de protoplastos:

El protocolo que se ha seguido para transformar *P. chrysogenum* se basa en la utilización de protoplastos de este microorganismo.

1. Se inoculan 100 ml de medio MPPY con esporas procedentes de una placa de medio Power, incubada durante 5 días a 28 °C. Se incuba el cultivo durante 12-18 h a 25 °C y 250 r.p.m. de forma que la mayoría de las esporas estén germinadas, pero sin que se haya generado un micelio muy entrelazado. Si se utiliza una cepa auxótrofa debe complementarse el medio con el aditivo adecuado.

2. Se recoge el micelio por filtración a través de un filtro estéril de nilón de 30 µm de poro, lavándose a continuación con 100 ml de NaCl 0,9 %.

3. Se toma entre 1 y 3 g de micelio y se resuspende en 10 ml de tampón de protoplastos (TPP), mezclándose en un matraz de 250 ml con 10 ml de una solución de enzimas líticas (Sigma Chemical Co.) a una concentración de 1,5-2,5 mg/ml en TPP. Esta solución se esteriliza por filtración a través de un filtro millipore de 0,22 µm. La mezcla se incuba a 25 °C con agitación suave (70-90 r.p.m.) durante 3-4 h. Se sigue el proceso de liberación de protoplastos observando alícuotas al microscopio cada hora.

4. Una vez que se han liberado la mayoría de los protoplastos, se filtra la suspensión a través de un filtro estéril de nilón de 30 µm de poro, y se reparte en dos tubos de 10 ml. Se centrifuga el filtrado en una centrífuga basculante a 1.500-2.000 r.p.m. durante 2-3 minutos para recoger los protoplastos. Se elimina el sobrenadante y se lava el precipitado dos veces con solución KCM, centrifugando de nuevo y eliminando el sobrenadante. Antes de la última centrifugación se hace un recuento de protoplastos en una cámara Thoma.

5. Los protoplastos obtenidos en el paso anterior se resuspenden en KCM con un 10 % de solución PCM, procurando que queden a una concentración de $2,5 \times 10^8$ protoplastos/ml. La suspensión se mantiene en hielo hasta que se proceda a transformar.

Tampón de protoplastos (TPP): Tampón fosfato potásico 50 mM, KCl 0,7 M; pH 5,8. **Solución KCM:** KCl 0,7 M; CaCl₂ 50 mM, Mes 10 mM, pH 5,8. **Solución PCM:** Polietilenglicol 6000 50 %, CaCl₂ 50 mM, Mes 10 mM, pH 5,8.

13.3. Transformación:

1. En un tubo eppendorf estéril se mezclan los siguientes componentes:

Suspensión de protoplastos	100 µl
ADN (1 µg/µl)	1-10 µl
Ácido aurintricarboxílico (ATA) 0,1 M	10 µl

2. Se mezcla suavemente con ayuda de una pipeta sin dejar burbujas y se incuba en hielo durante 20 min.

3. Se añaden 500 μ l de solución PCM, se mezcla con una pipeta y se incuba a temperatura ambiente durante 20 min.

4. Se diluye el polietilenglicol de la solución PCM de la reacción de transformación con 600 μ l de solución KCM, mezclando con una pipeta. Si es necesario diluir más la reacción de transformación se hará siempre utilizando KCM.

Además de las reacciones de transformación propiamente dichas, se realiza una reacción control de regeneración de protoplastos en la cual no se añade ADN plasmídico. Esta reacción, sembrada en medio selectivo y no selectivo informará de la viabilidad de los protoplastos, de la aparición de colonias revertientes (si se emplea la complementación de una mutación como sistema de selección) y de la posible presencia de microorganismos contaminantes.

13.4. Selección de los transformantes:

La selección de transformantes se realiza comprobando su capacidad de crecer en medio sólido selectivo. Estos medios deben poseer un estabilizante osmótico para evitar la lisis de los protoplastos (en nuestro caso se utilizó KCl 0,7 M o Sorbitol 1M). Cuando el método de selección fue la complementación de una auxotrofia el medio utilizado fue Czapek-KCl, medio definido en el cual sólo pueden crecer cepas protótrofas. Cuando el método de selección fue resistencia a fleomicina, se utilizó medio Czapek-Sorbitol (la alta concentración de sales en el Czapek-KCl impide la acción del antibiótico) con una concentración de 10-20 μ g/ml de fleomicina (10 mg/ml en H₂O).

1. Se prepara una base de medio selectivo, con 5 ml para placas de 60 mm de diámetro y con 10 ml para placas de 90 mm de diámetro. Se dejan polimerizar durante 10 min.

2. Se reparte la reacción de transformación en 4 tubos de 10 ml. Se mezclan los protoplastos con medio selectivo a 45 °C (5 ml para siembra en placas de 60 mm de diámetro y 10 ml para placas de 90 mm de diámetro), y se extiende sobre la base antes preparada. Se deja polimerizar durante 5 min. Si se ha utilizado en la transformación un plásmido de replicación autónoma, es necesario sembrar diluciones de la mezcla de reacción (300 μ l de diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), ya que la alta eficiencia de transformación que presentan estos plásmidos puede ocasionar la aparición de un césped en las placas, imposibilitando el aislamiento de transformantes.

3. Se incuban las placas a 28 °C durante 4-6 días hasta la aparición de colonias transformantes.

14. OBTENCIÓN DE ADN TOTAL DE *Penicillium chrysogenum*

Para la obtención de ADN total de *P. chrysogenum* se ha utilizado el método desarrollado por J.F. Fernández en nuestro laboratorio, que se detalla a continuación:

1. Se inoculan 100 ml de medio MPPY con esporas frescas procedentes de medio Power. El cultivo se incuba en un matraz liso (500 ml) durante 24-48 h a 25 °C y agitación a 250 r.p.m. Una vez crecido el microorganismo, se recoge el micelio a través de un filtro de nilón estéril (30-45 µm de poro) y se lava con 100 ml de NaCl 0,9 %. El micelio obtenido se seca entre papeles de filtro, se congela y se liofiliza.

2. Se toman 0,5-1 g de micelio liofilizado y se pulveriza con ayuda de un mortero y añadiendo N₂ líquido. El polvo obtenido se introduce en un tubo eppendorf (2,2 ml) y se mezcla bien con 1 ml de tampón de rotura. A esta suspensión se le añaden 1 ml de fenol neutro, se mezcla mediante agitación suave y se incuba en un baño con agua a 50 °C durante 30 minutos, agitando a intervalos de 5 minutos aproximadamente.

3. Se centrifuga a 14.000 r.p.m. y temperatura ambiente durante 10 min. Se recoge la fase acuosa (superior) y se extrae con fenol/CIA hasta que la interfase quede limpia de restos celulares. Una vez llegados a este paso, se extrae una vez con CIA para eliminar los restos de fenol.

4. Se precipita el ADN con 2,5 vol. de etanol absoluto y 0,1 vol. de acetato sódico 3 M pH 5,2. Se incuba a -20 °C durante más de 1 h y se centrifuga 30 minutos a 14.000 r.p.m. y 4 °C. El precipitado obtenido se lava con etanol al 70 %, se seca al aire y se resuspende en 30-40 µl de TE.

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

15. ELECTROFORESIS DE MACROMOLÉCULAS

15.1. Electroforesis de ADN:

Las condiciones de electroforesis para separar moléculas de ADN en geles de agarosa son las descritas por Maniatis *et al.* (1982) y Sambrook *et al.* (1989). Se utilizó agarosa GIBCO BRL ultra PURE (Life Technologies) a diferentes porcentajes (desde 0,3 % hasta 2,5 %), dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN a separar, utilizando TAE como tampón y preparando el gel mediante calentamiento del tampón y la agarosa en un microondas.

Las muestras de ADN se mezclaron con 0,1 vol. de tampón de carga 6x y se calentaron durante 5 minutos 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 % (14 x 11 cm) aplicando una diferencia de potencial de 80-100 voltios durante 3 h. Una vez finalizada la electroforesis, se tiñeron

los geles sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio durante 15-20 min. Los geles se observaron sobre un transiluminador de luz UV (Spectroline TR-302, $\lambda = 302$ nm), y se fotografiaron mediante una vídeo 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 *Pst*I: 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.

TAE 50x: Tris base 242 g, ácido acético glacial 57,1 ml; EDTA 0,5 M pH 8 100 ml, H₂O 1 litro. **Tampón de carga 6x:** Azul de bromofenol 0,25 %, Sacarosa 40 %, Xileno cianol 0,25 %. **Bromuro de etidio:** Se prepara una solución stock a 10 mg/ml y se conserva a 4 °C y oscuridad. Para tinción de geles se prepara una solución diluida a 5 μ g/ml.

15.2. 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 cual se quiere recuperar el ADN y se congela a -20 °C.
2. Se encaja el tubo eppendorf con el fragmento de gel en la boca de otro tubo eppendorf y se centrifuga el conjunto a 14.000 r.p.m. durante 4 min. Una vez finalizada la centrifugación, se obtendrá en el tubo eppendorf inferior el tampón contenido en el gel de agarosa con el ADN disuelto en él, mientras que la agarosa habrá quedado retenida por la lana de vidrio del eppendorf superior.
3. Se limpia la solución obtenida mediante extracción con fenol-cloroformo y se precipita el ADN con 2,5 vol. de etanol y 0,1 vol. de acetato sódico 3 M pH 5,2.

➤ **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 peso máximo de gel de agarosa que debe utilizarse es de 300 mg y el volumen máximo de las columnas es de 600 μ l.
2. Añadir 10 μ l de *capture buffer* por cada 10 mg de gel de agarosa (máximo 300 μ l).
3. Cerrar el tubo eppendorf y mezclar el contenido en un vórtex vigorosamente. Incubar a 60 °C hasta que la agarosa se disuelva completamente (5-15 min).

4. Centrifugar y transferir la muestra a una columna GFX previamente colocada en un tubo de *collection*. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.

5. Centrifugar a 14.000 r.p.m. durante 30 s. Descartar la solución recogida en el tubo de *collection* y colocar la columna GFX en un tubo nuevo.

6. Añadir 500 µl de *wash buffer* a la columna GFX. Centrifugar a 14.000 r.p.m. durante 30 s. 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 µl de *elution buffer*, agua destilada o TE directamente a la matriz de fibra de vidrio de la columna GFX. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min. Para obtener el ADN más concentrado se debe reducir el volumen de elución, pero no éste no debe ser menor de 10 µl.

8. Centrifugar a 14.000 r.p.m. durante 1 min. Recuperar el ADN purificado.

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

15.3. Electroforesis de ARN:

La electroforesis de moléculas de ARN puede realizarse en geles de TAE-agarosa cuando se necesita comprobar la integridad o la concentración de una muestra de ARN. En este caso, la electroforesis se desarrolla de igual forma a lo descrito para la electroforesis de moléculas de ADN, con la salvedad de que las muestras no deben calentarse y el tampón de carga debe ser especial para ARN.

Tampón de carga 6x para ARN: Azul de bromofenol 4 %, xileno cianol 4 %, EDTA 1 mM, glicerol 50 %.

16. TRANSFERENCIA DE MACROMOLÉCULAS

16.1. Transferencia de ADN por capilaridad (*Southern*):

La técnica de transferencia de ADN a filtros de nilón o nitrocelulosa es conocida como *Southern* (Southern, 1975), y para su realización se han seguido las indicaciones de Sambrook *et al.* (1989):

1. Una vez teñido y fotografiado el gel de agarosa, se lava con agua destilada y se incuba en agitación suave durante 15 minutos en una solución de ácido clorhídrico 0,25 M. Mediante este tratamiento se produce una rotura parcial del ADN que facilita su difusión a través de gel.

2. Se retira la solución de ácido clorhídrico y se sustituye por una solución desnaturalizante, en la que se incubará el gel durante 45-60 min.

3. Se elimina la solución desnaturizante y se añade una solución neutralizante, en la que se mantendrá el gel en agitación suave durante 45-60 min.

4. Se corta un taco de papeles de filtro (20-25 cm de alto) a la medida del gel, 4 papeles Whatman 3MM también de la medida del gel y un filtro (nilón o nitrocelulosa) ligeramente mayor que el gel. Los papeles Whatman y el filtro se incuban durante 1 minuto en agua destilada y posteriormente 2 minutos en solución SSC 15x.

5. Se prepara el sistema de transferencia por capilaridad, colocando en una bandeja un taco de 8-10 cm de alto de papeles de filtro. Sobre el taco de papeles se colocan en el orden en el que se cita los siguientes componentes: 2 papeles Whatman 3MM, el gel, el filtro de nilón o nitrocelulosa y otros dos papeles Whatman 3 MM. Sobre los papeles Whatman se colocará otro taco (12-15 cm) de papeles de filtro y sobre estos un peso (0,5-1 Kg) que facilitará la transferencia.

6. Se añade solución SSC 15x a la bandeja, asegurándose que sea suficiente para empapar la torre inferior de papeles de filtro, pero sin que el nivel de solución llegue a la altura del gel. La transferencia se deja durante 12 h.

7. Se retiran los papeles de filtro y papeles Whatman superiores, se marca sobre el filtro la posición de los pocillos y se lava el filtro en solución SSC 6x para eliminar el exceso de sales.

8. Se seca al aire el filtro. Si el filtro es de nilón se fija el ADN al filtro con luz ultravioleta (Stratalinker, Stratagene). Si el filtro es de nitrocelulosa se incuba a 80 °C y en vacío durante 2 h.

16.2. Transferencia de ADN mediante sistema de vacío:

Este sistema de transferencia se utilizó en aquellos casos en los que se quiso transferir ADN plasmídico digerido y desarrollado en geles de agarosa, ya que permite una eficiencia adecuada para la transferencia de moléculas de ADN de tamaño medio y pequeño. El método que se ha seguido es el siguiente:

1. Una vez visualizado el gel de agarosa, se incuba 15 minutos en ácido clorhídrico 0,25 M y en agitación suave. Una vez transcurridos los 15 minutos se lava el gel con agua destilada.

2. Se monta el aparato de transferencia, colocando un filtro de nilón 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 filtro 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 solución desnaturizante, cubriendo toda la superficie del gel. Se incuba de esta forma durante 20 min.

4. Se elimina la solución desnaturizante y se sustituye por solución neutralizante, incubando durante otros 20 min.

5. Se elimina la solución neutralizante y se cubre el gel con SSC 20x. Se mantiene la transferencia durante al menos 2 h. Una vez transcurrido el tiempo, se apaga el sistema de vacío, se retira el gel, se recoge el filtro y se fija mediante luz ultravioleta.

17. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

17.1. Marcaje no radiactivo de sondas:

El sistema de marcaje no radiactivo utilizado se basa en la utilización del nucleótido dUTP, modificado por la unión covalente 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 1 µg de ADN disuelto en 16 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 4 µl de la mezcla *random primer* 5x y se incuba a 37 °C durante 1-20 h. Una vez marcada, la sonda puede almacenarse a -20 °C durante más de un año.

Mezcla de *random primer* 5x: Klenow 1 U/µl, dATP/dCTP/dGTP cada uno 1 mM, dTTP 0,65 mM; DIG-11-dUTP 0,35 mM; Tampón de reacción 5 x 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 podrían retener la sonda y producir la aparición de señales inespecíficas de hibridación. En el caso de hibridación con sondas no radiactivas se utiliza un producto bloqueante (*Blocking reagent*, Boehringer Mannheim).

1. Se coloca el filtro entre dos pedazos 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 hibridación 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 adecuada durante 3-5 h.

Tampón de hibridación no radiactiva para ADN: Formamida 30-40 %, SSC 5x, Sarcosina 0,1 %; SDS 0,02 %; agente bloqueante 2 %.

➤ **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).

2. Se cierra la bolsa eliminando burbujas de aire y se incuba durante 12 h a la temperatura seleccionada y con agitación.

Las condiciones de astringencia de la hibridación se controlaron 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.

17.3. Lavado de los filtros:

Una vez finalizado el tiempo de 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 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 %. 15 minutos a la temperatura de hibridación.
3. SSC 0,1x; SDS 0,1 %. 10 minutos a 65 °C.

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

17.4. Detección inmunológica:

La detección de filtros hibridados con sondas no radiactivas 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 incubación del filtro con sustratos cromogénicos hidrolizados por esta enzima revelará la posición en el filtro de las bandas de hibridación. El protocolo utilizado para la detección fue el siguiente:

1. Se lava el filtro durante 1 minuto a temperatura ambiente con solución 1. En agitación.
2. Se incuba durante 30 minutos con solución 2. En agitación.
3. Se introduce el filtro en una bolsa transparente de plástico para envasado y se incuba 30 minutos en tampón 2 (20-50 ml) con 5 µl de anticuerpo frente a la digoxigenina (anticuerpo conjugado a la fosfatasa alcalina).

4. Se lava el filtro dos veces con solución 1 durante 15 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo. Posteriormente se incuba 2 minutos en tampón 3.

5. Se realiza la reacción de color, incubando el filtro en una bolsa de plástico transparente con tampón 3 (20-40 ml) más 45 μ l de solución de NBT (azul de nitrotetrazolio) y 35 μ l de solución de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) por cada 10 ml de tampón. Se incuba en oscuridad y reposo durante 2-60 min.

6. Una vez que aparecen las señales de hibridación, se detiene la reacción de color incubando el filtro en TE.

La intensidad de la señal se degrada con el tiempo, por lo que es recomendable guardar la imagen de la hibridación en un formato más estable (fotografía, digitalización, etc.).

Solución 1 hibridación no radiactiva: Ácido maléico 11,61 g; NaCl 8,76 g; H₂O 1 litro, pH 7,5. **Solución 2 hibridación no radiactiva:** Solución 1 más agente bloqueante al 0,2 %. **Solución 3 hibridación no radiactiva:** Tris base 12,11 g; NaCl 5,84 g; MgCl₂ 10,15 g; H₂O 1 litro, pH 9,5. **Solución NBT:** 75 mg/ml en N,N-dimetilformamida al 70 %. **Solución BCIP:** 50 mg/ml en N,N-dimetilformamida.

18. SECUENCIACIÓN DE ADN

18.1. Obtención de ADN plasmídico monocatenario (ADN de cadena sencilla):

Los métodos empleados para la secuenciación de fragmentos de ADN han requerido la utilización de ADN de cadena sencilla (ADNcs). Para la obtención de ADNcs se emplearon plásmidos que portan las secuencias del bacteriófago f1 que codifica las proteínas que llevan a cabo su empaquetamiento y replicación. Dichos plásmidos, transformados en la cepa de *E. coli* WK6mutS (que presenta *pili* sexuales) y en presencia del bacteriófago ayudante M13K07, son capaces de replicarse en forma monocatenaria. El método experimental seguido para la obtención de ADNcs se describe a continuación:

1. Se transforma el plásmido del cual se quiere obtener ADNcs en la cepa de *E. coli* WK6mutS.

2. Una vez que se han obtenido colonias aisladas de los transformantes del punto anterior, se inocula una colonia en un tubo eppendorf con 1 ml de medio 2xTY complementado con el antibiótico adecuado. Se incuba a 37 °C durante 2-3 h en agitación (250 r.p.m.).

3. Una vez que el cultivo alcanza una DO_{600nm} de 0,6 unidades se prepara en un tubo de 10 ml la mezcla siguiente: 150 μ l de cultivo del transformante, 150 μ l de medio 2xTY y 15 μ l de suspensión de bacteriófago M13K07. La proporción de células y bacteriófago debe ser 1 célula por cada 20 ufp, aproximadamente. Esta mezcla se incuba durante 1 h a 37 °C, mezclando suavemente cada 10-15 min.

4. Se añaden a la mezcla anterior 1,3 ml de medio 2xTY con kanamicina (50 µg/ml) y el antibiótico adecuado para la selección del transformante. Se incuba durante 15 h a 37 °C en agitación (250 r.p.m.).

5. Se centrifuga a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante, que se centrifuga de nuevo a 14.000 r.p.m. Se recoge el sobrenadante libre de células y se precipita el ADNcs con PEG-NaCl (400 µl) incubando a 4 °C durante 3-4 h.

6. Se recoge el ADNcs centrifugando a 14.000 r.p.m. a 4 °C durante 30 min. El precipitado se resuspende en 400 µl de TE. Se eliminan las proteínas por fenolización y se precipita el ADNcs con etanol frío y acetato sódico 3 M pH 5,2 durante 12-16 h.

7. Se centrifuga a 14.000 r.p.m. y 4 °C durante 30 minutos; se lava el precipitado con etanol al 70 %, se seca al aire y se resuspende el ADNcs en 8-12 µl de TE.

Solución PEG-NaCl: Polietilenglicol 6000 20 %, NaCl 2,5 M.

18.2. Reacciones para la secuenciación de ADN:

La secuenciación de ADNcs obtenido en el paso anterior se llevó a cabo utilizando el sistema *AutoRead™* (Pharmacia). Este procedimiento se basa en la síntesis de ADN a partir de un oligonucleótido marcado con fluorescencia que actúa como cebador de la polimerasa.

El protocolo que se ha seguido para la realización de las reacciones de secuenciación es el siguiente:

➤ Anillamiento:

1. Se mezcla en un tubo eppendorf los siguientes componentes:

ADNcs (1-2 µg, se ajustan con agua hasta el volumen final)	
Primer marcado con fluorescencia	(1 pmol)
Tampón de anillamiento	2 µl
Agua destilada	hasta 17 µl

Esta mezcla se incuba a 65 °C durante 10 minutos y se enfría lentamente hasta 35 °C durante, al menos, 10 minutos. Se centrifuga a continuación.

➤ Extensión-Terminación:

1. Se preparan 4 tubos para cada clon añadiendo 2,5 µl de cada dNTP Mix (A Mix, C Mix, G Mix y T Mix) y se incuban en baño de agua a 37 °C.

2. Se añade 1 µl de tampón de extensión a las reacciones de anillamiento.
3. Se añaden 2 µl de enzima T7 polimerasa diluida (1,5 U/µl), se mezcla bien y se centrifuga.
4. Se añaden 4,5 µl a cada tubo con los dNTPs y se incuban durante 5 minutos a 37 °C.
5. Se añaden 5 µl de tampón de parada y se pasa a temperatura ambiente. Se congela la mezcla.

18.3. Análisis de la secuencia de ADN:

Las secuencias se analizaron mediante el programa informático DNASTAR (*Comprehensive Microcomputer Systems for Molecular Biology*, ADNstar Inc., Madison). La comparación y búsqueda de similitud entre secuencias se realizó utilizando secuencias obtenidas de bases de datos (GenBank, EMBL, SwissProt, Prosite, etc.).

19. AISLAMIENTO DE MUTANTES DE *P. chrysogenum lys⁻/pip⁻*

Para la obtención de mutantes *lys⁻/pip⁻* se siguió la estrategia descrita por Riaño (1998), la cual, se detalla a continuación:

1. Esporas de *P. chrysogenum* HS⁻ (10⁶/ml) se incubaron en 0,1 M tampón Tris-malato a pH 9,0 durante 12-15 horas. Para inducir la germinación sincronizada, la cual está correlacionada con la síntesis de ADN (Martín *et al.*, 1974), se le añadió a la suspensión de esporas 1,75 mM de lisina, 15 g/l de glucosa y 1 g/l (NH₄)₂SO₄.

2. Las esporas fueron sometidas a mutación química, para lo cual se añadió a la suspensión 0,5 mM de N-metil-N'-nitro-N- nitrosoguanidina (NTG), obteniéndose a los 90 minutos una mortalidad del 90 %. Se plaquearon varias diluciones de esporas mutadas en medio Power suplementado con lisina (1,75 mM).

3. Se procedió a estudiar la capacidad de utilizar ácido pipecólico para complementar la auxotrofia de lisina en los mutantes *lys⁻ / pip⁻* obtenidos. Para ello, se sembraron en medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipecólico (0,1 M) como única fuente de nitrógeno y en medio mínimo Czapek con lisina (1,75 mM) como única fuente de nitrógeno (sin ácido pipecólico). Se seleccionaron los mutantes que eran incapaces de crecer en medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipecólico.

20. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

20.1. Preparación de extractos libres de células:

1. Se pulveriza el micelio (0,5-1 g) en mortero manteniéndolo congelado con N₂ líquido.
2. Se recoge 30-500 µl del polvo obtenido y se mezcla en un tubo eppendorf (2,2 ml) con 0,8-1 ml de tampón Tris-HCl 50 mM; 1 mM EDTA; pH 7,5.
3. Se resuspende y se mezcla bien utilizando una pipeta (no utilizar vortex) y se incuba durante 10 min en hielo.
4. Se centrifuga a 14.000 r.p.m. y 4 °C durante 15 min. Se recoge el sobrenadante y se vuelve a centrifugar a 14.000 r.p.m. y 4 °C durante 5 min para evitar restos de precipitado. Se recoge de nuevo el sobrenadante y se conserva en hielo hasta el momento de su utilización.

20.2. Determinación de la concentración de proteínas totales:

Para determinar la concentración de proteínas totales se siguió el método colorimétrico descrito por Bradford (1976), utilizando el sistema *Protein assay* (BioRad):

1. Se preparan una serie de soluciones de concentración conocida de seroalbúmina bovina (10, 7,5; 5; 2,5; 1,25 y 0 µg/ml) y diluciones del extracto libre de células (1:100; 1:200).
2. Las soluciones proteicas anteriores se mezclan con tampón Tris-HCl 50 mM; pH 7,5 hasta alcanzar un volumen de 800 µl.
3. Se añaden 200 µl del reactivo de Bradford y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente.
4. Se mide la absorbancia de las reacciones de seroalbúmina bovina a 595 nm, para realizar una recta patrón. La absorbancia a 595 nm es directamente proporcional a la concentración de proteínas totales.
5. Finalmente, la interpolación de la absorbancia del extracto libre de células en esta recta patrón, nos permitirá determinar la concentración de proteínas totales.

20.3. Ensayo de la actividad sacaropina deshidrogenasa:

En la ruta biosintética de lisina, la sacaropina deshidrogenasa cataliza la formación de lisina a partir de sacaropina; sin embargo, dicha actividad enzimática se mide en sentido reverso. El protocolo que se ha seguido para determinar la actividad sacaropina deshidrogenasa se describe a continuación:

1. La actividad sacaropina deshidrogenasa se determinó midiendo el consumo de NADH. Para ello, se añade a un tubo eppendorf (en un volumen final de 1ml):

Tampón Tris/HCl; pH 7,5	250 µl (250 mM)
Lisina (2 mM)	25 µl (50 mM)
α-cetoglutarato (500 mM)	20 µl (10 mM)
NADH (30 mM)	5 µl (0,15 mM)
Muestra (extracto libre de células; aprox. 50 µg proteína)	20 µl
Agua Milli-Q	680 µl

El control se realizó sin añadir lisina a la mezcla de reacción (se sustituye por Tampón).

2. Se inicia la reacción incubando a 37 °C durante 3 minutos.
3. Se mide la absorbancia a 340 nm en el espectrofotómetro.
4. La actividad enzimática fue expresada en unidades (1 unidad = 1 µmol de NADH consumido/min·ml; Coeficiente de extinción molar (ϵ) = 6.220 l/mol·cm a 340 nm). Las reacciones y los controles se realizaron por duplicado en todos los casos.

20.4. Ensayo de la actividad sacaropina reductasa:

En la ruta biosintética de lisina, la sacaropina reductasa cataliza la formación de sacaropina a partir de piperideín-6-carboxílico (P6C) y NADP. Esta actividad enzimática también se determinó en sentido reverso. Para medir la actividad sacaropina reductasa se siguió el protocolo que se describe a continuación:

1. La actividad sacaropina reductasa se determinó midiendo la formación de ácido piperideín-6-carboxílico (P6C) por derivatización con OAB. Para ello, se añade a un tubo eppendorf (en un volumen final de 400 µl):

Tampón Tris/HCl; pH 9,0 (100 mM)	320 µl (100 mM)
Muestra (extracto libre de células; aprox. 50 µg proteína)	20 µl
NADP (10 mM)	20 µl (0.5 mM)
Sacaropina (40 mM)	40 µl (4 mM)

El control se realizó sin añadir sacaropina a la mezcla de reacción (se sustituye por Tampón).

2. Se incuba la reacción a 30 °C durante 45 min.
3. Posteriormente, se detiene la reacción añadiendo 200 µl de 5 % ácido tricloroacético en etanol (TCA 5%).
4. El P6C formado se cuantifica mediante su derivatización con OAB. Para ello, se tomaron 400 µl de mezcla de reacción y se les añadió 600 µl de orto-amino-benzaldehído (OAB; 1 mg/ml en 2% etanol).
5. La reacción se incuba durante 45 minutos a 37 °C.

6. Se determina la absorbancia a 465 nm en el espectrofotómetro.

7. La actividad fue expresada en unidades (1 unidad = 1 μmol P6C formado/min·ml; Coeficiente de extinción molar (ϵ) de P6C-OAB = 2.800 l/mol·cm).

20.5. Ensayo de la actividad pipecolato oxidasa:

Para determinar la actividad pipecolato oxidasa se siguió el protocolo descrito por Mihalik *et al.* (1991), el cual, se describe a continuación:

1. La actividad pipecolato oxidasa se determinó midiendo la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producto de la reducción de ácido pipecólico en ácido piperideín-6-carboxílico (P6C). Para ello, se añade a un tubo eppendorf (en un volumen final de 1 ml):

Tampón HCl/ 40mM, pH 8,5; KCl 80 mM; EDTA 0,8 mM	890 μl
Muestra (extracto libre de células; aprox. 50 μg proteína)	40 μl
horseradish peroxidasa (2.000 U/ml)	10 μl (20 U)
Ácido pipecólico (0,5 M)	20 μl (10 mM)
<i>o</i> -dianisidina (16 mM)	40 μl (640 μM)

El control se realizó sin añadir pipecólico a la mezcla de reacción (se sustituye por Tampón).

2. Se incuba la reacción a 37 °C durante 15 min.

3. La formación de H_2O_2 se determina midiendo la absorbancia de la *o*-dianisidina oxidada a 460 nm en el espectrofotómetro.

4. La actividad pipecolato oxidasa fue expresada en unidades (1 unidad = 1 μmol de *o*-dianisidina oxidada/min·ml; Coeficiente de extinción molar (ϵ) de la *o*-dianisidina = 11.300 l/mol·cm).

21. VALORACIÓN DE SACAROPINA, ÁCIDO α -AMINOADÍPICO, ÁCIDO PIPECÓLICO Y LISINA EN EXTRACTOS CRUDOS DE *P. chrysogenum*

La detección mediante HPLC de sacaropina, ácido α -aminoadípico, ácido pipecólico y lisina en extractos crudos de micelio de *P. chrysogenum* Wis 54-1255, *P. chrysogenum* SR⁻ y *P. chrysogenum* TDX195 crecido en los diferentes medios de cultivo, se llevó a cabo utilizando el siguiente protocolo:

21.1. Preparación de los extractos libres de células:

1. Se recogen 400-500 mg de micelio congelado y se pulverizan en un mortero con N₂ líquido. Se introduce el polvo en un tubo eppendorf y se mezcla con 500 µl de tampón borato (500 mM; pH 7,7).
2. Se incuba en hielo durante 10 min. Luego, se centrifuga a 14.000 r.p.m. a 4 °C durante 30 min. El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 14.000 r.p.m. a 4 °C durante 5 min.
3. El sobrenadante se transfiere a otro tubo eppendorf y se eliminan las proteínas mediante la adición de 1 vol de metanol. Se centrifuga a 14.000 r.p.m. a 4 °C y durante 20 min.
4. Se recoge el sobrenadante y se almacena a -20 °C.

21.2. Derivatización y cromatografía de los extractos:

La detección de aminoácidos en extractos crudos de micelio de *P. chrysogenum* se realizó mediante su derivatización con 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC-Cl), como ha sido descrito previamente por Sim y Perry (1997), pero con algunas modificaciones. El FMOC-Cl reacciona con las aminas primarias y secundarias de los aminoácidos estableciendo la formación de carbamatos. La reacción de derivatización se realizó de la siguiente manera:

1. Se toman 500 µl de muestra, se le añaden 500 µl de FMOC-Cl 10 mM disuelto en acetona y se incuba a temperatura ambiente durante 1 min.
2. A continuación, se añaden 2 ml de ciclohexano a la reacción, se mezcla vigorosamente en vortex, se centrifuga y se descarta la fase superior (orgánica). Esta operación se repite tres veces seguidas.
3. La fase acuosa se recoge en un tubo eppendorf y se centrifuga a 14.000 r.p.m. durante 20 min para descartar restos de sales. Se transfiere el sobrenadante a un tubo eppendorf y se conserva en hielo.
4. Se inyectan 100 µl de muestra derivatizada en una columna de fase reversa µBondapack C₁₈ (Waters) de 300 x 4 mm, montada en un cromatógrafo Beckman System Gold (bomba modelo 126 y detector de longitud de onda variable modelo 166).

La elución se realizó con una mezcla de solventes: **A**, acetato/acético 50 mM pH 4.2 y **B**, acetonitrilo, siguiendo el gradiente de elución que se muestra en la Tabla 1, con un flujo de 1 ml/min y midiendo la absorbancia a 265 nm.

La sacaropina, ácido α-aminoadípico, ácido pipecólico y lisina fueron identificados mediante la cromatografía de patrones derivatizados de estos aminoácidos.

Tabla 1. PROGRAMA DEL GRADIENTE DE ELUCIÓN

Tiempo (min)	^aSolución A (%)	^bSolución B (%)	Gradiente
0	75	25	-
20	50	50	Lineal
30	42	58	Lineal
35	30	70	Lineal
40	30	70	Isocrático
45	75	25	Lineal
50	75	25	Isocrático

^a **Solución A:** acetato sódico 50 mM pH 4,2; ^b **Solución B:** acetonitrilo.

RESULTADOS

I.- CONVERSIÓN DE ÁCIDO PIPECÓLICO EN LISINA EN *P. chrysogenum*

1. EL ÁCIDO PIPECÓLICO SE CONVIERTE EN LISINA EN *P. chrysogenum*

Con la finalidad de estudiar la relación entre el metabolismo del ácido pipecólico y la biosíntesis de L-lisina en *P. chrysogenum*, se sembraron tres mutantes auxótrofos de lisina sobre medio mínimo Czapek suplementado con ácido D,L-pipecólico (0,1 M) para evaluar su capacidad de crecimiento. Dichos mutantes eran: (i) *P. chrysogenum* HS⁻ (interrumpido en el gen *lys1* que codifica la homocitrato sintasa), (ii) *P. chrysogenum* L2 (mutado en el gen *lys3* que codifica la homoaconitasa) y *P. chrysogenum* TDX195 (interrumpido en el gen *lys2* que codifica la α-aminoadipato reductasa).

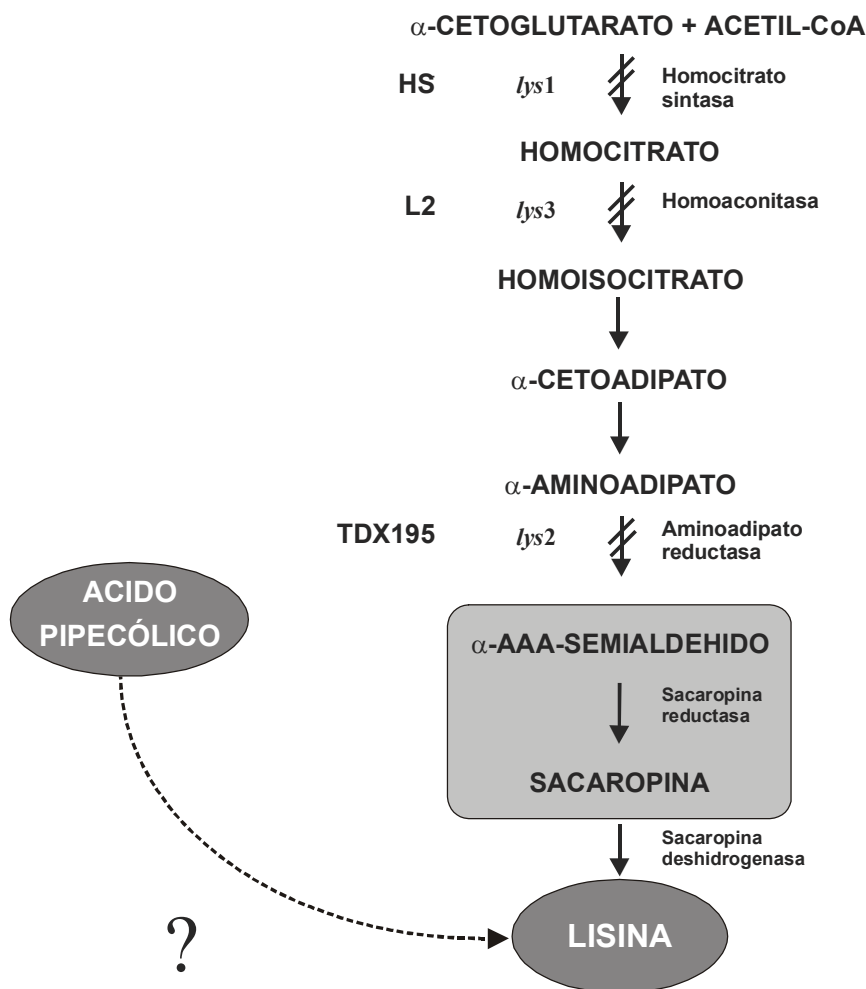


Fig. 1. Ruta de biosíntesis de L-lisina en *P. chrysogenum*. Las reacciones enzimáticas bloqueadas en los mutantes auxótrofos de lisina *P. chrysogenum* HS⁻, L2 y TDX195 se indican con el símbolo //.

Los mutantes HS⁻ y L2 están bloqueados en la síntesis de ácido α -aminoadípico, mientras, que el mutante TDX195 esta bloqueado en la conversión de ácido α -aminoadípico en α -aminoadipato- δ -semialdehído (Fig. 1).

Los resultados (Fig. 2) mostraron que los tres mutantes auxótrofos de lisina eran capaces de crecer tanto en medio mínimo Czapek suplementado con L-lisina¹ como en medio mínimo Czapek suplementado con ácido D,L-pipecólico (en este caso mostrando un crecimiento pobre). Estos resultados sugieren que, en *P. chrysogenum*, el ácido pipecólico se convierte en lisina. Además, este experimento evidencia por primera vez que *P. chrysogenum* es capaz de utilizar el ácido pipecólico para complementar la auxotrofia de lisina.

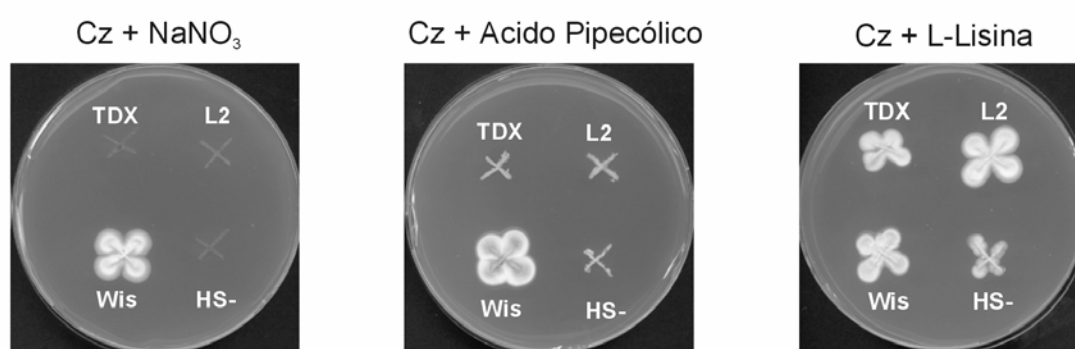


Fig. 2. Crecimiento de la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 y tres mutantes auxótrofos de lisina derivados de ésta sobre medio mínimo Czapek (izquierda), Czapek suplementado con ácido pipecólico (centro) y Czapek suplementado con L-lisina (derecha). Wis: *P. chrysogenum* Wis 54-1255, HS⁻: *P. chrysogenum* HS⁻; TDX: *P. chrysogenum* TDX195; y L2: *P. chrysogenum* L2. Se observa que los tres mutantes auxótrofos de lisina presentan un crecimiento menor en medio Czapek suplementado con ácido pipecólico en comparación con el crecimiento obtenido en medio Czapek con L-lisina.

2. AISLAMIENTO DE MUTANTES DE *P. chrysogenum* *lys*⁻/*pip*⁻

Con el objetivo de estudiar y caracterizar la ruta de conversión del ácido pipecólico en lisina en *P. chrysogenum*, se aislaron mutantes de *P. chrysogenum* HS⁻ incapaces de utilizar ácido pipecólico para complementar la auxotrofia de lisina (mutantes *pip*⁻). Estos mutantes deberían estar alterados en alguna de las enzimas implicadas en la conversión de ácido pipecólico en lisina. Para obtener los mutantes *pip*⁻ se llevó a cabo una mutación con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) de la cepa *P. chrysogenum* HS⁻ como se describe en el apartado 19 de *Materiales y Métodos*. Se analizó la

¹ Nota: en los estudios posteriores, la L-lisina se designará simplemente como lisina. Cuando nos referiremos al isomero D, se especificará siempre con la designación D-lisina.

utilización de ácido pipercolico para complementar la auxotrofia de lisina de 5.000 colonias por réplica en placa, empleando los medios: (i) Czapek (Cz); (ii) Cz + ácido D,L-pipercolico y; (iii) Cz + lisina. De este estudio se aislaron tres mutantes *lys⁻/pip⁻* que se denominan: *P. chrysogenum* 8.46, 7.2 y 10.25. Los mutantes *lys⁻/pip⁻* eran incapaces de crecer en medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipercolico pero eran capaces de crecer en medio mínimo Czapek suplementado con lisina (Tabla 1).

3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES *lys⁻/pip⁻* DE *P. chrysogenum*

3.1. Crecimiento

Con el objetivo de determinar si el ácido pipercolico se convierte directamente en lisina o si se transforma en algún intermediario de la ruta biosintética de lisina, los mutantes *lys⁻/pip⁻* se sembraron en placas sobre medio mínimo Czapek suplementado con ácido α -aminoadípico y se procedió a estudiar su crecimiento incubándolas a 28 °C durante varios días.

