



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Biología Molecular. Área de Microbiología

Instituto de Biotecnología (INBIOTEC)

TESIS DOCTORAL

**Un autoinductor de la biosíntesis de
penicilina en *Penicillium chrysogenum*:
Caracterización molecular y estudio de la
respuesta del proteoma a la adición de inductor**

Jorge Martín González

León, 2010



**INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

El Dr. D. **JUAN FRANCISCO MARTÍN MARTÍN** como Director, y el Dr. D. **CARLOS GARCÍA ESTRADA** como co-director¹ de la Tesis Doctoral titulada “**Un autoinductor de la biosíntesis de penicilina en *Penicillium chrysogenum*: Caracterización molecular y estudio de la respuesta del proteoma a la adición de inductor**” realizada por D. **JORGE MARTÍN GONZÁLEZ** en el Departamento de **BIOLOGÍA MOLECULAR**, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a ___ de _____ de 2010.

Dr. Juan Francisco Martín

Dr. Carlos García Estrada

¹ Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.



**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de **Biología Molecular** en su reunión celebrada el día ____ de _____ de 2010 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “**Un autoinductor de la biosíntesis de penicilina en *Penicillium chrysogenum*: Caracterización molecular y estudio de la respuesta del proteoma a la adición de inductor**”, dirigida por el Dr. D. **Juan Francisco Martín Martín** y el Dr. D. **Carlos García Estrada**, elaborada por D. **Jorge Martín González** y cuyo título en inglés es el siguiente “**A penicillin biosynthesis self-inductor in *Penicillium chrysogenum*: Molecular characterization and study of the proteome response to the addition of the inductor**”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a ____ de _____ de 2010.

El Secretario,

Fdo.: _____

Vº Bº

El Director del Departamento,

Fdo.: _____

***Memoria presentada por Jorge Martín González para
optar al grado de Doctor por la Universidad de León.
León, 2010.***

*A mi mujer Maribel
A mis hijas Andrea y Ana*

AGRADECIMIENTOS

Escribir los agradecimientos de esta memoria de Tesis Doctoral significa haber concluido un intenso trabajo que no hubiera sido posible sin la colaboración de aquellas personas que cito a continuación y a quienes quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Juan Francisco Martín, director de esta Tesis, la oportunidad ofrecida para desarrollar mi trabajo de Tesis Doctoral en el Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC).

Al Dr. Carlos García Estrada co-director de esta Tesis, le quiero agradecer su trabajo, su gran experiencia y sobre todo su paciencia e interés en todo momento.

A la Dra. Silvia M. Albillos García por su inestimable ayuda con los trabajos de cromatografía HPLC.

Al Dr. Eliseo Recio por su colaboración y asesoramiento en las técnicas cromatográficas, en la etapa inicial de esta Tesis.

Al Dr. Ricardo Vicente Ullán, al Dr. Carlos Barreiro y a Mohammad-Saeid Jami por haberme apoyado en el desarrollo de varios experimentos.

A los compañeros de INBIOTEC presentes y pasados quienes crearon un buen ambiente de trabajo.

Y finalmente deseo expresar mi gratitud a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Introducción a los antibióticos β-lactámicos.	3
1.1. Penicilina: descubrimiento y caracterización.	3
1.1.1. Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos.	7
1.1.2. Clasificación y estructura química.	9
1.2. Hongos productores: taxonomía y características generales.	12
1.2.1. Clasificación taxonómica de <i>Penicillium chrysogenum</i> .	13
1.3. Mejora de cepas productoras de penicilina.	13
1.4. Biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas.	15
1.5. Genes directamente implicados en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos.	17
1.5.1. Genes y proteínas comunes de las rutas biosintéticas de penicilinas y cefalosporinas.	17
1.5.1.1. El gen <i>pcbAB</i> codifica la ACV-sintetasa.	17
1.5.1.2. El gen <i>pcbC</i> codifica la isopenicilina N-sintasa (ciclasa).	18
1.5.1.3. El gen <i>penDE</i> codifica la acil-CoA: isopenicilina N-aciltransferasa.	19
1.6. Organización génica en los microorganismos productores de penicilinas y cefalosporinas.	20
1.7. Regulación de la biosíntesis de penicilina en <i>Penicillium chrysogenum</i> . Control molecular de la expresión de los genes.	21
1.7.1. Mecanismo de regulación de la expresión génica.	22

1.7.2. Regulación de la expresión de los genes de biosíntesis de penicilina.	28
1.7.2.1. Reguladores transcripcionales.	30
1.7.2.1.1. Regulación por pH externo. Regulador Pac C.	30
1.7.2.1.2. Regulación catabólica de la biosíntesis de penicilina por la fuente de carbono. Regulador transcripcional CreA.	32
1.7.2.1.3. Regulación por la fuente de nitrógeno. Regulador transcripcional NRE.	34
1.7.2.1.4. Regulador transcripcional PENR1.	35
1.7.2.1.5. Regulador transcripcional PTA1.	36
1.7.2.1.6. Regulador transcripcional penRFX.	37
1.7.2.1.7. Regulador global LaeA.	39
1.7.2.2. Regulación por aminoácidos.	39
1.7.2.3. Regulación por la adición de líquido de maceración del maíz (CSL).	40
1.7.2.4. Regulación mediada por el oxígeno.	41
1.7.2.5. Regulación mediada por la fuente de fósforo.	41
2. Compartimentalización de la biosíntesis de penicilina.	41
2.1. Localización de la ACVS.	42
2.2. Localización de la IPNS.	43
2.3. Localización de la IAT.	43
2.4. Otras enzimas implicadas en la biosíntesis de penicilina.	44
2.5. Importancia de la compartimentalización de la biosíntesis de penicilina.	45
2.5.1. Importancia de los peroxisomas en la ruta biosintética de penicilinas.	45
2.5.2. Importancia de otros orgánulos en la biosíntesis de penicilina.	47
2.5.3. Transporte a través de la membrana plasmática.	48

2.5.4. Transporte de precursores: aminoácidos y ácido fenilacético.	49
2.5.5. Transporte de intermediarios.	50
2.5.6. Transporte de penicilina.	51
2.5.7. Transporte a través de la membrana peroxisomal.	54
II. MATERIALES Y MÉTODOS	57
MATERIALES	59
1. Instrumental.	59
1.1. Equipos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	62
2. Productos y reactivos.	62
2.1. Productos para cromatografía.	62
2.1.1. Reactivos y solventes para cromatografía.	62
2.1.2. Resinas cromatográficas.	62
2.1.3. Columnas.	63
2.1.3.1. Columnas para cromatografía.	63
2.1.3.2. Columnas para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	63
2.2. Reactivos químicos de uso general.	63
2.3. Reactivos específicos para biología molecular.	64
2.3.1. Ácidos nucleicos.	64
2.3.2. Reactivos marcados con isótopos radiactivos.	64
2.3.3. Antibióticos.	65
2.3.4. Enzimas de restricción,ificadoras de ácidos nucleicos y otras.	66
2.3.5. Sistemas comerciales (Kits).	66
2.3.6. Vectores plasmídicos.	66
3. Microorganismos utilizados.	67

3.1. Cepas fúngicas.	67
3.2. Cepas bacterianas.	68
4. Medios de cultivo.	68
4.1. Medios de cultivo para bacterias.	68
4.2. Medios de cultivo para hongos.	71
4.2.1. <i>Acremonium chrysogenum</i> .	71
4.2.2. <i>Penicillium chrysogenum</i> .	73
4.2.3. <i>Candida utilis</i> .	77
MÉTODOS	77
5. Cultivo y mantenimiento de los microorganismos.	77
5.1. Cepas bacterianas.	77
5.1.1. Cultivo.	77
5.1.2. Mantenimiento.	78
5.2. Cepas fúngicas.	79
5.2.1. Cultivo.	79
5.2.1.1. <i>Acremonium chrysogenum</i> .	79
5.2.1.2. <i>Penicillium chrysogenum</i> .	79
5.2.1.3. <i>Candida utilis</i> .	80
5.2.2. Mantenimiento.	81
5.3. Determinación del crecimiento de los microorganismos.	81
6. Análisis y manipulación de ácidos nucleicos.	81
6.1. Eliminación selectiva de ácidos nucleicos.	81
6.2. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos por espectrofotometría en la región ultravioleta-visible.	82

6.3. Análisis y manipulación de ADN.	82
6.3.1. Extracción de ADN.	82
6.3.1.1. Limpieza y precipitación.	82
6.3.1.2. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .	83
6.3.1.2.1. Preparación de células competentes.	83
6.3.1.2.2. Transformación de <i>E. coli</i> .	84
6.3.1.2.3. Lisis alcalina.	85
6.3.2. Hidrólisis con endonucleasas de restricción.	85
6.3.3. Electroforesis de ADN.	87
6.3.3.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.	87
6.3.3.2. Extracción de ADN de geles de agarosa.	89
6.3.3.3. Marcaje de sondas de ADN por desplazamiento de mellas " <i>nick translation</i> ".	90
6.4. Análisis y manipulación de ARN.	91
6.4.1. Extracción de ARN total.	91
6.4.1.1. Obtención de ARN total de <i>P. chrysogenum</i> .	92
6.4.2. Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes.	93
6.4.3. Transferencia de ARN a filtros de nailon (<i>Northern</i>) e hibridación.	95
6.4.3.1. Transferencia por sistema de capilaridad.	95
6.4.3.2. Hibridación de ARN.	96
6.4.4. Retrotranscripción de ARN y amplificación del ADNc (RT-PCR).	98
6.4.4.1. Protocolo de eliminación de moléculas de ADN contaminantes en el ARN.	100
6.4.4.2. Protocolo de amplificación de secuencias de ARN por RT-PCR.	101

7. Métodos de análisis de proteínas.	102
7.1. Obtención de extractos acelulares.	102
7.2. Cuantificación de proteínas.	102
7.3. Determinación de la actividad enzimática beta-galactosidasa.	103
8. Valoración de antibióticos β-lactámicos.	104
8.1. Obtención de penicilinasa a partir de <i>Bacillus cereus</i> .	104
8.2. Valoración cualitativa de antibióticos β -lactámicos. Bioensayo en placa.	105
8.3. Valoración cuantitativa de antibióticos β -lactámicos.	106
8.3.1. Valoración cuantitativa de bioensayo en placa.	106
8.3.2. Detección y valoración de penicilinas por HPLC.	108
8.3.2.1. Preparación de muestras y tampones.	111
8.3.2.2. Bencilpenicilina.	111
9. Derivatización de las muestras con el compuesto FMOC.	
Condiciones cromatográficas.	113
9.1. Derivatización con cloruro de benzoilo para identificación de poliaminas.	
Condiciones cromatográficas.	115
10. Cromatografía en capa fina.	116
11. Cromatografía en columna.	118
11.1. Cromatografía de adsorción: columna de carbón activo.	119
11.2. Cromatografía de intercambio iónico.	120
11.3. Cromatografía de hidrofobicidad: columna de resina Phenyl sepharose 6 fast flow.	121
11.4. Cromatografía de gel filtración: columna Sephadex G10.	121
12. Resonancia magnética.	122

13. Microscopía láser confocal.	123
13.1. Preparación de las muestras y tinción de las vacuolas.	123
14. Microscopía electrónica de barrido (SEM).	124
15. Análisis proteómico.	125
15.1. Microorganismo utilizado y condiciones de cultivo para el análisis proteómico.	125
15.2. Preparación de las muestras y extracción proteica.	126
15.3. Isoelectroenfoque (primera dimensión) y electroforesis en geles de poliacrilamida (segunda dimensión).	127
15.4. Análisis de los geles bidimensionales.	128
15.5. Identificación proteica mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF y MS/MS en tándem).	129
III. RESULTADOS.	131
CAPÍTULO 1.	133
PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS INDUCTORAS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE BIOSÍNTESIS DE PENICILINA EN <i>P. chrysogenum</i>.	
1. Introducción.	133
Objetivos del Capítulo 1.	134
1. Búsqueda inicial de moléculas inductoras de la biosíntesis de penicilinas en <i>P. chrysogenum</i>.	135
1.1. Diseño de un método para el análisis de compuestos que inducen la producción de penicilina en <i>P. chrysogenum</i> .	139
1.2. Análisis de compuestos que actúan como hormonas en otros microorganismos diferentes a <i>P. chrysogenum</i> .	140
1.3. Análisis de aminoácidos.	141
1.4. Análisis del efecto inductor de caldos obtenidos en fermentaciones.	144
1.5. Análisis de la estimulación de la producción en medio líquido.	147

1.5.1. Estudio de la cinética de producción de penicilina en matraz.	148
1.6. Estudios de la expresión de los genes de biosíntesis de penicilina <i>pcbC</i> y <i>penDE</i> .	151
1.7. Estudio de la expresión génica del gen <i>pcbAB</i> empleando genes reporteros. Análisis de la actividad β -galactosidasa.	155
1.8. Efecto de la adición del ácido fenilacético (cadena lateral precursora de bencilpenicilina) con respecto a la adición del compuesto inductor en el medio de fermentación.	156
1.8.1. Efecto sobre la producción en medio sólido.	156
1.8.2. Efecto sobre la producción en medio líquido.	157
2. Proceso de obtención, recolección y purificación del caldo de cultivo de la cepa <i>A. chrysogenum</i> N-2.	160
2.1. Desproteínización del caldo filtrado.	161
2.2. Extracción con un solvente orgánico.	162
2.3. Cromatografía de adsorción. Tratamiento con carbón activo.	164
2.4. Cromatografía de intercambio iónico.	165
2.5. Cromatografía de hidrofobicidad.	168
2.6. Cromatografía de gel filtración: columna Sephadex G10.	168
2.7. Purificación mediante cromatografía de alta eficacia (HPLC).	169
2.8. Identificación y caracterización completa de la fracción 1 mediante técnicas espectroscópicas.	171
2.9. Identificación de poliaminas en los caldos utilizados mediante HPLC.	174
CAPÍTULO 2.	177
EFFECTO DE LAS POLIAMINAS SOBRE EL METABOLISMO PRIMARIO Y SECUNDARIO DE <i>P. chrysogenum</i>.	
Objetivos Capítulo 2.	177
1. Efecto de la adición de los compuestos purificados en el Capítulo 1 sobre la	

producción de penicilina.	178
1.1. Efecto de la adición de 1,3-diaminopropano sobre la producción de penicilina en <i>P. chrysogenum</i> .	178
1.2. Efecto de la adición de bis-tris-propano sobre la producción de penicilina en <i>P. chrysogenum</i> .	181
1.3. Efecto de la adición del ácido aspártico (sal sódica) sobre la producción de penicilina en <i>P. chrysogenum</i> .	183
1.4. Efecto de la adición conjunta de 1,3-diaminopropano y ácido aspártico (sal sódica) sobre la producción de penicilina en <i>P. chrysogenum</i> .	185
1.5. Efecto de la adición de 1,3-diaminopropano y otras poliaminas (putrescina y espermidina) sobre la producción de penicilina en <i>P. chrysogenum</i> .	188
2. Efecto de las poliaminas sobre el nivel de expresión de los genes de biosíntesis de penicilina en <i>P. chrysogenum</i>.	191
2.1. Análisis de la expresión del gen <i>pcbAB</i> .	192
2.2. Análisis de la expresión del gen <i>pcbC</i> .	194
2.3. Análisis de la expresión del gen <i>penDE</i> .	196
2.4. Análisis de la expresión del gen <i>laeA</i> .	198
2.5. Análisis de la expresión del gen <i>pacC</i> .	201
3. Efecto de las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina sobre la diferenciación morfológica y la esporulación.	203
3.1. Efecto de las poliaminas. Incremento en la formación de vacuolas.	203
3.2. Efecto de las poliaminas sobre la pigmentación y la esporulación.	205
4. Efecto de las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina sobre la producción de penicilina en fermentaciones realizadas a escala semi-industrial en Planta Piloto de Fermentación.	209
4.1. Efecto de las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina en medio definido.	210

4.2. Efecto de las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina en medio complejo.	215
5. Efecto de las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina sobre la producción de otros metabolitos secundarios en <i>P. chrysogenum</i>.	221
CAPÍTULO 3	223
EFFECTO DE LAS POLIAMINAS SOBRE EL PROTEOMA DE <i>P. chrysogenum</i>.	
Objetivos Capítulo 3.	223
1. Efecto de la poliamina 1,3-diaminopropano sobre el proteoma intracelular de <i>P. chrysogenum</i>.	224
1.1. Metabolismo y energía.	227
1.2. Proteínas de rutas de información.	229
1.3. Transporte celular y rutas de transporte.	230
1.4. Proteínas de respuesta a estímulos.	230
1.5. Proteínas de los procesos del desarrollo fúngico.	231
1.6. Otras proteínas.	231
2. Efecto de la poliamina espermidina sobre el proteoma intracelular de <i>P. chrysogenum</i>.	232
2.1. Metabolismo y energía.	235
2.2. Proteínas de rutas de información.	238
2.3. Proteínas de respuesta a estímulos.	239
2.4. Proteínas de los procesos del desarrollo fúngico.	240
2.5. Otras proteínas.	240
IV. DISCUSIÓN GENERAL.	241
CAPÍTULO 1.	243
1. Búsqueda inicial de moléculas inductoras en <i>P. chrysogenum</i>.	243

2. Desarrollo de un método de purificación del compuesto inductor.	246
CAPÍTULO 2.	247
1. Influencia de la suplementación de los medios de cultivo con poliaminas en la producción de penicilina.	247
2. Interacciones moleculares de las poliaminas con los ácidos nucleicos.	249
3. Metabolismo de las poliaminas.	253
4. Ruta de retroconversión.	255
5. Transporte de poliaminas al interior celular y localización subcelular.	256
CAPÍTULO 3.	258
1. Análisis proteómico en <i>P. chrysogenum</i> .	258
V. CONCLUSIONES.	265
VI. BIBLIOGRAFÍA.	269
VII. ANEXOS.	305

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

- Figura 1.1:** Placa original de *S. aureus* (en la zona intermedia e inferior de la placa) contaminada con una colonia de *Penicillium notatum* (en la zona superior de la placa) donde se puede comprobar la zona de inhibición observada por Fleming. 4
- Figura 1.2:** Imagen microscópica de los conidióforos en forma de pincel de *P. notatum*. 4
- Figura 1.3:** Uno de los matraces del trabajo en el laboratorio de Florey donde puede observarse el precipitado seco que contiene penicilina. 5
- Figura 1.4:** Fleming, Chain y Florey recibieron el premio Nobel de Medicina y Fisiología en Diciembre de 1945. 6
- Figura 1.5:** Andrew J. Moyer diseñando un medio de cultivo adecuado para el hongo. 7
- Figura 1.6:** Molécula de penicilina en el centro activo de la enzima transpeptidasa del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias. 8
- Figura 1.7:** Estructura química general de penicilinas y cefalosporinas. 9
- Figura 1.8:** Hongo productor de penicilina *P. chrysogenum* (en la parte izquierda se pueden observar las esporas mediante microscopía electrónica de barrido y en la derecha las hifas mediante microscopía confocal). 13
- Figura 1.9:** Ruta de biosíntesis de penicilina y cefalosporina por los hongos *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* respectivamente. 16
- Figura 1.10:** Agrupación de genes de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos en “clusters” en hongos filamentosos. 21
- Figura 1.11:** Orden de ensamblaje de los factores de transcripción al promotor eucariota. 24
- Figura 1.12:** El motivo de dedo de zinc Cys2-His2, que consiste en una hélice alfa y una lámina beta antiparalela. El ión de zinc (verde) está coordinado por dos cisteínas y dos histidinas. 26
- Figura 1.13:** Cremallera de leucina, (azul) unida al ADN. Los residuos de leucina están indicados en rojo. 27

Figura 1.14: Circuitos reguladores que controlan la expresión de los genes *pcbAB* y *pcbC* desde el promotor bidireccional y regulación del gen *penDE* desde su propio promotor en *P. chrysogenum* y *A. nidulans*. La inducción de la expresión génica se indica por flechas negras con un signo positivo (+) y la represión de la expresión génica se indica por flechas rojas con un signo (-). La intensidad de la inducción o represión se muestra con el número de signos (+) o signos (-). El inicio de la transcripción de los genes se indica con línea continua. 31

Figura 1.15: Esquema donde se muestra: la localización de las cajas TATA y CCAAT, las secuencias consenso de los reguladores transcripcionales PacC, CreA y NRE, las regiones correspondientes a las cajas A y B, que están sombreadas y se indica la unión del activador transcripcional PTA1 a la caja A y la transcripción de los genes *pcbAB* y *pcbC*, que están indicadas por líneas onduladas bajo el mapa de restricción (Kosalková y col., 2000). 38

Figura 1.16: Compartimentalización de la ruta biosintética de penicilina. Representación esquemática mostrando los pasos enzimáticos y los orgánulos involucrados en la ruta biosintética de penicilina. (1) ACV sintetasa. (2) IPN sintasa. (3) IPN aciltransferasa. (4) fenilacetil-CoA (aryl-CoA) ligasa. PAA-CoA, (fenilacetil-CoA). α AA, (L- α -aminoadípico). Cys, (L-cisteína). Val, (L-valina). PAA, (ácido fenilacético). PenG, (bencilpenicilina). 47

CAPÍTULO 1.

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS INDUCTORAS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE BIOSÍNTESIS DE PENICILINA EN *P. chrysogenum*.

Figura 3.1.1: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido de las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con diferentes volúmenes de los sobrenadantes obtenidos en la incubación de la concentración de esporas igual a 10^4 esporas/ml. 137

Figura 3.1.2: Cinética de producción de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y de los cultivos suplementados con diferentes volúmenes de los sobrenadantes obtenidos en la incubación de la concentración de esporas igual a 10^4 esporas/ml. 138

Figura 3.1.3: Cinética de producción específica de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y de los cultivos suplementados con diferentes volúmenes de los sobrenadantes obtenidos en la incubación de la concentración de esporas igual a 10^4 esporas/ml. 138

Figura 3.1.4: Clones de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Bioensayo en placa positivo donde se observa un mayor halo de inhibición del crecimiento del microorganismo sensible (*B. subtilis*) en la colonia de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 donde se había añadido un compuesto potencialmente inductor de la biosíntesis de penicilina con respecto al control. El compuesto potencialmente inductor se añadió a un pocillo practicado junto a la colonia formada por el hongo. 140

Figura 3.1.5: Clones de *P. chrysogenum* NRRL-1951. Bioensayo en placa positivo donde se observa un halo de inhibición del crecimiento del microorganismo sensible (*B. subtilis*) en la colonia de *P. chrysogenum* NRRL-1951 donde se había añadido un compuesto potencialmente inductor de la biosíntesis de penicilina con respecto al control. El compuesto potencialmente inductor se añadió a un pocillo practicado junto a la colonia formada por el hongo. 140

Figura 3.1.6: **A.** Bioensayo realizado con el compuesto γ -butirolactona a diferentes concentraciones. En todos los casos analizados el resultado fue negativo. Las colonias son de la cepa *P. chrysogenum* NRRL-1951. **B.** Bioensayo realizado con el compuesto ácido jasmónico a diferentes concentraciones. Las colonias son de la cepa *P. chrysogenum* NRRL-1951. No se obtuvo ningún halo de inhibición como en el caso anterior. 141

Figura 3.1.7: Resultado negativo de los compuestos analizados por bioensayo en placa. Las colonias fueron suplementadas con los aminoácidos glicina (G) y cisteína (C) a diferentes concentraciones. En la zona central las colonias fueron suplementadas con ACV-monomérico (ACV-m) y ACV-dimérico (ACV-d). Las colonias son de la cepa *P. chrysogenum* NRRL-1951. 142

Figura 3.1.8: **A.** Halos de inhibición positivos utilizando caldos recogidos de fermentaciones. AC (caldo de *A. chrysogenum*). AC x 2 (caldo de *A. chrysogenum* concentrado 2 veces). AC x 6 (caldo de *A. chrysogenum* concentrado 6 veces). Lev (caldo de *C. utilis*). Lev x 2 (caldo de *C. utilis* concentrado 2 veces). Los controles se realizaron añadiendo agua destilada estéril a los pocillos practicados junto a las colonias. **B.** Halos de inhibición positivos utilizando caldos recogidos de fermentaciones de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 concentrado 10 veces y tratado con una enzima betalactamasa para desactivar la penicilina previo al desarrollo del bioensayo y caldo de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 npe10 concentrado 10 veces. Los controles se realizaron añadiendo agua destilada estéril a los pocillos practicados junto a las colonias. 146

Figura 3.1.9: TLC donde se muestra un patrón de **ACV** de concentración 1 mg/ml comparado con el caldo de *A. chrysogenum* cepa N-2 a distintas concentraciones (sin diluir y diluido 1/10 y 1/100). Las condiciones del TLC se recogen en el apartado 10 de Materiales y Métodos. 147

Figura 3.1.10: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido en las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con caldo AC, inoculados ambos con la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. 149

Figura 3.1.11: Cinética de producción de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y de los cultivos suplementados con caldo AC, inoculados ambos con la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. 150

Figura 3.1.12: Cinética de producción específica de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y de los cultivos suplementados con caldo AC, inoculados ambos con la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. 150

Figura 3.1.13: A. Análisis mediante transferencia de *Northern* de los niveles de expresión del gen *pcbC* en los micelios extraídos de los controles y de los matraces con el caldo inductor AC. Como control se empleó el transcrito del gen de la β -actina. Carril 1; control a las 24 h. Carril 2; AC a las 24 h. Carril 3; control a las 48 h. Carril 4; AC a las 48 h. Carril 5; control a las 72 h. Carril 6; AC a las 72 h. Carril 7; control a las 96 h. Carril 8; AC a las 96 h. **B.** Cuantificación de la intensidad (en cpm) de las bandas de hibridación del gen *pcbC* con respecto al gen de la β -actina mediante el uso de un escáner electrónico de autorradiogramas (Instant Imager, Packard). 152

Figura 3.1.14: A. Análisis mediante transferencia de *Northern* donde se muestran los niveles de expresión de los genes *pcbC* y *penDE* en los micelios extraídos de los matraces con el caldo inductor y de los controles. Como control se empleó el transcrito del gen de la β -actina. Carril 1; AC añadido a las 0 h de fermentación. Carril 2; Control a las 0 h de fermentación. Carril 3; AC añadido a las 12 h de fermentación. Carril 4; Control a las 12 h de fermentación. Carril 5; AC añadido a las 24 h de fermentación. Carril 6; Control a las 24 h de fermentación. **B.** Cuantificación de la intensidad (en cpm) de las bandas de hibridación de los genes *pcbC* y *penDE* con respecto al gen de la β -actina mediante el uso de un escáner electrónico de autorradiogramas (Instant Imager, Packard). 154

Figura 3.1.15: Valoración de la actividad β -galactosidasa del transformante pDEL0. Los extractos celulares se obtuvieron a las 30 h y 60 h de fermentación. Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. 156

Figura 3.1.16: Bioensayo frente a *B. subtilis* empleando medios de cultivo sin AFA, con AFA a diferentes concentraciones y añadiendo en todos los casos el compuesto inductor a una de las colonias. 157

Figura 3.1.17: Bioensayo frente a *M. luteus* de caldos de fermentación obtenidos a diferentes tiempos.

20 horas de fermentación:

- 1 (+AFA/+inductor).
- 2 (-AFA/-inductor).
- 3 (-AFA/+inductor).
- 4 (+AFA/-inductor).

40 horas de fermentación:

- 5 (+AFA/-inductor). 159
- 6 (-AFA/-inductor).
- 7 (+AFA/+inductor).
- 8 (-AFA/+inductor). 159

Figura 3.1.18: Cromatograma correspondiente a las muestras recogidas a las 40 horas de fermentación. Las condiciones cromatográficas para valoración de bencilpenicilina (pen G) son las del apartado 8.3.2 Tabla 2.4 de Materiales y Métodos. 160

Figura 3.1.19: Cromatograma del caldo de cultivo de *A. chrysogenum* N-2 (72 h). Absorbancia a 214 nm. Método cromatográfico descrito en el apartado 9 de Materiales y Métodos Tabla 2.5. 161

Figura 3.1.20: **A.** Cromatograma del caldo de cultivo después de realizar la extracción con acetato de etilo (fase orgánica). **B.** Cromatograma del caldo de cultivo después de realizar la extracción con acetato de etilo (fase acuosa). Método cromatográfico descrito en el apartado 9 de Materiales y Métodos, Tabla 2.5. 163

Figura 3.1.21: Bioensayo en placa con las fracciones acuosa y orgánica obtenidas en el proceso de extracción. Como control se añadió agua milliQ. La cepa utilizada para la realización del bioensayo fue *P. chrysogenum* NRRL-1951. 163

Figura 3.1.22: Clarificado de la muestra a medida que avanza el proceso de purificación. Tubo número 1, muestra inicial del caldo concentrado. Tubo número 2, muestra fase acuosa después del proceso de extracción con acetato de etilo. Tubo número 3, muestra después del tratamiento con carbón activo. 164

Figura 3.1.23: Bioensayo de las fracciones eluidas de la columna de intercambio catiónico. 167

Figura 3.1.24: Análisis de las fracciones 36-50 en HPLC analítico. Las muestras se derivatizaron con FMOC. Método cromatográfico descrito en el apartado 9 de Materiales y Métodos. Absorbancia a 250 nm. 167

Figura 3.1.25: Bioensayo de la fracción no retenida y de las fracciones eluidas de la columna de hidrofobicidad. 168

Figura 3.1.26: **A.** Bioensayo de las fracciones recogidas de la columna de gel filtración G10. **B.** Clarificado de la muestra a medida que avanza el proceso de purificación. Tubo número 1, muestra inicial del caldo concentrado. Tubo número 2, muestra fase acuosa después del proceso de extracción con acetato de etilo. Tubo número 3, muestra después del tratamiento con carbón activo. Tubo número 4, muestra después del tratamiento columna G10. 169

Figura 3.1.27: **A.** Cromatograma de la purificación (250 nm) de la fracción bioactiva de la columna Sephadex G10 mediante HPLC analítico. **B.** Bioensayo en placa de las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5 recogidas de los picos cromatográficos en HPLC. 170

Figura 3.1.28: A. Espectros de masas de los HPLC-masas de la fracción número 1 recolectada del HPLC. El espectro de masas muestra una señal mayoritaria que se corresponde a un producto de m/z 75.1 (M+H)⁺, (1,3-diaminopropano). 171

Figura 3.1.28: B. Espectros de masas de los HPLC-masas de la fracción número 1 recolectada del HPLC. El espectro de masas muestra varias señales; la mayoritaria se corresponde a un producto de m/z 178.1 (M+H)⁺ que se corresponde con el aspartato sódico. La señal de m/z 200.0 (M+H)⁺ se corresponde con la sal disódica del mismo compuesto. 172

Figura 3.1.29: A. Cromatograma de la fracción 1 purificada, la cual presenta el mismo tiempo de retención que el compuesto puro 1,3-diaminopropano. 174

Figura 3.1.29: B. Cromatograma de la fracción acuosa del caldo de fermentación de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 donde se pueden observar los picos que coinciden con los patrones de putrescina y espermidina. 175

Figura 3.1.30: A. Cromatograma del caldo de la cepa *P. chrysogenum* npe10 donde se observan dos picos que coinciden con los patrones de 1,3-diaminopropano y espermidina. 175

Figura 3.1.30: B. Cromatograma del caldo de la cepa *C. utilis* donde se observa un pico que coincide con el patrón de espermidina. 176

Figura 3.1.31: Cromatograma de la fracción orgánica del caldo que sirvió de base para la purificación del compuesto inductor y donde se puede observar la no coincidencia de picos cromatográficos en los mismos tiempos de retención que los patrones de las poliaminas. 176

CAPÍTULO 2.

EFFECTO DE LAS POLIAMINAS SOBRE EL METABOLISMO PRIMARIO Y SECUNDARIO DE *P. chrysogenum*.

Figura 3.2.1: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido de las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con 1,3-diaminopropano a diferentes concentraciones. 179

Figura 3.2.2: Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y los cultivos suplementados con 1,3-diaminopropano a diferentes concentraciones. 180

Figura 3.2.3: Cinética de producción específica de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y de los cultivos suplementados con 1,3-diaminopropano a diferentes concentraciones. 180

Figura 3.2.4: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido de las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con 5 mM de bis-tris-propano (BTP) o 5 mM de TRIS. 182

Figura 3.2.5: Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y los cultivos suplementados con 5 mM de bis-tris-propano (BTP) o 5 mM de TRIS. 182

Figura 3.2.6: Cinética de producción específica de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y de los cultivos suplementados con 5 mM de bis-tris-propano (BTP) o 5 mM de TRIS. 183

Figura 3.2.7: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido de las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con ácido aspártico. 184

Figura 3.2.8: Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina de los controles y los cultivos, en medio definido de producción, suplementados con ácido aspártico a diferentes concentraciones. 184

Figura 3.2.9: Cinética de producción específica de bencilpenicilina de los controles y de los cultivos, en medio definido de producción, suplementados con ácido aspártico a diferentes concentraciones. 185

Figura 3.2.10: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido de las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con 1,3-diaminopropano (DP) y con 1,3-diaminopropano más ácido aspártico (Dp+Asp). 186

Figura 3.2.11: Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina de los controles y los cultivos, en medio definido de producción, suplementados con 1,3-diaminopropano (DP) y con 1,3-diaminopropano más ácido aspártico (Dp+Asp). 187

Figura 3.2.12: Cinética de producción específica de bencilpenicilina de los controles y de los cultivos en medio definido de producción suplementados con 1,3-diaminopropano (DP) y con 1,3-diaminopropano más ácido aspártico (Dp+Asp). 187

Figura 3.2.13: A. Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido de las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con Putrescina, 1,3-diaminopropano (1,3-Dp) y Espermidina. 189

Figura 3.2.13: B. Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina de los controles y de los cultivos en medio definido de producción suplementados con 1,3-diaminopropano (1,3-Dp), Putrescina y Espermidina. 189

Figura 3.2.13: C. Cromatogramas de la valoración de bencilpenicilina (PG) por HPLC a las 48 horas de fermentación. **Cromatograma superior:** Comparación del control (PG Control) con cultivos crecidos con Espermidina (PG E). **Cromatograma central:** Comparación del control (PG Control) con cultivos crecidos con 1,3-diaminopropano (PG D). **Cromatograma inferior:**

Comparación del control (PG Control) con cultivos crecidos con Putrescina (PG P). Las condiciones cromatográficas se detallan en la Tabla 2.4 de Materiales y Métodos. 190

Figura 3.2.13: D. Cinética de producción específica de bencilpenicilina de los controles y de los cultivos, en medio definido de producción, suplementados con 1,3-diaminopropano (1,3-Dp), Putrescina y Espermidina. 191

Figura 3.2.14: A. Resultado del experimento de RT-PCR donde se muestra el nivel de transcripción del gen *pcbAB* (panel superior) y del gen de la β -actina (panel inferior) a las 48 y 72 horas de fermentación en los cultivos control (c) y en los cultivos a los que se añadieron 1,3-diaminopropano (dp), espermidina (e) o putrescina (p). **B.** El nivel de expresión génica fue normalizado comparando la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen *pcbAB* con la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen de la β -actina. 194

Figura 3.2.15: A. Resultado del experimento de RT-PCR donde se muestra el nivel de transcripción del gen *pcbC* (panel superior) y del gen de la β -actina (panel inferior) a las 48 y 72 horas de fermentación en los cultivos control (c) y en los cultivos a los que se añadieron 1,3-diaminopropano (dp), espermidina (e) o putrescina (p). **B.** El nivel de expresión génica fue normalizado comparando la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen *pcbC* con la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen de la β -actina. 196

Figura 3.2.16: A. Resultado del experimento de RT-PCR donde se muestra el nivel de transcripción del gen *penDE* (panel superior) y del gen de la β -actina (panel inferior) a las 48 y 72 horas de fermentación en los cultivos control (c) y en los cultivos a los que se añadieron 1,3-diaminopropano (dp), espermidina (e) o putrescina (p). **B.** El nivel de expresión génica fue normalizado comparando la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen *penDE* con la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen de la β -actina. 198

Figura 3.2.17: A. Resultado del experimento de RT-PCR donde se muestra el nivel de transcripción del gen *laeA* (panel superior) y del gen de la β -actina (panel inferior) a las 48 y 72 horas de fermentación en los cultivos control (c) y en los cultivos a los que se añadieron 1,3-diaminopropano (dp), espermidina (e) o putrescina (p). **B.** El nivel de expresión génica fue normalizado comparando la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen *laeA* con la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen de la β -actina. 200

Figura 3.2.18: A. Resultado del experimento de RT-PCR donde se muestra el nivel de transcripción del gen *pacC* (panel superior) y del gen de la β -actina (panel inferior) a las 48 y 72 horas de fermentación en los cultivos control (c) y en los cultivos a los que se añadieron 1,3-diaminopropano (dp), espermidina (e) o putrescina (p). **B.** El nivel de expresión génica fue normalizado comparando la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen *pacC* con la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen de la β -actina. 202

Figura 3.2.19: Imágenes correspondientes a microscopía óptica confocal. **A.** Fotografía correspondiente al caldo de cultivo suplementado con la poliamina 1,3-diaminopropano, después de 24 horas de cultivo. **B.** Fotografía correspondiente al caldo control después de 24

horas de cultivo. **C.** Fotografía correspondiente al caldo de cultivo suplementado con la poliamina 1,3-diaminopropano, después de 48 horas de cultivo. **D.** Fotografía correspondiente al caldo control después de 48 horas de cultivo. Las preparaciones de las muestras para la microscopía confocal se realizaron según el apartado 13 de Materiales y Métodos. 204

Figura 3.2.20: Imágenes correspondientes a microscopía óptica confocal de cultivos tratados con 1,3-diaminopropano. **A.** Tinciones de las membranas vacuolares utilizando el fluoróforo FM 4-64. **B.** Misma imagen combinada de las hifas (contraste de fases) y de la tinción. 205

Figura 3.2.21: **A.** Placa control de *P. chrysogenum* sembrado en medio Czapek. **B.** Placa de *P. chrysogenum* sembrado en medio Czapek suplementado con 5 mM de 1,3-diaminopropano. 206

Figura 3.2.22: **A.** Placa control de *P. chrysogenum* sembrado en medio Power después de 4 días de incubación. **B.** Placa de *P. chrysogenum* sembrado en medio Power suplementado con 5 mM de 1,3-diaminopropano después de 4 días de incubación. 207

Figura 3.2.23: **A.** Fotografía de microscopía de campo claro (200x) con esporas procedentes de una placa control de medio Power. **B.** Fotografía de microscopía de campo claro (200x) con esporas procedentes de una placa de medio Power suplementada con 1,3-diaminopropano (5 mM). Las fotografías fueron realizadas con el sistema de Microscopio modelo BX60 Olympus Corporation con sistema automático para fotomicrografía PM20. 207

Figura 3.2.24: Figuras **A** y **C.** Fotografías de microscopía electrónica de barrido (650x) con esporas procedentes de diferentes placas control de medio Power. Figuras **B** y **D.** Fotografías de microscopía electrónica de barrido (650x) con esporas procedentes de diferentes placas de medio Power suplementadas con 1,3-diaminopropano 5 mM. Las imágenes fueron obtenidas con el sistema de Microscopio Electrónico de Barrido JEOL 6100 (Apartado 14 de Materiales y Métodos). 208

Figura 3.2.25: **A.** Fotografía de microscopía electrónica de barrido (12000x) con esporas procedentes de una placa control de medio Power. **B.** Fotografía de microscopía electrónica de barrido (15000x) con esporas procedentes de una placa de medio Power suplementada con 1,3-diaminopropano (5 mM). Las fotografías fueron realizadas con el sistema de Microscopio Electrónico de Barrido JEOL 6100. (Apartado 14 de Materiales y Métodos). 209

Figura 3.2.26: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido en medio definido de producción a partir de las fermentaciones control y de las suplementadas con poliaminas. 211

Figura 3.2.27: Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina, en medio definido de producción, de las fermentaciones control y de las fermentaciones suplementadas con las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina. La gráfica inferior corresponde a la producción a las 24 horas (con un cambio de escala del eje de las ordenadas para facilitar su visualización). 213

Figura 3.2.28: Cromatograma de la valoración de bencilpenicilina (PG) por HPLC a las 48 horas de fermentación. Comparación entre el control (C) y las fermentaciones suplementadas con 1,3-diaminopropano (D) y espermidina (E). Las condiciones cromatográficas se detallan en la Tabla 2.4, apartado 8 de Materiales y Métodos. 214

Figura 3.2.29: Producción específica de bencilpenicilina de las fermentaciones control y de las fermentaciones suplementadas con las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina. La gráfica inferior corresponde a la producción a las 24 horas (con un cambio de escala del eje de las ordenadas para facilitar su visualización). 215

Figura 3.2.30: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido en medio complejo de producción a partir de las fermentaciones control y de las suplementadas con poliaminas. 216

Figura 3.2.31: Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina en medio definido de producción de las fermentaciones control y de las fermentaciones suplementadas con las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina. La gráfica inferior corresponde a la producción a las 24 horas (con un cambio de escala del eje de las ordenadas para facilitar su visualización). 218

Figura 3.2.32: Cromatograma de la valoración de bencilpenicilina (PG) por HPLC a las 48 horas de fermentación. Comparación entre el control (C) y las fermentaciones suplementadas con 1,3-diaminopropano (D) y espermidina (E). Las condiciones cromatográficas se detallan en la Tabla 2.4, apartado 8 de Materiales y Métodos. 219

Figura 3.2.33: Producción específica de bencilpenicilina de las fermentaciones control y de las fermentaciones suplementadas con las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina. La gráfica inferior corresponde a la producción a las 24 horas (con un cambio de escala del eje de las ordenadas para facilitar su visualización). 220

Figura 3.2.34: A. Análisis mediante HPLC de los metabolitos secretados procedentes de la fracción acuosa obtenida de muestras extraídas a las 48 horas de fermentación. Las flechas indican las diferencias entre los distintos caldos. **B.** Análisis mediante HPLC de los metabolitos secretados procedentes de la fracción acuosa obtenida de muestras extraídas a las 72 horas de fermentación. Las flechas indican las diferencias entre los distintos caldos. 222

Figura 3.2.35: A. Análisis mediante HPLC de los metabolitos secretados procedentes de la fracción orgánica obtenida de muestras extraídas a las 48 horas de fermentación. Las flechas indican las diferencias entre los distintos caldos. **B.** Análisis mediante HPLC de los metabolitos secretados procedentes de la fracción orgánica obtenida de muestras extraídas a las 72 horas. Las flechas indican las diferencias entre los distintos caldos. 222

CAPÍTULO 3.

EFFECTO DE LAS POLIAMINAS SOBRE EL PROTEOMA DE *P. chrysogenum*.

Figura 3.3.1: Comparación de los proteomas intracelulares de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con y sin la adición de 1,3-diaminopropano. Geles 2-DE de los proteomas intracelulares de la cepa Wisconsin 54-1255 crecida durante 40 horas en ausencia (control) o presencia del compuesto 1,3-diaminopropano. Las proteínas se separaron mediante 2-DE usando tiras IPG de 18-cm (pH 3-10 NL) y geles de SDS-PAGE del 12.5 % y se tiñeron con Coomassie coloidal siguiendo el método de tinción “Blue Silver”. Las manchas cuya intensidad se vio disminuida tras la adición de esta poliamina se designaron como “Cd”, mientras que aquellas manchas cuya intensidad aumentó tras añadir el 1,3-diaminopropano, se identificaron como “Dc”. A todas las manchas se les añadió un número identificativo, que se corresponde con el mostrado en las Tablas 3.3.1. y 3.3.2. 225

Figura 3.3.2: Imagen aumentada de las manchas cuya intensidad se vio modificada tras la adición de 1,3-diaminopropano. Los fragmentos de los geles mostrados en la Figura 3.3.1 se amplificaron para una mejor observación de las diferencias. Las manchas cuya intensidad se vio disminuida tras la adición de esta poliamina se designaron como “Cd”, mientras que aquellas manchas cuya intensidad aumentó tras añadir 1,3-diaminopropano, se identificaron como “Dc”. A todas las manchas se les añadió un número identificativo, que se corresponde con el mostrado en las Tablas 3.3.1. y 3.3.2. 226

Figura 3.3.3: Comparación de los proteomas intracelulares de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con y sin la adición de espermidina. Geles 2-DE de los proteomas intracelulares de la cepa Wisconsin 54-1255 crecida durante 40 horas en ausencia (control) o presencia de espermidina. Las proteínas se separaron mediante 2-DE usando tiras IPG de 18-cm (pH 3-10 NL) y geles de SDS-PAGE del 12.5 % y se tiñeron con Coomassie coloidal siguiendo el método de tinción “Blue Silver”. Las manchas cuya intensidad se vio disminuida tras la adición de esta poliamina se designaron como “Cs”, mientras que aquellas manchas cuya intensidad aumentó tras añadir espermidina, se identificaron como “Sc”. A todas las manchas se les añadió un número identificativo, que se corresponde con el mostrado en las Tablas 3.3.3. y 3.3.4. 233

Figura 3.3.4: Imagen aumentada de las manchas cuya intensidad se vio modificada tras la adición de espermidina. Los fragmentos de los geles mostrados en la Figura 3.3.3 se aumentaron para una mejor observación de las diferencias. Las manchas cuya intensidad se

vio disminuida tras la adición de esta poliamina se designaron como “Cs”, mientras que aquellas manchas cuya intensidad aumentó tras añadir espermidina, se identificaron como “Sc”. A todas las manchas se les añadió un número identificativo, que se corresponde con el mostrado en las Tablas 3.3.3. y 3.3.4. 234

Figura 3.3.5: Imagen aumentada de las regiones de los geles 2-DE donde se encuentra la IAT. Los fragmentos de los geles mostrados en las Figura 3.3.1 y 3.3.3 donde se encuentra la IAT se agrandaron para ver mejor la aparición de una nueva isoforma de esa proteína tras la adición de 1,3-diaminopropano y espermidina. 235

IV. DISCUSIÓN GENERAL.

Figura 4.1: Estructura química de las poliaminas empleadas en el desarrollo de este trabajo en su forma protonada. **A.** 1,3-Diaminopropano. **B.** Putrescina. **C.** Espermidina. 248

Figura 4.2: Ruta biosintética de las poliaminas. 254

ÍNDICE DE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla 1.1: Clasificación de los antibióticos β -lactámicos según su estructura química.	10
Tabla 1.2: Diversos tipos de penicilinas naturales.	11

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2.1: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Se indica el nombre y la secuencia (5' a 3').	65
Tabla 2.2: Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de fragmentos de ADN de diferentes tamaños.	88
Tabla 2.3: Tiempos y temperaturas de reacción típicos para una reacción de PCR.	100
Tabla 2.4: Método cromatográfico para la detección y cuantificación de bencilpenicilina.	113
Tabla 2.5: Método cromatográfico para el análisis de varios tipos de aminas derivatizadas con FMOC.	114
Tabla 2.6: Método cromatográfico para el análisis de varios tipos de aminas derivatizadas con cloruro de benzoilo.	116

III. RESULTADOS.

CAPÍTULO 1.

Tabla 3.1.1: Aminoácidos analizados en bioensayo en placa.	143
Tabla 3.1.2: Microorganismos utilizados en fermentación en matraz para recoger posteriormente caldos fermentados y realizar bioensayos en placa.	145
Tabla 3.1.3: Serie de matraces con/sin AFA en el medio de cultivo y con/sin compuesto inductor.	158
Tabla 3.1.4: Datos de RMN-H1 y RMN-C13 del compuesto 1,3-diaminopropano en CDCl ₃ con un producto de m/z 75.1 (M+H) ⁺ .	173
Tabla 3.1.5: Datos de RMN-H1 y RMN-C13 del ácido aspártico sal sódica en D ₂ O con un producto de m/z 178.1 (M+H) ⁺ .	173

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1: Ampliación Figura 3.3.1:** Comparación de los proteomas intracelulares de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con y sin la adición de 1,3-diaminopropano. 307
- Anexo 2: Ampliación Figura 3.3.3:** Comparación de los proteomas intracelulares de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con y sin la adición de espermidina. 308
- Anexo 3: Tabla 3.3.1:** Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve aumentada tras la adición del 1,3-diaminopropano. Se indica el número de veces que aumenta la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que sólo se detectan tras la adición del 1,3-diaminopropano se indican como N/A. 309
- Anexo 4: Tabla 3.3.2:** Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve disminuida tras la adición del 1,3-diaminopropano. Se indica el número de veces que disminuye la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que desaparecen tras la adición del 1,3-diaminopropano se indican como N/A. 310
- Anexo 5: Tabla 3.3.3-1ª parte:** Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve aumentada tras la adición de espermidina. Se indica el número de veces que aumenta la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que sólo se detectan tras la adición de espermidina se indican como N/A. 311
- Anexo 5: Tabla 3.3.3-2ª parte:** Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve aumentada tras la adición de espermidina. Se indica el número de veces que aumenta la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que sólo se detectan tras la adición de espermidina se indican como N/A. 312
- Anexo 6: Tabla 3.3.4:** Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve disminuida tras la adición de espermidina. Se indica el número de veces que disminuye la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que desaparecen tras la adición de espermidina se indican como N/A. 313
- Anexo 7: Tabla 3.3.5:** Proteínas comunes cuya síntesis varía tras la adición tanto del 1,3-diaminopropano, como de espermidina. Estas proteínas están ordenadas de acuerdo al nombre de su ORF. 314

ABREVIATURAS

- α -AAA:** ácido α -aminoadípico
7-ACA: ácido 7-aminocefalosporánico
ACV: δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina
ACVS: ACV sintetasa
7-ADCA: ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
ADNasa: desoxirribonucleasa
ADP: adenosida difosfato
AFA: ácido fenilacético
Ap: ampicilina
6-APA: ácido 6-aminopenicilánico
ARN: ácido ribonucleico
ARNasa: ribonucleasa
ARNm: ARN mensajero
ARNr: ARN ribosómico
ARNt: ARN transferente
ATCC: colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection)
ATP: adenosina 5´trifosfato
AU: unidades de absorbancia
- BCIP:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA: seroalbúmina bovina
- °C:** grado centígrado
Ci: curio
CIA: cloroformo-alcohol isoamílico
cm: centímetros
CoA: coenzima A
COSY: COrelated SpectroscopY
CPC: cefalosporina C
cpm: cuentas por minuto
CSL: Líquido de maceración del maíz
- Da:** dalton
DAC: desacetilcefalosporina C
DAOC: desacetoxicefalosporina C

dATP: desoxiadenosina 5´trifosfato
dCTP: desoxicitidina 5´trifosfato
DEPC: dietilpirocarbonato
dGTP: desoxiguanosina 5´trifosfato
DO: densidad óptica
dpm: desintegraciones por minuto
DTT: ditioneitol
dTTP: desoxitimidina 5´trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetracético
EtBr: bromuro de etidio

FMOC-Cl: cloruro de 9-fluoroenilmetil cloroformato

g: gramo

GDP: guanosina difosfato
GMP: guanosina monofosfato
GMPc: GMP cíclico
GTP: guanosina trifosfato

h: horas

HIC: cromatografía de interacción hidrofóbica
HMBC: correlaciones heteronucleares protón-carbono indirecto
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)

IAT: isopenicilina N-acil transferasa
IMP: inosina monofosfato
IPG: gradiente inmovilizado de pH
IPN: isopenicilina N
IPNS: IPN sintasa

kb: kilo pares de bases
KDa: Kilodalton

l: litro

M: molar
mg: miligramo
min: minuto
ml: mililitro
mm: milímetros
mM: milimolar
MOPS: ácido morfolinopropano sulfónico
MS: espectroscopía de masas
m/z: relación entre masa y carga

MW: Peso molecular (molecular weight)

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)

nm: nanómetro

nM: nanomolar

ONPG: orto-nitrofenil-Beta-D-galactopiranosido

ORF: marco de lectura abierto (open reading frame)

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

pb: pares de bases

PBP: Proteínas de unión a penicilina

PCL: fenilacetil-CoA ligasa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol

p ej: por ejemplo

pg: picogramos

POA: ácido fenoxiacético

Pi: fosfato inorgánico

PPi: pirofosfato inorgánico

PTS: señal de localización en peroxisoma (Peroxisomal Targeting Signal)

p/v: relación peso/volumen

Rf: factor de retención o movilidad relativa

RMN: resonancia magnética nuclear

rpm: revoluciones por minuto

RT: tiempo de retención

RT-PCR: retrotranscripción y PCR

SAM: S-adenosilmetionina descarboxilasa

SDS: dodecil-sulfato sódico

SEC: cromatografía de gel filtración

TAE: Tris-acetato-EDT

TBE: Tris-borato-EDTA

TCA: ácido tricloroacético

TE: tampón Tris-EDTA

TF: Factores de transcripción

TLC: cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography)

Tm: Temperatura de fusión

Tris: tris-hidroximetil-aminometano

U: unidades

Abreviaturas

UDP: uridina difosfato

UTP: uridina trifosfato

UV: ultravioleta

V: Voltio

VIS: visible

v/v: relación volumen/volumen

W: Watio

µg: microgramo

µl: microlitro

µm: micrómetro

PRESENTACIÓN

Al descubrimiento de la penicilina a principios del siglo XX, le siguieron muchos años de investigación y mejoras tecnológicas que han hecho de los antibióticos β -lactámicos un modelo de aplicación de la quimioterapia y de su producción a escala industrial por fermentación, uno de los mejores ejemplos del desarrollo tecnológico. La fabricación con éxito y el desarrollo de la penicilina G demostró que los microorganismos podían producir compuestos médicamente útiles y también iniciar la búsqueda de nuevos antibióticos que ha continuado hasta el presente día. Actualmente, el interés por los antibióticos β -lactámicos sigue vigente ya que ocupan un porcentaje muy alto del mercado mundial de antibióticos.

La ruta de biosíntesis de bencilpenicilina (penicilina G) ha sido ampliamente estudiada y está caracterizada tanto a nivel bioquímico como genético. Se han clonado todos los genes involucrados en dicha ruta, se han purificado y caracterizado todas las enzimas que éstos codifican. Parte de las investigaciones actuales se centran en los procesos regulatorios de la ruta de biosíntesis de este antibiótico. Los resultados de los estudios realizados indican que la biosíntesis de penicilina está controlada por reguladores globales del metabolismo secundario más que por un regulador específico, por lo que el objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido la purificación y caracterización de una molécula inductora que actúe a nivel de regulación génica siendo capaz de incrementar la producción de bencilpenicilina en el hongo filamentoso *P. chrysogenum*.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Introducción a los antibióticos β -lactámicos.

El descubrimiento de los antibióticos fue uno de los avances más trascendentales en la historia de la medicina, puesto que con ellos se ha podido hacer frente a las enfermedades infecciosas que han causado la muerte de millones de seres humanos a lo largo de la historia de la humanidad, consiguiendo éstos reducir drásticamente el índice de mortalidad.

Los antibióticos (palabra de origen griego que significa *anti*: contra y *bios*: vida; es decir, inhibidores de la vida de otros seres vivos) pueden definirse como 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 mayoritariamente sintetizados una vez que la densidad del cultivo del microorganismo productor llega a su valor máximo, a su vez coincidiendo con una velocidad específica de crecimiento baja. Por este motivo y en función de que son compuestos no indispensables para la viabilidad del microorganismo productor, los antibióticos son considerados como metabolitos secundarios. La función biológica de estos compuestos, en los microorganismos productores, se atribuye generalmente a que confieren una ventaja ecológica cuando dichos microorganismos deben competir con otros por los nutrientes del medio ambiente (Martín y Demain, 1980).

1.1. Penicilina: descubrimiento y caracterización.

Ya en el siglo XIX algunos investigadores, como Cornil y Babes en 1885, llevaron a cabo experimentos con microorganismos vivos sobre antagonismo microbiano, sugiriendo que existiría un agente inhibidor de naturaleza química producido por uno de los microorganismos que interferiría en el crecimiento del otro. Aunque el año que se suele tomar como punto de partida de la historia de los antibióticos es el de 1928.

En Septiembre de 1928, Alexander Fleming, profesor de bacteriología del St. Mary's Hospital de Londres, estaba intentando aislar la bacteria *Staphylococcus aureus*. Para este propósito creció la bacteria en placas de cultivo y cuando observó éstas después de un periodo corto vacacional, apreció la contaminación de alguna de ellas con un hongo (Figura 1.1). Las placas contaminadas deberían haber sido descartadas; sin embargo, Fleming se dio cuenta de la ausencia de crecimiento de bacterias alrededor de las colonias del hongo que contaminó accidentalmente los cultivos bacterianos.

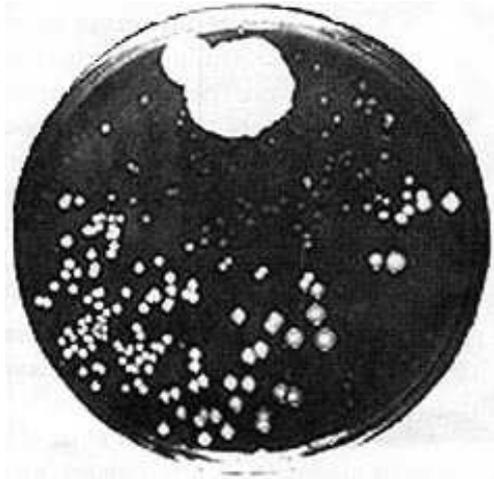


Figura 1.1: Placa original de *S. aureus* (en la zona intermedia e inferior de la placa) contaminada con una colonia de *Penicillium notatum* (en la zona superior de la placa) donde se puede comprobar la zona de inhibición observada por Fleming.

Fleming aisló el hongo y lo identificó viendo que se trataba del género *Penicillium*; por su morfología concluyó que era *Penicillium rubrum* y denominó al compuesto capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias “**penicilina**”. Trató además de concentrar y purificar el antibiótico pero encontró que la penicilina se destruía fácilmente y todos los intentos y propósitos fracasaron. El hallazgo de Fleming fue publicado el 10 de Mayo de 1929 en la *British Journal of Experimental Pathology* (Fleming, 1929). El artículo describe una extensa serie de experimentos donde se establece claramente el potencial de la penicilina como agente terapéutico. El artículo de Fleming describiendo la penicilina no causó mucho interés al principio y el descubrimiento quedó reducido a una mera observación manteniéndose desconocido fuera del círculo científico. Sólo unas pocas publicaciones referentes a la penicilina aparecieron en los siguientes 10 años siendo la más importante la que identificó correctamente el hongo aislado por Fleming como *Penicillium notatum* (Figura 1.2) en lugar de *P. rubrum*. (Clutterbuck y col., 1932).



Figura 1.2: Imagen microscópica de los conidióforos en forma de pincel de *P. notatum*.



Figura 1.3: Uno de los matraces del trabajo en el laboratorio de Florey donde puede observarse el precipitado seco que contiene penicilina.

Un segundo capítulo en la historia de la penicilina comenzó en el año 1938 cuando el médico patólogo australiano Howard Walter Florey y el bioquímico de origen alemán Ernst Boris Chain, junto con Norman Heatley, iniciaron una investigación detallada de las propiedades terapéuticas de la penicilina.

Florey se ocupó de los aspectos biológicos y farmacológicos, Chain se ocupó de las propiedades químicas y bioquímicas y Heatley se ocupó de la producción, de cómo cultivar la mayor cantidad posible del microorganismo para que produjese gran cantidad del principio activo y finalmente, de separarlo del caldo de cultivo y purificarlo (Figura 1.3).

Fruto de este trabajo se consiguió aislar el antibiótico con una pureza aceptable mediante las nuevas técnicas cromatográficas en columna. En Agosto de 1940 se describieron métodos para la producción de la penicilina y la utilización con éxito del antibiótico para curar infecciones en ratones (Chain y col., 1940). El éxito de estos experimentos iniciales permitió tomar la decisión de llevar a cabo el primer ensayo clínico en humanos. En Agosto de 1941 Abraham y colaboradores (1941) describieron en detalle las condiciones ideales para la producción de penicilina en grandes cantidades.

La importancia médica de la penicilina, gracias a los buenos resultados obtenidos, fue comprendida de inmediato. El conflicto de la Segunda Guerra Mundial aceleró las

investigaciones para la mejora del proceso y su producción a escala industrial fue llevada a cabo en los Estados Unidos en el Northern Regional Research Laboratory (NRRL) de Peoria, Illinois en 1941.

El descubrimiento de la penicilina y el desarrollo de un método de producción masiva supuso la concesión del premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 1945 a los científicos Sir Alexander Fleming, Ernst Boris Chain y Sir Howard Walter Florey (Figura 1.4).



Figura 1.4: Fleming, Chain y Florey recibieron el premio Nobel de Medicina y Fisiología en Diciembre de 1945.

Las innovaciones más relevantes en la producción de penicilina a gran escala fueron el aislamiento y selección de nuevas cepas y la optimización del proceso de fermentación, sustituyendo el cultivo en superficie por cultivos sumergidos (Moyer y Coghill, 1946 a; b), la utilización de líquido de maceración de maíz como fuente de nitrógeno y la adición de precursores de la cadena lateral, tales como el ácido fenilacético (Moyer y Coghill, 1947) (Figura 1.5).

El incremento de la producción también fue posible gracias al desarrollo de la tecnología del proceso industrial, introduciendo mejoras como la ingeniería de aireación y el sistema de mezclado en fermentadores. Paralelamente a las investigaciones destinadas a producir penicilina a gran escala, se llevaron a cabo estudios que permitieron determinar la estructura química de la penicilina (Clarke y col., 1949).

El ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) fue detectado en fermentaciones en el año 1957 y aislado en forma pura un año más tarde (Batchelor y col., 1959). Este hallazgo fue el punto de partida para el desarrollo de las penicilinas semisintéticas mediante la incorporación de diferentes cadenas laterales al núcleo de 6-APA por un proceso químico.



Figura 1.5: Andrew J.Moyer diseñando un medio de cultivo adecuado para el hongo.

1.1.1. Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos.

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas que mediante la unión a las enzimas DD-transpeptidasa y DD-carboxipeptidasa, proteínas llamadas “PBP” (Penicillin Binding Proteins) proteínas de unión a penicilina, inhiben de forma específica la síntesis de peptidoglicano, un componente indispensable de la pared celular bacteriana que consta de cadenas de polisacáridos lineales que están entrecruzadas con péptidos cortos.

La penicilina bloquea la última etapa en la síntesis de la pared celular, el entrecruzamiento de las distintas cadenas del peptidoglicano. La penicilina inhibe las enzimas transpeptidasa y carboxipeptidasa, responsables de dicho entrecruzamiento, llegando al centro activo de éstas porque se confunde con el sustrato normal de las enzimas, el compuesto acil-D-alanina-D-alanina, mimetizándolo en la reacción de entrecruzamiento. En la Figura 1.6 se

puede observar cómo la penicilina unida a la enzima transpeptidasa, forma un enlace covalente con un residuo de serina en el centro activo de ésta.

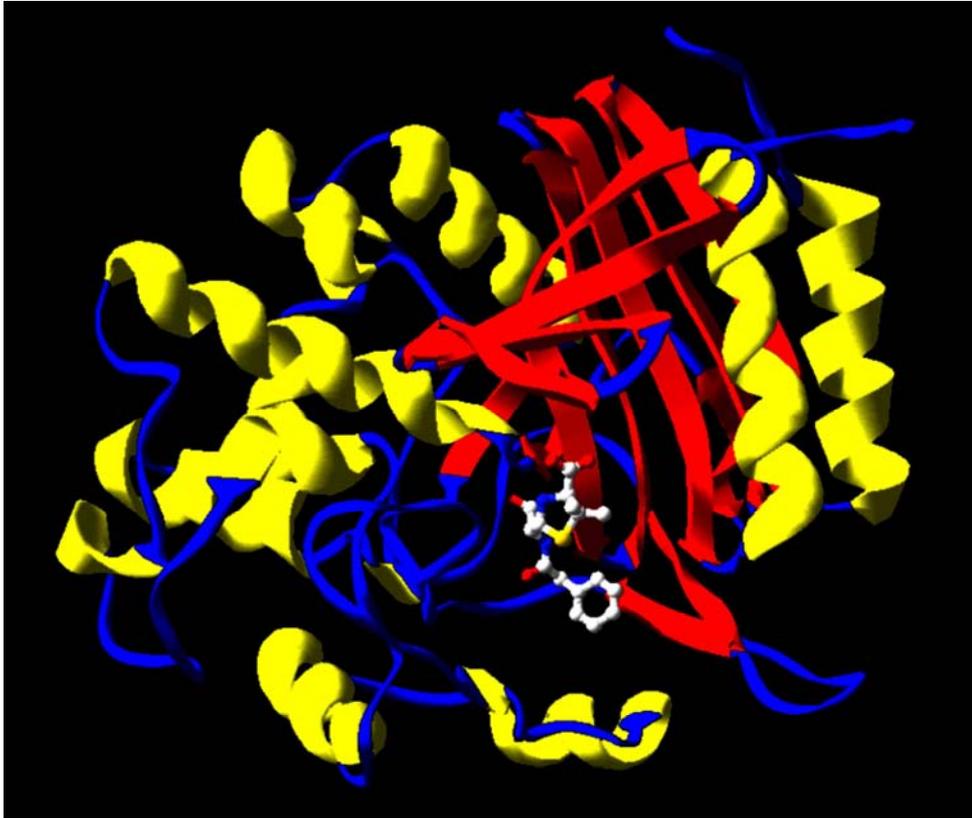


Figura 1.6: Molécula de penicilina en el centro activo de la enzima transpeptidasa del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias.

Estas penicilina-enzimas ya no reaccionan más y por lo tanto, quedan inhibidas de forma irreversible. Esto provoca que la pared celular se vuelva osmóticamente sensible, con la consiguiente autólisis de la bacteria (Giesbrecht y col., 1991; Frère y col., 1993).

La actividad de estos antibióticos es mucho mayor frente a bacterias gram positivas que frente a gram negativas. La explicación a esta diferencia en la actividad se encuentra en el diferente porcentaje de peptidoglicano en la composición de la pared celular de ambos grupos. Mientras que el peptidoglicano es el componente mayoritario de la pared celular de las bacterias gram positivas, constituye sólo una fina capa en la pared celular de las bacterias gram negativas. En todo caso, el espectro de actuación se ha ido ampliando a lo largo de los

años con la incorporación de nuevas moléculas que poseen una mayor actividad frente a los microorganismos gram negativos.

1.1.2. Clasificación y estructura química.

Los antibióticos β -lactámicos se incluyen dentro de los antibióticos de tipo peptídico. Se pueden clasificar según su estructura química en cinco grupos (Tabla 1.1) (O'Sullivan y Sykes, 1986; Aharonowitz y col., 1992). La característica estructural común a todos ellos es un anillo β -lactámico de cuatro miembros, formado por la condensación no ribosómica de tres aminoácidos: L-valina, L-cisteína y ácido L- α -aminoadípico. Exceptuando las monobactamas, que sólo presentan el anillo β -lactámico, estos compuestos están formados por un sistema bicíclico, siendo la estructura de este segundo anillo la que permite su clasificación.

En el caso de las penicilinas, el núcleo central es el 6-APA, formado por el anillo β -lactámico asociado a un segundo anillo tiazolidínico. Sin embargo, las cefalosporinas y las cefamicinas contienen como núcleo central el ácido 7-aminocefalosporánico formado por el anillo β -lactámico unido a un anillo dihidrotiazínico (Figura 1.7).

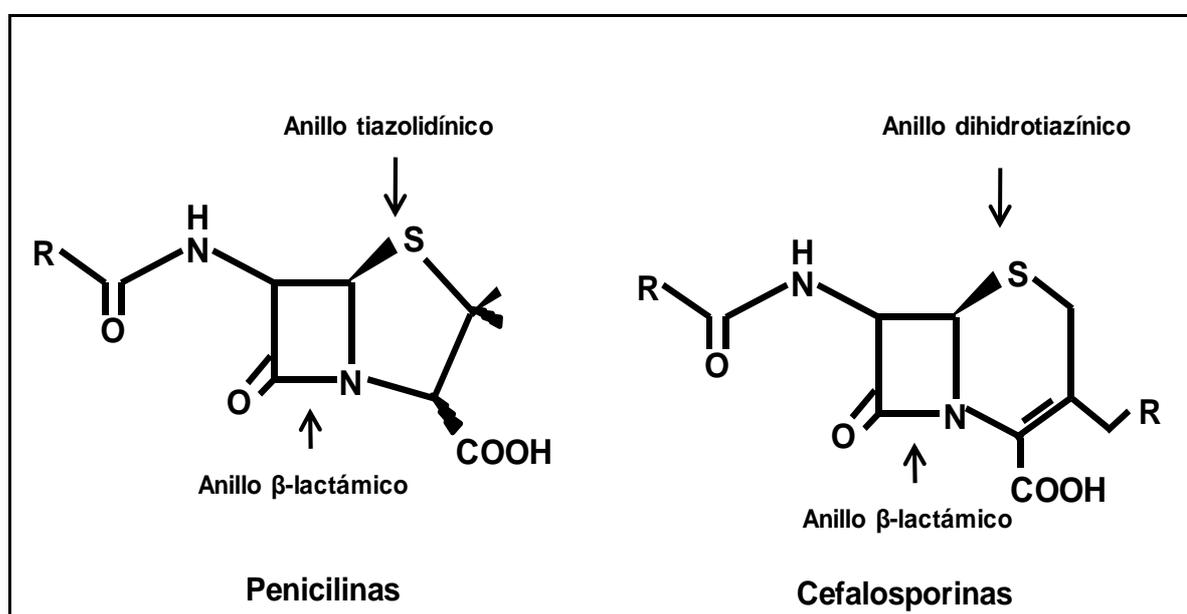


Figura 1.7: Estructura química general de penicilinas y cefalosporinas.

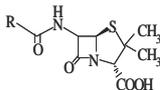
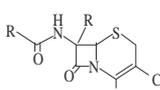
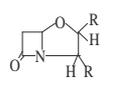
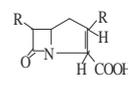
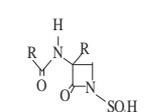
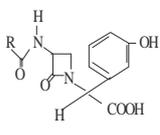
Estructura química	Antibióticos	Microorganismos Productores	
		Hongos	Bacterias
			Gram ⁺
 <p>Penam</p>	Penicilinas	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium notatum</i> <i>Aspergillus nidulans</i>	
 <p>Ceph-3-em</p>	Cefalosporinas Cefamicinas Cefabacinas Citinovorinas	<i>Acremonium chrysogenum</i> <i>Paecilomyces persinicus</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i> <i>Nocardia lactandurams</i>	<i>Flavobacterium sp.</i> <i>Lysobacter lactamgenus</i>
 <p>Clavam</p>	Ácido clavulánico	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	
 <p>Carbapenem</p>	Tienamicinas Ácidos olivánicos Epitienamicinas	<i>Streptomyces clavuligerus</i> <i>Streptomyces olivaceus</i>	<i>Erwinia carotovora</i> <i>Serratia sp.</i>
 <p>Nocardicinas</p>	Nocardicinas	<i>Nocardia uniformis</i> subsp. <i>Tsuyamanensis</i>	
 <p>Monolactam</p>	Monobactamas		<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Pseudomonas acidophila</i>

Tabla 1.1: Clasificación de los antibióticos β-lactámicos según su estructura química.

Los antibióticos β -lactámicos poseen cadenas laterales, (la R indica las diferentes cadenas laterales), que confieren un carácter hidrofílico o hidrofóbico; así algunas penicilinas son de carácter hidrofóbico al presentar una cadena lateral de ácido fenilacético (penicilina G o bencilpenicilina), ácido fenoxiacético (penicilina V), mientras que otras presentan una cadena lateral hidrofílica de ácido L- α -aminoadípico (isopenicilina N).

En una fermentación en la que no se añada al medio de cultivo ningún precursor de la cadena lateral se producirán no menos de 7 penicilinas naturales (Tabla 1.2).

NOMBRE GENÉRICO**ESTRUCTURA (R) (Ver Figura 1. 7)**

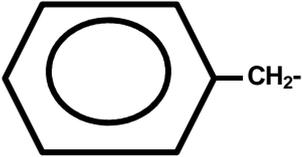
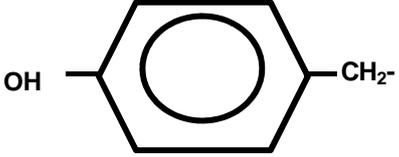
Penicilina G	
Penicilina F	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$
Dihidropenicilina F	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4-$
Penicilina K	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6-$
Penicilina X	
Isopenicilina N L-isómero	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_3- \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
Penicilina N D-isómero	$\begin{array}{c} \text{COOH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_3- \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$

Tabla 1.2: Diversos tipos de penicilinas naturales.

Las penicilinas con una cadena lateral hidrofóbica son exclusivamente sintetizadas por hongos filamentosos, como es el caso de especies del género *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. nalgiovense* y *P. griseofulvum*).

Sin embargo, la producción de antibióticos β -lactámicos de tipo hidrofílico tiene lugar en hongos filamentosos, como *Acremonium chrysogenum*, y en muchos Actinomicetos, como especies del género *Streptomyces* sp., además de algunas especies bacterianas Gram negativas (Aharonowitz y col., 1992).

Algunas de las penicilinas son producidas de forma natural por los microorganismos que las sintetizan. A partir de las producidas naturalmente pueden sintetizarse químicamente otras penicilinas de mayor interés farmacéutico que se denominan penicilinas semisintéticas.

Si se añade al medio de cultivo un precursor de la cadena lateral se producirá de forma mayoritaria un tipo de penicilina. Las penicilinas así obtenidas se denominan biosintéticas siendo las más importantes la bencilpenicilina o penicilina G (cuando se añade como precursor de la cadena lateral ácido fenilacético) y la penicilina V (cuando se añade como precursor de la cadena lateral ácido fenoxiacético). A partir de estas penicilinas biosintéticas se obtiene el núcleo de 6-APA escindiendo de forma química o enzimática la cadena lateral e incorporando mediante procedimientos químicos otras cadenas laterales obteniéndose las penicilinas semisintéticas como por ejemplo: ampicilina, amoxicilina, nafcilina, etc.

1.2. Hongos productores: taxonomía y características generales.

Aunque la penicilina es producida por diversas especies del género *Penicillium* y *Aspergillus*, la producción industrial de penicilina está basada en el hongo *P. chrysogenum*.

Los hongos productores de antibióticos β -lactámicos, como es el caso del hongo *P. chrysogenum* (Figura 1.8) pertenecen al *phylum* Ascomycota, el cual agrupa aproximadamente al 75 % de todos los hongos descritos, y dentro de éste al *subphylum* Pezizomycotina. Se caracterizan porque las células que lo forman se encuentran dispuestas en filamentos largos tubulares, divididos en segmentos celulares denominados hifas. Se reproducen de forma asexual con la formación de esporas asexuales (conidios o mitosporas). Dichos conidios contienen un núcleo mitótico y su pared celular procede de una hifa modificada.

1.2.1. Clasificación taxonómica de *Penicillium chrysogenum*.

Reino: Fungi. **Phylum:** Ascomycota. **Subphylum:** Pezizomycotina.

Clase: Eurotiomycetes. **Orden:** Eurotiales.

Familia: Trichocomaceae.; mitosporic Trichocomaceae.

Género: *Penicillium*.

NCBI Taxonomy ID: 5076.

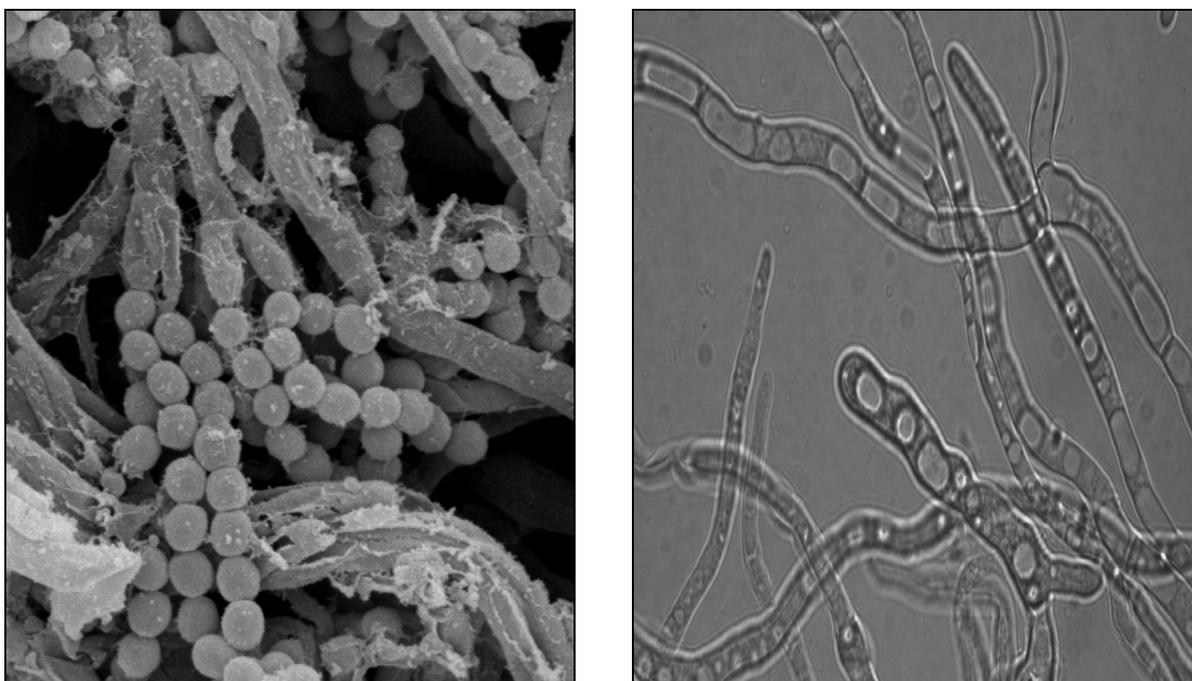


Figura 1.8: Hongo productor de penicilina *P. chrysogenum* (en la parte izquierda se pueden observar las esporas mediante microscopía electrónica de barrido y en la derecha las hifas mediante microscopía confocal).

1.3. Mejora de cepas productoras de penicilina.

La cepa original de *Penicillium* aislada por Fleming y que fue designada como *P. notatum* NRRL-1249 producía alrededor de 3-6 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina. En la búsqueda por conseguir cepas

con un incremento en los títulos de penicilina se enviaron muestras de tierra de todas partes del mundo (recogidas durante la Segunda Guerra Mundial) al Northern Regional Research Laboratory (NRRL) de Peoria, Illinois, donde fueron analizadas consiguiéndose cepas que incrementaban la producción de penicilina en cultivos sumergidos.

Sin embargo, la mejor cepa aislada fue hallada en Peoria a partir de un melón enmohecido obtenido en el mercado local. Esta cepa fue designada como *P. chrysogenum* NRRL-1951, la cual presentaba mayor capacidad de producción (0,25 mM) que la cepa de Fleming y era más adecuada para cultivos sumergidos (Raper, 1946).

Hoy se conoce uno de los motivos del incremento de producción de bencilpenicilina de *P. chrysogenum* NRRL-1951 con respecto a *P. notatum* NRRL-1249. Básicamente es debido a que *P. chrysogenum* NRRL-1951 presenta una mutación en la posición 1357 del gen *pahA* involucrado en el catabolismo del ácido fenilacético, reduciendo la oxidación de éste y permitiendo así que se genere mayor producción de bencilpenicilina con respecto a *P. notatum* (Rodríguez-Sáiz y col., 2001).

A partir de la cepa *P. chrysogenum* NRRL-1951 y por mutagénesis al azar, utilizando mutágenos tanto físicos (luz UV, rayos X) como químicos (nitrosoguanidina) se fueron obteniendo sucesivas cepas que se seleccionaron según su mayor producción.

Tras varios pasos de mutación se consiguió aislar la cepa Wis Q-176 con un título en penicilina de 2500 µg/ml. Esta cepa fue adoptada por la mayor parte de los fabricantes de penicilina y fue la original de la conocida línea Wisconsin en los distintos programas de mejora de cepas (Backus y Stauffer, 1955).

Dichos programas han conseguido aumentar la productividad más de 1000 veces (Lein, 1986; Elander, 2003). No solo ha sido importante el aumento del rendimiento en el desarrollo de las cepas, sino que también han sido optimizados otros factores que tienen un efecto muy importante sobre la recuperación del producto, como por ejemplo, la eliminación de pigmentos que se purificaban junto con la penicilina.

Han sido varios los grupos que han investigado desde un punto de vista molecular las cepas industriales de *P. chrysogenum* con el fin de poder establecer una relación entre las modificaciones genéticas existentes en las cepas de alta producción con respecto a las cepas utilizadas inicialmente y la alta producción de penicilina conseguida.

La principal explicación hallada, es el elevado número de copias y los altos niveles de transcripción de toda la agrupación de genes (*cluster*) responsables de la biosíntesis de penicilinas en estas cepas (Barredo y col., 1989a; Christensen y col., 1995; Fierro y col., 1995; Newbert, 1997; Kosalková y col., 2007). Más recientemente y tras la publicación del genoma de *P. chrysogenum* (van der Berg y col., 2008) se ha visto que la abundancia de peroxisomas y el aumento de la transcripción de los genes que codifican las enzimas encargadas de la biosíntesis de los aminoácidos precursores, también están directamente relacionados con el aumento de la producción.

Del mismo modo, estudios basados en proteómica, han revelado que el incremento del metabolismo redox y la biosíntesis de NADPH, así como la disminución de la biosíntesis de otros metabolitos secundarios y la capacidad infectiva del hongo, han tenido lugar durante el proceso de mejora de cepas (Jami y col., 2010).

1.4. Biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas.

Las rutas de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas han sido estudiadas en detalle a nivel molecular y bioquímico, habiéndose conseguido conocer los pasos implicados (Martín y Liras, 1989a; Aharonowitz y col., 1992; Martín y Gutiérrez., 1995; Martín, 1998; García-Estrada y Martín, 2007; Martín y col., 2010). En la Figura 1.9 se muestra un esquema de la vía biosintética de penicilinas y cefalosporinas con las actividades enzimáticas implicadas en cada paso.

Los dos primeros pasos de la vía biosintética de penicilinas y cefalosporinas son comunes. El primer paso consiste en la formación del tripéptido ACV: δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina por condensación no ribosómica de los tres aminoácidos que lo conforman (ácido L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina), llevada a cabo por la enzima ACV sintetasa (ACVS). El segundo paso de la vía biosintética es la ciclación oxidativa del tripéptido ACV para dar lugar al compuesto isopenicilina N ya con una débil actividad antibiótica. La enzima responsable de la ciclación es la isopenicilina N sintasa (IPNS), también denominada ciclasa.

El paso final de la biosíntesis de penicilinas consiste en la sustitución de la cadena lateral de L- α -aminoadípico por un ácido orgánico activado mediante coenzima A (CoA), que en el caso de la bencilpenicilina es el ácido fenilacético. Este último paso es llevado a cabo por la enzima acil-CoA: isopenicilina N aciltransferasa (IAT).

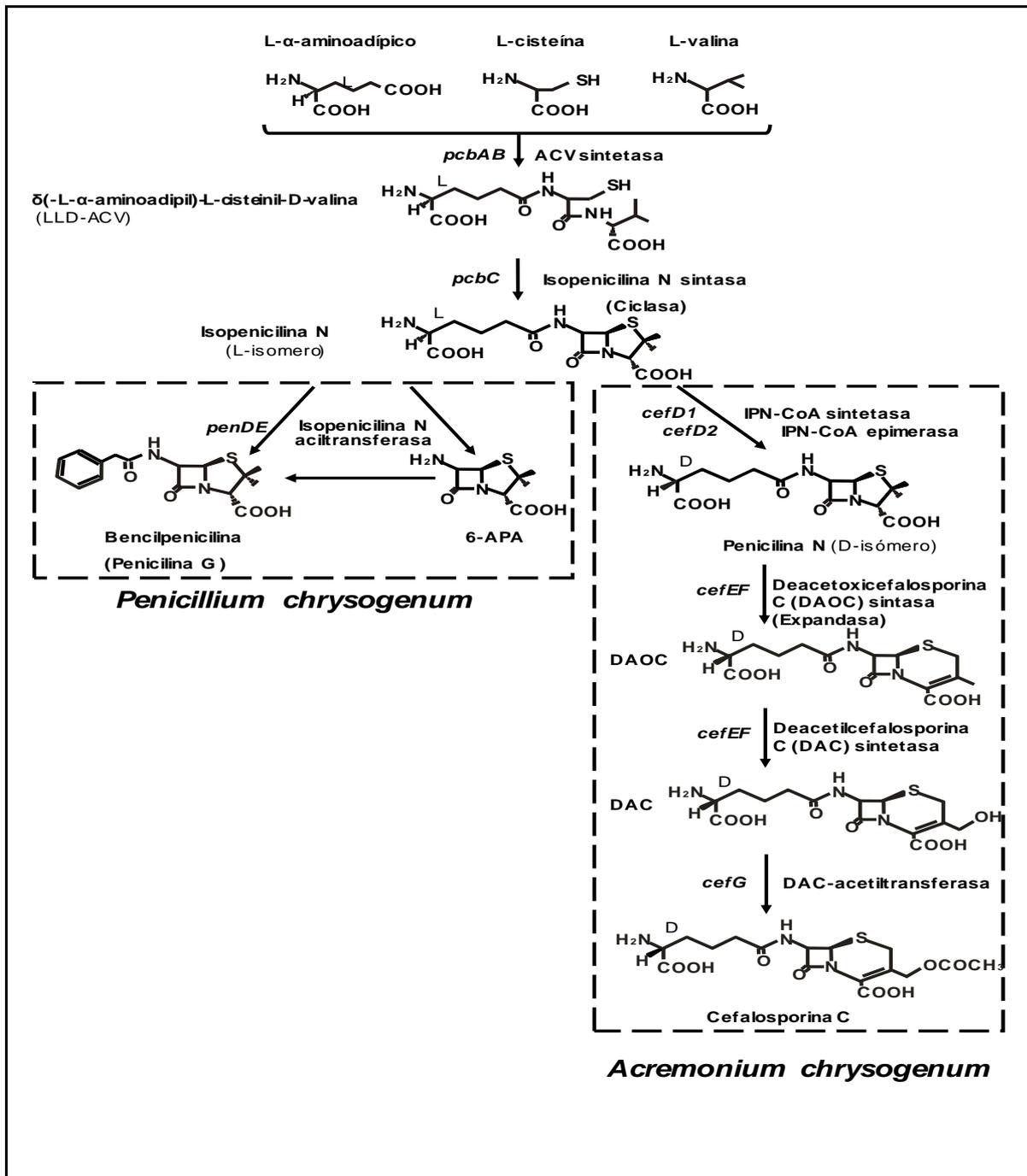


Figura 1.9: Ruta de biosíntesis de penicilina y cefalosporina por los hongos *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* respectivamente.

En hongos filamentosos y actinomicetos productores de cefalosporinas, la ruta prosigue con la epimerización de la isopenicilina N a penicilina N. Se ha propuesto que esta reacción transcurre en dos etapas: en primer lugar la isopenicilina N es activada por la enzima que codifica el gen *cefD1* a su derivado de CoA y después es epimerizada por la epimerasa que codifica el gen *cefD2*.

Posteriormente, se produce la expansión del anillo tiazolidínico de la penicilina N dando lugar a la desacetoxicefalosporina C (DAOC). La enzima DAOC sintasa (expandasa) es quien lleva a cabo esta reacción. La DAOC es hidroxilada y oxidada por la enzima desacetilcefalosporina C sintetasa (hidroxilasa), sintetizando desacetilcefalosporina C (DAC). El último paso es llevado a cabo por la DAC acetiltransferasa, que acetila DAC mediante la transferencia de acetil-CoA al grupo hidroxilo, obteniéndose cefalosporina C.

1.5. Genes directamente implicados en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos.

Algunos de los genes implicados en la biosíntesis de los antibióticos penicilina y cefalosporina son comunes. Basándose en esta situación, se han hecho dos categorías distintas dentro de los genes biosintéticos: por un lado están los genes que participan en las dos primeras reacciones de biosíntesis (comunes a todas las β -lactamas), que son denominados con las letras *pcb* ("penicillin and cephalosporin biosynthesis") siguiendo la sugerencia de Ingolia y Queener (1989).

Por otra parte, están el resto de los genes que intervienen de forma específica en la biosíntesis de un tipo particular de antibiótico β -lactámico, y que son denominados por las letras *pen* y *cef* para indicar su implicación en la biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas, respectivamente.

1.5.1. Genes y proteínas comunes de las rutas biosintéticas de penicilinas y cefalosporinas.

1.5.1.1. El gen *pcbAB* codifica la ACV-sintetasa.

El gen que codifica para la enzima ACV-sintetasa fue denominado *pcbAB* porque se suponía que eran dos los genes implicados en la biosíntesis de L- α -aminoadipil-L-cisteinil (AC) en primer lugar y ACV a continuación (Martin y col., 1990). Algunas evidencias genéticas

posteriores demostraron la existencia de un único gen que codifica una única enzima conteniendo todas las actividades necesarias para la biosíntesis de ACV.

La ACV-sintetasa es una enzima multimérica con un peso molecular de 426 KDa. Los módulos que la conforman presentan las diferentes actividades catalíticas necesarias para realizar la síntesis del tripéptido ACV: reconocimiento y activación de los tres aminoácidos precursores (L-valina, L-cisteína y L- α -aminoadípico), formación de los enlaces peptídicos, isomerización de la L-valina a D-valina y tioesterificación para liberar el tripéptido formado.

Esta enzima ha sido purificada a partir de *A. nidulans* (van Liempt y col., 1989), *A. chrysogenum* (Baldwin y col., 1990), *Streptomyces clavuligerus* (Jensen y col., 1990), *Amicolaptosis (Nocardia) lactamdurans* (Coque y col., 1996) y *P. chrysogenum* (Theilgaard y col., 1997).

Estudios transcripcionales revelaron la existencia de un ARN mensajero de aproximadamente 11,5 Kb, tamaño que fue confirmado al secuenciarse el gen y comprobarse la existencia de un ORF (Open Reading Frame) de 11376 pb, que codifica una proteína de 3792 aminoácidos con un peso molecular deducido de 426 KDa.

Este gen ha sido clonado en *P. chrysogenum* (Díez y col., 1990; Smith y col., 1990a), *A. chrysogenum* (Gutiérrez y col., 1991a), *A. nidulans* (MacCabe y col., 1991), *S. clavuligerus* (Tobin y col., 1991) y *A. lactamdurans* (Coque y col., 1991). El ORF de este gen tanto en hongos como en bacterias, no está interrumpido por ningún intrón y en su secuencia se observa la presencia de tres regiones repetidas o dominios. Cada uno de estos dominios presenta una gran similitud a dominios de péptido sintetasa de *Bacillus brevis*, además de regiones de unión a 4'-fosfopanteteína similares a las de policétido y ácido graso sintetasa (Martín y col., 2000a).

1.5.1.2. El gen *pcbC* codifica la isopenicilina N-sintasa (ciclasa).

El gen que codifica esta enzima se denomina *pcbC*, tiene un tamaño de 1 Kb y su secuencia no se encuentra interrumpida por ningún intrón. El primer gen *pcbC* que se clonó fue el de *A. chrysogenum* (Samson y col., 1985). Posteriormente, el gen *pcbC* se clonó a partir de muchos otros microorganismos como *P. chrysogenum* (Carr y col., 1986; Barredo y col., 1989b), *A. nidulans* (Ramón y col., 1987; Weigel y col., 1988), *S. griseus* (García-Domínguez y col., 1991), *S. clavuligerus* (Leskiw y col., 1988) y *A. lactamdurans* (Coque y col., 1991).

La enzima isopenicilina N-sintasa tiene una masa molecular de 48 KDa. Para llevar a cabo la reacción de ciclación del tripéptido ACV que origina el anillo β -lactámico, esta enzima requiere Fe^{+2} y oxígeno molecular como cofactores y ascorbato como donador de electrones. La ciclasa ha sido purificada a partir de *A. chrysogenum* (Pang y col., 1984; Hollander y col., 1984), *S. clavuligerus* (Jensen y col., 1986), *A. lactamdurans* (Castro y col., 1988) y *P. chrysogenum* (Ramos y col., 1985; Carr y col., 1986).

1.5.1.3. El gen *penDE* codifica la acil-CoA: isopenicilina N-aciltransferasa (IAT).

El último paso en la biosíntesis de bencilpenicilina está catalizado por la enzima aciltransferasa. En este paso se produce el intercambio de la cadena lateral de L- α -aminoadípico de la isopenicilina N por un ácido activado en forma de acil-CoA. Se ha propuesto un proceso de dos pasos enzimáticos (Queener y Neuss, 1982). En primer lugar, una actividad amidohidrolasa elimina la cadena lateral de L- α -aminoadipato de la isopenicilina N generando 6-APA y a continuación, una actividad acil-CoA: 6-APA-aciltransferasa incorpora la nueva cadena lateral activada. Estas dos actividades enzimáticas residen en una proteína heterodimérica (Tobin y col., 1990; 1993; Álvarez y col., 1993) denominada isopenicilina N-aciltransferasa (IAT). La forma activa de la enzima IAT resulta del procesamiento del precursor monomérico de 40 KDa a un heterodímero que contiene dos subunidades; una de 11 KDa (subunidad α correspondiente a la región amino terminal) y otra 29 KDa (subunidad β correspondiente a la región carboxilo terminal).

En *P. chrysogenum*, se ha conseguido purificar la subunidad de 29 KDa de la IAT (Álvarez y col., 1987), mientras que en *A. nidulans* se han purificado las dos subunidades (Whiteman y col., 1990). Ambas subunidades están codificadas por un único gen denominado *penDE* (Tobin y col., 1990; 1993). Dicho gen ha sido clonado en *P. chrysogenum*, (Barredo y col., 1989c; Tobin y col., 1990) y en *A. nidulans* (Montenegro y col., 1990; Tobin y col., 1990).

En contraste con los otros genes de la biosíntesis de penicilina, el gen *penDE* contiene tres intrones en similares posiciones en ambos organismos (Barredo y col., 1989c; Tobin y col., 1990; Fernández-Cañón y Peñalva, 1995). La presencia de intrones indica un posible origen fúngico (Aharonowitz y col., 1992), aunque éste aún no está claro ya que no se conocen análogos cercanos en organismos eucariotas o procariotas. Algunas características de este gen indican que derivó de una fusión de un gen eucariota con otro procariota (Martín y col.,

1994). En *A. nidulans* han descubierto el gen *aatB*, un gen homólogo al gen *aatA* (que codifica la IAT) con una estructura similar y un modelo de expresión génica igual al gen *aatA*. La proteína codificada por este gen posee actividad aciltransferasa e interviene en la biosíntesis de penicilina en *A. nidulans*. En otras especies de hongos productores de penicilina los genes homólogos al *aatA* forman parte del *cluster* de genes de biosíntesis de penicilina mientras que los genes homólogos al *aatB* también están presentes en hongos no productores (Spröte y col., 2008; García-Estrada y col., 2009).

El análisis del genoma en *P. chrysogenum* ha revelado la presencia de un gen (Pc13g09140) denominado gen *ial* debido a que codifica una proteína de gran similitud (IAL por IAT-like) a la IAT. Los estudios realizados sobre la proteína IAL concluyen que no tiene actividad relacionada con la biosíntesis de penicilina. Estos resultados sugieren que no sucede lo mismo que en *A. nidulans*, así los genes *ial* y *penDE* de *P. chrysogenum* podrían no haberse formado a partir de un mismo gen ancestral por duplicación génica. Por lo tanto, estos genes podrían no tener una función similar sino, distintas funciones dentro del organismo (García-Estrada y col., 2009).

1.6. Organización génica en los microorganismos productores de penicilinas y cefalosporinas.

En bacterias y en hongos los genes implicados en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos tienden a localizarse en agrupaciones génicas denominadas “*clusters*” (Martín y Liras, 1989b; Martín, 1992,) (Figura 1.10).

En los hongos productores de penicilinas *A. nidulans* y *P. chrysogenum*, los tres genes de la ruta biosintética de penicilina se encuentran agrupados en un *cluster* localizado en el cromosoma I, en el caso de *P. chrysogenum* (Fierro y col., 1993) y en el cromosoma VI en el caso de *A. nidulans* (Montenegro y col., 1990).

Los genes *pcbAB* y *pcbC* se transcriben en orientación divergente, existiendo entre ellos una región intergénica común que funciona como un promotor bidireccional. La expresión de estos genes que están situados en una región del genoma que contiene dos promotores divergentes ha sido asociada con la reorganización de la estructura de la cromatina que permite la interacción facilitada de las regiones promotoras con la ARN polimerasa II y con

factores transcripcionales (García y col., 2004; Ishida y col., 2006; Shwab y col., 2007). El gen *penDE*, situado aguas abajo del gen *pcbC*, se transcribe a partir de su propio promotor.

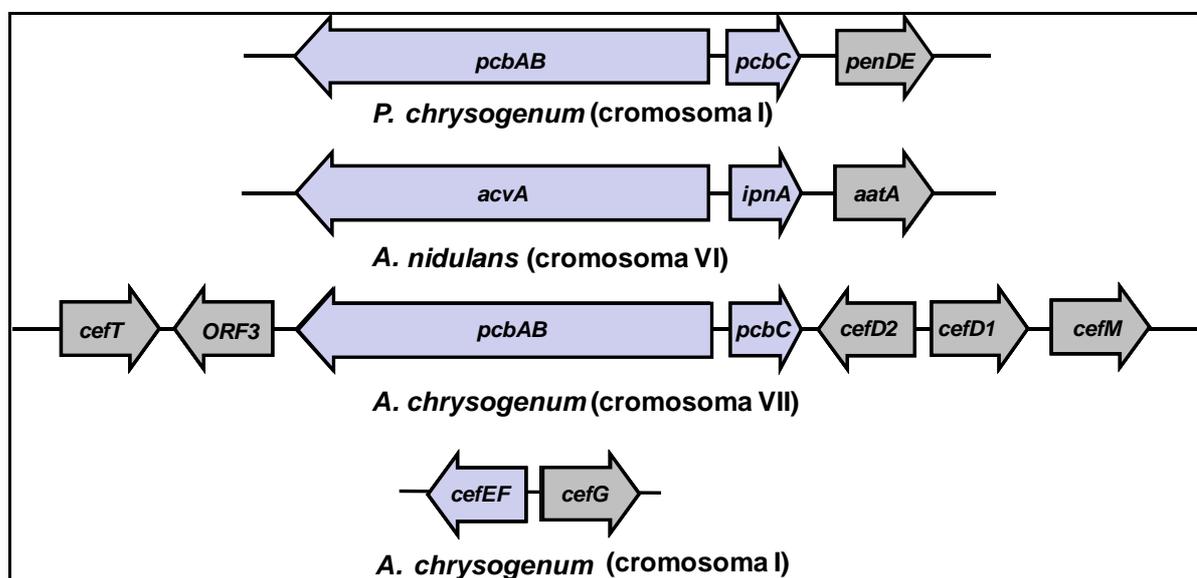


Figura 1.10: Agrupación de genes de biosíntesis de antibióticos β-lactámicos en “clusters” en hongos filamentosos.

En *A. chrysogenum*, los genes *pcbAB* y *pcbC* forman el denominado “cluster” temprano, situado en el cromosoma VII en la cepa C10 junto a los genes *cefT*, *cefD1* y *cefD2* (Ullán y col., 2002a, 2002b), mientras que los genes *cefEF* y *cefG* se encuentran agrupados en el cromosoma I, formando la agrupación tardía (Gutiérrez y col., 1999).

1.7. Regulación de la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*. Control molecular de la expresión de los genes.

La penicilina es, posiblemente, el metabolito secundario más estudiado y su biosíntesis la más investigada y conocida, debido en parte a que actualmente la penicilina sigue siendo uno de los antibióticos más importantes en términos de uso terapéutico y de volumen de producción anual.

La producción de penicilina tiene lugar, preferentemente, en condiciones de desequilibrio de nutrientes y a velocidades de crecimiento bajas. El desequilibrio nutricional se refiere sobre todo a la limitación en las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. Además de estos factores,

aminoácidos como la lisina ejercen un marcado efecto en la producción de penicilina en algunos microorganismos. Diversos componentes del medio de cultivo, como por ejemplo, el líquido de maceración de maíz y determinadas características del medio de cultivo como pueden ser el pH y el oxígeno disuelto, juegan un papel importante en el proceso de regulación.

La producción de penicilina es un proceso relativamente ineficiente ya que sólo un 20 % de la fuente de carbono consumida durante la fermentación termina incorporándose a la molécula de penicilina, aunque los análisis de flujos metabólicos en las cepas de alta producción estiman un rendimiento teórico de la conversión hasta valores del 50 % (Jorgensen y col., 1995).

La mejora en la producción y en el porcentaje de rendimiento de las cepas que actualmente se emplean se ha conseguido, en mayor medida, mediante la utilización de técnicas clásicas de mutación y selección.

La introducción de la tecnología del ADN recombinante ha llevado a la clonación y caracterización de los genes estructurales de la ruta biosintética de penicilina y hace posible la investigación sobre su regulación a nivel molecular. Debido a que la expresión de los genes de biosíntesis de penicilina está sujeta a sofisticados controles, bien sea por factores nutricionales y/o factores reguladores, los conocimientos sobre los circuitos reguladores y la sobreexpresión de los posibles genes reguladores pueden llevar a incrementos importantes sobre la producción y el rendimiento en la biosíntesis de la penicilina.

1.7.1. Mecanismo de regulación de la expresión génica.

La regulación de la expresión génica es un proceso que permite la expresión selectiva de la información codificada por el ADN. Cada célula contiene un gran número de genes, incluidos en su ADN, cuyos productos pueden llevar a cabo diferentes reacciones enzimáticas necesarias para la supervivencia de cada organismo en el nicho ecológico que habita.

La regulación génica puede tener lugar a diferentes niveles:

- Controlar la cantidad de enzima que se sintetiza, bien mediante el control de la transcripción (cuánto ARN se produce) y estabilidad de los transcritos (regulación post-transcripcional) o a nivel de traducción (se traduce o no el ARN a proteínas).

- Control postraduccional de la actividad enzimática, es decir, controlar la actividad de la enzima una vez sintetizada.

Tanto en organismos eucariotas como en procariontes, la regulación de la expresión génica se produce principalmente a nivel transcripcional, ya que es la transcripción la primera etapa del proceso de expresión génica. De los tres pasos de la transcripción génica (iniciación, elongación y terminación), la iniciación es la etapa más importante ya que de ella depende que un gen sea transcrito o no en un momento dado.

Un promotor eucariota está compuesto por sitios de unión de proteínas reguladoras específicas y un núcleo central compuesto por la caja TATA y/o un elemento iniciador. La maquinaria de transcripción se ensambla sobre este núcleo central e inicia la transcripción del ADN. Esta iniciación de la transcripción a partir de un promotor requiere de la actividad enzimática de las ARN polimerasas además de una serie de factores de transcripción, que en el caso de la ARN polimerasa II que transcribe los ARN mensajeros, son los factores de transcripción (TFIIA a TFIIH). Cada uno de estos elementos se ensambla en un orden determinado y regulado (Buratowski, 1994).

La proteína TBP ("TATA-Binding Protein-") se une a la caja TATA, junto a una serie de proteínas reguladoras llamadas TAFs ("TBP-Associated Factor-") implicadas en el correcto posicionamiento sobre el ADN. Este complejo se conoce como TFIID y, una vez ensamblado totalmente, protege una región de ADN de 70-80 pb alrededor del inicio de la transcripción.

Posteriormente a este complejo TFIID se une el factor de transcripción TFIIA que es esencial en la activación transcripcional y en la antirrepresión de muchos genes e impide la disociación o la inactivación de TBP mediada por inhibidores; además estabiliza la unión TBP-ADN e induce cambios conformacionales en el complejo TFIID que podrían favorecer la unión de la ADN-polimerasa II. A continuación se une el factor TFIIIB, el cual proporciona una plataforma para que la holoenzima ARN-polimerasa II unida al factor TFIIIF se incorpore al complejo de transcripción. Finalmente son incorporados secuencialmente los factores generales de transcripción TFIIIE y TFIIH haciendo competente a la enzima polimerasa para iniciar la transcripción (Figura 1.11).

Un gen reprimido está esencialmente inactivo, quizá porque se encuentra en una región de la cromatina que impide que la maquinaria de transcripción o algún otro factor pueda acceder a la secuencia promotora. Un gen que se expresa de forma basal, puede encontrarse

en una cromatina abierta y ser, por tanto, accesible a la maquinaria de transcripción; sin embargo, en ausencia de un activador que ponga en marcha toda esta maquinaria, el gen se expresa a bajos niveles.

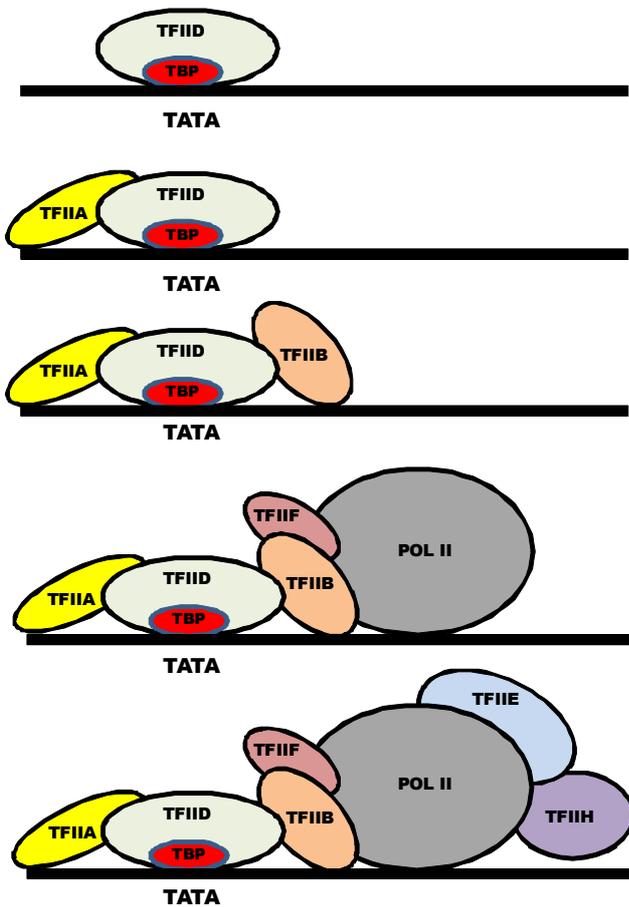


Figura 1.11: Orden de ensamblaje de los factores de transcripción al promotor eucariota.

Los genes inducibles, probablemente, se encuentran también en una cromatina “abierta” y a sus promotores se unen activadores transcripcionales que permiten, de forma altamente eficiente, el ensamblaje de la maquinaria transcripcional; estos genes se expresan a altos niveles, aunque el nivel de inducción dependerá de los reguladores transcripcionales presentes en el complejo.

La regulación transcripcional viene dada por la unión de distintos factores transcripcionales a secuencias específicas del ADN y por una serie de interacciones, que determinan que la transcripción se produzca o no. Algunos elementos reguladores se encuentran en la misma molécula de ADN y en regiones cercanas al gen a expresar

(elementos en *cis*), mientras que otros están situados en lugares diferentes del genoma (elementos en *trans*).

i. Elementos en *cis*. Estas secuencias se encuentran en los promotores de los genes que se van a transcribir y presentan una serie de características comunes como son la longitud, que oscila entre 3 y 8 pb, y a menudo, una estructura palindrómica. En dicha estructura, los centros de simetría se encuentran situados en la misma cara de la doble hélice. La información contenida en estos pequeños módulos, sobre todo si aparecen en forma de palíndrome, parece ser suficiente para ser reconocida por determinadas proteínas reguladoras; la posición y organización de éstas permiten crear numerosos complejos entre los distintos tipos de factores transcripcionales.

La estructura de estas secuencias parece indicar que las proteínas con las que interaccionan lo hacen en forma de dímeros, lo que explicaría el hecho de que los centros de simetría del palíndrome estén separados por una vuelta de la doble hélice. Se ha observado que la modificación de esta orientación angular mediante la introducción o eliminación de una base en el centro de simetría conlleva una reducción drástica de la afinidad de la proteína reguladora correspondiente (Beato, 1991).

Existen dos tipos de elementos en *cis*:

- Potenciadores o “*enhancers*”. Pueden hallarse a una distancia considerable del inicio de la transcripción, en cualquier orientación y están formados por varios módulos generalmente conjuntos. También aparecen en promotores de la ARN-polimerasa I (Muller y col., 1988). La unión de proteínas reguladoras a estos potenciadores activa la expresión de los genes adyacentes (Mcknighy y Tjian, 1986).

- Silenciadores. Son responsables de la represión transcripcional. Hay dos tipos: elementos silenciadores, no dependen de la posición y dirigen el mecanismo de represión activa y elementos reguladores negativos o “NRE”, que sí dependen de la posición y dirigen el mecanismo de represión activa (Ogbourne y Antalis, 1998).

ii. Elementos en *trans*: Son factores transcripcionales que actúan a nivel del ADN conjuntamente con otras proteínas que permiten o dificultan la unión de la ARN-polimerasa. Por comparación de secuencias, presentan una serie de motivos estructurales comunes muy cortos, responsables de la unión al ADN (Pabo y Sauer, 1992). Son:

- Los receptores de esteroides: Forman un grupo definido por una relación funcional: cada receptor es activado por la unión de un esteroide concreto.

- El dedo de zinc: Es un dominio proteico de unión al ADN (Figura 1.12). Se caracteriza por poseer varias cisteínas que unen moléculas de zinc. Aparecen en proteínas que unen ADN o ARN y pueden encontrarse solos o repetidos dos veces (Miller y col., 1985). Se encuentran, por ejemplo, en la proteína GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae* y en las proteínas CreA y PacC de hongos filamentosos.

- Motivo hélice-vuelta-hélice. Se describió por primera vez en la región de unión al ADN de represores fágicos; también se encuentran en las proteínas reguladoras MAT α 1 y MAT α 2 de *S. cerevisiae*. Está formado por dos hélices α cortas separadas por una secuencia corta que induce un giro de forma que ambas hélices quedan sobre planos diferentes. Una hélice α se coloca en el surco mayor del ADN; la otra forma un ángulo con respecto al ADN.

- Motivo hélice anfipática-lazo-hélice anfipática. Se encuentran en varios reguladores del desarrollo y en proteínas eucariotas de unión al ADN. Está formado por dos hélices α de distinto tamaño separadas por un lazo flexible, lo suficientemente grande como para permitir que las dos hélices se enfrenten paralelamente. Cada hélice anfipática tiene una cara con residuos hidrófobos y otra con residuos hidrófilos. La longitud del lazo que separa las dos hélices varía entre 12 y 28 aminoácidos. Este motivo estructural tiene dos funciones: dimerización de proteínas y unión al ADN.

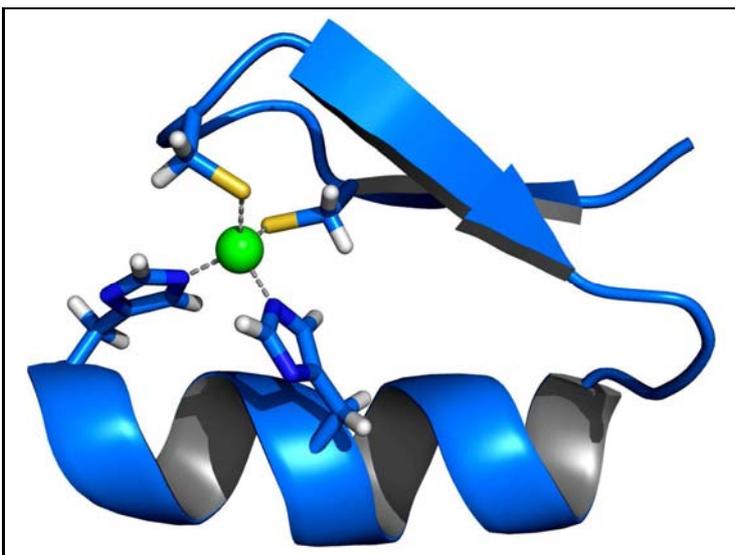


Figura 1.12: El motivo de dedo de zinc Cys2-His2, que consiste en una hélice alfa y una lámina beta antiparalela. El ión de zinc (verde) está coordinado por dos cisteínas y dos histidinas.

• Cremalleras de leucina. Son hélices ricas en residuos de leucina que emergen en uno de los laterales cada dos vueltas, (Figura 1.13). Son hélices anfipáticas con los grupos polares dispuestos hacia uno de los lados que les confiere la posibilidad de formar dímeros con mucha facilidad. En éstos se une las hélices α para formar hélices superenrolladas. Además de homodímeros pueden formar heterodímeros, lo cual aumenta las posibilidades de regulación génica.

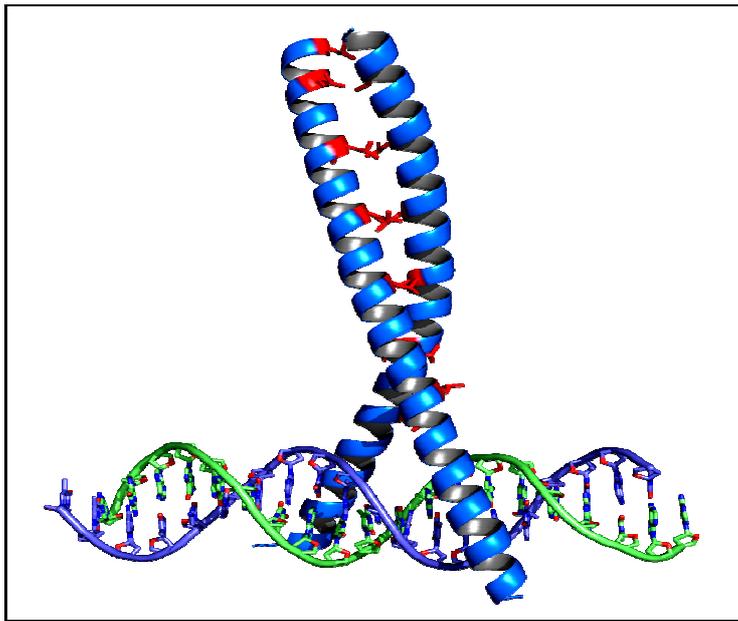


Figura 1.13: Cremallera de leucina, (azul) unida al ADN. Los residuos de leucina están indicados en rojo.

• Grupo de alta movilidad electroforética o HMG (“High Mobility Group”). Las proteínas HMG actúan como elementos arquitectónicos, estando implicadas en la regulación de la transcripción del ADN. Contienen un grupo de aproximadamente 75 aminoácidos aromáticos y básicos en el extremo carboxilo terminal. Se encuentran en proteínas cromosomales altamente conservadas.

Un factor transcripcional típico contiene un dominio específico de unión a ADN que se une a la secuencia reguladora de éste, un dominio de multimerización y un dominio de activación transcripcional. Aunque muchos de ellos actúan interactuando directamente con el promotor o las secuencias reguladoras, otros pueden hacerlo mediante la interacción con otros factores, con la ARN-polimerasa o incorporándose al complejo de transcripción tras la unión de otras determinadas proteínas.