Los resultados mostraron (Tabla 1) que el mutante 10.25 era incapaz de crecer en medio mínimo suplementado con ácido α -aminoadípico, indicando que la mutación *pip⁻* de la cepa 10.25 alteraba algún punto de la segunda parte de la ruta de biosíntesis de lisina (en la sacaropina reductasa o sacaropina deshidrogenasa), mostrando, por tanto, que la ruta biosintética de lisina estaba involucrada en la conversión de ácido pipercolico en lisina en *P. chrysogenum* (Fig. 1).

Por otro lado, los resultados mostraron que el mutante 7.2, aunque era incapaz de crecer en medio mínimo suplementado con ácido pipercolico, era capaz de crecer en medio mínimo Czapek suplementado con ácido α -aminoadípico, indicando que la mutación *pip⁻* de la cepa 7.2 podría encontrarse en algún punto externo a la ruta biosintética de lisina.

3.2. Tasa de Reversión

Una característica importante que se debe conocer de una cepa mutante es la probabilidad que existe de que la mutación revierta regenerándose el fenotipo original de la cepa parental. Para determinar el porcentaje de reversión de los mutantes *lys⁻/pip⁻* de *P. chrysogenum*, se obtuvo una suspensión de esporas de cada uno de los mutantes. Una vez conocida la concentración de esporas viables en cada una de las suspensiones, se procedió a sembrar aproximadamente 1×10^9 esporas de cada una de las cepas en medio mínimo Czapek. Después de 5 días de incubación a 28 °C se observó la aparición de colonias revertientes.

Los cálculos y el análisis de los datos obtenidos permitieron conocer que los mutantes *lys⁻/pip⁻* 7.2 y 10.25 presentaban una alta estabilidad fenotípica (Tabla.1), mientras que, por el contrario, el mutante 8.46 mostraba una alta inestabilidad de su mutación con una tasa de reversión aproximada de un revertiente por cada 10⁶ esporas. Teniendo en cuenta la tasa de reversión de los distintos mutantes, se continuó el estudio con los mutantes *lys⁻/pip⁻* 10.25 y 7.2 por la alta estabilidad fenotípica que presentan sus mutaciones.

Tabla 1. Crecimiento de los mutantes de *P. chrysogenum lys⁻/pip⁻* sobre medio mínimo Czapek suplementado con L-lisina, ácido D,L-pipecólico y ácido α -aminoadípico.

CRECIMIENTO EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO						
Cepas	Defecto Genético	Czapek	Czapek + Lisina	Czapek + Pipecólico	Czapek + α -AAA ^b	Tasa de reversión
<i>P. chrysogenum</i> Wis 54-1255	No	Si	Si	Si	Si	N.d. ^a
<i>P. chrysogenum</i> TDX195	<i>lys2⁻</i>	No	Si	Si	No	< 4 x 10 ⁻⁹
<i>P. chrysogenum</i> HS ⁻	<i>lys1⁻</i>	No	Si	Si	Si	< 3,3 x 10 ⁻⁸
<i>P. chrysogenum</i> 8.46	<i>lys1⁻; pip^{-c}</i>	No	Si	No	N.d. ^a	3,3 x 10 ⁻⁶
<i>P. chrysogenum</i> 7.2	<i>lys1⁻; pip^{-c}</i>	No	Si	No	Si	< 6,2 x 10⁻⁹
<i>P. chrysogenum</i> 10.25	<i>lys1⁻; pip^{-c}</i>	No	Si	No	No	< 5,8 x 10⁻⁹

^a N.d., No determinado; ^b α -AAA, ácido α -aminoadípico; ^c *pip⁻*, bloqueado en la conversión de ácido pipecólico en lisina.

4. ESTUDIO DE LA VÍA DE CONVERSIÓN DE ÁCIDO PIPECÓLICO EN LISINA EN *P. chrysogenum*

4.1. En *P. chrysogenum* el ácido pipecólico se convierte en lisina por acción de la sacaropina reductasa y de la sacaropina deshidrogenasa

La sacaropina reductasa y la sacaropina deshidrogenasa están implicadas respectivamente en la conversión de α -aminoadipato- δ -semialdehído en sacaropina (la forma lineal de P6C) y de ésta en lisina (Fig. 1). Para determinar si el ácido pipecólico se convertía en lisina a través de la sacaropina reductasa y/o de la sacaropina deshidrogenasa, se procedió a medir dichas actividades enzimáticas en

las cepas de *P. chrysogenum*: Wis 54-1255, 10.25 y 7.2. Los extractos crudos analizados se obtuvieron a partir de micelio crecido en medio mínimo MDFP suplementado con L-lisina (25 mM) y cosechado a las 48 horas.

Los resultados (Tabla 2) mostraron que la actividad sacaropina deshidrogenasa estaba presente en todas las cepas estudiadas. Sin embargo, el mutante 10.25 no presentaba actividad sacaropina reductasa. Por lo tanto, estos resultados sugieren que: (i) el mutante 10.25 está bloqueado en la sacaropina reductasa; (ii) que dicha enzima está implicada en la conversión de ácido pipercolico en lisina en *P. chrysogenum* y; (iii) que el ácido pipercolico se incorpora en la ruta biosintética de lisina a través del α -aminoadipato δ -semialdehído (Fig. 1).

Tabla 2. Actividades enzimáticas medida en extractos crudos de micelio de los mutantes *P. chrysogenum* *lys⁻/pip⁻* 10.25 y 7.2 crecidos en medio mínimo Czapek suplementado L-lisina

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS (mU/mg proteína)			
Cepas	Sacaropina deshidrogenasa	Sacaropina reductasa	Pipecolato oxidasa
<i>P. chrysogenum</i> Wis 54-1255	381	44	2,1
<i>P. chrysogenum</i> HS ⁻	402	46,1	1,9
<i>P. chrysogenum</i> 10.25	571	0	2,1
<i>P. chrysogenum</i> 7.2	450	35,4	0

4.2. El ácido pipercolico se incorpora en la ruta biosintética de lisina mediante su conversión en P6C por acción de la pipecolato oxidasa

La pipecolato oxidasa cataliza la conversión de ácido pipercolico en ácido piperideín-6-carboxílico (P6C; el cual es la forma ciclada del α -aminoadipato- δ -semialdehído) como ha sido descrito en varios organismos (Payton y Chang, 1982; Kurtz y Bhattacharjee, 1975; Kinzel y Bhattacharjee, 1982; IJlst *et al.*, 2000; Dodt *et al.*, 2000). Para determinar si el ácido pipercolico se convierte en P6C por acción de la pipecolato oxidasa en *P. chrysogenum* se llevaron a cabo dos experimentos que se describen a continuación:

4.2.1. Ensayo de la actividad pipecolato oxidasa en los mutantes *P. chrysogenum lys⁻/pip⁻*

Para profundizar en la caracterización de los mutantes *P. chrysogenum lys⁻/pip⁻*, se procedió a medir la actividad pipecolato oxidasa en las cepas 10.25 y 7.2 a partir de extractos de micelio crecido en medio mínimo MDFP suplementado con L-lisina (25 mM) y cosechado a las 48 horas.

Los resultados obtenidos (Tabla 2) mostraron que la actividad pipecolato oxidasa estaba presente tanto en la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 como en el mutante 10.25. Sin embargo, los resultados revelaron que el mutante *P. chrysogenum* 7.2 no presentaba dicha actividad, por lo cual, esta cepa no podía complementar su auxotrofia de lisina cuando se le añadía ácido pipecólico al medio de cultivo. Estos resultados indican que la actividad pipecolato oxidasa está implicada en la conversión de ácido pipecólico en lisina en *P. chrysogenum*.

4.2.2. Ensayo de la actividad pipecolato oxidasa en *P. chrysogenum* Wis 54-1255

Para determinar si la pipecolato oxidasa cataliza la conversión de ácido pipecólico en P6C en *P. chrysogenum* Wis 54-1255, se procedió a medir dicha actividad enzimática en extractos de micelio crecido en tres condiciones distintas: (i) en medio mínimo MDFP con NH_4 (37,8 mM) como única fuente de nitrógeno; (ii) en medio mínimo MDFP con ácido D,L-pipecólico (25 mM) como única fuente de nitrógeno; y (iii) en medio mínimo MDFP con NH_4 (37,8 mM) y ácido D,L-pipecólico (25 mM) como fuente de nitrógeno.

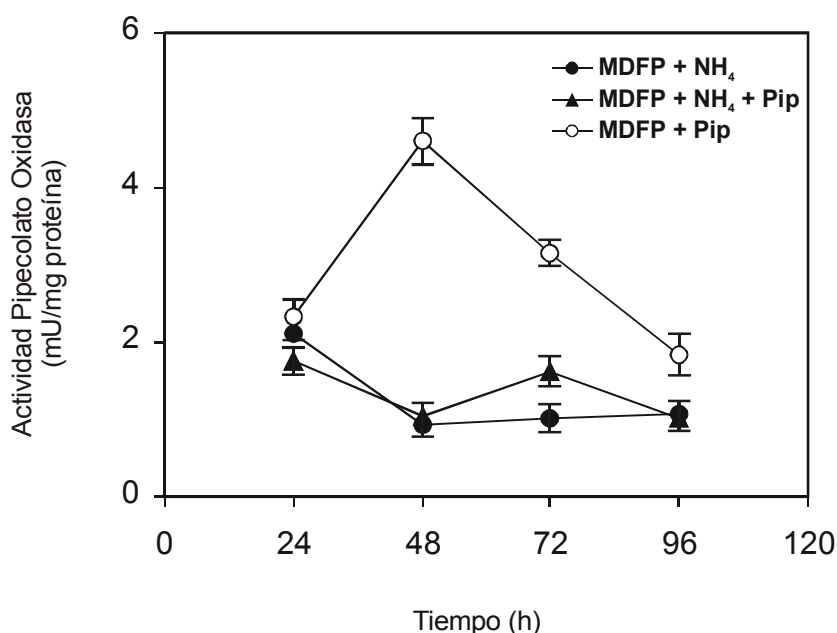


Fig. 3. Actividad pipecolato oxidasa en *P. chrysogenum* Wis 54-1255 en medio definido de producción (MDFP) suplementado con ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno (O), con ácido pipecólico y amonio (▲) y solamente con amonio (●). Se observa que la actividad pipecolato oxidasa se induce en medio mínimo MDFP con ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno (O) y se reprime cuando se le añade amonio al medio.

Los resultados obtenidos (Fig. 3) revelaron que, cuando *P. chrysogenum* Wis 54-1255 se crece con ácido pipercolico como única fuente de nitrógeno, se induce la actividad pipercolato oxidasa, lo cual, sugiere que el ácido pipercolico se cataboliza a través de su conversión en P6C por acción de la pipercolato oxidasa.

Por otro lado, es importante resaltar que la inducción de la pipercolato oxidasa por ácido pipercolico se inhibe cuando se añade amonio (37,8 mM) junto con ácido pipercolico al medio de cultivo, tal como ocurre con otros aminoácidos en *P. chrysogenum* (Bañuelos *et al.*, 2000).

Estos resultados indican que la primera reacción enzimática en la conversión de ácido pipercolico en lisina en *P. chrysogenum*, se lleva a cabo a través de la pipercolato oxidasa, tal como sucede en *R. glutinis* (Kurtz y Bhattacharjee, 1975; Kinzel y Bhattacharjee, 1982).

5. CLONACIÓN DEL GEN *lys7* QUE CODIFICA LA SACAROPINA REDUCTASA DE *P. chrysogenum*

5.1. Complementación de la mutación *lys⁻/pip⁻* de *P. chrysogenum* 10.25

Con el propósito de profundizar en el estudio sobre la caracterización de la conversión de ácido pipercolico en lisina en *P. chrysogenum*, se procedió a clonar el gen que complementa la mutación *pip⁻* de la cepa 10.25. Este mutante deriva de la cepa *P. chrysogenum* HS⁻ que se encuentra interrumpida en el gen *lys1* que codifica la homocitrato sintasa. Por lo cual, para la clonación del gen responsable del fenotipo *pip⁻*, se realizó una co-transformación utilizando el plásmido pLARA, plásmido de replicación autónoma que contiene el gen *lys1* bajo el control de su propio promotor (Bañuelos *et al.*, 2000), y una librería genómica *P. chrysogenum* construida en el plásmido pAMPF9L (ambos plásmidos se describen en el apartado 2 de *Materiales y Métodos*). El plásmido pAMPF9L contiene un fragmento de la región *AMA1* que le confiere la capacidad de replicarse autónomamente en *Penicillium chrysogenum* (Fierro *et al.*, 1996; Bañuelos *et al.*, 2003), lo cual, permite recuperar los plásmidos del ADN genómico de los co-transformantes que hayan complementado la mutación *lys⁻/pip⁻*.

Se obtuvieron dos co-transformantes (denominados T1 y T2) que fueron seleccionados directamente en medio mínimo Czapek. Los transformantes T1 y T2 eran protótrofos indicando que la doble mutación *lys⁻/pip⁻* se había complementado y, además, eran capaces de convertir ácido pipercolico en lisina, ya que podían crecer en medio mínimo suplementado con ácido pipercolico.

5.2. Recuperación de los plásmidos que complementan la mutación *lys⁻/pip⁻* de *P. chrysogenum* 10.25

El ADN genómico obtenido de los transformantes T1 y T2 se transformó en *E. coli* DH10B con la finalidad de rescatar los plásmidos presentes en sus genomas, tal como se describe en el apartado 11 de *Materiales y Métodos*. El análisis de la población de plásmidos rescatados demostró que algunos de estos plásmidos eran idénticos (Fig. 4A, carriles 2, 3, 4, 5, 7, 11 y 15) al plásmido pLARA (Fig. 4A, carril 1), mientras, que el resto de los plásmidos presentaban un patrón de restricción distinto (Fig. 4A, carriles 6, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19 y 20). Para identificar cuáles de estos plásmidos portaban el gen *lys1*, se procedió a realizar una hibridación de *Southern* utilizando como sonda un fragmento interno *AccI* de 650 pb del gen *lys1*.

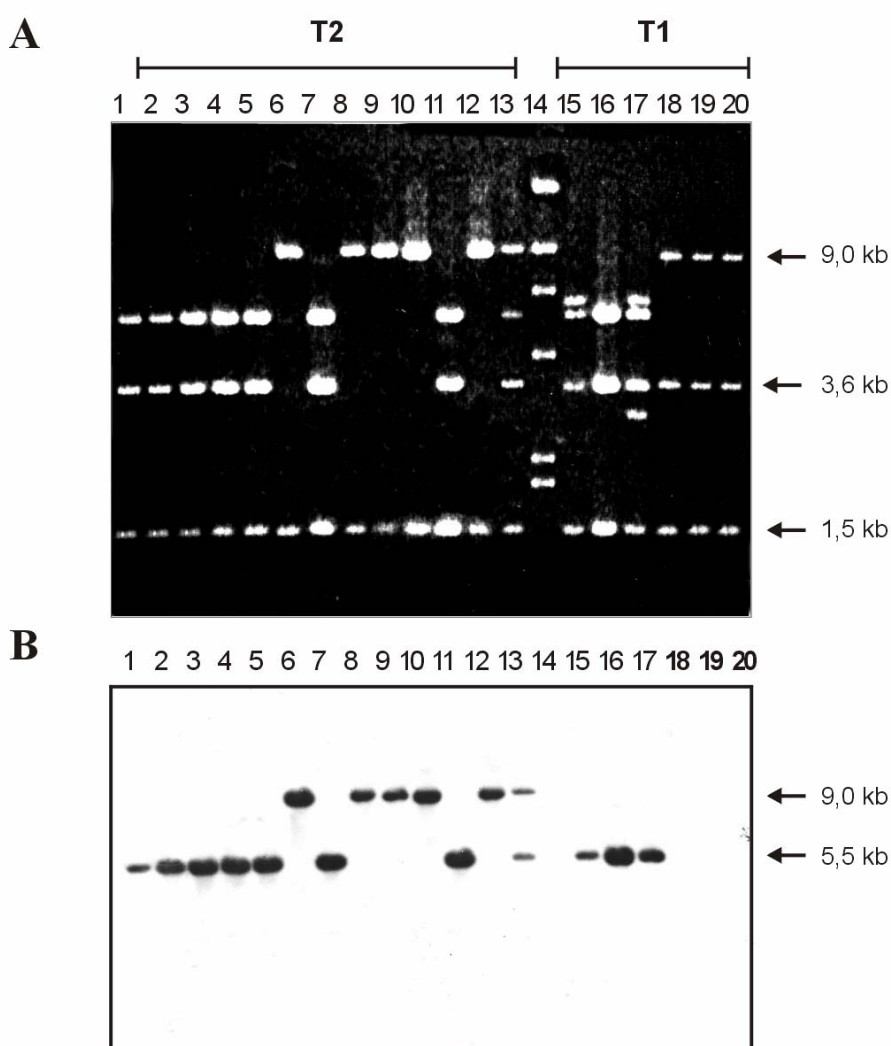


Fig. 4. (A), Digestión del DNA plasmídico de los co-transformantes T1 (carriles 15 al 20) y T2 (carriles 2 al 13) con la enzima *HindIII*, después de ser rescatados en *E. coli* DH10B. Como control se utilizó el plásmido pLARA que posee el gen *lys1* de *P. chrysogenum* (carril 1). (B), Hibridación con el fragmento interno *AccI* de 650 pb del gen *lys1* (sonda) con los plásmidos presentes en los transformante T1 y T2. Se observa que los plásmidos recuperados del transformante T1 de los carriles 18, 19 y 20 no hibridaron con la sonda *lys1*. Estos plásmidos contienen un inserto que complementa la mutación *pip⁻* de la cepa 10.25.

Los resultados (Fig. 4B) mostraron que hubo hibridación con todos los plásmidos, excepto con los plásmidos presentes en los carriles 18, 19 y 20, indicando que, posiblemente, éstos provenían de la librería genómica y contenían un fragmento de ADN que complementaba la mutación *pip*⁻. A este plásmido se le denominó p10T1.

5.3. Complementación de la mutación *lys*⁻/*pip*⁻ de *P. chrysogenum* 10.25 con los plásmidos pLARA y p10T1

Con el objeto de comprobar si el plásmido p10T1 contenía el fragmento de ADN responsable de complementar la mutación *pip*⁻, se realizó una co-transformación del mutante 10.25 con los plásmidos pLARA (complementa la mutación del gen *lys1*) y p10T1 (proveniente de la genoteca, recuperado del ADN total del co-transformante T1). Como resultado de la co-transformación se obtuvieron numerosos transformantes protótrofos crecidos en medio mínimo Czapek. Posteriormente se rescataron los plásmidos de tres transformantes protótrofos seleccionados al azar. El análisis de restricción demostró que los plásmidos rescatados eran pLARA y el p10T1 (Fig. 5).

Los resultados obtenidos demuestran que ambos plásmidos eran necesarios para complementar la mutación doble (*lys*⁻ y *pip*⁻) presente en la cepa *P. chrysogenum* 10.25. Además, se confirma que el plásmido p10T1 contenía el fragmento de ADN que complementa la mutación *pip*⁻.

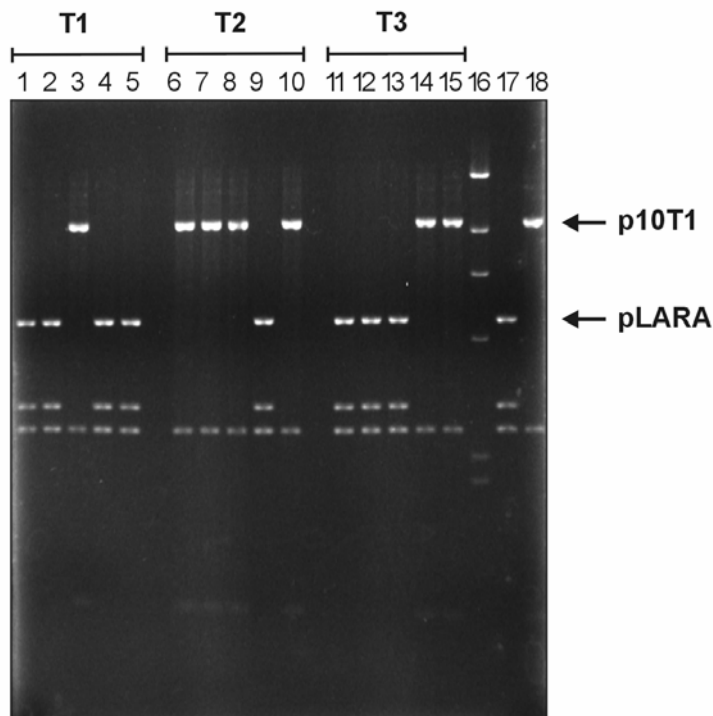


Fig. 5. Plásmidos rescatados en *E. coli* DH10B de tres co-transformantes protótrofos obtenidos por retransformación del mutante 10.25: T1 (carriles 1 al 5), T2 (carriles 6 al 10) y T3 (carriles 11 al 15). El ADN plasmídico fue digerido con la enzima de restricción *Pst*I. Plásmidos control: pLARA (carril 17) y p10T1 (carril 18). Se observa que los plásmidos pLARA y p10T1 están presentes en los co-transformantes derivados de la cepa 10.25, los cuales, complementan la doble auxotrofia de lisina presente en dicho mutante.

6. SECUENCIACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA LA SACAROPINA REDUCTASA DE *P. chrysogenum*

6.1. Estrategia de secuenciación del ORF1

Una vez localizado el fragmento de ADN que complementaba la mutación *pip⁻* presente en la cepa *P. chrysogenum* 10.25, era necesario secuenciarlo para poder caracterizarlo. El análisis de restricción del plásmido p10T1 reveló la presencia en dicho plásmido de un inserto de ADN genómico de aproximadamente 6 kb. Para facilitar la secuenciación de dicho inserto, se procedió a subclonar el fragmento *Bam*HI/*Pst*I de 5,2 kb en un pBluescript SK+, obteniéndose el plásmido p10PB (descrito en el apartado 3.1 de *Materiales y Métodos*).

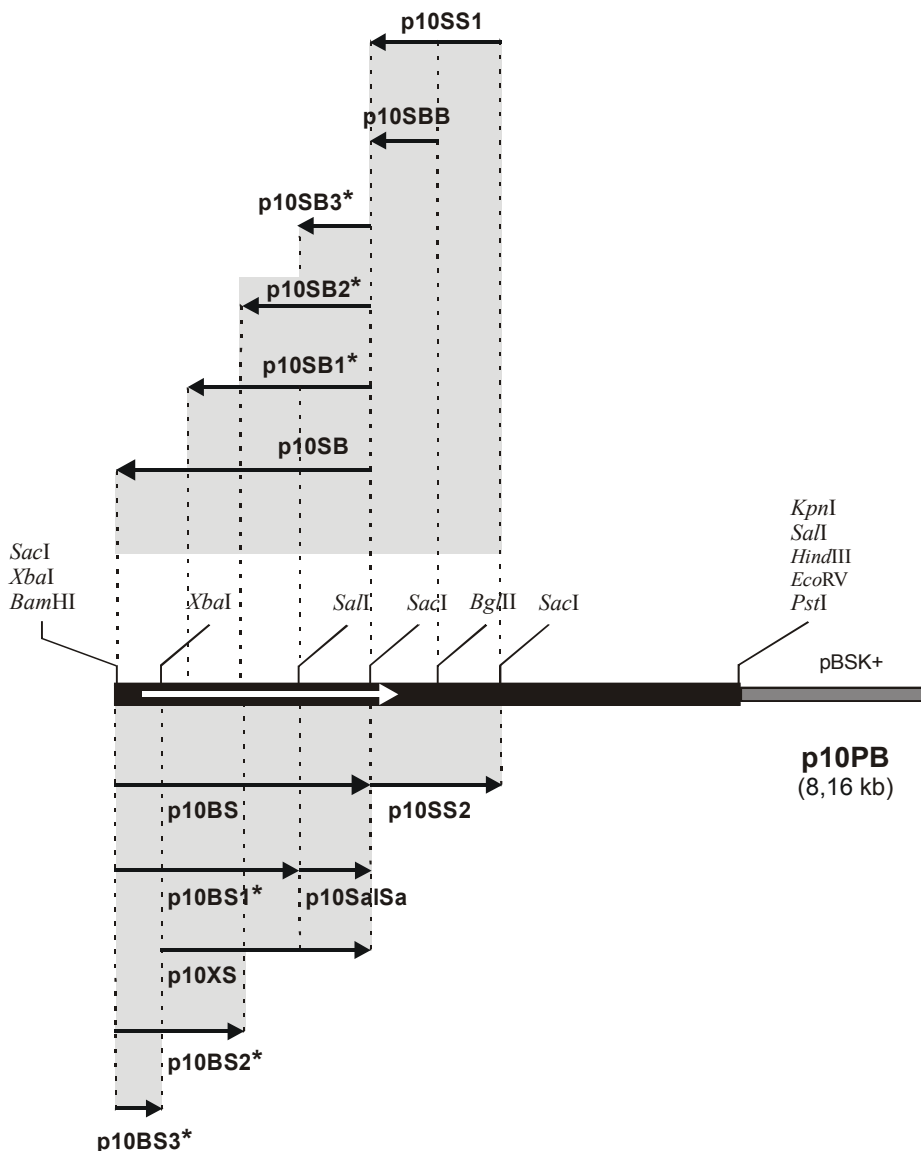


Fig. 6. Clones utilizados para la secuenciación del gen *lys7* de *P. chrysogenum*. Mapa físico de los plásmidos p10BS y p10SB construidos mediante la inserción del fragmento *Sac*I de 2,2 kb del plásmido p10PB en ambas orientaciones en el sitio *Sac*I del vector pBSK+. Los clones obtenidos mediante delección unidireccional se indican con asteriscos (*).

Después de realizar un mapeo de restricción más detallado del inserto contenido en el plásmido p10PB, se procedió a extraer un fragmento *SacI* de 2,2 kb y subclonarlo en ambas orientaciones en un vector pBluescript SK+ previamente digerido *SacI*. Los plásmidos obtenidos se denominaron p10BS y p10SB (descritos en el apartado 3.2 de *Materiales y Métodos*).

Dichos plásmidos se utilizaron para obtener una colección de clones de tamaño decreciente mediante deleciones unidireccionales por el sistema *Erase-a-base* como describe el apartado 9.2.6 de *Materiales y Métodos*. Se seleccionaron varios clones con diferencias de tamaño entre 300 y 500 pb, que permitieron leer por ambas cadenas la secuencia completa del fragmento *SacI* de 2,2 kb (Fig. 6).

6.2. Secuencia de nucleótidos

Los clones seleccionados permitieron leer la secuencia de nucleótidos de una región de ADN de 2.987 pb. El protocolo seguido para la secuenciación del ADN se describe en el apartado 18 de *Materiales y Métodos*. Posteriormente, se analizaron las secuencias de nucleótidos empleando el paquete informático DNASTAR, observándose la existencia de un marco de lectura abierta (ORF1) de 1.953 pb interrumpido por la presencia de diez posibles intrones (Fig. 7).

6.3. Confirmación del número, tamaño y localización de intrones en el ORF1

Para confirmar la presencia y el número de intrones del ORF1 fue necesario llevar a cabo, antes de su secuenciación, la retrotranscripción de las moléculas de ARN mensajero maduro a moléculas de ADN, tal como se describe en el apartado 9.3.2 de *Materiales y Métodos*. Este proceso se llevó a cabo utilizando el sistema *SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq* (Gibco BRL; Life Technologies). Se realizó una amplificación por RT-PCR usando como molde RNA total de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 extraído de micelio recogido a las 24 horas de fermentación y como cebadores se emplearon los oligonucleótidos Ia: 5'-TGCGATGTTCTCCAGTTG-3' y Ib: 5'-CGCATATACATCCCATTG-3'. El resultado de la RT-PCR mostró una banda de ADNc del tamaño esperado (1.350 pb) luego del procesamiento de los diez intrones. La banda de ADNc amplificada fue secuenciada por ambas cadenas.

El número, tamaño y localización de los intrones se determinaron mediante el alineamiento de las secuencias de ADN genómico y ADNc. Los resultados mostraron que el ORF1 contenía diez intrones de 104, 62, 53, 50, 52, 59, 52, 55, 53 y 63 nucleótidos respectivamente, los cuales, eran eliminados en los sitios de procesamiento correspondientes localizados entre los nucleótidos: 53-156, 211-272, 455-507, 629-678, 752-803, 847-905, 920-971, 1019-1073, 1178-1230 y 1795-1857, enumerados a partir del codón de inicio de la transcripción ATG (Fig. 7).

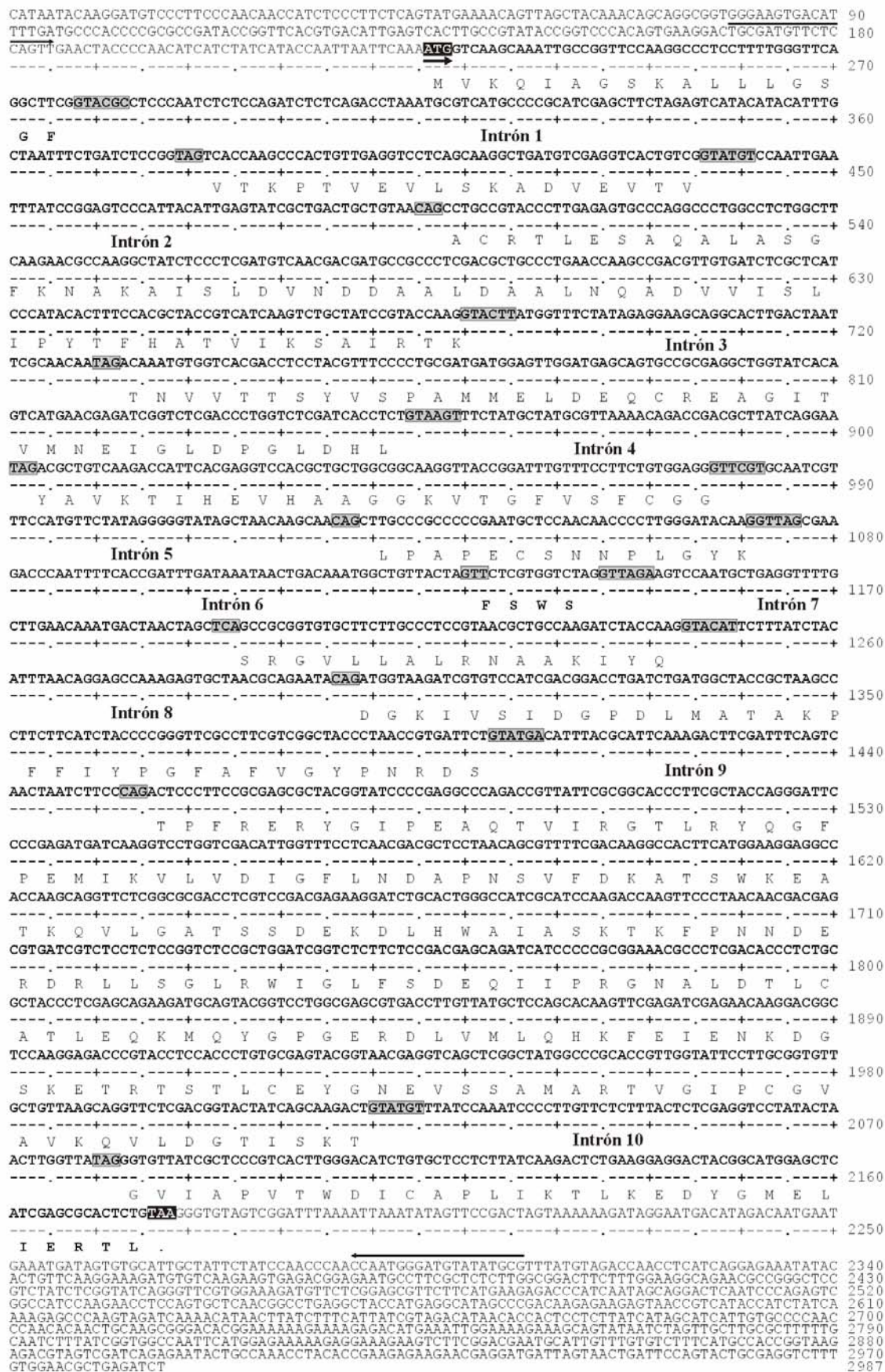


Fig. 7. Secuencia de nucleótidos en la que se encuentra el ORF1 del gen de la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum*. Se señalan los diez intrones que interrumpen el marco de lectura y las secuencias de entrada y salida de dichos intrones. Las flechas presentes en la figura representan los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por RT-PCR y secuenciación del fragmento de ADNc obtenido, con lo que se demostró la presencia de los diez intrones que interrumpen el ORF1.

7. MOTIVOS ENCONTRADOS EN LA SACAROPINA REDUCTASA DE *P. chrysogenum* Y MECANISMO MOLECULAR DE SÍNTESIS DE SACAROPINA

7.1. Análisis de la secuencia aminoacídica deducida del ORF1

EL ORF1, una vez procesados los diez intrones, codifica una proteína de 449 aminoácidos con un peso molecular deducido de 48,8 kDa. La secuencia de aminoácidos deducida del ORF1 se comparó con las sacaropinas reductasas deducidas por otros microorganismos fúngicos, utilizando el programa informático *ClustalW* (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>).

<i>P. chrysogenum</i>	MVKQIAGSKALLLGSFVTKPTVEVLS-KADVEVTVACRTLESAQALASGFKNAKAISLD	59
<i>N. crassa</i>	M---ASQHKVLMGAGFVTRPTLDVLS-EAGIPVTVACRTLASAQKLESGVKNATPISLD	56
<i>M. grisea</i>	M---ATKSVLMLGSGFVTRPTLDVLT-DSGIKVTVACRTLESAKKSAGVQHSTPISLD	55
<i>S. cerevisiae</i>	M-----GKNVLLGSGFVAQFVIDTLAANDDINVTVACRTLANAQALAKP-SGSKAISLD	54
<i>S. pombe</i>	M-----PSILLGSGFVAHETLEYLSRRKENNITVACRTLSKAEAFINGIPNSKAIALD	54
	VNDDAALDAALNQADVVI SLI PYTFHATVI KSAIRTKTNVVTTSYVSPAMMELDEQCREAGITVMNEIGLDPGLDH	135
	VTNDEALDAEVAKHDLVI SLI PYTFHATVI KSAIRQKKHVVTTSYVSPAMMELDAEAKAAGITVMNEIGLDPGIDH	132
	VNDDAALDAEVAKHDLVI SLI PYTFHATVI KSAIRQKKHVVTTSYVSPAMMELDQAAKDAGITVMNEIGLDPGIDH	131
	VTDDAALDKVLADNDVVI SLI PYTFHFNVKSARITKTDVVTSSYI SPALRELEPEIVKAGITVMNEIGLDPGIDH	130
	VNDEAALEKAVSEHDLTI SLI PYTYHATVMKAAIKHGKHVCTTSYVNPMAELEEAAIKAGSICMNEIGVDPGIDH	130
	LYAVKTIHEVHAAGGKVTGFVFCGGLPAPCEASNPLGYKFSWSRGGVLLALRNAAKIYQDGKIVSIDGPDLMATA	210
	LYAIKTIDEVHQAGGKILSFLSYCGGLPAPEDSDNPLGYKFSWSRGGVLLALRNAGKWWQDGKIVEVEGKDLMKMA	208
	LYAIKTIIEGVHAAGGKIKTFLSYCGGLPAPESDNPLGYKFSWSRGGVLLALRNAASFYKDGKVTNVAGPELMATA	207
	LYAVKTIDEVHRAGGKLSFLSYCGGLPAPEDSDNPLGYKFSWSRGGVLLALRNSAKYWKDGKIVTSSEDLMATA	206
	LYAIKTIIEVHKAGGKIKSFLSYCGGLPAPEDSDNPLGYKFSWSRGGVLLALRNSAKFYENGLVEIDGKDLMETA	206
	KPFYIYPGFYAFVGYPNRSTPFRERYGIPEAQTIVIRGTLRYQGFPFEMI KVLVDIGFLNDAPNSVFDK---ATSWKE	283
	KPYFIYPGYAFVAYPNRSTIYKERYNIPEAQTIVIRGTLRYQGFPFQFIKTLVDIGFLDdTARESLSK---QTPWKE	281
	KPYFIYPGFYAFVAYPNRSTPYKERYQIPEADNIVRGTLRYQGFPFQFIKVLVDIGFLSDEEQPFLKE---AIPWKE	280
	KPYFIYPGYAFVAYPNRSTLFDKDLHYIPEAETVIRGTLRYQGFPFQFVKALVDMGMLKDDANEI FSK---PIAWNE	279
	KPYFIYPGYAFVAYPNRSTVYQERYQIPEAETIIRGTLRYQGFPFQFVHCLVDMGFLDETAQEYLSPEAPALPWKE	282
	ATKQVLGATSSDEKDLHWAIAASKTKFPNNDERDRLLSGLRWIGLFSDEQIIPRGNALDTLTCATLEQKMQYGPGERD	359
	ATKEIVGAASSSQADLEAAILSKATFESAEDQKRILSGLRWIGLFSDETITPRGNPLDTLTCATLEQKMQFEGERD	357
	ATQKIVKASSASEQDIVSTIVSNATFESTEEQKRIVAGLKWLGIFSDKKITPRGNALDTLTCATLEQKMQFEGERD	356
	ALKQYLGAKSTSKEDLIASIDSKATWKDDEDRERILSGFAWLGLFSDAKITPRGNALDTLTCARLEELMQYEDNERD	355
	VTARVIAEESSEADLIKKISSIHKFKDEDDKKRILNGLKWLGMFSKPVTPRGNPLDTLTCATLEELMQYEEGERD	358
	LVMLQHKFEIENKDGSKETRTSTLCEYGNVSS---SAMARTVGI PCGVAVKQVLDGTISKTGVIAPVTDICAPL	428
	LVMLQHKFEIEHADGSRETSTLVEYGDPKGY---SAMAKTVGVC CAVAVKQVLSGQISGKGVLPAMSTDITEPL	430
	LVMLQHKFEIENKDGSKETRTSSLCEYGAPIGSGGYSAMAKFVGVPCAVAVKQVLDGTISDRGVLPAMNSKINDPL	432
	MVVLQHKFGIEWADGTTETRTSTLVDYGVK---GGYSMAATVGYFVAIATKQVLDGTIKGPGLLAPYSPEINDPI	428
	MLILQHKFEVETKEGKRQTRTCTLLDYGVP---NGYTSMAKLVGVC GVAATQQILDGVINTPGVLPANMDMKLCPGL	431
	IKTLKEDYGMELIERTL---	449
	MKELHEKYGITMI EKTIS---	448
	MKELKEKYGIECKEKVVA--	450
	MKELKDKYGIYLKEKTVA--	446
	IDTL-AKEGIRLEEEIIDE	450

Fig. 8. Alineamiento de la proteína deducida del ORF1 de *P. chrysogenum* con sacaropinas reductasas deducidas de *N. crassa*, *M. grisea*, *S. cerevisiae* y *S. pombe*. Se han sombreado los aminoácidos que son idénticos en las cuatro proteínas comparadas.

El alineamiento de las secuencias proteicas (Fig. 8) mostró un alto porcentaje de aminoácidos idénticos entre la proteína deducida del marco de lectura (ORF1) de *P. chrysogenum* y las sacaropinas reductasas de *Neurospora crassa* (70,4 % de identidad), *Magnaphorte grisea* (66,6 % de identidad), *Saccharomyces cerevisiae* (63,2 % de identidad) y *Schizosaccharomyces pombe* (60 % de identidad). Además, es interesante destacar que el extremo carboxilo terminal de la proteína deducida del marco de lectura abierta del ORF1 de *P. chrysogenum* es similar (cerca del 38 % de identidad) a la región carboxilo terminal (entre los residuos 500-1000 aproximadamente) de la proteína bifuncional lisina- α -cetoglutarato reductasa/lisina deshidrogenasa (SR/SDH) de varios organismos tales como: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Zea mays* y *Arabidopsis thaliana* (Kemper *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2000a, b).

Estos resultados sugieren que la proteína codificada por el ORF1 corresponde a la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum*. El gen que codifica la sacaropina reductasa en *P. chrysogenum* ha sido denominado *lys7*.

En resumen, los resultados bioquímicos, sustentados con los datos obtenidos por biología molecular, han permitido caracterizar la ruta de conversión de ácido pipecólico en lisina en *P. chrysogenum*. Dicha ruta de conversión se lleva a cabo utilizando α -aminoadipato- δ -semialdehído y sacaropina como intermediarios y la acción de tres enzimas esenciales: la pipecolato oxidasa, la sacaropina reductasa y la sacaropina deshidrogenasa. En conclusión, el ácido pipecólico se convierte en lisina a través de su transformación en ácido piperideín-6-carboxílico (P6C) por acción de la pipecolato oxidasa, el P6C (que es la forma ciclada del α -aminoadipato- δ -semialdehído) se convierte en sacaropina y lisina mediante dos reacciones enzimáticas consecutivas catalizadas por la sacaropina reductasa y sacaropina deshidrogenasa respectivamente (Fig. 9).