Es frecuente que una secuencia consenso sea reconocida por un factor de transcripción, lo que no implica que éste sea el mismo en todos los promotores, es decir, una única secuencia de ADN puede ser capaz de unir distintas proteínas reguladoras como por ejemplo, la secuencia CCAAT en eucariotas (Brakhage y col., 1999). Del mismo modo, una proteína reguladora puede reconocer varias secuencias, como por ejemplo, la proteína HAP1 de *S. cerevisiae*. Por último se han descrito proteínas reguladoras, que para activar la expresión del gen correspondiente, deben unirse al ADN en una determinada conformación; es el caso de las proteínas HAP2 y HAP3 de *S. cerevisiae*.

Existen varios tipos de mecanismos reguladores de la expresión de un gen:

1. Activación: Un factor de transcripción se une a la secuencia del potenciador provocando un cambio en la conformación de la proteína que permite la unión del coactivador. El complejo de proteínas coactivadoras, a través del mediador, incrementa la frecuencia de las interacciones de ensamblaje en el complejo transcripcional basal y, por tanto, aumenta el nivel de expresión del gen. Para la actividad de ciertos activadores es necesaria la participación de determinadas proteínas que funcionan como componentes arquitectónicos, capaces de curvar el ADN entre los sitios de unión y acercando las proteínas activadoras al complejo basal de transcripción (Tjian y Maniatis., 1994).

2. Represión activa. Un factor transcripcional se une a la secuencia consenso de un elemento silenciador y esta unión provoca un cambio en su conformación que permite la unión del represor. Este complejo reacciona con los factores del complejo transcripcional basal e impide su ensamblaje completo.

3. Represión pasiva. Un elemento regulador negativo inhibe físicamente la unión de los factores transcripcionales a sus sitios de unión en el ADN o interfiere con las señales específicas que controlan varios eventos transcripcionales.

1.7.2. Regulación de la expresión de los genes de biosíntesis de penicilina.

Las cepas de alta producción de *P. chrysogenum* contienen niveles elevados de las tres enzimas implicadas en la ruta biosintética de penicilina: ACV sintetasa (López-Nieto y col., 1985), isopenicilina N sintasa (Ramos y col., 1985) e isopenicilina N aciltransferasa (IAT), (Álvarez y col., 1993). Este efecto se debe a un elevado número de copias de los tres genes estructurales: *pcbAB*, *pcbC* y *penDE* (Barredo y col., 1989c; Smith y col., 1989).

En las cepas de *P. chrysogenum* de alta producción de penicilina se ha observado que la región que contiene los tres genes de la ruta de biosíntesis de penicilina se encuentra amplificada en repeticiones en tándem (Fierro y col., 1995). Estas repeticiones están unidas por un hexanucleótido conservado de secuencia TTTACA (Barredo y col., 1989a; Fierro y col., 1995; Newbert y col., 1997).

El tamaño de la región génica que sufre amplificación varía según la cepa (106.5 Kpb ó 56.8 Kpb), así como también varía el número de repeticiones. En *P. chrysogenum*, la cepa silvestre NRRL-1951 y la cepa Wisconsin 54-1255 poseen una única copia de la región amplificada. En cambio, la cepa AS-P-78 contiene unas 6 repeticiones y la cepa de alta producción E1 contiene aproximadamente 14 copias. La región amplificada ha sido secuenciada en las cepas AS-P-78 (Fierro y col., 2006) y Wisconsin 54-1255 (van den Berg y col., 2007), encontrándose varias ORFs flanqueando los genes responsables de la biosíntesis de penicilina.

La presencia de estas agrupaciones de genes biosintéticos de antibióticos en muchos de los organismos productores apoya la hipótesis que atribuye su formación durante el proceso evolutivo a la obtención de una ventaja ecológica (Martín y Liras, 1989b). Además, si esta organización estuviera controlada por un solo promotor permitiría coordinar la regulación de los genes biosintéticos, como ocurre en las bacterias productoras de antibióticos β -lactámicos (Seno y Baltz, 1989). Sin embargo, el hecho de que en los hongos productores los genes biosintéticos se transcriban de forma independiente y se expresen a través de diferentes promotores (Brakhage y Turner, 1995), parece indicar más bien que la formación del *cluster* refleja sólo un origen ancestral común. Esto último se encuentra sustentado por la alta similitud de los genes *pcbC* de hongos y bacterias (Weigel y col., 1988; Peñalva y col., 1990; Landan y col., 1990). De hecho, se ha sugerido que los genes *pcbAB* y *pcbC* se transfirieron horizontalmente desde las bacterias a los hongos filamentosos hace aproximadamente 370 millones de años (Carr y col., 1986; Ingolia y Queener, 1989; Cooper, 1993; Martín y col., 1994).

Los estudios transcripcionales mediante análisis de "Northern" han revelado que en las cepas con un alto número de copias de genes biosintéticos de penicilina también los niveles de ARNm de estos genes son mayores en comparación con la cepa silvestre (Smith y col., 1989, Renno y col., 1992). El patrón temporal de los transcritos de los genes *pcbC* y *penDE* en *P. chrysogenum* muestra que los niveles más elevados se observan en la fase de máximo

crecimiento, mientras que el gen *pcbAB* se expresa ya desde el inicio de la fermentación (Renno y col., 1992; Suárez y Peñalva, 1996).

1.7.2.1. Reguladores transcripcionales.

La biosíntesis de penicilina está afectada por diversos factores nutricionales como la regulación catabólica por fuente de carbono, nitrógeno y fósforo (Martín y col., 1999) y complejos procesos reguladores (Chang y col., 1990; Aharonowitz y col., 1992; Feng y col., 1994; Martín, 2000b; Brakhage y col., 2004).

Diversos factores transcripcionales diferentes a los TFs han sido identificados en diversos hongos filamentosos. Algunos de estos factores transcripcionales se unen a la región promotora de los genes *pcbAB* y *pcbC* y a la región corriente arriba del gen *penDE* en *A. nidulans* (Brakhage, 1998) y *P. chrysogenum* (Martín, 2000b).

Estos factores transcripcionales actúan como elementos reguladores de la expresión de los genes de biosíntesis de penicilina, (Chu y col., 1995; Feng y col., 1995; Kosalková y col., 2000; 2007; 2009). Sin embargo, ningún gen regulador específico ha sido encontrado en la región amplificada que contiene los tres genes biosintéticos (Fierro y col., 2006; van den Berg y col., 2007), lo cual indica que la biosíntesis de penicilina debe ser controlada directamente por “reguladores globales” más que por un regulador específico.

1.7.2.1.1. Regulación por pH externo. Regulador Pac C.

La producción de penicilina en *A. nidulans* está regulada mediante el pH ambiental o externo, siendo mayor en los cultivos incubados con valores de pH alcalinos. Este efecto se observa también en *P. chrysogenum* (Chu y col., 1997; Gutiérrez y col., 1999).

Existen diferencias en el comportamiento de estos dos hongos, ya que mientras en *A. nidulans* un valor de pH alcalino contrarresta la represión catabólica ejercida por el azúcar sacarosa sobre el gen *pcbAB* cuando se utiliza ésta como fuente de carbono (Espeso y col., 1993), en *P. chrysogenum* un valor de pH alcalino aunque estimula la transcripción de los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE*, no elimina la fuerte represión catabólica por glucosa que se ejerce sobre los dos primeros genes de la ruta de biosíntesis de penicilina (Gutiérrez y col., 1999) (Figura 1.14).

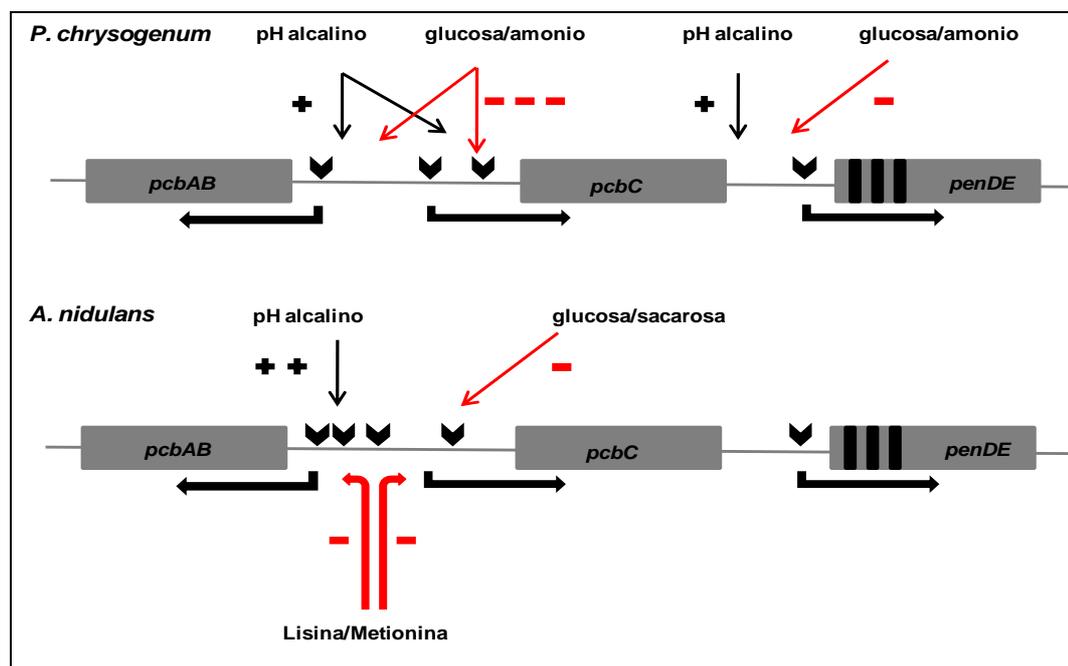


Figura 1.14: Circuitos reguladores que controlan la expresión de los genes *pcbAB* y *pcbC* desde el promotor bidireccional y regulación del gen *penDE* desde su propio promotor en *P. chrysogenum* y *A. nidulans*. La inducción de la expresión génica se indica por flechas negras con un signo positivo (+) y la represión de la expresión génica se indica por flechas rojas con un signo (-). La intensidad de la inducción o represión se muestra con el número de signos (+) o signos (-). El inicio de la transcripción de los genes se indica con línea gruesa negra continua.

En *A. nidulans*, el efecto regulador por pH externo está mediado a través del factor transcripcional PacC. Esta proteína es sintetizada como producto primario de la traducción, siendo inactiva en la regulación de los genes estructurales debido a las interacciones intramoleculares entre las regiones carboxilo y amino terminal (Arst y col., 1994; Tilburn y col., 1995).

A pH ambiental alcalino la proteína PacC cambia su conformación y aproximadamente un 60 % de la proteína inactiva (de la región carboxilo-terminal) es eliminada mediante proteólisis, dando lugar a una proteína funcional que contiene tres dominios de unión al ADN en forma de dedos zinc que activa la transcripción de genes que se expresan bajo un pH alcalino y reprime la transcripción de los genes que se expresan a pH ácido (Tilbur y col., 1995).

Suárez y Peñalva (1996) han determinado los sitios de unión *in vitro* de la proteína PacC de *P. chrysogenum* en la región intergénica *pcbAB* y *pcbC*. Dicha región intergénica contiene siete sitios de unión PacC mediante la secuencia consenso 5'-GCCARG-3'.

1.7.2.1.2. Regulación catabólica de la biosíntesis de penicilina por la fuente de carbono. Regulador transcripcional CreA.

La regulación por la fuente de carbono es un mecanismo general conocido en bacterias y hongos que impide la síntesis y/o la actividad de enzimas necesarias para la asimilación de las diversas fuentes de carbono cuando esté presente una fuente de carbono fácilmente utilizada, como puede ser la glucosa. Desde el punto de vista fisiológico, este tipo de regulación es beneficioso para el microorganismo ya que se utiliza la fuente de carbono más energética y no se desperdicia energía en la síntesis de otros sistemas catabólicos para fuentes de carbono alternativas. Los genes sujetos a represión por fuente de carbono pueden dividirse en tres grupos: los que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de fuentes de carbono menos favorables, los que codifican enzimas implicadas en la gluconeogénesis y en el ciclo del glioxilato y los relacionados con el metabolismo secundario. El mejor ejemplo del último grupo es la regulación por fuente de carbono de la producción del antibiótico penicilina.

El término represión por fuente de carbono (o más específicamente represión por glucosa) se refiere a un efecto represor que ejerce la glucosa sobre la expresión de algunos genes. La glucosa es una de las fuentes de carbono con que se produce un mayor crecimiento de micelio pero ejerce un efecto represor sobre la producción de penicilina.

En *A. nidulans* se ha observado el mismo fenómeno de represión catabólica en la biosíntesis de penicilina mediada por la fuente de carbono que en *P. chrysogenum*.

La mejor caracterización del fenómeno de la regulación catabólica por la fuente de carbono en hongos se consiguió en *S. cerevisiae*. La regulación por glucosa en levaduras puede tener lugar mediante la activación o represión a nivel transcripcional o postranscripcional. En levaduras, el represor MIG1, codificado por el gen *Mig1* es el efector responsable de la represión de los genes regulados por glucosa. La proteína MIG1 contiene dominios de unión de tipo dedos de zinc y se une a cajas GC, motivo presente en muchos genes reprimidos por glucosa.

El gen homólogo al *Mig1* en *A. nidulans* se denomina *creA*. El factor regulador o proteína CreA contiene dos dedos de zinc del tipo Cys2-His2 y una región rica en alaninas indicativa de una proteína represora de unión al ADN. La proteína CreA se une a determinadas regiones del ADN con el propósito de modular la expresión génica. Se ha conseguido definir la secuencia de unión consenso para CreA: 5'-SYGGRG-3' (S= C o G; Y= C o T; R= A o G) que coincide en gran medida con la de Mig1: 5'-GCGGRG-3'.

Se ha demostrado que la represión por la fuente de carbono del metabolismo primario es mediada por la proteína reguladora CreA. Sin embargo, la delección de un fragmento de 29 pb protegido por el factor regulador CreA no alteró la represión catabólica en *A. nidulans*, lo que indica que la represión catabólica por la fuente de carbono del gen que codifica la ACV sintetasa (*acvA*) es independiente del represor transcripcional CreA.

Estos resultados sugieren que en la biosíntesis de penicilina en *A. nidulans* está involucrado otro mecanismo de regulación independiente del gen *creA*. Sin embargo, en *P. chrysogenum* una mutación dirigida a los sitios de unión del factor regulador CreA indica que éste tiene un papel importante en la regulación por glucosa en la biosíntesis de penicilina.

La biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* está fuertemente regulada por glucosa, sacarosa y en un nivel más bajo por otros azúcares como la maltosa, fructosa y galactosa. Esta regulación no aparece cuando se utiliza como fuente de carbono la lactosa, por este motivo inicialmente la producción industrial de penicilina en *P. chrysogenum*, fue llevada a cabo utilizando como fuente de carbono lactosa, ya que se comporta de forma contraria a la glucosa, siendo menor el crecimiento en biomasa del microorganismo pero no poseyendo un efecto represor sobre la producción de penicilina. La lactosa no ejerce efecto represor debido, probablemente a una lenta hidrólisis de este azúcar como resultado de la muy baja actividad β -galactosidasa en este hongo.

La glucosa en altas concentraciones reprime la formación del tripéptido ACV (reprimiendo la enzima ACVS) y la represión no es reversible por la adición del ácido α -aminoadípico, cisteína o valina y también reprime la isopenicilina N sintasa, pero no tiene efecto sobre la isopenicilina N aciltransferasa (IAT) (Revilla y col., 1986). También la biosíntesis de penicilina es reprimida por 2-desoxiglucosa. Este análogo de glucosa es fosforilado a 2-desoxiglucosa-6-fosfato pero parece que no es metabolizado en la ruta glucolítica.

Martín y colaboradores (1999) demostraron que los niveles de ARN mensajero de los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE* están drásticamente reducidos en presencia de glucosa. Además los cultivos crecidos con glucosa como fuente de carbono muestran niveles reducidos del ácido α -aminoadípico, aparentemente causado por estimular la biosíntesis del aminoácido lisina y estimular a su vez el crecimiento del microorganismo (Revilla y col., 1984). En el año 1988 se aisló un mutante de *P. chrysogenum* (Barredo y col., 1988) desregulado en la represión ejercida por la glucosa sobre la biosíntesis de penicilina. Este mutante es incapaz de fosforilar la D-glucosa, lo que sugirió que podría carecer de la actividad glucoquinásica. En relación con esta hipótesis, se demostró que la hexoquinasa II de *S. cerevisiae* posee un importante papel en la represión catabólica ejercida por la glucosa en levaduras (Entian y col., 1984; Gancedo, 1998). Este hecho en hongos filamentosos no está del todo aclarado (Ruijter y col., 1997) dado que una deficiencia en la hexoquinasa provoca una disminución de la tasa de toma de glucosa, con lo que su efecto sobre la biosíntesis de penicilina podría explicarse en términos de una reducción de captación del compuesto represor.

Todas las evidencias disponibles sugieren que la regulación catabólica por fuente de carbono en la biosíntesis de penicilina es ejercida por una proteína reguladora, el factor transcripcional CreA que regula la producción de penicilina mediante dos mecanismos; uno indirecto, controlando el metabolismo general del hongo y otro directo regulando la expresión del gen *pcbAB* uniéndose a las cajas creA. La mutación de las cajas creA presentes en la región intergénica *pcbAB-pcbC* disminuye la tasa de represión de, al menos, el primer gen de la ruta biosintética de penicilina. Actualmente, el problema de la represión por glucosa ha sido parcialmente superado usando como fuente de carbono glucosa pero en dosis no represoras. De este modo la producción de penicilina es favorecida bajo condiciones subóptimas para el crecimiento del microorganismo (Demain y col., 1998).

1.7.2.1.3. Regulación por la fuente de nitrógeno. Regulador transcripcional NRE.

La represión por la fuente de nitrógeno en hongos es un ejemplo de un mecanismo regulador global necesario para la coordinación de la expresión de los genes que aseguren un aporte de fuente de nitrógeno necesario para el crecimiento en respuesta a cambios medioambientales. El ión amonio y la glutamina o el glutamato son las fuentes de nitrógeno preferiblemente usadas por los hongos.

En ausencia de fuentes de nitrógeno favorables se inicia una síntesis *de novo* de permeasas y enzimas catabólicas, cuya expresión es altamente regulada por el circuito regulador que permiten el uso de las fuentes de nitrógeno secundarias, como pueden ser nitratos, purinas, proteínas y amidas (Marzluf, 1993; Caddick y col., 1994).

En el hongo *Neurospora crassa* la regulación por la fuente de nitrógeno es llevada a cabo por el producto del gen *nit-2* (Fu y col., 1990) y en *A. nidulans* por el producto del gen *are A* (Kudla y col., 1990). Ambos genes codifican para los factores reguladores que contienen un dedo de zinc tipo Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys.

En *P. chrysogenum* la regulación por la fuente de nitrógeno es mediada por el producto del gen *nre*, homólogo a los genes *nit-2* y *areA* (Hass y col., 1995). Los factores transcripcionales de los genes reguladores reconocen una secuencia consenso GATA en el ADN (Marzluf, 1997). En el hongo *P. chrysogenum* hay seis secuencias o cajas GATA en el promotor bidireccional *pcbAB-pcbC* aunque se ha descrito que el producto del gen *nre*, el factor regulador NRE, sólo interactúa fuertemente con sólo dos de ellas (Haas y Marzluf, 1995). Cabe pensar, por lo tanto, que la regulación de la biosíntesis de penicilina esté mediada por la misma proteína reguladora NRE que participa en el circuito regulatorio de la fuente de nitrógeno.

1.7.2.1.4. Regulador transcripcional PENR1.

De los circuitos reguladores conocidos, algunos de ellos han sido encontrados mediante el análisis de mutantes (*creA*, *pacC*) o mediante análisis bioquímicos o fisiológicos (*nre*). El análisis delecional de la región intergénica entre los genes *pcbAB* y *pcbC* en *A. nidulans* ha revelado la presencia de otro factor transcripcional denominado PENR1 (PENicillin Regulator 1) que se une específicamente a la secuencia que contiene la caja 5'-CCAAT-3'.

La delección de la región que contiene la secuencia 5'-CCAAT-3' de la región intergénica *pcbAB-pcbC* o el cambio de cuatro pares de bases, provoca el incremento de hasta ocho veces, la expresión del gen *pcbAB* y una reducción simultánea del 30 % del nivel normal de la expresión del gen *pcbC*. Estos datos indican que la proteína PENR1 está involucrada en la expresión de los genes de la biosíntesis de penicilina en *A. nidulans* y que la secuencia de la unión del PENR1 manifiesta un efecto opuesto en la expresión de los genes *pcbAB* y *pcbC*.

Las cajas CCAAT están presentes en los promotores de aproximadamente el 30 % de los genes de eucariotas y son sitios de unión de diferentes factores transcripcionales.

Los complejos de unión a la secuencia 5'-CCAAT-3' se denominan HAP, AnCF, CBF o NF-Y. Son requeridos para la activación de un amplio grupo de genes y fueron caracterizados inicialmente en *S. cerevisiae* y posteriormente en *A. nidulans* (Papagiannopoulos y col., 1996). Este complejo, en *S. cerevisiae*, está formado por cuatro subunidades, HAP2, HAP3, y HAP5, (formando un complejo heterotrimérico esencial para la unión al ADN) y HAP4, que es una proteína ácida que actúa como el dominio de activación transcripcional.

Estudios realizados por Brakhage y colaboradores (1998) identificaron el complejo HAP en *A. nidulans* (denominado PENR1) (Steidl y col., 1999; Bergh y col., 1996; Litzka y col., 1999). La delección o mutagénesis de los sitios de unión de la proteína PENR1 (409 pb corriente arriba del codon de iniciación del gen *pcbAB*) incrementó hasta un valor de ocho veces la expresión del gen *acvA*, mientras la expresión del gen *ipnA*, fue reducida hasta un 30 % del valor normal (Bergh y col., 1996). En resumen, la caja CCAAT I media un efecto positivo en la expresión del gen *acvA* y un efecto negativo sobre el gen *ipnA*.

Otra caja CCAAT II, que es reconocida por el complejo proteico PENR1 está localizada 250 pb aguas arriba del inicio de la transcripción del gen *penDE*. La sustitución de la secuencia 5'-CCAAT-3' por 5'-GATCC-3', resulta en una reducción de la expresión de este gen (Litzka y col., 1996).

En *P. chrysogenum*, el complejo HAP está formado por los factores transcripcionales HAPB (fuerte similitud a la proteína HAPB de *A. nidulans*), HAPC (fuerte similitud a la proteína HAPC que se une a la secuencia 5'-CCAAT-3' de *Aspergillus oryzae*) y HAPE (fuerte similitud a la proteína HAPE de *A. oryzae*).

La contribución real del complejo PENR1 al control de la expresión de los genes de biosíntesis de penicilina no está muy clara. La delección del complejo PENR1 debería permitir niveles de transcripción más altos del gen *pcbAB* e incrementar la producción de penicilina en *A. nidulans*, donde es conocido que la expresión del gen *pcbAB* es limitante en la producción de penicilina.

1.7.2.1.5. Regulador transcripcional PTA1.

En *P. chrysogenum*, la expresión de los dos primeros genes de la ruta biosintética de penicilina, *pcbAB* y *pcbC*, se deben expresar de forma coordinada ya que ambos muestran un modelo regulatorio y de expresión similar.

El análisis de la secuencia de ADN de la región intergénica de estos dos genes revela la presencia de múltiples secuencias reguladoras que actúan en *cis* y que son objetivo de diversos reguladores transcripcionales como se ha visto hasta ahora. Así, un total de siete secuencias consenso para PacC, seis para CreA, seis para NRE y seis cajas CCAT son distribuidas a lo largo de la región del promotor bidireccional (Figura 1.15).

Estudios realizados sobre la región intergénica muestran que al menos hay cuatro regiones que parecen ser importantes en la regulación de la expresión del promotor del gen *pcbAB*. Cuando se delecciona la región más distal del promotor *pcbAB* (posición -933 a -789 en referencia al punto de inicio de la transcripción), el resultado es un incremento de la expresión del gen *pcbAB* en un medio donde se ha utilizado como fuente de carbono lactosa. Además, hay otras tres regiones importantes en la regulación del promotor denominadas cajas A, B y C que producen un bajo nivel de expresión cuando son deleccionadas tanto si se utiliza como fuente de carbono glucosa o lactosa.

Dos de estas regiones contienen secuencias que actúan en *cis* (cajas A y B). Ambas cajas contienen la mayoría de los motivos de unión al ADN de las diferentes proteínas que actúa como factores reguladores de la expresión génica (Martín y col., 1999) (Figura 1.15).

En la caja A aparece una secuencia heptamérica (TTAGTAA), que es el sitio de unión para una proteína reguladora denominada PTA1 (“Penicillin Transcriptional Activator 1”). La deleción de la secuencia heptamérica provoca una drástica reducción de la expresión del gen *pcbAB*, por lo que este factor regulador es requerido para un alto nivel de expresión del gen *pcbAB* (Kosalková y col., 2000). La secuencia 5'-TTAGTAA-3', se parece a las secuencia del factor regulador BAS2 (PHO2) requerido para la expresión de diversos genes en levaduras (Tice-Baldwin y col., 1989).

1.7.2.1.6. Regulador transcripcional *penRFX*.

Recientemente se ha identificado un nuevo factor transcripcional en el hongo *A. chrysogemum* (CpcR1) y que muestra gran homología con la familia de factores reguladores en animales (RFX) (Gajiwala y Burley., 2000).

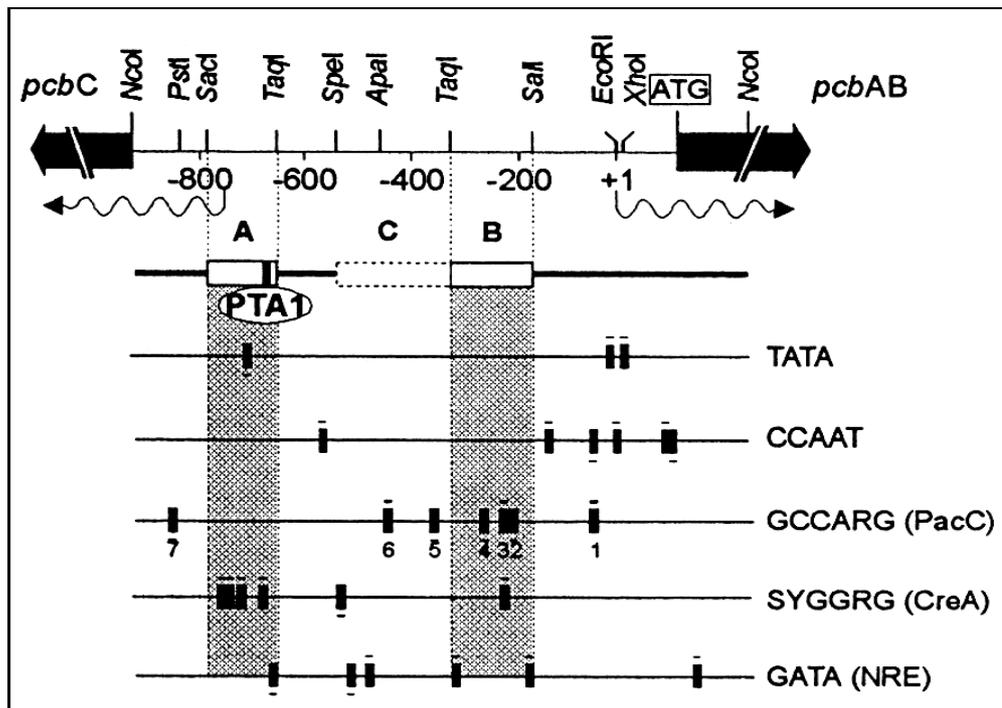


Figura 1.15: Esquema donde se muestra: la localización de las cajas TATA y CCAAT, las secuencias consenso de los reguladores transcripcionales PacC, CreA y NRE, las regiones correspondientes a las cajas A y B, que están sombreadas y se indica la unión del activador transcripcional PTA1 a la caja A y la transcripción de los genes *pcbAB* y *pcbC*, que están indicadas por líneas onduladas bajo el mapa de restricción (Kosalková y col., 2000).

En *A. chrysogenum*, la proteína CPC1 se une a una secuencia palindrómica imperfecta en la región promotora de los genes *pcbAB-pcbC*. La localización del sitio de unión de la proteína es aproximadamente 350 pb corriente arriba del lugar de inicio de la transcripción del gen *pcbC*, lo que sugiere que el factor de transcripción CPC1 está involucrado en la regulación de la ruta biosintética de cefalosporina C.

El gen homólogo del *cpcR1* de *A. chrysogenum* se ha identificado en *P. chrysogenum* (*penRFX*) el cual presenta una homología del 60 % con el gen *cpcR1*. Hasta el momento, muy poco se sabe del posible papel regulador *penRFX* en la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*, pero los resultados de nuestro laboratorio indican que está implicado en el control transcripcional de los genes biosintéticos y de la biosíntesis de este antibiótico (Rebeca Domínguez Santos, Carlos García-Estrada y Juan Francisco Martín, resultados no publicados).

1.7.2.1.7. Regulador global *LaeA*.

En *P. chrysogenum* se ha identificado el gen que codifica un regulador global del metabolismo secundario denominado *LaeA*. Este gen codifica una proteína nuclear (PcLaeA) con un dominio metiltransferasa. El gen *LaeA* está presente como copia única en el genoma de cepas de baja y alta producción de penicilina y no está localizado en la región amplificada de 56,8 kb donde se encuentra el *cluster* de genes de biosíntesis de penicilina en las cepas de alta producción de este antibiótico, lo que significa que no ha ocurrido amplificación génica en el proceso de selección de las cepas de alta producción (Kosalková y col., 2009).

Estudios realizados de sobreexpresión de este gen dieron como resultado un incremento de un 25 % en la producción de penicilina, lo que indica que la proteína PcLaeA actúa como un regulador de la expresión del *cluster* de genes de biosíntesis de penicilina. Estudios realizados en mutantes donde se había interrumpido el gen dieron como resultado un descenso drástico de la producción de penicilina, una baja pigmentación y esporulación. Estos resultados evidencian que el gen *LaeA* codifica un regulador global transcripcional que afecta a la esporulación, pigmentación y biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* (Kosalková y col., 2009).

1.7.2.2. Regulación por aminoácidos.

La penicilina es sintetizada a partir de tres aminoácidos precursores, la L-cisteína, L-valina y el L- α -aminoadípico (α -AAA), por lo que estos compuestos tienen un papel importante en su regulación. Altas concentraciones de lisina reducen la producción de penicilina (Demain, 1957; Luengo y col., 1979). En *P. chrysogenum*, las rutas biosintéticas de la penicilina y de la lisina tienen varias etapas en común. El punto de ramificación de las dos rutas es el ácido α -aminoadípico. En la biosíntesis del aminoácido lisina este ácido es convertido en α -aminoadipato- δ -semialdehído mediante la enzima α -aminoadipato reductasa, mientras que en la ruta de la biosíntesis de la penicilina, el ácido α -aminodípico es condensado junto con L-valina y L-cisteína dando lugar al tripéptido ACV. La L-lisina ejerce la inhibición de la biosíntesis de penicilina en varios pasos. Masurekar y Demain, describieron en 1974 que la primera enzima de la ruta biosintética de la lisina en *P. chrysogenum*, la homocitrato sintasa, era inhibida por el aminoácido lisina.

Resultados similares fueron descritos por otros investigadores (Friedrich y Demain, 1978; Luengo y col., 1979). Jaklitsch y Kubicek (1990), describieron la presencia de inhibición por lisina de la homocitrato sintasa.

Las diferencias observadas entre los distintos grupos pueden deberse a las cepas de *P. chrysogenum* utilizadas. La lisina también inhibe la actividad de la α -aminoadipato reductasa y se ha observado que esta inhibición se producía en mayor o menor intensidad según la cepa estudiada (Affenzeller y col., 1989). El hecho de que algunas enzimas de la biosíntesis de lisina sean inhibidas mediante el proceso de retroalimentación ejercido por la L-lisina, ocasiona una reducción del flujo de α -AAA disponible para la producción de penicilina (Brakhage, 1998). El α -AAA tiene un papel importante en la biosíntesis de penicilina, puesto que la adición del α -aminoadipato externo (Friedrich y Demain, 1978) u otras condiciones que incrementan el flujo intracelular de α -AAA (Hönliger y Kubicek, 1989) aumentan la tasa de ACV y de biosíntesis de penicilina. Las cepas de alta producción de penicilina de *P. chrysogenum* presentan altos niveles de flujo intracelular de α -AAA (Jaklitsch y col., 1986). Mediante la disrupción génica del gen *lys2*, que codifica para la enzima aminoadipato reductasa, Casqueiro y colaboradores (1999), han conseguido aumentar el flujo de α -AAA disponible para la biosíntesis de penicilina.

1.7.2.3. Regulación por la adición de líquido de maceración del maíz (CSL).

El líquido de maceración del maíz (Corn steep liquid o CSL) es un subproducto de la manufactura del almidón de maíz y viene siendo empleado como ingrediente de los medios de cultivo microbiológico desde hace muchos años.

El CSL es el líquido resultante del proceso de molienda húmeda del maíz para la fabricación del almidón y del gluten. Toda el agua empleada en sucesivas operaciones a lo largo de la manufactura del almidón va arrastrando compuestos solubles contenidos en un principio en el grano y que han de separarse de los productos finales: almidón, gluten, germen y fibra.

La adición de CSL al medio de producción de *P. chrysogenum* estimula la producción de penicilina (Ligget y Koffer, 1948). Una explicación de las propiedades básicas del CSL podría ser que en su composición hay un alto contenido en aminoácidos, polipéptidos, minerales y ácido láctico que favorecen la biosíntesis de penicilina. Las búsquedas de los compuestos simples, que son parte de esta mezcla tan compleja y que son responsables del efecto positivo que provoca su adición en el medio de fermentación, han sido infructuosas (Demain, 1999),

debido en parte al fenómeno de la variabilidad en los CSL de diferente origen y debido a las enormes oscilaciones del porcentaje en la composición de éste dependiendo de la intensidad de la fermentación que tiene lugar en la fabricación del CSL. Según Ligget y Koffer (1948), la fracción proteica del CSL tiene el importante papel de servir como fuente de nitrógeno al organismo *P. chrysogenum*. Los aminoácidos presentes no parecen tener proporciones constantes dependiendo del tipo de maíz del que proceden y del grado de solubilidad proteica que hayan sufrido.

1.7.2.4. Regulación mediada por el oxígeno.

Para la producción de penicilina, conseguir una buena aireación del micelio con oxígeno es una de las condiciones imprescindibles. Diversas enzimas como la isopenicilina N sintasa requieren oxígeno para su actividad. Sin embargo, el análisis transcripcional descrito por Renno y colaboradores (1992) demostró que la expresión de los genes *pcbAB* y *pcbC* en *P. chrysogenum* puede ser también inducida, como la respuesta al estrés, por la reducción de los niveles de oxígeno.

1.7.2.5. Regulación mediada por la fuente de fósforo.

El efecto represor de la glucosa sobre la biosíntesis de penicilina depende de la concentración del fosfato inorgánico en el medio de fermentación. En el medio complejo de fermentación con la fuente de fósforo limitada, el efecto represor es del 13 % cuando la fuente de carbono (glucosa) es añadida en el tiempo de inoculación, mientras que se incrementa hasta un 59 % cuando el medio es suplementado a la vez con glucosa y con fosfato inorgánico a una concentración de 100 mM. La adición de fosfato inorgánico a una concentración de 100 mM no tiene efecto sobre la producción de penicilina en medios con la concentración de glucosa limitada o con lactosa como fuente de carbono (Martín y col., 1999).

2. Compartimentalización de la biosíntesis de penicilina.

Las diferentes reacciones bioquímicas involucradas en la biosíntesis de penicilina ocurren en diferentes orgánulos celulares (revisado por van de Kamp y col., 1999), lo que significa que los sustratos y las enzimas de biosíntesis están separadas físicamente.

Esta organización implica el transporte de enzimas y precursores a través de los orgánulos celulares además de crearse distintas condiciones medioambientales específicas para cada paso de las reacciones de biosíntesis.

2.1. Localización de la ACVS.

Como ya se ha indicado en apartados anteriores, el primer paso en la ruta de biosíntesis de penicilina consiste en la formación del tripéptido ACV por condensación no ribosómica de los tres aminoácidos que lo conforman (ácido L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina), llevada a cabo por la enzima ACVS.

Estudios iniciales localizaban esta enzima asociada a estructuras membranosas del aparato de Golgi (Kurylowicz y col., 1987). Posteriormente, mediante experimentos de fraccionamiento celular, se localizó la enzima ACVS en el interior de vacuolas o vinculada a la membrana de éstas (Müller y col., 1991; Lendenfeld y col., 1993).

La purificación de la ACVS mostró que esta enzima era soluble (aunque altamente inestable) en ausencia de detergentes y que además, su actividad no parecía depender de la presencia de detergentes o de lípidos (van Liempt y col., 1989; Baldwin y col., 1990; 1991; Theilgaard y col., 1997). Un posterior análisis de la secuencia de aminoácidos de la ACVS mostró que era una proteína hidrofóbica, pero que no contenía ninguna región transmembrana (Lendelfeld y col., 1993) ni ninguna señal de localización (*targeting*) reconocible a retículo endoplásmico o vacuolas (van de Kamp y col., 1999).

Todos estos hechos hicieron replantearse de nuevo la localización de esta proteína y se realizaron más experimentos empleando las técnicas tradicionales de fraccionamiento, las cuales no mostraron ningún resultado claro dada la inestabilidad de la ACVS y su sensibilidad a la degradación proteolítica. La mejora de los protocolos de lisis celular, unida al uso de la técnica de inmunocitoquímica asociada a la microscopía electrónica, permitieron la localización subcelular de la proteína ACVS en el citosol (van der Lende y col., 2002a). En *A. nidulans*, se ha conseguido además mostrar la localización de la ACVS en el citosol fusionándola a una proteína verde fluorescente (Vousden y Turner, 2001; Evers y col., 2004). Esta localización citosólica está más acorde con las propiedades bioquímicas que se conocían de la ACVS, entre ellas un pH neutro (el pH de las vacuolas es ácido), requerimiento de cofactores y sensibilidad a proteasas (la vacuola tiene gran actividad proteolítica).

2.2. Localización de la IPNS.

El segundo paso de la biosíntesis de penicilina consiste en la ciclación oxidativa de LLD-ACV a IPN, catalizada por una proteína de 38 KDa denominada IPN sintasa o ciclasa (IPNS). Los resultados de los experimentos de fraccionamiento mostraron claramente que la IPNS era una enzima soluble y citosólica (Müller y col., 1991; Kurzatkowski y col., 1991). Esta localización está de acuerdo con la ausencia de regiones transmembrana y de señales de localización específicas en la secuencia aminoacídica deducida de la enzima (Ramón y col., 1987; Barredo y col., 1989b) y también, con todas las características bioquímicas y estructurales conocidas de la misma (Martín y Liras, 1989a; Roach y col., 1995; 1997). Esta enzima ha sido localizada también en el citosol utilizando técnicas de microscopía electrónica (Müller y col., 1991; Van der Lende y col., 2002a).

La presencia de la IPNS en el citosol implica que puede utilizar directamente como sustrato el LLD-ACV producido por la ACVS. Se ha planteado que estas dos enzimas, ACVS e IPNS, podrían estar organizadas formando un metabolón o gran complejo, pero esto es algo de lo que no se tiene ninguna evidencia experimental.

2.3. Localización de la IAT.

El tercer y último paso de la síntesis de penicilinas es el intercambio, catalizado por la acil-CoA: isopenicilina N aciltransferasa (IAT), de la cadena lateral L- α -aminoadípico de la IPN por el grupo fenilacetilo o fenoxiacetilo activado con Coenzima A, resultando la formación de bencilpenicilina o fenoxipenicilina, respectivamente. Estudios bioinformáticos muestran que una de las dos subunidades que forman la IAT (la subunidad de 29 KDa), una vez realizado el procesamiento autocatalítico de la pre-proteína de 40 KDa (Aplin y col., 1993a;b), posee en el extremo carboxilo terminal una señal PTS1, lo cual localiza esta enzima en la matriz peroxisomal. Por tanto, el sustrato de esta enzima, la IPN, tiene que entrar en el peroxisoma para poder ser convertida en bencilpenicilina o fenoxipenicilina.

El uso de técnicas inmunocitoquímicas asociadas a la microscopía electrónica ha permitido localizar a la IAT en el interior de los peroxisomas (Müller y col., 1991; 1992; 1995, García-Estrada y col., 2008a). Se ha demostrado que el transporte de la enzima IAT al interior del peroxisoma no depende del estado de procesamiento de la enzima ya que un mutante no procesable de la IAT (variante IAT^{C103S}) se transporta activamente al interior del peroxisoma

aunque no sea activo (García-Estrada y col., 2008a). Finalmente la localización de la IAT y dos fenilacetil-CoA ligasas (encargadas de la activación de la cadena lateral) en el interior de los peroxisomas, ha sido confirmada por aislamiento físico de estos orgánulos e identificación de las proteínas perixomales, mediante espectrometría de masas (Kiel y col., 2009).

2.4. Otras enzimas implicadas en la biosíntesis de penicilina.

Además de las tres proteínas de la ruta biosintética de penicilina, existen algunas enzimas implicadas en el metabolismo primario que son necesarias para la formación de la penicilina. Tres de las más importantes son la fosfopanteteinil transferasa (PTTasa), la fenilacetil-CoA ligasa (PCL) y la disulfuro reductasa.

La ACVS es sintetizada como una apoproteína inactiva, cuya activación se logra mediante la adición de 4'-fosfopanteteína a través de la PPTasa.

Esta clase de enzimas son las responsables de la modificación postraducciona de enzimas implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos, policétidos y péptidos no ribosómicos. Por lo tanto, la enzima PTTasa es necesaria para la biosíntesis de penicilina tanto en *A. nidulans* (Lambalot y col., 1996; Keszenman-Pereyra y col., 2003; Márquez-Fernández y col., 2007), como en *P. chrysogenum* (García-Estrada y col., 2008b). Además de activar a la enzima ACVS, la PTTasa activa también en el citosol a la enzima α -aminoadipato reductasa que convierte el α -aminoadipato en α -aminoadipato semialdehído en la ruta biosintética de la lisina en hongos (Casqueiro y col., 1998; Ehmann y col., 1999; Guo y col., 2001).

Para que se lleve a cabo la reacción de sustitución catalizada por la IAT, los ácidos fenilacético (AFA) o fenoxiacético (POA) que van a actuar como precursores de la cadena lateral, tienen que estar activados en sus correspondientes tioésteres. Teóricamente, esta activación la puede realizar una enzima de actividad acil-CoA sintetasa (ACS) o de actividad PCL. En 1997, se identificó una enzima PCL que contenía una señal PTS1 (SKI) de localización en peroxisomas (Gledhill y col., 1997). Años más tarde, se consiguió clonar el gen *phl* que codificaba esta enzima PCL, y se comprobó su actividad PCL y su implicación de forma directa en la ruta biosintética de penicilina (Lamas-Maceiras y col., 2006). También se encontró que no era la única enzima que presentaba esta actividad en el microorganismo, ya que aunque su inactivación suponía una notable reducción, no bloqueaba completamente la biosíntesis de penicilina (Lamas-Maceiras y col., 2006).

De hecho, también se ha clonado en *P. chrysogenum* un segundo gen implicado en la activación del ácido fenilacético, el gen *phlB*, el cual codifica una proteína que posee actividad PCL y una señal de localización peroxisomal en su extremo carboxilo terminal (Wang y col., 2007). Sin embargo, un reciente estudio de Koetsier y colaboradores (2010) ha puesto en evidencia que este gen (también denominado *acIA*) no interviene en la activación del ácido fenilacético y por tanto, en la biosíntesis de penicilina, tratándose de un gen que codifica una acil-CoA ligasa de amplio espectro que activa ácido adípico. La localización subcelular en peroxisomas de la PCL es ventajosa ya que es la misma localización que posee la IAT. Además, puesto que los ácidos fenilacético y fenoxiacético muy probablemente difunden a través de la membrana peroxisomal, su activación proporciona un método muy útil para acumularlos en este microcuerpo en concentraciones más altas que en el citosol sin ejercer efectos tóxicos. Una vez que el tripéptido ACV se sintetiza en la célula tiende a formar el dímero bis-ACV, lo cual le impide continuar la ruta biosintética puesto que la IPNS sólo admite como sustrato la ACV monomérica. Más aún, el bis-ACV inhibe la actividad de la ACVS (Theilgaard y col., 1997). La reincorporación del bis-ACV a la biosíntesis de penicilina es posible por la acción de un sistema tiorredoxina disulfuro reductasa (TrxAB) dependiente de NADPH. Este sistema está presente en el citosol y ha sido caracterizado en *P. chrysogenum* a nivel genético y proteico (Cohen y col., 1994).

2.5. Importancia de la compartimentalización de la biosíntesis de penicilina.

La organización subcelular de la biosíntesis de penicilina en diferentes compartimentos permite la regulación y la optimización de los procesos implicados. El elevado rendimiento de la producción de penicilina en las cepas industriales supone un elevado gasto de precursores y cofactores tales como CoA, ATP y NADPH (Hersbach y col., 1984; Nielsen, 1995). La compartimentalización facilita la canalización de los cofactores necesarios y de los precursores procedentes del metabolismo primario (aminoácidos) hacia la ruta metabólica específica de la biosíntesis de penicilina, en lo que se conoce como control del flujo metabólico por una barrera física.

2.5.1. Importancia de los peroxisomas en la ruta biosintética de penicilinas.

La razón exacta de porqué el último paso de la ruta biosintética de penicilina se realiza en el interior del peroxisoma no está clara. Lo que sí se conoce es que este hecho proporciona

una serie de condiciones favorables que pueden explicar que ocurra de este modo. Por ejemplo, crea un entorno específico para las enzimas que actúan en él. El pH óptimo de la IAT y la PCL está para ambas enzimas en un rango (pH 8,2) ligeramente alcalino (Álvarez y col., 1993; Lamas-Maceiras y col., 2006).

El pH de los microcuerpos de *P. chrysogenum* se ha investigado con experimentos de fluorescencia y se ha concluido que el pH es ligeramente alcalino (pH 7.0 – 7.5) (van der Lende y col., 2002b), lo cual está en concordancia con el pH óptimo de las enzimas biosintéticas mencionadas.

Otras posibles ventajas para la compartimentalización de algunos pasos enzimáticos pueden ser las altas concentraciones de proteínas y sustratos que se encuentran en los peroxisomas y que favorecen las reacciones que catalizan estas enzimas, la prevención de la pérdida de intermediarios de estas rutas por derivatización de los mismos a rutas laterales no deseadas y la regulación de la ruta biosintética.

La importancia de los peroxisomas en la biosíntesis de penicilina fue evidente cuando se demostró que la IAT estaba localizada en este orgánulo (Müller y col., 1991). Tratando de delimitar las implicaciones de esta localización, se realizaron unos experimentos en los que, tras la eliminación de la señal de localización a peroxisomas, se observaba que la IAT permanecía en el citosol interrumpiéndose en estas condiciones la producción de penicilina, pese a que la enzima se expresaba *in vivo* y se mostraba activa *in vitro* (Müller y col., 1992).

La explicación más factible a estos resultados es que la activación del precursor por la PCL tiene lugar en el interior peroxisomal y por tanto, al estar la IAT en el citosol, estos precursores activados se encuentran fuera de su alcance. Otra explicación que se planteó en su momento fue que la IAT no era capaz de desarrollar su actividad catalítica en el citosol. La obtención de un mutante de *A. nidulans* que carece de peroxisomas funcionales y que mantiene la producción de penicilina con las enzimas del peroxisoma localizadas en el citosol (De Lucas y col., 1997) hace que esta posibilidad sea menos probable.

Además, estos resultados sugieren que los peroxisomas no son esenciales para la producción de la penicilina *per se*, pero que existe una correlación positiva entre el rendimiento de la producción de penicilina y el número de peroxisomas. La razón de esta correlación no se conoce, pero podría deberse a un incremento en la cantidad de enzimas de esta ruta biosintética (Evers y col., 2004).

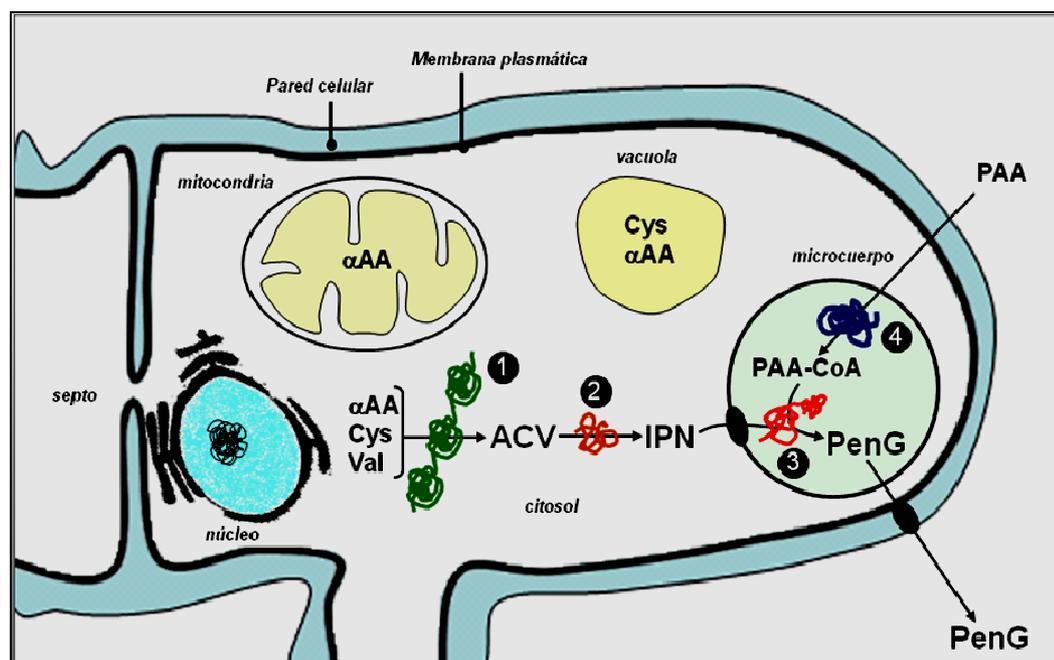


Figura 1.16: Compartimentalización de la ruta biosintética de penicilina. Representación esquemática mostrando los pasos enzimáticos y los orgánulos involucrados en la ruta biosintética de penicilina. (1)ACV sintetasa. (2)IPN sintetasa. (3)IPN aciltransferasa. (4) fenilacetil-CoA (aryl-CoA) ligasa. PAA-CoA, (fenilacetil-CoA). α AA, (L- α -aminoadípico). Cys, (L-cisteína). Val, (L-valina). PAA, (ácido fenilacético (AFA)). PenG, (bencilpenicina).

En la Figura 1.16 se muestra un esquema de la localización de las enzimas de la ruta biosintética de penicilinas y de los procesos de transporte necesarios para que se lleve a cabo. Una evidencia clara de la importancia de estos microcuerpos en la biosíntesis de penicilina ha sido subrayada a través de la alteración del número y forma de estos orgánulos como resultado de la sobreexpresión de la proteína Pc-Pex11p (una peroxina que está involucrada en la abundancia de peroxisomas). La sobreexpresión de esta proteína se traduce en un incremento en la biosíntesis de penicilina. Este efecto positivo viene a estar relacionado con un aumento en el transporte de penicilina y/o de los precursores a través de los peroxisomas, (Kiel y col., 2005), lo cual evidencia que el transporte a través de membrana en los orgánulos es muy importante.

2.5.2. Importancia de otros orgánulos en la biosíntesis de penicilina.

Además de los peroxisomas, orgánulos como la mitocondria y las vacuolas son de cierta importancia en la biosíntesis de penicilina. La vacuola fúngica está implicada en una amplia

variedad de procesos celulares (Klionsky y col., 1990), entre los que se encuentran el control activo de la concentración en el citosol de muchos y muy diferentes componentes.

La mayor parte de los aminoácidos libres básicos y neutros, y una parte sustancial de los aminoácidos ácidos, están localizados en las vacuolas (Klionsky y col., 1990; Kubicek-Pranz y Kubicek, 1991). Estudios acerca de los niveles de aminoácidos utilizados en la biosíntesis de penicilina en el citosol indicaban que existía una transferencia elevada desde las vacuolas (Jaklitsch y col., 1986; Hönlinger y Kubicek, 1989; Kubicek y col., 1990; Affenzeller y Kubicek, 1991; Lendenfeld y col., 1993). Además, el ácido L- α -aminoadípico y la L-cisteína son tóxicos a concentraciones moderadas, siendo por tanto sus niveles citosólicos cuidadosamente regulados a través de su almacenamiento en la vacuola (Klionsky y col., 1990; Kubicek-Pranz y Kubicek, 1991). El transporte a través de la membrana de la vacuola tanto al interior como al exterior, implica un sistema de antiporte de tipo H⁺-aminoácido, el cual está presente en la membrana vacuolar fúngica (Klionsky y col., 1990; Harvey y Nelson, 1992).

2.5.3. Transporte a través de la membrana plasmática.

La pared celular fúngica está compuesta por una capa de polímeros que rodean la membrana plasmática (Kuhn y col., 1989; Losel, 1989; Ruiz-Herrera, 1992; Sentandreu y col., 1994; Sietsma y Wessels, 1994; Gooday, 1995a; van der Rest y col., 1995).

La pared celular puede ser atravesada libremente por solutos con un tamaño menor de 700 KDa, aunque este límite podría ser mucho mayor (de Nobel, 1991; de Nobel y Barnett, 1991). La membrana plasmática forma la barrera principal entre el medio y el citosol (Kuhn y col., 1989; Gooday, 1995b; van der Rest y col., 1995).

El mayor componente lipídico de la membrana plasmática fúngica son los glicerofosfolípidos, los cuales se encuentran combinados con una cantidad de esteroides que es característicamente alta en hongos y que compactan el empaquetamiento lipídico, y también con pequeñas cantidades de esfingolípidos glicolípidos (van den Bossche, 1989; Lösel, 1989; Hillenga y col., 1994; Gooday, 1995b; van der Rest y col., 1995).

El transporte a través de la membrana plasmática fúngica puede ocurrir por difusión pasiva (principalmente para los compuestos relativamente hidrofóbicos) o por un transporte mediado por proteínas. Las fuerzas conductoras para el transporte activo en hongos son tanto gradientes electroquímicos (transporte secundario) como hidrólisis de ATP (transporte primario)

(van der Rest y col., 1995; Krämer, 1996). Por tanto, una característica importante que afecta al transporte es el pH del citosol.

En *P. chrysogenum*, el pH intracelular se mantiene aproximadamente entre 7.0-7.2 (Henriksen, 1996). En *A. nidulans*, se midió el pH interno creciendo el hongo a diferentes pHs del medio de cultivo, entre 3.5 y 8.0. Se observó que el pH intracelular permanecía entre los valores 5.7-6.6, ilustrando la gran estabilidad del pH interno (Caddick y col., 1986). Por otro lado, se sabe que la biosíntesis de penicilina se encuentra regulada transcripcionalmente por el pH externo (Chu y col., 1997; Brakhage, 1997; 1998).

2.5.4. Transporte de precursores: aminoácidos y ácido fenilacético.

Los hongos filamentosos pueden sintetizar cualquier aminoácido, pero también son capaces de incorporarlos del medio de cultivo al interior celular para usarlos como fuente de nitrógeno y de carbono o como unidades estructurales para la síntesis de proteínas y péptidos (Horak, 1986), estando implicadas en este proceso permeasas activas de aminoácidos.

La mayoría de las permeasas fúngicas de aminoácidos muestran similitudes muy significativas en la secuencia y forman una única familia conocida como AAP (permeasas de aminoácidos) (Andre, 1995), que pertenece a la superfamilia de proteínas APC (aminoácidos/poliaminas/organocaciones) (Jack y col., 2000). Las permeasas tienen una estructura común con 12 posibles segmentos α -hélice transmembrana y regiones hidrofílicas en los extremos carboxilo y amino terminal localizadas en el citoplasma (Horak y Wolf, 1997; Regenbergl y col., 1999). La incorporación de aminoácidos transcurre a través de un transporte secundario, mediante un gradiente electroquímico de protones como fuerza conductora que permite dicha incorporación contra el gradiente de concentración (Seaston y col., 1973; Andre, 1995; Jack y col., 2000).

En *P. chrysogenum*, se han clonado y caracterizado tres permeasas de aminoácidos (Trip y col., 2002) y se han determinado y clasificado otras actividades en base a ensayos de competición y transporte. Se han publicado hasta el momento nueve sistemas de transportadores de aminoácidos: sistema I para la L-metionina (Benko y col., 1967), sistema II para la L-cisteína (Skye y Segel, 1970), sistema III para todos los aminoácidos (Benko y col., 1969; Hunter y Segel, 1971), sistema IV para aminoácidos ácidos; sistema V para la L-prolina; sistema VI para L-lisina y L-arginina, sistema VII para L-arginina, sistema VIII para L-lisina y sistema IX para L-cisteína (Hunter y Segel, 1971).

La incorporación del aminoácido ácido α -aminoadípico podría ser realizada mediante ambos sistemas, el sistema de transporte de aminoácidos ácidos (Hunter y Segel, 1971) y un sistema de transporte de aminoácidos general (Horak, 1986). Estudios más recientes muestran que la permeasa general de aminoácidos es la principal ruta para la incorporación a la célula de este aminoácido (Evers y col., 2004).

Los ácidos fenilacético y fenoxiacético son ácidos débiles que entran rápidamente en las células de *P. chrysogenum* mediante difusión pasiva y se distribuyen a lo largo de la membrana de acuerdo con el gradiente transmembrana de pH (Eriksen y col., 1995; Hillenga y col., 1995). Este hecho, actualmente aceptado, fue durante un tiempo objeto de discusión pues otros autores habían postulado un transporte activo para la adquisición del AFA desde el medio de cultivo (Fernández-Cañón y col., 1989a; b; Martínez-Blanco y col., 1989). Las principales diferencias en estos estudios se encontraban en las concentraciones empleadas de AFA y en el tipo de cepas (de bajo y alto rendimiento). Un análisis pormenorizado de estas variables condujo de nuevo a la misma conclusión, que durante la biosíntesis de penicilinas se consumen grandes concentraciones de AFA o POA que entran en la célula utilizando como ruta dominante la difusión pasiva (Eriksen y col., 1998).

Por otro lado, este tipo de transporte supone que a concentraciones muy elevadas de AFA en el medio, se produciría una difusión masiva de este ácido hacia el interior celular, lo que conduciría a un colapso del gradiente electroquímico (Henriksen, 1996). Esto podría explicar en parte el efecto tóxico de estas moléculas cuando están presentes en elevadas concentraciones o en un medio de pH bajo (Barrios-González y col., 1993; Henriksen, 1996).

2.5.5. Transporte de intermediarios.

El hongo *P. chrysogenum* secreta al medio de cultivo los tres intermediarios de la ruta biosintética de penicilina además del producto final de la misma, la bencilpenicilina, cuando se utiliza ácido fenilacético como precursor de la cadena lateral. Se han encontrado en dichos caldos tanto el tripéptido ACV (Adriaens y col., 1975; López-Nieto y col., 1985), como la IPN y el 6-APA (Demain, 1983). En todos estos casos no está claro si la secreción de intermediarios se debe a un sobreflujo de la ruta biosintética en las cepas de alta producción o si es un proceso natural con un significado ecológico.

Las cantidades de los intermediarios que se secretan al medio durante las fermentaciones son diferentes. Mientras que el ACV se va acumulando en el caldo de cultivo,

llegando a ser una tercera parte de la concentración intracelular, las concentraciones de IPN extracelulares permanecen bajas y más o menos constantes durante toda la fermentación (Jørgensen y col., 1995).

Aunque no hay evidencia experimental de ello, se ha propuesto que el ACV podría ser transportado fuera de la célula por el sistema de exportación del glutatión (GSH) (Meister y Anderson, 1983; Schwartz y col., 1988; del Carmen Mateos y Sánchez, 1990), el cual se parecería al sistema glutatión S-conjugado (GSX) dependiente de ATP que se ha localizado en la membrana plasmática de eucariotas superiores (Deeley y Cole, 1997; Rea y col., 1998). Una vez que el tripéptido ACV es transportado al exterior celular no es importado de nuevo hacia el interior, ni en forma dimérica, ni monomérica (García-Estrada y col., 2007).

La IPN es el siguiente intermediario de la ruta biosintética de penicilina y al igual que el tripéptido ACV, se sintetiza en el citosol celular y también se secreta parcialmente al caldo de cultivo. Mediante estudios de transporte realizados utilizando una cepa mutante que carece del *cluster* de genes de biosíntesis de penicilina (*P. chrysogenum* npe10 *pygG*⁻), transformada con un plásmido que contiene en gen *penDE*, se ha observado que la IPN atraviesa con dificultad la membrana plasmática. No ocurre lo mismo con el paso a través de la membrana peroxisomal desde el citosol ya que en este caso probablemente éste sea muy efectivo (García-Estrada y col., 2007).

El 6-APA es el último intermediario de la ruta biosintética de penicilina antes de formarse bencilpenicilina cuando se añade ácido fenilacético como precursor de la cadena lateral. El 6-APA, es un compuesto más hidrofóbico que los anteriores ya que posee un grupo carboxilo menos. Esto, unido a su menor tamaño, hace más factible su transporte por difusión pasiva a través de las membranas. Estudios realizados de conversión de 6-APA en bencilpenicilina utilizando el mismo microorganismo mutante que en el caso de la IPN se ha podido apreciar que el 6-APA es transportado al interior celular mediante un transporte por difusión que depende de la concentración extracelular (García-Estrada y col., 2007). Hasta el momento, no se ha identificado ningún transportador que pueda estar implicado en el transporte de los compuestos intermediarios de la ruta al exterior celular.

2.5.6. Transporte de penicilina.

Las penicilinas aromáticas producidas por *P. chrysogenum* son compuestos anfipáticos, moderadamente hidrofóbicos y cargados negativamente al pH normal del citosol (Kirschbaum,

1986). Estas características hacen posible su secreción al exterior celular por difusión a través de las membranas peroxisomal y plasmática.

Aparte de estas indicaciones, no se conoce mucho más acerca del mecanismo por el que los antibióticos β -lactámicos son secretados al medio por las células de los hongos productores (Martín y col., 2010).

Existen varias razones que apuntan a un sistema de transporte activo, primario o secundario, como el más probable para la secreción de penicilinas a través de la membrana plasmática. En primer lugar, factores físicos relacionados con las características de la membrana plasmática, como el apretado empaquetamiento de su capa lipídica debido al alto contenido en ergosterol y diferentes factores superficiales y electroquímicos, que probablemente son suficientes para inhibir drásticamente la difusión pasiva de penicilinas (Hillenga y col., 1994). En segundo lugar, la difusión pasiva no puede explicar una distribución de penicilinas y con concentraciones más altas fuera que dentro de la célula (van de Kamp y col., 1999).

Tampoco se puede excluir una tercera opción, situada entre la difusión pasiva y el transporte activo, que es el transporte vesicular (Luengo y col., 1986a; Kurylowicz y col., 1987; Kurzatkowski y Kurylowicz, 1991; Müller, 1991; Martín y col., 2010). Este tipo de transporte está implicado, por ejemplo, en la síntesis de la pared celular, en la secreción de feromonas, en la liberación de neurotransmisores y en el transporte y secreción de ácidos biliares en los organismos eucariotas. El hecho de que la penicilina sea sintetizada en el interior de microcuerpos, otorga posibilidades a este tipo de transporte mediado por vesículas, de modo que la bencilpenicilina además sea transportada desde el peroxisoma hasta la membrana citoplasmática sin encontrarse libre por el citosol. Aunque por otro lado, el flujo de bencilpenicilina a través del citosol podría servir para explicar en parte la formación de 6-APA atribuyéndola a una actividad acilasa citosólica (Nielsen, 1995).

Con respecto al transporte activo, hasta el momento no se ha identificado ningún transportador de penicilina en *P. chrysogenum*. Las investigaciones en la búsqueda de transportadores ha tenido algún resultado en *A. nidulans* donde se ha encontrado un transportador de tipo ABC codificado por el gen *atrD* que está implicado, de algún modo, en la secreción de penicilina (Andrade y col., 2000).

En *A. chrysogenum*, se han localizado dos proteínas pertenecientes a la familia de transportadores MFS que tienen características de *antiporter* droga/H⁺, denominadas CefT y CefT3. La inactivación del gen *cefT* mostró que este gen no era esencial para la biosíntesis de cefalosporinas, pero su sobreexpresión aumentaba la producción de cefalosporinas un 100 % (Ullán y col., 2002b). Estos datos sugerían que debía de haber otros transportadores de cefalosporinas en *A. chrysogenum*. Por ello, dada su alta similitud con CefT, se propuso esta actividad también para la proteína CefT3. En otros *clusters* de genes de biosíntesis de metabolitos secundarios están presentes también dos genes que codifican transportadores similares a CefT y CefT3 (por ejemplo, en los *clusters* de actinorrodina y HC-toxina), pudiendo ser esta duplicación un mecanismo para asegurar una secreción apropiada de los metabolitos tóxicos internos (Martín y col., 2005). El papel de la proteína CefT en el transporte de compuestos β -lactámicos hidrofílicos que contienen ácido α -aminoadípico como cadena lateral ha sido demostrado recientemente (Ullán y col., 2008). La implicación de las proteínas CefT y CefT3 en la secreción de cefalosporinas parece clara aunque no se puede excluir por el momento la posibilidad de que estas proteínas CefT sean sensores de señales extracelulares y que formen parte de una cascada de señales de transducción que estimule la biosíntesis de cefalosporinas (Martín y col., 2005).

La mayor capacidad para la producción de antibióticos de *P. chrysogenum* con respecto a *A. chrysogenum*, unido al mayor coste que supone las fermentaciones de *A. chrysogenum*, ha motivado que se hayan realizado numerosos esfuerzos para producir antibióticos con anillo cefalosporánico en *P. chrysogenum* (Skatrud, 1992; Díez y col., 1997; Nielsen, 1998). Para ello, se han obtenido diferentes cepas transformando *P. chrysogenum* con una amplia variedad de combinaciones de genes biosintéticos de antibióticos cefalosporánicos procedentes de los microorganismos productores de dichos antibióticos (Cantwell y col., 1992; Ullán y col., 2007).

En el análisis de los caldos de fermentación de estas cepas se han encontrado los intermediarios de las rutas biosintéticas de los antibióticos cefalosporánicos que corresponden a los genes introducidos en cada una de las cepas. También se halló una amplia variedad de compuestos derivados de 7-ACA y 7-ADCA, ambos de gran importancia industrial. Pero, sin embargo, no se detectó CPC en los caldos de cultivo de ninguna de las cepas. La presencia de los compuestos intermediarios detectados en los caldos de fermentación implica que son secretados por *P. chrysogenum* al medio. En cambio, parece que *P. chrysogenum* no es capaz de secretar CPC al medio de cultivo.

La transformación de hongos filamentosos no productores de penicilina como *N. crassa* y *A. niger* con el *cluster* biosintético de penicilina, les capacita para la producción y secreción de penicilinas (Smith y col., 1990a). Del mismo modo, cuando *A. chrysogenum* se transformó con el gen *penDE* de *P. chrysogenum* se observó producción de bencilpenicilina (Gutiérrez y col., 1991b).

Aunque la producción de penicilina de todos los transformantes obtenidos en estos estudios es baja, indica que los constituyentes principales para la producción y secreción de penicilina son endógenos en la mayoría de los hongos filamentosos. Esta hipótesis se ha ampliado postulándose además que durante una evolución posterior, *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* desarrollaron enzimas especializadas más efectivas para la producción y secreción de penicilinas y cefalosporinas respectivamente. Esta hipótesis no está clara actualmente, pero hechos como la mayor producción de penicilina por parte de *P. chrysogenum* con respecto a otros hongos productores, la producción de penicilinas por hongos no productores de las mismas como *A. chrysogenum*, *A. niger* o *N. crassa* introduciéndoles los genes necesarios, y la nula capacidad de *P. chrysogenum* para secretar CPC al medio, parecen apoyarla.

2.5.7. Transporte a través de la membrana peroxisomal.

Los peroxisomas se han estudiado en varios hongos filamentosos como *A. nidulans* (Valenciano y col., 1996; 1998; De Lucas y col., 1997), *A. niger* (van Dijken y Veenhuis, 1980; Schilling y Lerch, 1995), *N. crassa* (Wanner y Theimer, 1982; Kionka y Kunau, 1985; Thieringer y Kunau, 1991a,b; de Zoysa y Connerton, 1994) y *Podospora anserina* (Berteaux-Lecellier y col., 1995). El microcuerpo de *P. chrysogenum* es un compartimento pequeño de membrana sencilla con un diámetro de 200-800 nm por lo que es de esperar que el flujo a través de este orgánulo sea alto.

Aunque se han aislado microcuerpos de *P. chrysogenum*, la contaminación con otros orgánulos ha impedido su completa caracterización (Müller y col., 1995). Los peroxisomas están implicados en diferentes rutas metabólicas que varían según los distintos organismos. En hongos, el único lugar en el que se lleva a cabo la β -oxidación de ácidos grasos es en los peroxisomas. Además, estos orgánulos están implicados en otras funciones como la biosíntesis de penicilina y el desarrollo sexual.

Durante mucho tiempo se pensó que los peroxisomas eran permeables a moléculas pequeñas debido a la presencia de porinas en sus membranas. Pero estudios posteriores realizados *in vivo*, mostraron que estas membranas constituían una barrera efectiva siendo impermeable a los protones (lo que permite la existencia de diferente pH entre la matriz peroxisomal y el citosol), y a otros pequeños solutos como NADPH, acetyl-CoA y ácidos grasos activados, para los cuales eran necesarios transportadores especializados (Singh y col., 1992; Tabak y col., 1995; van Roermund y col., 1995; Hettema y col., 1996). De todos modos, debido al bajo contenido en colesterol de la membrana peroxisomal, se ha sugerido que es más permeable que la membrana plasmática (Sulter y col., 1993; Zinser y Daum, 1995).

No existen datos disponibles de la permeabilidad de la membrana peroxisomal para el AFA, POA, CoA y ATP, sustratos de la PCL, o para el AFA-CoA, POA-CoA e IPN, sustratos de la IAT, ni tampoco para los productos de la reacción catalizada por la IAT, la bencilpenicilina y el ácido L- α -aminoadípico.

En vista de las propiedades de permeabilidad del AFA y POA (Hillenga y col., 1995), es probable que tanto el AFA como el POA difundan libremente a través de la membrana del microcuerpo. Del mismo modo, basándose en las propiedades hidrofílicas y de peso molecular de la IPN y del ácido L- α -aminoadípico, es de esperar que se necesiten transportadores específicos para estos compuestos.

En cuanto a las penicilinas hidrofóbicas formadas, podrían liberarse del microcuerpo tanto por difusión como por transporte activo. Pero esto hasta el momento son suposiciones, ya que no existe ninguna evidencia experimental de la implicación de transportadores activos en el transporte de IPN, AFA, ácido L- α -aminoadípico o penicilinas hidrofóbicas a través de la membrana peroxisomal.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Instrumental.

El instrumental que se empleó para la realización de los experimentos presentados en esta memoria fue suministrado por las siguientes casas comerciales:

Agitador de Placas-Promax 1020.

Agitador Vortex-Heidolph-Reax 2000.

Analyzer MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics). Espectrómetro de masas.

GE Healthcare Bio-Sciences Corporation (Piscataway, NJ, EE.UU.), (antiguamente Amersham Pharmacia Biotech): Filtros de nailon Hybond y películas de autorradiografía del tipo Hyperfilm-MP. Transiluminador de luz ultravioleta modelo LKB-Macro Vue. Equipo de cromatografía compuesto de detector de luz ultravioleta modelo LKB-Uvicord SII, bomba peristáltica modelo LKB-pump P-1 y colector GradiFrac.

Beckman Instruments Inc. (Palo alto, CA, EE.UU.): Centrífuga refrigerada modelo GS-15R.

BioRad Laboratories (Richmond, CA, EE.UU.): Cubetas de electroforesis para ADN y ARN (equipos SubCell).

Braum-Biostat B 5 L. Fermentador de 5 litros de capacidad.

Braum-Biostat B 15 L. Fermentador de 15 litros de capacidad.

Buchi-R-114 Rotavapor concentrador.

Buchi Labortechnik AG (Flawil, Suiza): Bombas de vacío modelo B-169.

Cabina de Extracción de gases-FAGV-80.

Cabina de flujo laminar vertical-Flu 80.

Camag (Muttentz, Suiza): Cubetas de desarrollo cromatográfico.

Cámara de Neubauer. Esta cámara se utilizó para conteo celular siguiendo las instrucciones del fabricante.

Canon Inc. (Japón): Cámara digital EOS 10D Reflex.

Colector de fracciones-Pharmacia-Gradifrac.

Colector de fracciones-Bio-Rad-2110.

Eppendorf (Hamburgo, Alemania): Microcentrífugas de los modelos 5415C y 5417C y refrigerada modelo 5415R. Agitador Thermomixer del modelo 5432.

ImageScanner II (GE 175 Healthcare). Escáner empleado para los geles de electroforesis.

Ettan Dalt Six (GE Healthcare). Equipo de electroforesis geles de poliacrilamida.

Gallenkamp (Leicester, Reino Unido): Incubadores orbitales modelo IMR 250.

Gilson Medical Electronics Inc. (Middletown, WI, EE.UU.): pipetas automáticas de los tipos P2, P20, P200, P1000 y P5000.

Hitachi Instruments, Inc (Tokio, Japón): Espectrofotómetro modelo U-2001.

Maissa (Barcelona, España): Filtros de poliamida Nyltal.

Merck (Darmstad, Alemania): pulverizador.

Merck-HIR 10M Horno de hibridación.

Microflow-Cabina de flujo laminar horizontal.

Microscopio Confocal RADIANCE 2000 (BIORAD).

Microscopio Electrónico de Barrido JEOL 6100.

Millipore Corp. (Bedford, MA, EE.UU.): Membranas de filtración, unidades de ultrafiltración Ultra free y membranas de PVDF de electrotransferencia (Immobilon-R). Equipo de filtración de agua MilliRo y MilliQ.

Misonix Inc. (Narmingdale, NJ, EE.UU.): Sonicador del modelo Sonicator-XL.

Moulinex (Barcelona, España): Microondas M41.

New Brunswick Scientific (Edison, NJ, EE.UU.): Incubador orbital modelo Innova 4230.

Olympus Corporation (Shibuya-ku, Japón): Sistema de Microscopio modelo BX60 de contraste de fases, campo brillante de luz transmitida, contraste de interferencias diferenciales Nomarski de luz reflejada y luz fluorescente reflejada. Sistema automático para fotomicrografía PM20.

Packard Instrument Comp. (Meriden, EE.UU.): Aparato de autorradiografía electrónica InstantImagerTM.

Perkin Elmer (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, EE.UU.): termociclador GeneAmp 2400.

Q-BIOgene (Irvine, CA, EE.UU.): Instrumento Fast-Prep FP 120, Bio 101.

Sanyo-ultra 10 W-Armario congelador -80 °C.

Sartorius GmbH (Weinheim, Alemania): Balanzas de precisión, modelos 2442 y 1216MP.

Savant Instruments Inc. (Hicksville, NY, EE.UU.): Centrífuga de vacío modelo SVC-100H. Speedvac SC-110.

Selecta (Barcelona, España): Autoclave del modelo Autester-E, baños termostaticados del modelo 320 OR, estufas de incubación de los modelos 207, 207-A y 237, estufa del modelo 372-A para el secado de vidrio y horno de vacío del modelo Vacio-Term 571.

Sorvall (Newtown, CO, EE.UU.): Centrífugas refrigeradas, modelo RC-5B.

Spectrum Medical Industries Inc. (LA, CA, EE.UU.): Transiluminador de luz UV Spectroline TR-302.

Stratagene (La Jolla, CA, EE.UU.): Fijador de ADN/ARN UV Stratalinker72400.

VirTis (Gardiner, NY, EE.UU.): Liofilizador modelo Bench Top3.

Whatman Laboratory Products Inc. (Clifton, NJ, EE.UU.): Papel 3MM.

Whatman Biometra7GmbH (Goettingen, Alemania): Termociclador con gradiente de temperatura TGradient.

WTW (Alemania): pHmetro del modelo Sentix 41.

1.1. Equipos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los equipos de cromatografía líquida que se emplearon fueron:

- Equipo analítico Waters compuesto por una bomba binaria modelo Waters 1525 y un detector dual modelo Waters 2487. El sistema de inyección fue automático. El Software para el equipo Waters fue el *Millenium32* Versión 3.05.01.
- Equipo analítico Agilent 1100.
- Equipo HPLC-masas: Waters Alliance 2695 conectado a un detector de masas Waters Micromass LCT. El programa de asignación de masas empleado fue el *Masslynx* 3.5.

2. Productos y reactivos.

2.1. Productos para cromatografía.

2.1.1. Reactivos y solventes para cromatografía.

El agua empleada para todos los desarrollos cromatográficos realizados fue agua ultrapura (milliQ) obtenida mediante el sistema de purificación de agua Millipore, modelo MilliQ-Plus. Los solventes orgánicos, acetonitrilo y metanol, eran de calidad HPLC y fueron adquiridos a las casas comerciales Merck y Sigma-Aldrich Chemical Co.

Los reactivos utilizados para la preparación de las soluciones acuosas, sales y ácidos, fueron de una pureza mayor del 99 % (Sigma-Aldrich Chemical Co.).

2.1.2. Resinas cromatográficas.

El carbón activo en polvo (Panreac Química), las resinas de intercambio iónico Dowex® 50WX8-400 (Sigma-Aldrich Chemical Co.) y 1WX8-400 (Sigma-Aldrich Chemical Co.), la resina hidrofóbica Phenyl sepharose 6 fast flow (Pharmacia Biotech) y la resina de gel filtración

Sephadex G10 (GE Healthcare) fueron empaquetadas en las columnas correspondientes siguiendo las indicaciones de las casas comerciales.

2.1.3. Columnas.

2.1.3.1. Columnas para cromatografía.

Las columnas empleadas en el desarrollo de cromatografías de baja presión fueron: *glass Econo-column*® (5 x 30 cm) y *glass Econo-column*® (1.5 x 170 cm) de BioRad y la columna modelo XK-50 de GE Healthcare.

2.1.3.2. Columnas para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Las columnas utilizadas en los análisis de HPLC fueron: columna analítica LiChrospher® 100 RP-18 de 5 µm de tamaño de poro y dimensiones 250 x 4 mm protegida por un guarda columna (Merck) y columna analítica Tecnokroma C-18 de 3 µm de tamaño de poro y dimensiones 150 x 4,6 mm (Sea Mediterránea).

2.2. 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: Ambion Inc. (Austin, TX, EE.UU.), Apothecon (Princeton, NJ, EE.UU.), Appligene Oncor (Francia), BDH Chemicals (Poole, Reino Unido), BioRad Laboratories (Richmond, CA, EE.UU.), Carlo Erba (Milán, Italia), Cayla (Toulouse, Francia), Difco Laboratories Inc. (Detroit, MI, EE.UU.), Fluka Chemika-Biochemika (Buchs, Suiza), GE Healthcare Bio-Sciences Corporation (Piscataway, NJ, EE.UU.), Genosys Biotechnologies Inc. (TX, EE.UU.), Gibco BRL (Eggenstein, Alemania), ICN Biomedicals Inc. (Irvine, CA, EE.UU.), Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU.), Laboratorio Reig Jofré, SA (España), MBI Fermentas (Vilnius, Lituania), Merck (Darmstadt, Alemania), Millipore (Billerica, EE.UU.), New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, EE.UU.), Oxoid Ltd. (Hampshire, Reino Unido), Panreac (Barcelona, España), Probus (Badalona, España), Prolabo (FontenayBois, Francia), Promega Corporation (Madison, WI, EE.UU.), Pronadisa (Madrid, España), QIAGEN (Hilden, Alemania), Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN, EE.UU.), Schleicher & Schuell (Alemania), Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.), Stratagene (La Jolla, CA, EE.UU.), Takara Bio Inc. (Shiga, Japón), USB™ (Cleveland, OH, EE.UU.), Whatman7 (Reino Unido).

2.3. Reactivos específicos para biología molecular.

2.3.1. Ácidos nucleicos.

El ADN del bacteriófago lambda (empleado como marcador de peso molecular en los geles de electroforesis de ADN tras su digestión con las endonucleasas de restricción *HindIII* o *PstI*), fue adquirido a la casa comercial MBI Fermentas.

- ADN del bacteriófago lambda digerido con *HindIII*: 23130; 9416; 6557; 4361; 2322; 2027; 564; 125 pb.

- ADN del bacteriófago lambda digerido con *PstI*: 11509; 5080; 4649; 4505; 2840; 2577; 2454; 2443; 2140; 1980; 1700; 805; 516; 467; 448; 339; 265; 247; 210 pb.

El marcador de peso molecular de 1 Kb para ADN, de Roche, proporciona fragmentos de: 75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216 pb.

El marcador de peso molecular para ARN utilizado fue el RNA *Millennium* Size Markers, de Ambion Inc. Es un marcador comercial de excelente calidad con bandas de 0.5-1.0-1.5-2.0-2.5-3.0-4.0-5.0-6.0 y 9.0 Kpb.

El ADN de esperma de salmón tipo III se obtuvo de la compañía Sigma-Aldrich, Inc.

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo fueron adquiridos a Sigma-Genosys. Cuando se necesitó añadir secuencias de corte para enzimas de restricción, se siguieron las recomendaciones presentes en el catálogo comercial de Biolabs. En la Tabla 2.1 se detalla la secuencia de los mismos.

2.3.2. Reactivos marcados con isótopos radiactivos.

El reactivo químico con isótopo radiactivo en su estructura utilizado en este trabajo, [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol) fue adquirido a Amersham International. Este nucleótido tri-fosfato fue empleado para el marcaje radiactivo de moléculas de ARN mediante el sistema de desplazamiento de mella (*nick translation*).

NOMBRE	Secuencia 5' - 3'
β -actina-Upper	CTGGCCGTGATCTGACCGACTAC
β -actina-Lower	GGGGGGAGCGATGATCTTGACCT
TH10-R	AGGCCTTCACTTCCATCGTCCGATATAC
TH10-F	CCATGGTCATCGATGTGGACAGTGC
pcbC-R	CCATGCCATGGCGAAGAGAAGTGGGACCTCG
pcbC-F	CCATGCCAATGGACACGTCCTCATGCCATTTCG
penDE-R	AAAAGGCCTTCAAAGCCTGGCGTTGAGCGC
penDE-F	CATGCCATGGTTCACATCCTCTGTCAAGG
pacC-R	GTCCGCATGAGTCTTGACAT
pacC-F	GTCCGCATGAGTCTTGACAT
laeA-5	GATCGCCGATATCAGATCTATGTCTTACCGAG
laeA-6	GTAGAAGAATTCAGGCCTTTATTCTCGAC

Tabla 2.1: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Se indica el nombre y la secuencia (5' a 3').

2.3.3. Antibióticos.

La bencilpenicilina potásica se obtuvo de lotes procedentes de la planta industrial de Antibióticos (S.A.U.). Se almacenó a 4 °C. Las disoluciones se prepararon en agua milliQ.

2.3.4. Enzimas de restricción,ificadoras de ácidos nucleicos y otras.

Las enzimas de restricción fueron suministradas por las casas comerciales New England Biolabs Inc., GE-Healthcare, MBI Fermentas y Takara Bio Inc.

Las enzimas desoxirribonucleasa I (ADNasa I) y ribonucleasa A (ARNasa A), ambas de páncreas bovino, fueron adquiridas a la compañía Sigma-Aldrich, Inc.

La enzima *Taq* ADN polimerasa fue adquirida a Sigma-Aldrich, Inc. y a Promega, y la enzima *Platinum*® *Pfx* ADN polimerasa a Invitrogen.

2.3.5. Sistemas comerciales (*Kits*).

Varios de los procesos descritos en este capítulo se realizaron mediante el uso de sistemas comerciales (*kits*) que incluyen todos los componentes necesarios para las reacciones. Los sistemas comerciales utilizados fueron los siguientes:

GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit. *Kit* comercial para realizar la extracción de ADN de geles de agarosa.

Nick Translation Kit. Marcaje radiactivo de ADN por medio de la técnica de desplazamiento de mellas (*nick translation*). Se obtiene una cantidad adecuada de sonda marcada con una actividad específica de 2×10^9 dpm/ μ g (GE Healthcare).

Wizard*® *DNA Clean-Up System. Sistema de minicolumnas y resina, adquirido a Promega,

RNAeasyTM Plant Mini Kit. *Kit* de QIAGEN usado para la obtención de ARN total de hongos filamentosos a pequeña escala.

SuperscriptTM One-StepTM RT-PCR System (GibcoBRL). Utilizado para la realización de reacciones de RT-PCR.

2.3.6. Vectores plasmídicos.

Los vectores plasmídicos utilizados durante el desarrollo de este trabajo fueron los siguientes:

pULJL33

Plásmido de 7,9 Kpb derivado del PBluescript^{KS+} (Barredo, 1990). Este vector tiene clonado en el sitio de restricción *Sall*, un fragmento de 5,0 Kpb que contiene los genes *pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum* con sus respectivas regiones promotoras y la zona intergénica presente entre ambos genes.

pZact

Plásmido de 3,71 Kpb derivado del pZERTM-2 (Bañuelos, 1999). Este vector tiene clonado en el sitio de restricción *SacI*, un fragmento de 420 pb correspondientes al gen de la β -actina de *P. chrysogenum* (Haas y col., 1997). Este fragmento fue empleado en los experimentos de hibridación.

3. Microorganismos utilizados.

3.1. Cepas fúngicas.

- ***Penicillium chrysogenum* NRRL-1951.** Cepa silvestre aislada de un melón en Peoria (Illinois). (Raper, 1944).
- ***Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255.** Cepa de baja producción de penicilina (800 μ g/ml) cedida por el Dr. A.L. Demain del Instituto Tecnológico de Massachusetts (M.I.T.).
- ***Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 npe10.** Cepa fúngica no productora de penicilina obtenida a partir de la cepa Wisconsin 54-1255 por mutación con nitrosoguanidina. Tiene deleccionado un fragmento de ADN de 56,8 Kb que contiene la agrupación de genes biosintéticos de penicilina. Obtenida por el Dr. S. Gutiérrez (Cantoral y col., 1993; Fierro y col., 1995).
- ***Penicillium chrysogenum* pDELO** (Kosalková y col., 2000). Esta cepa deriva de la npe10 *pyrG*⁻ (Cantoral y col., 1993; Fierro y col., 1995) que posee integrado en una sola copia en el locus *pyrG*, el promotor del gen *pcbAB* fusionado en fase, a nivel del codón de inicio, al gen *lacZ* de *E. coli* que codifica para una enzima β -galactosidasa.
- ***Candida utilis* CETCT 1061.** Cepa fúngica utilizada para realizar estudios comparativos de péptidos no relacionados con la biosíntesis de penicilinas.
- ***Acremonium chrysogenum* N-2.** Mutante no productor obtenido por sucesivas mutaciones de la cepa *A. chrysogenum* ATCC 14553, cedida por Industrias Químicas Takeda,

Osaka (Japón). Esta cepa no productora acumula durante la fermentación de cefalosporina varios tipos de péptidos intermediarios de la biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas.

3.2. Cepas bacterianas.

- ***Escherichia coli* DH5α.** Cepa utilizada para experimentos de transformación y amplificaciones de ADN plasmídico. Permite la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (hasta 1×10^8 transformantes / μg de ADN). Posee además una delección en el gen *lacZ* que permite la selección por color de aquellas colonias transformadas con un plásmido capaz de originar α -complementación, como por ejemplo el pBluescript o el pBC. (Hanahan, 1985). Genotipo: F, *endA1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^-), *supE44*, *thi-1*, λ^- , *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, $\phi 80d\text{lacZ}$ λ M15, Φ (*lacZYA-argF*), *deoR*.

- ***Bacillus subtilis* ATCC 6633.** Este microorganismo que presenta una gran sensibilidad a bajas concentraciones de penicilina y facilidad de cultivo y conservación, ha sido utilizado para la valoración del antibiótico formado en las distintas fermentaciones.

- ***Micrococcus luteus* ATCC 9341.** Cepa supersensible a la bencilpenicilina y sensible a isopenicilina N.

4. Medios de cultivo.

4.1. Medios de cultivo para bacterias.

- **Medio Luria-Bertani (LB)**

Medio de mantenimiento y propagación de *E. coli* (Miller, 1972).

Bacto-triptona.....10 g

Extracto de levadura.....5 g

NaCl.....10 g

Agua destilada.....hasta 1 litro

pH 7.5 ajustado con NaOH.

Para medio sólido se añade un 2 % (p/v) de agar.

- **YED**

Extracto de levadura.....10 g
Glucosa.....10 g
(NH₄)₂SO₄.....4 g
Agua destilada.....hasta 1 litro
pH 7.0

- **Medio 2 x TY**

Medio empleado para el crecimiento de *E. coli* (Maniatis y col., 1982).

Bacto-triptona.....20 g
Extracto de levadura.....20 g
Agua destilada.....hasta 1 litro
pH 7.2 ajustado con KOH.

- **Medio SOB**

Medio de cultivo utilizado para la preparación de células competentes de *E. coli* (Hanahan, 1983).

Bacto-triptona.....20 g
Extracto de levadura.....5 g
NaCl.....0.5 g
Agua destilada.....hasta 1 litro
pH 7.5 ajustado con KOH.

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

- **Medio TSB**

Medio utilizado para el crecimiento y mantenimiento de *B. subtilis* ATCC 6633 y *M. luteus* ATCC 9341.

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.....	hasta 1 litro
pH 7.0	

Para su uso como medio base en la realización de bioensayos se añaden 10 g de agar por litro (TSA 1 %).

- **Medio para *Bacillus cereus*** (obtención de penicilinas).

Ácido casamino.....	20 g
KH ₂ PO ₄	6.5 g
FeSO ₄ (1 mg/ml).....	1 ml
MgSO ₄ x 7 H ₂ O.....	0.4 g
Agua destilada.....	hasta 1 litro
pH 7.0	

- **Medio para *Bacillus subtilis*** (obtención de esporas).

Peptona de soja.....	8 g
Extracto de carne.....	3 g
Agar.....	20 g
MnCl ₂	10 ⁻⁵ M
Agua destilada.....	hasta 1 litro
pH 7.2	

4.2. Medios de cultivo para hongos.

4.2.1. *Acremonium chrysogenum*.

- **Medio LPE**

Medio de esporulación y mantenimiento. Medio modificado a partir del de Le Page y Campbell (1946).

Glucosa.....1 g
Extracto de levadura.....2 g
NaCl.....1.5 g
CaCl₂.....10 g
Agua destilada.....hasta 1 litro

pH 6.8 ajustado con NaOH.

Se añade agar al 2 % (p/v).

- **MDIA**

Medio definido de inóculo de *A. chrysogenum* (Shen y col., 1984).

Glucosa.....10 g
CaCO₃.....5 g
Sólidos de maceración de maíz.....30 g
Almidón.....30 g
Agua destilada.....hasta 1 litro

pH 7.0

Debido a que el almidón y los sólidos de maceración de maíz se mantienen en suspensión y no se disuelven, el medio se mantiene continuamente en agitación durante la dispensación en botellas. La esterilización se realiza en olla a presión.

• **MDFA**

Medio definido de fermentación de *A. chrysogenum* (Shen y col., 1984).

Sacarosa.....	36 g
DL-Metionina.....	5 g
L-Asparragina.....	12 g
Solución de sales nº 1.....	8 ml
Solución de sales nº 2.....	144 ml
Agua destilada.....	hasta 1 litro

pH 7.4

Composición de la solución de sales nº 1 (gramos por 100 ml):

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

Composición de la solución de sales nº 2 (gramos por litro):

K ₂ HPO ₄	104 g
KH ₂ PO ₄	102 g
Na ₂ SO ₄ x 10 H ₂ O.....	11.5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O.....	2.4 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O.....	0.2 g
MnSO ₄ x H ₂ O.....	0.2 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O.....	0.05 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O.....	0.5 g

Este medio se complementa con 5.4 ml de glucosa al 50 % estéril por cada 100 ml antes de su utilización.

• **MMC**

Medio definido de crecimiento. Medio modificado a partir del de Queener y col., (1985).

Sacarosa.....	31.6 g
---------------	--------

Glucosa.....	2.2 g
Sólidos de maceración de maíz.....	0.5 g
L-Asparagina.....	7.5 g
Acetato amónico.....	0.22 g
KH ₂ PO ₄	15 g
K ₂ HPO ₄	21 g
Na ₂ SO ₄	0.75 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O.....	0.18 g
CaCl ₂	0.06 g
Solución de sales.....	1 ml
Agua destilada.....	hasta 1 litro

pH 7.0

Composición de la solución de sales (gramos por litro):

Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O.....	15 g
MnSO ₄ x 4 H ₂ O.....	3 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O.....	3 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O.....	0.8 g

4.2.2. *Penicillium chrysogenum*.

- **Czapek (Cz)**

Medio mínimo de crecimiento, se usa para microorganismos capaces de utilizar el NaNO₃ como única fuente de nitrógeno y para la realización de bioensayos en placa (Smith, 1960).

Sacarosa.....	30 g
NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g

MgSO₄ x 7 H₂O.....0.5 g
FeSO₄ x 7 H₂O.....0.01 g
Agua destilada.....hasta 1 litro

pH 7.0

Se añade agar al 2% (p/v).

• **Medio Power (PW)**

Medio de esporulación y mantenimiento para *P. chrysogenum*. Consiste en una fusión de los medios PM1 (López-Nieto y col., 1985) y Czapek-KCl 0.7 M.

Sacarosa.....25 g
Lactosa.....5 g
Peptona.....2.5 g
Sólidos de maceración de maíz.....0.5 g
KCl.....26.1 g
NaCl.....2 g
NaNO₃.....1.5 g
K₂HPO₄0.25 g
MgSO₄ x 7 H₂O.....0.25 g
Sales PW.....1 ml

Agua destiladahasta 1 litro

pH 6.75

Se añade agar en una concentración de 2% (p/v)

Sales PW:

KH₂PO₄6 g
FeSO₄ x 7 H₂O.....1 g
FeCl₃ x 6 H₂O.....0.4 g

CuSO₄ x 5 H₂O.....0.2 g

Se completa el volumen hasta 200 ml con agua destilada. El precipitado formado se homogeneiza por agitación antes de su uso.

- **MDP**

Medio definido de *P. chrysogenum* (Casqueiro y col., 1999).

Ácido cítrico.....20 g

Ácido acético.....4.76 ml

Etilamina.....3 g

(NH₄)₂SO₄.....10 g

KH₂PO₄.....2 g

MgSO₄ x 7 H₂O.....1 g

FeSO₄ x 7 H₂O.....0.1 g

ZnSO₄ x 7 H₂O.....0.02 g

CuSO₄ x 5 H₂O.....0.02 g

MnSO₄ x 4 H₂O.....0.015 g

CoSO₄.....0.01 g

NaCl.....0.002 g

Agua destilada.....hasta 1.6 litros

pH 5.5

Este medio se dispensa en botellas (80 ml) y se esteriliza en olla a presión.

- **MDIP**

El medio definido de inóculo para fermentaciones de *Penicillium* se prepara suplementando cada 80 ml de MDP con 20 ml de glucosa al 20 % estéril.

• **MDFP**

El medio de fermentación de *Penicillium* se prepara suplementando el MDP (cada 80 ml) con:

10 ml de sacarosa al 10 %.

10 ml de lactosa al 30 %.

Si en la fermentación se quiere producir bencilpenicilina se añade además 2.5 ml de fenilacetato potásico al 40 % por litro (fenilacetato potásico 40 %: 20 g de ácido fenilacético, 25 ml de KOH 40 % y 25 ml de agua destilada, pH 8.0-8.2).

• **MCIP**

Medio complejo de inóculo para *Penicillium*.

Sólidos de maceración del maíz.....20 g

Extracto de levadura.....10 g

Sacarosa.....20 g

CaCO₃.....5 g

Agua destilada.....hasta 1 litro

pH 5.7

• **MCFP**

Medio complejo de fermentación para *Penicillium*.

Fenilacetato potásico.....0.4%

Pharmamedia.....20 g

Lactosa.....50 g

(NH₄)₂SO₄.....4 g

CaCO₃.....5 g

Agua destilada.....hasta 1 litro

pH 6.1

La lactosa se esteriliza por separado y se añade en condiciones estériles.

4.2.3. *Candida utilis*.

- YED

Extracto de levadura.....10 g

Glucosa.....10 g

(NH₄)₂SO₄.....4 g

Agua destilada.....hasta 1 litro

pH 7.0

MÉTODOS

5. Cultivo y mantenimiento de los microorganismos.

5.1. Cepas bacterianas.

5.1.1. Cultivo.

La cepa de *E. coli* se creció en placas de medio LB sólido (2 % de agar) durante unas 12 horas a 37 °C. Para el cultivo en medio líquido, se inoculó una colonia desde una placa a un matraz liso de 500 ml con 100 ml de medio y se incubó de 16-18 horas a 37 °C y 250 rpm.

Los medios se suplementaron con antibióticos cuando se cultivaron transformantes resistentes a algunos de éstos en las siguientes concentraciones:

- Ampicilina (Ap) 100 µg/ml.

La cepa de *B. subtilis* se creció en placas de medio TSA al 1 % durante 24 horas. Para la obtención de esporas se procedió de la siguiente manera:

- A partir de una placa de TSA al 1 % se preparó una suspensión de células en agua estéril de DO = 1 medida a una λ 660 nm.

- Se prepararon matraces de 250 ml con 50 ml de medio YED líquido. Cada matraz se inoculó con 1 ml de la suspensión de esporas preparada anteriormente.
- Se incubaron los matraces durante 24 horas a 32 °C y 250 rpm.
- Se recogieron los medios y se centrifugaron durante 10 minutos a 9000 rpm.
- El precipitado de células se lavó con agua destilada estéril 4 veces consecutivas.
- Las células lavadas se resuspendieron en un volumen de 5 ml de agua estéril.
- De la resuspensión anterior se inocularon con 1 ml matraces de 250 ml conteniendo el medio de esporulación.
- Se incubaron los matraces a 32 °C y 250 rpm durante 7 días.
- Al final el 95 % de las células se vieron esporuladas a microscopía de contraste de fases.
- El contenido de los matraces se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 50 ml de agua estéril. Posteriormente, se repartió el contenido en alícuotas y se congelaron éstas a -20 °C hasta su utilización.

5.1.2. Mantenimiento.

Las condiciones para el mantenimiento de las cepas bacterianas dependieron del tiempo de conservación. Para periodos de tiempo cortos (2-3 semanas), se conservaron en placas de Petri selladas con *parafilm*TM a 4 °C.

Para su conservación durante un año, se prepararon suspensiones bacterianas en glicerol al 20 % que se guardaron a -20 °C. Para la conservación durante varios años se recurrió a la liofilización. Para la realización de bioensayos en placa para la cuantificación de producción de penicilina se utilizaron suspensiones de esporas de la cepa de *B. subtilis* ATCC 6633 mantenidas en agua estéril a 4 °C.

5.2. Cepas fúngicas.

5.2.1. Cultivo.

5.2.1.1. *Acremonium chrysogenum*.

La cepa de *Acremonium* se sembró en placas de medio LPE y se incubaron éstas a 28 °C durante una semana para lograr una completa esporulación.

Los cultivos líquidos se realizaron en matraces erlenmeyer de paredes estriadas de 500 ml y 2 l, con un volumen de medio de 100 ml y 400 ml respectivamente. Las condiciones de cultivo, tanto para el inóculo como para la fermentación, fueron de 25 °C y 250 rpm en agitadores orbitales.

El cultivo de inóculo se obtuvo extrayendo las esporas de 6 placas de medio LPE (raspando la superficie del micelio con una pipeta invertida estéril) e inoculándolas en 100 ml de medio de inóculo. Transcurridas 48 horas en las condiciones antes descritas, se inició la fermentación añadiendo 10 ml de este cultivo de inóculo (10 % del volumen de la fermentación) por cada 100 ml de medio de fermentación.

Para la fermentación en volúmenes mayores se recurrió a un fermentador BRAUM BIOSTAT de 15 litros de capacidad. Las condiciones de cultivo para la fermentación fueron de 25 °C, 300 rpm, y un caudal de aire estéril de 10 litros/minuto y el mismo porcentaje de siembra que en las condiciones anteriores.

5.2.1.2. *Penicillium chrysogenum*.

Las diferentes cepas de *Penicillium* se sembraron en placas de medio Power y se incubaron a 28 °C durante 4-5 días para lograr una completa esporulación. Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces erlenmeyer lisos de 250 ml y 500 ml con un volumen de medio de 50 ml y 100 ml respectivamente. Las condiciones de cultivo, tanto para el inóculo como para la fermentación, fueron de 25 °C y 250 rpm en agitadores orbitales.

El cultivo de inóculo se obtuvo extrayendo las esporas de una placa de medio Power (raspando la superficie del micelio con una pipeta invertida estéril) e inoculándolas en 100 ml de medio de inóculo. Tras 24-48 horas (dependiendo de la cepa) en las condiciones antes

descritas, se inició la fermentación añadiendo 10 ml de este cultivo de inóculo (10 % del volumen de la fermentación) por cada 100 ml de medio de fermentación.

Para las fermentaciones del escalado se utilizaron fermentadores BRAUM BIOSTAT de 5 litros de capacidad. Las condiciones de cultivo fueron de 25 °C de temperatura, 350 rpm de agitación inicial y un caudal inicial de aire estéril de 2.5 litros/minuto. En todos los experimentos realizados se mantuvo el mismo porcentaje de siembra utilizado en las fermentaciones en matraz, además de utilizar un mismo cultivo de inóculo para todos los fermentadores para poder cerciorarse de tener las mismas condiciones iniciales de fermentación.

5.2.1.3. *Candida utilis*.

La cepa de *Candida* se sembró en placas de medio TSA, a partir de un glicerol y se incubaron éstas a 28 °C durante una noche para lograr un crecimiento óptimo.

Los cultivos líquidos se realizaron en matraces erlenmeyer lisos de 500 ml, con un volumen de medio de 100 ml. Las condiciones de cultivo para la fermentación, fueron de 25 °C y 250 rpm en agitadores orbitales.

El cultivo se obtuvo extrayendo las células de 3 placas de medio TSA (añadiendo agua estéril y raspando la superficie de la placa con una pipeta invertida estéril) e inoculándolas en 100 ml de medio YEME. Tras 48 horas, una vez finalizada la fermentación, a los caldos de cultivo se les aplicó el siguiente tratamiento:

- i. Separación del microorganismo mediante el uso de un filtro de nailon "nytal" de 30 µm de tamaño de poro y posterior lavado de las células con agua milli Q. Se desechó la fracción precipitada de células.
- ii. Centrifugación del caldo obtenido en el apartado anterior en una centrífuga Sorvall a 4000 rpm durante 30 minutos.
- iii. Recolección del sobrenadante y posterior esterilización mediante filtración (se utilizaron filtros de 0,20 µm de tamaño de poro).

5.2.2. Mantenimiento.

Las cepas fúngicas se conservaron aprovechando la capacidad de estos organismos de formar estructuras asexuales de reproducción y resistencia (conidios). Para periodos cortos, máximo un mes, se mantuvieron a 4 °C sembradas en placas. Para su conservación durante un año, se prepararon suspensiones de esporas con una concentración final de glicerol del 20 % que se guardaron a -20 °C. Para periodos más largos de tiempo, se liofilizaron suspensiones de conidios.

5.3. Determinación del crecimiento de los microorganismos.

Para la determinación del crecimiento de las bacterias, se calculó la turbidez del cultivo valorándose la absorbancia a 600 nm (DO 600 nm) en un espectrofotómetro.

En hongos filamentosos, el crecimiento se valoró mediante el cálculo de peso seco por volumen de medio. El procedimiento que para ello se siguió fue el siguiente: se recogieron muestras de la fermentación (5 ml) a distintos tiempos y se centrifugaron para recoger el micelio. Este micelio se lavó tres veces con una solución de NaCl 0.9 %. Tras eliminar el último sobrenadante de lavado, el micelio se transfirió a cestillos de papel de aluminio previamente pesados. Tras 2 ó 3 días de secado, en una estufa a 80 °C, se pesaron éstos y se calculó el peso seco restándolo del peso de los cestillos vacíos.

6. Análisis y manipulación de ácidos nucleicos.

6.1. Eliminación selectiva de ácidos nucleicos.

Los procesos de purificación de ADN o ARN conllevan habitualmente la contaminación de las muestras con ARN o ADN respectivamente. Para eliminar selectivamente alguno de los dos tipos de ácidos nucleicos, se utilizaron las enzimas ARNasa¹ y ADNasa², libres de ADNasas y ARNasas respectivamente. Ambas enzimas se utilizaron a una concentración final de 10 µg/ml, incubando la reacción 90 minutos a 37 °C.

¹**ARNasa:** Stock a 10 mg/l en Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; NaCl 15 mM. Las ADNasas presentes se eliminan hirviendo la solución durante 15 minutos. Se enfría lentamente y se almacena a -20 °C.

²**ADNasa I:** Solución de 10 mg/ml en agua.

6.2. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos por espectrofotometría en la región ultravioleta-visible.

La concentración de ácidos nucleicos se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm, longitud de onda a la que presentan un máximo de absorción las bases nitrogenadas. Para ADN de doble hebra, se estimó que una unidad de densidad óptica equivale a 50 µg/ml de ADN. Para ARN de simple hebra, una unidad de densidad óptica equivale a 40 µg/ml de ARN.

Para estimar el grado de pureza del ácido nucleico con respecto a la presencia de proteínas, se utilizó el valor de la razón de absorbancia 260/280, ya que 280 nm es la longitud de onda a la que absorben las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos (se considera puro cuando esta razón se encuentra entre 1.7 y 2 (Sambrook y Rusell, 2001)).

6.3. Análisis y manipulación de ADN.

6.3.1. Extracción de ADN.

6.3.1.1. Limpieza y precipitación.

La eliminación de proteínas y otras impurezas de las soluciones de ADN, se realizó mediante un proceso de limpieza con fenol seguido de la precipitación del ADN.

Protocolo:

- Añadir a la solución de ADN un volumen de fenol neutro¹ y agitar vigorosamente mediante un agitador vortex. Centrifugar durante 5 minutos a 13200 rpm y temperatura ambiente.
- Recoger la fase acuosa (superior) cuidadosamente y añadir 0.5 volúmenes de fenol neutro y 0.5 volúmenes de CIA². Agitar nuevamente de forma vigorosa y centrifugar 5 minutos a 13200 rpm y temperatura ambiente.
- Repetir la adición de fenol-CIA hasta que la interfase quede completamente libre de impurezas.

- Añadir 1 volumen de CIA para eliminar los restos de fenol. Agitar vigorosamente con un vortex y centrifugar de igual manera que en los pasos anteriores, recogiendo la fase acuosa al final del proceso.
- Añadir a la solución de ADN 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto (enfriado a -20 °C). Mezclar con un vortex.
- Mantener la mezcla al menos durante 2 horas a -20 °C ó 30 minutos a -80 °C. Centrifugar durante 30 minutos a 13200 rpm y 4 °C.
- Eliminar el sobrenadante. Lavar el precipitado con 0.5 volúmenes de etanol al 70 % y centrifugar 5 minutos a 13200 rpm y temperatura ambiente. Retirar el sobrenadante y dejar secar el precipitado.
- Resuspender en agua o en TE³. Conservar a 4 °C o congelado (-20 °C) durante largos periodos de tiempo.

¹ **Fenol neutro:** Se mezclan por agitación fuerte 3 volúmenes de fenol ácido con 1 volumen de Tris-HCl 1 M, pH 8 (para que el fenol se sature y evitar que capte agua de la fase acuosa que va a ser extraída) y 8-hidroxiquinoleína (50 mg por cada 100 ml de fenol ácido), un compuesto reductor que evitará que se oxide. Se deja reposar hasta que se separan las fases y se guarda a 4°C. 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 las dos fases y se retira la fase superior (acuosa).

² **CIA:** Cloroformo 24 volúmenes; alcohol isoamílico 1 volumen.

³ **TE:** Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8.0.

6.3.1.2. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*.

6.3.1.2.1. Preparación de células competentes.

Este procedimiento ha sido descrito por Hanahan (1983 y 1985) y se usó para la cepa DH5 α con el fin de obtener elevadas eficiencias de transformación (hasta 10⁸ transformaciones / μ g de ADN).

La cepa de *E. coli* se creció en medio SOB sólido durante 12-14 horas. Se inocularon 100 ml de medio SOB líquido con 2 ó 3 colonias aisladas y se incubó a 37 °C y 250 rpm hasta

que el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 0.4-0.45. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm, 4 °C durante 5 minutos.

Las células se resuspendieron en 1/3 del volumen inicial de solución **RF1** y se mantuvieron durante 30 minutos en hielo. A continuación se centrifugaron de la misma forma que antes, se resuspendieron en 1/12.5 del volumen inicial de solución **RF2** y se mantuvieron durante 15 minutos en hielo. Las células competentes resultantes pueden ser usadas inmediatamente o bien pueden conservarse a -75 °C previa congelación en N_2 líquido o en un baño de hielo seco/etanol.

Agua tratada con carbón activo: Se utilizó H_2O milliQ tratada con carbón activo para eliminar todas las impurezas en la preparación de todas las soluciones y medios de cultivo así como para lavar el material utilizado. Se mezcló H_2O milliQ con carbón activo (1 % p/v), se agitó durante 48 horas y se filtró a través de papel Whatman 3MM.

Solución RF1: 0.1 M RbCl, 50 mM $MnCl_2$, 30 mM acetato potásico, 10 mM $CaCl_2$, glicerol al 15 % (v/v), pH 5.8 ajustado con 0.2 M ácido acético. Esterilización por filtración.

Solución RF2: 10 mM MOPS pH 7, 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2$, glicerol al 15 % (v/v), pH 6.8 ajustado con NaOH. Esterilización por filtración.

6.3.1.2.2. Transformación de *E. coli*.

Los plásmidos purificados se transformaron en células competentes de *E. coli* siguiendo un protocolo descrito por Hanahan (1983). Las células competentes se descongelaron en un baño de hielo y se mezcló el ADN con 100 μ l de células, se mantuvo la mezcla en hielo durante 20 minutos. A continuación se sometió a un choque térmico por inmersión en un baño de H_2O a 42 °C durante 45 segundos, las células volvieron a pasarse nuevamente a hielo donde se mantuvieron 2 minutos.

La suspensión bacteriana se suplementó con 800 μ l de medio LB y se incubó a 37 °C, 250 rpm durante 1 hora con el fin de que las células transformadas expresasen su resistencia al antibiótico. Finalmente se inocularon placas de petri con una alícuota, o bien todas las células, en medio LB suplementado con el antibiótico para el cual confiere resistencia el plásmido con el que se transformó. La concentración final de antibiótico empleada fue:

- Ampicilina (Ap): 100 μ g/ml.

6.3.1.2.3. Lisis alcalina.

Se utilizó un protocolo basado en el descrito por Maniatis y colaboradores (1982). Se inoculó una colonia de *E. coli* en 100 ml de medio TB con el antibiótico adecuado y se incubó durante 15-18 horas con agitación a 250 rpm y a 37 °C.

Las células se recogieron por centrifugación a 4000 rpm, 4 °C durante 10 minutos y se resuspendieron en 4 ml de solución GTE (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) con 5 mg/ml de lisozima y la suspensión se mezcló manteniéndose a temperatura ambiente 5 minutos. Se añadieron 8 ml de solución alcalina recién preparada (0.2 N NaOH, 1 % SDS), se mezcló agitando suavemente y se mantuvo 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 6 ml de acetato potásico pH 4.8 (60 ml acetato potásico, 11.5 ml ácido acético glacial, 28.5 ml H₂O destilada) previamente enfriado a 4 °C, se mezcló y se mantuvo en hielo durante 15 minutos.

La mezcla se centrifugó a 15000 rpm, 4 °C durante 20 minutos para precipitar las proteínas. Al sobrenadante se le añadieron 0.7 volúmenes de isopropanol, se mezcló y se mantuvo 30 minutos a temperatura ambiente. El ADN plasmídico se precipitó por centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos, se lavó con etanol al 70 %, se secó y se resuspendió en 500 µl de tampón TE. Se trató con 5 µg/ml final de ARNasa, (preparada libre de ADNasas según Sambrook y col., 1989), durante 1 hora a 37 °C y se extrajo una vez con fenol, varias veces con fenol-CIA hasta observarse una interfase clara y una última vez con CIA, precipitándose finalmente con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol mantenido a -20 °C. El ADN se resuspendió tras centrifugarlo y lavarlo con etanol al 70 % en 200-300 µl de tampón TE.

6.3.2. Hidrólisis con endonucleasas de restricción.

Las enzimas de restricción son enzimas nucleolíticas que catalizan la hidrólisis de enlaces fosfodiéster internos en las dos hebras de una molécula de ADN bicatenario, mayoritariamente por sitios específicos (dianas o sitios de restricción).

Toda enzima posee unas condiciones óptimas de temperatura, pH, concentración salina y presencia de cofactores para llevar a cabo su actividad que varían según la enzima. Tanto el pH como las condiciones salinas y los aditivos necesarios son suministrados por los tampones de digestión.

Las enzimas de restricción empleadas para este trabajo se utilizaron siguiendo las indicaciones de los proveedores y teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Añadir siempre menos de 1/10 de volumen de enzima con respecto al volumen final de la reacción, con objeto de diluir suficientemente el glicerol presente en las soluciones de conservación de las enzimas, evitando que pueda inhibir la actividad enzimática.
- Si el ADN se encuentra suspendido en TE, configurar la reacción en un volumen que supere 10 veces el volumen de ADN a digerir. De esta manera se evita que el TE modifique las características del tampón de reacción.

El esquema seguido en la preparación de una reacción de digestión fue el siguiente:

- Mezclar en un microtubo:

Tampón de digestión (10x) ¹1/10 del volumen final

ADN..... (n)² µg de ADN a digerir

ARNasa A (1µg/ml).....1/10 del volumen final

Enzima de restricción.....1-2 U/µg de ADN

Agua milliQ.....completar hasta el volumen final

- Incubar la reacción a la temperatura adecuada para cada enzima durante 1-4 horas.
- Analizar mediante electroforesis en geles de agarosa o purificar y precipitar, según su finalidad.

¹ Este tampón contiene principalmente; una solución amortiguadora que mantiene un pH constante y adecuado para las condiciones óptimas de la enzima (suele ser Tris-HCl pH 7.5-8.0), iones Mg⁺² requeridos como cofactores de las endonucleasas, agentes reductores (DTT normalmente) y sales (éste es el parámetro más variable en los medios de digestión de las distintas enzimas).

² 1-2 µg de ADN por 20 µl de volumen total de digestión (digestiones analíticas). Para digestiones preparativas no se superaron los 100 µl de volumen total.

6.3.3. Electroforesis de ADN.

La electroforesis es una técnica de separación muy importante en el trabajo con biopolímeros, en general, y con ácidos nucleicos, en particular. Se basa en el movimiento o migración de las macromoléculas disueltas en un determinado medio (solución tampón de electroforesis) a través de una matriz o soporte reticulado y como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de una molécula en esas circunstancias viene definido por su movilidad electroforética que depende de la carga, peso molecular y estructura tridimensional de la misma.