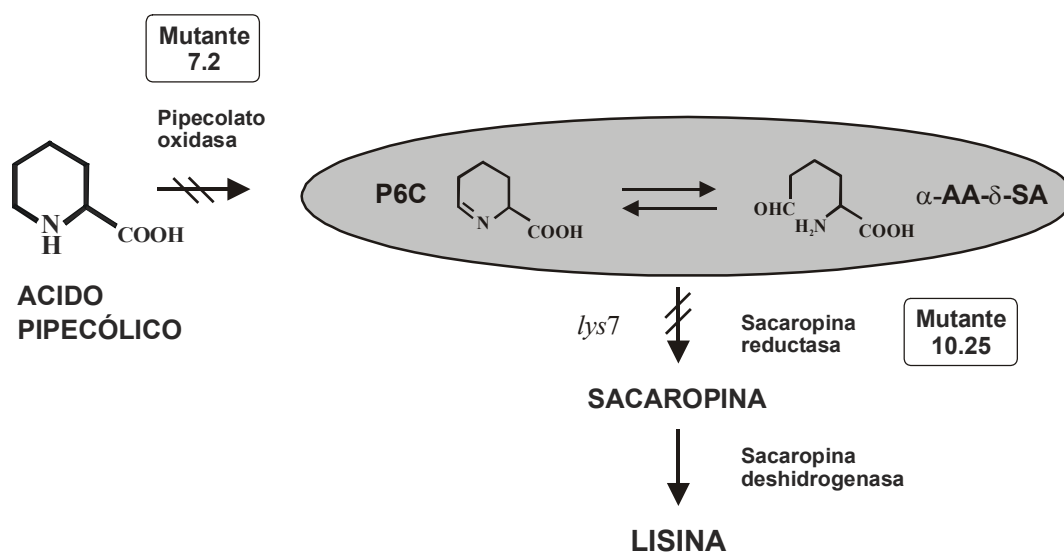


Fig. 9. Ruta de conversión de ácido pipecólico en lisina en *P. chrysogenum* vía α -aminoadipato- δ -semialdehído y sacaropina. α -AA- δ -SA: α -aminoadipato- δ -semialdehído; P6C: ácido piperideín-6-carboxílico; *lys7*: gen que codifica la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum*. Los pasos bloqueados en los mutantes 7.2 y 10.25 están indicados con el símbolo //.

7.2. Predicción de la estructura secundaria y terciaria de la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum*

Con el propósito de profundizar sobre la caracterización de la proteína deducida del gen *lys7*, se procedió a estudiar *in silico* la estructura secundaria y terciaria de la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum*.

7.2.1. Predicción de la estructura secundaria de la sacaropina reductasa

Para la predicción de la estructura secundaria de la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum*, se utilizaron diversos programas disponibles en servidores tales como: PredictProtein-PHDsec (The PredictProtein server, Columbia, USA; <http://dodo.cpmc.columbia.edu/predictprotein/>) y Psi-Pred (Protein structure prediction server, secondary structure & transmembrane topology, Brunel, UK; <http://insulin.brunel.ac.uk/psipred/>). Éste último es un programa de alta fiabilidad para la predicción de las estructuras típicas de los polipéptidos, que se basa en un sistema de redes neuronales alimentado con *Blast* y es capaz de conseguir una media de predicciones correctas cercanas al 76 %.

Los resultados mostraron que la proteína en estudio se encuentra en un 31,6 % formando α -hélices, en un 20,3 % formando láminas β y en un 48,1 % formando horquillas (loop). Tomando en cuenta los valores asociados a las estructuras típicas de los polipéptidos que se han encontrado en la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum* se puede predecir que esta proteína pertenece a la clase alfa-beta (% α -hélices < 30; y % láminas β > 20).

La predicción de dominios y de la familia de la proteína se realizó utilizando diversas herramientas bioinformáticas, tales como Pfam (Protein families database of alignments y HMMs; Sanger, UK; <http://www.sanger.ac.uk/Pfam/>). Pfam es una base de datos de familias de proteínas que busca en las moléculas dominios relacionados con su función específica tomando en cuenta su posición en el alineamiento múltiple. La predicción obtenida (Evalue: 0,043) señala que la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum* es miembro de la familia de las óxidorreductasas (NAD-binding Rossmann fold). Las óxidorreductasas es una familia de enzimas que se caracterizan por presentar un dominio de unión conocido como Rossmann fold, el cual, es estructuralmente muy conservado en muchas proteínas y consiste en una alternancia de láminas β y de α -hélices (Rossmann *et al.*, 1975). Esta familia de enzimas utiliza NADP o NAD como donador/aceptor de electrones y se conoce como la familia GFO_IDH_MocA² en la base de datos Swiss-Prot.

En *P. chrysogenum*, la sacaropina reductasa presenta una variante del dominio Rossmann fold que une NADPH. Dicho dominio se localiza en el extremo amino terminal de la proteína, comienza en

² GFO_IDH_MocA. Número de acceso en Pfam y Swiss-Prot: PF01408. GFO: Glucosa-Fructosa Oxidorreductasa de *Zymomonas mobilis* implicada en la ruta biosintética de gluconato-sorbitol. MocA: es una proteína implicada en el catabolismo de rizopina en *Rhizobium* MocA.

el aminoácido 8 y termina en el aminoácido 127. En *P. chrysogenum*, el dominio Rossmann fold de unión a NADPH contiene un motivo $\beta\alpha\beta$ con una secuencia consenso conservada: Gly-X-Gly-X-X-Gly (donde X puede ser cualquier aminoácido), que se encuentra localizada en el extremo carboxilo terminal de la primera lámina β (lesk, 1995; Johansson *et al.*, 2000). En la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum* esta secuencia corresponde a los aminoácidos 14-19, Gly-Ser-Gly-Phe-Val-Thr, donde la última Gly de la secuencia consenso es cambiada por una Thr. De la misma manera, este cambio en la secuencia consenso sucede en otras sacaropinas reductasas, como en la descrita en el hongo patógeno de plantas *M. grisea* (Johansson *et al.*, 2000)

La Figura 10 muestra la predicción de la estructura secundaria de la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum* obtenida por Psi-Pred. En el extremo amino terminal de la proteína, se puede apreciar claramente una alternancia de láminas β y de α -hélices a lo largo de la secuencia de aminoácidos, que consiste en una variante del dominio Rossmann fold que une NADPH, definido entre los aminoácidos 8 y 127 de la proteína.

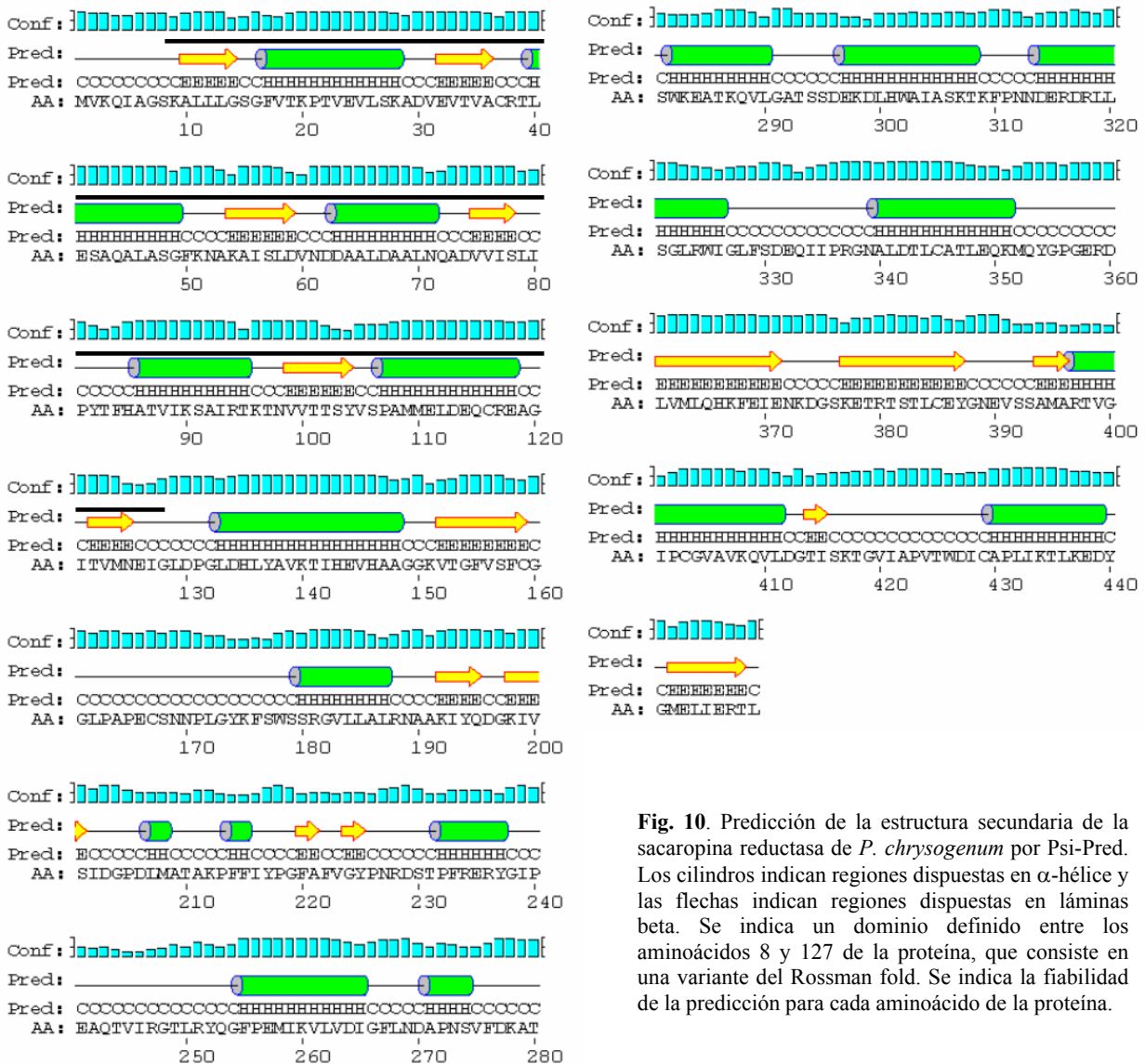


Fig. 10. Predicción de la estructura secundaria de la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum* por Psi-Pred. Los cilindros indican regiones dispuestas en α -hélice y las flechas indican regiones dispuestas en láminas β . Se indica un dominio definido entre los aminoácidos 8 y 127 de la proteína, que consiste en una variante del Rossmann fold. Se indica la fiabilidad de la predicción para cada aminoácido de la proteína.

7.2.2. Predicción de la estructura terciaria de la sacaropina reductasa

Es posible modelar la estructura tridimensional de una secuencia de aminoácidos si se tiene un homólogo claro de estructura conocida. Si la homología es alta ($> 30\%$) y el alineamiento es bueno, las regiones con estructura secundaria (*core* de la proteína) no suelen tener problemas a la hora de modelarse (Gómez-Puertas, Roca y García, Comunicación Personal. Curso de Bioinformática, 2001).

Nuestra proteína tiene un homólogo claro de estructura tridimensional conocida. Recientemente, la sacaropina reductasa de *M. grisea* ha sido purificada y cristalizada (Johansson *et al.*, 2000a y 2000b), por lo cual, se procedió a modelar la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum* basándonos en su estructura tridimensional. La predicción de la estructura tridimensional de la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum* se llevó a cabo utilizando un diseño por homología, ya que el porcentaje de identidad de residuos idénticos en la proteína ($> 66,4\%$) se encontraba dentro de los valores límites de aplicación para este tipo de modelado, es decir, un porcentaje de identidad mayor al 30% con proteínas homólogas cristalizadas y descritas en la base de datos de proteínas PDB (*Protein Data Base*).

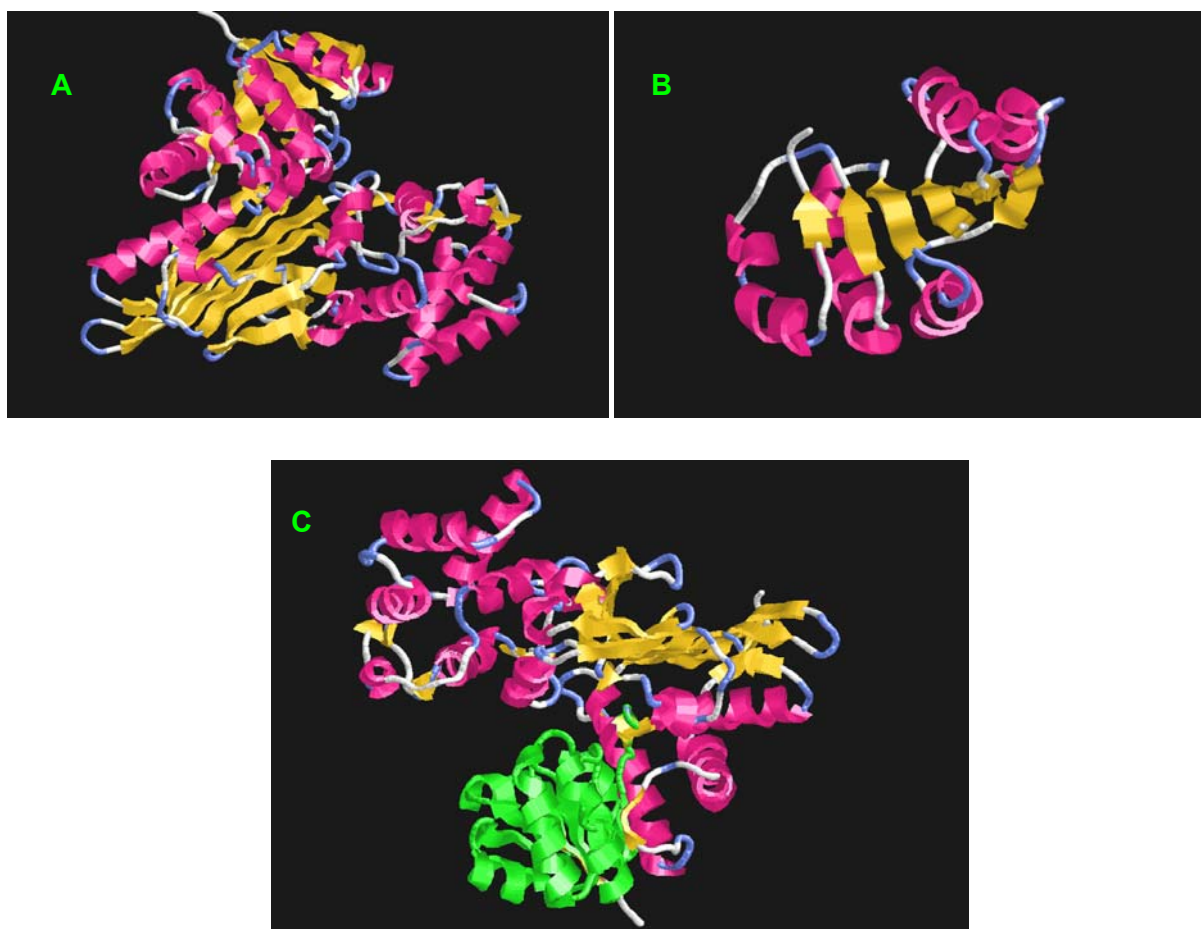


Fig. 11. (A), Modelado de la estructura tridimensional de la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum* utilizando un diseño por homología. (B), Dominio Rossmann fold que une NADPH, característico de la familia de las óxidorreductasas, y definido entre los aminoácidos 8 y 127. (C), Extremo amino de la proteína en el que se observa el dominio Rossmann fold.

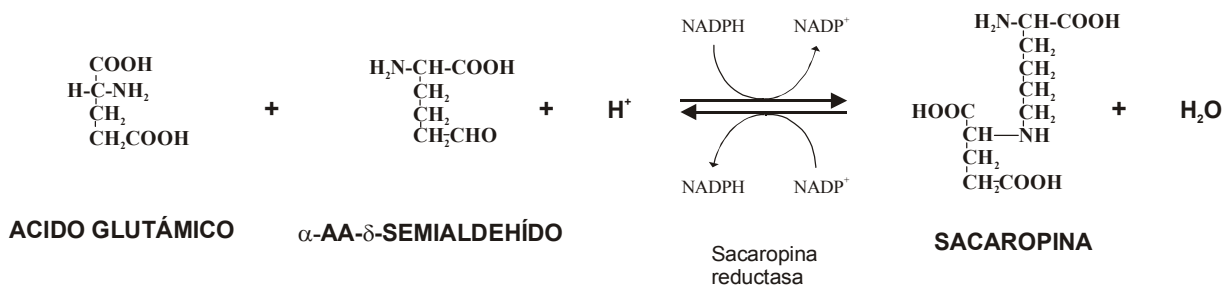
Para ello, se utilizó el servidor SWISS-MODEL (An Automated Comparative Protein Modelling Server, ExPASy, CH; <http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>), que es un programa totalmente automático y de gran fiabilidad que realiza todo el proceso, desde la búsqueda de proteínas cristalizadas homólogas hasta la generación del modelo tridimensional final (Guex y Peitsch, 1997; Peitsch, 1996; Peitsch, 1995).

El análisis estructural descrito recientemente de la sacaropina reductasa de *M. grisea* indica que es un homodímero y que cada sub-unidad está constituida por tres dominios. El dominio I, contiene una variante del dominio Rossmann fold que une NADPH. El dominio II, contiene una mezcla de 7 láminas beta flanqueadas por α -hélices y esta implicado en la unión de sustrato y en la formación del dímero, el dominio III, es todo α -hélices y su función es desconocida hasta los momentos. El sitio activo se localiza probablemente entre el domino de unión a NADPH y el segundo dominio constituido por la mezcla de β/α (para revisión ver Johansson *et al.*, 2000b).

El resultado de la predicción se muestra en la Figura 11, donde las perspectivas de la estructura tridimensional de la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum* permiten apreciar detalladamente la alternancia de láminas beta y de α -hélices que define al dominio Rossmann fold que une NADPH.

7.3. Mecanismo molecular de síntesis de sacaropina por la sacaropina reductasa

En la naturaleza existen dos rutas completamente diferentes para sintetizar lisina: la ruta del ácido diaminopimérico y la ruta del ácido α -aminoadípico. La ruta del diaminopimérico es usada por plantas, bacterias y hongos inferiores, mientras, que la ruta del α -aminoadípico esta presente en hongos superiores y algas verde-azuladas (como describe el apartado 5 de *Introducción*). En *P. chrysogenum*, la lisina se sintetiza a través de la ruta del ácido α -aminoadípico. El penúltimo paso de la ruta del ácido α -aminoadípico es catalizado por la sacaropina reductasa, una enzima dependiente de NADPH (EC 1.5.1.10). Esta enzima muestra una marcada preferencia por NADPH como co-sustrato, aunque también puede utilizar NADH pero muestra una menor eficiencia catalítica (Johansson *et al.*, 2000a). En dicha reacción, la sacaropina se produce vía anabólica a partir de ácido glutámico y α -aminoadipato- δ -semialdehído, tal como muestra a continuación:



II. CONSTRUCCIÓN POR INTERRUPCIÓN GÉNICA DE UN MUTANTE INACTIVADO EN LA SACAROPINA REDUCTASA (SR-)

1. INTERRUPCIÓN DEL GEN *lys7* DE *P. chrysogenum* WIS 54-1255

Con el objeto de estudiar la función que desempeña la sacaropina reductasa en el metabolismo del ácido pipercolico en *P. chrysogenum*, se procedió a inactivar el gen *lys7* mediante la técnica de la doble recombinación. Dicha técnica, desarrollada en nuestro laboratorio para la inactivación de genes de *P. chrysogenum* implicados en la biosíntesis de lisina (Casqueiro *et al.*, 1999b; 2002), consiste en la inactivación dirigida del gen de interés mediante la transformación con un plásmido integrativo que contenga un marcador de selección inactivando y/o reemplazando dicho gen de interés y seleccionando aquellos transformantes que experimenten un evento de doble recombinación homóloga. De esta manera, los transformantes interrumpidos mediante esta técnica presentan mayor estabilidad genética en el *locus* interrumpido en comparación con los transformantes interrumpidos mediante entrecruzamiento simple (Casqueiro *et al.*, 1999a; 1999b).

En *P. chrysogenum* se ha descrito que para aumentar la probabilidad de que se produzca un evento de recombinación e integración homóloga, es necesario utilizar fragmentos de ADN homólogos de gran tamaño, siendo aconsejable emplear fragmentos homólogo mayores de 8 kb (Casqueiro *et al.*, 1999a; 2002; Bañuelos *et al.*, 2002). Por lo tanto, para llevar a cabo la interrupción del gen *lys7*, se hizo necesario obtener un fragmento de ADN de gran tamaño para favorecer la integración homóloga en la transformación de la cepa hospedadora. Para la clonación de dicho fragmento de ADN se siguieron los pasos que se describen a continuación:

1.1. Clonación de la región del genoma de *P. chrysogenum* que contiene el gen *lys7*

Como se ha indicado en el apartado 6.1 de *Resultados*, el fragmento de ADN clonado en el plásmido p10T1 que contiene el gen *lys7* tiene un tamaño aproximado de 6 kb. Para aumentar la probabilidad de que se produzca un evento de recombinación e integración homóloga se procedió a clonar un fragmento de ADN homólogo de mayor tamaño.

La estrategia que se siguió fue el rastreo de una genoteca de ADN genómico de *P. chrysogenum* AS-P-78 construida en el vector fágico λ EMBL3 utilizando como sonda un fragmento interno *Bgl*III de 0,9 kb del gen *lys7* de *P. chrysogenum*. En primer lugar, se determinó el título de la genoteca infectando la cepa *E. coli* LE392. Posteriormente, se infectó de nuevo la cepa *E. coli* LE392 con la genoteca para obtener aproximadamente 80.000 ufps en 4 placas de Petri de 150 mm de diámetro. Una vez realizada la infección, plaqueo e incubación, se transfirió el ADN de los fagos a filtros de nitrocelulosa y se hibridaron con la sonda interna del gen *lys7*. Como resultado de la hibridación se

obtuvieron un total de 6 fagos positivos que fueron purificados en tres rondas más de infección, transferencia e hibridación. En dichas rondas, la infección de *E. coli* LE392 se llevó a cabo cada vez con un número menor de fagos permitiendo, de esta manera, purificar a homogeneidad cada uno de los fagos positivos obtenidos. En la última ronda de infección e hibridación, los fagos se picaron con una pipeta Pasteur estéril, con el fin de seleccionar una única placa de lisis. Los seis fagos positivos aislados se denominaron F1, F2, F3, F4, F5 y F6 respectivamente.

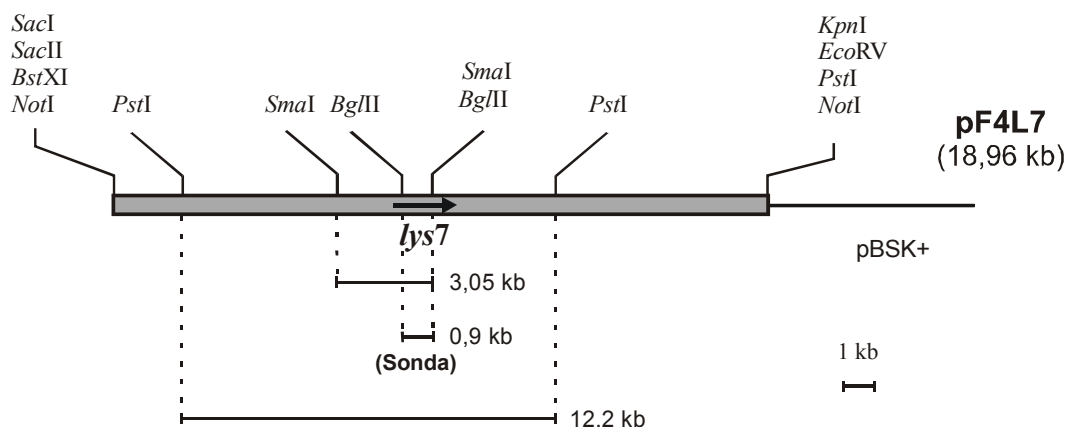
Posteriormente, y con la finalidad de localizar bandas comunes que contienen el gen *lys7* de *P. chrysogenum*, se llevaron a cabo una serie de digestiones del ADN de los fagos obtenidos utilizando las enzimas de restricción *Bgl*III, *Not*I y *Xba*I. El estudio de los patrones de restricción obtenidos reveló que el fago 4 presentaba patrones de restricción idénticos al gen *lys7*. Por lo cual, seleccionamos el fago 4 para continuar los experimentos. El fago 4 portaba un fragmento de 16 kb *Not*I que se subclonó en el sitio *Not*I de un vector pBluescript SK+ para dar lugar al plásmido pF4L7 (como se describe en el apartado 3.3 de *Materiales y Métodos*). A continuación, se llevó a cabo un análisis de restricción más detallado del fragmento de ADN genómico de 16 kb clonado en el plásmido pF4L7, comprobándose que el gen *lys7* se encontraba en la zona central del mismo (Fig. 12A).

1.2. Estudio del número de copias del gen *lys7* presentes en el genoma de *P. chrysogenum*

Con el propósito de estimar el número de copias del gen *lys7* presentes en el genoma de *P. chrysogenum*, se realizó un análisis de *Southern* utilizando tres cepas diferentes de este hongo: *P. chrysogenum* NRRL1951, *P. chrysogenum* Wis 54-1255 y *P. chrysogenum* AS-P-99. Luego de extraer ADN genómico de cada una de las cepas, se procedió a digerirlo con las enzimas de restricción *Bgl*III (libera un fragmento interno del gen *lys7* de 0,9 kb), *Sma*I (digiere dentro y fuera del gen *lys7*, liberando un fragmento de ADN de 3,05 kb) y *Pst*I (libera un fragmento de ADN de 12,2 kb en el que se localiza el gen *lys7* completo), se realizó una electroforesis en gel de agarosa de dichas muestras y se transfirió el ADN a un filtro de nilón. Para la hibridación se utilizó como sonda un fragmento interno *Bgl*III de 0,9 kb del gen *lys7* de *P. chrysogenum* (Fig. 12A).

El resultado de la hibridación (Fig. 12B) reveló la existencia de una sola banda de hibridación en el ADN genómico de las tres cepas estudiadas digerido con cualquiera de las tres enzimas de restricción empleadas. El tamaño de las bandas de hibridación coincidía con el deducido a partir del mapa de restricción del fragmento *Not*I de 16 kb clonado de la cepa *P. chrysogenum* Wis 54-1255 y que contiene el gen *lys7* en la zona central (Fig. 12A). Los resultados indican que, al menos en las tres cepas estudiadas de *P. chrysogenum*, existe un único gen (*lys7*) que codifica la enzima sacaropina reductasa.

A



B

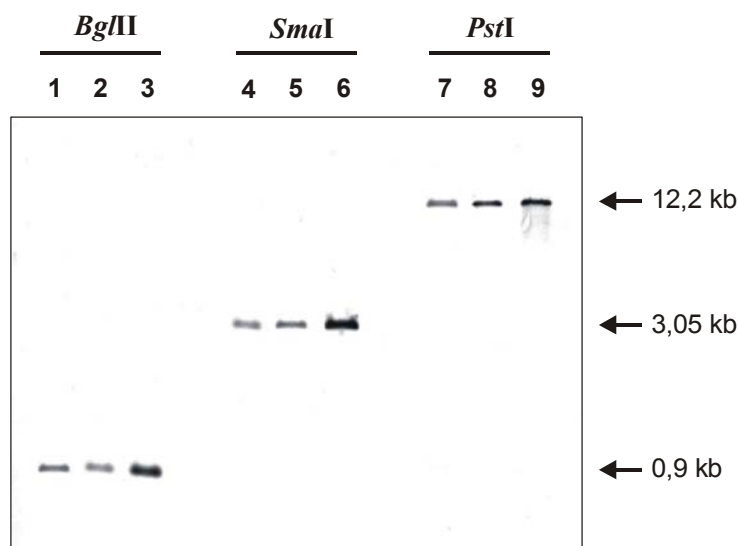


Fig. 12 (A), Mapa de restricción de la región cromosómica que contiene el gen *lys7*. **(B)**, Hibridación de muestras de ADN total de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 (carriles 1, 4 y 7); *P. chrysogenum* NRRL1951 (carriles 2, 5 y 8) y *P. chrysogenum* AS-P-99 (carriles 3, 6 y 9) usando una sonda *Bgl*II de 0,9 kb interna del gen *lys7* de *P. chrysogenum*. Las muestras se digirieron con las enzimas *Bgl*II (carriles 1, 2 y 3), *Sma*I (carriles 4, 5 y 6) y *Pst*I (carriles 7, 8 y 9).

1.3. Diseño y construcción del plásmido a utilizar para la interrupción del gen *lys7* de *P. chrysogenum*

Uno de los objetivos de mayor interés de este trabajo de investigación, fue sin duda la interrupción del gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa y estudiar el papel que desempeña dicha enzima en la posible biosíntesis de ácido piperólico en *P. chrysogenum*.

Como se ha señalado anteriormente, al diseñar el sistema para interrumpir el gen *lys7*, se eligió el sistema de doble recombinación. Habitualmente, en nuestro laboratorio, para inactivar genes de *P. chrysogenum*, se utiliza un casete de transformación que consta de dos fragmentos de ADN homólogos a las regiones que flanquean el gen que se desea interrumpir y de un marcador de transformación insertado entre ambos. En este caso, se utilizó un casete que confiere resistencia frente al antibiótico fleomicina como sistema de selección positiva de transformantes. Este casete de resistencia a fleomicina está constituido por el gen *ble* de *Streptoalloteicus hindustanus* fusionado transcripcionalmente al promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* y al terminador del gen *CYC1* de *Saccharomyces cerevisiae* (Bañuelos *et al.*, 2003), tal como se describe en el apartado 13.1 de *Materiales y Métodos*

El vector pDL7 utilizado para llevar a cabo la interrupción del gen *lys7* de *P. chrysogenum* se construyó como se describe en el apartado 3.4 de *Materiales y Métodos*. Es importante resaltar que el plásmido pDL7 contiene dos fragmentos de ADN homólogos de 10 kb en total que flanquean el casete de resistencia a fleomicina (Fig. 5 del apartado 3.4 de *Materiales y Métodos*).

1.4. Transformación y selección de transformantes

Para obtener transformantes interrumpidos, se transformaron protoplastos de la cepa hospedadora *P. chrysogenum* Wis 54-1255 con el plásmido pDL7 utilizando la resistencia a fleomicina como marcador de selección. Después de la transformación, se seleccionaron aquellos transformantes que presentaban un fenotipo de resistencia a fleomicina. Como resultado de dicha selección, se obtuvieron un total de 3.000 transformantes. Dichos transformantes fueron analizados tomando en cuenta su capacidad de crecer en medio mínimo Czapek. Se identificó un transformante auxótrofo de lisina por su incapacidad de crecer en medio mínimo Czapek, lo cual, sugería que se había producido la inactivación de algún gen implicado en la biosíntesis de este aminoácido. Al transformante auxótrofo de lisina seleccionado se le denominó *P. chrysogenum* TDL7-111 (por Transformante Deleccionado en el gen lys7).

1.5. Análisis del transformante auxótrofo de lisina *P. chrysogenum* TDL7-111

Para comprobar si el fenotipo *lys*⁻ observado en el transformante *P. chrysogenum* TDL7-111 se había generado por la inactivación del gen *lys7* se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

1.5.1. Estudios genéticos mediante hibridación (*Southern*)

Para realizar el análisis de *Southern* se obtuvieron muestras de ADN genómico del transformante *P. chrysogenum* TDL7-111, de la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 y de dos transformantes protótrofos (no auxótrofos de lisina) seleccionados al azar denominados

P. chrysogenum TDL7-233 y *P. chrysogenum* TDL7-913. Las muestras de ADN genómico fueron digeridas con *Pst*I, separadas mediante electroforesis en gel de agarosa y transferidas a un filtro de nilón. El filtro se hibridó con tres sondas diferentes: **I**, un fragmento de 2,8 kb *Bgl*II correspondiente al extremo 5' del gen *lys7* (Fig. 13A; sonda I); **II**, un fragmento de 0,9 kb *Bgl*II interno del gen *lys7* (Fig. 13A; sonda II); y **III**, un fragmento de 1,8 kb *Bgl*II correspondiente al extremo 3' del gen *lys7* (Fig. 13A; sonda III).

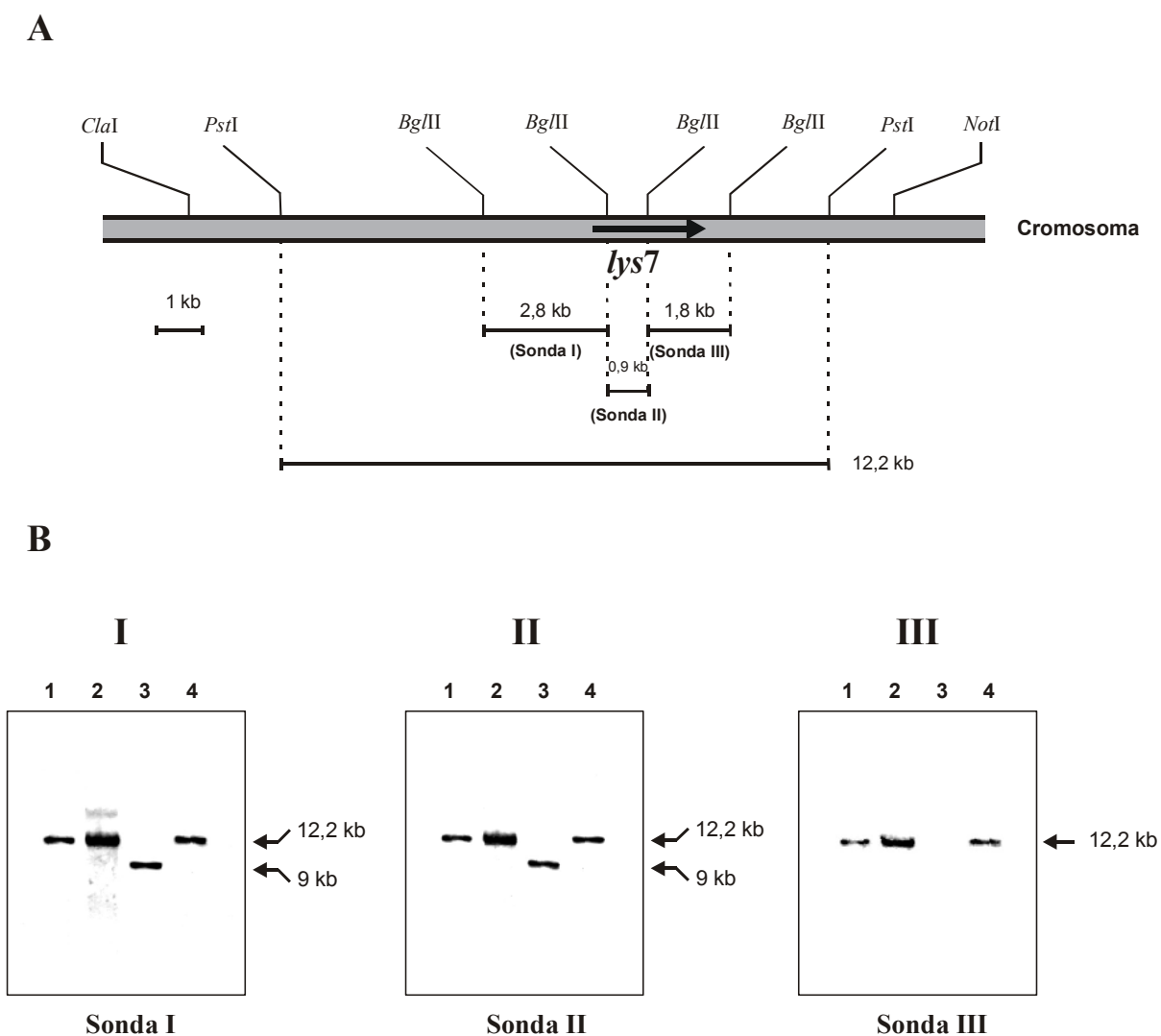


Fig. 13. Interrupción del gen *lys7* de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 y análisis molecular de los transformantes. (A) Mapa de restricción de la región del cromosoma que contiene el gen *lys7*. Se indican las tres sondas utilizadas para la hibridación del ADN genómico digerido con la enzima *Pst*I. **Sonda I:** fragmento *Bgl*II de 2,8 kb correspondiente al extremo 5' del gen *lys7*; **Sonda II:** fragmento *Bgl*II de 0,9 kb interno del gen *lys7*; **Sonda III:** fragmento *Bgl*II de 1,8 kb correspondiente al extremo 3' del gen *lys7*. (B), **I.** Hibridación con la sonda I. **II.** Hibridación con la sonda II. **III.** Hibridación con la sonda III. ADN genómico digerido con la enzima *Pst*I de: *P. chrysogenum* Wis 54-1255 (carril 1); transformantes TDL7-233 y TDL7-913 (carril 2 y 4 respectivamente) y *P. chrysogenum* TDL7-111 (carril 3). Se observa que cuando se utiliza la sonda III, la banda de 9 kb desaparece indicando que el mutante *P. chrysogenum* TDL7-111 carece del extremo 3' del gen *lys7*.

En los tres experimentos, los resultados de hibridación (Fig. 13B) mostraron la presencia de una banda de 12,2 kb, correspondiente a la región cromosómica que contiene el gen *lys7*, tanto en la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 (Fig. 13B; carril 1) como en los transformantes protótrofos (Fig. 13B; carriles 2 y 4). Sin embargo, en el transformante auxótrofo de lisina *P. chrysogenum* TDL7-111, se observó que la banda de hibridación de 12,2 kb era reemplazada por una banda de hibridación de 9 kb cuando se utilizaban como sondas el fragmento de 2,8 kb *Bgl*III (extremo 5' del gen *lys7*; sonda I) o el fragmento de 0,9 kb *Bgl*III (interno del gen *lys7*; sonda II) (Fig. 13B; carril 3). Es interesante señalar que en el transformante auxótrofo de lisina *P. chrysogenum* TDL7-111, cuando se utilizaba como sonda el fragmento de 1,8 kb *Bgl*III (extremo 3' del gen *lys7*; sonda III), la banda de 9 kb desaparecía indicando que el extremo 3' del gen *lys7* estaba deleciónado en este mutante (Fig. 13B; carril 3). Dicha deleción en *P. chrysogenum* TDL7-111 tiene un tamaño aproximado de 1.000 pb de 1.953 pb que tiene en total el gen *lys7*. Estos resultados demuestran que en la cepa *P. chrysogenum* TDL7-111 el gen *lys7* esta interrumpido.

1.5.2. Determinación de la actividad sacaropina reductasa de *P. chrysogenum* TDL7-111

Con el objetivo de confirmar si la interrupción del gen *lys7* era la causa de la auxotrofia de lisina, y que esta auxotrofia se debía a la carencia de actividad sacaropina reductasa, se procedió a medir dicha actividad enzimática en extractos crudos de *P. chrysogenum* TDL7-111. La cepa control *P. chrysogenum* Wis 54-1255 y el transformante protótrofo *P. chrysogenum* TDL7-233 fueron usados como control. Los extractos crudos para los ensayos enzimáticos se obtuvieron de micelio crecido en medio mínimo MDFP suplementado con 1,75 mM L-lisina y cosechado a las 48 y 72 h.

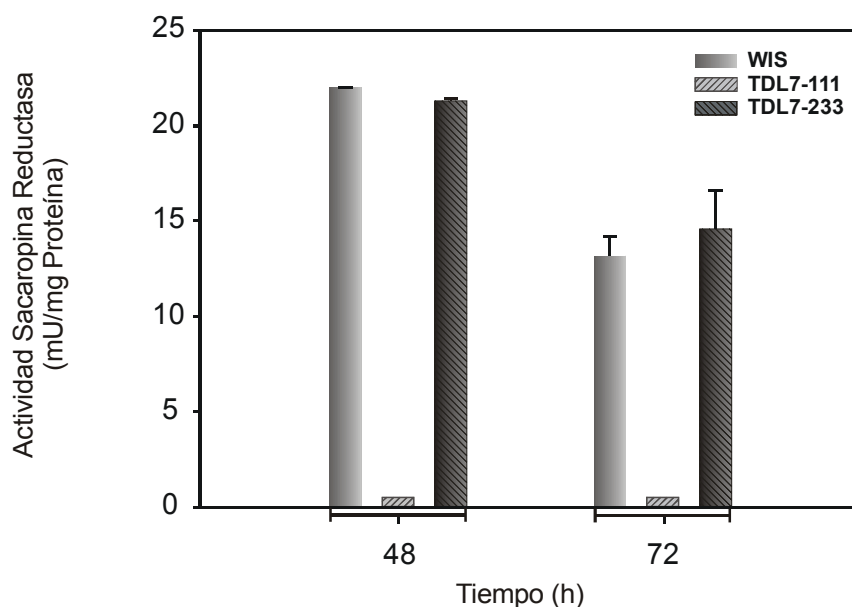


Fig. 14. Actividad sacaropina reductasa en extractos crudos de micelio de: *P. chrysogenum* TDL7-111, Wis 54-1255 y TDL7-233. Wis, *P. chrysogenum* Wis 54-1255; TDL7-111, *P. chrysogenum* TDL7-111; TDL7-233, *P. chrysogenum* TDL7-233. Obsérvese que *P. chrysogenum* TDL7-111, interrumpido en el gen *lys7*, carece de actividad sacaropina reductasa.

Los resultados obtenidos (Fig. 14) mostraron que la actividad sacaropina reductasa se encontraba presente tanto en la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 como en el transformante protótrofo *P. chrysogenum* TDL7-233. Sin embargo, la cepa *P. chrysogenum* TDL7-111, la cual tiene interrumpido el gen *lys7*, no presentaba actividad sacaropina reductasa.

Este resultado confirma que *P. chrysogenum* TDL7-111 posee interrumpido el gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa, siendo ésta la causa de la auxotrofia de lisina. Con la finalidad de simplificar la nomenclatura éste transformante fue renombrado como *P. chrysogenum* SR⁻ (por Sacaropina Reductasa⁻).

1.5.3. Complementación de la auxotrofia de lisina de *P. chrysogenum* SR⁻ mediante la transformación con el gen *lys7*

Para determinar si el gen *lys7* podía complementar la auxotrofia de lisina, se llevó a cabo una transformación del mutante *P. chrysogenum* SR⁻ con el plásmido p10T1 que contiene el gen *lys7* de *P. chrysogenum* que codifica la sacaropina reductasa (Fig. 15A). En la transformación se obtuvieron un alto número de transformantes protótrofos. Se seleccionaron tres transformantes al azar y se denominaron T1, T2 y T3. El mutante *P. chrysogenum* SR⁻ y la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 fueron utilizados como control para realizar un análisis de *Southern* usando un fragmento de 1,8 kb *Bgl*III como sonda, correspondiente al extremo 3' del gen *lys7* (Fig. 15B).