La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga/peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un calor excesivo. En contraste, al aplicar un voltaje bajo, puede ocurrir una separación pobre causada por la difusión que tiene lugar durante un proceso electroforético muy largo.

6.3.3.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

La agarosa es el soporte electroforético más usado en el trabajo con ADN. Se trata de un polisacárido, de estructura lineal, insoluble en medios acuosos a temperatura ambiente pero que se disuelve en ellos en ebullición. Cuando la solución se enfría, la agarosa gelifica formando un reticulado microscópico por cuyos poros se desplazan las moléculas de ADN cuando se les coloca en un campo eléctrico.

La migración de las moléculas a través de la matriz del gel es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular, de modo que las moléculas más pequeñas lograrán hacer un mayor recorrido a lo largo del gel. La conformación en la que se encuentra la molécula es otro aspecto importante a tener en cuenta, así aquellas moléculas de ADN que se encuentran en forma circular covalentemente cerrada ofrecen menos resistencia a la migración a través del gel que aquéllas que se encuentran de forma lineal.

La electroforesis en geles de agarosa se realizó básicamente según las descripciones realizadas por Sambrook y Russell (2001). Se utilizó agarosa (Pronadisa) disuelta por calentamiento en tampón TAE con concentraciones entre 0.3 y 2 % (p/v) dependiendo del rango de tamaños de los fragmentos de ADN a separar (Tabla 2.2).

Concentración de agarosa (%)	Tamaños de los fragmentos de ADN separados (Kpb)
0.3	5-60
0.5	1-20
0.7	0.8-12
1	0.5-10
1.5	0.2-3
2	0.05-2

Tabla 2.2: Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de fragmentos de ADN de diferentes tamaños.

El tamaño de los fragmentos de ADN separados por electroforesis se determinó por comparación con marcadores de peso molecular de ADN.

Protocolo:

- Disolver por calentamiento la agarosa en tampón TAE¹ (1x) y verterla en el molde adecuado. Dejar solidificar.
- Mezclar las muestras de ADN con 1/10 del volumen final de tampón de carga² concentrado. Calentar las muestras a 65 °C por 3-5 minutos y enfriar en hielo antes de dispensarlas en los pocillos del gel.
- Desarrollar la electroforesis horizontal en tampón TAE (1x) mediante la aplicación de una diferencia de potencial de entre 1 y 5 voltios/cm de gel.
- Teñir el ADN por inmersión del gel durante 20-30 minutos en una solución de bromuro de etidio³. Los geles se visualizan y fotografían sobre un transiluminador *Spectroline* TR-302 (emite luz con longitud de onda de 302 nm) con el *sistema vides Graphic Printer UP-890CE* (UVP).

¹ **Tampón TAE 50x:** 242 g de Tris base (2 M); 57.1 ml de ácido acético glacial (5.7 % (v/v)); 100 ml de EDTA 0.5 M, pH 8.0 (50 mM) y agua destilada hasta completar un litro.

² **Tampón de carga concentrado (6x):** azul de bromofenol 0.25 % (p/v); xilene-cianol 0.25 % (p/v); glicerol 50 % (v/v); EDTA 0.1 M; SDS 0.1 %; Tris-HCl 10 mM; en solución acuosa. Se conserva a 4 °C o a temperatura ambiente.

³ **Solución de bromuro de etidio (BrEt):** Se prepara una solución concentrada a 10 mg/ml en agua y se conserva a 4 °C protegida de la luz. Para un litro de agua destilada se añaden 50 µl de la solución concentrada. El BrEt se intercala en la doble cadena y en las estructuras secundarias de los ácidos nucleicos de cadena sencilla y permite su visualización iluminando el gel con luz ultravioleta.

6.3.3.2. Extracción de ADN de geles de agarosa.

Para realizar la extracción de ADN de geles de agarosa se empleó el *kit* comercial **GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit** (GE Healthcare), que fue utilizado siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Este *kit* emplea un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión del ADN de doble cadena (0.1-48 Kpb) a la matriz de la columna.

Una vez que el ADN es “retenido”, las proteínas y sales contaminantes son eliminadas mediante un lavado. El ADN es posteriormente eluido en un buffer de baja fuerza iónica. Se obtiene un porcentaje de recuperación superior al 60 %.

Protocolo:

- Separar el ADN mediante electroforesis, cortar la banda de interés del gel procurando escindir la menor cantidad de agarosa posible.
- Introducir el fragmento de agarosa en un microtubo de 1.5 ml de peso conocido, pesándose posteriormente el conjunto tubo-agarosa. Deducir el peso de la agarosa.
- Adicionar 10 ml de buffer de captura por cada 10 mg de agarosa. Mezclar vigorosamente en vortex e incubar a 60 °C durante 5-15 minutos (hasta la completa disolución de la agarosa).

- Transferir la muestra a una columna GFX e incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar durante 30 segundos a 13200 rpm.
- Descartar el eluyente y adicionar a la columna 500 µl de buffer de lavado. Centrifugar durante 30 segundos a 13200 rpm.
- Transferir la columna a un nuevo microtubo de 1.5 ml y añadir 15-50 µl de buffer de eluido¹ e incubarla por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 1 minuto a 13200 rpm para recuperar el ADN purificado.

¹ **Buffer de eluido:** Tris-HCl 10 mM, pH 8.0. También puede usarse agua milliQ.

6.3.3.3. Marcaje de sondas de ADN por desplazamiento de mellas “*nick translation*”.

El isótopo radiactivo empleado es el ³²P. Este isótopo posee como características principales: una vida media de 14 días, la emisión casi exclusiva de partículas α, y una elevada actividad específica. El hecho de que la mayoría de las enzimas empleadas en el marcaje no se inhiban con la utilización de nucleótidos trifosfatos marcados en su grupo α fosfato, junto con la gran energía del ³²P, que permite la detección en un espacio corto de tiempo, hacen que sea el isótopo comúnmente empleado en el marcaje radiactivo de sondas de ADN.

La técnica de marcaje por desplazamiento de mella, “*nick translation*”, se basa en la utilización combinada de la ADNasa I y la ADN polimerasa I de *E. coli*. La ADNasa I rompe inespecíficamente una de las dos cadenas de la molécula generando extremos 3'-OH libres; por otro lado, la ADN polimerasa I puede desplazar estas roturas o mellas “*nicks*” en una de las cadenas, gracias a sus actividades exonucleasa 5'→3' y polimeras 3'→5'. A medida que se sintetiza la nueva cadena, se van introduciendo nucleótidos trifosfato marcados con ³²P.

- **Esquema de la reacción de marcaje de la sonda.**

En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se mezclan los siguientes componentes:

ADN sonda.....	40-200 ng
dATP 0.3 mM.....	1 µl
dGTP 0.3 mM.....	1 µl

dTTP 0.3 mM.....	1 µl
Tampón de reacción 10x.....	2 µl
Mezcla de enzimas.....	2 µl
[α^{32} P] dCTP.....	2 µl

H₂O destilada hasta 20 µl. La reacción se lleva a cabo a 15 °C durante 30 minutos.

- **Purificación de la sonda.**

La sonda se purifica con el fin de eliminar los nucleótidos no incorporados a la doble hélice de ADN, a través de minicolumnas denominadas *WizardTM* (Promega). La purificación consiste básicamente en mezclar la sonda con la resina de purificación, pasarla a través de una minicolumna de cromatografía, en la que quedan retenidos los ácidos nucleicos; lavar la columna con 2 ml de isopropanol al 80 % y eluir posteriormente la sonda con 100 µl de agua destilada caliente (65-80 °C). Una vez purificada la sonda se añaden 500 µl de agua destilada estéril, se hierve durante 10 minutos para desnaturalizar la sonda y, transcurrido este tiempo, se mantiene en hielo durante 2-3 minutos; posteriormente se añade al tampón de hibridación que se va a emplear.

Tampón de *nick translation* 10x: Tris-HCl 0.5 M pH 8; MgCl₂ 50 mM; DTT 5 mM; gelatina 500 µg/ml.

Mezcla de enzimas: ADN polimerasa I (0,025 V/µl)+ADNasa I (0.5 pg/µl).

6.4. Análisis y manipulación de ARN.

6.4.1. Extracción de ARN total.

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

- Ha de realizarse en una solución que contenga algún agente inactivador de la actividad de las ARNasas [fenol, dietilpirocarbonato (DEPC 0.1 %) o isotiocianato de guanidina].
- Debe ser un método rápido y realizado en condiciones que no favorezcan la actuación de las ARNasas. Esto puede conseguirse, por ejemplo, efectuando el proceso de rotura de las células en presencia de nitrógeno líquido o calentando a 65 °C.

- Independientemente del método utilizado, es muy importante el uso de guantes a lo largo de todo el proceso, así como extremar el grado de limpieza del material utilizado, limpiando con cloroformo el material de vidrio (y después con etanol para eliminar los restos de cloroformo), esterilizando (preferiblemente dos veces) en autoclave el material de plástico y cuidando la limpieza del lugar de trabajo.

6.4.1.1. Obtención de ARN total de *P. chrysogenum*.

Para la purificación de ARN total de *P. chrysogenum* se utilizó el sistema *RNeasy™ Plant Mini Kit* (Qiagen), el cual utiliza minicolumnas que contienen una matriz con base de sílica gel que posee la propiedad de unir selectivamente el ARN.

Protocolo:

- Recolectar el micelio proveniente de medio líquido por filtración a través de filtros estériles de nailon de 30 μm de poro y lavar con NaCl 0.9 %. Eliminar el exceso de humedad con papel de filtro y congelar inmediatamente en N_2 líquido. El micelio puede almacenarse a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta la extracción del ARN.
- Triturar el micelio en mortero con N_2 líquido hasta convertirlo en un fino polvillo. Distribuir el polvillo en microtubos de 2.0 ml hasta la marca de 0.7 ml (0.5 g).
- Adicionar 700 μl de tampón de lisis RLT ^{1,2}, mezclar fuertemente mediante vortex y centrifugar a 13200 rpm durante 3 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo y adicionar etanol 100 % en proporción 1:1 mezclando suavemente con la pipeta.
- Adicionar la mitad del volumen de la mezcla (aproximadamente 700 μl) a la columna de purificación y centrifugar durante 15 segundos a 10000 rpm. Desechar el eluyente y repetir el procedimiento con el volumen restante de la mezcla.
- Lavar, primero con 700 μl de buffer RW1 y luego con 500 μl de buffer RPE, centrifugando cada vez durante 30 segundos a 10000 rpm.
- Añadir otros 500 μl de buffer RPE y centrifugar a 10000 rpm durante 2-3 minutos para secar la columna y eliminar cualquier resto de etanol.

- Eluir con 30 µl de agua-DEPC³ centrifugando a 10000 rpm durante 1 minuto. Recoger y volver a pasar por la columna los 30 µl para recoger todo el ARN⁴.
- Almacenar a -80 °C.

¹ El *kit* dispone además de otro buffer (RLC) que puede emplearse dependiendo de las recomendaciones del fabricante. Todos los tampones mencionados en este protocolo los proporciona el fabricante.

² A la cantidad de tampón RLT que se vaya a utilizar se le adiciona antes de su uso β-mercaptoetanol al 1 % (v/v).

³ Para preparar esta disolución se añade DEPC al 0.1 % (v/v) en agua destilada y se deja en agitación durante 12-15 horas. Se esteriliza en autoclave.

⁴ En este paso es opcional una precipitación con etanol absoluto y acetato sódico, y una posterior resuspensión en un volumen menor de agua-DEPC.

6.4.2. Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes.

La electroforesis para separar fragmentos de ARN en función de su tamaño se efectuó en geles de agarosa desnaturalizantes. Se siguió básicamente el método descrito por Sambrook y Russell (2001).

En los geles para electroforesis de ARN se añadió formaldehído como agente desnaturalizante, con la finalidad de evitar la formación de estructuras secundarias en el ARN que pudieran afectar el proceso de separación. El tamaño de las bandas de ARN separadas en el gel se determinó por comparación con el marcador de peso molecular de ARN, *RNA Millenium Size Marker* (Ambion).

Protocolo:

- Lavar todo el material de electroforesis con H₂O₂ durante 5-10 minutos y después con agua-DEPC.
- Por cada 100 ml de volumen de gel mezclar: 1.5 g de agarosa, 5 ml de MOPS (20x)¹ y 80 ml de agua tratada con DEPC. Calentar la mezcla hasta que la agarosa esté completamente disuelta.

- Dejar enfriar hasta 50-55 °C y añadir 15 ml de formaldehído al 37 %. Mezclar sin formar burbujas y dispensar la mezcla sobre una bandeja de electroforesis nivelada, donde se deja solidificar durante al menos 30 minutos. Para evitar los vapores del formaldehído realizar éste y los siguientes pasos en una campana de extracción.
- Colocar el gel dentro de la cubeta de electroforesis con tampón MOPS (1x) sin que llegue a cubrir completamente el gel.
- Dispensar las muestras en los pocillos y aplicar una diferencia de potencial de 70 voltios durante 30 minutos (lo necesario para que salgan las muestras de los pocillos).
- Rellenar la cubeta con MOPS (1x) hasta cubrir el gel y aplicar de nuevo la corriente durante 3-4 horas. También se puede dejar a 4 °C durante la noche a menor voltaje.

¹ **MOPS (20x):** ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) 0.8 M; acetato sódico 0.2 M; EDTA 0.04 M; ajustar pH a 7 con NaOH 1 N; completar con agua tratada con DEPC hasta 1 litro o bien añadir 0.1 % de DEPC. Agitar vigorosamente varias veces y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

² La composición final del gel es; 1.5 % de agarosa, MOPS 1x y 6 % formaldehído.

Las muestras antes de ser cargadas se calientan a 65 °C durante 5-10 minutos para desnaturalizarlas e inmediatamente se enfrían en hielo durante 5 minutos. Dichas muestras se preparan como se describe a continuación:

- ARN.....10-20 µg
- Formamida.....5 µl
- Formaldehído al 37 %.....2 µl
- MOPS (1x).....1 µl
- Colorante DYE¹ (10 x).....1 µl
- Agua-DEPC.....hasta 20 µl

¹ **Colorante DYE (10x):** Glicerol 50 %; azul de bromofenol 0.25 % (p/v); xilene-cianol 0.25 % (p/v); EDTA 1 mM; en agua tratada con DEPC.

6.4.3. Transferencia de ARN a filtros de nailon (*Northern*) e hibridación.

La transferencia a un soporte sólido del ARN total tras someterlo a migración electroforética en gel de agarosa desnaturalizante se denomina *Northern blotting* o “transferencia de *Northern*” (Alwine y col., 1977; Thomas, 1980). Como soporte para la transferencia se utiliza una membrana de nailon cargada positivamente (Hybond-N (+) TM, GE Healthcare). La transferencia puede realizarse por sistema de vacío o por capilaridad. En este trabajo se empleó el segundo sistema.

6.4.3.1. Transferencia por sistema de capilaridad.

El fundamento de la transferencia por capilaridad consiste en que las moléculas de ácido nucleico son arrastradas desde el gel hasta el soporte sólido en contacto con él, gracias al flujo capilar originado por la acción absorbente de una pila de papeles. Un peso colocado sobre esta pila ayuda al mantenimiento del flujo y, al mismo tiempo, fuerza la salida del líquido del interior del gel que queda al final deshidratado y reducido a una fina capa de agarosa. El proceso suele durar entre 8 y 24 horas, en función del tamaño de las hebras y de la dureza del gel.

Protocolo:

- Separar el ARN mediante electroforesis.
- Terminada la electroforesis transferir el gel a una cubeta y mantenerlo sumergido en 20 x SSC-DEPC¹ durante 1 hora con agitación suave.
- Colocar en una cubeta con SSC 20x un taco de unos 5 cm de papeles de filtro cortados a la medida del gel. Sobre los papeles de filtro colocar 2 láminas de papel Whatman 3 MM y sobre éstas el gel.
- Colocar encima del gel un filtro de nylon (Hybond N, Healthcare) de un tamaño 1 cm mayor que éste en anchura y longitud.
- Colocar sobre el filtro de nylon 2 láminas de papel Whatman 3 MM y otro taco de papeles de filtro de unos 10-15 cm de grosor. Tanto el filtro de nylon como los Whatman 3 MM se humedecen en H₂O destilada y posteriormente en SSC 2x durante 5 minutos previamente a su colocación en contacto con el gel.

- Encima de toda esta estructura colocar un peso de unos 500 g.
- Comprobar el nivel de la cubeta (nunca debe secarse). Si es necesario, añadir más cantidad de la solución SSC 20x hasta que finalice la transferencia del ARN al filtro de nylon.
- Terminada la transferencia fijar el ARN al filtro mediante la aplicación de luz UV (UV-Stratalinker 2400, Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- Pasar a la hibridación, o bien realizar un lavado del filtro con agua milliQ para eliminar los restos de SSC. Estos filtros se pueden conservar a 4 °C protegidos con papel Whatman 3 MM y papel de aluminio durante varios meses.

¹**SSC 20x-DEPC:** 3 M NaCl, 0.3 M citrato sódico, pH 7 ajustado con NaOH. Se añade DEPC 0.1 % final y se esteriliza en el autoclave.

6.4.3.2. Hibridación de ARN.

La búsqueda de homologías entre secuencias de ADN localizadas en filtros de nitrocelulosa (*screening* de genotecas) o bien en filtros de nylon con ADNs o ARNs transferidos desde geles de agarosa, se realiza mediante la utilización de una sonda de ADN marcada, en la mayoría de los casos radiactivamente, y posterior exposición del filtro hibridado bien sobre un film de autorradiografía o realizar una cuantificación de la intensidad de las bandas de hibridación de la sonda mediante el uso de un escáner electrónico.

El proceso de hibridación se lleva a cabo una vez que se ha realizado la transferencia del ARN y se ha marcado la sonda. En el proceso completo de hibridación se pueden distinguir cuatro fases: prehibridación, hibridación, lavados y detección.

- **La prehibridación**, tiene como finalidad bloquear los sitios activos de la membrana donde no se han unido ácidos nucleicos durante la transferencia y equilibrar ésta con el tampón de prehibridación.
- **La hibridación**, en sentido estricto permite la unión de la sonda marcada al ARN fijado en la membrana. La especificidad de esta unión depende tanto de las condiciones utilizadas durante la incubación (temperatura a la que se desarrolla la hibridación y la

concentración de sales y detergentes en el tampón de hibridación) como de las utilizadas en los lavados posteriores.

- **Los lavados**, permiten la eliminación selectiva de las uniones inespecíficas que hayan podido producirse entre la sonda y el ARN. La disminución de la unión inespecífica durante los lavados se consigue:
 - i) disminuyendo la concentración de sales del tampón de lavado.
 - ii) aumentando la concentración de detergentes en el tampón de lavado.
 - iii) aumentando la temperatura y la duración del lavado.
- **La detección**, permite visualizar la unión de la sonda con los fragmentos de ácidos nucleicos, mediante autorradiografía o realizar una cuantificación de la intensidad (en cpm) de las bandas de hibridación de la sonda mediante el uso de un escáner electrónico de autorradiogramas (Instant Imager, Packard).

Prehibridación:

Los filtros de ARN se prehibridaron utilizando un tubo de vidrio de hibridación cerrado herméticamente con tampón de “Northern” (40 % formamida, Denhardt 5x, SSPE 5x, SDS 0.1 % y 500 µg/ml ADN de esperma de salmón) a 42 °C durante un mínimo de 5 horas o toda la noche. El ADN de esperma de salmón se hirvió 10 minutos para desnaturalizarlo y se enfrió en hielo rápidamente antes de añadirlo al resto de componentes del tampón.

Hibridación:

Tras retirar el tampón de prehibridación se añadió el de hibridación, cuya composición es la misma que en el caso anterior pero con una cantidad menor de ADN de esperma de salmón (120 µg/ml) y la sonda de ADN marcada por “*nick translation*”. El filtro se incubó con la sonda durante 12-24 horas a 42 °C. Posteriormente se retiró el tampón de hibridación con la sonda y se procedió a continuación a los lavados del filtro.

Tampón de hibridación para ARN: formamida 40 %; Denhardt 5x; SSPE 5x; SDS 0.1 %.

Denhardt 100x: BSA (fracción V) 2 %; Ficoll 2 %; Polivinilpirrolidona 2 %; se disuelven en este orden sin calentar. Se conserva a -20 °C.

SSPE 20x: NaCl 3.6 M; NaH₂PO₄ 0.2 M; EDTA 20 mM pH 8.

ADN esperma de salmón: se disuelven 10 mg/ml en tampón TE.

Lavados y exposición:

La duración y temperatura de los lavados a los que se sometieron los filtros depende de la señal observada al chequearlos con un contador "Geiger". Como norma general se realizan los siguientes lavados:

- SSC 2x, 0.1 % SDS; 20 minutos a temperatura ambiente.
- SSC 2x, 0.1 % SDS; 20 minutos a 42 °C.
- SSC 0.1x, 0.1 % SDS; 5-20 minutos a 42 °C.

Reutilización de filtros de nylon:

Tras el proceso de exposición los filtros que se van a reutilizar posteriormente, se someten a un lavado para eliminar la sonda hibridada. Este lavado consiste en incubar el filtro durante 30 minutos con 50 % formamida, SSPE 6x a 65 °C y a continuación con SSPE 2x unos minutos a temperatura ambiente. Se deja secar y se guarda a 4 °C.

6.4.4. Retrotranscripción de ARN y amplificación del ADNc (RT-PCR).

La amplificación por PCR del producto de la retrotranscripción de ARNm abre una amplia serie de posibilidades, tales como la detección de moléculas de ARN, el clonado del ADNc de un mensajero, la construcción de bibliotecas de ADNc o la determinación de intrones.

La primera etapa del proceso consiste en la síntesis de la primera cadena del ADNc mediante la acción de la transcriptasa inversa sobre el ARNm, puro o mezcla. El cebador usado para ello puede ser:

- Una mezcla de oligómeros (hexámeros) construidos al azar (random primer), lo que dirige la retrotranscripción indiscriminada de una mezcla de ARNs.
- Un oligonucleótido (dT) capaz de unirse a la cola poli(A) de la mayoría de los mensajeros eucariotas; de esta forma puede conseguirse la amplificación de la secuencia completa de aquellos ARNs que lleven cola poli(A) (fracción poli(A)+).

- Un cebador específico diseñado para la posterior PCR de un determinado ARNm; dirige un proceso mucho más selectivo que permite la amplificación de un ARNm particular a partir de una mezcla compleja.

La segunda parte es una reacción de PCR en la que se emplea como molde el producto de esta reacción de transcripción inversa.

Esta sencilla técnica permite la amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos (Mullis y Faloona, 1987). Así, partiendo de una molécula de ADN diana se pueden obtener entre 105 y 109 veces una secuencia específica contenida en ella mediante la utilización de oligonucleótidos (o cebadores) diseñados al efecto y una ADN polimerasa termoestable.

La amplificación se basa en la repetición de un ciclo que consta de tres etapas:

- **Desnaturalización:** Consiste en la separación de las dos cadenas del ADN molde mediante la incubación a elevada temperatura (92-96 °C). Las hebras disociadas permanecerán de esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la unión de los cebadores.
- **Anillamiento de los cebadores:** Básicamente consiste en la unión de dos oligonucleótidos al ADN diana. Cada uno de estos oligonucleótidos es complementario a una de las dos cadenas del ADN y su diseño es tal, que quedan enfrentados por sus extremos 3' tras el anillamiento flanqueando la región a amplificar. La distancia entre ellos determinará la longitud de la secuencia de ADN que se pretende obtener.
- **Extensión:** Consiste en la elongación de los cebadores del conjunto ADN-cebador por la acción de una ADN polimerasa termoestable, a una temperatura próxima a los 72 °C, durante un tiempo que depende de la longitud del fragmento a amplificar. El resultado del proceso es la formación de las dos nuevas cadenas de ADN, copias de la molécula molde y que han incorporado en el extremo 5' de su secuencia al cebador respectivo. Este paso depende de la velocidad de proceso de la enzima (p.ej.: *Taq* polimerasa 60 pb/segundo). Los ciclos de PCR se repiten del orden de 20 a 40 veces. Para asegurar que la primera desnaturalización del ADN molde sea completa, se realiza una desnaturalización inicial a 94-96 °C durante 2-3 minutos. Igualmente para permitir que la ADN polimerasa termine de sintetizar todas las hebras de ADN que no hubiera

completado después de finalizar el último ciclo de PCR, se programa una extensión final a 70 °C durante 10 minutos.

Los tiempos y temperaturas para una reacción de PCR son básicamente empíricos y dependen de diversos factores como: contenido en G+C del ADN, contenido en G+C de los oligonucleótidos, longitud del fragmento a amplificar, velocidad de procesamiento de la ADN polimerasa, abundancia de ADN molde, etc. De modo genérico estos tiempos y temperaturas aparecen reflejados en la Tabla 2.3.

Segmento		Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial		94-96 °C	4-6 minutos	1
Amplificación	Desnaturalización	94-96 °C	30-60 segundos	25-35
	Anillamiento	Según el nucleótido	30-45 segundos	
	Extensión	72 °C	30-120 segundos	
Extensión final		72 °C	10 minutos	1

Tabla 2.3: Tiempos y temperaturas de reacción típicos para una reacción de PCR.

6.4.4.1. Protocolo de eliminación de moléculas de ADN contaminantes en el ARN.

Antes de la realización de las RT-PCR las muestras con el ARN obtenido en el apartado 6.4.1.1. fueron tratadas con el *kit RQ1 DNase* (PROMEGA) para eliminar la posible existencia de moléculas de ADN.

Protocolo:

Mezclar en un microtubo estéril libre de ARNasas los siguientes componentes:

- Tampón de reacción 10x.....1 µl

- Enzima RQ 1 ADNasa.....1 u/μg ARN
- ARN.....de 1 a 8 μl
- Nuclease-free water.....hasta 10 μl
- Incubar a 37 °C durante 45 minutos.
- Añadir 1 μl de la solución de stop para parar la reacción.
- Incubar a 65 °C durante 10 minutos para inactivar la ADNasa. La muestra de ARN ya está preparada para añadir a la RT-PCR.

6.4.4.2. Protocolo de amplificación de secuencias de ARN por RT-PCR.

Las RT-PCR de este trabajo se realizaron fundamentalmente empleando el *kit Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq System* (INVITROGEN).

Protocolo:

Mezclar en un microtubo estéril libre de ARNasas los siguientes componentes:

- Tampón de reacción¹ 2x..... 25 μl
- ARN molde².....2-4 μl
- Oligonucleótido 1 (10 μM)..... 1 μl
- Oligonucleótido 2 (10 μM).....1 μl
- Enzima RT/Taq Mix.....1 μl
- Agua DEPC.....hasta 50 μl
- Incubar a 55 °C durante 30 minutos para que se lleve a cabo la síntesis de ADNc.
- Incubar la reacción durante 2 minutos a 94 °C para inactivar la retrotranscriptasa (RT).

- Amplificar el fragmento de ADNc mediante PCR según los parámetros indicados en el sistema *Superscript™ One-Step™ RT-PCR System* (GibcoBRL).

¹ **Tampón de reacción 2x:** dNTP 0.4 mM; MgSO₄ 2.4 mM.

² Se realizaron diferentes reacciones variando la cantidad de ARN molde entre estas dos cantidades.

Al finalizar cualquier reacción de PCR, se debe analizar el resultado de la misma en un gel de agarosa, comprobando la cantidad del fragmento amplificado y la inexistencia de bandas inespecíficas.

7. Métodos de análisis de proteínas.

7.1. Obtención de extractos acelulares.

Se utilizó el método descrito por Miller (1972), adaptándolo a *P. chrysogenum*:

- Recoger el micelio por filtración a través de un filtro de nailon "Nytal" de 30 µm de diámetro de poro. Lavar el micelio retenido con una solución de NaCl al 0,9 % (p/v).
- Pulverizar el micelio con N₂ líquido en un mortero y recoger aproximadamente 100 mg del polvo resultante en un tubo Eppendorf de 2.2 ml (el polvo recogido no debe superar los 0.5 ml de volumen). Añadir 1 ml de tampón de rotura, manteniendo la muestra en hielo en todo momento y posteriormente centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Recoger la fase acuosa y utilizarla como extracto proteico.

Tampón de rotura: EDTA 1mM; tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0

7.2. Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976), basado en el cambio del máximo de absorción de 465 a 595 nm al unirse, de modo específico, el colorante Azul Brillante Coomassie G-250 a las proteínas.

La mezcla de la reacción consistió en:

- Muestra.....10 µl dilución 1:5 y 1:10

- Reactivo Bradford.....200 μ l
- H₂O destilada..... 790 μ l
- En el caso de los blancos, se añadieron 800 μ l de H₂O destilada.

Se preparó además una recta patrón usando concentraciones conocidas de BSA. Se utilizó un stock de BSA de 10 mg/ml y las concentraciones finales fueron 1, 2, 5, 7, 10 y μ g/ml.

7.3. Determinación de la actividad enzimática β -galactosidasa.

Se utilizó una variante del método descrito por Miller (1972):

- Obtener un extracto proteico como se describió en el apartado 7.1.
- Realizar una reacción de prueba, para determinar el volumen de muestra necesario para alcanzar una densidad óptica a 420 nm (DO_{420}) de 0.4 unidades tras una incubación de 30 minutos a 37 °C.

Para esta reacción mezclar:

- Extracto proteico.....50 μ l
- Tampón Z¹.....470 μ l
- Solución de ONPG².....100 μ l
- Parar la reacción mediante la adición de 1ml de Na₂CO₃ 1 M, ya que de esta forma se produce un aumento del pH hasta valores próximos a 11, lo que inactiva la enzima.
- Medir la absorbancia a 420 nm.

Una vez determinado el volumen necesario, llevar a cabo la reacción definitiva en las mismas condiciones.

Medir la absorbancia a 420 nm, longitud de onda a la que absorbe el O-nitrofenol formado por la acción de la β -galactosidasa sobre el ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido), y a 550 nm, longitud de onda a la que pueden absorber restos celulares que también lo hacen a 420 nm.

Una vez determinados todos estos parámetros, calcular la actividad β -galactosidasa:

$$A.E \text{ (u/mg)} = \frac{(DO_{420} - 2,2 \times DO_{550}) \times V_t}{\epsilon \times V_{sob} \times t \times P}$$

donde:

DO_{420} = absorbancia a 420 nm.

DO_{550} = absorbancia a 550 nm.

V_t = volumen total de la reacción (1620 ml).

ϵ = coeficiente de extinción molar del ONPG a 420 nm (0,0045 ml/(nmol x cm)).

V_{sob} = volumen del extracto (X ml).

t = tiempo de reacción (30 minutos)

P = concentración de proteínas totales en el extracto (Y mg/ml).

Para determinar la actividad β -galactosidasa de una cepa de *P. chrysogenum* se realizó el ensayo por duplicado con extractos proteicos procedentes de tres fermentaciones distintas.

¹**Tampón Z:** $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ 21,5 g; $NaH_2PO_4 \times H_2O$ 5,5g; KCl 0,75 g; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 0,246 g. Añadir antes de usar, 2-mercaptoetanol 27 μ l /10 ml.

²**Solución de ONPG (orto-nitrofenil-Beta-D-galactopiranosido):** Disolver 40 mg de producto en 10 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,0

8. Valoración de antibióticos β -lactámicos.

8.1. Obtención de penicilinas a partir de *Bacillus cereus*.

La penicilinas obtenida a partir de cultivos de *B. cereus* hidroliza específicamente el anillo β -lactámico de las penicilinas. Esta enzima se utilizó a razón de 1 volumen de muestra por 1 volumen de enzima, para eliminar la penicilina producida por *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuando se realizaron bioensayos en placa, de los caldos obtenidos por fermentación de esta cepa y así, comprobar la posible existencia de moléculas inductoras de la expresión de los genes de biosíntesis de penicilina. Para la obtención de esporas se siguió el siguiente protocolo:

Protocolo:

- Inocular con una colonia de *B. cereus*, sembrado en aislamiento en una placa de medio TSA, en un matraz erlenmeyer liso con 100 ml de medio de cultivo para *B. cereus* al que se ha añadido 50 U/ml de penicilina G¹ para inducir la formación de penicilinas.
- Incubar a 30 °C y 250 rpm durante 18-36 horas.
- Centrifugar a 8000 rpm durante 15 minutos, recoger el sobrenadante y esterilizarlo por filtración utilizando filtros de 0.22 µm.
- Dispensar en tubos de 2.2 ml y guardar a -20 °C. Se emplea 600 µl de este sobrenadante con penicilinas de *B. cereus* por cada 100 ml de caldo de cultivo.

Tras el tratamiento de los caldos de *P. chrysogenum*, para eliminar las penicilinas presentes, la penicilinas se inactivó posteriormente sometiendo el caldo a 3 volúmenes de metanol, dejando la mezcla durante 45 minutos a temperatura ambiente y posteriormente eliminando el metanol en la centrífuga de vacío modelo SVC-100H. *Speedvac* SC-110.

¹ La correspondencia es de 1595 U/mg de penicilina G potásica. Para 100 ml de medio se añaden, por tanto, 3 ml de penicilina G potásica a una concentración de 1 mg/ml, previamente esterilizada por filtración.

8.2. Valoración cualitativa de antibióticos β-lactámicos: bioensayo en placa.

El bioensayo en placa proporciona un método rápido para cuantificar de forma cualitativa la producción de penicilina en medio sólido. Para este propósito, se utilizaron placas de petri con medio de cultivo Czapek (20 ml de medio/placa ó 50 ml medio/placa dependiendo del diámetro y capacidad de éstas). Una vez el medio fundido, se repartió entre las placas utilizando una plataforma niveladora. Cuando el medio de cultivo de las placas se solidificó, se comprobó de forma visual, que el reparto de éste fuese lo más homogéneo posible, en caso contrario, se descartó la placa.

Protocolo:

- Sobre la superficie de cada placa se inocularon 2 μ l de esporas de *P. chrysogenum* procedentes de una suspensión de esporas mantenidas en una solución de glicerol al 25-30 % y a -20 °C. Las cepas utilizadas en los bioensayos fueron *P. chrysogenum* NRRL-1951 y *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.
- Una vez las placas inoculadas, se incubaron durante un periodo de 24 horas a 28 °C para permitir la germinación de las esporas. Transcurrido ese tiempo, con la ayuda de un sacabocados se perforó y se eliminó un disco de agar junto a las colonias formadas de *P. chrysogenum*. En el agujero practicado, se añadieron los distintos compuestos a analizar en una cantidad de 100 μ l por pocillo. Como control, se añadió agua destilada estéril o medio estéril a uno de los pocillos practicados junto a las colonias. Las placas se incubaron durante otras 24 horas a 28 °C permitiendo, en ese tiempo, que los compuestos añadidos difundiesen por el agar y contactasen con las colonias de *P. chrysogenum*.
- Una vez transcurrido el tiempo de incubación de 48 horas aproximadamente, se procedió a añadir una cobertera (20 ml ó 40 ml según el tipo de placa utilizado en el bioensayo) de TSA al 1 % con esporas de *B. subtilis*, como microorganismo sensible a la penicilina (100 μ l de esporas por cada 100 ml de medio TSA al 1 %). Después de añadir la cobertera, las placas se incubaron durante una noche a una temperatura de 30 °C.

8.3. Valoración cuantitativa de antibióticos β -lactámicos.

La determinación de la producción del antibiótico penicilina en fermentaciones de *Penicillium*, se realizó mediante bioensayo o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las muestras a valorar se tomaron por triplicado a diferentes tiempos de las fermentaciones y cada una de ellas fue analizada tres veces.

8.3.1. Valoración cuantitativa de bioensayo en placa.

Se utilizaron dos microorganismos sensibles a penicilinas, *M. luteus* ATCC 9341, crecido en medio TSB a una DO 600 nm de 2.0 y esporas de *B. subtilis* ATCC 6633.

Protocolo para *M. luteus*:

- Inocular un 1 % del cultivo de *M. luteus* en medio TSA 1 % previamente fundido y temperado, homogeneizar y dispensar en placas de Petri de 15 cm de diámetro (40 ml por placa).
- Una vez solidificado, perforar 8 agujeros de 5 mm de diámetro con un sacabocados y extraer el taco de agar con un palillo estéril.
- Añadir 100 µl de los patrones o caldos a bioensayar en cada pocillo.
- Incubar a 4 °C durante 2 horas para permitir la difusión del antibiótico por el medio.
- Incubar a 30 °C durante 15 horas para permitir el crecimiento del microorganismo.
- El antibiótico presente en el medio inhibe el crecimiento del microorganismo inoculado dando lugar a halos de inhibición del crecimiento cuyo diámetro es directamente proporcional a la concentración del antibiótico.

Protocolo para *B. subtilis*:

- Inocular 100 µl de esporas de *B. subtilis* en medio TSA 1 % previamente fundido y temperado, homogeneizar y dispensar en placas de Petri de 15 cm de diámetro (40 ml por placa).
- Una vez solidificado, perforar 8 agujeros de 5 mm de diámetro con un sacabocados y extraer el taco de agar con un palillo estéril.
- Añadir 100 µl de los patrones o caldos a bioensayar en cada pocillo.
- Incubar a 4 °C durante 2 horas para permitir la difusión del antibiótico por el medio.
- Incubar a 30 °C durante 15 horas para permitir el crecimiento del microorganismo.
- El antibiótico presente en el medio inhibe el crecimiento del microorganismo inoculado dando lugar a halos de inhibición del crecimiento cuyo diámetro es directamente proporcional a la concentración del antibiótico.

Los controles con diferentes concentraciones de penicilina permitieron realizar una recta patrón, que relacionaba directamente la concentración de penicilina con el diámetro del halo de inhibición de crecimiento. La interpolación en esta recta, de los diámetros de los halos de inhibición de las muestras problema permitió determinar la concentración de penicilinas en los caldos de fermentación.

Hay que tener en cuenta, que este método proporciona la concentración de penicilinas totales, sin distinguir unas de otras. Cuando en la fermentación se emplea fenilacetato potásico como precursor de la cadena lateral, se asume que todo el halo es derivado de bencilpenicilina. Por tanto, se utilizan los diámetros de los halos de inhibición obtenidos al realizar bioensayos en las mismas condiciones con disoluciones de bencilpenicilina potásica pura de concentraciones 1, 5, 10, 20, 50 y 100 µg/ml.

8.3.2. Detección y valoración de penicilinas por HPLC.

La cromatografía HPLC (High Performance Liquid Chromatography) o cromatografía líquida de alta eficacia, es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. En la cromatografía HPLC, el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna.

El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria.

La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el

acetonitrilo. El agua puede contener tampones o sales que ayuden a la separación de los compuestos.

Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita, es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como un eluido en gradiente. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un porcentaje bajo de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta alcanzar un 50 % un tiempo determinado. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra, como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. Así, por ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo.

Hay varios tipos de cromatografía; la cromatografía de fase normal y fase reversa. La cromatografía de fase normal se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica, utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención.

La fuerza de interacción no sólo depende de los grupos funcionales del compuesto de interés, sino también en factores estéricos de forma que los isómeros estructurales a menudo se pueden diferenciar el uno del otro. La utilización de disolventes más polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención de los compuestos mientras que los disolventes más hidrofóbicos tienden a aumentar el tiempo de retención.

La cromatografía de fase reversa, consiste en una fase inmóvil apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con RMe_2SiCl , donde la R es una cadena alquil tal como $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ó C_8H_{17} . El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de

repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar.

La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de la energía libre de la entropía asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquil larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida.

Aparte de la hidrofobicidad de la fase móvil, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como que la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención.

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón para controlar el valor del pH. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquier resto de sílica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

El diámetro interno de una columna de HPLC es un aspecto crítico que determina la cantidad de muestra que se puede cargar a la columna y también influye en su sensibilidad. Las columnas de diámetro interno más grande (>10 mm) se utilizan normalmente en la purificación de compuestos para su utilización posterior. En cambio, las columnas de diámetro interno menor (4-5 mm) se utilizan en el análisis cuantitativo de las muestras, y se caracterizan

por el aumento la sensibilidad y la minimización del consumo de disolventes que conllevan. Estas columnas se suelen denominar columnas de rango analítico y normalmente están asociadas a un detector UV-VIS. Aparte, existen otros tipos de columnas, como las de tipo capilar, con un diámetro inferior a 0.3 mm, utilizadas principalmente en espectrometría de masas. La mayoría de HPLC tradicionales se realizan con una fase estacionaria unida al exterior de partículas esféricas de sílica. Estas partículas pueden tener diferentes medidas, siendo las de 5 μm de diámetro las más utilizadas. Partículas más pequeñas ofrecen una mayor superficie y una mejor separación, pero la presión que se requiere por obtener una velocidad lineal óptima aumenta de forma inversamente proporcional al cubo del diámetro de la partícula. Esto significa que disminuir la medida de las partículas a la mitad, aumentaría la resolución de la columna, pero a la vez, aumentaría la presión necesaria en un factor de ocho.

Muchas fases estacionarias son porosas para proporcionar una mayor superficie. Los poros pequeños proporcionan una mayor superficie mientras que los poros de mayor medida proporcionan una cinética mejor, especialmente para los compuestos de tamaño más grande; por ejemplo, una proteína que sea ligeramente más pequeña que el tamaño de los poros puede entrar, pero difícilmente saldrá con facilidad.

8.3.2.1. Preparación de muestras y tampones.

Todos los tampones empleados en los métodos cromatográficos fueron realizados en agua milliQ utilizando compuestos de alta pureza (Sigma-Aldrich) y filtrados con filtros de 0.45 μm (Millipore). Los tampones se prepararon nuevos cada día para evitar el crecimiento de microorganismos y cambios de concentración debido a evaporaciones. La correcta preparación de las muestras es muy importante para el buen desarrollo cromatográfico. Deben de estar libres de proteínas y de cualquier partícula sólida que pueda colapsar la columna o el sistema.

8.3.2.2. Bencilpenicilina.

La poca absorbancia de la bencilpenicilina en UV, unido a la presencia de gran número de compuestos en los filtrados, hizo que se optara por extraer la bencilpenicilina antes de su determinación por HPLC en las muestras correspondientes a las 24 horas de fermentación.

Extracción de bencilpenicilina:

La extracción se realizó disminuyendo el pH de la solución en la que se encontraba la bencilpenicilina (filtrado), por debajo de valor de 2.5. En estas condiciones, el grupo ácido de la bencilpenicilina tiene una carga neta neutra ($pK_a = 2.7$) lo cual, unido a las propiedades hidrofóbicas de su cadena lateral, permite su extracción con solventes orgánicos. Las precauciones para evitar la degradación de la penicilina a estos pH tan ácidos fueron trabajar lo más rápidamente posible, en cámara fría a 4 °C y manteniendo las muestras en hielo.

Protocolo:

- Reducir el pH de la muestra a pH 2.0 utilizando HCl diluido.
- Realizar extracciones (3x) con un tercio del volumen de muestra con acetato de n-butilo.
- Juntar todas las fracciones orgánicas y realizar en ellas una reextracción de la bencilpenicilina con tampón fosfato 10 mM pH 7.5 (3x) con un tercio de volumen inicial.
- Juntar las fracciones acuosas, congelar a -80 °C y liofilizar.
- Resuspender en agua destilada en el mismo volumen inicial de muestras o menor según se quiera concentrar la muestra.

Condiciones cromatográficas:

El método cromatográfico que se empleó para la detección y cuantificación de bencilpenicilina fue desarrollado en el presente trabajo (Tabla 2.4.). El método cromatográfico consta de dos partes, una primera isocrática en la que eluye la bencilpenicilina y otra en gradiente, que constituye el lavado y equilibrado de la columna.

En total, cada cromatograma tiene una duración de 35 minutos. El tiempo de retención de la bencilpenicilina con este método es de 15.39 ± 0.17 minutos, y la menor cantidad detectada es de 0.1 µg/ml.

<p>Tampón A = formiato de amonio 30 mM, pH 5.0 + 5 % de acetonitrilo.</p> <p>Tampón B = acetonitrilo.</p> <p>Absorbancia: 214 nm.</p> <p>Columna: LiChrospher® 100 RP-18(4 x 250 mm), 5 µm (Merck).</p> <p>Flujo: 1.0 ml/minuto.</p> <p>Volumen de inyección: 20 µl.</p> <p>Equipo: Waters compuesto de bomba binaria Waters 1525 y detector dual Waters 2487.</p>

Tiempo	% B
0	15
20	15
22	70
26	70
28	15
35	15

Tabla 2.4: Método cromatográfico para la detección y cuantificación de bencilpenicilina.

9. Derivatización de las muestras con el compuesto FMOC. Condiciones cromatográficas.

Las muestras obtenidas en el proceso de recolección de caldo inicial de la cepa de *A. chrysogenum* N-2 y las muestras obtenidas en los procesos de purificación de cromatografía en columna y HPLC, se derivatizaron con cloruro de 9-fluoroenilmetil cloroformato (FMOC-Cl).

El FMOC-Cl reacciona con los grupos amino (primarios y secundarios) formando derivados carbamados (-NCO₂R) altamente fluorescentes y estables. Este agente altamente reactivo, originalmente y todavía usado como grupo amino protector en síntesis de péptidos, fue primeramente aplicado como un agente derivatizante en precolumna para análisis de aminoácidos. El FMOC-Cl reacciona con todos los aminoácidos a pH alcalino y a temperatura ambiente para producir derivados aminoacídicos. Durante la reacción, también se forman productos de hidrólisis del reactivo (FMOC-Cl) que pueden interferir en la separación por cromatografía de fase inversa y que son eliminados por extracción con un disolvente orgánico. Este compuesto es usado para la derivatización y análisis de varios tipos de aminas incluyendo aminas biogénicas y poliaminas y grupos amino de los aminoácidos. El método cromatográfico está recogido en la Tabla 2.5.

Protocolo:

- Añadir a 1 ml de caldo (o extracto) 2 ml de acetona. Mezclar con vortex y dejar reposar en hielo 30 minutos para desproteinizar las muestras.
- Centrifugar a 4 °C durante 20 minutos y recoger el sobrenadante.
- Añadir a este sobrenadante 300 µl de solución bórica ¹ y 400 µl de solución FMOC ².
- Agitar en vortex 1 minuto y dejar la reacción a temperatura ambiente durante 4 minutos.
- Extraer con hexano (2 x 3.7 ml) para eliminar los productos formados por la hidrólisis de FMOC-Cl.
- Concentrar a vacío en *speed-vac* para eliminar los restos de hexano y llevar la muestra a su volumen inicial (1 ml).

¹ **Solución bórica:** borato de sodio 0.2 M, pH 7.5.

² **Solución FMOC:** solución de FMOC 15 mM en acetona.

Tampón A = acetato de sodio 50 mM, pH 4.2.
Tampón B = acetonitrilo
Absorbancia: 254 nm.
Columna: LiChrospher ® 100 RP-18(4 x 250 mm), 5 µm (Merck).
Flujo: 1.0 ml/minuto
Volumen de inyección: 10 µl.
Equipo: Waters Alliance 2695

Tiempo	% B
0	20
7	25
15	20
30	50
33	70
38	70
40	20
46	20

Tabla 2.5: Método cromatográfico para el análisis de varios tipos de aminas derivatizadas con FMOC.

9.1. Derivatización con cloruro de benzoilo, para identificación de poliaminas. Condiciones cromatográficas.

La derivatización con cloruro de benzoilo (benzoilación) es uno de los compuestos más utilizados para la detección de poliaminas por cromatografía HPLC.

Protocolo:

- Añadir a 500 µl de muestra 1 ml de NaOH 2 N.
- Añadir 10 µl de cloruro de benzoilo. Mezclar con vortex vigoroso durante 10 segundos e incubar las muestras durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 2 ml de una solución saturada de NaCl y mezclar suavemente.
- Añadir 2 ml de éter dietílico y mezclar suavemente.
- Centrifugar las muestras durante 4000 rpm durante 15 minutos.
- Recoger 1 ml de la fase orgánica y evaporar ésta a sequedad en el *speed vac*.
- Resuspender la muestra en 100 µl de metanol grado HPLC.

El método cromatográfico que se empleó para la detección de poliaminas está basado en los métodos descritos en los trabajos de Flores y colaboradores (1982), Slocum y colaboradores (1989) y Özgül y Üren Ali (2009), (Tabla 2.5).

El método cromatográfico en un principio isocrático se sustituyó por un gradiente para mejorar la resolución de los picos cromatográficos.

Tampón A = agua milliQ
Tampón B = metanol
Absorbancia: 254 nm.
Columna: TeknoKroma C-18 (4.6 x 150 mm), 3 μ m (Sea-Mediterránea).
Flujo: 1.0 ml/minuto
Volumen de inyección: 10 μ l.
Equipo: Waters Alliance 2695

Tiempo	% B
7	65
13	80
20	80
25	80
30	100

Tabla 2.6: Método cromatográfico para el análisis de varios tipos de aminas derivatizadas con cloruro de benzoilo.

10. Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina, o más comúnmente denominada TLC (*thin layer chromatography*), consigue la separación de los componentes de una mezcla gracias a la diferencia entre sus coeficientes de reparto entre las dos fases del sistema, la fase estacionaria y la fase móvil. Esta diferencia se traduce en un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual, lo cual permite su separación e identificación. La fase estacionaria más empleada es la sílica gel dispuesta formando una capa uniforme sobre una lámina de aluminio que actúa de soporte. Aunque en un principio estas cromatoplasmas o placas se preparaban en el propio laboratorio, actualmente se adquieren a casas comerciales.

El parámetro experimental asociado a la técnica es el R_f o movilidad relativa, el cual es la relación entre la distancia recorrida por la mancha de un compuesto y la distancia recorrida por el frente de solvente en el momento de sacar la placa del solvente. El R_f se encuentra relacionado con la solubilidad relativa de un compuesto entre la fase estacionaria y la fase móvil. En un sistema de TLC bien caracterizado, las sustancias pueden identificarse comparando los valores de R_f con los de los estándares, los cuales se han analizado previamente o durante la cromatografía.

Para la realización de este trabajo se han empleado las cromatoplasmas de sílica gel 60 (Merck) de 20 x 20 cm con zona de concentración y una fase móvil de (butanol/acético/agua).

Protocolo:

- Cortar la cromatoplaque con el tamaño adecuado y marcar con un lápiz una línea paralela a 1 cm de la zona de concentración de la placa. Sobre esta línea se marcan con una cruz los lugares donde se va a aplicar la muestra, a distancias iguales, dejando al menos 1 cm a un lado y al otro de la placa.
- Las muestras en disolución se aplican sobre la placa mediante puntas capilares a cantidades no mayores de 1.5 µl con el fin de que las manchas correspondientes a las muestras no sean mayores de 5 mm, lo cual se traduciría en peores separaciones. Después de cada aplicación se seca ésta, para que la evaporación del disolvente sea más rápida utilizando para ello un secador de pelo. Una vez que se han secado las manchas, la placa está lista para el desarrollo de la cromatografía.
- Para preparar la cubeta cromatográfica se añade la fase móvil (2:1:1) que se va a emplear en cantidad suficiente para que ocupe de 1.5 a 2 cm de altura en la cubeta y se cierra herméticamente. Después se deja en estas condiciones un mínimo de una hora, dependiendo de las características del disolvente, con el fin de asegurar que la atmósfera del interior de la cubeta de cromatografía está saturada con el solvente.
- Pasado este tiempo, se introduce la placa y se desarrolla la cromatografía hasta que el frente de la fase móvil llegue casi hasta el final de la placa.
- Sacar la placa de la cubeta y marcar el límite del frente alcanzado antes de que se seque con un lápiz.
- Secar la placa con ayuda de un secador de pelo y una vez seca revelar para la localización de los productos.

Las sustancias coloreadas son visibles inmediatamente, pero hay otros compuestos que son incoloros y que deben hacerse visibles. En estos casos, se puede hacer uso de varios métodos: métodos físicos, que utilizan propiedades particulares de los compuestos tales como la fluorescencia (sustancias que son invisibles a la luz ordinaria pero que son visibles a la luz ultravioleta), o métodos químicos (son los más utilizados), que consisten en hacer reaccionar las sustancias a revelar con algún agente químico con el que forman algún compuesto coloreado y así hacerlas visibles.

El revelado de estas placas se realizó mediante el método químico-colorimétrico.

Método químico-colorimétrico: reacción con ninhidrina.

Los métodos colorimétricos se basan en la reacción específica del compuesto a determinar con ciertos compuestos, dando derivados coloreados. De todos los métodos el más general y utilizado, y que fue el empleado en este trabajo, es la reacción con ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno). La ninhidrina reacciona con las aminas primarias, en caliente, produciendo amoniaco, dióxido de carbono y un complejo de color púrpura azulado.

Para el revelado de las placas de TLC por este método, las placas se pulverizaron con una solución de ninhidrina en acetona al 0.2 % (p/v). (Esta solución puede conservarse preservándola de la luz a 4 °C). Después se aplicó calor con un decapador hasta la aparición de las manchas coloreadas.

11. Cromatografía en columna.

Durante el transcurso de este trabajo se utilizaron varios tipos de resinas cromatográficas que fueron adquiridas en forma de polvo seco. Estas resinas se empaquetaron en carcasas de diferentes tamaños, siguiendo un mismo protocolo, para obtener las columnas cromatográficas que se emplearon en el proceso de purificación del compuesto inductor. El correcto empaquetamiento de estas columnas fue fundamental para conseguir un desarrollo cromatográfico óptimo.

Protocolo:

- Hinchar la resina a utilizar en un exceso del mismo solvente que se va a emplear para el desarrollo cromatográfico durante al menos 12 horas a la temperatura a la que va a operar la columna. Evitar la agitación brusca y la formación de burbujas.
- Montar la carcasa de la columna con agarradores estables.
- Llenar con el solvente el espacio muerto de la salida de la columna para asegurar que no haya burbujas en el mismo. Cerrar la salida de la columna.
- Inclinar la columna y verter sobre la pared de la misma la resina en suspensión, bien mezclada. Inmediatamente, y sin dejar de verter la resina, abrir la columna y reajustarla

a una posición vertical. Todo el gel se debe añadir en una sola operación con el fin de formar un lecho homogéneo y evitar la formación de capas que supondrían un mal empaquetamiento de la columna.

- Cerrar la salida de la columna y llenar el espacio sobre el gel con eluyente en torno a 1-2 cm de altura.
- Poner la tapa superior de la columna. Esta operación debe de hacerse con cuidado de no dejar ninguna burbuja en el sistema.
- El flujo debe empezar tan pronto como sea posible después de llenar la columna para obtener una sedimentación igualada. Los flujos de empaquetamiento vienen dados por el tipo de resina y dependen de la presión que soporta cada una de ellas. Normalmente este flujo es ligeramente mayor que el que se va a utilizar para el desarrollo cromatográfico.
- Pasar diez volúmenes de eluyente a través de la columna para estabilizar el lecho y equilibrar la columna.

11.1. Cromatografía de adsorción: columna de carbón activo.

El mecanismo en el que se basa la cromatografía de adsorción es la competición entre el disolvente y las moléculas de soluto por los sitios de unión de la superficie adsorbente con los que cuenta la resina empleada. Estas uniones pueden deberse a interacciones químicas o, más frecuentemente, a interacciones físicas (fuerzas de dispersión de tipo London, fuerzas electrostáticas). El carbón activo opera por este mecanismo.

Independientemente de su fuente, las cuales son diversas (madera, turba, petróleo, etc), el carbón se activa al calentarlo a altas temperaturas (entre 800 y 1000 °C) en ausencia de oxígeno. El resultado de este tratamiento es la creación de millones de poros microscópicos en la superficie del carbón. Esta enorme cantidad de área superficial favorece en gran medida que tenga lugar el proceso de adsorción. El carbón activo tiene una fuerte atracción de adsorción para moléculas orgánicas y es excelente en la retención de compuestos orgánicos aromáticos. El nivel de actividad de la adsorción depende de la concentración de la sustancia en la muestra, la polaridad de la misma, la temperatura a la que se desarrolla la cromatografía y el tipo de carbón, ya que cada uno tiene su propia isoterma de adsorción.

Para la preparación de la columna de carbón activo empleada en este trabajo, se hidrató el carbón activo con agua milliQ durante 12-14 horas a 4 °C, temperatura a la que se iba a desarrollar la cromatografía.

11.2. Cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico es un equilibrio heterogéneo donde se produce un intercambio de iones entre un cambiador iónico fijo y el medio móvil con el que está en contacto (normalmente una disolución acuosa).

Cada intercambiador de iones posee un esqueleto (la matriz del intercambiador que es un polímero orgánico sintético) y grupos de intercambio iónico (los grupos ionogénicos o grupos funcionales). El grupo ionogénico se encuentra dividido en dos partes: el ión fijo que está unido fuertemente a la matriz mediante enlaces covalentes y el ión móvil o contraión que posee carga opuesta a la del ión fijo y, normalmente, se une a éste mediante fuerzas de tipo electrostático en número suficiente para asegurar la neutralidad eléctrica.

Atendiendo a la naturaleza del grupo ionogénico podemos hablar de diferentes tipos de intercambiadores, entre los que destacan los intercambiadores catiónicos y aniónicos que son los empleados en la mayoría de las aplicaciones analíticas. Los intercambiadores de iones que poseen cationes como contraiones se denominan intercambiadores catiónicos (intercambian cationes). Los intercambiadores de iones capaces de intercambiar aniones, se denominan intercambiadores aniónicos.

Sus propiedades como cambiadores iónicos estarán presentes solamente para aquellos valores de pH en los cuales los grupos ionogénicos se encuentren ionizados. Los términos fuerte y débil aplicados a las resinas de intercambio iónico nos indican cómo varían las propiedades de intercambio con el pH. La causa principal de la acción separativa del proceso de intercambio iónico es la atracción electrostática selectiva entre los grupos iónicos fijos y los contraiones, los cuales pueden ser intercambiados por una cantidad equivalente de iones (del mismo tipo de carga) presentes en la disolución que está en contacto con el intercambiador.

Para la preparación de la columna de intercambio catiónico empleada en este trabajo, se hidrató la resina embebiéndola en el buffer acetato sódico 100 mM pH 3. En el caso de la resina de la columna de intercambio aniónico, ésta se embebió en Tris 100 mM.

Una vez empaquetada la resina en la columna cromatográfica, siguiendo el protocolo antes citado, se equilibró pasando 10 volúmenes del mismo buffer pero en esta ocasión a una concentración 10 mM. En estas condiciones la columna ya está preparada para ser utilizada.

11.3. Cromatografía de hidrofobicidad: columna de resina Phenyl sepharose 6 fast flow.

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), separa los componentes de una muestra según su hidrofobicidad. Las moléculas de la muestra, que contienen regiones hidrofóbicas e hidrofílicas, se aplican a una columna HIC disueltas en un tampón de concentración salina alta. La sal del tampón reduce la solvatación de los solutos de la muestra haciendo que las regiones hidrofóbicas se encuentren expuestas y sean adsorbidas por la resina.

Cuanto más hidrofóbica es la molécula que se quiere separar, menos sal es necesaria para promover su adsorción. Posteriormente, para la elución se suele usar un gradiente decreciente de sal de modo que los distintos compuestos de la muestra eluyan de la columna según un aumento de su hidrofobicidad, un incremento del pH que origina un aumento de la repulsión con la matriz o por el contrario la salida de la muestra puede hacerse también por la adición de modificadores orgánicos suaves o detergentes, como por ejemplo isopropanol o metanol.

Para la preparación de la columna de hidrofobicidad empleada en este trabajo, se hidrató la resina embebiéndola en agua milliQ durante 12-14 horas a 4 °C de temperatura.

Una vez empaquetada la columna se equilibró la resina pasando 10 volúmenes de agua milliQ. En estas condiciones la columna ya está preparada para ser utilizada.

11.4. Cromatografía de gel filtración: columna Sephadex G10.

La cromatografía de gel filtración o de exclusión (SEC) se define como la separación diferencial por tamaños de los solutos componentes de una mezcla, provocada por el volumen de poro de la fase estacionaria, el cual es particular de cada clase de resina. Este tipo de cromatografía se utiliza en las últimas etapas de los procesos de purificación de proteínas ya que la capacidad de esta técnica es baja, sólo un 5-10 % del volumen de la columna se puede

inyectar como muestra y la velocidad de flujo es baja, dado que la matriz no resiste mucha presión por sus grandes poros.

Al contrario que otras técnicas de cromatografía líquida, las separaciones de gel filtración están controladas exclusivamente por efectos entrópicos. Al menos en principio, factores como la composición de la fase móvil o el flujo, no deberían de influir en la separación. Como es lógico, en muchas circunstancias las separaciones SEC no se comportan de un modo ideal, especialmente en lo que se refiere a la ausencia de interacciones soluto-matriz. Por ello, es usual recomendar una fase móvil de fuerza iónica apreciable cuando se trabaja en SEC acuosa para prevenir las interacciones entre los solutos y la superficie del gel. El Sephadex es uno de los materiales de mayor difusión y aplicabilidad. Variando el grado de entrecruzamiento se consiguen geles de diferente porosidad y por tanto, diferente intervalo de utilización. La Sephadex G10 tiene como matriz el dextrano y es estable en el intervalo de pH 2-13. Además, admite sin problemas aditivos como tensioactivos y es esterilizable en el autoclave. La Sephadex G10 tiene un intervalo de fraccionamiento para solutos menores de 700 Da.

Para la preparación de la columna de gel filtración empleada en este trabajo, se hidrató la resina con agua milliQ durante 12-14 horas a temperatura ambiente.

Una vez empaquetada la columna se equilibró la resina pasando 10 volúmenes de acetato sódico 0,05 M. En estas condiciones la columna ya está preparada para ser utilizada.

12. Resonancia magnética.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares. Algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias.

Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno de estos núcleos, se puede emplear para determinar la estructura de la molécula en donde se encuentran éstos. La aplicación fundamental de la espectroscopia de RMN es la determinación estructural, ya sea de moléculas orgánicas, organometálicas o biológicas. Para ello es necesaria la realización de diferentes tipos de experimentos de los cuales se obtiene una determinada información.

Para la elucidación estructural de moléculas orgánicas y organometálicas los experimentos más utilizados son los siguientes:

- Espectro monodimensional de ^1H : Da información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro (desplazamiento químico) determina el entorno químico del núcleo, y por tanto da información de grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca. La forma de la señal da información de los protones cercanos acoplados escalaramente.
- Espectro monodimensional de ^{13}C : Al igual que en ^1H el desplazamiento químico da información de los grupos funcionales. Dependiendo del tipo de experimento realizado se puede obtener información del número de hidrógenos unidos a cada carbono.
- Espectros bidimensionales homonucleares: Los experimentos COSY dan información de las relaciones entre los protones de la molécula, por acoplamiento escalar o dipolar.
- Espectros bidimensionales heteronucleares: Los experimentos HMQC indican qué hidrógenos están unidos a qué carbonos.

Las medidas para los espectros RMN fueron realizadas en D_2O a temperatura ambiente utilizando un espectrómetro modelo Bruker WM 500 (500 MHz (^1H -RMN) y 125 MHz (^{13}C -RMN)).

El programa de los experimentos 2D fue tomado de la librería del Software de Broker. Los experimentos de RMN y espectrometría de masas fueron realizados en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid (Departamento de Química Orgánica).

13. Microscopía láser confocal.

Las imágenes de fluorescencia de células vivas se obtuvieron utilizando un microscopio confocal RADIANCE 2000 (BIORAD).

13.1. Preparación de las muestras y tinción de las vacuolas.

Las membranas vacuolares se tiñeron utilizando un fluoróforo lipofílico, N-(3-trietilamoniopropil)-4-(p-dietilaminofenil-hexatrienil) piridio dibromuro (FM 4-64, Molecular

Probes Inc., OR), utilizando un protocolo que incluía algunas modificaciones con respecto al descrito por Vida y Emr (1995).

Protocolo:

- Recoger el micelio a las 24 y 48 horas de incubación, procedentes de una fermentación en medio líquido.
- Centrifugar las muestras recogidas a 4000 rpm durante 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y realizar dos lavados de las células obtenidas con agua estéril.
- Añadir a 4ml de muestra 5 μ l de colorante y agitar suavemente.
- Incubar las muestras en oscuridad y a temperatura ambiente durante 60 minutos.
- Coger una alícuota de 1 ml de muestra y llevar a un microtubo de 1.5 ml de capacidad y realizar 3 lavados utilizando medio definido de inóculo (MDI) del apartado 4.2.2 para eliminar el exceso de colorante.
- Con una punta de micropipeta truncada en la base coger un volumen de 20 μ l de preparación y depositarla en un portaobjetos. Colocar un cubreobjetos sobre la preparación. Para evitar burbujas, depositar el cubreobjetos sobre la gota: primero una arista y luego todo él.
- Observar la fluorescencia por microscopía confocal con una longitud de onda de excitación (λ EX) de 488 nm y una longitud de onda de detección (λ EM) de entre 620 y 660 nm, según se ha descrito (Yenush y col., 2005).

14. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La microscopía barrido (SEM) permite el análisis de superficies de las muestras biológicas o de materiales con unos aumentos prácticos de 60.000x. En este modelo de microscopio (Microscopio Electrónico de Barrido JEOL 6100), el haz de electrones, enfocado por las lentes electromagnéticas a través de una columna con alto vacío, se proyecta sobre la

superficie de la muestra donde los electrones rebotan o provocan la emisión de electrones secundarios de la muestra.

Estos electrones dispersados o emitidos son recogidos por unos detectores y proyectados sobre una pantalla de televisión que proporciona una imagen tridimensional del objeto. Las muestras biológicas requieren un proceso de desecado en un gradiente de etanol y un recubrimiento con una película de un metal conductor (oro).

15. Análisis proteómico.

La proteómica es el estudio y caracterización de todo el conjunto de proteínas expresadas de un genoma (proteoma). La proteómica permite identificar, categorizar y clasificar las proteínas con respecto a su función y a las interacciones que establecen entre ellas. De este modo, se pueden caracterizar las redes funcionales que establecen las proteínas y su dinámica durante procesos fisiológicos.

El proteoma de una célula varía según el estado en el que se encuentre, si se encuentra en una situación de estrés o, por ejemplo, bajo el efecto de una molécula inductora o una hormona. Así, en cada momento y en cada tipo celular el perfil de proteínas expresadas será diferente. La proteómica es útil para estudiar estas diferencias. Las técnicas más usadas en proteómica se basan en la electroforesis bidimensional (2-DE) y en la espectrometría de masas. Estas técnicas han sido empleadas en el análisis proteómico de algunos hongos ascomicetos como *Schizosaccharomyces pombe* (Hwang y col., 2006), algunas especies del género *Aspergillus* (Melin y col., 2002; Vödisch y col., 2009), *S. cerevisiae* (Shevchenko y col., 1996; Bruckman y col., 2009) y *P. chrysogenum* (Jami y col., 2010).

15.1. Microorganismo utilizado y condiciones de cultivo para el análisis proteómico.

Para el estudio del análisis proteómico se utilizó la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Para la obtención de esporas y posterior cultivo en medio líquido, se emplearon los medios Power, MDI y MDP (ver apartado 4.2.2).

Transcurridas 48 horas de fermentación, el caldo de cultivo se filtró a través de un filtro de nailon "nytal" de 30 µm de tamaño de poro. Se recolectó el micelio y se lavó con NaCl al 0.9 %. Posteriormente se realizaron varios lavados sucesivos con agua milliQ y se eliminó el

exceso de humedad con papel de filtro. El micelio así obtenido se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

15.2. Preparación de las muestras y extracción proteica.

Se utilizó un protocolo basado en el descrito por Fernández-Acero y colaboradores (2006), tal y como se indicó por Jami y colaboradores (2010).

Protocolo:

- Triturar el micelio obtenido en mortero con N₂ líquido hasta convertirlo en un fino polvillo.
- Resuspender 2 g de muestra en 10 ml de tampón fosfato 10 mM (K₂HPO₄:KH₂PO₄) (pH 7.4) (rango 1 g /5 ml) conteniendo un 0.07 % (p/v) de 1,4 ditiotreitól (DTT) y suplementado con un inhibidor de proteasas (una tableta cocktail Complete™ (Roche) por cada 10 ml de tampón fosfato).
- Agitar la mezcla a 4 °C durante 2 horas.
- Realizar dos centrifugaciones sucesivas de la mezcla a 13200 rpm durante 5 minutos hasta obtener un clarificado.
- Precipitar las proteínas a -20 °C durante 1 hora añadiendo 1 volumen de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % en acetona conteniendo un 0.14 % (p/v) de DTT.
- Realizar dos lavados sucesivos del pellet obtenido con acetona seguido de un lavado final con acetona al 80 %.
- Resuspender la proteína purificada (pellet) en 500 µl del buffer de solubilización cuya composición es: urea 8 M, detergente CHAPS 2 % (p/v), buffer IPG pH 3-10 NL (GE Healthcare) 0.5 % (v/v), DTT 20 mM y azul de bromofenol 0.002 %.
- Centrifugar la mezcla a 13200 rpm durante 5 minutos y recoger el sobrenadante.
- Cuantificar la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976), según el apartado 7.2.

15.3. Isoelectroenfoque (primera dimensión) y electroforesis en geles de poliacrilamida (segunda dimensión).

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida es la herramienta más empleada para el análisis global y la separación de los componentes del proteoma. Dicha técnica permite la separación de cientos o miles de proteínas (manchas o “spots”) en un único gel.

En el isoelectroenfoque las proteínas se separan en base a su punto isoeléctrico en gradientes de pH inmovilizados (IPGs). En este caso, el enfocamiento isoeléctrico fue desarrollado con tiras de gradientes de pH inmovilizados (IPG) de 18 cm, con un rango de pH 3-10 no lineal (GE Healthcare).

La cantidad de muestra proteica (obtenidas en el apartado 15.2) utilizada fue de 500 µg para la tinción con azul de Coomassie Coloidal (CC). Las muestras proteicas se colocaron en contacto con las tiras de isoelectroenfoque (IPGs) y se sometieron una serie de voltajes diferentes para favorecer su migración hasta alcanzar su punto isoeléctrico. Durante todo el proceso la temperatura fue constante (20 °C). El voltaje aplicado y el tiempo de duración fueron los siguientes:

- 1 hora a 0 voltios (V).
- 12 horas a 30 V (rehidratación).
- 2 horas a 60 V.
- 1 hora a 500 V.
- 1 hora a 1000 V.
- 30 minutos en gradiente hasta alcanzar los 8000 V.
- 7 horas a 8000 V hasta alcanzar un total de 50 KVh.

Finalizado el isoelectroenfoque, cada tira fue equilibrada durante 15 minutos en un buffer de composición: 6 M de urea, glicerol 30 % (v/v), dodecilsulfatosódico (SDS) 2 % (p/v), Tris-HCl 50 mM pH (8.8), azul de bromofenol 0.002 % y DTT 1 % (p/v). Después de 15 minutos, las tiras fueron equilibradas en el mismo buffer otros 15 minutos, pero en este segundo paso el DTT se sustituyó por iodoacetamida 4 % (p/v).

Para la segunda dimensión, las tiras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5 % utilizando el equipo Ettan Dalt Six (GE Healthcare) con una potencia de corriente de 3 Vatios/gel durante 45 minutos seguido de una potencia de corriente de 18 Vatios/gel durante 4 horas. Se utilizaron patrones estándar de proteínas de concentración conocida (Bio-Rad) como marcadores de peso molecular.

Los geles fueron teñidos mediante una solución de tinte (Blue Silver) según el método descrito por Candiano y colaboradores (2004), el cual, proporciona una alta reproducibilidad utilizando una mezcla que contiene azul de Coomassie G-250 (Sigma) 0.12 %, sulfato amónico 10 %, ácido fosfórico 10 % y metanol 20 %.

15.4. Análisis de los geles bidimensionales.

Las imágenes de los geles fueron capturadas utilizando un escáner ImageScannerII (GE 175 Healthcare) calibrado mediante el uso de un marcador de escala de grises (Kodak) digitalizado con el programa Labscan 5.00 (v 1.0.8) (GE Healthcare) y analizado con el programa ImageMaster™ 2D Platinum v 5.0 (GE Healthcare).

Para garantizar unos resultados representativos se analizaron tres geles procedentes de tres experimentos independientes de cada cultivo, incluyendo el control y aquellos suplementados con las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina.

Después de la detección de los puntos correspondientes a las proteínas ("spots"), éstos fueron comprobados manualmente para eliminar cualquier tipo de artefacto como rayas o ruido de fondo. Cada gel de electroforesis correspondiente a diferentes experimentos fue superpuesto y emparejado para detectar posibles diferencias en el patrón de expresión proteica utilizando las mismas condiciones de cultivo. Se comprobó que había una diferencia inferior al 10 % de variabilidad en el número de puntos en las réplicas de los geles.

Para determinar la existencia de un perfil de expresión proteica diferente entre las distintas condiciones de cultivo ensayadas, se determinó el volumen relativo (% vol) de cada punto. Este volumen relativo se corresponde con el volumen de cada punto dividido por el volumen total de todos los puntos del gel. Se consideró que un punto está diferencialmente representado cuando el valor de la media del volumen relativo (obtenido de los tres geles réplica) de ese punto comparado entre las distintas condiciones fue superior a 1.5, con un valor de confianza $p < 0.05$.

15.5. Identificación proteica mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF y MS/MS en tándem).

Los puntos de interés se escindieron manualmente de los geles teñidos con Coomassie coloidal utilizando puntas de micropipeta truncadas en su extremo. Los puntos embebidos en acrilamida se situaron en tubos de microcentrífuga y se lavaron dos veces con agua destilada. Las proteínas se digirieron siguiendo el método de Havlis y colaboradores (2003): las muestras se deshidrataron con acetonitrilo (Carlo Erba) durante 5 minutos, se redujeron con DTT 10 mM (GE Healthcare) en bicarbonato amónico 25 mM (Fluka) durante 30 minutos a 56 °C y alquiladas con iodoacetamida 55 mM (MS grade; Sigma) en bicarbonato amónico 25 mM durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente, las muestras se digirieron durante toda la noche a 37 °C con 10.0 ng/μl de tripsina porcina modificada (grado de secuenciación; Promega) en bicarbonato amónico 25 mM (pH 8.5).

Tras la digestión, se recolectó el sobrenadante, se secó a vacío y se resuspendió en 4 μl de acetonitrilo al 50 % y ácido trifluoroacético al 0.1 % en agua destilada. Un μl de esa solución se situó en una placa de MALDI y se secó al aire durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron a los péptidos digeridos secos 0.5 μl de matriz [3 mg/ml de ácido α-cyano-4-hydroxy-trans-cinnamic (LaserBio Labs)] diluida en ácido trifluoroacético-acetonitrilo/agua 0.1 % (1:1, v/v), dejando secar la mezcla al aire durante otros 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras así preparadas se analizaron con un analizador “4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems)”. Como calibrador externo se empleó la mezcla “4700 proteomics analyzer calibration mixture (Cal Mix 5; Applied Biosystems)”.

Todos los espectros de masas se calibraron internamente usando péptidos procedentes de la digestión con tripsina. El análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF produjo huellas de masas peptídicas. Los péptidos observados (hasta 65 por punto) se analizaron y se representaron como una lista de pesos moleculares monoisotópicos con un parámetro S/N (señal/ruido) mayor de 20, usando el programa informático “4000 Series Explorer v3.5.3 software (Applied Biosystems)”. Todos los iones contaminantes conocidos (péptidos derivados de tripsina y queratina) se excluyeron de la búsqueda en las bases de datos proteicas y para el subsiguiente análisis de MS/MS en tándem. Por tanto, de cada espectro de masas, se seleccionaron para análisis de MS/MS en tándem los seis precursores más intensos que tuviesen un S/N mayor de 20. Para ello, se llevó a cabo una disociación inducida por colisión

(CID) con gas atmosférico en modo reflector de iones 2-kV y ventanas de precursor de masas de ± 7 Da.

Para la identificación de proteínas, se crearon automáticamente Archivos Genéricos Mascot combinando espectros de MS y MS/MS en tándem. Éstos se emplearon para buscar frente a una base de datos no redundante con una licencia local de Mascot v 2.2 de Matrix Science a través del servidor "Protein Global Server (GPS) v 3.6 (Applied Biosystems)". Los parámetros de búsqueda para las huellas peptídicas y los espectros de masas en tándem obtenidos se fijaron de acuerdo a los siguientes parámetros:

- i) Base de datos empleada NCBI nr (2008.11.22).
- ii) Taxonomía: Total (7387702 secuencias) y Fungi (433354 secuencias).
- iii) Se consideraron modificaciones fijas y variables (Cys como S carbamidometil derivado y Met como metionina oxidada).
- iv) Se permitió la pérdida de un sitio de digestión.
- v) La tolerancia del precursor fue de 100 ppm, mientras que la tolerancia del fragmento de MS/MS fue 0.3 Da.
- vi) Carga peptídica: 1+.
- vii) Se fijó el algoritmo para que se emplease tripsina como enzima de digestión.

Las proteínas candidatas generadas mediante esta búsqueda combinada de PMF/tándem MS se consideraron válidas cuando el resultado proporcionado por Mascot fue superior a 81 (base de datos total) o 69 (base de datos Fungi) con un nivel de confianza $p < 0.05$. Otros criterios adicionales para una identificación de confianza fueron que se identificase la proteína con una cobertura mínima de secuencia de al menos el 15 %. Para coberturas menores, sólo se consideraron válidas aquellas proteínas que en el análisis de MS en tándem arrojasen un resultado de Mascot para los iones superior a 40 (con un nivel de confianza $p < 0.05$).

3. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS INDUCTORAS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE BIOSÍNTESIS DE PENICILINA EN *P. chrysogenum*.

1. INTRODUCCIÓN.

Como ya se ha mencionado en la presentación, Introducción General de este trabajo, la penicilina producida por el hongo filamentoso *P. chrysogenum*, es uno de los metabolitos secundarios más extensamente estudiados y a pesar de que las rutas biosintéticas de penicilina han sido ampliamente estudiadas a nivel genético y bioquímico, hoy en día se sigue investigando principalmente en los mecanismos de control de la biosíntesis y su aplicación en la mejora del proceso de producción.

Gracias al análisis bioinformático del genoma de *P. chrysogenum* (van den Berg y col., 2008), se han podido identificar muchos genes que codifican diversos factores transcripcionales, los cuales, hipotéticamente, regulan la expresión de un amplio grupo de genes involucrados en diversos procesos tales como el crecimiento, desarrollo asexual, remodelación de la cromatina, morfología, resistencia a drogas, respuesta al estrés y la biosíntesis de penicilina, entre otros.

Además de las líneas generales de investigación descritas en la Introducción General para la mejora del proceso, existen también métodos alternativos que persiguen los mismos resultados; incrementar la producción de penicilina. Estos métodos se basan en la adición de moléculas al medio de cultivo que actúen como inductores de la expresión de los genes de

biosíntesis de penicilina y que no actúen como nutrientes o precursores (Bolatito y col., 1998; Liu y col., 2001; Radman y col., 2003,2004), un fenómeno similar al sistema de comunicación celular denominado “*quorum sensing*”.

El fundamento de este sistema consiste en la biosíntesis de sustancias señal que son utilizadas como mecanismo de comunicación entre los microorganismos. Estos compuestos, en la mayoría de los casos, son producidos por las propias células y liberados al medio provocando ulteriormente cambios fisiológicos y/o morfológicos. Por este motivo, han sido denominados hormonas microbianas o feromonas. El sistema del “*quorum sensing* o control de la expresión génica en respuesta a la densidad celular”, es utilizado por bacterias gram negativas y gram positivas (Khokholv y col., 1967; Salmon y col., 1995; Bassler, 1999) y por hongos y levaduras (Timothy y col., 1998; Ki-Bong Oh y col., 2001).

Como se advirtió en la Introducción General, en *P. chrysogenum* se ha observado que una proporción significativa del tripéptido ACV es secretado al medio de cultivo y no es retornado al interior celular. También se han encontrado otros péptidos análogos en el caldo de cultivo de *P. chrysogenum*, que no están relacionados con la biosíntesis de penicilina (Neuss y col., 1980; Avanzini y col., 1980,1984), por lo que pueden servir como señales químicas para la comunicación intercelular (feromonas).

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 1:

- Determinación de la existencia de moléculas inductoras de la expresión de los genes de biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*.
- Purificación de las moléculas inductoras.
- Caracterización espectroscópica de las moléculas purificadas e identificación de los compuestos por Resonancia Magnética Nuclear.

1. Búsqueda inicial de moléculas inductoras de la biosíntesis de penicilinas en *P. chrysogenum*.

El planteamiento y primer objetivo de este trabajo ha sido identificar la posible existencia de moléculas que actúen como señales intercelulares y que activen las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios en *P. chrysogenum*. Como punto de partida de la búsqueda de posibles moléculas inductoras, se diseñó un experimento a partir de esporas de *P. chrysogenum* similar al realizado por Sánchez y Braña (1996).

Para ello se inocularon, con esporas de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, placas de Petri con medio de esporulación Power (apartado de Materiales y Métodos 5.2.1.2). Después de mantener las placas durante 5 días de incubación a 28 °C se recogieron las esporas formadas raspando las placas con un asa de siembra y se resuspendieron éstas en una solución de cloruro sódico al 0.9 %. La suspensión de esporas fue sonicada en un baño de ultrasonidos, lavada 3 veces con agua destilada estéril y resuspendida en una disolución de glicerol al 30 %.

Se prepararon una serie de matraces de 500 ml de volumen con 100 ml de medio de cultivo formado por una solución de 0.0001 % de cloruro sódico, 0.5 % de sulfato amónico y 2 % de glucosa. Los matraces se inocularon con distintas cantidades de esporas preparadas con una cámara de conteo celular; 10^4 , 10^6 , 10^8 y 10^9 esporas/ml y se incubaron durante 12 horas en un agitador orbital a 25 °C y 250 rpm.

Transcurrido el tiempo de incubación se recogió el contenido de los diferentes matraces y se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante de cada lote de matraces con diferente cantidad de esporas y se concentró 10 veces en un rotavapor concentrador.

A continuación se filtraron los diferentes medios concentrados por un filtro de 0.45 μm de tamaño de poro y se guardaron a 4 °C hasta su uso.

Para comprobar si las diferentes concentraciones de esporas habían producido algún tipo de factor condicionante que acelerase la adquisición de la capacidad de biosíntesis de metabolitos secundarios, en concreto la producción de penicilina, se preparó una fermentación en medio líquido, según el apartado 5.2.1.2 de Materiales y Métodos, a la cual se añadieron diferentes volúmenes de los medios concentrados de la fermentación de esporas a tiempo "0" en

matraces con medio definido de producción. Los volúmenes añadidos a las fermentaciones inoculadas con cada lote de concentración de esporas/ml (10^4 , 10^6 , 10^8 y 10^9) fueron:

- 0.1 ml
- 0.5 ml
- 1 ml
- 1.5 ml
- 2 ml
- Los matraces que sirvieron de controles se les añadió la cantidad equivalente de agua destilada estéril.

Para efectuar las fermentaciones en medio líquido se eligió la cepa de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Las condiciones de fermentación, los medios empleados y los métodos de valoración de bencilpenicilina están recogidos en los apartados de Materiales y Métodos (4.2.2, 5.2.1.2, 8.2 y 8.3).

La toma de muestras de las fermentaciones se realizó a las 24, 48 y 72 horas para determinar el peso seco, la producción volumétrica y la producción específica de bencilpenicilina. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados de las fermentaciones, independientemente del lote de concentración de esporas utilizado, fueron los siguientes:

- El crecimiento del microorganismo fue similar en los cultivos correspondientes a los controles con respecto a los cultivos suplementados con diferentes volúmenes obtenidos en las incubaciones de las esporas. En todos los casos, el crecimiento fue lento en las primeras horas de incubación incrementándose de forma progresiva hasta el final de la fermentación (Figura 3.1.1).

Los caldos de fermentación tomados a diferentes tiempos se analizaron mediante bioensayo. La recta de calibración de la penicilina empleada para esta cuantificación fue obtenida mediante una regresión lineal ($y = 1.2691x - 2.753$; $r^2 = 0.998$). Para ello, se emplearon los diámetros de los halos de inhibición obtenidos al realizar bioensayos en las mismas

condiciones con disoluciones de bencilpenicilina a una concentración de 1, 5, 10, 20, 50 y 100 µg/ml.

- La producción de penicilina en todos los casos siguió una pauta similar. El antibiótico comenzó a producirse a las 24 horas de fermentación incrementándose de forma lineal hasta las 72 horas. No se apreció un mayor incremento de producción de penicilina en los matraces que se habían suplementado con diferentes volúmenes obtenidos en la incubación de la concentración de esporas con respecto a los controles (Figura 3.1.2).
- Lo mismo que en el caso anterior, no se observó un incremento de la producción específica de bencilpenicilina en los matraces donde se habían añadido diferentes volúmenes obtenidos en la incubación de la concentración de esporas (Figura 3.1.3).

Como resultado de la experimentación, se pudo concluir que los diferentes medios obtenidos a partir de la fermentación de esporas en distintas proporciones y añadiendo diferentes volúmenes de los mismos no ejercieron efecto alguno sobre el crecimiento y la producción de bencilpenicilina en medio definido de producción.

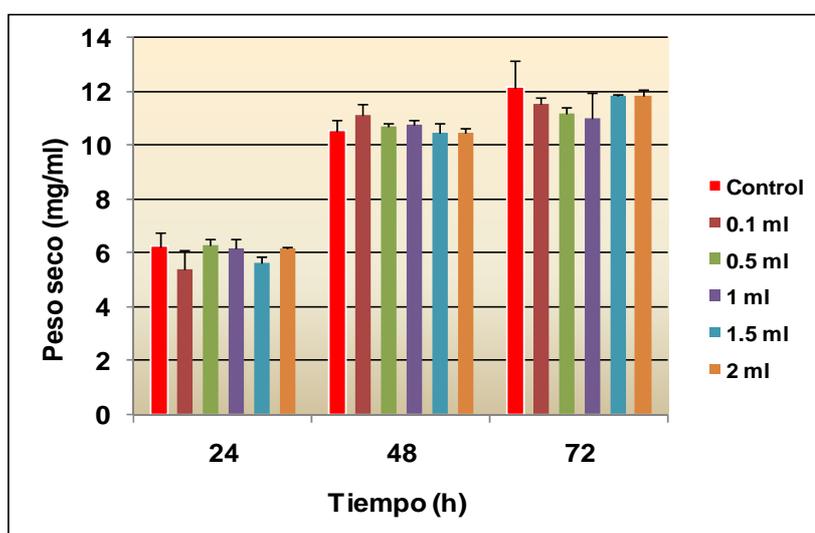


Figura 3.1.1: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido de las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con diferentes volúmenes de los sobrenadantes obtenidos en la incubación de la concentración de esporas igual a 10^4 esporas/ml.

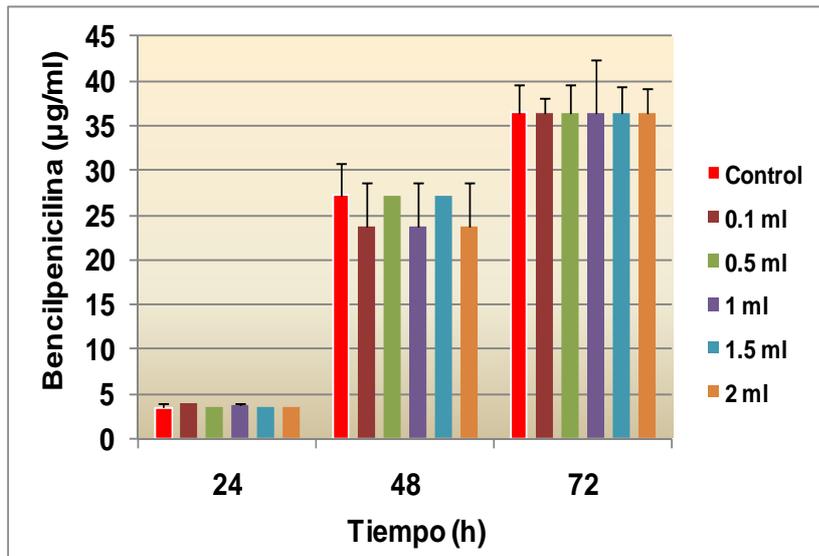


Figura 3.1.2: Cinética de producción de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y de los cultivos suplementados con diferentes volúmenes de los sobrenadantes obtenidos en la incubación de la concentración de esporas igual a 10^4 esporas/ml.

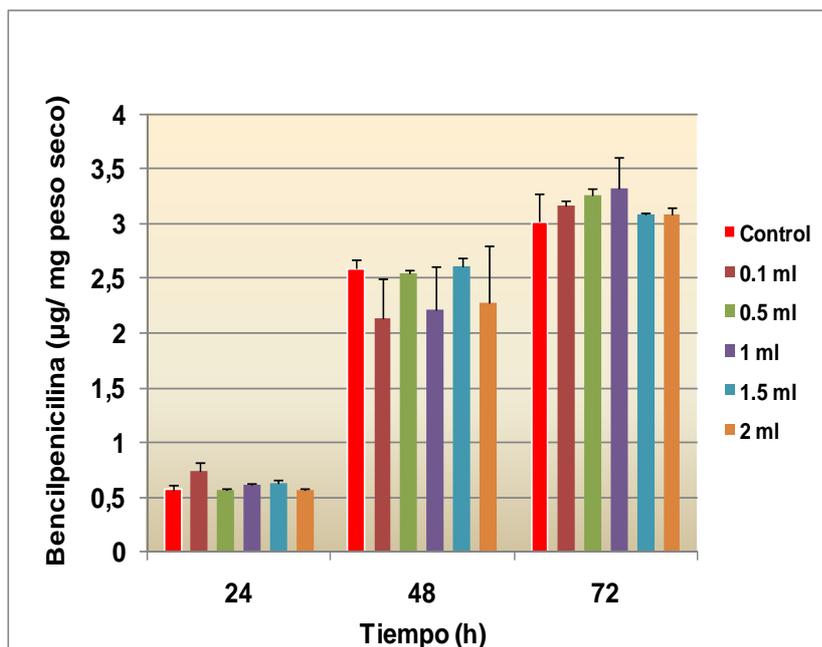


Figura 3.1.3: Cinética de producción específica de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y de los cultivos suplementados con diferentes volúmenes de los sobrenadantes obtenidos en la incubación de la concentración de esporas igual a 10^4 esporas/ml.

1.1. Diseño de un método para el análisis de compuestos que inducen la producción de penicilina en *P. chrysogenum*.

Como se pudo evidenciar en el apartado anterior, cada compuesto que se pretendiese analizar para comprobar el efecto sobre el metabolismo secundario en *P. chrysogenum* obligaría a realizar numerosas fermentaciones en medio líquido lo que implicaría manejar cantidades elevadas de matraces, medios de cultivo y toma de muestras para su posterior análisis.

Por este motivo, para poder realizar análisis de compuestos de diversa naturaleza sin tener que efectuar un número elevado de fermentaciones en medio líquido, se diseñó un bioensayo en placa donde se podía cuantificar de forma cualitativa la producción de penicilina en medio sólido utilizando un microorganismo sensible a la penicilina.

En cualquier caso, cuando el resultado de un bioensayo en placa no evidenció de forma clara que un incremento de penicilina observado en medio sólido se relacionaba o se debía a un posible efecto inductor, se recurrió a realizar fermentaciones en medio líquido para valorar la producción específica de bencilpenicilina.

En un principio, se utilizaron distintos medios de cultivo sólido para la realización de los bioensayos en placa, así como, distintos volúmenes de siembra de esporas. Además, se variaron los tiempos de incubación totales de los bioensayos hasta llegar a las condiciones que se consideraron óptimas para la realización de los mismos (apartado de Materiales y Métodos 8.2). Todos los compuestos analizados se bioensayaron como mínimo por triplicado.

El criterio a seguir para determinar si un compuesto analizado pudiera actuar como inductor de la biosíntesis de penicilina fue el siguiente: los resultados de los bioensayos en placa se consideraron positivos cuando los halos de inhibición de crecimiento del microorganismo sensible (generados por la penicilina producida por las colonias de *P. chrysogenum* donde se había añadido una posible sustancia inductora) fueron superiores a los halos de inhibición de las colonias usadas como controles (donde se añadía la cantidad equivalente de agua destilada estéril) (Figura 3.1.4 y Figura 3.1.5). Si no había diferencia en los diámetros de halo generados o si no se generaban halos de inhibición, se consideraba el resultado del bioensayo como negativo.

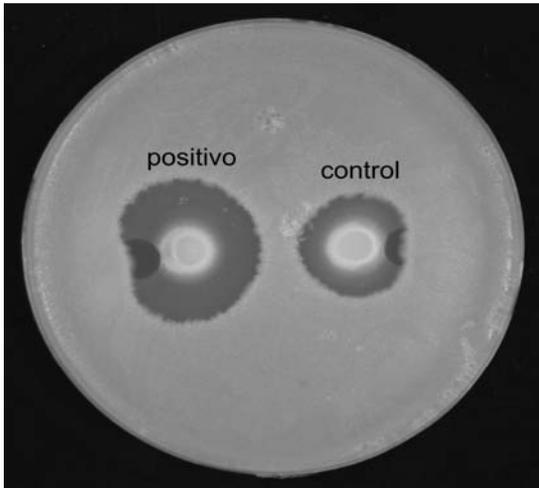
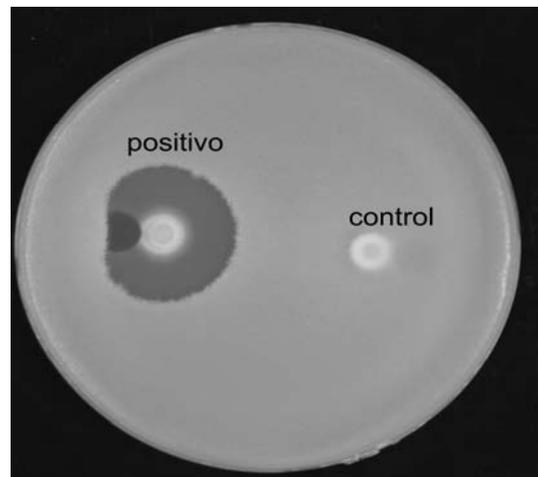


Figura 3.1.4: Clones de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Bioensayo en placa positivo donde se observa un mayor halo de inhibición del crecimiento del microorganismo sensible (*B. subtilis*) en la colonia de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 donde se había añadido un compuesto potencialmente inductor de la biosíntesis de penicilina con respecto al control. El compuesto potencialmente inductor se añadió a un pocillo practicado junto a la colonia formada por el hongo.

Figura 3.1.5: Clones de *P. chrysogenum* NRRL-1951. Bioensayo en placa positivo donde se observa un halo de inhibición del crecimiento del microorganismo sensible (*B. subtilis*) en la colonia de *P. chrysogenum* NRRL-1951 donde se había añadido un compuesto potencialmente inductor de la biosíntesis de penicilina con respecto al control. El compuesto potencialmente inductor se añadió a un pocillo practicado junto a la colonia formada por el hongo.



1.2. Análisis de compuestos que actúan como hormonas en otros microorganismos diferentes a *P. chrysogenum*.

Como punto de partida, se decidió bioensayar como primer grupo de compuestos las llamadas hormonas microbianas de bacterias gram negativas; las butirolactonas y de bacterias gram positivas; las homoserina lactonas además de reguladores u hormonas vegetales como por ejemplo el ácido jasmónico. Para ello se prepararon de cada uno de los compuestos (γ -butirolactona, L-homoserina lactona, ácido jasmónico), una serie de concentraciones que abarcaba desde el rango 100 nM hasta alcanzar concentraciones del orden de 1-10 mM.

Para la realización de los bioensayos en placa se utilizó en este caso *P. chrysogenum* NRRL-1951, ya que interesaba que la cepa a utilizar no estuviese modificada (mejorada en la biosíntesis de penicilina) genéticamente pensando que este hecho facilitaría ver un posible efecto inductor. Para ello se siguió el procedimiento mencionado en el apartado 1.1 utilizando como microorganismo sensible *B. subtilis*.

En todos los casos ensayados para dichos compuestos y a distintas concentraciones, el resultado de los bioensayos fue negativo ya que no se generó ningún halo de inhibición del crecimiento del microorganismo sensible. El promedio de crecimiento de las colonias fue similar en todos los casos analizados (Figura 3.1.6).

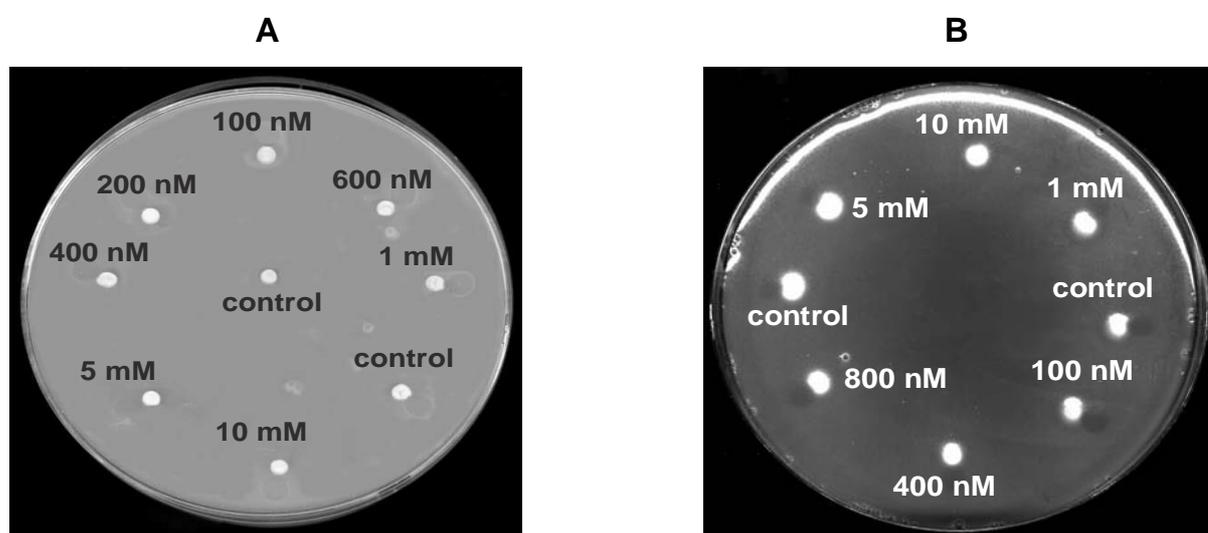


Figura 3.1.6: **A.** Bioensayo realizado con el compuesto γ -butirolactona a diferentes concentraciones. En todos los casos analizados el resultado fue negativo. Las colonias son de la cepa *P. chrysogenum* NRRL-1951. **B.** Bioensayo realizado con el compuesto ácido jasmónico a diferentes concentraciones. Las colonias son de la cepa *P. chrysogenum* NRRL-1951. No se obtuvo ningún halo de inhibición, como en el caso anterior.

1.3. Análisis de aminoácidos.

Un segundo grupo de compuestos analizados fueron soluciones acuosas preparadas de aminoácidos libres y combinaciones de éstos a diferentes concentraciones como en el caso anterior (punto 1.2). Además, junto a los aminoácidos bioensayados, se analizó también el tripéptido ACV en su forma monomérica y dimérica a diferentes concentraciones. Los

aminoácidos analizados están indicados en la Tabla 3.1.1. De la misma manera que en el caso anterior, el procedimiento de realización de los análisis fue el establecido en el punto 1.1, utilizando para los bioensayos la cepa *P. chrysogenum* NRRL-1951 y como microorganismo sensible *B. subtilis*. En los bioensayos realizados se podía esperar que en *P. chrysogenum*, algún aminoácido ejerciera un efecto similar al producido por el aminoácido DL-metionina en *A. chrysogenum*. Este aminoácido ejerce un efecto estimulador en la producción de antibióticos tanto en medios complejos como definidos (Velasco y col., 1994; Martín y col., 1994). La DL-metionina no es necesaria para el crecimiento de *A. chrysogenum*; por el contrario, reduce ligeramente el crecimiento cuando se añade a un medio definido con sulfato amónico como fuente principal de azufre y nitrógeno. El efecto estimulador de la DL-metionina es máximo si se añade durante el crecimiento exponencial del hongo. Se ha descrito que induce además cambios morfológicos cuando se añade durante la fase temprana del crecimiento. En este sentido, se ha observado que las hifas se engruesan y fragmentan de forma irregular y se inhibe la conidiación (Velasco y col., 1994). Los resultados de los bioensayos con los diferentes aminoácidos analizados, así como con el compuesto ACV en su forma monomérica y dimérica, fueron en todos los casos considerados como negativos ya que en ningún momento se observó que se formase algún halo de inhibición. Con algunos aminoácidos, como la L-glutamina, sí se observó sin embargo, un mayor crecimiento de las colonias suplementadas con este aminoácido a una concentración entre 5-10 mM con respecto a los controles donde se había añadido la cantidad equivalente de agua destilada estéril. Este mayor crecimiento de las colonias debido probablemente a una estimulación general del metabolismo primario, no se tradujo en una producción de penicilina detectable por bioensayo. Uno de los bioensayos realizados se muestra como ejemplo en la Figura 3.1.7.

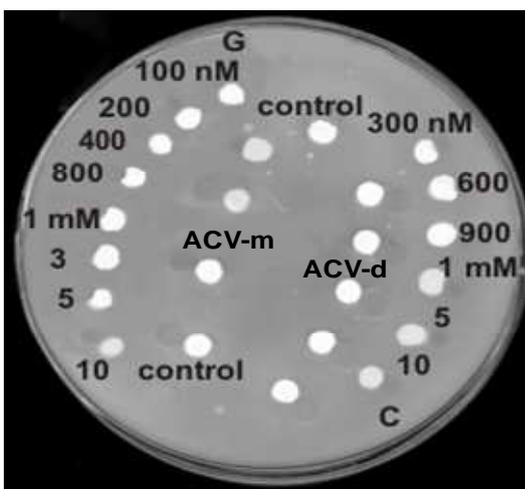


Figura 3.1.7: Resultado negativo de los compuestos analizados por bioensayo en placa. Las colonias fueron suplementadas con los aminoácidos glicina (G) y cisteína (C) a diferentes concentraciones. En la zona central las colonias fueron suplementadas con ACV-monomérico (ACV-m) y ACV-dimérico (ACV-d). Las colonias son de la cepa *P. chrysogenum* NRRL-1951.

Aminoácidos analizados	Resultado del bioensayo en placa
N α -acetil L-lisina	Negativo
Ácido L-glutámico	Negativo
L-alanina	Negativo
D,L-arginina	Negativo
L-asparragina	Negativo
D,L-cisteína	Negativo
L-fenilalanina	Negativo
glicina	Negativo
L-glutamina	Negativo
L-histidina	Negativo
L-isoleucina	Negativo
D,L-lisina	Negativo
D,L-metionina	Negativo
L-prolina	Negativo
L-serina	Negativo
L-tirosina	Negativo
L-treonina	Negativo
Triptófano	Negativo
L-valina	Negativo
ACV-monomérico	Negativo
ACV-dimérico	Negativo

Tabla 3.1.1: Aminoácidos analizados en bioensayo en placa.

1.4. Análisis del efecto inductor de caldos obtenidos en fermentaciones.

Un tercer grupo de compuestos analizados por bioensayo en placa siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 1.1, fueron los caldos obtenidos al realizar fermentaciones en medio líquido con diferentes microorganismos “medios acondicionados”, así como los medios de cultivo (medios definidos) utilizados sin fermentar.

Una vez finalizada la fermentación en medio líquido, a los caldos de cultivo se les aplicó el siguiente tratamiento:

- i. Separación del microorganismo mediante el uso de un filtro de nailon “nytal” de 30 μm de tamaño de poro y posterior lavado de las células con agua milliQ. Se desechó la fracción conteniendo el precipitado de células.
- ii. Centrifugación del caldo obtenido en el apartado anterior en una centrífuga Sorvall a 4000 rpm durante 30 minutos.
- iii. Recolección del sobrenadante y posterior esterilización mediante filtración (se utilizaron filtros de 0,20 μm de tamaño de poro).

Las muestras así obtenidas se analizaron en bioensayo en placa, pero en esta ocasión las esporas utilizadas para el desarrollo de los bioensayos fueron de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. El motivo de utilizar la cepa de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 en lugar de la cepa de *P. chrysogenum* NRRL-1951 fue debido a que al existir una diferencia considerable en cuanto a producción de penicilina, este hecho facilitaría detectar por bioensayo en placa un posible efecto inductor de los compuestos que se estaban analizando y que pudiera ser que no se detectaran con la cepa de *P. chrysogenum* NRRL-1951 debido a su escaso nivel de producción en medio sólido.

Además, en esta ocasión, dado que la sensibilidad del bioensayo era un factor crítico a la hora de determinar si un compuesto analizado pudiera actuar como inductor, se procedió a concentrar en un rotavapor parte de las muestras obtenidas en las fermentaciones para evitar una posible baja concentración del compuesto activo buscado. Estas muestras se denominaron caldos “acondicionados” concentrados.

Los microorganismos que se utilizaron en las fermentaciones en medio líquido para obtener los caldos fermentados que se utilizaron posteriormente en los bioensayos están

recogidos en la Tabla 3.1.2. Los medios y las condiciones de cultivo empleadas están recogidos en los apartados de Materiales y Métodos (4.2, 5.2).

Microorganismos para obtener el "caldo acondicionado"	Características.
<i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	Cepa fúngica de baja producción de penicilina. Posee una sola copia de la agrupación de genes biosintéticos de penicilina.
<i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255 npe10	Cepa fúngica obtenida a partir de la cepa Wisconsin 54-1255 por mutación con nitrosoguanidina. Tiene deleccionado un fragmento de ADN de 56,8 Kb que contiene la agrupación de genes biosintéticos de penicilina.
<i>Candida utilis</i> CETCT 1061.	Cepa fúngica utilizada para realizar estudios comparativos de péptidos no relacionados con la biosíntesis de penicilinas.
<i>A. chrysogenum</i> N-2.	Cepa fúngica no productora de antibióticos β -lactámicos obtenida por mutación de la cepa <i>A. chrysogenum</i> ATCC 14553, cedida por Industrias Químicas Takeda, Osaka (Japón). Esta cepa acumula durante la fermentación varios tipos de péptidos intermediarios de la biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas.

Tabla 3.1.2: Microorganismos utilizados en fermentación en matraz para recoger posteriormente caldos acondicionados y realizar bioensayos en placa.

Como se puede comprobar en la Figura 3.1.8, los caldos obtenidos dieron positivo en los bioensayos en placa. Se pueden apreciar las diferencias de tamaño existentes entre los halos de inhibición generados por las colonias de la cepa de *Penicillium* donde se habían añadido

diferentes concentraciones de los caldos de *A. chrysogenum*, *C. utilis*, *P. chrysogenum* npe10 y *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, con respecto a los controles donde se había añadido la cantidad equivalente de agua destilada estéril (bioensayo realizado según el apartado 8.2 de Materiales y Métodos).

Antes de realizar el bioensayo en placa, el caldo de la cepa de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 fue tratado previamente con una enzima betalactamasa para eliminar la penicilina producida por esta cepa. Dicha betalactamasa fue posteriormente inactivada según el apartado de Materiales y Métodos 8.1.

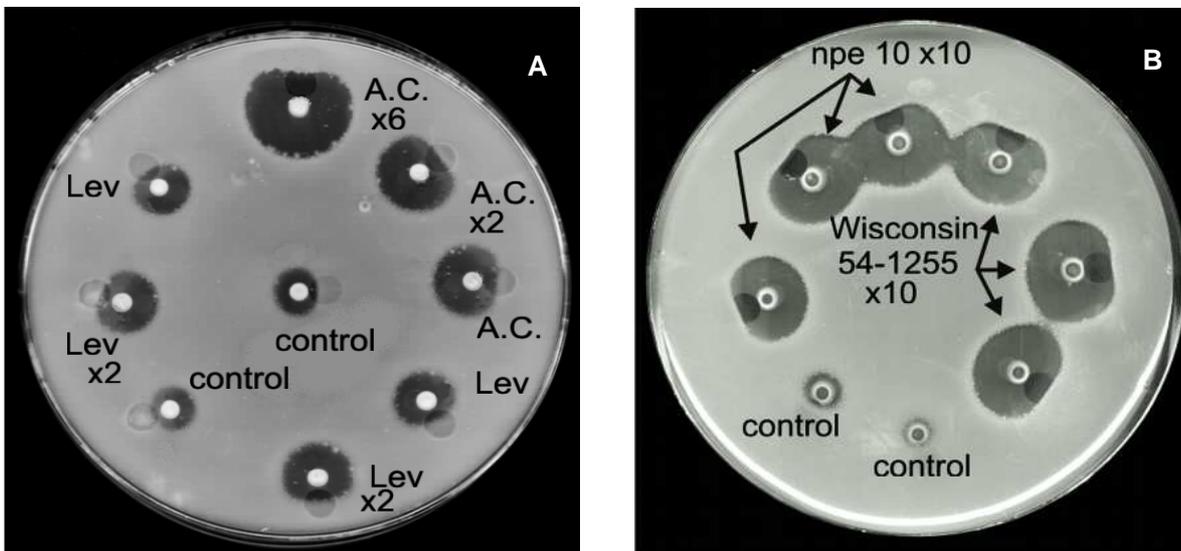


Figura 3.1.8: A. Halos de inhibición positivos utilizando caldos recogidos de fermentaciones. AC. (caldo de *A. chrysogenum*). AC. x 2 (caldo de *A. chrysogenum* concentrado 2 veces). AC. x 6 (caldo de *A. chrysogenum* concentrado 6 veces). Lev (caldo de *C. utilis*). Lev x 2 (caldo de *C. utilis* concentrado 2 veces). Los controles se realizaron añadiendo agua destilada estéril a los pocillos practicados junto a las colonias. **B.** Halos de inhibición positivos utilizando caldos recogidos de fermentaciones de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 concentrado 10 veces y tratado con una enzima betalactamasa para desactivar la penicilina previo al desarrollo del bioensayo y caldo de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 npe10 concentrado 10 veces. Los controles se realizaron añadiendo agua destilada estéril a los pocillos practicados junto a las colonias.

1.5. Análisis de la estimulación de la producción en medio líquido.

Para comprobar que los resultados positivos obtenidos en los bioensayos en placa no eran debidos a un mayor crecimiento de las colonias del microorganismo, no apreciado visualmente, como consecuencia de estar enriqueciendo el medio con una variedad de compuestos de distinta naturaleza como pueden ser oligopéptidos, oligosacáridos, etc., y por lo tanto, que el incremento de producción de penicilina observado de forma cualitativa no se debiera a un compuesto activo, se decidió realizar fermentaciones en medio líquido para poder valorar la producción específica de bencilpenicilina.

El caldo que se utilizó para realizar las fermentaciones en matraz fue el recogido de la fermentación realizada en medio definido con el microorganismo *A. chrysogenum* cepa N-2. El motivo de elegir este caldo y no otros que habían dado positivo en los bioensayos en placa fue que esta cepa produce, además de diversos péptidos, el tripéptido ACV, uno de los compuestos posibles candidatos a funcionar como inductor (Martín, 2000), (Figura 3.1.9).

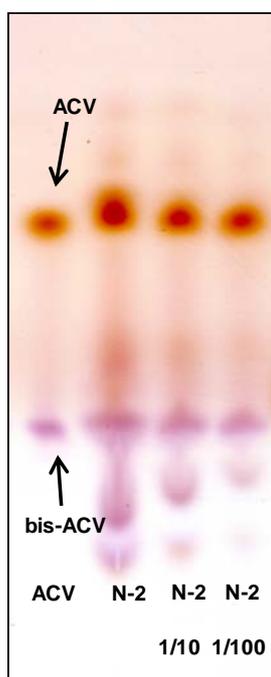


Figura 3.1.9: TLC donde se muestra un patrón de **ACV** de concentración 1 mg/ml comparado con el caldo de *A. chrysogenum* cepa N-2 a distintas concentraciones (sin diluir y diluido 1/10 y 1/100). Las condiciones del TLC se recogen en el apartado 10 de Materiales y Métodos.

Para realizar las fermentaciones en medio líquido se eligió como control la cepa de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Las condiciones de las fermentaciones, los medios empleados y los métodos de valoración de bencilpenicilina están recogidos en los apartados de Materiales y Métodos (4.2, 5.2, 8.3).

1.5.1. Estudio de la cinética de producción de penicilina en matraz.

Los resultados obtenidos de las fermentaciones realizadas fueron los correspondientes a tres experimentos distintos. Cada experimento a su vez se realizó por triplicado. En las gráficas obtenidas se representaron los valores promedios de todas las fermentaciones efectuadas. El medio elegido para acometer los estudios de producción de bencilpenicilina fue un medio definido de composición conocida para evitar la utilización de un medio complejo cuya composición podría interferir en el desarrollo del experimento. Las fermentaciones se realizaron utilizando matraces lisos de 500 ml. Se utilizó un mismo inóculo para realizar las siembras de los matraces con medio de producción con el objetivo de que la fermentación se iniciara en las mismas condiciones preliminares. A una serie de matraces se les añadió en el momento de la siembra con el inóculo, un 10 % del volumen total (10 ml) del caldo “acondicionado” de *A. chrysogenum* cepa N-2 (matraces en adelante denominados “AC”). Los matraces que sirvieron como control se les añadió la cantidad equivalente de medio de cultivo estéril, en unos casos, y agua estéril en otros para que partieran todos los matraces con un mismo volumen inicial. La toma de muestras se realizó cada 24 horas durante los días que duró la fermentación. A partir de las muestras se determinó el peso seco, la producción volumétrica en bencilpenicilina y la producción específica de dicho antibiótico.

Los caldos de fermentación tomados a diferentes tiempos se analizaron mediante bioensayo en placa utilizando como microorganismo sensible *B. subtilis*. La recta de calibración empleada para esta cuantificación ($y = 1.2691x - 2.753$; $r^2 = 0.998$) fue obtenida mediante una regresión lineal. Para ello, se emplearon los diámetros de los halos de inhibición obtenidos al realizar bioensayos en las mismas condiciones con disoluciones de bencilpenicilina de concentraciones 1, 5, 10, 20, 50 y 100 µg/ml. Las Figuras 3.1.10, 3.1.11 y 3.1.12, muestran la cinética de fermentación obtenida en medio definido.

En la Figura 3.1.10 se aprecia que el patrón de crecimiento del microorganismo en los matraces controles y en los matraces con el caldo añadido AC fue ligeramente diferente. El crecimiento en los controles fue menor que en los matraces AC. A las 24 horas de fermentación

hubo un incremento del 28 % del crecimiento en los matraces AC, con respecto a los controles. Esta diferencia de crecimiento se mantuvo durante las siguientes horas de fermentación en un porcentaje similar hasta las 72 horas, donde se alcanzó una meseta y se observó una disminución de crecimiento a las 96 horas, en ambos casos (controles y matraces AC), debido al agotamiento de algún nutriente esencial, posiblemente la fuente de carbono.

En la Figura 3.1.11 se aprecia que la producción de penicilina comenzó a las 24 horas, pero con claro incremento en los matraces donde se había añadido el caldo de AC, con respecto a los controles. En las 24 y 48 horas de cultivo el incremento de producción fue del orden del 72-75 % superior a los controles, descendiendo este porcentaje en las horas siguientes hasta el 55 %. La producción de penicilina se realizó de forma lineal hasta las 96 horas en ambos casos.

En la Figura 3.1.12 se observa un incremento de la producción específica de los matraces AC, superior a los controles desde el inicio de la fermentación, manteniéndose la diferencia constante durante el desarrollo de ésta y alcanzando un valor promedio del 33 % de incremento.