Puesto que el gen *lys7* se encuentra en un fragmento *Pst*I en el ADN genómico, se esperaba una señal de hibridación de 12,2 kb para la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 sin transformar. Mientras que, debido a la transformación del plásmido p10T1 en *P. chrysogenum* SR⁻, se esperaba una señal de hibridación de 10 kb con una digestión *Pst*I del ADN genómico de los transformantes T1, T2 y T3, y no se esperaba señal de hibridación para la cepa no transformada *P. chrysogenum* SR⁻, debido a que este mutante carece del extremo 3' del gen *lys7*.

Los resultados obtenidos de la hibridación (Fig. 15B) mostraron que la cepa parental mantenía intacta la banda de 12,2 kb (Fig. 15B; carril 1), la cual, se encontraba ausente en el resto de las cepas estudiadas. Mientras, los transformantes T1, T2 y T3 presentaron una sola señal de hibridación de 10 kb correspondiente al inserto de ADN no recombinado presente en el plásmido de replicación autónoma p10T1 (Fig. 15B; carriles 3, 4 y 5).

Estos resultados indicaron que el gen *lys7* es el responsable de complementar la auxotrofia de lisina del mutante *P. chrysogenum* SR⁻.

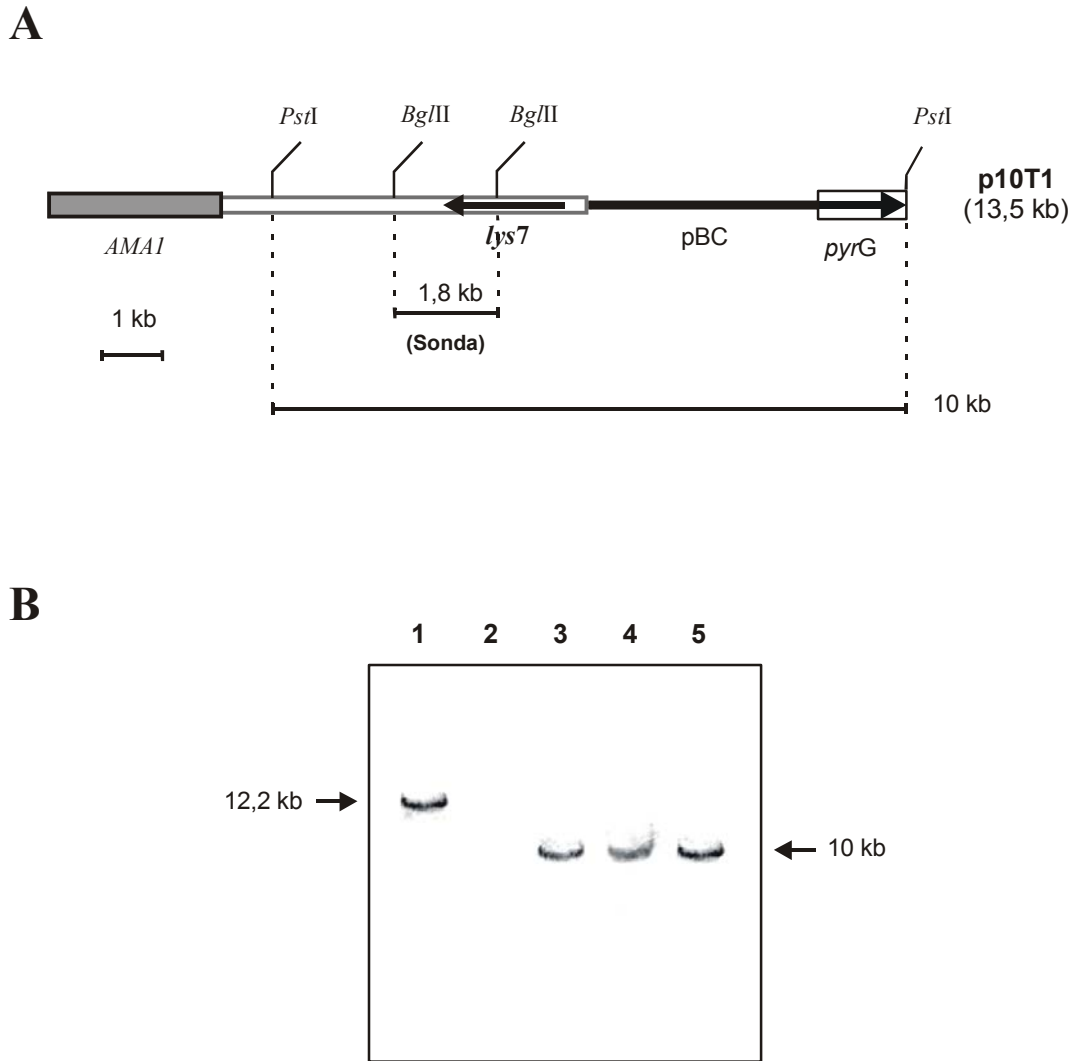


Fig. 15. (A), Mapa de restricción del plásmido de replicación autónoma p10T1 que porta el gen *lys7* bajo el control de su propio promotor. Se indica el fragmento *Bgl*II de 1,8 kb correspondiente al extremo 3' del gen *lys7* utilizado como sonda. (B), Hibridación del ADN genómico digerido con la enzima *Pst*I de tres transformantes protótrofos seleccionados al azar (T1, T2 y T3; carriles 3, 4 y 5 respectivamente). La cepa parental Wis 54-1255 y el mutante *P. chrysogenum* SR⁻ (ambos sin transformar) fueron usados como control (carriles 1 y 2 respectivamente). La señal de hibridación de 12,2 kb corresponde a la banda endógena *Pst*I que contiene al gen *lys7* en la cepa parental Wis 54-1255, y la señal de hibridación de 10 kb corresponde a la banda exógena *Pst*I que contiene al gen *lys7* y que porta el plásmido p10T1.

1.5.4. El gen *lys7* es esencial para restaurar la actividad sacaropina reductasa en el mutante *P. chrysogenum* SR⁻

Con el objeto de confirmar si el gen *lys7* es esencial para restaurar la prototrofia en el mutante *P. chrysogenum* SR⁻, se procedió a medir la actividad sacaropina reductasa en extractos crudos de micelio de los transformantes T1, T2 y T3 (obtenidos por complementación de la mutación SR⁻)

crecido en medio mínimo MDFP y cosechado a las 48 y 72 h. El mutante *P. chrysogenum* SR⁻ y la cepa parental Wis 54-1255 fueron usados como control (ambos sin transformar con p10T1).

Los resultados obtenidos (Fig. 16) demostraron que la actividad sacaropina reductasa estaba presente en todas las cepas estudiadas excepto en el mutante *P. chrysogenum* SR⁻. Sin embargo, los transformantes T1, T2 y T3 mostraron tanto a las 48 como a las 72 h niveles altos de actividad sacaropina reductasa en comparación con la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255. Dichos niveles de actividad sacaropina reductasa pueden ser debidos a la presencia del gen *lys7* en el plásmido de replicación autónoma p10T1. Dichos plásmidos se encuentran entre 25-50 copias por célula en *P. chrysogenum* (Fierro *et al.*, 1996). Estos resultados confirman definitivamente que el gen *lys7* es estrictamente necesario para restaurar la actividad sacaropina reductasa en el mutante *P. chrysogenum* SR⁻.

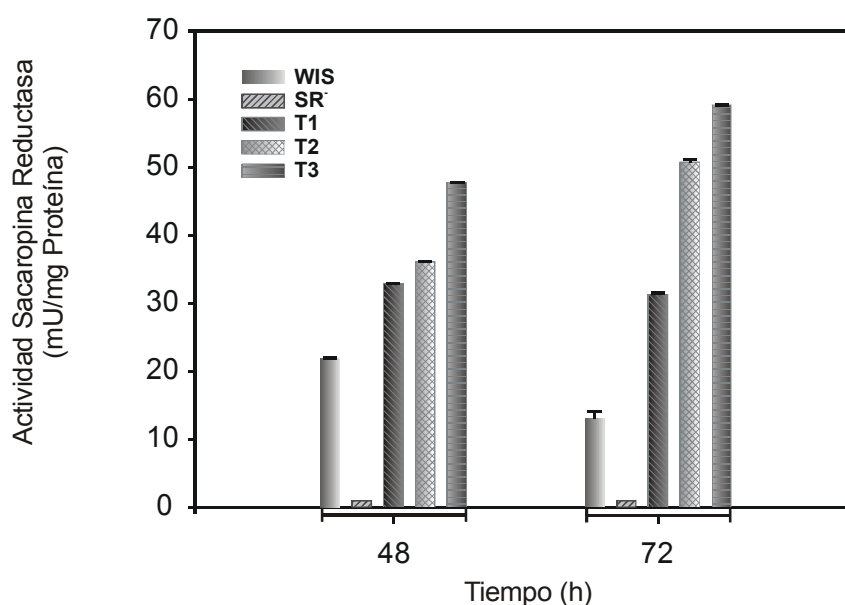


Fig. 16. Actividad sacaropina reductasa en extractos crudos de micelio de los tres transformantes protótrofos (T1, T2 y T3) derivados de *P. chrysogenum* SR⁻ por complementación con el plásmido p10T1. La cepa parental Wis 54-1255 y el mutante SR⁻ (ambos sin transformar) fueron usados como control. Las cepas fueron crecidas en medio MDFP y el micelio fue cosechado a las 48 y 72 horas. Wis, *P. chrysogenum* Wis 54-1255; SR⁻, *P. chrysogenum* SR⁻.

2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL MUTANTE *P. chrysogenum* SR⁻

2.1. Tasa de Reversión

Para determinar el porcentaje de reversión de la auxotrofia de lisina en el mutante *P. chrysogenum* SR⁻ se partió de una suspensión de esporas con una concentración conocida de

esporas viables. Se sembraron varias placas con $5,2 \times 10^7$ esporas en medio mínimo Czapek y, después de 5 días de incubación a 28 °C, se comprobó que no había crecido ninguna colonia revertiente, en la que la auxotrofia de lisina se hubiera perdido. El análisis de la tasa de reversión indicó que la auxotrofia de lisina de *P. chrysogenum* SR⁻ es altamente estable, ya que no se obtuvo ningún revertiente cuando una población de $5,2 \times 10^7$ esporas eran sembradas en medio mínimo Czapek.

2.2. Crecimiento

Para evaluar el crecimiento en medio líquido, esporas del mutante auxótrofo de lisina *P. chrysogenum* SR⁻ y de la cepa control Wis 54-1255 fueron utilizadas para iniciar un cultivo de inóculo en medio mínimo MDIP con L-lisina a una concentración final de 3,5 mM. Una vez crecido el inóculo (36 h), se utilizaron 10 ml para inocular una fermentación en matraces de 500 ml con medio mínimo MDFP con lisina a una concentración final de 3,5 mM. Se tomaron muestras cada 24 h para determinar el crecimiento de los microorganismos y para cuantificar la concentración de penicilina en los caldos de fermentación (como se describe en los apartados 7 y 8 de *Materiales y Métodos* respectivamente). Como se observa en la figura 17A, hasta las 48 horas, no existen diferencias significativas de crecimiento entre el mutante auxótrofo de lisina *P. chrysogenum* SR⁻ y la cepa control Wis 54-1255 en medio mínimo MDFP suplementado con L-lisina; sin embargo, los valores de peso seco del mutante SR⁻ se incrementan ligeramente desde las 72 hasta las 120 horas de la fermentación con respecto al crecimiento mostrado en las mismas condiciones por Wis 54-1255.

2.3. Producción de Penicilina

Como se ha mencionado en la parte introductoria de la presente memoria, el ácido α -aminoadípico es un intermediario donde divergen la ruta biosintética de lisina y la ruta biosintética de penicilina en *P. chrysogenum*, y constituye un precursor esencial de la síntesis de este antibiótico β -lactámico (Demain, 1957; Masurekar y Demain, 1972, Casqueiro *et al.*, 2002). Para evaluar el efecto de la inactivación del gen *lys7* sobre la producción de penicilina en *P. chrysogenum*, se llevó a cabo una fermentación en medio mínimo MDFP en condiciones de producción de dicho antibiótico β -lactámico. Se tomaron muestras cada 24 para valorar la concentración de penicilina en los caldos de cultivo del mutante *P. chrysogenum* SR⁻ y de la cepa parental Wis 54-1255 usada como control (descrito en el apartado 8 de *Materiales y Métodos*). Las fermentaciones se hicieron por duplicado y se repitieron tres veces.

Como se aprecia en la figura 17B, la producción específica de penicilina en el mutante SR⁻ en este medio es muy similar a la observada en cepa Wis 54-1255. Sin embargo, para tener una mayor fiabilidad, los datos de producción específica de penicilina se procesaron estadísticamente mediante la Prueba de Kruskal-Wallis. Para ello, se utilizó el paquete informático *Statistix* Versión 1.0 (Analytical

Software; Windows Version 95; 1996). Los resultados obtenidos a las 120 horas de fermentación, mostraron que no existían diferencias significativas ($P > 0,05$) en la producción específica de penicilina entre el mutante auxótrofo de lisina *P. chrysogenum* SR⁻ y la cepa control Wis 54-1255 1255 en medio mínimo MDFP suplementado con 3,5 mM de L-lisina (Fig. 17B). Estos resultados sugieren que el flujo del ácido α -aminoadípico requerido para la biosíntesis de penicilina no se ve afectado por la interrupción del gen *lys7* de la sacaropina reductasa en *P. chrysogenum*.

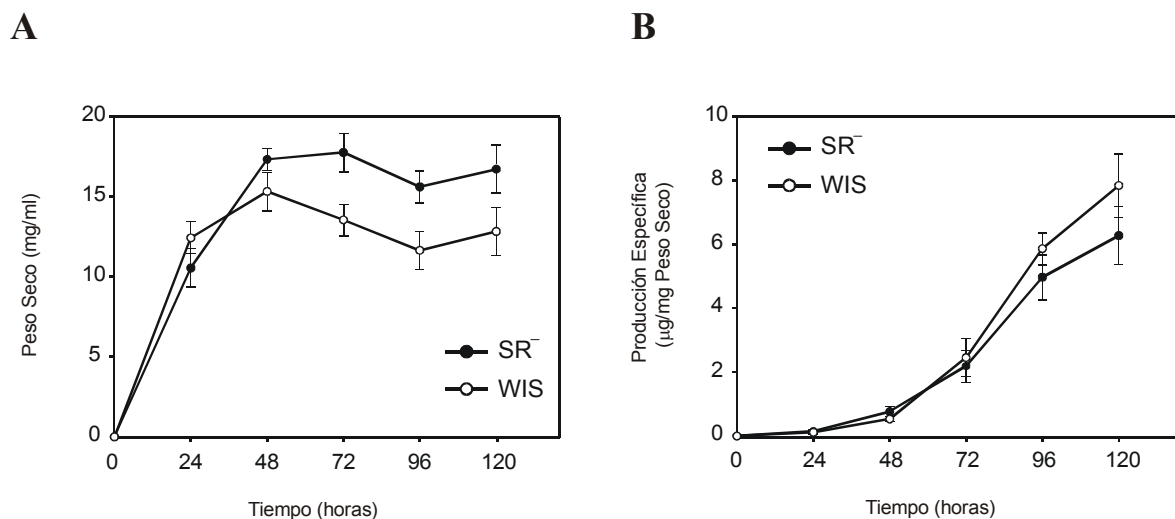


Fig. 17 (A), Crecimiento de *P. chrysogenum* SR⁻ (●) y de la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 (○) en medio mínimo MDFP suplementado con L-lisina (3,5 mM). (B), Producción específica de penicilina en los caldos de cultivo de la cepa Wis 54-1255 (○) y del mutante SR⁻ (●). Wis: *P. chrysogenum* Wis 54-1255; SR⁻: *P. chrysogenum* SR⁻.

III. EL ÁCIDO PIPECÓLICO SE CONVIERTE EN LISINA A TRAVÉS DE UNA RUTA ADAPTATIVA EN *P. chrysogenum* SR⁻

1. Crecimiento del mutante *P. chrysogenum* SR⁻ sobre medio mínimo suplementado con ácido pipecólico

Como hemos señalado anteriormente en *P. chrysogenum*, el ácido pipecólico se convierte en lisina a través de su conversión en P6C, sacaropina y finalmente lisina por acción de la pipecolato oxidasa, sacaropina reductasa y sacaropina deshidrogenasa respectivamente. Con la finalidad de estudiar si el ácido pipecólico se convierte o no en lisina en *P. chrysogenum* SR⁻ (inactivado en la actividad sacaropina reductasa) se analizó la capacidad de este mutante para crecer sobre medio mínimo Czapek suplementado con 0,1 M de ácido D,L-pipecólico como única fuente de nitrógeno. La cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255, dos transformantes protótrofos (*P. chrysogenum* TDL7-233 y *P. chrysogenum* TDL7-913) y tres mutantes auxótrofos de lisina fueron usados como controles. Dichos mutantes eran: (i) *P. chrysogenum* HS⁻ (con inactivación dirigida del gen *lys1* que codifica la homocitrato sintasa); (ii) *P. chrysogenum* TDX195 (con inactivación dirigida del gen *lys2* que codifica la α -aminoadipato reductasa) y; (iii) *P. chrysogenum* L2 (con una mutación puntual en el gen *lys3* que codifica la homoaconitasa).

Inesperadamente, los resultados (Fig. 18) mostraron que el mutante *P. chrysogenum* SR⁻ era capaz de crecer con ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno y, aunque el crecimiento era lento y pobre, indicaba que en este mutante el ácido pipecólico se convierte en lisina a través de una ruta adaptativa puesto que, en dicho mutante, la conversión de ácido pipecólico en lisina a través de la ruta de biosíntesis (vía α -aminoadipato- δ -semialdehído y sacaropina) de lisina está bloqueada a nivel de la sacaropina reductasa.

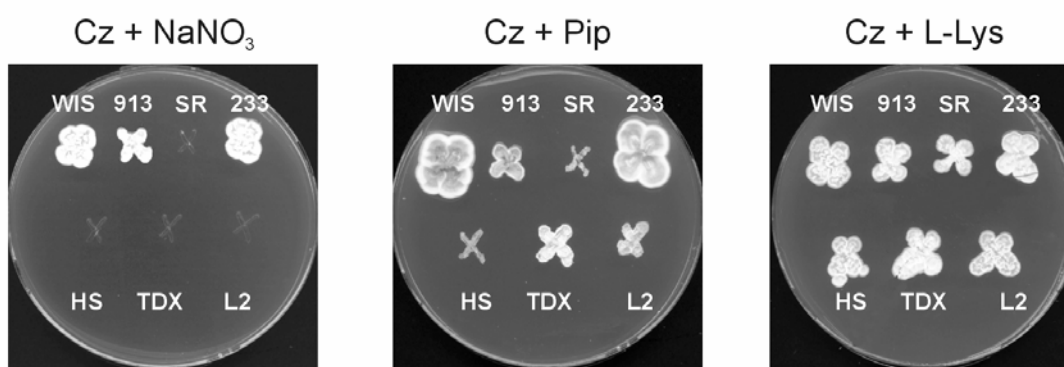


Fig. 18. Crecimiento de la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255; dos transformantes protótrofos (TDL7-233 y TDL7-913); *P. chrysogenum* SR⁻ y los mutantes auxótrofos de lisina HS⁻, TDX195 y L2 sobre: medio mínimo Czapek con NaNO₃ como única fuente de nitrógeno (Cz + NaNO₃); medio Czapek con ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno (Cz + Pip); y medio mínimo Czapek con L-lisina como única fuente de nitrógeno (Cz + L-Lys). Wis: *P. chrysogenum* Wis 54-1255; 913: *P. chrysogenum* TDL7-913; SR: *P. chrysogenum* SR⁻; 233: *P. chrysogenum* TDL7-233; HS: *P. chrysogenum* HS1⁻; TDX: *P. chrysogenum* TDX195; L2: *P. chrysogenum* L2. Obsérvese que *P. chrysogenum* SR⁻ es capaz de crecer sobre medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipecólico indicando que, en dicho mutante, éste iminoácido se convierte en lisina a través de una ruta adaptativa.

Para confirmar los resultados obtenidos en el experimento anterior y analizar más detalladamente la capacidad de *P. chrysogenum* SR⁻ de crecer con ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno se procedió a realizar un nuevo experimento. Esta vez se partió de una suspensión de esporas con una concentración conocida de esporas viables ($5,2 \times 10^7$ esporas/ml) y se procedió a sembrar por duplicado diluciones seriadas en placas de Petri con medio mínimo Czapek suplementado con ácido D,L-pipecólico (0,1 M) como única fuente de nitrógeno.

Después de 10 días de incubación a 28 °C se observó la aparición de colonias blancas y diminutas (Fig. 19). Es importante destacar que en las placas en las que se sembraron 100 μ l de la suspensión diluida a 10^{-5} , donde teóricamente deberían haber 52 esporas viables, se observó la aparición de 50 colonias, es decir, crecieron aproximadamente el 100 % de las esporas viables de *P. chrysogenum* SR⁻ sembradas sobre medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipecólico.

Estos resultados confirman los obtenidos anteriormente e indican que en el mutante *P. chrysogenum* SR⁻ existe una ruta adaptativa por medio de la cual el ácido pipecólico se convierte en lisina.

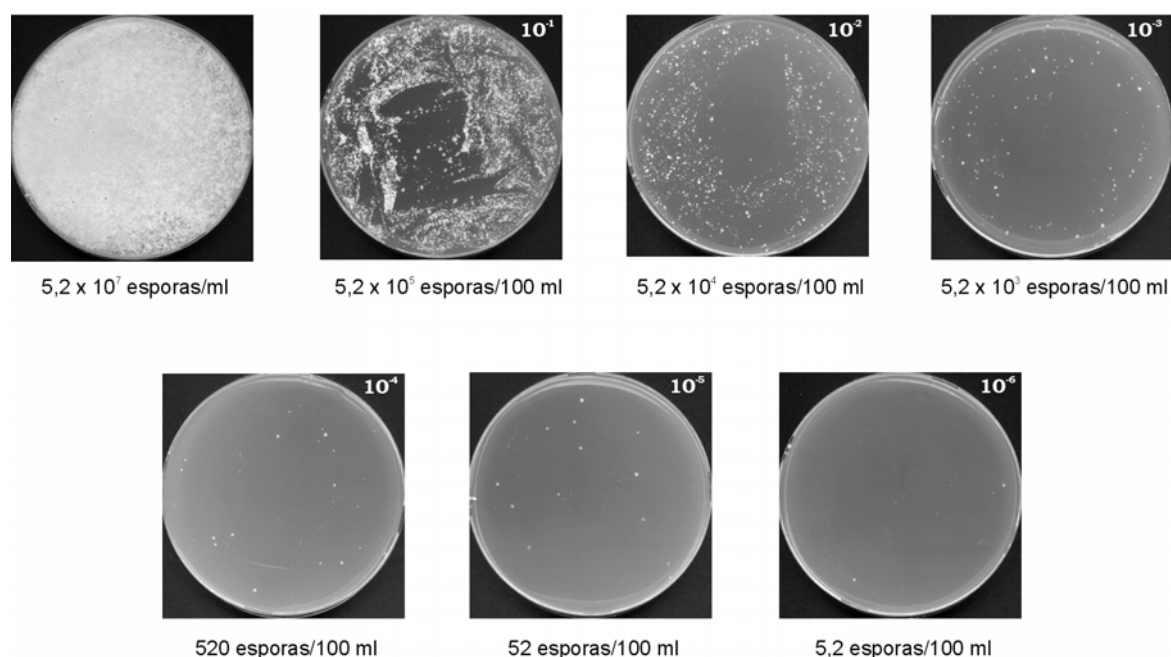


Fig. 19. Crecimiento de *P. chrysogenum* SR⁻ sobre medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno. Se sembraron diluciones decrecientes a partir de una suspensión de esporas de concentración conocida de esporas viables ($5,2 \times 10^7$ esporas/ml). La capacidad de *P. chrysogenum* SR⁻ de crecer sobre medio Czapek suplementado con ácido pipecólico indica que este mutante convierte ácido pipecólico en lisina mediante una ruta adaptativa.

2. El ácido pipercolico induce el incremento de la actividad pipercolato oxidasa y la acumulaci3n intracelular de P6C en *P. chrysogenum* SR⁻

Se ha descrito ampliamente que la enzima pipercolato oxidasa convierte 3cido pipercolico en P6C, el cual, es la forma ciclada del α -aminoadipato- δ -semialdehido (IJst *et al.*, 2000; Dodt *et al.*, 2000; Fujii *et al.*, 2002a; Kinzel y Bhattacharjee, 1982). Con la finalidad de estudiar c3mo el 3cido pipercolico se convierte en lisina en el mutante *P. chrysogenum* SR⁻, se procedi3 a medir la actividad pipercolato oxidasa y la concentraci3n intracelular de P6C en extractos de micelio crecido en medio m3nimo MDFP suplementado con 3cido D,L-pipercolico (25 mM) como 3nica fuente de nitr3geno y cosechado a las 48 y 72 horas.

Al mismo tiempo, y con la finalidad de tener un punto de referencia para inferir si la pipercolato oxidasa es inducida por el 3cido pipercolico en el mutante SR⁻, tambi3n se midieron estos par3metros en extractos de micelio crecido en medio m3nimo MDFP suplementado con L-lisina como 3nica fuente de nitr3geno. En las dos condiciones la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 fue utilizada como control.

Los resultados demostraron (Tabla 3) que la actividad pipercolato oxidasa se induce tanto en la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 como en el mutante SR⁻ cuando crecen con 3cido pipercolico como 3nica fuente de nitr3geno. En estas condiciones, la actividad pipercolato oxidasa es significativamente mayor que cuando se utiliza L-lisina como 3nica fuente de nitr3geno.

Tabla 3. Actividad pipercolato oxidasa medida en extractos crudos de micelio de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 y *P. chrysogenum* SR⁻ crecidos en medio m3nimo MDFP utilizando 3cido D,L-pipercolico o L-lisina como 3nicas fuentes de nitr3geno.

PIPECOLATO OXIDASA (mU/mg Prote3na)

Cepas	MDFP + 3cido Pipercolico		MDFP + L-Lisina	
	Tiempo de cultivo (h)		Tiempo de cultivo (h)	
	48	72	48	72
<i>P. chrysogenum</i> Wis-54 1255	13,25	0	0,35	0
<i>P. chrysogenum</i> SR ⁻	4,57	7,4	1,51	0

Concentraci3n final de 3cido D,L-pipercolico y L-lisina 25 mM.

Por otro lado, los resultados revelan que en la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 la actividad pipecolato oxidasa se induce drásticamente a las 48 horas pero desaparece a las 72 horas, mientras, que en el mutante SR⁻ dicha actividad se incrementa de las 48 a las 72 horas del cultivo. Esto puede ser debido, probablemente, a que *P. chrysogenum* Wis 54-1255 es un protótrofo, mientras que *P. chrysogenum* SR⁻ es un mutante auxótrofo de lisina, por lo tanto, el crecimiento en medio mínimo MDFP con ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno es superior en la cepa parental Wis 54-1255 que en el mutante SR⁻ en las mismas condiciones.

La concentración intracelular de P6C se determinó en los mismos extractos. Los resultados obtenidos (Tabla 4) demostraron que tanto la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 como el mutante SR⁻, cuando crecían con ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno, acumulaban niveles significativamente más altos de P6C que cuando crecían con L-lisina como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, la concentración intracelular de P6C en el mutante SR⁻ es significativamente mayor con respecto a la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 tanto a las 48 como a las 72 horas.

Estos resultados (Tabla 4) indican que, en *P. chrysogenum* SR⁻: (i) la inactivación del gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa provoca la acumulación de P6C y; (ii) el ácido pipecólico se cataboliza a través de su conversión en P6C por acción de la pipecolato oxidasa, sugiriendo que esta enzima esta implicada en el primer paso de la ruta adaptativa de conversión de ácido pipecólico en lisina utilizada por dicho mutante, por medio del cual, el ácido pipecólico se convierte en P6C.

Tabla 4. Concentración intracelular de P6C medida en extractos crudos de micelio de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 y *P. chrysogenum* SR⁻ crecidos en medio mínimo MDFP utilizando ácido D,L-pipecólico o L-lisina como únicas fuentes de nitrógeno.

CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE P6C
(nmoles P6C/mg Proteína)

Cepas	MDFP + Ácido Pipecólico		MDFP + L-Lisina	
	Tiempo de cultivo (h)		Tiempo de cultivo (h)	
	48	72	48	72
<i>P. chrysogenum</i> Wis-54 1255	366	211	38	37
<i>P. chrysogenum</i> SR ⁻	759	680	286	168

Concentración final de ácido D,L-pipecólico y L-lisina 25 mM.

3. *P. chrysogenum* SR⁻ acumula sacaropina y lisina cuando crece con ácido pipercolico como única fuente de nitrógeno

Con el propósito de profundizar en la caracterización sobre la capacidad de *P. chrysogenum* SR⁻ de sintetizar lisina a partir de ácido pipercolico, se analizó por HPLC la concentración intracelular de sacaropina, ácido α -aminoadípico, ácido pipercolico y lisina en extractos de micelio crecido en medio mínimo MDFP suplementado con ácido D,L-pipercolico como única fuente de nitrógeno (25 mM) y cosechado a las 48 y 72 horas.

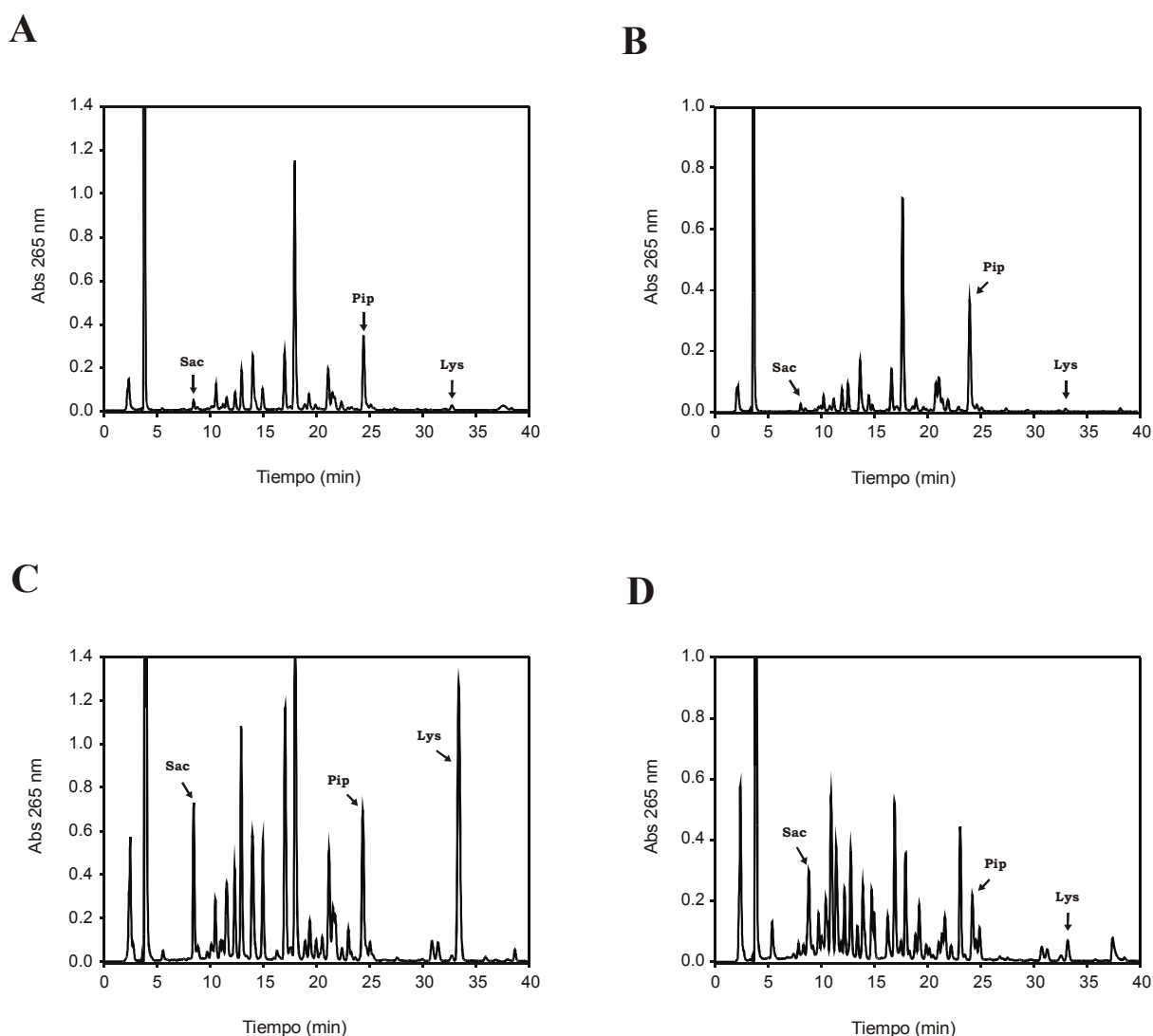


Fig. 20. Análisis mediante HPLC de la concentración intracelular de sacaropina, ácido α -aminoadípico, ácido pipercolico y lisina en extractos crudos de micelio de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 (A y B) y *P. chrysogenum* SR⁻ (C y D) crecido en medio mínimo MDFP suplementado con ácido D,L-pipercolico (25 mM) y cosechado a las 48 (A y C) y 72 (B y D) horas. Se observa una clara acumulación de lisina y sacaropina en el mutante *P. chrysogenum* SR⁻, mientras, que en la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 están ausentes en las mismas condiciones. Sac: sacaropina; Pip: ácido pipercolico; Lys: lisina.

Los resultados obtenidos (Fig. 20) en los cromatogramas de los extractos crudos de la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 usada como control, demostraron que dicha cepa no acumula sacaropina ni lisina. Sin embargo, se observó que *P. chrysogenum* SR⁻ acumula niveles altos de lisina y sacaropina a las 48 horas cuando crece con ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno. Se observa que la acumulación de lisina y sacaropina detectada a las 48 horas decrece posteriormente hacia las 72 horas debido a su utilización para el crecimiento. Además, de manera significativa, en ninguno de los extractos analizados se detectó la presencia de ácido α -aminoadípico.

Estos resultados confirman que, en *P. chrysogenum* SR⁻, el ácido pipecólico se convierte en lisina a través de una ruta adaptativa. Por otro lado, los resultados obtenidos sugieren que la lisina producida a partir del ácido pipecólico podría estar siendo catabolizada por acción de la sacaropina deshidrogenasa provocando, por lo tanto, la acumulación de sacaropina.

IV.- BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO PIPECÓLICO EN *P. chrysogenum*

1. LA INTERRUPCIÓN DEL GEN *lys7* PROVOCA LA ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE P6C Y DE ÁCIDO PIPECÓLICO EN *P. chrysogenum* SR⁻

En hongos filamentosos, la biosíntesis de ácido pipecólico está estrechamente relacionada con el metabolismo de lisina. Se ha descrito que el ácido pipecólico se forma a través del catabolismo de L-lisina en *Metarhizium anisopliae* y *Rhizoctonia leguminicola*. En estos microorganismos el ácido pipecólico es un precursor en la síntesis de alcaloides (Wickwire *et al.*, 1990a, b; Sim y Perry, 1997). Aspen y Meister (1962) señalan que el ácido pipecólico juega un papel importante en la biosíntesis de lisina en *Aspergillus nidulans*, ya que han descrito que ciertos mutantes auxótrofos de lisina son capaces de convertir ácido α -aminoadípico en ácido pipecólico. Así mismo, estudios con D-lisina marcada radiactivamente en *Neurospora crassa* demostraron que el ácido pipecólico era un intermediario en la conversión de D-lisina en L-lisina (Fangmeier y Leistner, 1980). Aunque existe la evidencia de que algunos organismos son capaces de sintetizar ácido pipecólico, en *P. chrysogenum* esta habilidad era completamente desconocida, por lo cual, se decidió estudiar si este hongo filamentosos de importancia industrial podía sintetizar ácido pipecólico.

Con la finalidad de estudiar si *P. chrysogenum* es capaz de sintetizar ácido pipecólico, se analizaron por HPLC la concentración intracelular de ácido pipecólico, sacaropina, ácido α -aminoadípico y lisina en extractos crudos de micelio de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 y *P. chrysogenum* SR⁻ crecido en medio mínimo MDFP suplementado con L-lisina (25 mM) o D-lisina (25 mM) como fuentes de nitrógeno. Además, en ambas condiciones se procedió a medir la concentración intracelular de P6C en los mismos extractos de micelio.

1.1. El ácido pipecólico no se forma a partir del catabolismo de L-lisina en *P. chrysogenum*

Debido a que en los hongos filamentosos *M. anisopliae* y *R. leguminicola* el ácido pipecólico se forma a partir del catabolismo de L-lisina (Wickwire *et al.*, 1990a, b; Sim y Perry, 1997) estudiamos, en primer lugar, si en *P. chrysogenum* el ácido pipecólico se sintetiza a partir de la L-lisina. Para ello, se llevaron a cabo fermentaciones en medio mínimo MDFP con L-lisina (25 mM) como única fuente de nitrógeno. Se cosechó el micelio a las 48 y 72 horas y los extractos crudos se analizaron por HPLC para determinar la concentración intracelular de ácido pipecólico, sacaropina, ácido α -aminoadípico y lisina.

Los resultados obtenidos (Fig. 21) en los cromatogramas de extractos de micelio crecido con L-lisina como única fuente de nitrógeno, mostraron que la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255

acumulaba sacaropina pero no acumulaba ácido pipecólico. Este resultado indicó que en *P. chrysogenum* el ácido pipecólico no se forma a partir del catabolismo de L-lisina. Sin embargo, los cromatogramas de extractos celulares de *P. chrysogenum* SR⁻ mostraron que este mutante acumulaba sacaropina y, además, también acumulaba una pequeña concentración de ácido pipecólico a las 48 horas, la cual, decrecía hacia las 72 horas. Este resultado sugería, puesto que el ácido pipecólico no proviene del catabolismo de L-lisina en la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255, que podría originarse de la ruta biosintética de lisina, a partir del P6C, tal como sucede en *A. nidulans* (Aspen y Meister, 1962). Para estudiar este supuesto, se determinó la concentración intracelular de P6C en los mismos extractos crudos de micelio analizados anteriormente.

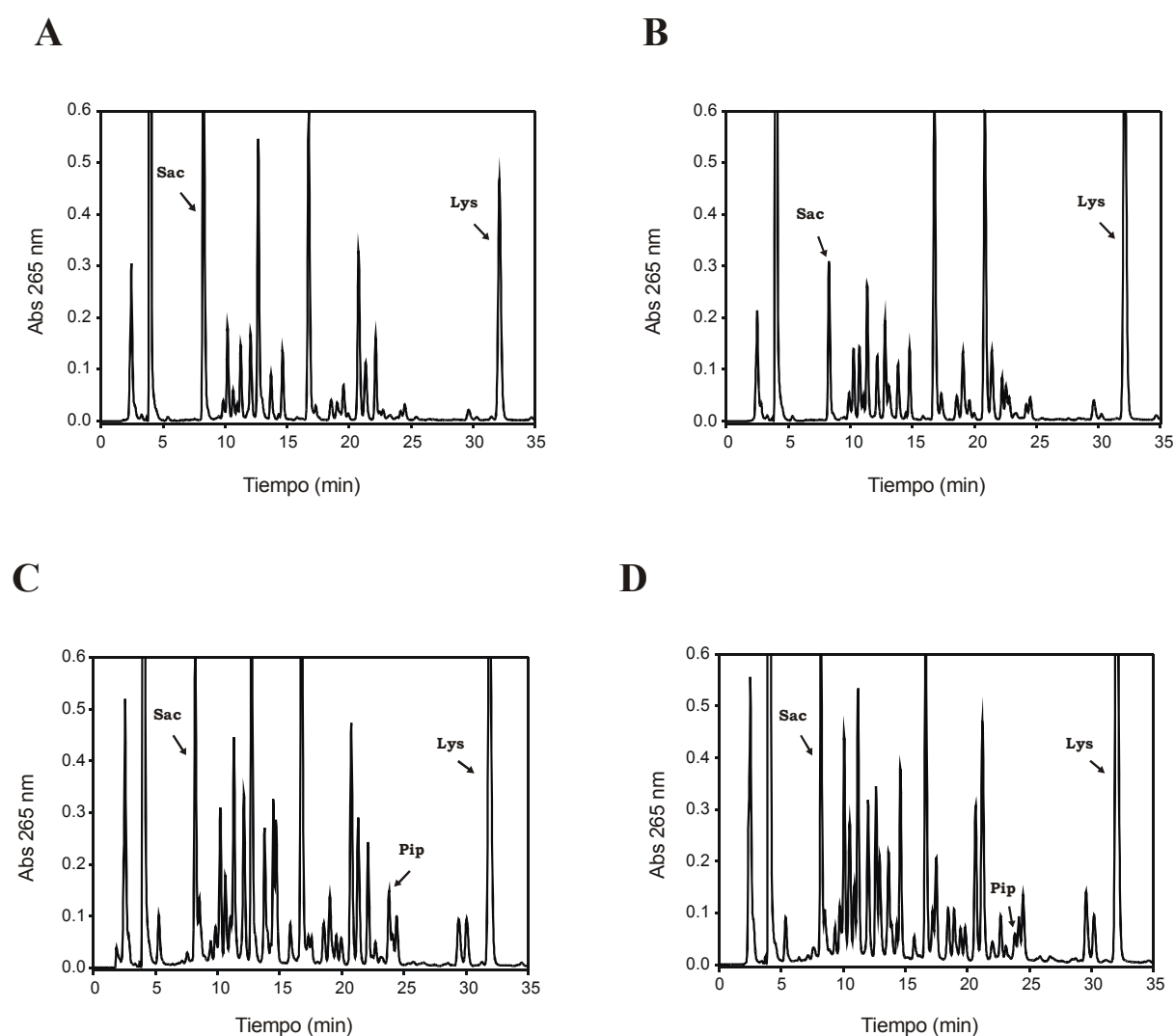


Fig. 21. Análisis mediante HPLC de la concentración intracelular de ácido pipecólico en extractos crudos de micelio de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 (A y B) y *P. chrysogenum* SR⁻ (C y D) crecido en medio mínimo MDFP suplementado con L-lisina (25 mM) como única fuente de nitrógeno y cosechado a las 48 (A y C) y 72 (B y D) horas. Se observa claramente una pequeña acumulación de ácido pipecólico en el mutante SR⁻ a las 48 horas, mientras, que la cepa parental Wis 54-1255 no acumula este iminoácido en las mismas condiciones. Sac: sacaropina; Pip: ácido pipecólico; Lys: lisina.

Los resultados obtenidos (Tabla 5) mostraron que *P. chrysogenum* SR⁻, cuando crecía con L-lisina como única fuente de nitrógeno, acumulaba niveles altos de P6C en comparación con la cepa control *P. chrysogenum* Wis 54-1255. Estos resultados indican que *P. chrysogenum* SR⁻ es capaz de producir ácido pipercolico y sugieren que el P6C es su principal precursor.

Tabla 5. Concentración intracelular de P6C medida en extractos crudos de micelio de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 y *P. chrysogenum* SR⁻ crecidos en medio mínimo MDFP utilizando como únicas fuentes de nitrógeno: L-lisina, D-lisina o L-lisina + ácido D,L- α -aminoadípico.

CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE P6C						
(nmoles P6C/mg Proteína)						
Cepas	L-Lisina		D-Lisina		L-Lisina + α-AAA^b	
	<u>Tiempo de cultivo (h)</u>		<u>Tiempo de cultivo (h)</u>		<u>Tiempo de cultivo (h)</u>	
	48	72	48	72	48	72
<i>P. chrysogenum</i> Wis-54 1255	38	37	112	79	75	80
<i>P. chrysogenum</i> SR ⁻	286	168	568	687	295	364

^b α -AAA, ácido D,L- α -aminoadípico. Concentración final de todas las fuentes de nitrógeno 25 mM.

1.2. El ácido pipercolico no se forma a partir del catabolismo de D-lisina en *P. chrysogenum*

En *N. crassa*, el ácido pipercolico es un intermediario en la conversión de D-lisina en L-lisina (Fangmeier y Leistner, 1980). Para estudiar si en *P. chrysogenum* el ácido pipercolico desempeña un papel similar, se llevaron a cabo fermentaciones en medio mínimo MDFP con D-lisina como única fuente de nitrógeno. Se cosecharon los micelios a las 48 y 72 horas y los extractos crudos se analizaron por HPLC para estudiar la concentración intracelular de ácido pipercolico, sacaropina, ácido α -aminoadípico y lisina.

Los resultados obtenidos (Fig. 22) en los cromatogramas de extractos de micelio crecido con D-lisina fueron similares a los obtenidos cuando se utilizó L-lisina como única fuente de nitrógeno, mostrando que la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 acumulaba sacaropina pero no

acumulaba ácido pipecólico. Así mismo, en las mismas condiciones de fermentación, *P. chrysogenum* SR⁻ acumula tanto sacaropina como una pequeña concentración de ácido pipecólico similar a la obtenida con L-lisina, sugiriendo, que la síntesis de ácido pipecólico en *P. chrysogenum* no está relacionada con el catabolismo de D-lisina, ni con la conversión de D-lisina en L-lisina.

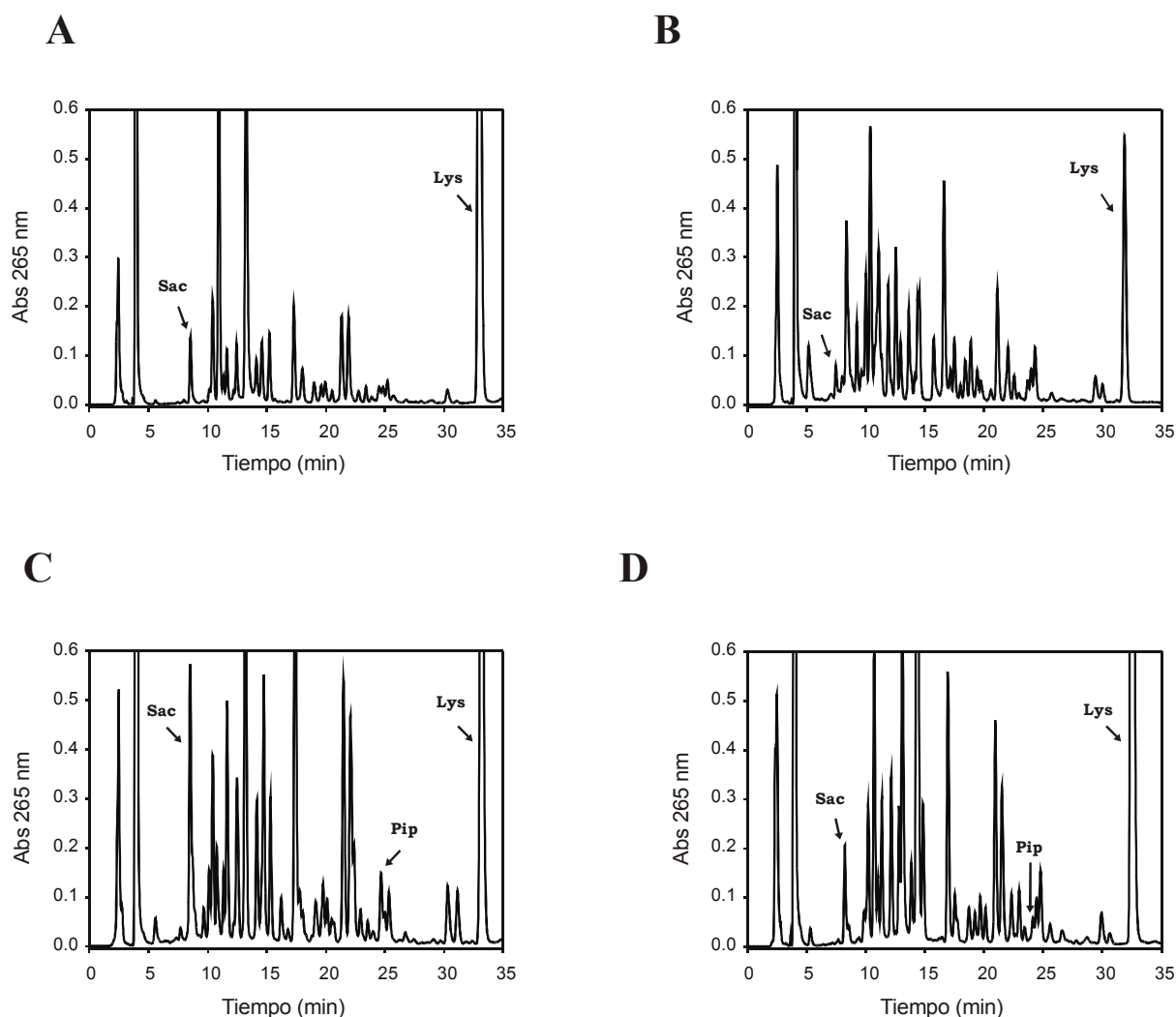


Fig. 22. Análisis mediante HPLC de la concentración intracelular de ácido pipecólico en extractos crudos de micelio de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 (A y B) y *P. chrysogenum* SR⁻ (C y D) crecido en medio mínimo MDFP suplementado con D-lisina (25 mM) como única fuente de nitrógeno y cosechado a las 48 (A y C) y 72 (B y D) horas. Se observa claramente una pequeña acumulación de ácido pipecólico en el mutante SR⁻ a las 48 horas, mientras, que la cepa parental Wis 54-1255 no acumula este iminoácido en las mismas condiciones. Sac: sacaropina; Pip: ácido pipecólico; Lys: lisina.

Las concentraciones intracelulares de P6C medida en los mismos extractos demostraron que *P. chrysogenum* SR⁻, cuando crecía con D-lisina como única fuente de nitrógeno, acumulaba niveles altos de P6C en comparación a la cepa control *P. chrysogenum* Wis 54-1255 (Tabla 5). Además, y como era de esperar, los niveles de concentración intracelular de P6C con D-lisina fueron

significativamente mayores con respecto a los valores obtenidos en micelio crecido con L-lisina como única fuente de nitrógeno tanto para la cepa control Wis 54-1255 como para el mutante *P. chrysogenum* SR⁻. Estos datos apoyan la hipótesis propuesta por Martín de Valmaseda *et al.*, (2003) de que la D-lisina se cataboliza principalmente a través de una lisina aminotransferasa (LAT) en *P. chrysogenum* (ver apartado 4 de *Discusión*).

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que: (i) *P. chrysogenum* Wis 54-1255 no es capaz de sintetizar ácido pipercolico cuando crece con L o D-lisina como únicas fuentes de nitrógeno, por lo cual, sugieren que la síntesis de ácido pipercolico en *P. chrysogenum* no se lleva a cabo a través del catabolismo de lisina y; (ii) que *P. chrysogenum* SR⁻ es capaz de sintetizar ácido pipercolico independientemente del isómero de lisina empleado como fuente de nitrógeno, por lo cual, la interrupción del gen *lys7* parece favorecer la síntesis de ácido pipercolico en este mutante.

2. EL ÁCIDO PIPECÓLICO SE SINTETIZA A TRAVÉS DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE LISINA EN *P. chrysogenum* Wis 54-1255

Puesto que se considera que en *P. chrysogenum* el ácido pipercolico no se obtiene a partir del catabolismo de lisina, decidimos estudiar si en dicho hongo filamentoso este iminoácido se sintetiza a partir de la ruta de biosíntesis de lisina, tal como se ha descrito en *A. nidulans* (Aspen y Meister, 1962).

2.1. La adición de ácido D,L- α -aminoadípico a los caldos de cultivo incrementa significativamente la acumulación de P6C y de ácido pipercolico en *P. chrysogenum* SR⁻

Si en *P. chrysogenum* Wis 54-1255 el ácido pipercolico se sintetiza a partir de la ruta biosintética de lisina, entonces, es lógico esperar que la adición de ácido D,L- α -aminoadípico a los medios de cultivo incremente la concentración intracelular de P6C y de ácido pipercolico. Con el objeto de determinar si la síntesis de ácido pipercolico deriva de la ruta biosintética de lisina en *P. chrysogenum* Wis 54-1255, se analizó por HPLC la concentración intracelular de ácido pipercolico en extractos crudos de micelio crecido en medio mínimo MDFP suplementado con L-lisina (25 mM) y ácido D,L- α -aminoadípico (25 mM) y cosechado a las 48 y 72 horas.

Sorprendentemente, los resultados obtenidos (Fig. 23) en los cromatogramas de extractos de micelio crecidos en caldos de cultivo con ácido D,L- α -aminoadípico añadido, mostraron una pequeña acumulación de ácido pipercolico en la cepa parental *P. chrysogenum* Wis 54-1255 a las 48 horas que

decrecía a las 72 horas. Sin embargo, los cromatogramas de extractos de *P. chrysogenum* SR⁻ mostraron niveles altos de ácido pipecólico acumulado a las 48 horas y que se incrementaba a las 72 horas.

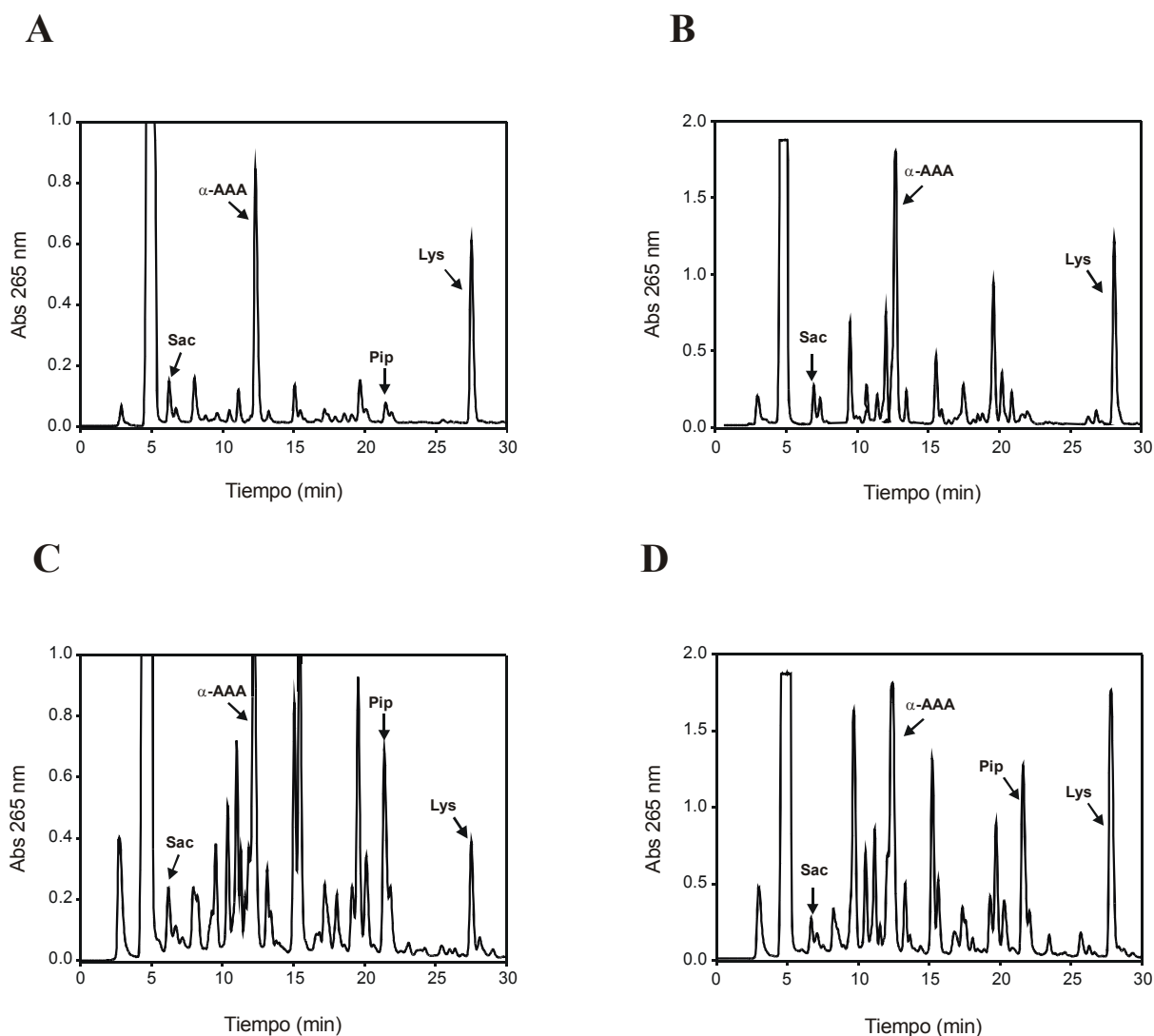


Fig. 23. Análisis mediante HPLC de la concentración intracelular de ácido pipecólico en extractos crudos de micelio de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 (A y B) y *P. chrysogenum* SR⁻ (C y D) crecido en medio mínimo MDFP suplementado con L-lisina (25 mM) y ácido D,L- α -aminoadípico (25 mM) y cosechado a las 48 (A y C) y 72 (B y D) horas. Se observa una acumulación alta de ácido pipecólico en el mutante SR⁻ que se incrementa significativamente de las 48 a las 72 horas (obsérvese la escala del eje de las ordenadas en el cromatograma obtenido a las 72 horas). De manera interesante, en la cepa parental Wis 54-1255 se observa una pequeña acumulación de ácido pipecólico a las 48 horas. Sac: sacaropina; Pip: ácido pipecólico; Lys: lisina; α -AAA: ácido D,L- α -aminoadípico.

Por otro lado, se determinó la concentración intracelular de P6C en los mismos extractos crudos. Los resultados (Tabla 5) demostraron que *P. chrysogenum* SR⁻, cuando se crecía con L-lisina más ácido D,L- α -aminoadípico como fuente de nitrógeno, acumulaba niveles significativamente mayores

de P6C en comparación a los niveles acumulados por la cepa parental Wis 54-1255 tanto a las 48 como a las 72 horas.

Es importante resaltar que cuando al medio mínimo MDFP se le añade ácido D,L- α -aminoadípico, la acumulación de ácido pipecólico *P. chrysogenum* Wis 54-1255 es detectable, cosa que no ocurre cuando la cepa parental crece con L-lisina como única fuente de nitrógeno. Además, cuando se le añade ácido D,L- α -aminoadípico al medio MDFP, la acumulación de ácido pipecólico en *P. chrysogenum* SR⁻ es significativamente mayor con relación a la acumulación observada cuando este mutante crece con L-lisina como única fuente de nitrógeno tanto a las 48 como a las 72 horas (Fig. 21 y Fig. 23 respectivamente). Igualmente, cuando al medio MDFP se le añade ácido D,L- α -aminoadípico, la concentración intracelular de P6C en *P. chrysogenum* SR⁻ cosechado a las 72 es significativamente mayor con respecto a los valores obtenidos en micelio crecido con L-lisina como única fuente de nitrógeno a las 72 horas (Tabla 5).

Estos resultados indican que: (i) la adición de ácido D,L- α -aminoadípico a los caldos de cultivo incrementa la acumulación de P6C y de ácido pipecólico en ambas cepas estudiadas; (ii) la interrupción del gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa en *P. chrysogenum* provoca la acumulación de P6C y de ácido pipecólico en el mutante *P. chrysogenum* SR⁻; (iii) la síntesis de ácido pipecólico proviene de la biosíntesis de lisina en *P. chrysogenum* Wis 54-1255, sugiriendo, que este iminoácido podría formarse a partir de ácido α -aminoadípico y; (iv) descarta definitivamente la hipótesis de que el ácido pipecólico proviene del catabolismo de lisina en *P. chrysogenum* Wis 54-1255.

2.2. El mutante auxótrofo de lisina *P. chrysogenum* TDX195 no acumula ácido pipecólico cuando se le añade ácido D,L- α -aminoadípico a los caldos de cultivo

Con la finalidad de confirmar que el ácido pipecólico se forma a partir del ácido α -aminoadípico, se procedió a analizar el mutante auxótrofo de lisina *P. chrysogenum* TDX195, el cual, tiene interrumpido el gen *lys2* que codifica la α -aminoadipato reductasa (Casqueiro *et al.*, 1999b; Casqueiro *et al.*, 1998; Casqueiro, 1997), enzima implicada en la conversión de ácido α -aminoadípico a α -aminoadipato- δ -semialdehído (forma lineal de P6C).

Por ello, nos planteamos la siguiente hipótesis: si en *P. chrysogenum* el ácido pipecólico se sintetiza a partir del ácido α -aminoadípico vía α -aminoadipato- δ -semialdehído (ruta de biosíntesis de lisina), entonces, es lógico esperar que el mutante TDX195 no acumule ácido pipecólico con la adición de ácido D,L- α -aminoadípico a los medios de cultivo.

Para dicho análisis, se llevó a cabo una fermentación en medio mínimo MDFP suplementado con L-lisina (25 mM) y ácido D,L- α -aminoadípico (25 mM) con las cepas SR⁻ y TDX195. Se cosechó el micelio a las 48 y 72 horas y se analizó por HPLC la concentración intracelular de ácido pipecólico.

Los resultados obtenidos (Fig. 24) pusieron de manifiesto que, mientras el mutante *P. chrysogenum* SR⁻ acumula concentraciones intracelulares muy elevadas de ácido pipecólico cuando crece con L-lisina y ácido D,L- α -aminoadípico como fuente de nitrógeno, el mutante *P. chrysogenum* TDX195 no mostraba la presencia de dicho iminoácido a nivel intracelular.

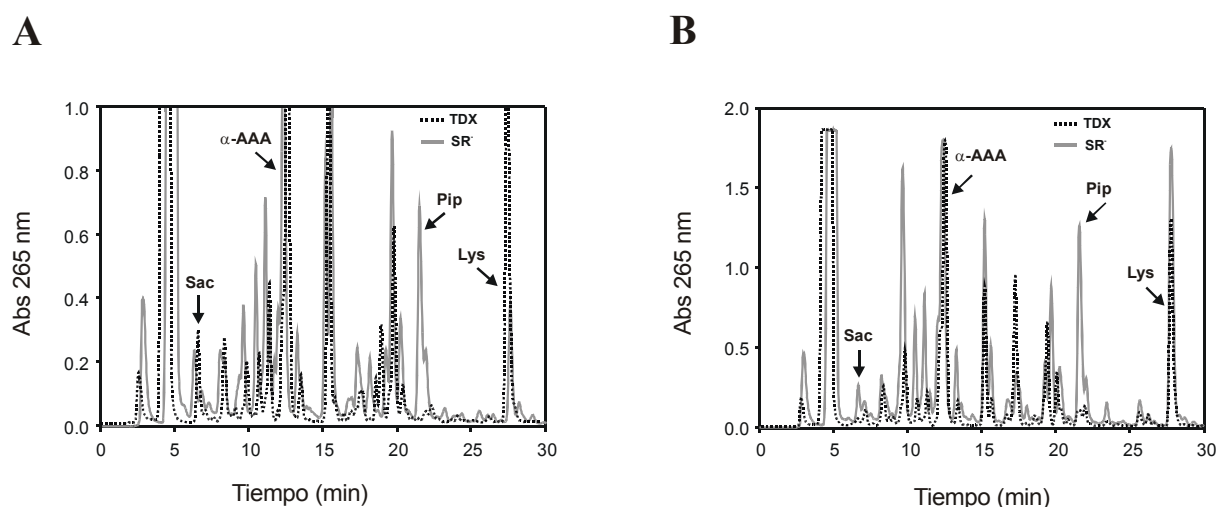


Fig. 24. Análisis mediante HPLC de la concentración intracelular de ácido pipecólico en extractos crudos de micelio crecido en medio mínimo MDFP con L-lisina y ácido D,L- α -aminoadípico y cosechado a las 48 (A) y a las 72 horas (B). Sac: sacaropina; Pip: ácido pipecólico; Lys: lisina; α -AAA: ácido D,L- α -aminoadípico. TDX: *P. chrysogenum* TDX195; SR: *P. chrysogenum* SR⁻.

Estos resultados confirman definitivamente que: (i) el ácido pipecólico se forma a partir del ácido α -aminoadípico vía α -aminoadipato- δ -semialdehído a través de la ruta biosintética de lisina en *P. chrysogenum*, tal como muestra la Figura 25 y; (ii) que la α -aminoadipato reductasa es una enzima esencial en la biosíntesis de ácido pipecólico en *P. chrysogenum*, por lo que el precursor directo del ácido pipecólico es el P6C, la forma ciclada del α -aminoadipato- δ -semialdehído.

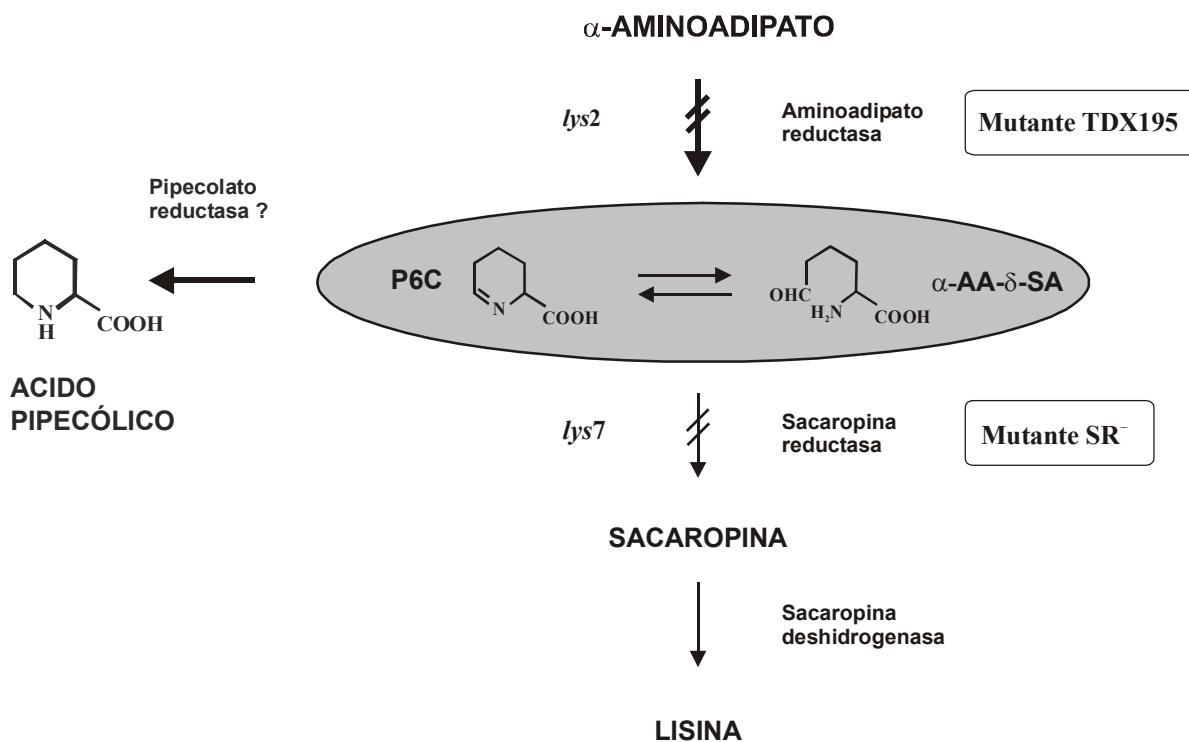


Fig. 25. Ruta de biosíntesis de ácido pipecólico en *P. chrysogenum*. La α -aminoadipato reductasa convierte el ácido α -aminoadípico en α -aminoadipato- δ -semialdehído (en equilibrio con P6C), luego una hipotética pipecolato reductasa transformaría el P6C en ácido pipecólico. Mutante TDX195: *P. chrysogenum* TDX195; Mutante SR⁻: *P. chrysogenum* SR⁻. *lys2*: gen que codifica la α -aminoadipato reductasa; *lys7*: gen que codifica la sacaropina reductasa. Las reacciones enzimáticas bloqueadas en los mutantes auxótrofos de lisina *P. chrysogenum* SR⁻ y TDX195 se indican con el símbolo //.

DISCUSIÓN GENERAL

1. LA SACAROPINA REDUCTASA, UNA ENZIMA IMPLICADA EN LA CONVERSIÓN DE ÁCIDO PIPECÓLICO EN LISINA EN *P. chrysogenum*

Uno de los aspectos más importantes logrados en este trabajo de investigación, se refiere a la clonación y caracterización molecular del gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa en *P. chrysogenum*. La sacaropina reductasa (E.C. 1.5.1.10), también conocida como sacaropina deshidrogenasa (formadora de glutamato) o α -aminoadípico semialdehído-glutamato reductasa, es una enzima dependiente de NADPH y cataliza la penúltima reacción de la ruta del α -aminoadipato para la formación de lisina. En dicha reacción, el α -aminoadipato- δ -semialdehído y el glutamato se convierten en sacaropina, siendo este pseudo-péptido el precursor inmediato de la lisina (Bhattacharjee, 1985; Johansson *et al.*, 2000a).

Inicialmente, tal como ocurría en *Rhodotorula glutinis* (Kurtz y Bhattacharjee, 1975), se observó que mutantes auxótrofos de lisina de *P. chrysogenum* eran capaces de crecer en medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipecólico. La capacidad que tienen estos mutantes auxótrofos de utilizar ácido pipecólico para complementar la auxotrofia de lisina, reveló que el ácido pipecólico se convierte en lisina en *P. chrysogenum*.

P. chrysogenum 10.25 es incapaz de crecer en medio Czapek suplementado con ácido pipecólico (mutación *pip*⁻). Además, es un mutante auxótrofo de lisina (mutación *lys*⁻) derivado de *P. chrysogenum* HS⁻, una cepa interrumpida en el gen *lys1* que codifica la homocitrato sintasa. La incapacidad del mutante 10.25 de utilizar ácido pipecólico para complementar la auxotrofia de lisina, sugería que dicho mutante podría estar bloqueado en una enzima esencial en la conversión de ácido pipecólico en lisina. Por otro lado, el mutante 10.25 es incapaz de crecer en medio mínimo Czapek suplementado con ácido α -aminoadípico. Dicha incapacidad sugirió a su vez que la “hipotética” enzima bloqueada en la conversión de ácido pipecólico en lisina, podría encontrarse en la ruta biosintética de lisina, después de la formación de α -aminoadipato- δ -semialdehído (Fig. 29).

Kinzel y Bhattacharjee (1979, 1982), determinaron por primera vez las bases bioquímicas, genéticas y enzimáticas de la conversión de ácido pipecólico en lisina en *R. glutinis*. Demostraron que el ácido pipecólico se convertía en lisina vía α -aminoadipato- δ -semialdehído (en equilibrio con el P6C) y sacaropina.

La caracterización bioquímica del mutante *lys*⁻/*pip*⁻ 10.25 permitió identificar la presencia de la actividad pipecolato oxidasa y de la sacaropina deshidrogenasa; sin embargo, se observó que el mutante 10.25 carecía de la actividad sacaropina reductasa. En la ruta biosintética de lisina, la sacaropina reductasa cataliza la conversión de α -aminoadipato- δ -semialdehído en sacaropina

(Bhattacharjee, 1985). En *P. chrysogenum* 10.25, la inactivación de la sacaropina reductasa provoca la incapacidad de utilizar ácido pipecólico y ácido α -aminoadípico para complementar la auxotrofia de lisina en dicho mutante. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kinzel y Bhattacharjee, (1979, 1982) en *R. glutinis*, los cuales indican que la sacaropina reductasa es una enzima esencial en la conversión de ácido pipecólico en lisina en esta levadura roja.

La complementación de la mutación *pip*⁻ presente en la cepa 10.25 con una librería genómica, nos permitió clonar el gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa en *P. chrysogenum*. Dicha proteína, esta constituida por 449 aminoácidos y tiene un peso molecular deducido de 48,8 kDa. La secuencia de aminoácidos de la proteína deducida del gen *lys7* mostró un alto porcentaje de identidad con las sacaropinas reductasas de otros microorganismos, especialmente, con: *Neurospora crassa* (70,4 %), *Magnaphorte grisea* (66,6 %), *Saccharomyces cerevisiae* (63,2 %) y *Schizosaccharomyces pombe* (60 %). Estos resultados sugirieron que la proteína codificada por el gen *lys7* corresponde a la sacaropina reductasa de *P. chrysogenum*.

En plantas y animales se ha descrito que el catabolismo de lisina tiene lugar vía sacaropina a través de dos reacciones enzimáticas consecutivas llevadas a cabo por la sacaropina deshidrogenasa (SDH) y la sacaropina reductasa (SR), las cuales son sintetizadas a partir de un único gen que codifica un polipéptido bifuncional; sin embargo, recientemente se ha demostrado que la planta *Arabidopsis thaliana* posee no solamente una proteína bifuncional SR/SDH, sino que también posee una enzima SDH monofuncional, la cual está codificada por un gen distinto (Tang *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000a, b; Epelbaum *et al.*, 1997). Aunque no todas las especies vegetales poseen un gen activo que codifique una SDH monofuncional, se conoce que la producción de esta enzima está directamente relacionada con un incremento del flujo de lisina vía catabólica (Tang *et al.*, 2000). Sin embargo, en *P. chrysogenum*, la complementación de la mutación *pip*⁻ de la cepa 10.25 con el gen *lys7* activo produjo la restauración de la actividad sacaropina reductasa. Estos resultados demostraron que el gen *lys7* codifica una sacaropina reductasa y que dicha proteína es monofuncional en *P. chrysogenum*.

Por otra parte, se ha descrito que existe una gran similitud entre las proteínas bifuncionales SR/SDH y las proteínas monofuncionales SR y SDH (Kemper *et al.*, 1999). La Figura 26, muestra una representación esquemática de la similitud encontrada entre algunos polipéptidos bifuncionales SR/SDH y las proteínas monofuncionales SR y SDH de diversos organismos.

Es interesante destacar que, en las proteínas bifuncionales SR/SDH, el dominio SR se encuentra en el extremo carboxilo terminal y el dominio SDH se encuentra en el extremo amino terminal de la proteína (Kemper *et al.*, 1999). En la Figura 26 se puede observar que en las proteínas bifuncionales SR/SDH de *Zea mays* (maíz) y *Arabidopsis*, el dominio SR y el dominio SDH presentan una alta similitud con las enzimas monofuncionales SR (42 %) y SDH (27 %) de *S. cerevisiae* respectivamente.

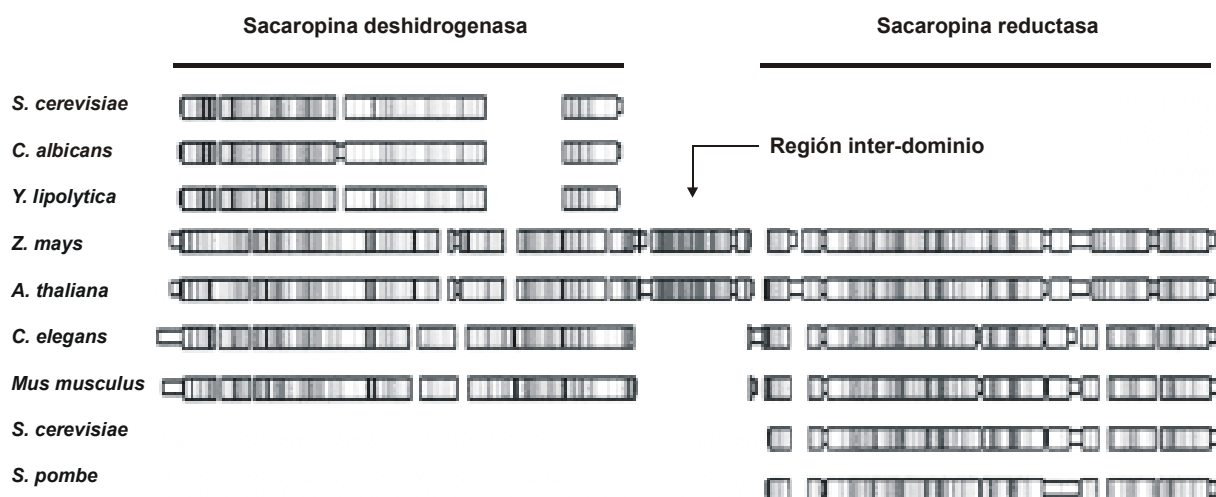


Fig. 26. Representación esquemática de la similitud encontrada entre algunas proteínas bifuncionales SR/SDH y proteínas monofuncionales SR y SDH de diversos organismos (Kemper *et al.*, 1999). Se muestra el alineamiento de proteínas monofuncionales de: *S. cerevisiae* (Los dominios SDH y SR corresponden a las proteínas LYS1 y LYS9; P38998 y P38999 respectivamente), *C. albicans* (dominio SR; P43065) y *S. pombe* (dominio SDH; AL022244) con proteínas bifuncionales SR/SDH de nemátodos (*C. elegans*; AF038615), plantas (*Z. mays* y *A. thaliana*; AF003551 y U95759 respectivamente) y mamíferos (*M. musculus*; AJ224761). Se indica la región inter-dominio presente únicamente en los polipéptidos bifuncionales SR/SDH de plantas. En el pie de esta Figura se muestran entre paréntesis los números de acceso en la base de datos GenBank para cada una de las proteínas estudiadas.

Sin embargo, aunque se encuentran grandes similitudes entre los polipéptidos bifuncionales SR/SDH y las proteínas monofuncionales SR y SDH, existen marcadas diferencias entre las proteínas bifuncionales SR/SDH de plantas y animales. Una de las diferencias consiste en que la región inter-dominio (SR/SDH) está ausente en las proteínas bifuncionales SR/SDH de animales, mientras que en plantas esta región se encuentra presente (Fig. 26). En maíz y en *Arabidopsis*, la región inter-dominio de los polipéptidos bifuncionales SR/SDH tiene un 57 % de identidad (Kemper *et al.*, 1999).

El alineamiento de la proteína monofuncional SR de *P. chrysogenum* con proteínas bifuncionales SR/SDH de plantas (*Z. mays* y *A. thaliana*) y animales (*H. sapiens* y *M. musculus*), reveló de manera interesante un alto porcentaje de similaridad (27,7; 26,4; 30,6 y 30,9 % respectivamente) con la región carboxilo terminal de las proteínas bifuncionales SR/SDH de plantas y animales (Fig. 27).

La comparación de la secuencia aminoacídica deducida del gen *lys7* de *P. chrysogenum* con las sacaropinas reductasas de otros organismos permitió construir el árbol filogenético representado en la Figura 28. Se puede observar como el grado diferente de similitud de las secuencias aminoacídicas agrupa a los organismos en tres grupos claramente definidos: (i) hongos filamentosos y levaduras, en

los que la sacaropina reductasa interviene en el metabolismo de lisina, con porcentajes de similitud de sus sacaropinas reductasas superiores al 60 %; (ii) plantas (*Z. mays* y *A. thaliana*) y; (iii) mamíferos (*H. sapiens* y *M. musculus*) en los que los que la actividad sacaropina reductasa proviene de un único polipéptido bifuncional SR/SDH que interviene en el catabolismo de lisina, con porcentajes de similitud de sus sacaropinas reductasas aproximados del 38 % con respecto a la proteína de *P. chrysogenum*. Además, se puede advertir una mayor proximidad evolutiva entre las SR monofuncionales de los microorganismos y las proteínas bifuncionales SR/SDH de las plantas, que entre las SR monofuncionales de microorganismos y las proteínas bifuncionales SR/SDH de los mamíferos estudiados (Fig. 28).

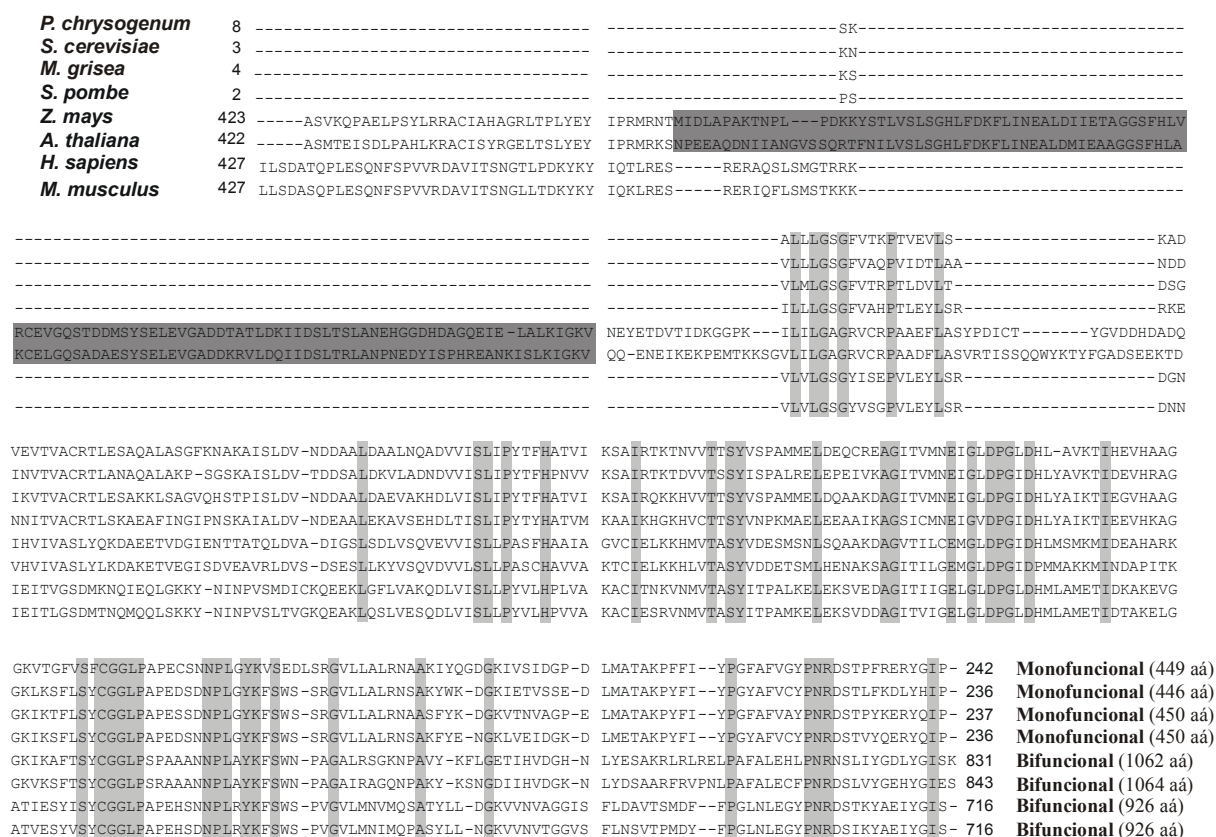


Fig. 27. Alineamiento parcial de las proteínas SR monofuncionales de *P. chrysogenum*, *S. cerevisiae*, *M. grisea* y *S. pombe* con proteínas bifuncionales SR/SDH de organismos eucariotas. Se observa que el dominio SR localizado en el extremo carboxilo terminal de las proteínas bifuncionales SR/SDH de plantas (*Z. mays* y *A. thaliana*) y mamíferos (*H. sapiens* y *M. musculus*) presentan una clara similitud con las sacaropinas reductasas monofuncionales de hongos y levaduras. Se han sombreado en gris claro los aminoácidos que son idénticos entre las proteínas bifuncionales SR/SDH de plantas y mamíferos y las SR monofuncionales de levaduras y hongos y, en gris oscuro, se indican los residuos aminoácidos más conservados de la región inter-dominio presentes en SR/SDH bifuncionales de plantas. Se observa que la región inter-dominio se encuentra ausente en las proteínas bifuncionales SR/SDH de animales.