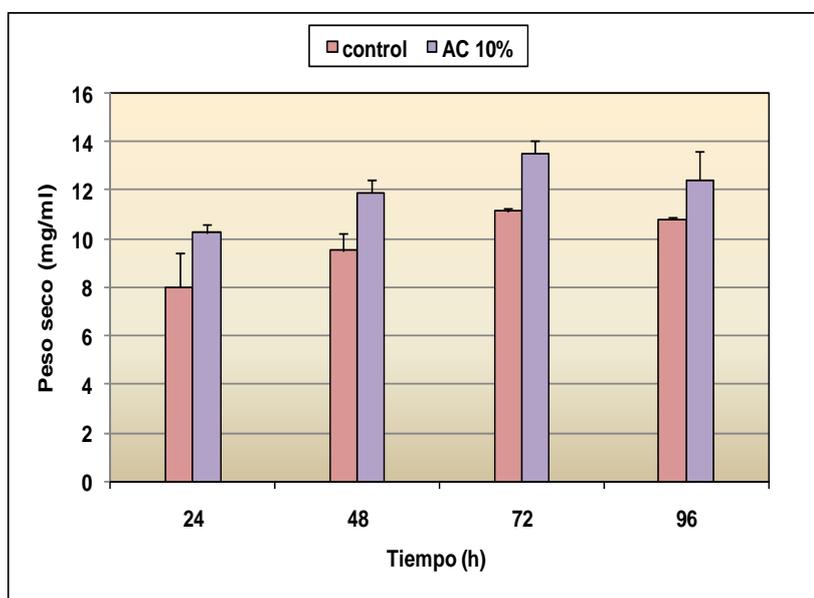


Figura 3.1.10: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido en las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con caldo AC, inoculados ambos con la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.

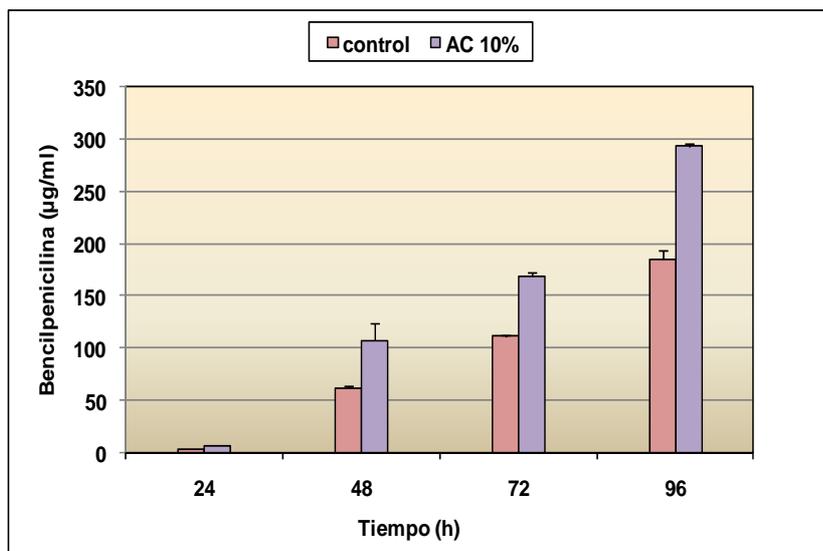


Figura 3.1.11: Cinética de producción de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y de los cultivos suplementados con caldo AC, inoculados ambos con la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.

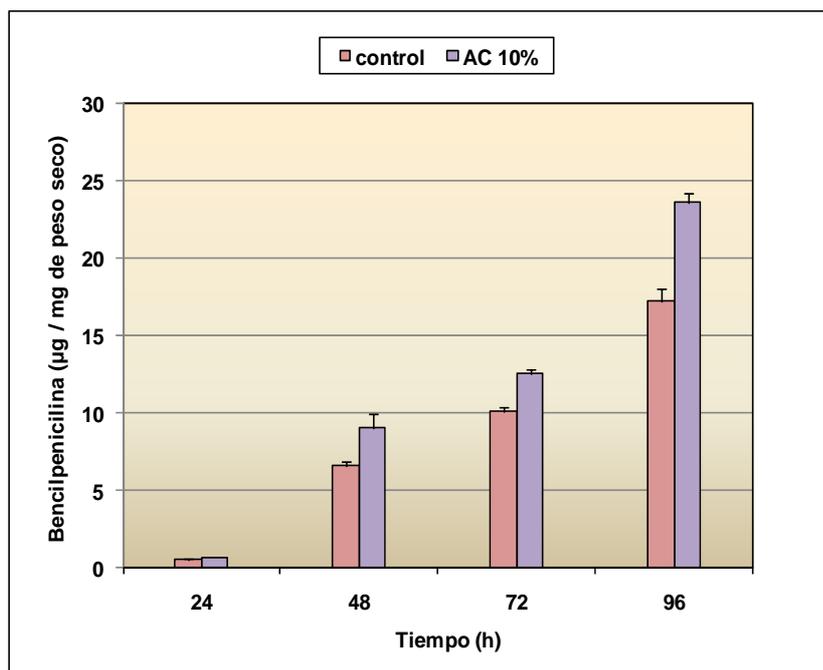


Figura 3.1.12: Cinética de producción específica de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y de los cultivos suplementados con caldo AC, inoculados ambos con la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.

1.6. Estudios de la expresión de los genes de biosíntesis de penicilina *pcbC* y *penDE*.

Una vez comprobado mediante el estudio de la cinética de la fermentación, que al añadir a los medios de cultivo una alícuota del caldo recogido en una de las fermentaciones realizadas en el punto 1.4. se obtenía un incremento en los títulos de penicilina en términos de producción específica, se decidió realizar fermentaciones en matraz para recoger el micelio a distintas horas de cultivo. A continuación, se procedió a la extracción del ARN total (Materiales y Métodos 6.4) y posteriormente se realizó un estudio por hibridación de *Northern* (Materiales y Métodos 6.4.3) para determinar el nivel de expresión de los genes de biosíntesis de penicilina cuando se añadía el compuesto inductor.

Para realizar este estudio se efectuó una fermentación en las mismas condiciones que en el apartado 1.1. añadiendo el caldo inductor en los matraces con el medio definido de producción a tiempo "0". El micelio procedente de los matraces utilizados como controles y de los matraces con el inductor se recogió a las 24, 48, 72 y 96 horas de fermentación para extraer el ARN total.

Para el desarrollo del experimento se utilizó la sonda del gen *pcbC* obtenida a partir del plásmido pULJL33 digerido con *Nco*I. Como control del nivel de expresión se empleó la sonda del gen de la β -actina obtenida a partir del plásmido pZact digerido con *Sac*I (Materiales y Métodos 2.3.6).

Para la cuantificación de la intensidad (en cpm) de las bandas de hibridación del gen *pcbC* con respecto al gen de la β -actina se utilizó el uso de un escáner electrónico de autorradiogramas (Instant Imager, Packard). El resultado del escáner electrónico sirvió para poder realizar una cuantificación del nivel de expresión dividiendo las cpm obtenidas a las diferentes horas con el gen *pcbC* entre las cpm obtenidas a las mismas horas con el gen de la β -actina.

La Figura 3.1.13 muestra los niveles de expresión del gen *pcbC* a distintas horas de fermentación. Como resultado de esta experimentación se pudo apreciar un mayor nivel de expresión del gen *pcbC* en los matraces donde se había añadido el caldo que contenía el inductor en comparación a los controles en todas las horas analizadas.

A las 24 horas de fermentación hubo un ligero aumento en el nivel de expresión en los matraces con el caldo inductor AC que se acentuó de forma más acusada a las 48 horas, alcanzando un valor del 47 % de incremento del nivel de expresión y posteriormente disminuyendo esta diferencia a las 72 y 96 horas con unos valores del 44 y del 19 %, respectivamente.

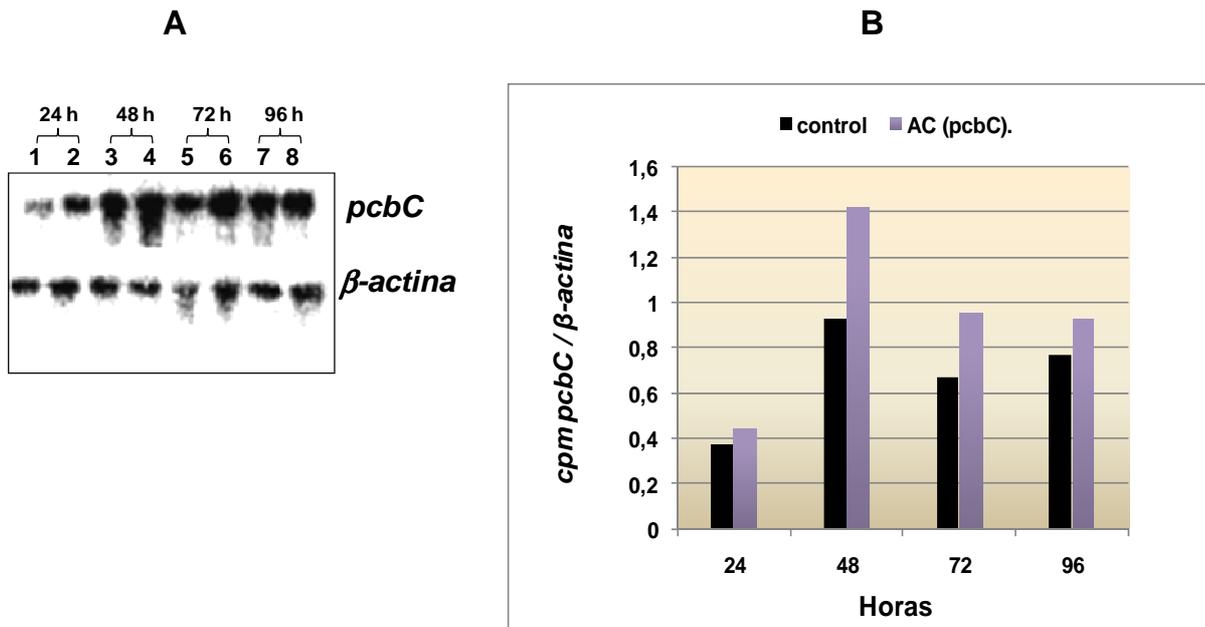


Figura 3.1.13: A. Análisis mediante transferencia de *Northern* de los niveles de expresión del gen *pcbC* en los micelios extraídos de los controles y de los matraces con el caldo inductor AC. Como control se empleó el transcrito del gen de la *β-actina*. Carril 1; control a las 24 h. Carril 2; AC a las 24 h. Carril 3; control a las 48 h. Carril 4; AC a las 48 h. Carril 5; control a las 72 h. Carril 6; AC a las 72 h. Carril 7; control a las 96 h. Carril 8; AC a las 96 h. **B.** Cuantificación de la intensidad (en cpm) de las bandas de hibridación del gen *pcbC* con respecto al gen de la *β-actina* mediante el uso de un escáner electrónico de autorradiogramas (Instant Imager, Packard).

En un segundo estudio se decidió añadir el caldo inductor AC a distintos tiempos de la fermentación para comprobar el efecto del compuesto inductor a lo largo del tiempo sobre la expresión de los genes de biosíntesis de penicilina *pcbC* y *penDE*.

Las condiciones de siembra y el medio de cultivo empleado fueron las mismas que en el apartado 1.1. salvo los tiempos en los cuales se añadió el caldo inductor AC, que fueron a tiempo "0", es decir, cuando se añadió el inóculo, 12 horas después del inicio de la fermentación y 24 horas después del inicio de la fermentación.

El micelio procedente de los matraces utilizados como controles y de los matraces con el caldo inductor se recogió a las 48 horas de cultivo para extraer el ARN total. Para el desarrollo del experimento de hibridación se utilizó la sonda del gen *pcbC* obtenida a partir del plásmido pULJL33 digerido con *NcoI* y la sonda del gen *penDE* obtenida a partir del plásmido pULJL33 digerido con *XhoI*. Como control del nivel de expresión se empleó la sonda del gen de la β -actina obtenida a partir del plásmido pZact digerido con *SacI*. Para el proceso de cuantificación de la intensidad (en cpm) de las bandas de hibridación del gen *pcbC* y del gen *penDE* con respecto al gen de la β -actina se utilizó un escáner electrónico de autorradiogramas (Instant Imager, Packard). El resultado del escáner electrónico sirvió para poder realizar una cuantificación del nivel de expresión dividiendo las cpm obtenidas a las diferentes horas con el gen *pcbC* y del gen *penDE* entre las cpm obtenidas a las mismas horas con el gen de la β -actina.

La Figura 3.1.14 muestra los niveles de expresión del gen *pcbC* y del gen *penDE* a las 48 horas de fermentación. Se pudieron apreciar tres situaciones diferentes.

- Caldo con el compuesto inductor añadido a tiempo "0". Los niveles de expresión de los genes *pcbC* y *penDE* fueron más altos que los correspondientes controles.
- Caldo con el compuesto inductor añadido a las 12 horas del inicio de la fermentación. Los niveles de expresión de los genes *pcbC* y *penDE* fueron mayores que los correspondientes controles, pero en menor medida que en el caso anterior.
- Caldo con el compuesto inductor añadido a las 24 horas del inicio de la fermentación. Los niveles de expresión de los genes *pcbC* y *penDE* fueron prácticamente iguales a los correspondientes controles.

A la vista de los resultados obtenidos, la conclusión final fue que el mayor efecto de incremento del nivel de expresión se consiguió mediante la adición a tiempo "0", disminuyendo de forma progresiva el nivel de expresión de los genes analizados a medida que se añadía más tarde el caldo AC con el compuesto inductor.

Este hecho se confirmó analizando la producción volumétrica de bencilpenicilina en las mismas muestras donde se recogió el ARN total, siendo mayor la producción volumétrica en aquellos matraces donde se había añadido el compuesto inductor a tiempo "0" y disminuyendo la diferencia con respecto a los controles de forma progresiva a medida que se retardaba el tiempo de adición del inductor a los matraces (datos no mostrados).

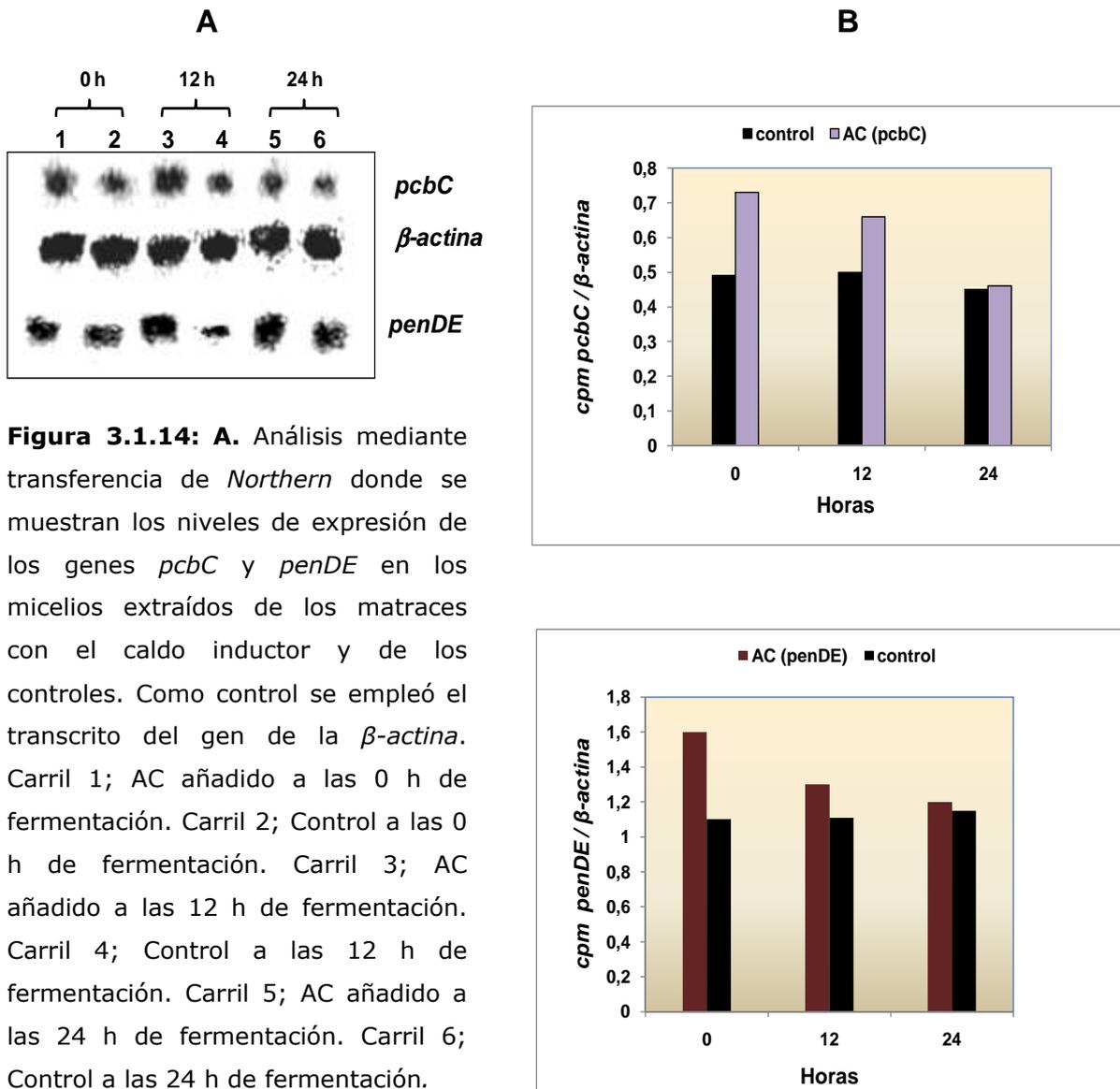


Figura 3.1.14. A. Análisis mediante transferencia de Northern donde se muestran los niveles de expresión de los genes *pcbC* y *penDE* en los micelios extraídos de los matraces con el caldo inductor y de los controles. Como control se empleó el transcrito del gen de la β -actina. Carril 1; AC añadido a las 0 h de fermentación. Carril 2; Control a las 0 h de fermentación. Carril 3; AC añadido a las 12 h de fermentación. Carril 4; Control a las 12 h de fermentación. Carril 5; AC añadido a las 24 h de fermentación. Carril 6; Control a las 24 h de fermentación.

Figura 3.1.14. B. Cuantificación de la intensidad (en cpm) de las bandas de hibridación de los genes *pcbC* y *penDE* con respecto al gen de la β -actina mediante el uso de un escáner electrónico de autorradiogramas (Instant Imager, Packard).

1.7. Estudio de expresión génica del gen *pcbAB* empleando genes reporteros. Análisis de la actividad β -galactosidasa.

Para poder analizar el nivel de expresión del gen *pcbAB* cuando se añadió el compuesto inductor a las fermentaciones, se recurrió a una determinación de actividad enzimática en lugar del análisis mediante transferencia de *Northern* ya que todos los intentos de obtener una señal de las bandas electroforéticas en los filtros utilizados para la hibridación de la sonda presentaron mucho ruido de fondo lo que imposibilitó la cuantificación de la intensidad (en cpm) de las bandas de hibridación del gen *pcbAB*.

Para los estudios de análisis de la actividad enzimática se utilizó la cepa *P. chrysogenum* pDEL0 (Kosalková y col., 2000). Ésta, deriva de la cepa npe10 *pyrG*⁻ y posee integrado en una sola copia en el locus *pyrG*, el promotor del gen *pcbAB* fusionado traduccionalmente al gen *lacZ* de *E. coli*, el cual codifica la enzima β -galactosidasa.

El gen de esta enzima así como su producto están bien caracterizados genética y bioquímicamente y existen ensayos muy sensibles para determinar la actividad de ésta, que utiliza sustratos comerciales disponibles.

Se realizaron fermentaciones por triplicado utilizando medio definido de producción en las mismas condiciones que en el apartado 1.1. y añadiendo el caldo AC al inicio de la fermentación. La actividad β -galactosidasa se determinó en extractos libres de células recogidos a las 30 y 60 horas de fermentación según el apartado de Materiales y Métodos 7.3.

En la Figura 3.1.15 se observa que la actividad β -galactosidasa en la cepa *P. chrysogenum* pDEL0 fue siempre más alta en los cultivos donde se añadió el caldo con el compuesto inductor, con lo cual, éste actuó también incrementando el nivel de expresión del promotor del gen *pcbAB*.

Con este último experimento quedó comprobado que el caldo AC añadido a los matraces con medio definido de producción, incrementaba el nivel de transcripción de los tres genes implicados en la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*.

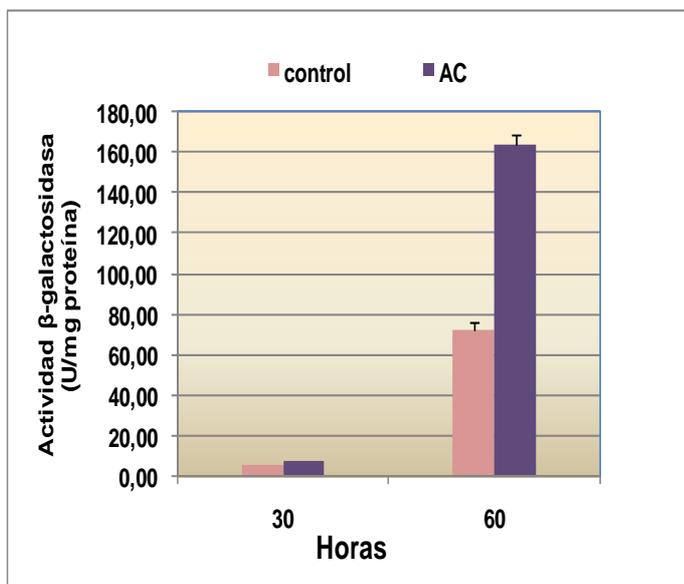


Figura 3.1.15: Valoración de la actividad β -galactosidasa del transformante pDEL0. Los extractos celulares se obtuvieron a las 30 h y 60 h de fermentación. Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

1.8. Efecto de la adición del ácido fenilacético (cadena lateral precursora de bencilpenicilina) con respecto a la adición del compuesto inductor en el medio de fermentación.

La adición de precursores de la cadena lateral de penicilina origina un incremento de la formación del antibiótico, en particular, de un tipo de penicilina dependiendo de la naturaleza del precursor. Con objeto de comprobar si existía una relación directa o de sinergia entre la presencia de ácido fenilacético (AFA) y presencia del compuesto inductor e incremento en la producción de penicilina, se realizaron bioensayos en placa y fermentaciones en medio líquido.

1.8.1. Efecto sobre la producción en medio sólido.

Para la realización de este estudio se diseñó un bioensayo en placa como los realizados en apartados anteriores (apartado 8.2 de Materiales y Métodos). Se prepararon placas con medio de cultivo Czapek sin AFA en su composición y placas con el mismo medio a las que se añadieron dos concentraciones de este compuesto 0,15 g/l y 1,5 g/l, respectivamente.

Las placas se inocularon con 2 μ l de esporas de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 procedentes de un mismo glicerol. Trascorridas 24 horas de incubación a 28 °C se practicó un pocillo con un sacabocados al lado de cada colonia y se añadieron 100 μ l del caldo inductor a

una de las colonias y el equivalente en agua estéril a otra colonia que serviría de control. A las 48 horas de incubación se añadió una cobertera de TSA al 1 % con esporas del microorganismo sensible (*B. subtilis*).

Después de añadir la cobertera las placas se incubaron a 30 °C durante toda la noche. En la Figura 3.1.16 se puede apreciar en todas las placas, ya sea en ausencia o presencia de AFA, que las colonias a las que se añadió el caldo inductor presentan un mayor halo de inhibición que los respectivos controles.

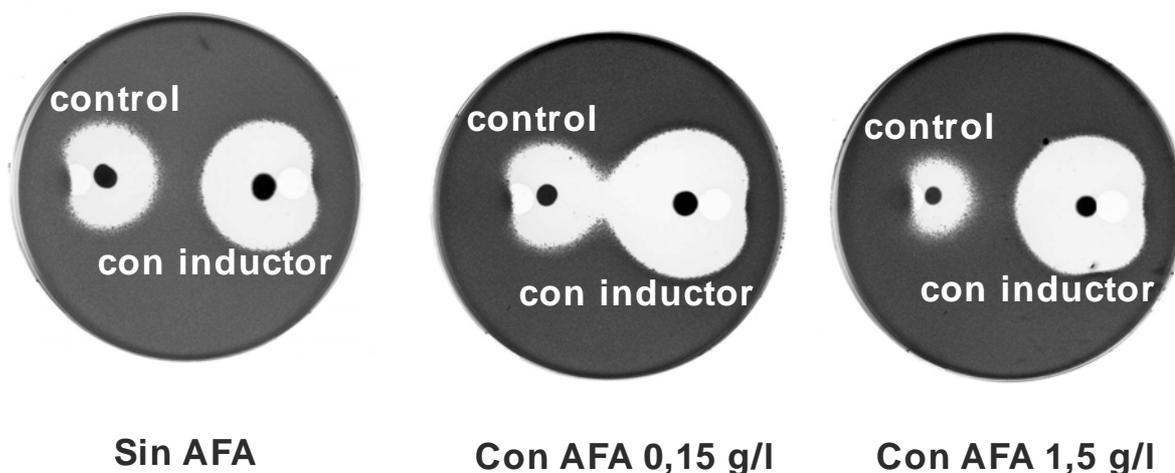


Figura 3.1.16: Bioensayo frente a *B. subtilis* empleando medios de cultivo sin AFA, con AFA a diferentes concentraciones y añadiendo en todos los casos el compuesto inductor a una de las colonias.

1.8.2. Efecto sobre la producción en medio líquido.

Para llevar a cabo este estudio se realizó una fermentación en medio definido de producción según el apartado 5.2.1.2 de Materiales y Métodos empleando todas las combinaciones posibles referidas a la presencia de AFA y compuesto inductor. Las muestras para la valoración de penicilina por bioensayo se recogieron a las 20 y 40 horas. Se resumen en la Tabla 3.1.3 las condiciones iniciales de cada serie de matraces.

Serie	Ácido fenilacético	Compuesto inductor
1 (20 h)	+	+
2 (20 h)	-	-
3 (20 h)	-	+
4 (20 h)	+	-
5 (40 h)	+	-
6 (40 h)	-	-
7 (40 h)	+	+
8 (40 h)	-	+

Tabla 3.1.3: Serie de matraces con/sin AFA en el medio de cultivo y con/sin compuesto inductor.

Para la realización de los bioensayos se eligió el microorganismo *M. luteus* por ser una cepa sensible a la isopenicilina N y a la bencilpenicilina. En la Figura 3.1.17 se pueden apreciar los halos de inhibición generados frente al microorganismo sensible a las 20 y 40 horas de fermentación. Con estos resultados tanto en bioensayo en placa como en medio líquido, se pudo concluir que el AFA no parece influir en gran medida sobre el incremento de producción de penicilina, al contrario que el compuesto inductor, que ejerce un gran efecto sobre la misma. En la Figura 3.1.18 se puede comprobar que el pico cromatográfico correspondiente a la muestra de

40 horas de fermentación de los matraces que contenían el compuesto inductor y el AFA es mayor que el pico cromatográfico correspondiente a los matraces que contenían AFA sin compuesto inductor. Este efecto pudo deberse, en parte, a que en las cepas de baja producción el posible efecto activador de la producción por parte del AFA fuera menos acusado que en las cepas de alta producción donde la expresión enzimática de la vía biosintética es considerablemente mayor.

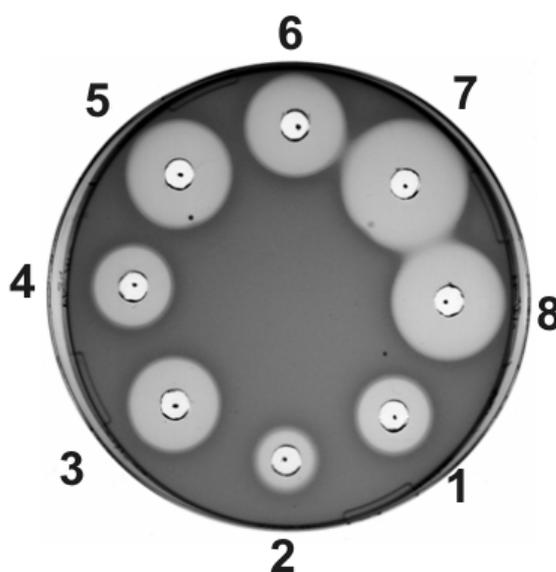


Figura 3.1.17: Bioensayo frente a *M. luteus* de caldos de fermentación obtenidos a diferentes tiempos.

20 horas de fermentación:

- **1** (+AFA/+inductor).
- **2** (-AFA/-inductor).
- **3** (-AFA/+inductor).
- **4** (+AFA/-inductor).

40 horas de fermentación:

- **5** (+AFA/-inductor).
- **6** (-AFA/-inductor).
- **7** (+AFA/+inductor).
- **8** (-AFA/+inductor).

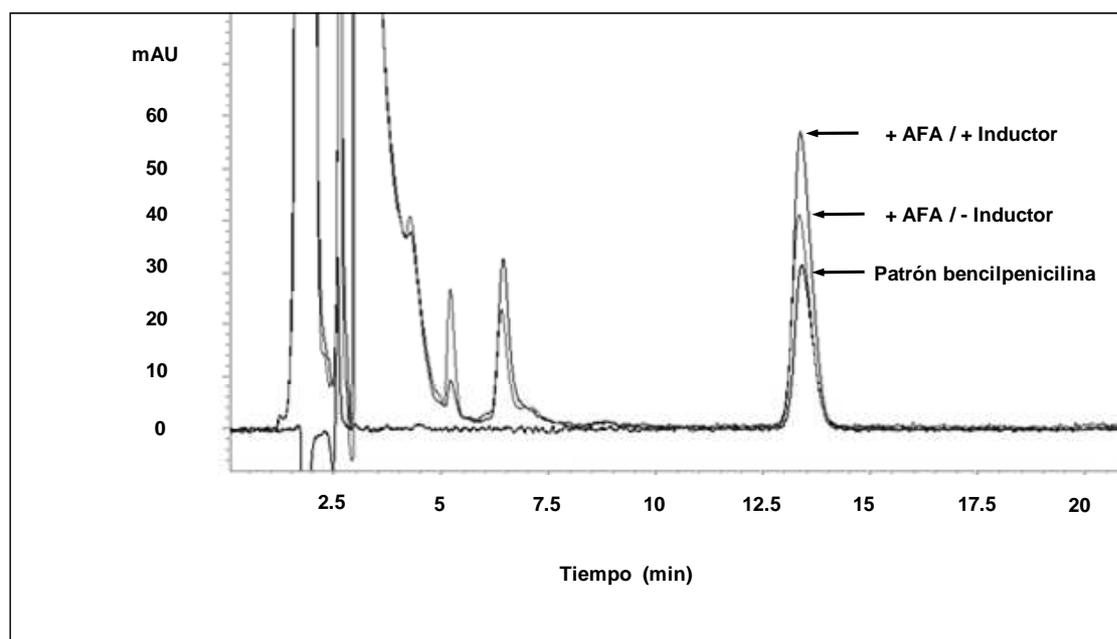


Figura 3.1.18: Cromatograma correspondiente a las muestras recogidas a las 40 horas de fermentación. Las condiciones cromatográficas para valoración de bencilpenicilina son las del apartado 8.3.2 Tabla 2.4 de Materiales y Métodos.

2. Proceso de obtención, recolección y purificación del caldo de cultivo de la cepa *A. chrysogenum* N-2.

Una vez comprobado que el caldo obtenido por fermentación de la cepa de *A. chrysogenum* N-2 incrementaba la producción específica de bencilpenicilina en cultivos de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y al mismo tiempo existía un incremento del nivel de expresión de los genes de biosíntesis de penicilina, nos planteamos desarrollar un método de purificación para el compuesto inductor. Con este fin, se procedió a realizar una revisión bibliográfica de los procedimientos y técnicas habituales en la purificación de compuestos a partir de caldos de fermentación. Además, fue necesario disponer de un sistema rápido de bioensayo que permitiese un seguimiento del compuesto de interés durante su purificación (bioensayo en placa).

En el proceso de obtención del caldo de *A. chrysogenum* cepa N-2 se utilizó un fermentador BRAUM-BIOSTAT G 15 litros según se especifica en el apartado de Materiales y Métodos (5.2.1.1). Para realizar la fermentación se utilizaron tanto en la etapa de inóculo como la de producción, medios de composición definida.

De la etapa de fermentación se obtuvo un volumen de caldo de 10 litros, transcurridas 72 horas desde el inicio de ésta. El primer tratamiento del caldo obtenido fue la separación del micelio mediante la filtración del medio de cultivo por un filtro de nailon "nytal" de 30 µm de tamaño de poro. Posteriormente el caldo se centrifugó a 8000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. De las dos fracciones obtenidas se recogió el sobrenadante y se desechó la fracción precipitada (restos celulares).

El caldo filtrado obtenido mostró numerosos picos cuando se analizó mediante cromatografía de HPLC (Figura 3.1.19).

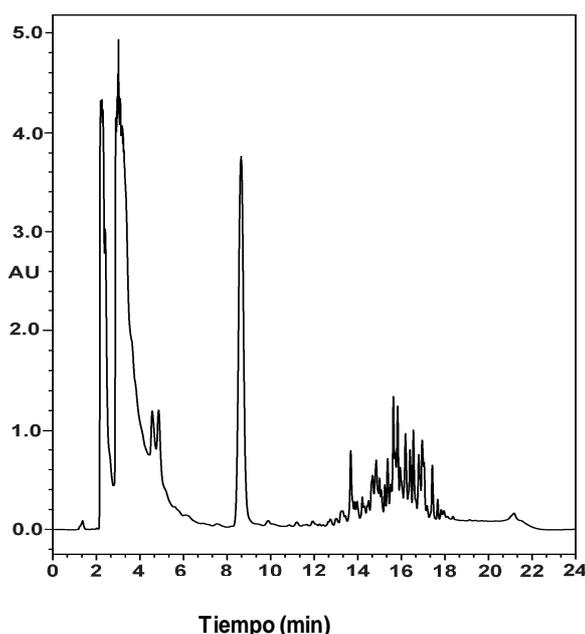


Figura 3.1.19: Cromatograma del caldo de cultivo de *A. chrysogenum* N-2 (72 h). Absorbancia a 214 nm. Método cromatográfico descrito en el apartado 9 de Materiales y Métodos Tabla 2.5.

2.1. Desproteinización del caldo filtrado.

Una vez obtenido el filtrado libre de células, el caldo se procesó rápidamente para evitar una posible degradación del compuesto a purificar ya que los caldos de fermentación de

cualquier microorganismo contienen con frecuencia enzimas que pueden degradar todo tipo de metabolitos. Para no tener que trabajar con un volumen excesivo, se decidió concentrar el caldo filtrado en un rotavapor concentrador. El caldo concentrado en el paso anterior fue clarificado eliminando las proteínas del mismo. El método utilizado para el proceso de desproteización consistió en ajustar el pH con HCl concentrado hasta alcanzar un valor de pH de 2 en un baño de hielo y trabajando en una cámara fría lo más rápidamente posible para evitar una posible degradación del compuesto. Transcurrida una hora desde el ajuste del pH, el caldo se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C durante 90 minutos en una supercentrífuga Sorvall.

Después de la centrifugación, se recogió el sobrenadante obtenido y se ajustó a pH 7 con NaOH, con lo que se incrementó ligeramente el volumen de dicho sobrenadante. Este caldo así tratado, se esterilizó por filtración utilizando un filtro estéril de 0,2 µm de tamaño de poro, trabajando en campana de flujo laminar, para evitar cualquier tipo de contaminación con microorganismos ambientales que pudieran generar una degradación de los compuestos a purificar. El caldo, una vez estéril, se repartió en botellas estériles y se mantuvo a 4 °C en oscuridad hasta su utilización en los distintos procesos cromatográficos.

2.2. Extracción con un solvente orgánico.

Dado que no se tenía conocimiento sobre la naturaleza del compuesto inductor, era importante realizar una extracción con un solvente orgánico apolar para obtener dos fases: una fase acuosa y otra orgánica y realizar un seguimiento del compuesto mediante bioensayo en placa para dilucidar su naturaleza polar o apolar. Para ello, se procedió a realizar una extracción del caldo utilizando como solvente orgánico acetato de etilo en una relación 3:1 (3 volúmenes de acetato de etilo por 1 volumen de caldo).

Este proceso se repitió 3 veces. Una vez separadas las fases acuosa y orgánica, éstas se concentraron en un rotavapor concentrador a sequedad. El sólido procedente de la fase acuosa se disolvió en agua milliQ y el de la fase orgánica se disolvió en una mezcla de metanol/agua milliQ en una proporción 50/50 (vol/vol). El caldo obtenido en este proceso de purificación se analizó mediante cromatografía HPLC para ver el resultado del proceso de extracción con un solvente orgánico (Figura 3.1.20: A, B).

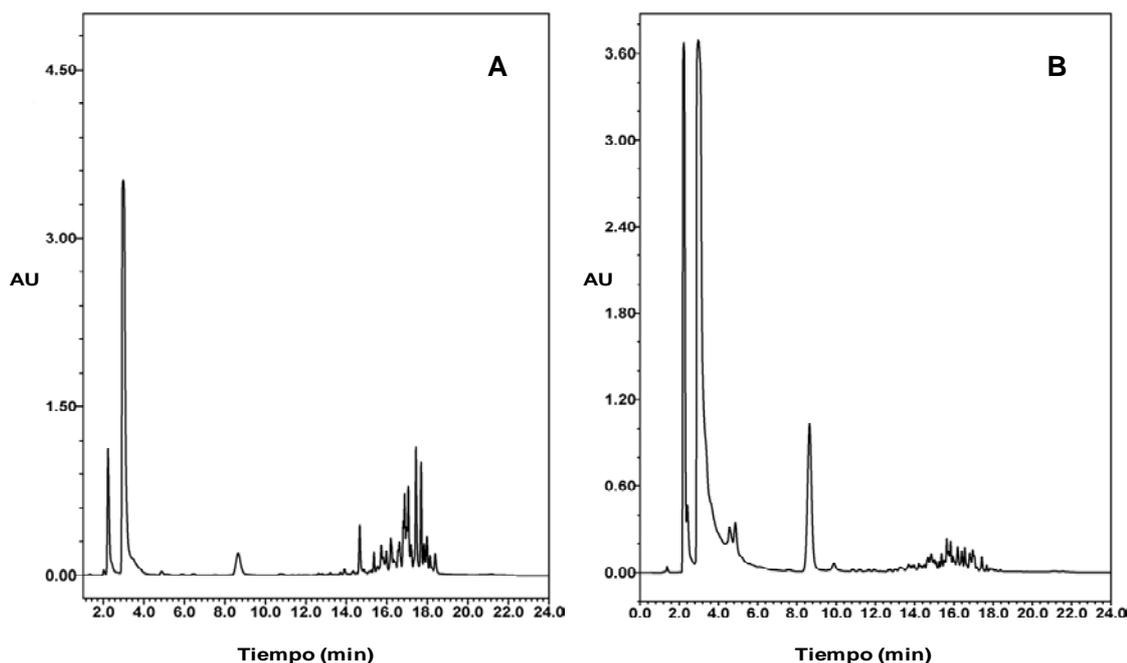


Figura 3.1.20: **A.** Cromatograma HPLC del caldo de cultivo después de realizar la extracción con acetato de etilo (fase orgánica). **B.** Cromatograma del caldo de cultivo después de realizar la extracción con acetato de etilo (fase acuosa). Método cromatográfico descrito en el apartado 9 de Materiales y Métodos, Tabla 2.5.

Ambas fracciones, acuosa y orgánica, se bioensayaron en placa para determinar la actividad inductora, siguiendo el mismo procedimiento ya descrito anteriormente. El resultado obtenido (Figura 3.1.21), fue que la molécula inductora estaba presente en la fase acuosa y no en la fase orgánica, indicando por lo tanto su naturaleza polar.

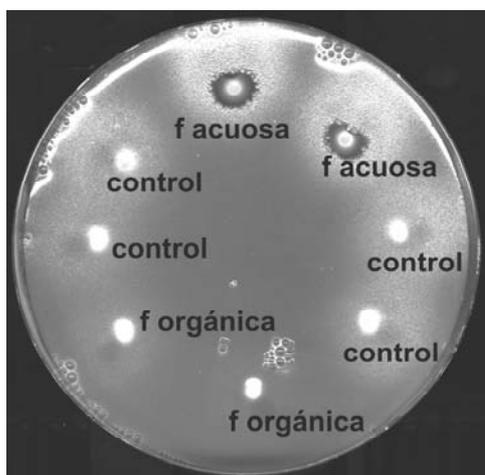


Figura 3.1.21: Bioensayo en placa con las fracciones acuosa y orgánica obtenidas en el proceso de extracción. Como control se añadió agua milliQ. La cepa utilizada para la realización del bioensayo fue *P. chrysogenum* NRRL-1951.

2.3. Cromatografía de adsorción. Tratamiento con carbón activo.

Para conseguir un mayor grado de pureza de la fracción acuosa en la que se encontraba el compuesto inductor, se utilizaron columnas de adsorción. La preparación de la columna de carbón activo empleada en este trabajo está recogida en el apartado de Materiales y Métodos 11 y 11.1. Tras el empaquetamiento de la columna y el equilibrado de la misma con agua milliQ, se pasaron por ésta 100 ml de la fracción acuosa obtenida en el proceso de extracción con acetato de etilo a un flujo de 1 ml/min. Finalizado este proceso, se pasaron por la columna dos volúmenes de agua milliQ que se juntaron al caldo eluido. Los compuestos retenidos en la columna se eluyeron de ésta con metanol.

Todas las fracciones obtenidas, tanto el eluido inicial como los compuestos retenidos en el tratamiento de esta columna, se concentraron en un rotavapor concentrador a sequedad. Posteriormente las fracciones se disolvieron en agua milliQ y se realizaron bioensayos en placa para determinar las fracciones que seguían dando resultado positivo antes de proceder al siguiente paso de purificación. El resultado del bioensayo en placa indicó que sólo la fracción acuosa dio positivo con respecto a los controles y todas las fracciones retenidas por la columna dieron negativo (datos no mostrados). Puesto que el color de la muestra palidecía al paso por la columna, eliminándose impurezas coloreadas del caldo además de compuestos orgánicos aromáticos (Figura 3.1.22), la conclusión final que pudo extraerse de estos resultados es que este tratamiento aportó una limpieza de la muestra.

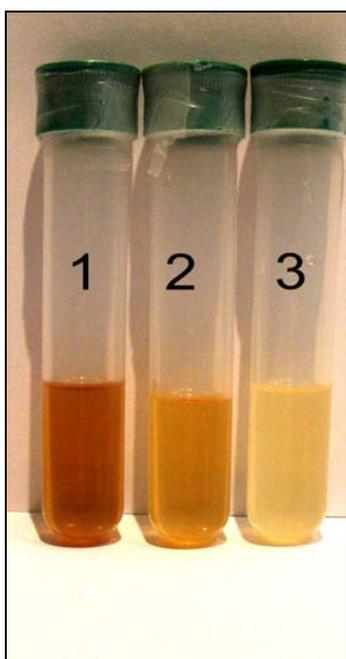


Figura 3.1.22: Clarificado de la muestra a medida que avanza el proceso de purificación. Tubo número 1, muestra inicial del caldo concentrado. Tubo número 2, muestra fase acuosa después del proceso de extracción con acetato de etilo. Tubo número 3, muestra después del tratamiento con carbón activo.

2.4. Cromatografía de intercambio iónico.

Para la realización de este trabajo se emplearon dos resinas de intercambio iónico fuerte, ambas con la matriz de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB); la resina de intercambio catiónico fuerte Dowex ® 50WX8-400 (cuyo grupo ionogénico es $-\text{SO}_3\text{-H}^+$ y se encuentra totalmente ionizado a un pH por encima de 2.0) y la resina de intercambio aniónico fuerte Dowex ® 1X8-400 (cuyo grupo ionogénico es $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$ y se encuentra totalmente ionizado hasta un pH de aproximadamente 10).

Debido al desconocimiento de la posible carga de la molécula inductora y su punto isoeléctrico, se probaron distintas condiciones cromatográficas con ambas resinas con el objetivo de seleccionar el tipo de cromatografía a utilizar, bien de intercambio catiónico o aniónico, seleccionar el tipo de tampón para desarrollar la cromatografía y poner a punto las condiciones de equilibrado de columna y elución de moléculas retenidas. Los pasos seguidos para la realización de las cromatografías en “*batch*” fueron los siguientes:

- Preparar una batería de tubos de polipropileno de 10 ml de capacidad con 1 g de resina en cada uno.
- Embeber la resina de cada tubo en el tampón elegido (acetato sódico 100 mM para la resina de intercambio catiónico y Tris 100 mM para la resina de intercambio aniónico) a diferente pH y realizar sucesivos lavados de la resina hasta 10 veces. Usar un rango de pH de 3 a 8 para la resina de intercambio catiónico y de 5 a 9 para la resina de intercambio aniónico con 0,5 unidades de pH de variación en cada tubo.
- Equilibrar la resina de cada tubo con lavados sucesivos (hasta 5 lavados) en tampón de baja fuerza iónica (los mismos tampones utilizados en el apartado anterior pero en esta ocasión a una concentración 10 mM).
- Añadir la muestra de caldo diluida en el tampón.
- Mezclar la muestra con la resina durante 10 minutos con agitación suave.
- Centrifugar los tubos a 800 rpm durante 2 minutos para precipitar la resina y recoger el sobrenadante.

- Lavar los tubos con el tampón de baja fuerza iónica y centrifugar éstos como en el paso anterior.
- Eluir los compuestos retenidos mediante el lavado de las resinas con una solución de NaCl 1 M en el tampón empleado. Mezclar la resina con la solución durante 10 minutos con agitación suave.
- Centrifugar los tubos a 800 rpm durante 2 minutos para precipitar la resina y recoger el sobrenadante.
- Bioensayar las fracciones recogidas.

Después de la serie de test realizados con ambas resinas, el resultado fue que con la resina de intercambio catiónico, utilizando un tampón de acetato sódico a un pH entre 3 y 6, se obtenía en bioensayo en placa un resultado positivo en la fracción eluida. También se obtuvo un resultado positivo en el sobrenadante recogido antes de comenzar los lavados para la obtención del eluido. La explicación de estos resultados, se debe a una saturación de la capacidad de la resina. Con estos resultados, se preparó una columna de dimensiones 5 x 30 cm (Materiales y Métodos 2.1.3). Tras cargar la muestra de caldo (fracción acuosa, 15 ml diluidos en el tampón acetato sódico 10 mM pH 3,0) y de realizar los lavados de la columna con tampón, comenzó el eluido con NaCl en gradiente hasta alcanzar una concentración 0,5 M. Se recogieron 120 fracciones de 3 ml cada una.

Las fracciones, en su conjunto, se congelaron a -80 °C para una posterior liofilización. Cada liofilizado se disolvió en 400 µl de agua milliQ y posteriormente se juntaron las fracciones en grupos de 3 ó 4 para reducir el número de bioensayos. A continuación se bioensayaron todas las fracciones para determinar cuáles daban resultado positivo y se analizaron en el HPLC analítico empleando el método cromatográfico de la Tabla 2.5 de Materiales y Métodos (Figura 3.1.23 y Figura 3.1.24).

Se observaron resultados positivos en las fracciones siguientes: 33-35, 36-38, 39-41, 42-44, 45-47 y 48-50. Se juntaron todas las fracciones que componían cada una de estas series con actividad para continuar con el proceso de purificación.

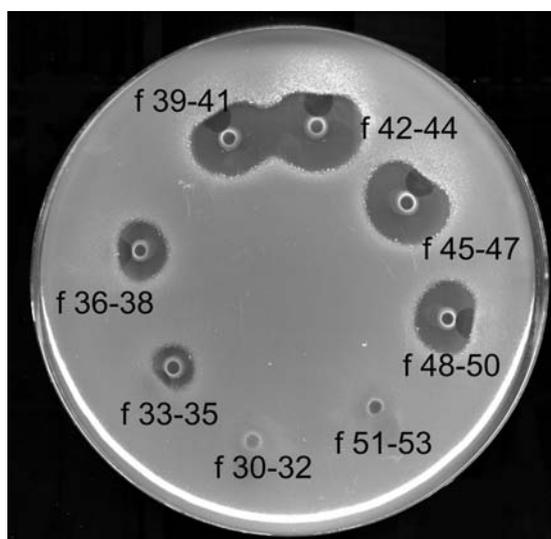


Figura 3.1.23: Bioensayo de las fracciones eluidas de la columna de intercambio catiónico.

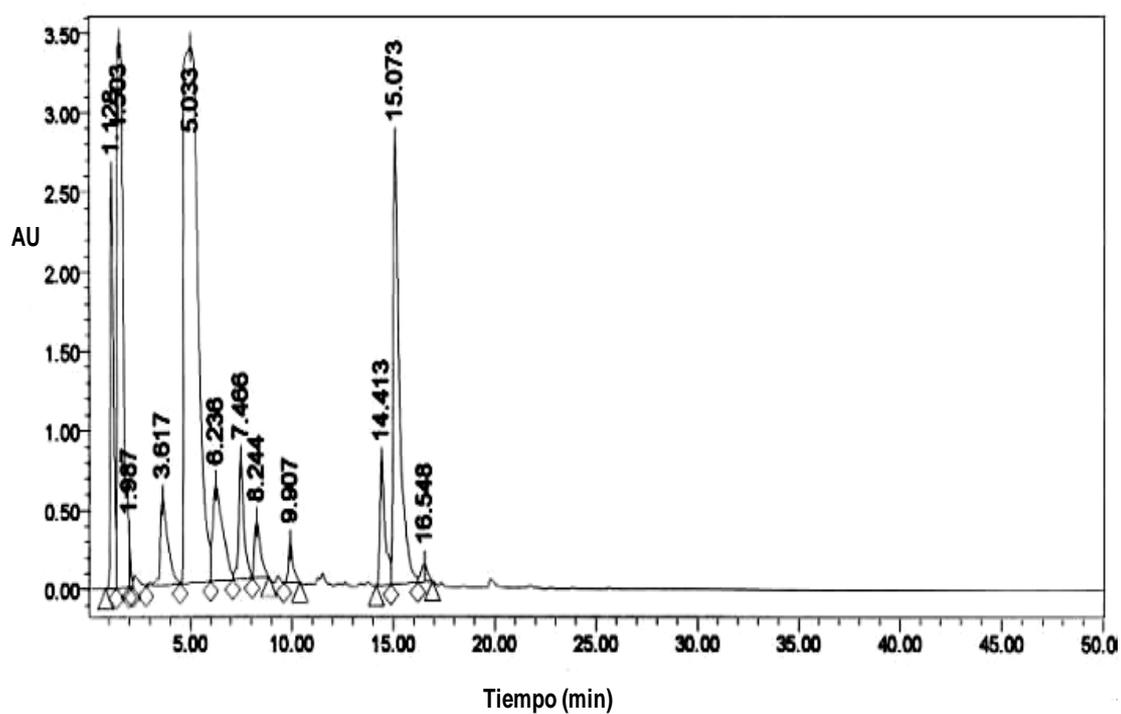


Figura 3.1.24: Análisis de las fracciones 36-50 en HPLC analítico. Las muestras se derivatizaron con FMOC. Método cromatográfico descrito en el apartado 9 de Materiales y Métodos Absorbancia a 250 nm.

2.5. Cromatografía de hidrofobicidad.

Con el fin de separar los componentes de las distintas fracciones de acuerdo a su hidrofobicidad, en el proceso de purificación de la molécula reguladora se utilizó una columna de interacción hidrofóbica (HIC) con una resina phenyl sepharose 6 fast flow. Una vez empaquetada la columna y equilibrada según el apartado de Materiales y Métodos 11.3, se pasaron las fracciones recogidas en la cromatografía de intercambio catiónico a un flujo de 1 ml/min. No se adicionó ninguna sal a las fracciones ya que éstas contaban con una concentración salina lo suficientemente alta para que la mayor parte de los compuestos con cierto carácter hidrofóbico presentes en dichas fracciones fueran adsorbidos por la resina. El proceso de elución se realizó de forma gradual, para que el cambio de polaridad del eluyente no afectara al empaquetamiento del lecho. De este modo, se fueron pasando por la columna diferentes mezclas de metanol: agua (20:80; 50:50; 80:20). Todas las fracciones recogidas, las eluidas de la columna y la que no había quedado retenida en la columna se concentraron a sequedad y se disolvieron en agua milliQ para analizar por bioensayo en placa. Únicamente dio resultado positivo en el bioensayo en placa la fracción no retenida en la columna (Figura 3.1.25).

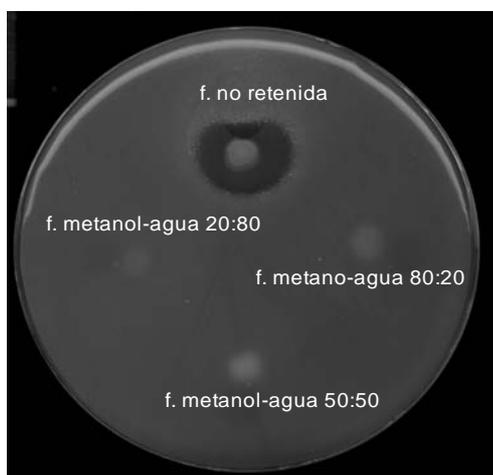


Figura 3.1.25: Bioensayo de la fracción no retenida y de las fracciones eluidas de la columna de hidrofobicidad.

2.6. Cromatografía de gel filtración: columna Sephadex G10.

Con el fin de conseguir un grado mayor de purificación, se llevó a cabo un paso a través de cromatografía de gel filtración o de exclusión (SEC), cuyo empaquetamiento y equilibrado se definen en el apartado de Materiales y Métodos 11.4. El tamaño de la columna empleada para

desarrollar la cromatografía fue 1.5 x 170 cm. El tampón utilizado para el desarrollo de la cromatografía fue acetato sódico 0,05 M, para evitar las interacciones inespecíficas entre los compuestos y la matriz de la columna. La carga (2,5 ml de la fracción no retenida en la columna de hidrofobicidad) se realizó por gravedad y el caudal de flujo fue de 0.2 ml/min. Se recogieron 120 fracciones de 3 ml que se concentraron mediante liofilización. El liofilizado de cada fracción se disolvió en 300 µl de agua milliQ y se analizó mediante bioensayo. Las fracciones que resultaron positivas (Figura 3.1.26: A, B) se juntaron en una única para continuar en el proceso de purificación.

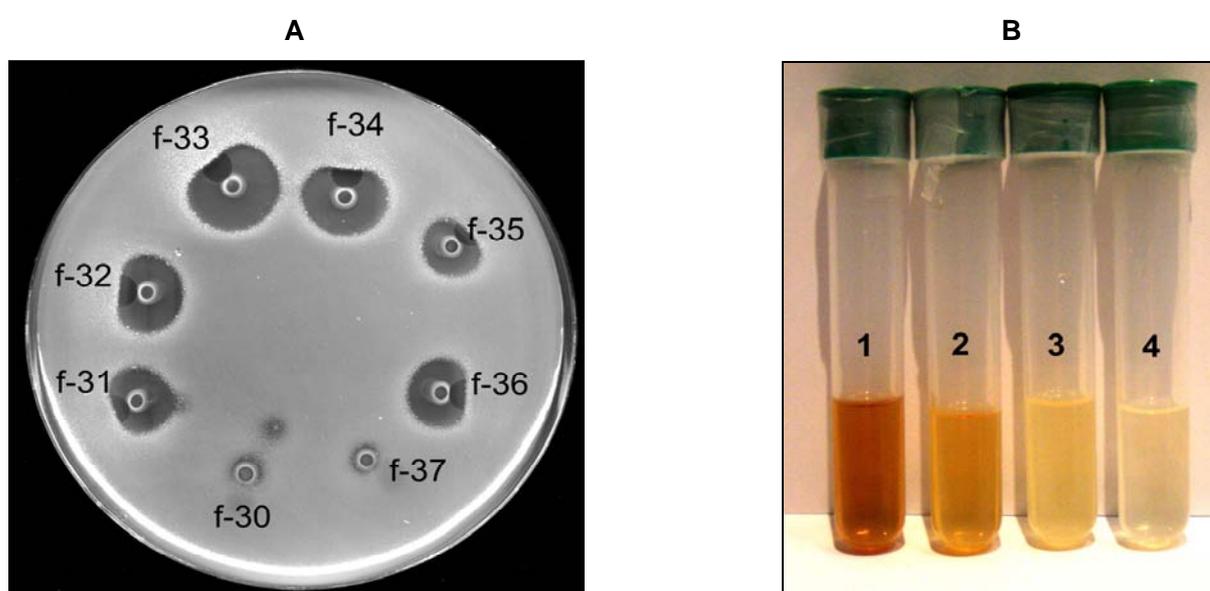


Figura 3.1.26: A. Bioensayo de las fracciones recogidas de la columna de gel filtración G10. **B.** Clarificado de la muestra a medida que avanza el proceso de purificación. Tubo número 1, muestra inicial del caldo concentrado. Tubo número 2, muestra fase acuosa después del proceso de extracción con acetato de etilo. Tubo número 3, muestra después del tratamiento con carbón activo. Tubo número 4, muestra después del tratamiento columna G10.

2.7. Purificación mediante cromatografía de alta eficacia (HPLC).

La cromatografía líquida de alto rendimiento o HPLC suele ser el último paso en los protocolos de aislamiento de compuestos bioactivos de caldos de fermentación para conseguir purificarlos a homogeneidad. En esta etapa de purificación, se probaron diferentes tipos de columnas cromatográficas y métodos cromatográficos con distintos solventes hasta conseguir

una resolución aceptable de los picos cromatográficos. El método cromatográfico utilizado está recogido en el apartado 9 de Materiales y Métodos, Tabla 2.5. La Figura 3.1.27 A, muestra el cromatograma obtenido al aplicar la fracción recogida en la cromatografía de gel filtración.