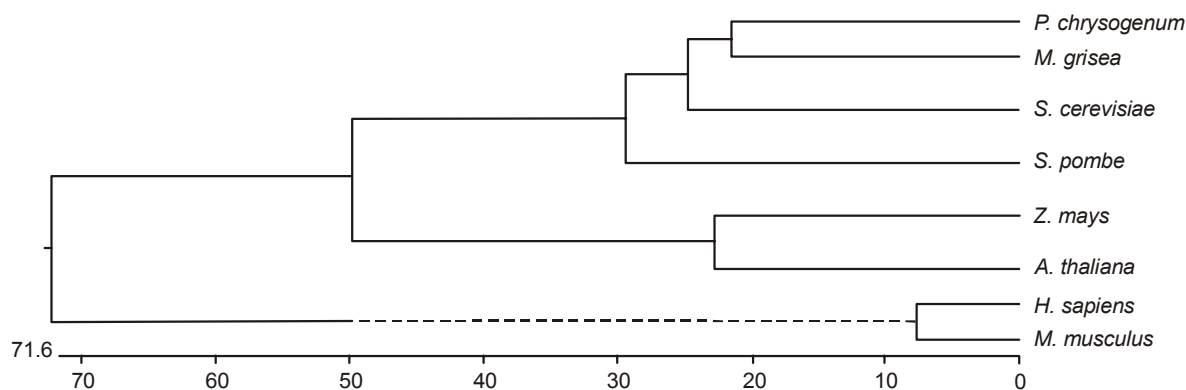


Fig. 28. Árbol filogenético de organismos que sintetizan sacaropinas reductasas monofuncionales y bifuncionales. Las secuencias de aminoácidos fueron comparadas mediante el algoritmo de *Clustal* (Higgins y Sharp, 1989). Se puede observar tres grupos diferentes de organismos (hongos y levaduras, plantas y animales) reunidos debido al grado de similitud de las secuencias aminoacídicas de sus proteínas.

2. EN *P. chrysogenum* EL ÁCIDO PIPECÓLICO SE CONVIERTE EN LISINA VÍA α -AMINOADIPATO- δ -SEMIALDEHÍDO Y SACAROPINA

Como se ha mencionado en la parte introductoria de la presente memoria, Kurtz y Bhattacharjee (1975) establecieron por primera vez la importancia nutricional del ácido pipecólico en *R. glutinis*. Demostraron que algunos mutantes auxótrofos de lisina podían crecer en medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipecólico. Posteriormente, Kinzel y Bhattacharjee (1979; 1982), determinaron la ruta de conversión de ácido pipecólico en lisina en *R. glutinis*, demostrando que el ácido pipecólico se convertía en lisina vía α -aminoadipato- δ -semialdehído y sacaropina. Así mismo, comprobaron que la pipecolato reductasa convierte el ácido pipecólico en α -aminoadipato- δ -semialdehído (en equilibrio con el P6C), un intermediario de la ruta del ácido α -aminoadípico para la formación de lisina, concluyendo que, en *R. glutinis*, el ácido pipecólico es un precursor circunstancial de lisina y no un intermediario de la ruta biosintética de lisina.

Inicialmente, en *P. chrysogenum* se observó que el ácido pipecólico se convertía en lisina, ya que algunos mutantes auxótrofos de lisina podían crecer sobre medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipecólico. Dichas cepas, denominadas *P. chrysogenum* HS⁻, L2 y TDX195, poseen mutaciones en los genes *lys1*, *lys3* o *lys2* que codifican la homocitrato sintasa, la homoaconitasa y la α -aminoadipato reductasa respectivamente (Fig. 29). Los mutantes HS⁻ y L2, están bloqueados en la síntesis de ácido α -aminoadípico (primera parte de la ruta del α -aminoadipato) y el mutante TDX195

esta bloqueado en la conversión de ácido α -aminoadípico en α -aminoadipato δ -semialdehído (primera reacción enzimática de la segunda parte de la ruta del α -aminoadipato) como indica la Figura 29.

Tomando en cuenta las características genóticas de los mutantes auxótrofos de lisina y su capacidad de crecer sobre medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipecólico, nos planteamos dos posibles hipótesis: (i) que en *P. chrysogenum* el ácido pipecólico podría convertirse directamente en lisina a través de una ruta desconocida o (ii) que podría transformarse en algún intermediario de la segunda parte de la ruta biosintética de lisina tal como sucede en *R. glutinis*.

Si *P. chrysogenum* utiliza una ruta similar a la descrita en *R. glutinis* (Kinzel y Bhattacharjee, 1979; 1982), entonces, el ácido pipecólico debería transformarse en algún intermediario de la segunda parte de la ruta biosintética de lisina, específicamente, en α -aminoadipato- δ -semialdehído (en equilibrio con P6C). La capacidad del mutante TDX195 (interrumpido en la α -aminoadipato reductasa) de crecer con ácido pipecólico sugería que, si el ácido pipecólico estaba convirtiéndose en algún intermediario de la segunda parte de la ruta biosintética de lisina, éste podría ser α -aminoadipato- δ -semialdehído o sacaropina.

Sin embargo, fue la caracterización de los mutantes *lys⁻/pip⁻* 10.25 y 7.2 lo que permitió determinar la ruta de conversión de ácido pipecólico en lisina en *P. chrysogenum*. En primer lugar, desde el punto de vista fenotípico, se comprobó que ambos mutantes auxótrofos de lisina (interrumpidos en el gen *lys1* que codifica la homocitrato sintasa) eran incapaces de crecer sobre medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipecólico. Además, el mutante 10.25, aparte de no poder utilizar el ácido pipecólico para complementar la auxotrofia de lisina, era incapaz de crecer en medio mínimo Czapek suplementado con ácido α -aminoadípico, lo que sugería que el ácido pipecólico se convierte en algún intermediario de la segunda parte de la ruta de biosíntesis de lisina (Fig. 29).

En segundo lugar, el estudio de las actividades enzimáticas: pipecolato oxidasa, sacaropina reductasa y sacaropina deshidrogenasa en los mutantes *lys⁻/pip⁻* 7.2 y 10.25, permitió determinar que estos mutantes, aunque presentaban actividad sacaropina deshidrogenasa, carecían de la actividad pipecolato oxidasa y sacaropina reductasa respectivamente. Estos resultados sugirieron que la incapacidad de los mutantes 7.2 y 10.25 para convertir ácido pipecólico en lisina estaba asociada a la deficiencia de dichas actividades enzimáticas.

Posteriormente, la complementación de la actividad sacaropina reductasa del mutante 10.25 con el gen *lys7* confirmó los resultados bioquímicos, demostrando que la sacaropina reductasa está implicada directamente en la conversión de ácido pipecólico en lisina en *P. chrysogenum*, tal como sucede en *R. glutinis* (Kinzel y Bhattacharjee, 1979; 1982) donde, previamente, se había descrito que las actividades pipecolato oxidasa, la sacaropina reductasa y la sacaropina deshidrogenasa estaban involucradas en la conversión de ácido pipecólico en lisina (Kinzel y Bhattacharjee, 1979; 1982).

Por otro lado, en el mutante 7.2, la incapacidad para convertir ácido pipercolico en lisina estaba asociada a la deficiencia de la actividad pipercolato oxidasa (Fig. 29). A continuación, el estudio de la actividad pipercolato oxidasa en *P. chrysogenum* Wis 54-1255 demostró que esta cepa (protótrofa de lisina) era capaz de convertir ácido pipercolico en P6C. Además, se demostró que cuando se utiliza ácido pipercolico como única fuente de nitrógeno se induce la actividad pipercolato oxidasa. Estos resultados confirmaron que la actividad deficiente de la pipercolato oxidasa en el mutante 7.2 era la causa de su incapacidad de crecer en medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipercolico. Además, reafirmaron que en *P. chrysogenum* la pipercolato oxidasa lleva a cabo la primera reacción enzimática en la conversión de ácido pipercolico en lisina, específicamente, la conversión de ácido pipercolico en P6C.

En *P. chrysogenum* el ácido pipercolico se oxida inicialmente a P6C por acción de la pipercolato oxidasa, tal como sucede en *Pseudomonas putida* (Chang y Adams, 1971), *Rhodotorula glutinis* (Kurtz y Bhattacharjee, 1975; Kinzel y Bhattacharjee, 1982), en *Pseudomonas sp.* (Payton y Chang, 1982) y humanos (IJlst *et al.*, 2000; Dodt *et al.*, 2000). Sin embargo, en *P. chrysogenum* no quedaba establecido si la conversión de ácido pipercolico en lisina era reversible, es decir, si el ácido pipercolico se sintetizaba a partir del catabolismo de lisina, tal como sucede en mamíferos y en algunas especies de *Pseudomonas* (Fothergill y Guest, 1977; Chang *et al.*, 1990).

En conclusión, la capacidad de los mutantes auxótrofos de lisina HS⁻, L2 y TDX195 de utilizar ácido pipercolico para satisfacer sus requerimientos nutricionales, permitió descubrir que el ácido pipercolico se convierte en lisina en *P. chrysogenum*. La caracterización bioquímica y molecular de los mutantes *lys⁻/pip⁻* nos permitió determinar: (i) que la actividad deficiente de la pipercolato oxidasa y la sacaropina reductasa identificada en las cepas 7.2 y 10.25 respectivamente, genera la incapacidad de utilizar ácido pipercolico para complementar la auxotrofia de lisina en dichos mutantes y, por consiguiente; (ii) que las enzimas pipercolato oxidasa y sacaropina reductasa están directamente implicadas en la conversión de ácido pipercolico en lisina en *P. chrysogenum*. Por otro lado, dicha caracterización nos permitió conocer que en *P. chrysogenum* el ácido pipercolico es un precursor circunstancial de lisina, y no un intermediario de la ruta biosintética de lisina, tal como concluyeron Kinzel y Bhattacharjee en *R. glutinis* (1979).

Finalmente, como se aprecia en la Figura 29, en *P. chrysogenum* el ácido pipercolico se convierte en lisina vía α -aminoadipato- δ -semialdehído y sacaropina¹. El primer paso de la conversión lo lleva a cabo la pipercolato oxidasa que convierte el ácido pipercolico en α -aminoadipato- δ -semialdehído (en equilibrio con P6C). El segundo paso es catalizado por la sacaropina reductasa que

¹ Con la finalidad de facilitar la nomenclatura, la ruta de conversión de ácido pipercolico en lisina vía α -aminoadipato- δ -semialdehído y sacaropina pasará a denominarse ruta de conversión vía sacaropina.

convierte α -aminoadipato- δ -semialdehído en sacaropina y, ésta, se transforma finalmente en lisina a través de la sacaropina deshidrogenasa (Naranjo *et al.*, 2001).

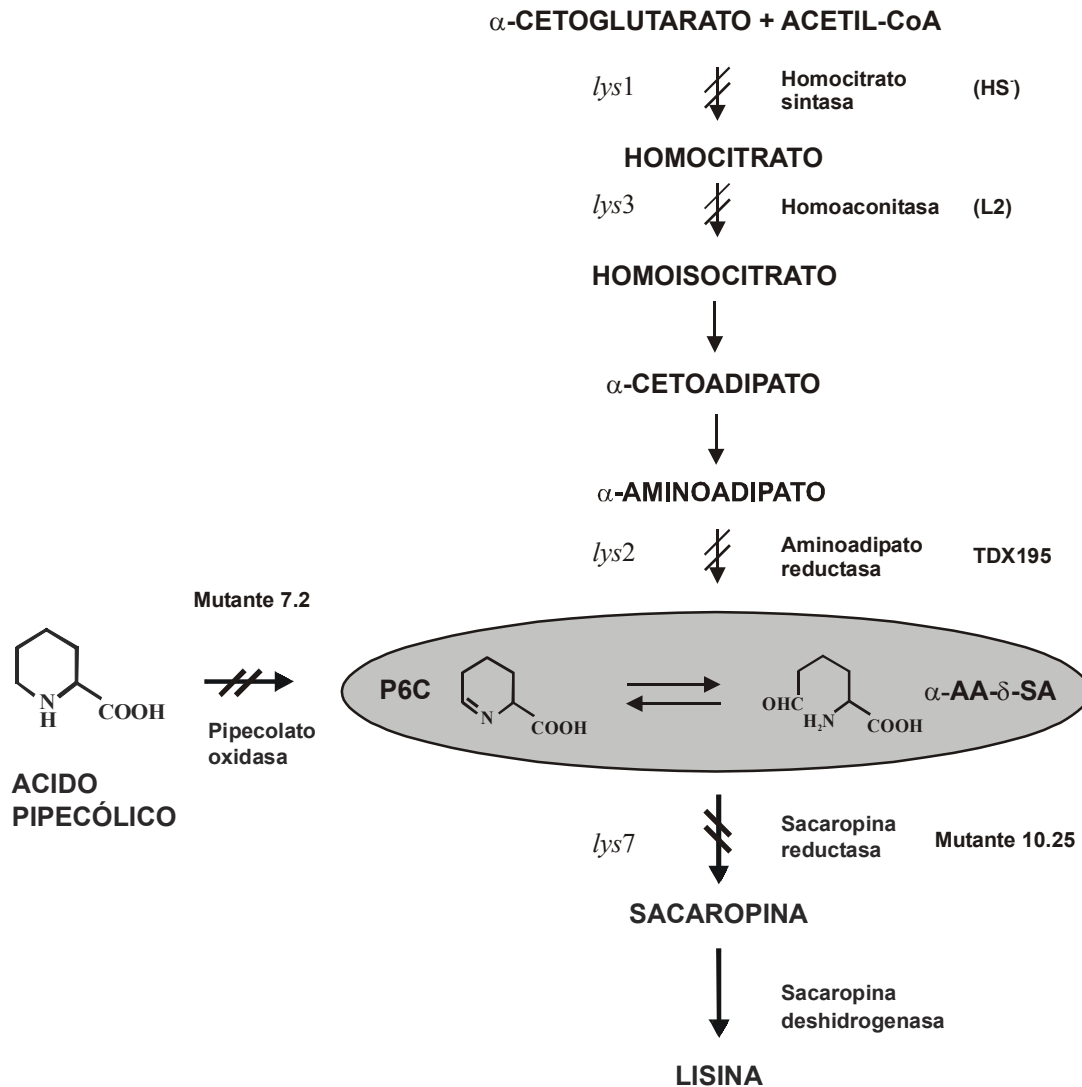


Fig. 29. Ruta de conversión de ácido pipecólico en lisina en *P. chrysogenum* vía sacaropina. Los pasos de la conversión bloqueados en los mutantes 7.2 y 10.25 y las reacciones enzimáticas bloqueadas en los mutantes auxótrofos de lisina HS, TDX195 y L2 están indicados con el símbolo //. α -AA- δ -SA: α -aminoadipato- δ -semialdehído; P6C: ácido piperideín-6-carboxílico.

3. INTERRUPCIÓN DEL GEN *lys7* POR LA TÉCNICA DE LA DOBLE RECOMBINACIÓN

La técnica de interrupción génica en *P. chrysogenum* fue desarrollada inicialmente en nuestro laboratorio por Casqueiro J. y ha sido utilizada para inactivar el gen *lys2* y el gen *lys1* de

P. chrysogenum Wis 54-1255 (Casqueiro, 1997; Casqueiro *et al.*, 1999b, 2001, 2002; Bañuelos *et al.*, 2002). Este método se ha utilizado en numerosas ocasiones para comprobar la función biológica de varios genes implicados en la ruta de síntesis de lisina de *S. cerevisiae* (Wang *et al.*, 1989; Feller *et al.*, 1994; 1999; Ramos *et al.*, 1996), *Y. lipolytica* (Pérez-Campo *et al.*, 1996), *A. nidulans* (Weidner *et al.*, 1997) y *T. thermophilus* (Kosuge y Hoshino, 1998; Kobashi *et al.*, 1999).

Las conclusiones derivadas de los experimentos desarrollados en *P. chrysogenum* (Casqueiro *et al.*, 1999a, 1999b, 2001, 2002; Bañuelos *et al.*, 2002), junto a los precedentes existentes en *S. cerevisiae* (Rothstein, 1983; 1991), llevaron a utilizar la técnica de sustitución o doble entrecruzamiento debido a la mayor estabilidad genética y fenotípica que presentan los transformantes interrumpidos mediante esta técnica frente a los obtenidos mediante integración simple (Casqueiro *et al.*, 2001; 2002). Los resultados de la interrupción del gen *lys7* confirman los datos obtenidos por Casqueiro *et al.* (1999b) y Bañuelos *et al.* (2002) con relación a dos aspectos: (i) a la frecuencia de obtención de transformantes interrumpidos y; (ii) a la estabilidad fenotípica de los transformantes interrumpidos.

Utilizando el plásmido pDL7 (apartado 3.4 de *Materiales y Métodos*, Fig. 5), con 10 kb de zona homóloga a la región del cromosoma donde se localiza el *locus lys7*, se obtuvo un transformante interrumpido (denominado *P. chrysogenum* SR⁻) entre 3.000 transformantes totales ensayados. En dicha cepa, se produjo un proceso de recombinación del gen *lys7* endógeno que condujo a su inactivación. El análisis de *Southern* (Capítulo II, apartado 1.5.1 de *Resultados*, Fig. 13), indicó que la cepa *P. chrysogenum* SR⁻ tenía deleccionado el extremo 3' del gen *lys7* (1.000 pb aproximadamente). Posteriormente, el estudio de la actividad sacaropina reductasa en *P. chrysogenum* SR⁻, confirmó que este mutante carecía de dicha actividad enzimática.

Los resultados obtenidos sobre la dificultad en la interrupción del gen *lys7*, coinciden con los resultados obtenidos por Casqueiro *et al.* (1999b) en la inactivación de gen *lys2* y con los resultados obtenidos por Bañuelos *et al.* (2002) en la disrupción del gen *lys1*, y confirman la baja eficiencia del método de doble recombinación para la interrupción génica en *P. chrysogenum*. La frecuencia de obtención de transformantes interrumpidos en el gen *lys7* (1 de cada 3.000 transformantes aproximadamente) fue significativamente menor que las obtenidas en la interrupción de los genes *lys2* y *lys1*. En el caso de la interrupción del gen *lys2*, se obtuvo una frecuencia de 1 transformante interrumpido entre una población de 728 transformantes totales, utilizando un plásmido con una zona homóloga al *locus lys2* de 7,3 kb (Casqueiro *et al.*, 1997; 1999b). Mientras que, en el caso de la interrupción del gen *lys1*, se obtuvo una frecuencia de 1 transformante interrumpido entre una población de 636 transformantes totales, utilizando un plásmido con una zona homóloga al *locus lys1* de 9 kb (Bañuelos, 2000; Bañuelos *et al.*, 2002). Adicionalmente, los resultados de la interrupción del gen *lys7* muestran el hecho ya comprobado (Cantoral *et al.*, 1987; Casqueiro *et al.*, 1999b; 2002) de

que la integración de ADN exógeno en el genoma de *P. chrysogenum* es rara por recombinación homóloga y se produce predominantemente por recombinación heteróloga.

Por otro lado, la frecuencia de reversión de la auxotrofia de lisina descrita en el transformante de *P. chrysogenum* interrumpido en el gen *lys2* por doble recombinación era menor de 4×10^{-9} (Casqueiro *et al.*, 1999b) y la frecuencia de reversión de los transformantes interrumpidos en el gen *lys1* era menor de $3,33 \times 10^{-8}$ (Bañuelos, 2000). El análisis de la tasa de reversión de *P. chrysogenum* SR⁻ (interrumpido en el gen *lys7*), indicó que el fenotipo auxotrófico es altamente estable, ya que ningún revertiente se obtenía en una población de 5.2×10^7 esporas. Este dato que confirma la estabilidad fenotípica de los transformantes de *P. chrysogenum* interrumpidos genéticamente por doble recombinación (Casqueiro *et al.*, 1999b).

En *P. chrysogenum*, la interrupción del gen *lys7* ha permitido demostrar: (i) que este gen codifica la sacaropina reductasa, la enzima que transforma α -aminoadipato- δ -semialdehído en sacaropina en la ruta biosintética de lisina; (ii) la existencia de un único gen en el genoma que codifica dicha actividad; (iii) que la actividad sacaropina reductasa es imprescindible para la conversión de ácido pipecólico en lisina vía sacaropina; (iv) que provoca la acumulación intracelular de P6C y, bajo ciertas condiciones de cultivo, también acumula ácido pipecólico en *P. chrysogenum* SR⁻; (v) que el ácido pipecólico se sintetiza a través de la ruta biosintética de lisina, específicamente, a partir del ácido α -aminoadípico y; (vi) que induce la activación de una ruta adaptativa de conversión de ácido pipecólico en lisina hasta ahora desconocida.

4. EL ÁCIDO PIPECÓLICO SE CONVIERTE EN LISINA A TRAVÉS DE UNA RUTA ADAPTATIVA EN *P. chrysogenum* SR⁻

Como se ha descrito en el apartado anterior, *P. chrysogenum* es capaz de convertir ácido pipecólico en lisina utilizando α -aminoadipato- δ -semialdehído y sacaropina como intermediarios (ruta de conversión vía sacaropina), tal como sucede en *R. glutinis* (Kinzel y Bhattacharjee, 1979; 1982; Naranjo *et al.*, 2001). Sin embargo, el mutante *P. chrysogenum* SR⁻ tiene inactivado el gen *lys7* (carece de actividad sacaropina reductasa) y es capaz de convertir ácido pipecólico en lisina; por tanto, debe existir otra vía de conversión que se activa en dicho mutante. La formación de minúsculas colonias sobre medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipecólico sugiere que dicha conversión se produce con muy baja eficiencia en *P. chrysogenum* SR⁻.

La primera evidencia observada de la existencia de una ruta adaptativa de conversión de ácido pipecólico en lisina fue la capacidad del mutante auxótrofo de lisina *P. chrysogenum* SR⁻ de crecer con muy baja eficiencia sobre medio mínimo Czapek suplementado con ácido pipecólico como única

fuelle de nitrógeno (Capítulo III, apartado 1 de *Resultados*). Posteriormente, estudios bioquímicos confirmaron los resultados fenotípicos y permitieron conocer algunos aspectos sobre la ruta adaptativa utilizada por el mutante SR⁻. Dichos estudios mostraron: (i) que la actividad pipecolato oxidasa se induce en *P. chrysogenum* SR⁻ cuando crece con ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno; (ii) que el mutante SR⁻ acumula niveles de P6C significativamente más altos con relación a la cepa control Wis 54-1255 y; (iii) que *P. chrysogenum* SR⁻ acumula lisina y sacaropina cuando crece con ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno (análisis por HPLC). Estos resultados confirmaron inequívocamente que el mutante *P. chrysogenum* SR⁻ utiliza una ruta adaptativa por medio de la cual convierte ácido pipecólico en lisina.

Por otro lado, los resultados experimentales nos permitieron conocer algunos aspectos sobre el funcionamiento de la ruta adaptativa de conversión de ácido pipecólico en lisina utilizada por *P. chrysogenum* SR⁻, los cuales se detallan a continuación:

En primer lugar, en la conversión de ácido pipecólico en lisina, la ruta adaptativa que utiliza el mutante SR⁻ para complementar la auxotrofia de lisina es mucho menos eficiente que la ruta de conversión vía sacaropina. Esto se deduce tomando en cuenta dos aspectos fundamentales: (i) el crecimiento pobre y lento que muestra *P. chrysogenum* SR⁻ en distintos medios de cultivo con ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno y; (ii) la alta acumulación intracelular de P6C en el mutante SR⁻ con relación a la cepa control Wis 54-1255 sostenida en el tiempo (Capítulo III, apartado 2 de *Resultados*), sugiriendo, que el P6C no es transformado eficientemente en lisina y por lo tanto se acumula.

En segundo lugar, los resultados obtenidos sugieren que la pipecolato oxidasa cataliza la primera reacción enzimática tanto en la ruta de conversión vía sacaropina como en la ruta adaptativa. Este supuesto se apoya en que la pipecolato oxidasa se induce en *P. chrysogenum* SR⁻ cuando se utiliza ácido pipecólico como única fuente de nitrógeno, y en el hecho de que el mutante *P. chrysogenum* 7.2 carece de la actividad pipecolato oxidasa.

En tercer lugar, los resultados obtenidos sugieren que en la ruta adaptativa podría existir un paso crítico o deficiente en la conversión de ácido pipecólico en lisina. Dicha deficiencia, debería localizarse en una reacción enzimática entre el intermediario P6C y la lisina. Este segundo paso de la ruta adaptativa de *P. chrysogenum* SR⁻ que transforma P6C en lisina queda todavía sin esclarecer, sin embargo, tomando en cuenta los resultados obtenidos en nuestro laboratorio por Martín de Valmaseda *et al.* (2003), podemos especular sobre la posible reacción enzimática que estaría implicada en el segundo paso de la ruta adaptativa de *P. chrysogenum* SR⁻.

En *P. chrysogenum*, Martín de Valmaseda *et al.* (2003) han establecido la existencia de dos rutas catabólicas de lisina diferentes dependiendo del isómero que se trate (L o D). Han demostrado que cuando se usa L-lisina como única fuente de nitrógeno se induce la actividad sacaropina deshidrogenasa (SDH) y la acumulación de sacaropina. Así mismo, se ha demostrado que cuando se

utiliza L-lisina como única fuente de nitrógeno se induce la actividad lisina aminotransferasa (LAT). Por otro lado, se ha demostrado que cuando se usa D-lisina como única fuente de nitrógeno se induce la actividad LAT, mientras, que la actividad SDH no es inducida en las mismas condiciones.

La LAT es una enzima que convierte L-lisina en P6C en el catabolismo de lisina en diversos microorganismos, tales como: *Flavobacterium fuscum* (Soda y Misono, 1971), *Rhodotorula glutinis* (Kinzel *et al.*, 1983), *Nocardia lactandurans* (Kern *et al.*, 1980), *Candida utilis* (Hammer y Bode, 1992), *Escherichia coli* (Fujii *et al.*, 2002a).

Deliberando sobre cómo podría convertirse el P6C en lisina en la ruta adaptativa de *P. chrysogenum* SR⁻ se ha formulado una hipótesis. Dicho planteamiento se basa en que el P6C podría convertirse en lisina a través de la LAT (Martín de Valmaseda *et al.*, 2003). Esta enzima de *P. chrysogenum* en condiciones normales convierte L-lisina + α -cetoadipato en ácido α -aminoadípico + P6C. Se especula que esta enzima podría ser reversible. Esta hipótesis se apoya con el hecho de que el doble mutante *lys⁻/pip⁻* 10.25 (inactivado en la homocitrato sintasa y la sacaropina reductasa) es incapaz de convertir ácido pipecólico en lisina, es decir, no puede utilizar ni la ruta vía sacaropina ni la ruta adaptativa para complementar la auxotrofia de lisina. A diferencia del mutante SR⁻ que esta interrumpido únicamente en la sacaropina reductasa (gen *lys7*), el mutante 10.25 esta bloqueado tanto en la homocitrato sintasa como en la sacaropina reductasa (genes *lys1* y *lys7* respectivamente). Por lo tanto, la interrupción en la primera parte de la ruta biosintética de lisina (gen *lys1* de la homocitrato sintasa) genera la incapacidad de sintetizar ácido α -aminoadípico. Si la LAT de *P. chrysogenum* fuera reversible, para poder formar L-lisina + α -cetoadipato tendrían que existir los precursores ácido α -aminoadípico + P6C. Sin embargo, en la cepa 10.25, la interrupción en la primera parte de la ruta del α -aminoadipato (gen *lys1* de la homocitrato sintasa) impide que este mutante pueda sintetizar ácido α -aminoadípico, por lo tanto, tampoco podría formar L-lisina + α -cetoadipato a través de la LAT en sentido reverso. La Figura 30 muestra un circuito hipotético de como podría llevarse a cabo la conversión de ácido pipecólico en lisina en la ruta adaptativa que utiliza *P. chrysogenum* SR⁻.

5. LA INTERRUPCIÓN DEL GEN *lys7* PROVOCA LA ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE P6C Y ÁCIDO PIPECÓLICO EN *P. chrysogenum* SR⁻

Se ha descrito anteriormente que el ácido pipecólico, un iminoácido de seis átomos de carbono, es un precursor importante para la biosíntesis de metabolitos secundarios en microorganismos y plantas. El ácido pipecólico y sus derivados tienen un gran potencial en la industria farmacológica, por lo tanto, decidimos investigar si *P. chrysogenum* sintetiza dicho iminoácido y, de sintetizarlo, estudiar la maquinaria biosintética mediante la cual se lleva a cabo.

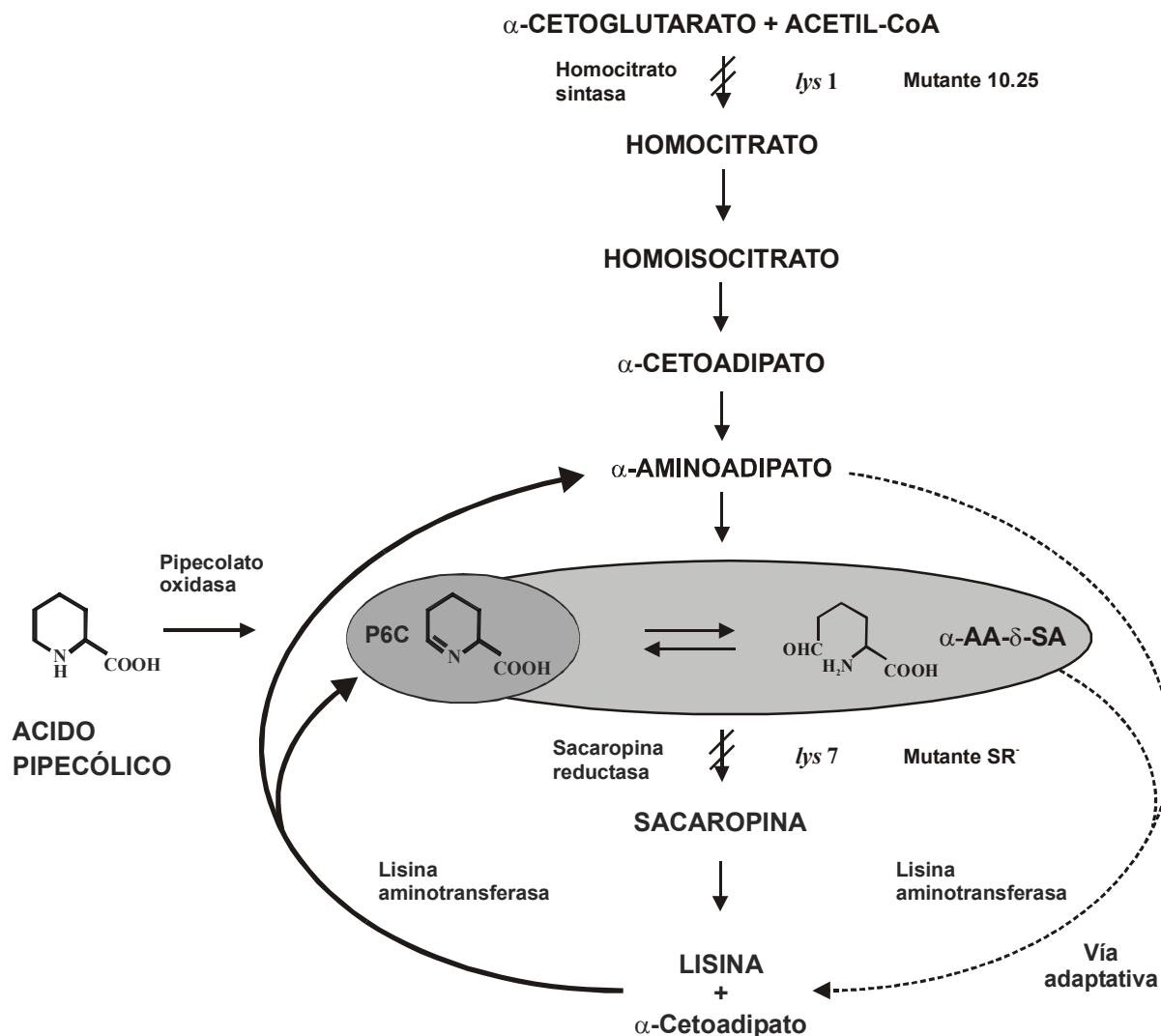


Fig. 30. Ruta adaptativa “hipotética” de la conversión de ácido piperidico en lisina utilizada por *P. chrysogenum* SR. Inicialmente, el ácido piperidico se transforma en P6C por acción de la piperolato oxidasa, posteriormente, el P6C + ácido α -aminoadipico se transformaría en L-lisina + α -cetoadipato en presencia de la lisina aminotransferasa (LAT). En condiciones normales, La LAT cataboliza L-lisina + α -cetoadipato a P6C + ácido α -aminoadipico. También se muestra la ruta de conversión de ácido piperidico en lisina via sacaropina. Los pasos de la conversión bloqueados en el mutante 10.25 (homocitrato sintasa y sacaropina reductasa) y en el mutante SR (sacaropina reductasa) se indican con el símbolo //.

α -AA- δ -SA: α -aminoadipato- δ -semialdehído; P6C: ácido piperidico-6-carboxilico.

Se ha descrito, que la formación de ácido piperidico esta relacionada con el metabolismo de lisina en varios organismos, incluyendo mamíferos, plantas, bacterias, levaduras y hongos (Goncalves-Butruille *et al.*, 1996; IJlst *et al.*, 2000; Dodt *et al.*, 2000; Kinzel y Bhattacharjee, 1982; Aspen y Meister, 1962; Fujii *et al.*, 2002a; Fujii *et al.*, 2002b; Fothergill y Guest, 1977). En los hongos filamentosos *Metarhizium anisopliae* y *Rhizoctonia leguminicola* el ácido piperidico se forma a partir del catabolismo de lisina (Sim y Perry, 1997; Wickwire *et al.*, 1990a, b). Sin embargo, Aspen y

Meister (1962) establecieron que en *Aspergillus nidulans* el ácido pipecólico se forma a partir de ácido α -aminoadípico, un intermediario de la ruta biosintética de lisina. Por otro lado, Fangmeier y Leistner (1980) demostraron que en *Neurospora crassa* el ácido pipecólico era un intermediario en la conversión de D-lisina a L-lisina.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron, a diferencia de lo que ocurre en *M. anisopliae* y *R. leguminicola* (Sim y Perry, 1997; Wickwire *et al.*, 1990a, b), que *P. chrysogenum* Wis 54-1255 no acumula ácido pipecólico cuando crece con L-lisina como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, el mutante SR⁻ (inactivado en el gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa), acumula niveles bajos de ácido pipecólico en las mismas condiciones y, en comparación a la cepa control Wis 54-1255, acumula niveles más altos de P6C, el precursor inmediato de ácido pipecólico.

Es importante resaltar, que los resultados obtenidos con D-lisina fueron muy similares a los encontrados cuando se utilizó L-lisina como única fuente de nitrógeno, lo cual, indica que el ácido pipecólico tampoco se forma a través del catabolismo de D-lisina, tal como sucede en *N. crassa* (Fangmeier y Leistner, 1980).

Por otro lado, es interesante destacar que el mutante SR⁻ y la cepa control *P. chrysogenum* Wis 54-1255, cuando crecen con L-lisina o D-lisina como únicas fuentes de nitrógeno, acumulan sacaropina. En nuestro laboratorio se ha observado que la actividad sacaropina deshidrogenasa (SDH) en *P. chrysogenum*, cuando utiliza L-lisina como única fuente de nitrógeno, se induce y se acumula sacaropina (Martín de Valmaseda *et al.*, 2003). Esto se debe a que la SDH es la primera enzima que convierte L-lisina en sacaropina en la ruta catabólica de lisina, tal como sucede en otros organismos (Bhattacharjee 1985; Markovitz *et al.*, 1984; Galili, 1985; Zhu *et al.*, 2000b). Además, cuando *P. chrysogenum* utiliza L-lisina como única fuente de nitrógeno, también se induce la actividad lisina aminotransferasa (LAT), una enzima que convierte L-lisina en P6C, tal como sucede en otros microorganismos (Soda y Misono, 1971; Kinzel *et al.*, 1983; Kern *et al.*, 1980; Hammer y Bode, 1992; Fujii *et al.*, 2002a; Esmahan *et al.*, 1994). Sin embargo, cuando *P. chrysogenum* usa D-lisina como única fuente de nitrógeno se induce la actividad LAT, mientras, que la actividad SDH no es inducida en las mismas condiciones. Por lo tanto, Martín de Valmaseda *et al.* (2003), determinaron la existencia de dos rutas catabólicas de lisina diferentes en *P. chrysogenum* que dependen del tipo de isómero usado: (i) L-lisina, que se cataboliza a través de la ruta biosintética de lisina (en sentido reverso) y a través de la LAT y; (ii) D-lisina, que se cataboliza únicamente a través de la LAT.

Nuestros resultados apoyan la premisa de que la L-lisina se cataboliza a través de la ruta biosintética de lisina (vía reversa) en *P. chrysogenum*, ya que las cepas (*P. chrysogenum* SR⁻ y *P. chrysogenum* Wis 54-1255) acumulan sacaropina cuando crecen con L-lisina como única fuente de nitrógeno. Aún más, se observó una mayor acumulación de sacaropina sostenida en el tiempo en el mutante SR⁻ (a las 48 y 72 horas respectivamente), lo cual, podría ser debido a su incapacidad de

convertir sacaropina en α -aminoadipato- δ -semialdehído por la inactivación de la actividad sacaropina reductasa (codificada por el gen *lys7*).

Por otro lado, también es importante resaltar que, en la cepa control Wis 54-1255 y en el mutante SR⁻, la concentración intracelular de P6C es significativamente mayor cuando crecen con D-lisina como única fuente de nitrógeno que cuando crecen con L-lisina. Esto podría explicarse tomando en cuenta varios aspectos: (i) en primer lugar, que la L-lisina puede ser catabolizada por dos vías en *P. chrysogenum*, a través de la SDH y mediante la LAT. Para llevar a cabo estas dos actividades, las enzimas deberían competir de manera independientemente para catabolizar el mismo sustrato (L-lisina + α -cetoadipato), ya que mientras la LAT convierte directamente L-lisina en P6C, la SDH convierte L-lisina en sacaropina. Compartir un mismo sustrato para llevar a cabo dos reacciones enzimáticas distintas, podría ocasionar que la magnitud de los productos resultantes se vean disminuidos; en este caso, la concentración intracelular de P6C cuando se utiliza L-lisina como única fuente de nitrógeno, (ii) en segundo lugar, que cuando la D-lisina se utiliza como única fuente de nitrógeno, la LAT se induce para convertir directamente D-lisina en P6C, mientras que la SDH no es inducida en las mismas condiciones. En este caso, la D-lisina serviría de sustrato exclusivo para llevar a cabo la actividad LAT, ocasionando que la concentración intracelular de P6C sea significativamente mayor y, (iii) en tercer lugar, al efecto fisiológico debido al crecimiento, puesto que éste es mucho menor con D-lisina que cuando se utiliza L-lisina como única fuente de nitrógeno.

6. EL ÁCIDO PIPECÓLICO SE SINTETIZA A PARTIR DEL ÁCIDO α -AMINOADÍPICO EN *P. chrysogenum*

Argumentos científicos sólidos afirman que el ácido pipecólico se forma a partir del catabolismo de lisina en varios organismos. Sin embargo, la primera y única evidencia descrita en hongos filamentosos que indica que el ácido pipecólico no deriva del catabolismo de lisina procede del trabajo de Aspen y Meister (1962). Estos autores identificaron algunos mutantes auxótrofos de lisina de *A. nidulans* que eran capaces de acumular ácido pipecólico cuando crecían sobre medio mínimo con cantidades limitantes de lisina. Además, determinaron que en *A. nidulans* el ácido pipecólico deriva del ácido α -aminoadípico, que es un intermediario de la ruta biosintética de lisina.

Tomando en cuenta lo descrito en la literatura postulamos que en *P. chrysogenum* el ácido pipecólico se podría sintetizar por dos vías: (i) a partir del catabolismo de lisina o (ii) a partir de la ruta biosintética de lisina. El hecho de que *P. chrysogenum* cuando crece con L o D-lisina como única fuente de nitrógeno no acumula ácido pipecólico descarta la primera posibilidad, en la que el ácido pipecólico se forma del catabolismo de lisina en este hongo filamentosos. Por tanto, nos planteamos la

siguiente hipótesis: si en *P. chrysogenum* el ácido pipecólico se sintetiza a partir de la ruta biosintética de lisina, entonces, la adición de ácido α -aminoadípico a los caldos de cultivo debería estimular la concentración intracelular de P6C y ácido pipecólico.

Nuestros experimentos le dieron validez a dicha hipótesis al demostrar que el mutante *P. chrysogenum* SR⁻ acumula niveles elevados de ácido pipecólico; es más, incluso, la cepa parental Wis 54-1255 acumula pequeños niveles de ácido pipecólico cuando se le añade ácido α -aminoadípico a los caldos de cultivo. Estos resultados coinciden con los resultados encontrados por Aspen y Meister (1962) en *A. nidulans*, y dieron argumentos consistentes para confirmar que en *P. chrysogenum* el ácido pipecólico se sintetiza a partir del ácido α -aminoadípico (vía biosintética de lisina) y no a partir del catabolismo de lisina.

También es importante destacar que tanto en la cepa control Wis 54-1255 como en el mutante SR⁻, cuando se añade ácido α -aminoadípico a los caldos de cultivo, la concentración intracelular de P6C es mayor que cuando se crecen con L-lisina como única fuente de nitrógeno. Esto podría ser debido al aumento del flujo metabólico hacia la formación de P6C, producto de la adición de ácido α -aminoadípico a través de la α -aminoadipato reductasa, enzima de la ruta de biosíntesis de lisina que convierte ácido α -aminoadípico en P6C (Casqueiro *et al.*, 1998, 1999b; Hijarrubia *et al.*, 2000). Además, cuando se añade ácido α -aminoadípico a los caldos de cultivo del mutante SR⁻, la acumulación de P6C es considerablemente mayor a la de la cepa parental y, además, dicha acumulación se incrementa en el tiempo (Capítulo IV, apartado 1 de *Resultados*, Tabla 5). Esto parece ser debido a la incapacidad de dicho mutante de convertir P6C en sacaropina por la inactivación de la sacaropina reductasa (la interrupción del gen *lys7*).

Para confirmar los resultados obtenidos, nos planteamos una nueva hipótesis: si en *P. chrysogenum* la adición de ácido α -aminoadípico provoca la acumulación de P6C y ácido pipecólico vía α -aminoadipato reductasa, entonces, el mutante auxótrofo de lisina *P. chrysogenum* TDX195 no debería ser capaz de acumular ninguno de estos dos precursores de metabolitos secundarios. Esto se debe a que el mutante TDX195 tiene interrumpido el gen *lys2* que codifica la α -aminoadipato reductasa, la enzima que convierte ácido α -aminoadípico en P6C (forma ciclada del α -aminoadipato- δ -semialdehído) en la ruta biosintética de lisina (Casqueiro *et al.*, 1998, 1999b; Hijarrubia *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos demostraron que el mutante TDX195 es incapaz de formar ácido pipecólico cuando se añade ácido α -aminoadípico a los caldos de cultivo mientras, que en las mismas condiciones, el mutante SR⁻ acumula una alta concentración de ácido pipecólico, confirmando inequívocamente que el ácido pipecólico se sintetiza a partir del ácido α -aminoadípico en *P. chrysogenum*. Además, los resultados indicaron que la α -aminoadipato reductasa es una enzima esencial para la biosíntesis de ácido pipecólico en este hongo filamentoso.

Finalmente, en este trabajo se ha demostrado con sólidas bases bioquímicas y moleculares que, en *P. chrysogenum*, la interrupción del gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa provoca la acumulación de P6C y, en determinadas condiciones de crecimiento, también provoca la acumulación de ácido pipecólico (Naranjo *et al.*, 2003).

Uno de los logros más significativos en el presente trabajo de investigación se refiere a la caracterización de la biosíntesis de ácido pipecólico en *P. chrysogenum*. Como se ha presentado en esta memoria, datos experimentales sólidos concluyen que en *P. chrysogenum* el ácido pipecólico se forma a partir del ácido α -aminoadípico (vía biosintética de lisina) y no a partir del catabolismo de lisina (Naranjo *et al.*, 2003), tal como muestra la Figura 31.

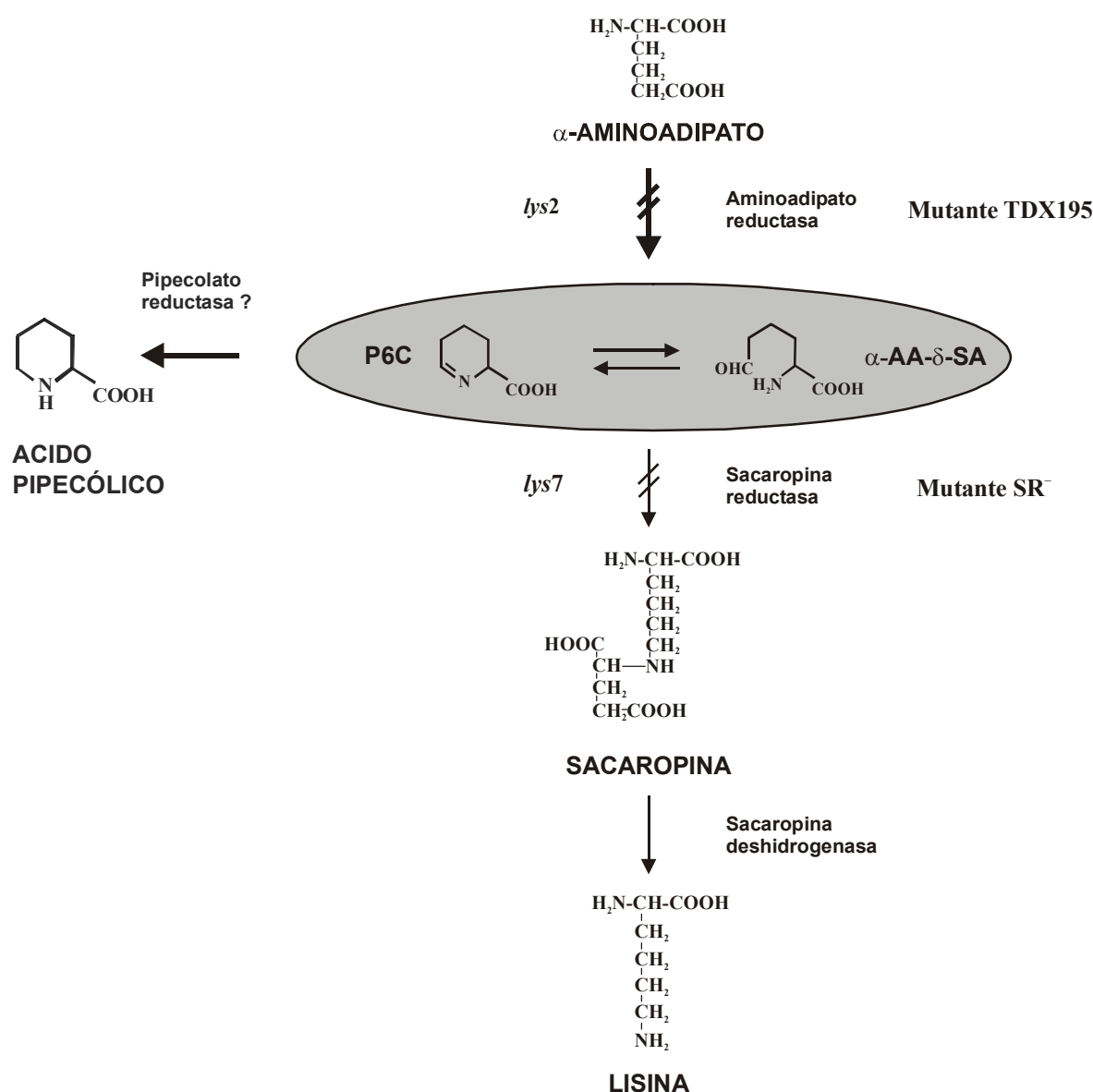


Fig. 31. Ruta de biosíntesis de ácido pipecólico en *P. chrysogenum*. Las reacciones enzimáticas bloqueadas en los mutantes auxótrofos de lisina *P. chrysogenum* SR⁻ y TDX195 se indican con el símbolo //. *lys2*: gen que codifica la α -aminoadipato reductasa; *lys7*: gen que codifica la sacaropina reductasa. Mutante TDX195: *P. chrysogenum* TDX195; Mutante SR⁻: *P. chrysogenum* SR⁻.

En conclusión, y a modo de resumen sobre la caracterización del metabolismo del ácido pipecólico en *P. chrysogenum*, la Figura 32 muestra un circuito que hipotéticamente podría llevarse a cabo entre el metabolismo del ácido pipecólico y el metabolismo de la lisina en este hongo filamentos. Dicho circuito metabólico integra: (i) la ruta biosintética de ácido pipecólico; (ii) la ruta de conversión de ácido pipecólico en lisina vía sacaropina y; (iii) la ruta adaptativa de conversión de ácido pipecólico que se induce cuando se inactiva el gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa.

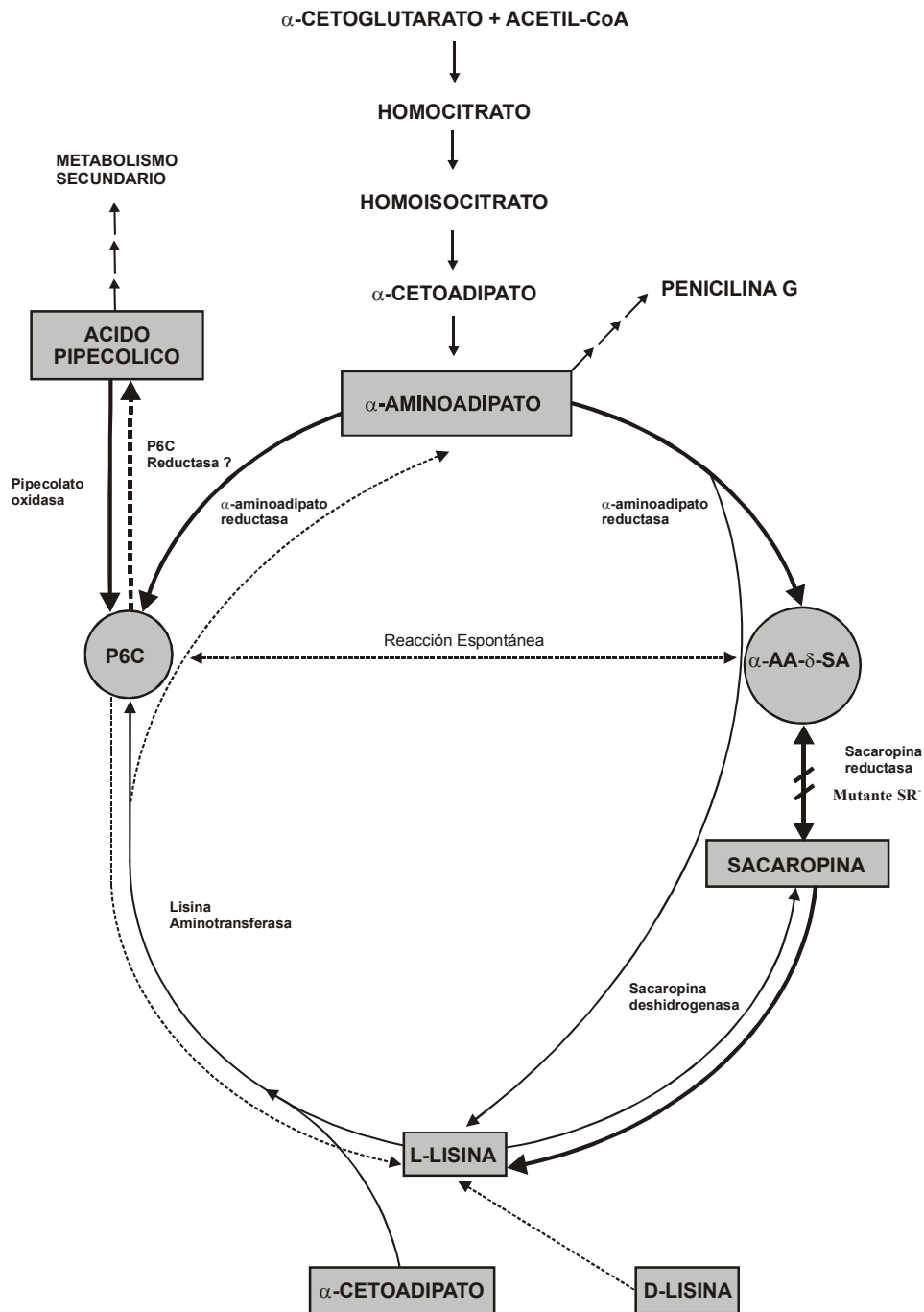


Fig. 32. Ruta de biosíntesis de ácido pipecólico en *P. chrysogenum*. También se muestran las dos rutas de conversión de ácido pipecólico en lisina: vía sacaropina y ruta adaptativa. La reacción enzimática bloqueada en el mutante auxótrofo de lisina *P. chrysogenum* SR⁻ está indicada con el símbolo //. α -AA- δ -SA: α -aminoadipato- δ -semialdehído; P6C: ácido piperideín-6-carboxílico.

7. PAPEL BIOLÓGICO DEL ÁCIDO PIPECÓLICO EN *P. chrysogenum*

El significado biológico de la biosíntesis de ácido pipecólico en *P. chrysogenum* todavía se desconoce. Sin embargo, la adición de ácido pipecólico a los medios de cultivo (sólidos o líquidos) tanto de la cepa silvestre *P. chrysogenum* NRRL1951, la cepa parental *P. chrysogenum* Wis-54-1255 como de los mutantes *P. chrysogenum* 7.2 y *P. chrysogenum* SR⁻ produce al cabo de varios días de incubación un pigmento amarillo de estructura desconocida (Fig.33). Esto sugiere que, en *P. chrysogenum*, podría existir una ruta silenciosa para formar metabolitos secundarios que se activa por la acumulación de P6C o ácido pipecólico.

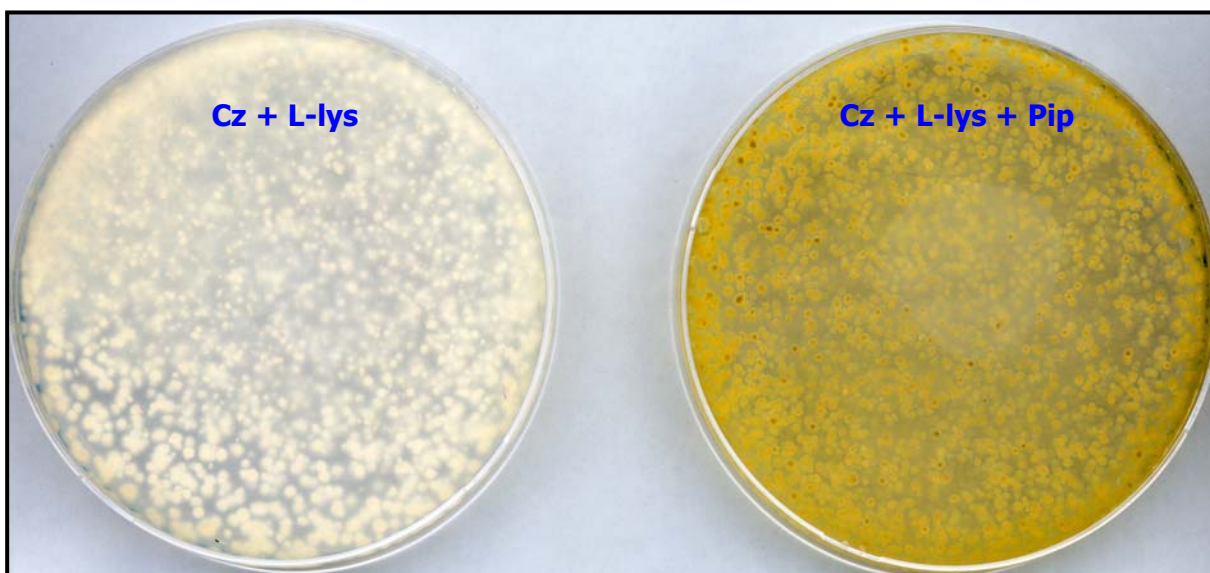


Fig. 33. Pigmento amarillo secretado a los medios de cultivo cuando el mutante auxótrofo de lisina *P. chrysogenum* 7.2 (interrumpido en el gen *lys1* que codifica la homocitrato sintasa y deficiente en la actividad pipecolato oxidasa) crece en medio mínimo Czapek suplementado con lisina (1,75 mM) y ácido D,L-pipecólico (0,1 M). En las placas se observa que cuando no se añade ácido pipecólico no se produce el pigmento amarillo. Cz: medio mínimo Czapek; L-lys: L-lisina; Pip: ácido pipecólico.

El ácido pipecólico y sus derivados tienen un gran potencial en la industria farmacológica y agroalimentaria. En humanos, el ácido pipecólico tiene una función metabólica importante ya que está relacionada con diversas enfermedades neurodegenerativas. La acumulación excesiva de este iminoácido en la sangre, debido a la actividad deficiente de la pipecolato oxidasa, se denomina hiperpipecolatemia y se encuentra asociada con pacientes que sufren un desorden generalizado en la biogénesis de los peroxisomas (*peroxisome biogenesis disorder* o PBD), tales como: el síndrome cerebro-hepato-renal de Zellweger, la adrenoleucodistrofia neonatal, la hiperpipecólico acidemia

(Wanders *et al.*, 1989a, 1988; Mihalik y Rhead, 1989; Mihalik *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1993). Además, se ha descubierto que pacientes que sufren encefalopatía hepática también presentan niveles altos de ácido pipecólico en el plasma sanguíneo (Fujita *et al.*, 1999).

En los hongos filamentosos *R. leguminicola* y *M. anisopliae* se ha descrito que el ácido pipecólico es un precursor inmediato en la síntesis de alcaloides octahidroindolizínicos (Sim y Perry, 1997; Wickwire *et al.*, 1990a; b), los cuales, tienen aplicaciones interesantes en el campo de la salud humana; entre dichos alcaloides se encuentra la swainsonina, que tiene una importante actividad antitumoral (Dennis, 1986; Dennis *et al.*, 1990; Humphries *et al.*, 1986).

Algunas plantas en las que se ha identificado la presencia de ácido pipecólico y/o sus derivados exhiben propiedades medicinales interesantes. *Momordica charantia* (bitter melon) es una planta que acumula ácido pipecólico y se caracteriza por tener, entre otras, propiedades antibióticas, antimutagénicas, antioxidantes, antivirales, antitumorales, astringentes, depurativas, afrodisíacas, inmunomodulares, citotóxicas, inmunosupresoras, así como, actividad leishmanicida e insecticida, (Salawu *et al.*, 1999; Romeo, 1984; Jaramillo, 2000). De igual manera, se ha descubierto que el ácido pipecólico y sus derivados actúan como factores tóxicos y antinutritivos en las leguminosas *Albizia lebbek* y *Calliandra calothyrsus* (Marlier *et al.*, 1979; Romeo, 1984), y se ha descrito que *C. calothyrsus* posee propiedades insecticidas y fitotóxicas (Romeo, 1984, 1998).

Por otro lado, se ha descrito que el ácido pipecólico es un soluto asociado con la adaptación osmótica en algunas especies vegetales y bacterianas, donde se ha demostrado que es un compuesto efectivo capaz de optimizar el crecimiento bajo condiciones inhibitorias de osmolaridad (Steward y Larher, 1980; Gouesbet *et al.*, 1994; Gouffi *et al.*, 2000).

Actualmente, en la industria química fina (*Fine Chemicals Industry*), existen algunas compañías vanguardistas (Mercian's, DSM, Lonza, ISP y Johnson Matthey) que se dedican, entre otras cosas, a producir ácido pipecólico mediante el desarrollo de nuevas tecnologías enantioselectivas, biocatálisis y otros métodos químicos que permiten sintetizar compuestos orgánicos. La manufactura de estas sustancias químicas puras es cada vez mayor en el área de la biofarmacéutica y de la agricultura, con concomitantes beneficios económicos para dichas empresas. Como se ha demostrado en la presente memoria, se ha caracterizado la ruta biosintética de ácido pipecólico en *P. chrysogenum*. Al mismo tiempo, se ha obtenido la cepa *P. chrysogenum* SR⁻, interrumpida en el gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa, que es superproductora de ácido pipecólico, característica que le proporciona una gran importancia a nivel industrial para ser utilizada como biofactoria para producir ácido pipecólico a gran escala.

Con respecto al ácido piperideín-6-carboxílico (P6C), actualmente se está desarrollando el denominado "*P6C World*" usando biotransformación, como han descrito Asano y Ito (2002). Aunque la enzima implicada en la reducción de P6C en ácido pipecólico no se ha podido caracterizar, ya que su sustrato, el P6C, es un compuesto químicamente inestable (Fujii *et al.*, 2002a), la compañía

farmacológica Mercian's en este momento esta explorando el "P6C World" y obteniendo una colección de productos químicos útiles para la farmacología derivados del P6C usando biotransformación, entre dichos productos se encuentran algunos como: el ácido α -aminoadípico y el ácido pipercolico (Fujii *et al.*, 2002a; Asano y Ito, 2002). Como se ha demostrado en la presente memoria, *P. chrysogenum* SR⁻, no solamente es una cepa superproductora de ácido pipercolico sino que también acumula niveles altos de P6C. Por lo tanto, este mutante también podría ser aprovechado a nivel industrial para obtener una amplia colección de productos químicos derivados del P6C.

Además, el ácido pipercolico también tiene una gran importancia en la industria farmacológica, ya que sirve de sustrato de algunos péptidos sintetasas no-ribosomales (NRPS) y poliquétidos sintetasas (PKS) para obtener compuestos con actividad farmacológica (Schwecke *et al.*, 1995; Molnar *et al.*, 1996; Motamedi y Shafiee, 1998; Reynolds y Demain, 1997; Nielsen *et al.*, 1991). La obtención de una cepa recombinante de *P. chrysogenum* que funcione como una factoría celular para producir metabolitos secundarios que contengan ácido pipercolico tendría una substancial aplicación en la industria farmacológica.

Por un lado, se conoce que la ruta biosintética de penicilina en *P. chrysogenum* comienza con la condensación no ribosómica de tres aminoácidos; L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina para sintetizar el tripéptido δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV). La enzima que cataliza esta reacción es la ACV sintetasa y está codificada por el gen *pcbAB* (Diez *et al.*, 1990, Smith *et al.*, 1990; Mac Cabe *et al.*, 1991; Gutiérrez *et al.*, 1991b; Coque *et al.*, 1991).

Por otro lado, se conoce que *P. chrysogenum* posee una ruta de lisina altamente activa mediante la cual suministra ácido α -aminoadípico para la biosíntesis del tripéptido no ribosomal ACV (Casqueiro *et al.*, 1999b; Martín, 2000; Bañuelos *et al.*, 2002; 2001).

El potencial de la maquinaria biosintética de *P. chrysogenum* para producir antibióticos podría verse valiosamente incrementado al modificarse los dominios del tripéptido no ribosomal ACV de una manera racional. Esto permitiría: (i) "re-diseñar" los productos naturales existentes ampliando la complejidad química que nos ofrece la naturaleza; (ii) desarrollar biofactorías que permitan obtener una diversidad estructural enormemente extendida de productos naturales y; (iii) enriquecer las alternativas terapéuticas actuales en la lucha contra las enfermedades.

Por otra parte, el aporte científico que brinda el presente trabajo de investigación sobre la caracterización del metabolismo del ácido pipercolico en *P. chrysogenum*, así como la obtención de una cepa superproductora de P6C y ácido pipercolico, podrían ser los primeros pasos para intentar utilizar este hongo filamentoso a nivel industrial como una biofactoría para obtener una diversidad estructuralmente extendida de productos naturales que contengan ácido pipercolico.

CONCLUSIONES

1. Se ha clonado un fragmento de ADN de 6 kb por complementación homóloga, en el que se encuentra el marco de lectura abierta (ORF1) del gen *lys7* de *P. chrysogenum*. Este ORF1 tiene un tamaño de 1953 pb y está constituido por 11 exones y 10 intrones.
2. El gen *lys7* codifica una proteína de 449 aminoácidos con un peso molecular deducido de 48,8 kDa. Esta proteína presenta una elevada similitud con sacaropinas reductasas de otros microorganismos fúngicos tales como: *Neurospora crassa*, *Magnaphorte grisea*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*.
3. La caracterización bioquímica y molecular de los mutantes *lys⁻/pip⁻* *P. chrysogenum* 10.25 y *P. chrysogenum* 7.2, ha permitido determinar que en este hongo filamentoso el ácido pipercolico se convierte en lisina a través de su conversión en ácido piperideín-6-carboxílico (P6C) por acción de la pipercolato oxidasa; el P6C se convierte en sacaropina y finalmente en lisina a través de dos reacciones enzimáticas consecutivas catalizadas por la sacaropina reductasa y la sacaropina deshidrogenasa respectivamente.
4. El gen *lys7* es el único gen que codifica la sacaropina reductasa en *P. chrysogenum*. La interrupción de dicho gen mediante la técnica de la doble recombinación provoca la auxotrofia de lisina en *P. chrysogenum*.
5. La interrupción del gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa en *P. chrysogenum* activa una ruta adaptativa de conversión, con baja eficiencia, de ácido pipercolico en lisina siendo, el primer paso de dicha ruta, catalizado por la pipercolato oxidasa.
6. La interrupción del gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa en *P. chrysogenum* provoca la acumulación de P6C y ácido pipercolico. Así mismo, la adición de ácido α -aminoadípico a los caldos de cultivo incrementa significativamente la acumulación intracelular de estos precursores de metabolitos secundarios
7. En este trabajo se ha demostrado por primera vez que *P. chrysogenum* es capaz de sintetizar ácido pipercolico. Dicha síntesis se lleva a cabo a partir del ácido α -aminoadípico, un intermediario de la ruta de biosíntesis de lisina que es también un precursor esencial de la biosíntesis de penicilina.
8. La cepa *P. chrysogenum* SR⁻, interrumpida en el gen *lys7* que codifica la sacaropina reductasa, al ser superproductora de ácido pipercolico y P6C, podría servir como hospedador para obtener metabolitos secundarios con nuevas e interesantes actividades farmacológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Affenzeller, K.; Jaklitsch, W.M.; Hönlinger, C. y Kubicek, C.P. (1989). Lysine biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is regulated by feedback inhibition of α -amino adipate reductase. *FEMS Microbiol. Lett.* 58: 293-298.
- Aharonowitz, Y. y Demain, A.L. (1978). Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents. Ch.* 14:159-164.
- Alexopoulos, C.J. y Mims, C.W. (1985). *Introducción a la micología*. Ediciones Omega, S. A.; Barcelona.
- Álvarez, E.; Cantoral, J.M.; Barredo, J.L.; Díez, B. y Martín, J.F. (1987). Purification to homogeneity and characterization of acyl coenzyme A:6-aminopenicilanic acid acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. *Antimicrob. Agents. Ch.* 31:1675-1682.
- Anné, J. (1977). Somatic hybridization between *Penicillium chrysogenum* species after induced fusion of their protoplasts. *Agricultura.* 25:1-117.
- Asano, Y., y Ito, T. (2002). Selected abstract from the 5th Japanese Symposium on the Chemistry of Biocatálisis. ELSEVIER, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 18: 173-197.
- Aspen A.J., y Meister A. (1962). Conversion of α -amino adipic acid to L-pipecolic acid by *Aspergillus nidulans*. *Biochemistry* 1: 606-611.
- Baginsky, M.L., y Rodwell, V.W. (1967). Metabolism of pipecolic acid in a *Pseudomonas* species. V. Pipecolate oxidase and dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 94(4): 1034-1039.
- Ball, C. (1983). Genetics of β -lactam producing fungi. En: *Antibiotics containing the β -lactam structure*. Eds. Demain, A.L. y Solomon, N. Springer-Verlag. New York. pp. 147-162.
- Bañuelos O. (1999). Biosíntesis de lisina en *Penicillium chrysogenum*: Caracterización Genética y Molecular de la Enzima Homocitrato Sintasa. Tesis doctoral. Universidad de León.
- Bañuelos, O., Casqueiro, J., Gutiérrez, S., Martín, J.F. (2000). Overexpression of the *lys1* gene in *Penicillium chrysogenum*: homocitrate synthase levels, α -amino adipic acid pool and penicillin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 69-77.
- Bañuelos, O., Casqueiro, J., Steidl, S., Gutiérrez, S., Brakage, A.A., y Martín, J.F. (2002). Subcellular localization of the homocitrate synthase in *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Gen. Genet.* 266: 711-719.
- Bañuelos, O., Naranjo, L., Casqueiro, J., Gutiérrez, S., Martín, J.F. (2003). Co-transformation with Autonomous Replicating and Integrative Plasmids in *Penicillium chrysogenum* is Highly Efficient and Leads in Some Cases to Rescue of the Intact Integrative Plasmid. Aceptado para publicación *Fungal, Genetics and Biology*. (Abril de 2003).
- Bañuelos, O.; Casqueiro, J.; Fierro, F.; Hijarrubia, M.J.; Gutiérrez, S. y Martín, J.F. (1999a). Characterization and lysine control expression of the *lys1* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding homocitrate synthase. *Gene* 226: 51-59.
- Bañuelos, O.; Casqueiro, J.; Gutiérrez, S.; Riaño, J. y Martín, J.F. (1999b). The specific transport system for lysine is fully inhibited by ammonium in *Penicillium chrysogenum*: a ammonium-insensitive system allows uptake in carbon-starved cells. *Antonie van Leeuwenhoek.* 77: 91-100.
- Barnes, D.A. y Thorner, J. (1986). Genetic manipulation of *Saccharomyces cerevisiae* by the use of the *LYS2* gene. *Mol. Cell. Biol.* 6:2828-2838.
- Barredo, J.L.; Cantoral, J.M.; Alvarez, E.; Díez, B. y Martín, J.F. (1989). Cloning, sequence analysis and transcriptional study of the isopenicillin N synthase of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78. *Mol. Gen. Genet.* 216: 91-98.
- Bayles, D.O., y Wilkinson B.J. (2000). Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 30(1): 23-7
- Becker, B.; Feller, A.; El-Alami, M.; Dubois, E. y Piérard, A. (1998). Nonameric core sequence is required upstream of the *LYS* genes of *Saccharomyces cerevisiae* for Lys14p-mediated activation and apparent repression by lysine. *Mol. Microbiol.* 29:151-163.

- Beinert, H. y Kennedy, M.C. (1993).** Aconitase, two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *FASEB J.* 7:1442-1449.
- Bhattacharjee, J.K. (1985).** α -amino adipate pathway for the biosynthesis of lysine in lower eukaryotes. En: *Critical Reviews in Microbiology*. CRC Press. Boca Raton, FL, vol. 12, pp 131-151.
- Bhattacharjee, J.K. y Tucci, A.F. (1969).** Relationship of glutaric acid to the homocitric acid pathway of biosynthesis of lysine in yeast. *J. Biol. Chem.* 244:1417-1423.
- Bhattacharjee, V. y Bhattacharjee, J.K. (1998).** Nucleotide sequence of the *Schizosaccharomyces pombe* *lys1⁺* gene and similarities of the *lys1⁺* protein to peptide antibiotic synthetases. *Yeast* 14:479-484.
- Bleykasten-Grosshans, C., Prior, C., y Potier, S. (2001).** Cloning and sequence of the *LYS2* homologue gene from the osmotolerant yeast *Pichia sorbitophila*. *Yeast*. 15;18(1): 61-7.
- Borell, C.W. y Bhattacharjee, J.K. (1988).** Cloning and biochemical characterization of *LYS5* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 13:299-304.
- Borell, C.W.; Urrestarazu, L.A. y Bhattacharjee, J.K. (1984).** Two unlinked lysine genes (*LYS9* y *LYS14*) are required for the synthesis of saccharopine reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159:429-432.
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brakhage, A.A. y Turner, G. (1992).** L-lysine repression of penicillin biosynthesis and the expression of penicillin biosynthesis genes *acvA* and *ipnA* in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 98:123-128.
- Brakhage, A.A.; Browne, P.; Turner, G. (1992).** Regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis and penicillin biosynthesis genes *acvA* and *ipnA* by glucose. *J. Bacteriol.* 174:3789-3799.
- Broquist, H.P. (1971).** Lysine biosynthesis. *Methods Enzymol.* 17:112-129.
- Bryan, J.K. (1980).** Synthesis of aspartate family and branched-chain amino acids. En: *The biochemistry of plants*. Ed. Mifflin, B. J. Academic Press. New York, vol. 5. pp. 402-440.
- Cane, D.E., y Walsh, C.T. (1999).** The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6, R319-R325.
- Cantoral, J.M.; Díez, B.; Barredo, J.L.; Alvarez, E. y Martín, J.F. (1987).** High-frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Bio/Technology* 5: 494-497.
- Cantoral, J.M.; Gutiérrez, S.; Fierro, F.; Gil-Espinoso, S.; van Liempt, H. y Martín, J.F. (1993).** Biochemical characterization and molecular genetics of nine mutants of *Penicillium chrysogenum* impaired in penicillin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 268: 737-744.
- Carr, L.G.; Skatrud, P.L.; Scheetz III, M.E.; Qeener, S.W. y Ingolia, T.D. (1986).** Cloning and expression of the isopenicillin N synthetase gene from *Penicillium chrysogenum*. *Gene* 48:257-266.
- Casqueiro, J. (1997).** Caracterización de la ruta biosintética de lisina en *Penicillium chrysogenum*: clonación, secuenciación, análisis y disrupción génica del locus *lys2*. Tesis doctoral. Universidad de León.
- Casqueiro, J., Bañuelos, O., Gutiérrez, S., Fierro, F., y Martín, J.F. (2002).** Site directed integration in β -lactam producing fungi: Molecular mechanisms, genetic instability and industrial application. *Recent Res.Devel.Genet.* 2(2002): 31-41 ISBN: 81-7736-150-3.
- Casqueiro, J., Bañuelos, O., Gutiérrez, S., Martín, J.F. (2001).** Metabolic engineering of the lysine pathway for β -lactam overproduction in *Penicillium chrysogenum*. In: *Focus on Biotechnology*, vol. 1. Van Broedkhoven, A., Anné J. and Shapiro, F (eds.). Kluwer Academic Publishers, NL.
- Casqueiro, J.; Bañuelos, O.; Gutiérrez, S.; Hijarrubia, M. J. y Martín, J.F. (1999b).** Intrachromosomal recombination in *Penicillium chrysogenum*: Gene conversion and deletion events. *Mol. Gen. Genet.* 261:994-1000.
- Casqueiro, J.; Gutiérrez, S.; Bañuelos, O.; Fierro, F.; Velasco, J. y Martín, J.F. (1998).** Characterization of the *lys2* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding α -amino adipic acid reductase. *Mol. Gen. Genet.* 259: 549-556.

- Casqueiro, J.; Gutiérrez, S.; Bañuelos, O.; Hijarrubia, M.J. y Martín, J.F. (1999a). Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction. *J. Bacteriol.* 181:1181-1188.
- Caten, C.E. (1981). Parasexual processes in fungi. En: *The fungal nucleus*. Eds. Gull, K. y Oliver, S. G. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 191-214.
- Chang Y.F., Adams E. (1971). Induction of separate catabolic pathways for L- and D-lysine in *Pseudomonas putida*. *Biochim. Biophys. Acta* 45: 570-576.
- Chang Y.F., Ghosh P., Rao V.V. (1990). L-pipecolic acid metabolism in human liver: L- α -amino adipate- δ -semialdehyde oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta.* 8; 1038(3): 300-305.
- Chattoo, B.B.; Sherman, F.; Azubalis, D.A.; Fjellstedt, T.A.; Mehnert, D., y Ogur, M. (1979). Selection of *lys2* mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by the utilization of α -amino adipate. *Genetics* 93:51-65.
- Cheng, Y.R., Fang, A., y Demain, A.L. (1995). Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43(6): 1096-8.
- Chung, C.T.; Niemela, S.L. y Miller, R.H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Nat. Sci. USA* 86:2172-2175.
- Cohen, N.H. y Saint-Girons, I. (1987). Biosynthesis of threonine, lysine and methionine. En: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology*. Ed. Neihardt, F. C. ASM. Washington. pp. 429-444.
- Collins, C.M. y Hall, R.M. (1985). Identification of a Tn5 determinant conferring resistance to phleomycens, bleomycins and tallysomycins. *Plasmid* 14:143-151.
- Coque, J.J.R.; Martín, J.F.; Calzada, J.G. y Liras, P. (1991). The cephamycin biosynthetic genes *pcbAB*, encoding a large multidomain peptide synthetase, and *pcbC* of *Nocardia lactamdurans* are clustered together in an organization different from the same genes in *Acremonium chrysogenum* and *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Microbiol.* 5:1125-1133.
- Croteau, R., Kutchan, T. y Lewis, N. (2003). Natural Products (Secondary Metabolites). American Society of Plant Biologist, Chapter 24. En Internet. (<http://www.aspb.org/publications/biotext/intros/ch24.cfm>).
- Demain, A.L. (1957). Inhibition of penicillin formation by lysine. *Arch. Biochem. Biophys.* 67:244-245.
- Demain, A.L. y Masurekar, P.S. (1974). Lysine inhibition of *in vivo* homocitrate synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.* 82: 143-151.
- Dennis, J.W. (1986). Effects of swainsonine and polyinosinic: polycytidylic acid on murine tumor cell growth and metastasis. *Cancer Res.* 46(10): 5131-6.
- Dennis, J.W., Koch, K., Yousefi, S., y VanderElst, I. (1990). Growth inhibition of human melanoma tumor xenografts in athymic nude mice by swainsonine. *Cancer Res.* 50(6): 1867-72.
- Díez, B.; Alvarez, E.; Cantoral, J.M.; Barredo, J.L. y Martín, J.F. (1987). Isolation and characterization of *pyrG* mutants of *Penicillium chrysogenum* by resistance to 5'-fluoroorotic acid. *Curr. Genet.* 12: 277-282.
- Díez, B.; Gutiérrez, S.; Barredo, J.L.; van Solingen, P.; van deer Voort, L.H.M. y Martín, J.F. (1990). The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the α -amino adipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. *J. Biol. Chem.* 265: 16358-16365.
- Dodt, G., Kim, D.G., Reimann, S.A., Reuber, B., MacCabe, K., Gould, S., Mihalik, S. (2000). L-pipecolic acid oxidase, a human enzyme essential for the degradation of L-pipecolic acid, is most similar to the monomeric sarcosine oxidases. *Biochem. J.* 345: 487-494.
- Doekel, S., y Marahiel, M.A. (2001). Biosíntesis of natural products on modular peptide synthetases. Review. *Metabolic Engineering.* 3, 64-77.
- Donahue, T.F.; Daves, R.S.; Lucchini, G. y Fink, G.R. (1983). A short nucleotide sequence required for regulation of *HIS4* by the general control system of yeast. *Cell* 32:89-98.
- Drocourt, D.; Camels, T.; Reynes, J. P.; Baron, M. y Tiraby, G. (1990). Cassettes of the *Streptoalloteicus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 18:4009.

- Ehmann, D.E.; Gehring, A.M. y Walsh, C.T. (1999).** Lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of alpha-amino adipate reductase (*LYS2*) involves posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5. *Biochemistry* 38:6171-6177.
- Eibel, H. y Philippsen, P. (1983).** Identification of the cloned *Saccharomyces cerevisiae* *LYS2* gene by and integrative transformation approach. *Mol. Gen. Genet.* 191:66-73.
- Epelbaum, S., McDevitt, R., and Falcon, S.C. (1997).** Lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: Nucleotide sequence and characterization. *Plant Mol. Biol.* 35, 735-748.
- Esmahan, C. (1994).** Formación del ácido 2-aminoadípico, un precursor de la penicilina en *Penicillium chrysogenum*, por la vía biosintética o por el catabolismo de lisina. Tesis doctoral. Universidad de León.
- Esmahan, C.; Alvarez, E.; Montenegro, E. y Martín, J.F. (1994).** Catabolism of lysine in *Penicillium chrysogenum* leads to formation of 2-amino adipic acid, a precursor of penicillin biosynthesis. *Appl. Environ. Microb.* 60: 1705-1710.
- Espeso, E.A. y Peñalva, M.A. (1992).** Carbon catabolite repression can account for the temporal pattern of expression of a penicillin biosynthetic gene in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 6:1457-1465.
- Evans, D.J.; Jones, R.; Woodley, P.R.; Wilborn, J.R. y Robson, R.L. (1991).** Nucleotide sequence and genetic analysis of the *Azotobacter chroococcum* *nifUSVWZM* gene cluster, including a new gene (*nifP*) which encodes a serine acetyltransferase. *J. Bacteriol.* 173: 5457-5469.
- Fangmeier, N., Leistner, E. (1980).** A ¹⁵N NMR study on D-lysine metabolism in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 255: 10205-10209.
- Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983).** A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
- Feller, A.; Dubois, E.; Ramos, F. y Piérard, A. (1994).** Repression of the genes for the lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is caused by limitation of Lys14-dependent transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 14:6411-6418.
- Feller, A.; Ramos, F.; Piérard, A. y Dubois, E. (1999).** In *Saccharomyces cerevisiae*, feedback inhibition of homocitrate synthase isoenzymes by lysine modulates the activation of *LYS* gene expression by Lys14p. *Eur. J. Biochem.* 261:163-170.
- Feller, A.; Ramos, F.; Piérard, A. y Dubois, E. (1997).** Lys80p of *Saccharomyces cerevisiae*, previously proposed as a specific repressor of *LYS* genes, is a pleiotropic regulatory factor identical to Mks1p. *Yeast* 13:1337-1346.
- Feng, B.; Friedlin, E. y Marzluf, G.A. (1994).** A reporter gene analysis of penicillin biosynthesis gene expression in *Penicillium chrysogenum* and its regulation by nitrogen and glucose catabolite repression. *Appl. Environ. Microb.* 60:4432-4439.
- Fierro, F.; Barredo, J.L.; Díez, B.; Gutiérrez, S.; Fernández, F.J. y Martín, J.F. (1995).** The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6200-6204.
- Fierro, F.; Gutiérrez, S.; Díez, B. y Martín, J.F. (1993).** Resolution of four chromosomes in penicillin-producing filamentous fungi: the penicillin gene cluster is located on chromosome II (9.6 Mb) in *Penicillium notatum* and chromosome I (10.4 Mb) in *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Gen. Genet.* 241: 573-578.
- Fierro, F.; Kosalková, K.; Gutiérrez, S. y Martín, J.F. (1996).** Autonomously replicating plasmids carrying the *AMA1* region in *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* 29: 482-489.
- Fleming, A. (1929).** On the bacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 10:226-236.
- Flint, H.J. y Kemp, B.F. (1981).** General control of arginine biosynthetic enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 124:129-140.
- Ford, R.A. y Bhattacharjee, J.K. (1995).** Molecular properties of the *lysI*⁺ gene and the regulation of α -amino adipate reductase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* 28:131-137.

- Fothergill J.C., y Guest J.R. (1977). Catabolism of L-lysine by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 99: 139-155.
- Friedrich, C.G. y Demain, A.L. (1977). Homocitrate as a crucial site of the lysine effect on the penicillin biosynthesis. *J. Antibiot.* 9:760-761.
- Fu, Y.H., y Marzluf, G.A. (1987). Characterization of *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 7:1691-1696.
- Fujii, T., Aritoku, Y., Agematu, H., y Tsunekawa, H. (2002b). Increase in the rate of L-pipecolic acid production using *lat*-expressing *Escherichia coli* by *lysP* and *yeiE* amplification. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(9):1981-1984.
- Fujii, T., Mukaiharu, M., Agematu, H., y Tsunekawa, H. (2002a). Biotransformation of L-lysine to L-pipecolic acid catalyzed by L-lysine 6-aminotransferase and pyrroline-5-carboxylate reductase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:622-627.
- Fujii, T., Narita, T., Agematu, H., Agata, N., y Isshiki, K. (2000). Cloning and characterization of *pcd* encoding delta`-piperidine-6-carboxylate dehydrogenase from *Flavobacterium lutescens* IFO3084. *J Biochem (Tokyo)*. 128(6): 975-82.
- Fujioka, S., Sakuri, A., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N., Kaihara, S., y Takimoto, A. (1987). Isolation and identification of L-pipecolic acid and nicotinamide as flower-inducing substances in *Lemna*. *Plant Cell Physiol.* 28: 995-1003.
- Fujita, T., Hada, T., y Higashino, K. (1999). Origin of D- and L-pipecolic acid in human physiological fluids: a study of the catabolic mechanism to pipecolic acid using the lysine loading test. *Clin. Chim. Acta.* 287: 145-156.
- Gaillardin, C.M. y Heslot, H. (1979). Evidence for mutations in the structural gene for homocitrate synthase in *Saccharomyces lipolytica*. *Mol. Gen. Genet.* 172:185-192.
- Gaillardin, C.M.; Poirier, L. y Heslot, H. (1976). A kinetic study of homocitrate synthase activity in the yeast *Saccharomyces lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta* 422:390-406.
- Gaillardin, C.M.; Sylvestre, G. y Heslot, H. (1975). Studies on an unstable phenotype induced by UV irradiation: the lysine excreting [lex(-)] phenotype of the yeast *Saccharomyces lipolytica*. *Arch. Microbiol.* 104:89-94.
- Galili, G. (1985). Regulation of lysine and threonine synthesis. *Plant Cell.* 7: 899-906.
- Gamonet, F. y Lauquin, J.M. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* *LYS7* gene is involved in oxidative stress protection. *Eur. J. Biochem.* 251:716-723.
- Garrad, R.; Schmidt, T.M. y Bhattacharjee, J.K. (1994). Molecular and functional analysis of the *LYS1* gene of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 62:5027-5031.
- Garrad, R.C. y Bhattacharjee, J.K. (1992). Lysine biosynthesis in selected pathogenic fungi: characterization of lysine auxotrophs and the cloned *LYS1* gene of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 174:7379-7384.
- Gasent-Ramirez, J.M. y Benitez, T. (1997). Lysine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast isolated in continuous culture. *Appl. Environ. Microb.* 63:4800-4806.
- Genilloud, O.; Garrido, M.C. y Moreno, F. (1984). The transposon Tn5 carries a bleomycin-resistance determinant. *Gene* 32:225-233.
- Glass, J. y Bhattacharjee, J.K. (1971). Biosynthesis of lysine in *Rhodotorula*: accumulation of homocitric, homoaconitic and homosicitric acids in a leaky mutant. *Genetics* 67:356.
- Goncalves-Butruille, M., Szajner, P., Torigoi, E., Leite, A., Arruda, P. (1996). Purification and characterization of the bifunctional lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from maize. *Plant Physiol.* 110: 765-771.
- Goss, P.E., Baker, M.A., Carver, J.P. y Dennis, J.W. (1995). Inhibitors of carbohydrate processing: a new class of anticancer agents. *Clin Cancer Res.* 1(19): 935-44.
- Gouesbet, G. Jebbar, M., Talibart, R., Bernard, T., y Blanco C. (1994). Pipecolic acid is an osmoprotectant for *Escherichia coli* taken up by the general osmoporters ProU and ProP. *Microbiology.* 140(Pt9): 2415-22.

- Gouffi, K., Bernard T., y Blanco C. (2000).** Osmoprotection by pipecolic acid in *Sinorhizobium meliloti*: specific effects of D and L isomers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(6): 2358-64.
- Guengerich, F.P., y Broquist, H.P. (1973).** Biosynthesis of slaframine (1S,6S,8aS)-1-acetoxy-6-aminooctahydroindolizine, a parasymphathomimetic alkaloid of fungal origin. II. The origin of pipecolic acid. *Biochemistry.* 12, 4270-4274.
- Guex, N., y Peitsch, M.C. (1997).** SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18:2714-2723.
- Gutiérrez, S.; Díez, B.; Montenegro, E. y Martín, J.F. (1991).** Characterization of the *Cephalosporium acremonium* *pcbAB* gene encoding α -amino adipyl-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. y Martín, J.F. (1999a).** Gene organization and plasticity of the β -lactam genes in different filamentous fungi. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 75:81-94.
- Gutiérrez, S.; Marcos, A.T.; Casqueiro, J.; Kosalková, K.; Fernández, F.J.; Velasco, J. y Martín, J.F. (1999b).** Transcription of the *pcbAB*, *pcbC* and *penDE* genes of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78 is repressed by glucose and the repression is not reversed by alkaline pHs. *Microbiology* 145:317-324.
- Haas, H., y Marzluf, G.A. (1995).** NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum* binds specifically to elements in the intergenic promoter regions of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters. *Curr. Genet.* 28:177-183.
- Haas, H.; Angermayr, K.; Zadra, I., y Stöffler, G. (1997).** Overexpression of *nreB*, a new GATA factor-encoding gene of *Penicillium chrysogenum*, leads to repression of the nitrate assimilatory gene cluster. *J. Biol. Chem.* 272:22576-22582.
- Haas, H.; Bauer, B.; Redl, B.; Stöffler, G. y Marzluf, G.A. (1995).** Molecular cloning and analysis of *nre*, the major nitrogen regulatory gene of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* 27:150-158.
- Haidaris, C. G. y Bhattacharjee, J.K. (1978).** High lysine excreting mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Fer. Technol.* 56:189.
- Hammer, T., y Bode, R. (1992).** Purification and characterization of an inducible L-lysine: 2-oxoglutarate 6-aminotransferase from *Candida utilis*. *J. Basic. Microbiol.* 32(1):21-7.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Hanahan, D. (1985).** Techniques for transformation of *E. coli*. En: *DNA cloning: a practical approach*. Ed. Glover, D. M. IRL Press. Oxford. pp. 109-135.
- Hartline y Rodwell (1971).** Metabolism of pipecolic acid in a *Pseudomonas* species. VI. Precursors of glutamate. *Arch. Biochem. Biophys.* 142,(1): 32-39.
- Henikoff, S. (1984).** Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28: 351-359.
- Hetzberg, R.P.; Caranfa, M.J. y Hecht, S.M. (1985).** DNA methylation diminishes bleomycins-mediated strand scission. *Biochemistry.* 24:5285-5289.
- Higgins, D.G. y Sharp, P.M. (1989).** Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Cabios* 5:151-153.
- Higuchi, K., Suzuki, T., y Ashihara, H. (1995).** Pipecolic acid from the developing fruits (pericarp and seeds) of *Coffea arabica* and *Camellia sinensis*. 16th Colloquium. *Association Scientifique Internationale du café*. ASIC Conference. Kyoto.
- Hijarrubia M.J., Aparicio J.F., Casqueiro J., y Martín J.F. (2001).** Characterization of the *lys2* gene of *Acremonium chrysogenum* encoding a functional alpha-amino adipate activating and reducing enzyme. *Mol. Gen. Genet.* 264(6): 755-62.
- Hijarrubia M.J., Aparicio J.F., y Martín J.F. (2002).** Nitrate regulation of alpha-amino adipate reductase formation and lysine inhibition of its activity in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59(2-3): 270-7.

- Hinnebush, A.G. (1988).** Mechanisms of gene regulation in general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52:248-273.
- Hinnen, A., y Nuesch, J. (1976).** Enzymatic hydrolysis of cephalosporin C by and extracellular acetilhydrolase of *Cephalosporium acremonium*. *Antimicrob. Agents. Ch.* 9:824-830.
- Hogg, R. y Broquist, H.P. (1968).** Homocitrate formation in *Neurospora crassa*: relation to lysine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 243:1829-1845.
- Holmes, D.S. y Quigley, M. (1981).** A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal. Biochem.* 114:193-197.
- Hönlinger, C., y Kubicek, C.P. (1989b).** Regulation of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine and isopenicillin N biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* by the α -aminoadipate pool size. *FEMS Microbiol Lett.* 65: 71-76.
- Hönlinger, C.; Hampel, W.; Röhr, M. y Kubicek, C.P. (1988).** Differential effects of general amino acid control of lysine biosynthesis on penicillin formation in strains of *Penicillium chrysogenum*. *J. Antibiot.* 41:255-257.
- Hoover, T.R.; Imperial, J.; Ludden, P.W. y Shah, V.K. (1989).** Homocitrate is a component of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Biochemistry* 28:2768-2771.
- Horecka, J.; Kinsey, P. y Sprague, G.F. Jr. (1995).** Cloning and characterization of *LYS7* gene: evidence for function outside of lysine biosynthesis. *Gene* 167:87-92.
- Humphries, P. (1986).** Polymorphic DNA markers genetically linked to disease-causing genes: a review. *Ir. J. Med. Sci.* 155(12): 425-30.
- IJlst, L., Kromme, I., Oostheim, W., y Wanders, R.J. (2000).** Molecular Cloning and Expression of Human L-Pipecolate Oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270, 1101-1105.
- Izaddoost, M., Harris, B.G., y Gracy, R.W. (1976).** Structure and toxicity of alkaloids and amino acids of *Sophora secundiflora*. *J Pharm Sci.* 65(3): 352-4.
- Jaklitsch, W.M. y Kubicek, C.P. (1990)** Homocitrate synthase from *Penicillium chrysogenum*: localization, purification of the cytosolic isoenzyme, and sensitivity to lysine. *Biochem. J.* 269: 247-253.
- Jaklitsch, W.M.; Hampel, W.; Röhr, M., y Kubicek, C.P. (1986).** α -aminoadipate pool concentration and penicillin biosynthesis in strains of *Penicillium chrysogenum*. *Can. J. Microbiol.* 32: 473-480.
- Jaklitsch, W.M.; Rhör, M. y Kubicek, C.P. (1987).** Lysine biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*: regulation by general amino acid control and absence of lysine repression. *Exp. Mycol.* 11:141-149.
- Jaramillo, M.C. (2000).** Acción Leishmanicida *in vitro* de la cascara del fruto de *Annona muricata* y aislamiento y caracterización de compuestos activos de hoja de *Annona muricata* y *Momordica charantia*. Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas (GISB). Trabajo Especial de Grado de Maestría en Química. En Internet. (http://investigacion.udea.edu.co/gru/consolidados/sustan_bioactivas9900.htm).
- Johansson, E., Steffens, J.J., Emptage, M., Lindqvist, Y., y Schneider, G. (2000a).** Cloning, expression, purification and cristalization of saccharopine reductase from *Magnaporthe grisea*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 56: 662-664.
- Johansson, E., Steffens, J.J., Lindquist, Y., y Schneider, G. (2000b).** Crystal structure of saccharopine reductase from *Magnaporthe grisea*, an enzyme of the alpha-aminoadipate pathway of lysine biosynthesis. *Struct. Fold Des.* 8: 1037-1047.
- Jones, E.E. y Broquist, H.P. (1966).** Saccharopine an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 240:2531.
- Kemper, E.L., Neto, G.C., Papes, F., Moraes, K.C.M., Leite, A., Arruda, P. (1999).** The role of Opaque2 in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. *Plant cell.* 11: 1981-1994.
- Kern, B.A., Hendlin, D., Inamine, E. (1980).** L-lysine ϵ -aminotransferase involved in cephamycin C synthesis in *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 17: 679-685.
- Kinzel, J.J., Winston, M.K., y Bhattacharjee, J.K. (1983).** Role of L-lysine- α -ketoglutarate aminotransferase in catabolism of lysine as a nitrogen source for *Rhodotorula glutinis*. *J. Bacteriol.* 155: 417-419.

- Kinzel, J.J., y Bhattacharjee, J.K. (1979).** Role of pipecolic acid in the biosynthesis of lysine in *Rhodotorula glutinis*. *J. Bacteriol.* 138, 410-417.
- Kinzel, J.J., y Bhattacharjee, J.K. (1982).** Lysine biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*: properties of pipecolic acid oxidase. *J. Bacteriol.* 151: 1073-1077.
- Kobashi, N.; Nishiyama, M. y Tanokura, M. (1999).** Aspartate kinase-independent lysine synthesis in an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*: lysine is synthesized via α -amino adipic acid not via diaminopimelic acid. *J. Bacteriol.* 181: 1713-1718.
- Kosuge, T. y Hoshino, T. (1998).** Lysine is synthesized through the alpha-amino adipate pathway in *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 169: 361-367.
- Kramar, R., Kremser, K., y Schon, H. (1989).** Peroxisomal oxidation of pipecolic acid in the rat. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27(5): 319-321.
- Kudla, B.; Kaddick, M.X.; Langdon, T.; Martinez-Rossi, N.M.; Bennett, C.P.; Sibley, S.; Davies, R.W. y Arst, H. N. Jr. (1990).** The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of putative zinc-finger. *EMBO J.* 9:1355-1364.
- Kurtz, M., Bhattacharjee, J.K. (1975).** Biosynthesis of lysine in *Rhodotorula glutinis*: role of pipecolic acid. *J. Gen. Microbiol.* 86: 103-110.
- Leisinger, T. (1987).** Biosynthesis of proline. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L. Low, K.B., Magasanic, B., Schaechter, M., y Umberger, H.E. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. In "American Society for Microbiology". Washington, DC. Pp.345-351.
- Lejohn, H.B. (1971).** Enzyme regulation, lysine pathways, and cell structures as indicators of major lines of evolution in fungi. *Nature* (London) 231:164-168.
- Lesk, A.M. (1995).** NAD-binding domains of dehydrogenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 775-783.
- Leskiw, B.K.; Aharonowitz, Y.; Mevarech, M.; Wolfe, S.; Vining, L.C.; Westlake, D.W.S. y Hensen, S.E. (1988).** Cloning and nucleotide sequence determination of the isopenicillin N synthetase gene from *Streptomyces clavuligerus*. *Gene* 62:187-196.
- Leung, S.O., Yeung, H.W., Leung, K.N. (1987).** The immunosuppressive activities of two abortifacient proteins isolated from the seeds of Bitter Melon (*Momordica charanti*). *Immunopharmacology.* 13: 159-71.
- Li, C.J., Brownson, D.M., Mabry, T.J., Perera, C., y Bell, E.A. (1996).** Nonprotein amino acids from sedes of *Cycas circinalis* and *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry.* 42: 443-445.
- Lopez-Nieto, M.H.; Ramos, F.R.; Luengo, J.M. y Martín, J.F. (1985).** Characterization of the biosynthesis *in vivo* of α -amino adipyl-cysteinyl-valine in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:343-351.
- Luengo, J.M.; Revilla, G.; Lopez, M.J.; Villanueva, J.R. y Martín, J.F. (1980).** Inhibition and repression of homocitrate synthase by lysine in *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* 144: 869-876.
- Luengo, J.M.; Revilla, G.; Villanueva, J.R. y Martín, J.F. (1979).** Lysine regulation of penicillin biosynthesis in low-producing and industrial strains of *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.* 115: 207-211.
- MacCabe, A.P.; vanLiempt, H.; Palissa, H.; Unkles, S.; Riach, M.B.R.; Pfeifer, E.; von Dörhen, H. y Kinghorn, J.R. (1991).** δ -(L- α -amino adipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*: molecular characterization of the *acvA* gene encoding the first enzyme of the penicillin biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 266:12646-12654.
- Madden, M. S.; Krezel, A.M.; Allen, R.M.; Ludden, P.W. y Shah, V.K. (1992).** Plausible structure of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Biochemistry* 89:6487-6491.
- Malik, A.N.; McLean, P.M.; Roberts, A.; Barnett, P.S.; Demaine, A.G.; Banga, J.P. y McGregor, A.M. (1990).** A simple high yield method for the preparation of lambda gt10 DNA suitable for subcloning, amplification and direct sequencing. *Nucleic Acids Res.* 18:4031-4032.
- Malumbres, M. y Martín, J.F. (1996).** Molecular control mechanisms of lysine and threonine biosynthesis in amino acid-producing corynebacteria: Redirecting carbon flow. *FEMS Microbiol. Lett.* 143: 103-114.

- Maniatis, T.; Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982).** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.
- Maragoudakis, M. E. y Strassman, M. (1966).** Homocitric accumulation by lysine requiring yeast mutant. *J. Biol. Chem.* 241:695-699.
- Maragoudakis, M. E.; Holmes, H. y Strassman, M. (1967).** Control of lysine biosynthesis in yeast by a feedback mechanism. *J. Bacteriol.* 93:1677-1697.
- Markovitz, P.J., Chuang, D.T., y Cox, R.P. (1984).** Familial hyperlysinemias: Purification and characterization of the bifunctional amino adipic semialdehyde synthase with LKR and SDH activities. *J. Biol. Chem.* 259, 11643-11646.
- Marlier, M., Dardenne, G., y Casimir, J. (1979).** 2S, 4R-carboxy-2-acetyl amino-4-piperidin in the leaves of *Calliandra haematocephala*. *Phytochemistry.* 18, 479-481.
- Martín de Valmaseda, E.M., Naranjo, L., Bañuelos, O., Casqueiro, J, y Martín, J.F. (2003).** Two Different Pathways for the Catabolism of Lysine Isomers in *Penicillium chrysogenum*. (Sin Publicar).
- Martín, J.F. (1998).** New aspects of genes and enzymes for β -lactam antibiotic biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 1-15.
- Martín, J.F. Gutiérrez, S. y Demain, A.L. (1997).** β -lactams. En: *Fungal Biotechnology* Ed. Anke, T. Weinheim: Chapman and Hall. pp. 91-127.
- Martín, J.F. y Aharonowitz, Y. (1983).** Regulation of the biosynthesis of β -lactam antibiotics. En: *Antibiotics containing the β -lactam structure, part I.* Eds. Demain, A. L. y Solomon, N. A. Springer-Verlag. Berlin. pp. 229-254
- Martín, J.F. y Demain, A.L. (1980).** Control antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 44:230-251.
- Martín, J.F. y Gutiérrez, S. (1995).** Genes for β -lactam antibiotic biosynthesis. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 67:181-200.
- Martín, J.F. y Liras, P. (1989a).** Enzymes involved in penicillin, cephalosporin and cephamycin biosynthesis. En: *Advances in biochemical engineering/biotechnology.* Ed. Fiechter, A. Vol. 39. Springer-Verlag. Berlín. pp. 153-187
- Martín, J.F. y Liras, P. (1989b).** Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:173-206.
- Martín, J.F., Gutiérrez, S., Aparicio, J.F. (2000).** Secondary metabolites. In "Encyclopedia of Microbiology", vol. 4, 2nd ed. (Lederberg, J., ed.). Academic Press, pp. 213-237.
- Martín, J.F., Liras, P., Villanueva, J.R. (1974).** Changes in composition of conidia of *Penicillium notatum* during germination. *Arch. Microbiol.* 97: 39-50.
- Martín, J.F.; Casqueiro, J.; Kosalkova, K.; Marcos, A.T. y Gutiérrez, S. (1999).** Penicillin and cephalosporin biosynthesis: mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 75:21-31.
- Martín, J.F.; Gutiérrez, S.; Fernández, F.J.; Velasco, J.; Fierro, F.; Marcos, A.T. y Kolsakova, K. (1994).** Expression of genes and processing of enzymes for the biosynthesis of penicillins and cephalosporins. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 65:227-243.
- Martín, J.F.; Lopez-Nieto, M.J.; Castro, J.M.; Cortes, J.; Romero, J.; Ramos, F.R.; Cantoral, J.M.; Alvarez, E.; Dominguez, M.G.; Barredo, J.L. y Liras, P. (1986).** Enzymes involved in β -lactam biosynthesis controlled by carbon and nitrogen regulation. En: *Regulation of secondary metabolites formation.* Eds. Kleinkaud, J.; Von Döhren, H.; Dornauer, H. y Nesemann, G. WCH Weinheim. Germany. pp. 41-75.
- Martinez-Blanco, H.; Reglero, A.; Ferrero, M.A.; Fernández-Cañón, J.M. y Luengo, J.M. (1989).** Repression of phenylacetic acid transport system in *Penicillium chrysogenum* Wis 54-1255 by free amino acids and ammonium salts. *J. Antibiot.* 42:1416-1423.
- Marzluf, G.A. (1997).** Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 61:17-32.

- Masepohl, B.; Angermüller, S.; Hennecke, S.; Hübner, P.; Moreno-Vivian, C. y Klipp, W. (1993).** Nucleotide sequence and genetic analysis of the *Rhodobacter capsulatus* ORF6-*nifU₁SVW* gene region: possible role of NifW in homocitrate processing. *Mol. Gen. Genet.* 238:369-382.
- Masurekar, P.S. y Demain, A.L. (1972).** Lysine control of penicillin biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* 18:1045-1048.
- Matsuda, M. y Ogur, M. (1969a).** Separation and specificity of the yeast glutamic α -ketoacid transaminase. *J. Biol. Chem.* 244:3352-3358.
- Matsuda, M. y Ogur, M. (1969b).** Enzymatic and physiological properties of yeast glutamic α -ketoacid transaminase. *J. Biol. Chem.* 244:5153.
- Matsumura, M.; Imanaka, T.; Yoshida, T. y Taguchi, H. (1978).** Effect of glucose and methionine consumption rates on cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium*. *J. Ferment. Technol.* 56:345-353.
- McKenzie, T.; Hoshino, T.; Tanaka, T. y Sueoka, N. (1986).** The nucleotide sequence of pUB110; some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* 14:93-103.
- Meijer, W. G. y Tabita, F.R. (1992).** Isolation and characterization of the *nifUSVW-rpoN* gene cluster from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 174: 3855-3866.
- Mihalik S.J., McGuinness M., Watkins P.A. (1991).** Purification and characterization of peroxisomal L-pipecolic acid oxidase from monkey liver. *J. Biol. Chem.* 266: 4822-4830.
- Mihalik, S.J. y Rhead, W.J. (1989).** L-pipecolic acid oxidation in the rabbit and cynomolgus monkey. Evidence for differing organellar locations and cofactor requirements in each species. *J. Biol. Chem.* 264(5): 2509-2517.
- Mihalik, S.J. y Rhead, W.J. (1991).** Species variation in organellar location and activity of L-pipecolic acid oxidation in mammals. *J. Comp. Physiol. B.* 160(6): 671-676.
- Mihalik, S.J., Moser, H.W., Watkins, P.A., Danks, D.M., Poulos, A., y Rhead, W.J. (1989).** Peroxisomal L-pipecolic acid oxidation is deficient in liver from Zellweger syndrome patients. *Pediatric. Res.* 25(5): 548-552.
- Miller, J.H. (1972).** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, New York. pp. 352-355.
- Miller, K. . y Bhattacharjee, J.K. (1996).** The *LYS5* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 172:167-168.
- Mitchell, H.K. y Houlihan, N.D. (1948).** An intermediate in the biosynthesis of lysine in *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* 174:883-887.
- Molnar, I., Aparicio, J.F., Haydock, S.F., Khaw, L.E., Schwecke, T., König, A., Staunton, J., Leadlay, P.F. (1996).** Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. *Gene.* 22; 169(1): 1-7.
- Morris, M.E. y Jinks-Robertson, S. (1991).** Nucleotide sequence of the *LYS2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: homology to *Bacillus brevis* tyrocidine synthetase I. *Gene* 98:141-145.
- Motamedi, H., y Shafiee, A. (1998).** The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506. *Eur. J. Biochem.* 256, 528-534.
- Müller, W.U., y Leistner, E. (1975).** Conversion of D-lysine via L-pipecolic acid in *Neurospora crassa*. *Z. Naturforsch. Sect. C30*, 253-262.
- Naranjo L., Martín de Valmaseda E., Casqueiro J., Bañuelos O., Ullán, R.V., Lamas, M., y Martín J.F. (2003).** Inactivation of *lys7* encoding saccharopine reductase in *Penicillium chrysogenum* leads to accumulation of the secondary metabolite precursors piperidine-6-carboxylic acid and pipecolic acid from α -amino adipic acid. (En Evaluación).
- Naranjo, L., Martín de Valmaseda, E., Bañuelos, O., López, P., Riaño, J., Casqueiro, J. y Martín, J.F. (2001).** Conversión of pipecolic acid into lysine in *Penicillium chrysogenum* requires pipecolato oxidase and saccharopine reductasa: characterization of the *lys7* gene encoding saccharopine reductasa. *Journal of Bacteriology.* 183: 7165-7172.

- Niederberger, P.; Miozzari, G. y Üter, R. (1981). Biological role of the general control of amino acid biosynthesis in *saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1:584-593.
- Nielsen JB, Hsu M-J, Byrne KM, Kaplan L. (1991). Biosynthesis of the immunosuppressant immunomycin: The enzymology of pipecolate incorporation. *Biochemistry* 30:5789-5796.
- Normansell, P.J.M.; Normansell, I.D. y Holt, G. (1979). Genetic and biochemical studies of mutants of *Penicillin chrysogenum* impaired in penicillin production. *J. Gen. Microbiol.* 112:113-126.
- Norton, B.W. (2002). Anti-nutritive and toxic factors in forage tree legumes. Chapter 4.3. En Internet. (<http://fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Publicat/Gutt-shel/x5556e01.htm>).
- Ogawa, H. y Fujioka, M. (1978). Purification and characterization of saccharopine dehydrogenase (L-lysine forming) from Baker's yeast. *J. Biol. Chem.* 253:3666-3670.
- Patte, J.C. (1983). Diaminopimelate and lysine. En: *Amino acids: biosynthesis and genetic regulation*. Eds. Hermann, K. M. y Somerville, R. L. Adison-Wesley Reading. Mass. pp. 213.
- Payton, C.W., Chang, Y.F. (1982). Δ^1 -piperideine-2-carboxylate reductase of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 149: 864-871.
- Peitsch, M.C. (1995). Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology* 13,658-660.
- Peitsch, M.C. (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans* 24:274-279.
- Pérez-Campo, F.M.; Nicaud, J.M.; Gaillardin, C. y Domínguez, A. (1996). Cloning and sequencing of the *LYS1* gene encoding homocitrate synthase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 12: 1459-1469.
- Polman, J.K. y Larkin, J.M. (1989). Purification of DNA from agarose gels. *Biotechnol. Tech.* 3:329-332.
- Pontecorvo, G. y Sermonti, G. (1954). Parasexual recombination in *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.* 11:94-104.
- Queener, S.F. (1986). History and origin of β -lactam antibiotics. *Clin. Farmacol.* 4:3-15.
- Rajnarayan, S.; Vaughn, J.A.C.; Bhattacharjee, J.K. (1992). Physical and biochemical characterization of the cloned *LYS5* gene required for α -amino adipate reductase activity in the lysine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 21:13-16.
- Ramón, D.; Carramolino, L.; Patiño, C.; Sanchez, F. y Peñalva, M.A. (1987). Cloning and characterization of the isopenicillin N synthetase gene mediating the formation of the β -lactam ring in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 57:171-181.
- Ramos, F. y Wiame, J.M. (1985). Mutation affecting the specific regulatory control of lysine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 200:291-294.
- Ramos, F.; Dubois, E. y Piérard, A. (1988). Control of the enzyme synthesis in the biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 171:171-176.
- Ramos, F.; Verhasselt, P.; Feller, A.; Peeters, P.; Wach, A.; Dubois, E. y Volckaert, G. (1996). Identification of a gene encoding a homocitrate synthase isoenzyme of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12: 1315-1320.
- Rao V.V., Chang, Y.F. (1990). L-Pipecolic acid metabolism in human liver: detection of L-pipecolic oxidase and identification of its reaction product. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1038: 295-299.
- Rao, V.V., Chang, Y.F. (1992). Assay for pipecolic acid oxidase activity in human liver: detection of enzyme deficiency in hyperpipecolic acidemia. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1139: 189-195.
- Rao, V.V., Tsai, M.J., Xiaoming, P., Chang, Y.F. (1993). L-pipecolic acid oxidation in rat: subcellular localization and developmental study. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1164: 29-35.
- Raper, K.B. (1978). The penicillin saga remembered. *ASM News* 44:645-653.
- Raper, K.B.; Alexander, D.F. y Coghill, R.D. (1944). Natural variation and penicillin production in *Penicillin notatum* and allied species. *J. Bacteriol.* 48:639-659.
- Reuber, B.E., Karl, C., Reimann, S.A. Mihalik, S.J., y Dodt, G. (1997). Cloning and functional expression of a mammalian gene for a peroxisomal sarcosine oxidase. *J. Biol. Chem.* 272, 6766-6776.

- Revilla, G.; Ramos, F.R.; Lopez-Nieto, M.J.; Álvarez, E. y Martín, J.F. (1986).** Glucose represses formation of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cisteinyl-D-valine and isopenicillin N synthase but not penicillin acyltransferase in *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* 168:947-952.
- Revilla, G.M.; Lopez-Nieto, M.J.; Luengo, J.M. y Martín, J.F. (1984).** Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *J. Antibiot.* 37:781-789.
- Reynolds, K.A., Demain, A.L. (1997).** Rapamycin, FK506, and ascomycin-related compounds, pp. 497-520. In: *Biotechnology of Antibiotics*. Strohl, W.R. (ed.). Marcel Dekker Inc, NY.
- Riaño, J. (1998).** Aislamiento y caracterización de mutantes auxótrofos del hongo *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Tesis de Licenciatura. Universidad de León.
- Rodwell, V.W. (1971).** *Methods in Enzymology*. Vol. XVIII B. 188-199.
- Romeo, J.T. (1984).** Insecticidal amino acids in the leaves of *Calliandra*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 12, 293-297.
- Romeo, J.T. (1988).** Functional multiplicity among nonprotein amino acids in Mimosoid legumes: a case against redundancy. *Ecoscience*, an International Journal of Ecology. *Ecoscience* online, Volumen 5(3). Editor Jeremy McNeil. En Internet: (http://www.bio.ulaval.ca/ecoscience/ARTICLE_ENG/vol5n3.htm).
- Rosenthal, G.A. (1982).** Plant nonprotein amino acids. Biological, Biochemical and Toxicological Properties. Academic Press, New York.
- Rossmann, M.G., Liljas, A., Brändén, C.I., y Banaszak, L.J. (1975).** Evolutionary and structural relationship among dehydrogenases. *Enzymes*. 11, 51-102.
- Rost, B., y Sander, C. (1993).** *JMB*. 232, 584-599.
- Rothstein, M. y Saffran, E.M. (1963).** Lysine biosynthesis in algae. *Arch. Biochem. Biophys.* 101:373.
- Rothstein, R.J. (1983).** One-step gene disruption in yeast. *Method. Enzymol.* 101:202-211.
- Rothstein, R.J. (1991).** Targeting disruption replacement and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Method. Enzymol.* 194:281-301.
- Sagisaka, S. y Shimura, K. (1960).** Mechanism of activation and reduction of α -aminoadipic acid by a yeast enzyme. *Nature* (London) 188:1189-1190.
- Sagisaka, S. y Shimura, K. (1962).** Studies in lysine biosynthesis: IV. Mechanism of activation and reduction of α -aminoadipic acid. *J. Biochem.* (Tokio) 52:155.
- Salawu, M.B., Acamovic, T., Stewart, R.L., y Roothaert (1999).** Composition and degradability of different fractions of *Calliandra* leaves, pods and seeds. *ELSEVIER. Animal Feed Science and Technology*. 77, 181-199.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez, S.; Flores, M.E. y Demain, A.L. (1988).** Nitrogen regulation of penicillin and cephalosporin fermentations. En: *Nitrogen source control of microbial processes*. Ed. Sánchez-Esquivel, S. CRC Press, Boca Raton. Florida. pp. 121-136.
- Sánchez, S.; Panaigua, L.; Mateos, R.C.; Lara, F. y Mora, J. (1981).** Nitrogen regulation of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. En: *Advances in biotechnology*. Vol. III. Eds. Vezina, C. y Singh, K. Pergamon Press. Toronto. pp 147-154.
- Saunders, G. y Holt, G. (1987).** Genetics of penicilia. En: *Penicillium and Acremonium*. Ed. Peberdy, J. Plenum Press. New York. pp. 73-91.
- Schmidt, H.; Bode, R. y Birnbaur, D. (1989).** Regulation of the lysine biosynthesis in *Pichia guilliermondii*. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 56:337-347.
- Schmidt, H.; Bode, R.; Lindner, N. y Birnbaum, D. (1985).** Lysine biosynthesis in the yeast *Candida maltosa*: properties of some enzymes and regulation of the biosynthetic pathway. *J. Basic. Microbiol.* 25:675-681.

- Schwecke, T., Aparicio, J.F., Molnar, I., König, A., Khaw, L.E., Haydock, S.F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortes, J., y Lester, J.B (1995). The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 7839-7843.
- Schweet, R.S., Holden, J.T., y Lowry, P.H. (1954). The metabolism of lysine in *Neurospora*. *J. Chem.* 211: 517-529.
- Sim K.L., y Perry D. (1997). Analysis of swainsonine and its early metabolic precursors in cultures of *Metarhizium anisopliae*. *Glycoconjugate J.* 14: 661-668.
- Singh, H., Usher, S., y Poulos, A. (1989). Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase and alkyldihydroxyacetone phosphate synthase activities in rat liver subcellular fractions and human skin fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 268(2): 676-686.
- Sinha, A, K. y Bhattacharjee, J.K. (1971). Lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: conversion of α -aminoadipate into α -aminoadipic- δ -semialdehyde. *Biochem. J.* 125:743-749.
- Smith, A.W.; Burhan, M.K.R.; Edwards, J.; Earl, A.J. y Turner, G. (1990). Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology* 8:39-41.
- Soda, K., Misono, H. (1971). L-lysine- α -ketoglutarate aminotransferase. *Methods Enzymol.* 17B: 222-228.
- Soltero, F.V. y Johnson, M.J. (1953). Effect of the carbohydrate nutrition on penicillin production by *Penicillium chrysogenum* Q176. *Appl. Microbiol.* 1:52-57.
- Somerson, N.L.; Demain, A.L. y Nunheimer, T.D. (1961). Reversal of lysine inhibition of penicillin production by α -aminoadipic acid. *Arch. Biochem.* 93:238-241.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Steward, G.R., y Larher, F. (1980). Accumulation of amino acids and related compounds in relations to environmental stress. *Biochem. Plants.* 5: 609-635.
- Steward, V. y Vollmer, S.J. (1986). Molecular cloning of *nit-2*, a regulatory gene required for nitrogen metabolite repression in *Neurospora crassa*. *Gene* 46:291-295.
- Stinson, S. (2000). Chiral Drugs. Science/Technology. Cover Story. American Chemical Society. Vol. 78, No. 43. pp.55-78. En Internet. (<http://pubs.acs.org/cen/coverstory/7843/7843scit1.html>).
- Stinson, S. (2001). Fine Chemical. Cover Story. American Chemical Society. Vol. 79, No. 28. pp.65-84. En Internet. (<http://pubs.acs.org/cen/coverstory/7928/print/7928finechemicals.html>).
- Storts, D.R. y Bhattacharjee, J.K. (1987). Purification and properties of saccharopine dehydrogenase (glutamate forming) in the *Saccharomyces cerevisiae* lysine biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* 169:416-418.
- Storts, D.R. y Bhattacharjee, J.K. (1989). Properties of revertants of *lys2* and *lys5* mutant as well as α -aminoadipate semialdehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 161:182-186.
- Strassman, M. y Ceci, L.N. (1964). Enzymatic formation of homocitric acid, an intermediate in lysine biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 14:262.
- Stricker, O.; Masepohl, B.; Klipp, W., y Bohme, H. (1997). Identification and characterization of the *nifV-nifZ-nifT* gene region from the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 179:2930-2937.
- Suvarna, K.; Seah, L.; Bhattaharjee, V. y Bhattacharjee, J.K. (1998). Molecular analysis of the *LYS2* gene of *Candida albicans*: homology to peptide antibiotic synthetases and the regulation of the α -aminoadipate reductase. *Curr. Genet.* 32:268-275.
- Takenouchi, E.; Tanaka, H. y Soda, K. (1981). Homocitrate synthase of *S*-(aminoethyl)-L-cysteine resistant mutants of *Candida pelliculosa*. *J. Ferment. Biotechnol.* 59:429-433.
- Tang, G., Zhu, X., Tang, X., Galili, G. (2000). A novel composite locus of *Arabidopsis* encoding two polypeptides with metabolically related but distinct functions in lysine catabolism. *Plant J.* 23(2):195-203.

- Teves, F., Casqueiro, J., **Naranjo, L.**, Ullán, R.V., Bañuelos, O., Lamas, M. y Martín, J.F. (2003). Characterization of the *lys3* Gene and a Mutant allele from *Penicillium chrysogenum* encoding a Bi-Functional Protein with Homoaconitase Activity and Regulatory Functions. (En Evaluación).
- Tracy, J. y Kohlhaw, G. (1975). Reversible coenzyme A mediated inactivation of biosynthetic condensing enzymes in yeast: a possible regulatory mechanism. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72:1802-1806.
- Tucci, A.F. y Ceci, L.N. (1972b). Homocitrate synthase from yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 153:742-750.
- Tucci, A.F. y Ceci, L.N. (1972a). Control of the lysine biosynthesis in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 153:751-754.
- Urrestarazu, L.A.; Borell, C.W. y Bhattacharjee, J.K. (1985). General and specific controls of lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 9:341-344.
- Vogel, H.J. (1960). Two models of lysine synthesis among lower fungi: evolutionary significance. *Biochim. Biophys. Acta* 41:172.
- Waksman, S. A. (1947). What is an antibiotic or an antibiotic substance?. *Micology* 39:565-569.
- Wanders, R.J., Romeyn, G.J., Schutgens, R.B., y Tager, J.M. (1989). L-pipecolate oxidase: a distinct peroxisomal enzyme in man. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164(1): 550-555.
- Wanders, R.J., Romeyn, G.J., van Roermund, C.W., Schutgens, R.B., van den Bosch, H., y Tager, J.M. (1988). Identification of L-pipecolate oxidase in human liver and its deficiency in the Zellweger syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154(1): 33-8.
- Wang, L.; Okamoto, S. y Bhattacharjee, J.K. (1989). Cloning and physical characterization of linked genes (*LYS4*, *LYS15*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 16:7-12.
- Wang, S.; Dean, D.R.; Chen, J. y Johnson, J.L. (1991). The N-terminal and C-terminal protons of *nifV* are encoded by two different genes in *Clostridium pasteurianum*. *J. Bacteriol.* 173:3041-3046.
- Weidner, G., Steidl, S., Brakhage, A.A. (2001). The *Aspergillus nidulans* homoaconitase gene *lysF* is negatively regulated by the multimeric CCAAT-binding complex AnCF and positively regulated by GATA sites. *Arch. Microbiol.* 175(2): 122-32.
- Weidner, G.; Stefan, B. y Brakhage, A.A. (1997). The *Aspergillus nidulans* *lysF* gene encodes homoaconitase an enzyme involved in the fungus-specific lysine biosynthesis pathway. *Mol. Gen. Genet.* 355:237-247.
- Weigel, B.J.; Burgett, S.G.; Chen, V.J.; Skatrud, P.L.; Frolik, C.A.; Queener, S.W. e Ingolia, T.D. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of isopenicillin N synthetase genes from *Streptomyces lipmanii* and *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 170:3817-3826.
- Wickwire, B.M., Harris, C.M., Harris, T.M., Broquist, H.P. (1990a). Pipecolic acid biosynthesis in *Rhizoctonia leguminicola*; I. The lysine, saccharopine Δ^1 -piperideine-6-carboxylic acid pathway. *J. Biol. Chem.* 265: 14742-14747.
- Wickwire, B.M., Wagner, C., Broquist H.P. (1990b). Pipecolic acid biosynthesis in *Rhizoctonia leguminicola*. II. Saccharopine oxidase: a unique flavine enzyme involved in pipecolic acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 265: 14748-14753.
- Wiemken, A. y Durr, M. (1974). Characterization of amino acids pool in the vacuola compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 101:45.
- Windsor, E. (1951). α -amino adipic as a precursor to lysine in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 192:607.
- Winston, M.K. y Bhattacharjee, J.K. (1987). Biosynthetic and regulatory role of *Lys9* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 11:393-398.
- Wolfner, M.; Yep, D.; Messenguy, F. y Fink, G.R. (1975). Integration of amino acid biosynthesis in to the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 96:273.
- Xuan, J.W.; Fournier, P.; Declerck, N.; Chasles, M. y Gaillardin, C. (1990). Overlapping reading frames at the *LYS5* locus in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Cell. Biol.* 10:4795-4806.
- Ye, Z.H. y Bhattacharjee, J.K. (1988). Lysine biosynthesis pathway and biochemical blocks of lysine auxotrophs of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 170:5968-5970.

- Zaret, K.S. y Sherman, F. (1985).** α -aminoadipate as a primary nitrogen source for *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *J. Bacteriol.* 162:579-583.
- Zhu, X., Tang, G., Galili, G. (2000a).** Characterization of the two saccharopine dehydrogenase isozymes of lysine catabolism encoded by the single composite AtLKR/SDH locus of Arabidopsis. *Plan Physiol.* 124: 1363-1372.
- Zhu, X., Tang, G., Galili, G. (2000b).** The catabolic function of the alpha-aminoadipic acid pathway in plants is associated with unidirectional activity of lysine-oxoglutarate reductase, but not saccharopine dehydrogenase. *Biochem J.* 1; 351(Pt 1): 215-20.