Se recogieron 5 fracciones correspondientes a los picos cromatográficos obtenidos para proceder a su liofilización y posterior bioensayo en placa (Figura 3.1.27 B). De las fracciones obtenidas la única que dio positivo fue la fracción número 1. A partir de este momento, se recogió la fracción número 1 de forma sucesiva para obtener cantidad suficiente de metabolito relativamente puro para poder realizar una posterior identificación mediante espectrometría de masas y RMN.

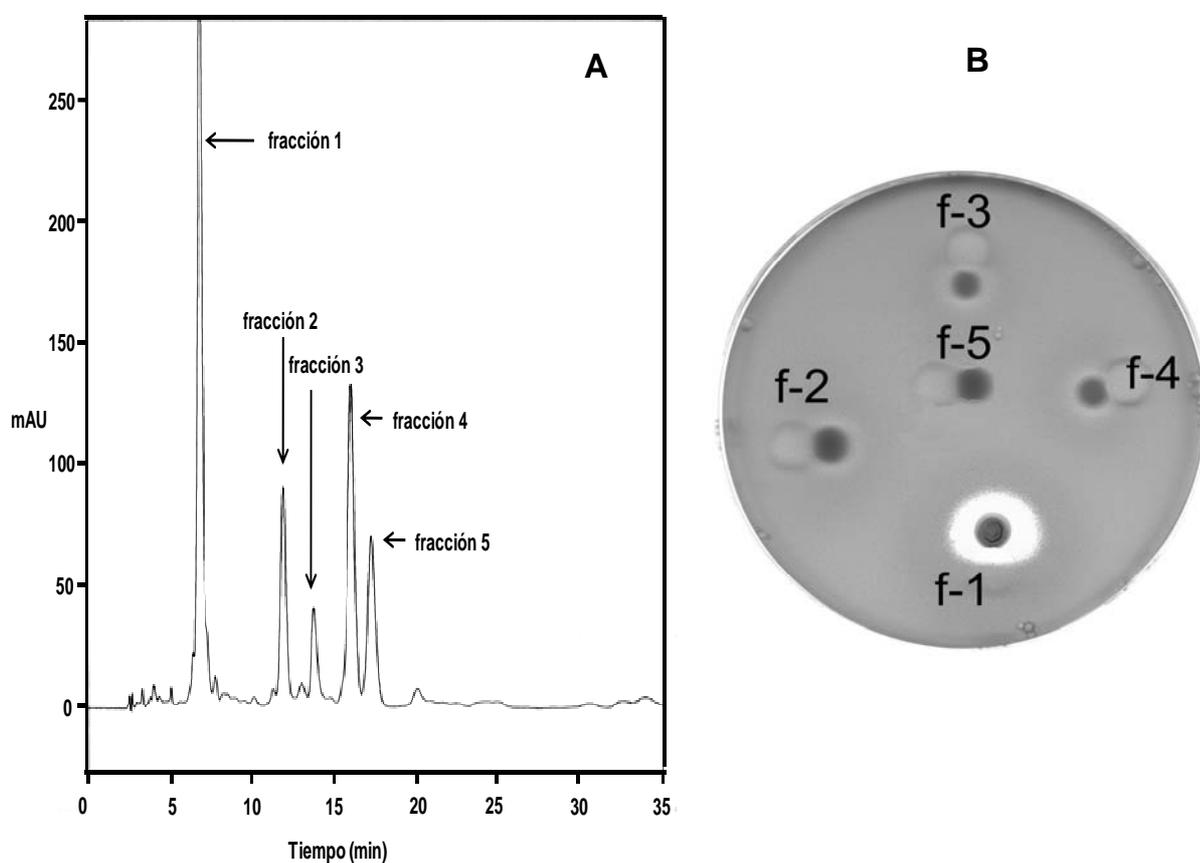


Figura 3.1.27: A. Cromatograma de la purificación (250 nm) de la fracción bioactiva de la columna Sephadex G10 mediante HPLC analítico. **B.** Bioensayo en placa de las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5 recogidas de los picos cromatográficos en HPLC.

2.8. Identificación y caracterización completa de la fracción 1 mediante técnicas espectroscópicas.

Para poder identificar los componentes existentes en la fracción bioactiva del HPLC se recolectaron 20 ml de la fracción correspondiente al pico cromatográfico número 1. Este volumen se concentró hasta 1 ml mediante centrifugación a vacío para realizar un posterior análisis por HPLC-MS.

La muestra mostró un compuesto mayoritario de m/z 75.1 ($M+H$)⁺ que se corresponde con el compuesto 1,3-diaminopropano. La muestra también mostró otro compuesto en menor proporción de m/z 178.1 ($M+H$)⁺ que se corresponde con el aspartato sódico (Figura 3.1.28 A y B) y aún en menor proporción, fragmentos del compuesto TRIS que podrían estar unidos al compuesto 1,3-diaminopropano, formando el compuesto bis-tris-propano.

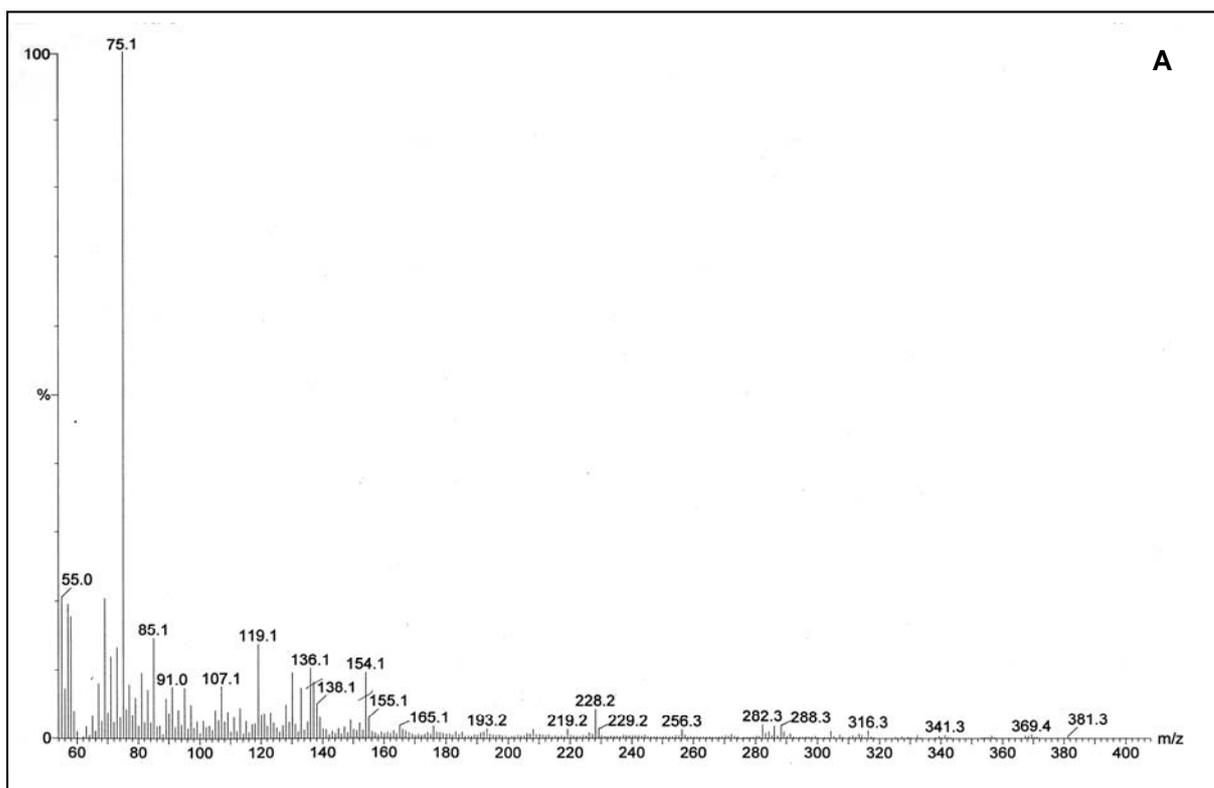


Figura 3.1.28: A. Espectros de masas de los HPLC-masas de la fracción número 1 recolectada del HPLC. El espectro de masas muestra una señal mayoritaria que se corresponde a un producto de m/z 75.1 ($M+H$)⁺, (1,3-diaminopropano).

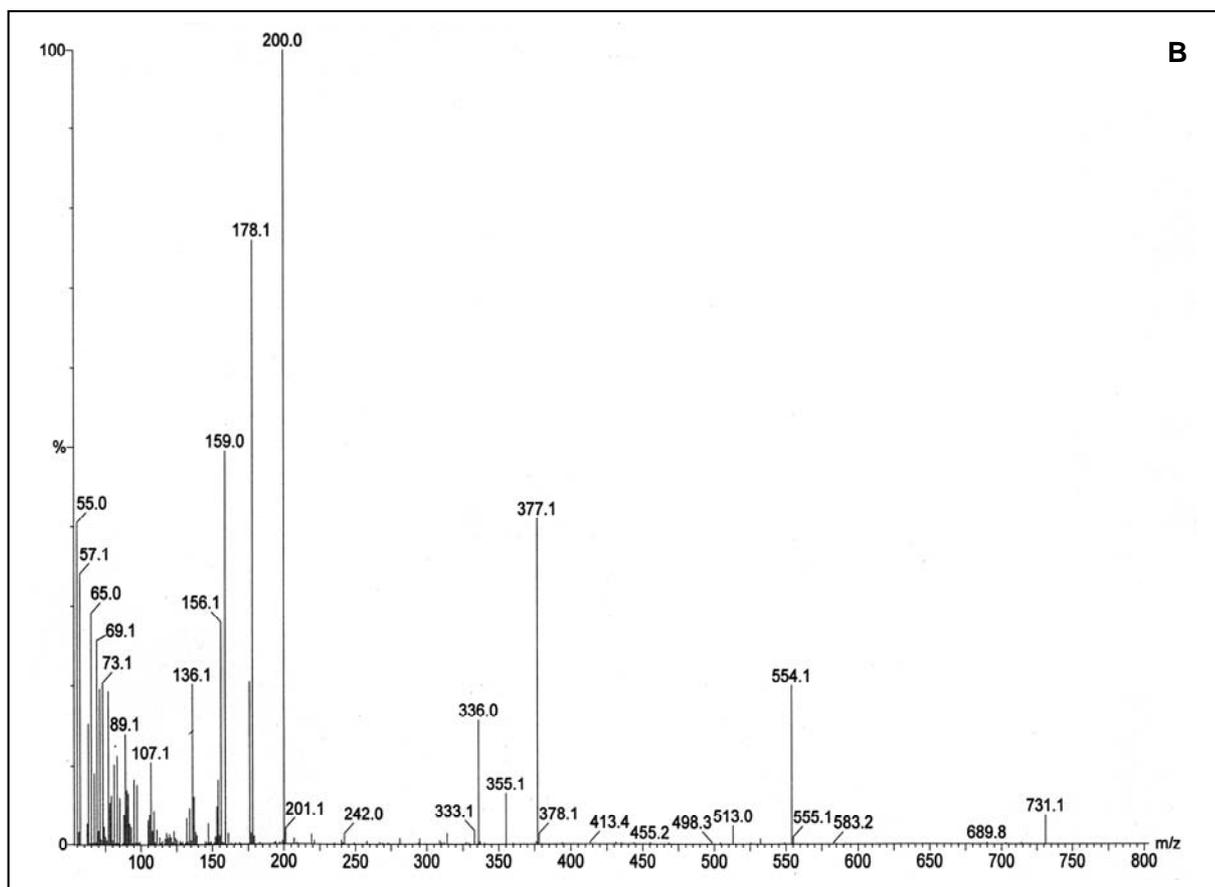
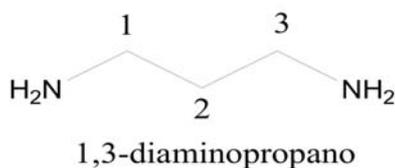


Figura 3.1.28: B. Espectros de masas de los HPLC-masas de la fracción número 1 recolectada del HPLC. El espectro de masas muestra varias señales; la mayoritaria se corresponde a un producto de m/z 178.1 $(M+H)^+$ que se corresponde con el aspartato sódico. La señal de m/z . 200.0 $(M+H)^+$ se corresponde con la sal disódica del mismo compuesto.

Además del análisis de espectrometría de masas también se llevaron a cabo resonancias magnéticas de protón y de carbono (apartado 12 de Materiales y Métodos). Las señales y asignación de las mismas, obtenidas de los análisis de RMN- H^1 y RMN- C^{13} se indican en las Tablas 3.1.4 y 3.1.5. Estos datos indican que los compuestos existentes en la fracción bioactiva correspondiente al pico cromatográfico número 1 recogido del HPLC son, en orden de mayor a menor proporción:

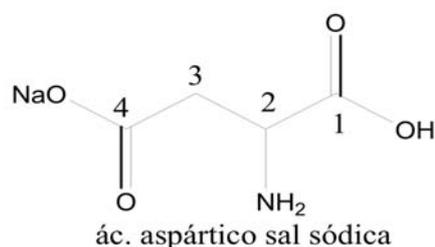
1. 1,3-diaminopropano.



Nº de carbono	DEPT	δ_c (ppm)	δ_H (ppm)
1	CH ₂	39.08	2.34 (t, J=6.9 Hz, 2H)
2	CH ₂	36.59	1,17 m (2H)
3	CH ₂	39.08	2,34 (t, J=6.9 Hz, 2H)

Tabla 3.1.4: Datos de RMN-¹H y RMN-C¹³ del compuesto 1,3-diaminopropano en CDCl₃ con un producto de m/z 75.1 (M+H)⁺.

2. ácido aspártico sal sódica.



Nº de carbono	DEPT	δ_c (ppm)	δ_H (ppm)
1	C	174.27	
2	CH	52.20	2.90 (m, 1H)
3	CH ₂	36.55	A: 2.81 (dt, J=17.5 y 3.1 B: 2.68 (ddd, J=17.5; 8.6 y 1.7 Hz, 1H)
4	C	177.58	

Tabla 3.1.5: Datos de RMN-¹H y RMN-C¹³ del ácido aspártico sal sódica en D₂O con un producto de m/z 178.1 (M+H)⁺.

2.9. Identificación de poliaminas en los caldos utilizados mediante HPLC.

Una vez identificado el 1,3-diaminopropano como compuesto mayoritario en la fracción 1 responsable de la inducción de la biosíntesis de penicilina, se procedió a analizar la presencia de esta poliamina en los caldos utilizados en el presente trabajo.

Además, se procedió a analizar la presencia en los caldos de otras poliaminas como la espermidina, ya que la espermidina es una molécula formada por 1,3-diaminopropano y 1,4-diaminobutano (putrescina). Las condiciones cromatográficas y método de análisis están recogidos en el apartado de Materiales y Métodos 9.1, Tabla 2.6. La identificación de los picos se vio facilitada al poseer poliaminas como patrones con una pureza superior al 99 %.

Como se puede comprobar en la Figura 3.1.29 A, el tiempo de retención de la fracción 1 purificada en el HPLC coincide con el tiempo de retención del compuesto 1,3-diaminopropano. En la Figura 3.1.29 B, se observa que el caldo purificado de la cepa de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 presenta varios picos cromatográficos con tiempos de retención que coinciden con las poliaminas putrescina y espermidina.

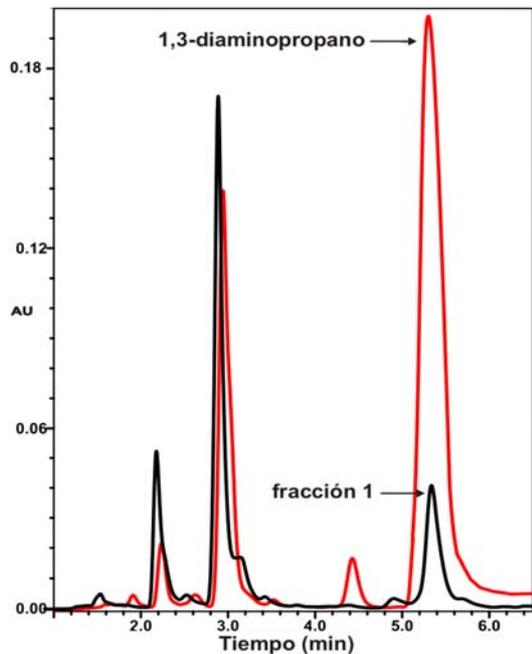


Figura 3.1.29: A. Cromatograma de la fracción 1 purificada, la cual presenta el mismo tiempo de retención que el compuesto puro 1,3-diaminopropano.

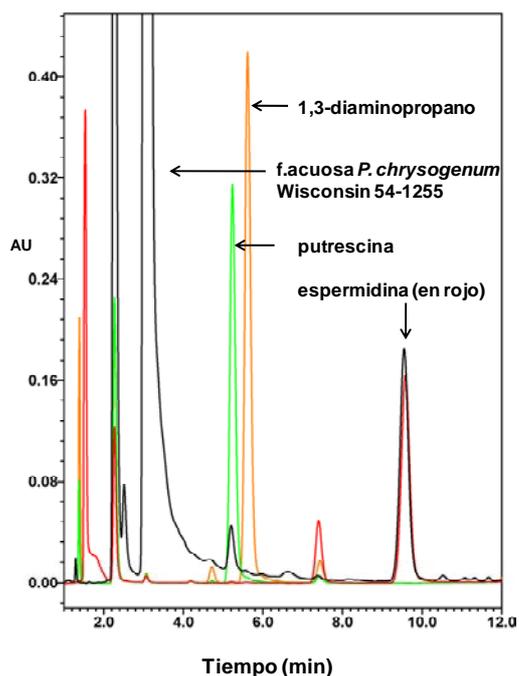


Figura 3.1.29: B. Cromatograma de la fracción acuosa del caldo de fermentación de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 donde se pueden observar los picos que coinciden con los patrones de putrescina y espermidina.

El caldo purificado de la cepa mutante *P. chrysogenum* npe10 presenta varios picos cromatográficos que coinciden con las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina (Figura 3.1.30 A). También se puede observar que el caldo obtenido de la levadura *C. albicans*, que también dio positivo en bioensayo en placa (Figura 3.1.8 A), presenta un pico cromatográfico que coincide con la espermidina (Figura 3.1.30 B).

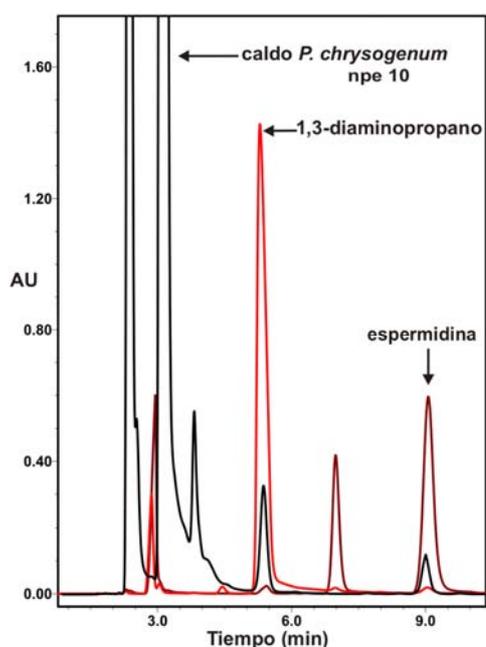


Figura 3.1.30: A. Cromatograma del caldo de la cepa *P. chrysogenum* npe10 donde se observan dos picos que coinciden con los patrones de 1,3-diaminopropano y espermidina.

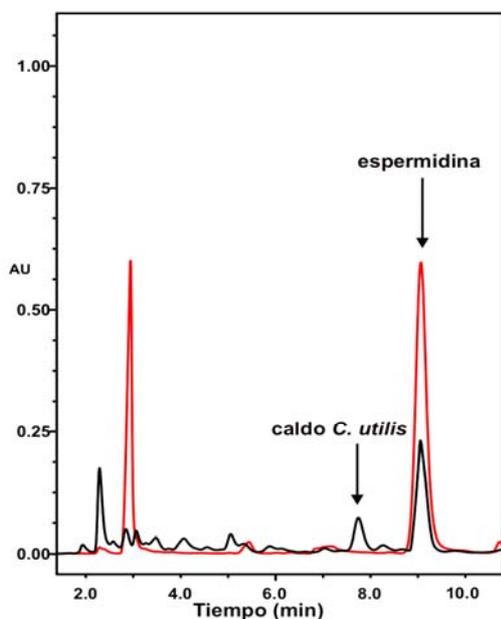


Figura 3.1.30: B. Cromatograma del caldo de la cepa *C. utilis* donde se observa un pico que coincide con el patrón de espermidina.

El único caldo que no presenta ningún pico cromatográfico cuyo tiempo de retención coincida con algún patrón de las poliaminas, fue la fracción orgánica obtenida en los primeros pasos de purificación del compuesto inductor (Figura 3.1.31). Como se indicó con anterioridad, éste no dio positivo cuando se realizó en bioensayo en placa (Figura 3.1.21), lo que confirma el papel de las poliaminas en la inducción de la biosíntesis de penicilina.

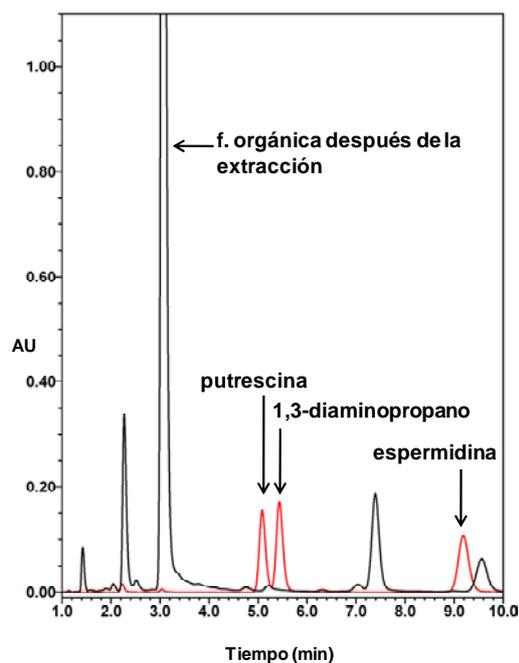


Figura 3.1.31: Cromatograma de la fracción orgánica del caldo que sirvió de base para la purificación del compuesto inductor y donde se puede observar la no coincidencia de picos cromatográficos en los mismos tiempos de retención que los patrones de las poliaminas.

CAPÍTULO 2

EFFECTO DE LAS POLIAMINAS SOBRE EL METABOLISMO PRIMARIO Y SECUNDARIO DE *P. chrysogenum*.

OBJETIVOS CAPÍTULO 2:

- Efecto de la adición de los compuestos purificados en el Capítulo 1 sobre la producción de penicilina en *P. chrysogenum*.
- Efecto de las poliaminas a nivel de expresión de los genes de biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*.
- Efecto de las poliaminas sobre la diferenciación morfológica de *P. chrysogenum*.
- Efecto de las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina sobre la producción de penicilina en fermentaciones realizadas a escala semi-industrial en Planta Piloto.
- Efecto de las poliaminas sobre la producción de otros metabolitos secundarios diferentes de penicilina en *P. chrysogenum*.

1. Efecto de la adición de los compuestos purificados en el Capítulo 1 sobre la producción de penicilina.

Una vez identificados los compuestos existentes en la fracción número 1 de la última etapa del proceso de purificación (mediante HPLC), fue necesario realizar una serie de fermentaciones en medio líquido para determinar la verdadera molécula inductora.

Para ello, se decidieron probar las moléculas identificadas por separado y a distintas concentraciones y posteriormente ir añadiendo de forma progresiva una mezcla de los compuestos identificados para comprobar la posible existencia de un efecto amplificador o inclusive inhibidor de la biosíntesis de penicilina.

1.1. Efecto de la adición de 1,3-diaminopropano sobre la producción de penicilina en *P. chrysogenum*.

Al ser el 1,3-diaminopropano el compuesto mayoritario identificado en el análisis de espectrometría de masas y RMN se decidió comenzar el estudio con la adición de esta molécula a los medios de cultivo.

Se determinó la cinética del crecimiento y de la producción en medio definido según los apartados 5.3 y 8.3 de Materiales y Métodos. En todos los casos estudiados, se añadió el compuesto 1,3-diaminopropano al inicio de la fermentación a diferentes concentraciones: 1 mM, 3 mM, 5 mM y 10 mM. Como controles, se realizaron cultivos a los que se añadió la cantidad equivalente de agua destilada estéril.

La toma de muestras se realizó a las 24, 48 y 72 horas para determinar el peso seco, la producción volumétrica y la producción específica de bencilpenicilina. El resultado de las fermentaciones a nivel de matraz fue el siguiente:

El crecimiento del microorganismo fue diferente en los controles con respecto a los matraces con una mayor concentración del compuesto 1,3-diaminopropano. En los controles el crecimiento fue lento durante el desarrollo de la fermentación, incrementándose de forma progresiva hasta las 72 horas.

Los matraces con una concentración de 1 y 3 mM de 1,3-diaminopropano crecieron de forma similar a los controles no observándose ninguna diferencia significativa. Sin embargo, a

partir de una concentración 5 mM de 1,3-diaminopropano, se observó ya a las 24 horas un fuerte incremento del crecimiento en comparación a los controles. Con concentraciones 5 mM y 10 mM de 1,3-diaminopropano se alcanzó una meseta de crecimiento a las 48 horas de fermentación debido posiblemente al agotamiento de alguno de los nutrientes esenciales, en especial la fuente de carbono (Figura 3.2.1).

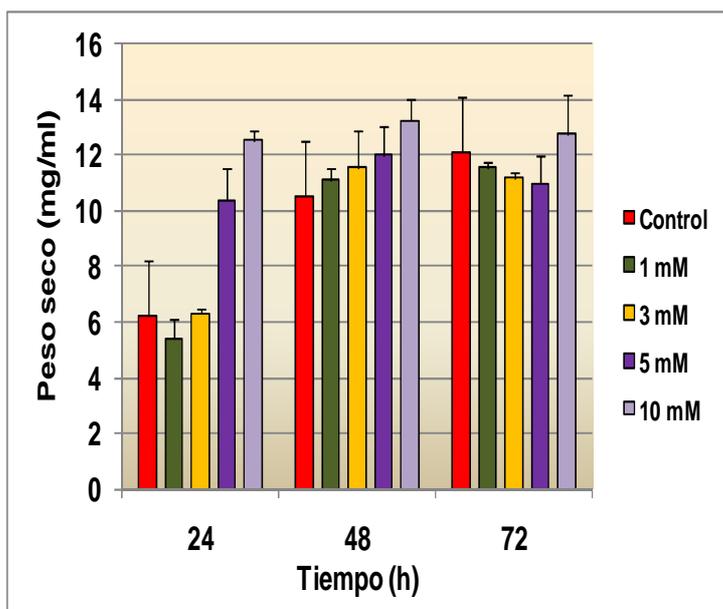


Figura 3.2.1: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido de las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con 1,3-diaminopropano a diferentes concentraciones.

A continuación, los caldos de fermentación tomados a diferentes tiempos se analizaron mediante bioensayo en placa. La recta de calibración de la penicilina empleada para esta cuantificación ($y = 1.2691x - 2.753$; $r^2 = 0.998$) fue obtenida mediante una regresión lineal.

La producción de penicilina se estimó como se indica en el punto 8.3.1 de Materiales y Métodos y en todos los casos siguió una pauta similar. El antibiótico comenzó a producirse a las 24 horas de fermentación incrementándose de forma lineal hasta las 72 horas. Se apreció un mayor incremento de producción de penicilina a las 24 horas (hasta 2 veces superior a los controles) en los matraces donde se había añadido el compuesto 1,3-diaminopropano a unas concentraciones 5 y 10 mM.

No se observó con concentraciones inferiores, un incremento tan significativo en la producción de penicilina como con concentraciones superiores de 1,3-diaminopropano. A las 48 y 72 horas de fermentación disminuyeron las diferencias de producción de penicilina entre los matraces con el compuesto 1,3-diaminopropano y los controles, pero aún así las diferencias en cuanto a producción volumétrica fueron altas (Figura 3.2.2).

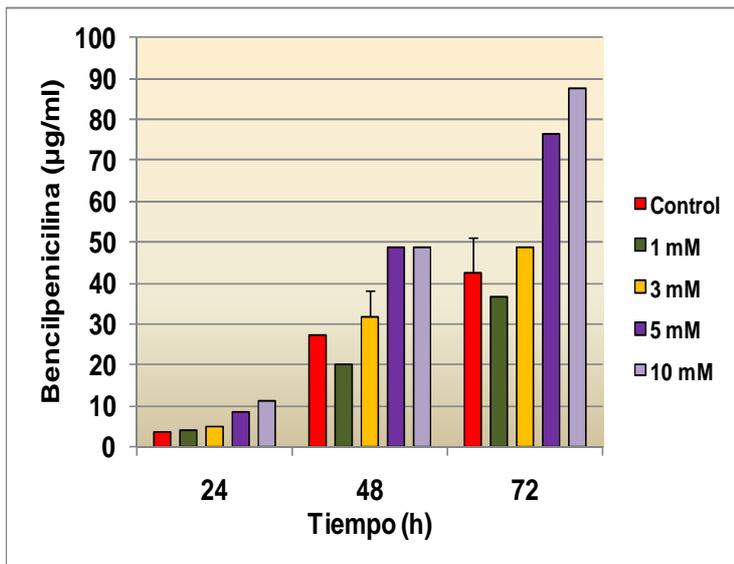


Figura 3.2.2: Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y los cultivos suplementados con 1,3-diaminopropano a diferentes concentraciones.

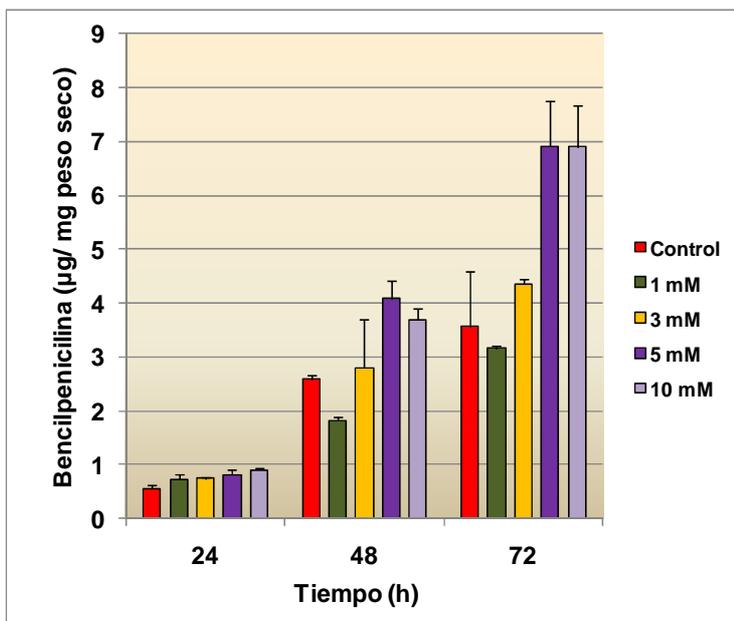


Figura 3.2.3: Cinética de producción específica de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y de los cultivos suplementados con 1,3-diaminopropano a diferentes concentraciones.

En cuanto a la producción específica de penicilina, se observó un incremento de la misma con concentraciones de 5 y 10 mM de 1,3-diaminopropano desde el inicio de la fermentación, manteniéndose la diferencia constante en un promedio del 48 % durante el desarrollo de ésta (Figura 3.2.3). En base a estos datos, se pudo concluir que el compuesto 1,3-diaminopropano a una concentración entre 5 y 10 mM incrementó la producción de bencilpenicilina en medio definido de producción. Con concentraciones de 1,3-diaminopropano inferiores a las mencionadas no se observó una diferencia significativa en la producción específica de bencilpenicilina.

1.2. Efecto de la adición de bis-tris-propano sobre la producción de penicilina en *P. chrysogenum*.

El hecho de que junto a la identificación del compuesto 1,3-diaminopropano apareciese el tampón TRIS (tris-hidroximetil aminometano), presumiblemente arrastrado en los pasos iniciales de purificación aplicando las técnicas de cromatografía de intercambio iónico (aniónico), cabía la posibilidad de que el compuesto 1,3-diaminopropano estuviese unido a fragmentos de TRIS formando el compuesto bis-tris-propano. En este sentido, se desarrollaron una serie de fermentaciones, en medio definido de producción, en las mismas condiciones que en el apartado 1.1. donde se añadió a los cultivos el compuesto bis-tris-propano a la concentración de 5 mM. A otra serie de cultivos, se añadió la misma concentración del tampón TRIS. Como control, se añadió a otros cultivos la cantidad equivalente de agua destilada estéril. Se determinó la cinética del crecimiento y de la producción en medio definido siguiendo el mismo criterio que en el apartado 1.1.

Debido a que tanto el bis-tris-propano como el TRIS provocaron un incremento del pH inicial del medio con respecto a los controles, los medios de cultivo se esterilizaron por filtración a través de un filtro de tamaño de poro 0,2 μm debido al previo ajuste de pH necesario antes de proceder a la inoculación de los matraces con el micelio procedente del inóculo. Para el ajuste de pH se utilizó HCl al 37 % (v/v). La toma de muestras se realizó a las 24, 48 y 72 horas para determinar el peso seco, la producción volumétrica y la producción específica de bencilpenicilina. El resultado de las fermentaciones a nivel de matraz fue el siguiente:

El crecimiento del hongo fue similar en los controles con respecto a los matraces donde se habían añadido los compuestos bis-tris-propano y TRIS. Como en otras fermentaciones, el crecimiento fue lento en las primeras horas de fermentación incrementándose de forma progresiva hasta el final de ésta (Figura 3.2.4).

Los caldos de fermentación tomados a diferentes tiempos se analizaron mediante bioensayo en placa. La recta de calibración empleada para esta cuantificación ($y = 1.2691x - 2.753$; $r^2 = 0.998$) fue obtenida mediante una regresión lineal.

La producción de penicilina se estimó como se indica en el punto 8.3.1 de Materiales y Métodos y en todos los casos siguió una pauta similar. El antibiótico comenzó a producirse a las 24 horas de fermentación incrementándose de forma lineal hasta las 72 horas. No se apreció un

mayor incremento de producción de penicilina en los matraces que se habían suplementado con el compuesto bis-tris-propano a una concentración de 5 mM y tampoco en los matraces que se habían suplementado con el tampón TRIS a la misma concentración (Figura 3.2.5).

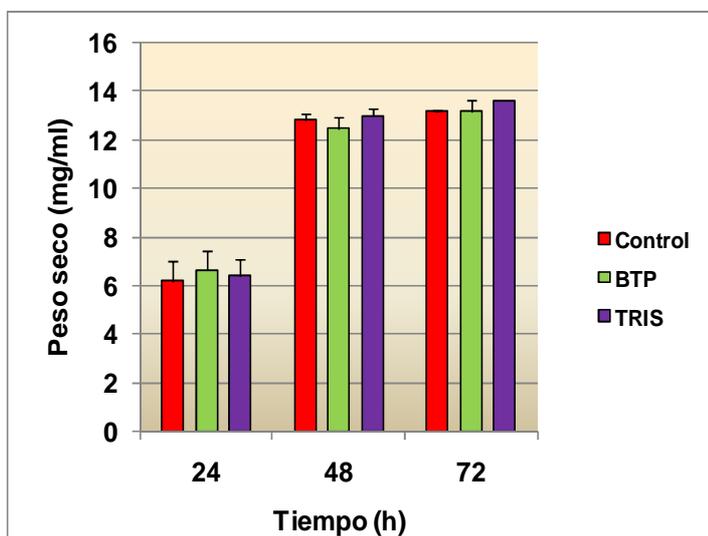


Figura 3.2.4: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido de las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con 5 mM de bis-tris-propano (BTP) o 5 mM de TRIS.

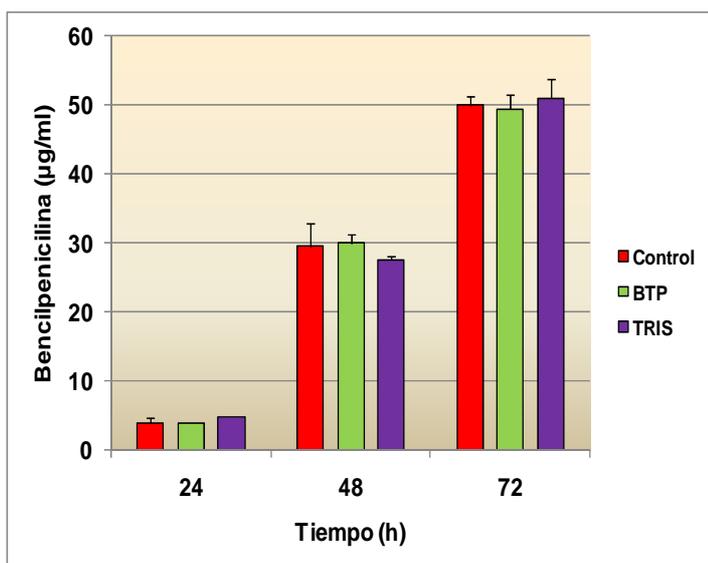


Figura 3.2.5: Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y los cultivos suplementados con 5 mM de bis-tris-propano (BTP) o 5 mM de TRIS.

Tampoco se observó un incremento de la producción específica de bencilpenicilina al añadir 5 mM de bis-tris-propano o TRIS con respecto a los controles (Figura 3.2.6), con lo que se pudo concluir que ninguno de estos compuestos ejerció efecto alguno sobre el crecimiento y la producción de antibiótico, en medio definido de producción, a las concentraciones analizadas, descartándoles como moléculas inductoras.

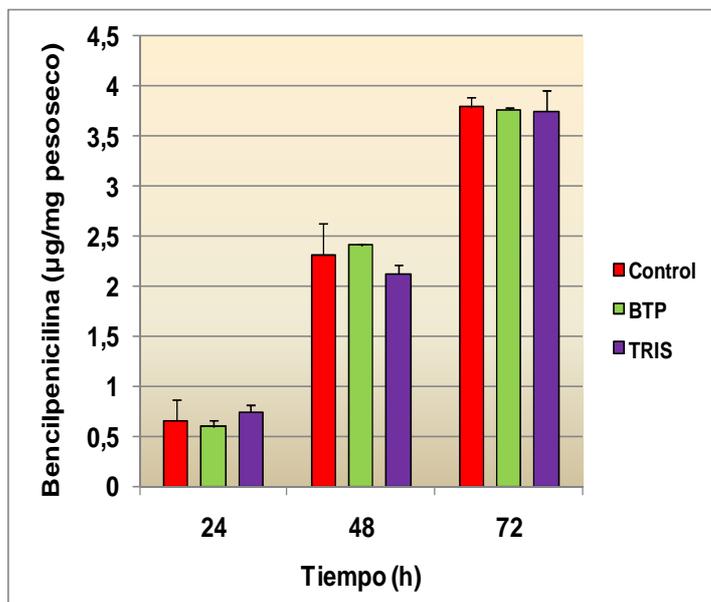


Figura 3.2.6: Cinética de producción específica de bencilpenicilina en medio definido de producción de los controles y de los cultivos suplementados con 5 mM de bis-tris-propano (BTP) o 5 mM de TRIS.

1.3. Efecto de la adición del ácido aspártico (sal sódica) sobre la producción de penicilina en *P. chrysogenum*.

El segundo compuesto identificado por espectrometría de masas y RMN en el pico cromatográfico número 1 recogido del HPLC fue la sal sódica del ácido aspártico. Para comprobar el posible efecto inductor en la producción de bencilpenicilina generado por el ácido aspártico, se realizaron una serie de fermentaciones en medio definido de producción donde se añadieron diferentes concentraciones de este compuesto (1 mM, 3 mM, 5 mM y 10 mM).

Como en casos anteriores, se realizaron cultivos control a los que se añadió la misma cantidad de agua destilada estéril. Se determinó la cinética del crecimiento y de la producción en medio definido según el apartado 5.3 y 8.3 de Materiales y Métodos. El resultado promedio de las fermentaciones realizadas fue el siguiente:

El crecimiento del microorganismo fue similar en los controles con respecto a los cultivos a los que se había añadido el compuesto aspartato sódico a diferentes concentraciones. Como en otras ocasiones precedentes, el crecimiento fue incrementándose de forma progresiva hasta el final de la fermentación (Figura 3.2.7).

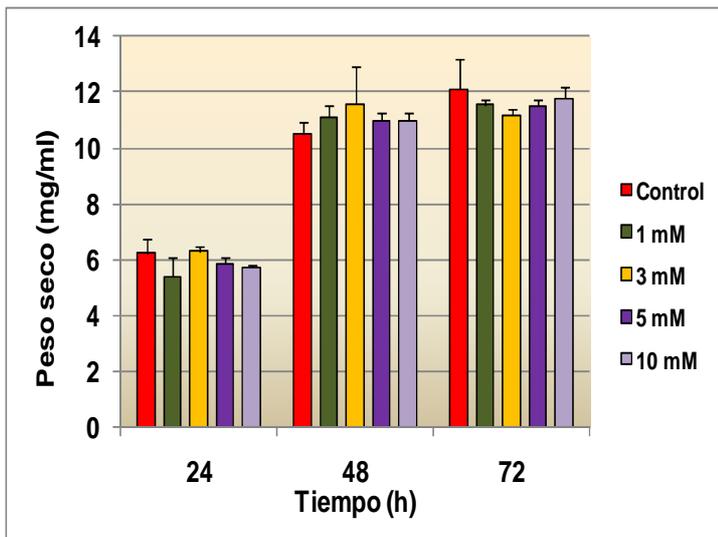


Figura 3.2.7: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido de las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con ácido aspártico.

Los caldos de fermentación tomados a diferentes tiempos se analizaron mediante bioensayo en placa. La recta de calibración empleada para esta cuantificación ($y = 1.2691x - 2.753$; $r^2 = 0.998$) fue obtenida mediante una regresión lineal. La producción de penicilina se estimó como se indica en el punto 8.3.1 de Materiales y Métodos y siguió una pauta similar a la observada en ocasiones precedentes. El antibiótico comenzó a producirse a las 24 horas de fermentación incrementándose de forma lineal hasta las 72 horas. No se apreció un mayor incremento de producción de penicilina en los matraces donde se había añadido el aspartato sódico a diferentes concentraciones (Figura 3.2.8).

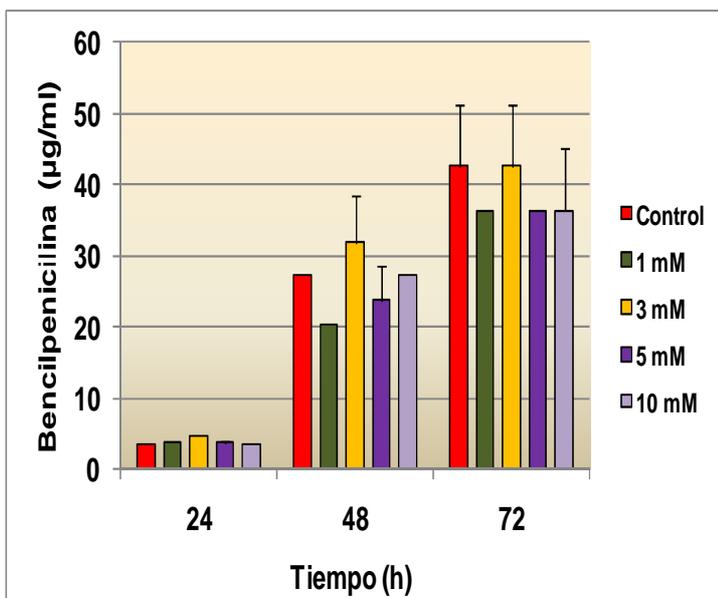


Figura 3.2.8: Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina de los controles y los cultivos, en medio definido de producción, suplementados con ácido aspártico a diferentes concentraciones.

Tampoco se observó un incremento de la producción específica de bencilpenicilina al añadir concentraciones diferentes de aspartato sódico (Figura 3.2.9). En base a los resultados obtenidos, se pudo concluir que la sal sódica del aspartato sódico no ejerció efecto alguno sobre la producción de bencilpenicilina, en medio definido de producción, a las concentraciones analizadas, por lo que cabe descartar este compuesto como la molécula inductora identificada por espectrometría de masas y RMN.

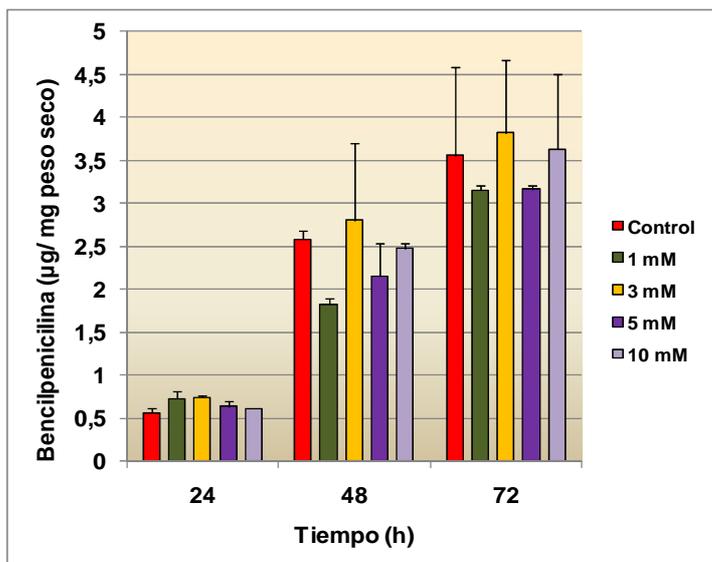


Figura 3.2.9: Cinética de producción específica de bencilpenicilina de los controles y de los cultivos, en medio definido de producción, suplementados con ácido aspártico a diferentes concentraciones.

1.4. Efecto de la adición conjunta de 1,3-diaminopropano y ácido aspártico (sal sódica) sobre la producción de penicilina en *P. chrysogenum*.

Puesto que el ácido aspártico se identificó en la fracción 1 que ejercía efecto inductor y añadido a las fermentaciones en medio líquido no provocó efecto alguno sobre el incremento de producción de penicilina, se decidió comprobar si éste era capaz de actuar de modo sinérgico con el 1,3-diaminopropano provocando un incremento en la producción de penicilina mayor que cuando se añadía únicamente el compuesto 1,3-diaminopropano.

Para ello se llevaron a cabo una serie de fermentaciones en medio definido de producción en las mismas condiciones que en los apartados anteriores. La concentración elegida fue de 5 mM, tanto para el 1,3-diaminopropano, como para el ácido aspártico. Como controles se utilizaron una serie de cultivos a los que se añadió únicamente el compuesto 1,3-diaminopropano

a una concentración de 5 mM, o la cantidad equivalente de agua estéril (controles negativos). Se determinó la cinética del crecimiento y de la producción en medio definido según los apartados 5.3 y 8.3 de Materiales y Métodos.

Como ya se indicó en el apartado 1.1. de este capítulo, el crecimiento del microorganismo fue más lento en los controles con respecto a los matraces donde se había añadido el compuesto 1,3-diaminopropano con o sin aspartato sódico. Los matraces con el compuesto 1,3-diaminopropano crecieron de forma similar independientemente de la adición de aspartato sódico presentando un fuerte crecimiento a las 24 horas y alcanzando una meseta a las 48 horas para disminuir el crecimiento a las 72 horas como consecuencia, probablemente, de lisis celular por falta de nutrientes (Figura 3.2.10).

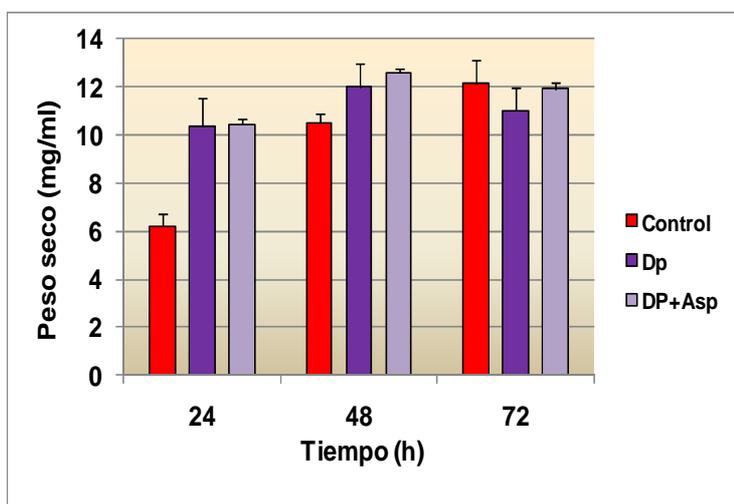


Figura 3.2.10: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido de las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con 1,3-diaminopropano (DP) y con 1,3-diaminopropano más ácido aspártico (Dp+Asp).

Como en otras ocasiones, los caldos de fermentación tomados a diferentes tiempos se analizaron mediante bioensayo. La recta de calibración empleada para esta cuantificación ($y = 1.3705x - 3.5132$; $r^2 = 0.989$) fue obtenida mediante una regresión lineal.

La producción de penicilina se estimó como se indica en el punto 8.3.1 de Materiales y Métodos y siguió la misma pauta observada en el apartado 1.1. de este capítulo. El antibiótico comenzó a producirse a las 24 horas de fermentación incrementándose de forma lineal hasta las 72 horas. Los matraces donde se añadió el compuesto 1,3-diaminopropano comenzaron con un incremento de producción de penicilina muy superior a los controles y no mostraron diferencias significativas con respecto a aquellos donde se añadieron 1,3-diaminopropano y aspartato sódico conjuntamente (Figura 3.2.11).

Tampoco se observó un incremento de la producción específica de los matraces con 1,3-diaminopropano y aspartato sódico con respecto a los matraces donde se añadió sólo el 1,3-diaminopropano. Sí hubo un incremento de la producción específica de ambas series de matraces comparándolas con los controles donde no se añadió ningún compuesto (Figura 3.2.12), como ya ocurrió en el apartado 1.1.

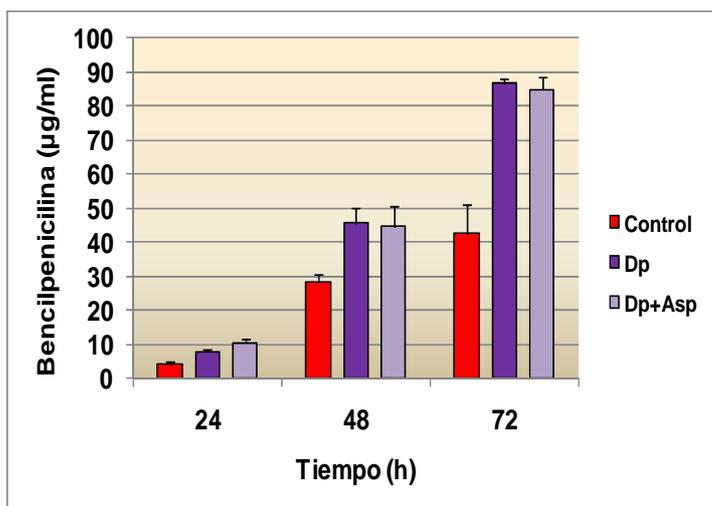


Figura 3.2.11: Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina de los controles y los cultivos, en medio definido de producción, suplementados con 1,3-diaminopropano (DP) y con 1,3-diaminopropano más ácido aspártico (Dp+Asp).

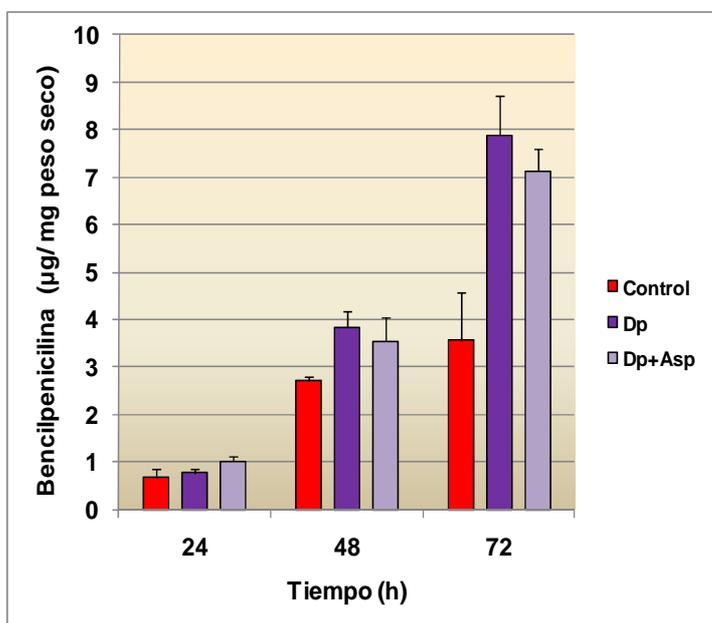


Figura 3.2.12: Cinética de producción específica de bencilpenicilina de los controles y de los cultivos en medio definido de producción suplementados con 1,3-diaminopropano (DP) y con 1,3-diaminopropano más ácido aspártico (Dp+Asp).

Con los resultados obtenidos se pudo concluir que no existió efecto sinérgico o de incremento de producción de penicilina entre aspartato sódico y 1,3-diaminopropano a las concentraciones ensayadas.

1.5. Efecto de la adición de 1,3-diaminopropano y otras poliaminas (putrescina y espermidina) sobre la producción de penicilina en *P. chrysogenum*.

Como se describió en el Capítulo 1 de Resultados, el análisis mediante cromatografía HPLC de los caldos utilizados en este trabajo indicó que además de 1,3-diaminopropano, existían otras poliaminas como la putrescina y la espermidina, en los caldos de fermentación de *P. chrysogenum*. Cabía preguntarse si estas poliaminas podrían ejercer el mismo efecto observado sobre el crecimiento y producción de penicilina cuando se suplementaban los medios de cultivo. Para ello, se desarrollaron una serie de fermentaciones donde se añadieron respectivamente, 1,3-diaminopropano, putrescina y espermidina a una misma concentración de 5 mM. Una serie de fermentaciones sirvieron de controles, a las cuales se añadió la cantidad equivalente de agua destilada estéril. Se determinó la cinética del crecimiento y de la producción en medio definido según los apartados 5.3 y 8.3 de Materiales y Métodos.

La cinética de crecimiento confirmó un resultado esperado. La poliamina espermidina ejerció el mismo efecto que el 1,3-diaminopropano al incrementar el crecimiento ya en las primeras horas de fermentación. Sin embargo, con la poliamina putrescina no sucedió lo mismo que con la espermidina, siendo el crecimiento en este caso similar a los respectivos controles (Figura 3.2.13 A).

La producción volumétrica de penicilina (Figura 3.2.13 B) en los matraces donde se añadió la espermidina siguió la misma pauta que en los matraces donde se añadió el 1,3-diaminopropano, incrementándose en ambos casos dicha producción con respecto a los controles. En los matraces donde se añadió la putrescina no se observó un incremento significativo de la producción de penicilina con respecto a los controles. Los caldos analizados para la valoración de bencilpenicilina se cuantificaron por cromatografía HPLC siguiendo el método establecido en el apartado 8.3.2 de Materiales y Métodos (Figura 3.2.13 C).

La cuantificación de la producción específica de bencilpenicilina (Figura 3.2.13 D) puso de manifiesto que la poliamina espermidina ejerció el mismo efecto positivo sobre la producción que el 1,3-diaminopropano, al contrario que la poliamina putrescina, que no provocó cambios en los títulos del antibiótico. Este efecto positivo de la espermidina no fue de extrañar dado que la molécula de espermidina está formada por la unión de 1,3-diaminopropano y 1,4-diaminobutano y que la degradación de la espermidina por la enzima di amino oxidasa origina, entre otras, la

molécula 1,3-diaminopropano en la mayoría de los microorganismos. En el caso de la putrescina lo que puede suceder es que este compuesto no sea activo “*per se*” ya que es un intermediario en la biosíntesis de espermidina.

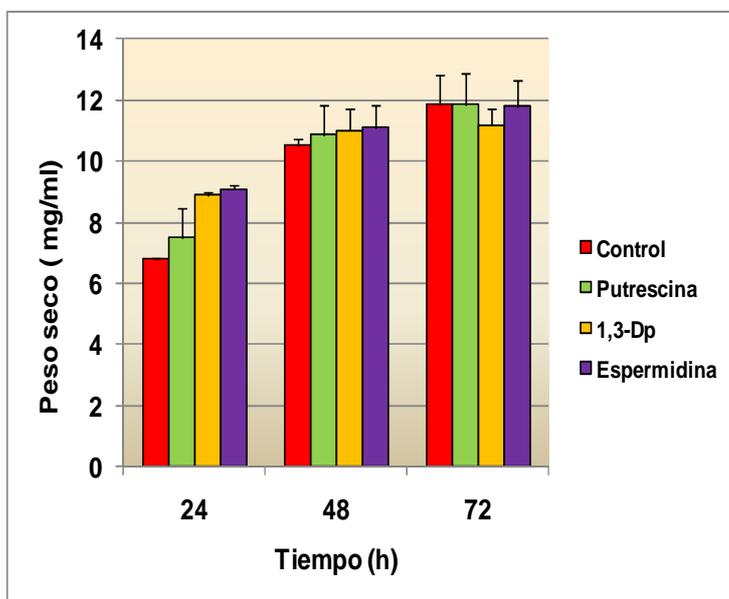


Figura 3.2.13: A. Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido de las fermentaciones realizadas en medio definido de producción con los controles y los cultivos suplementados con Putrescina, 1,3-diaminopropano (1,3-Dp) y Espermidina.

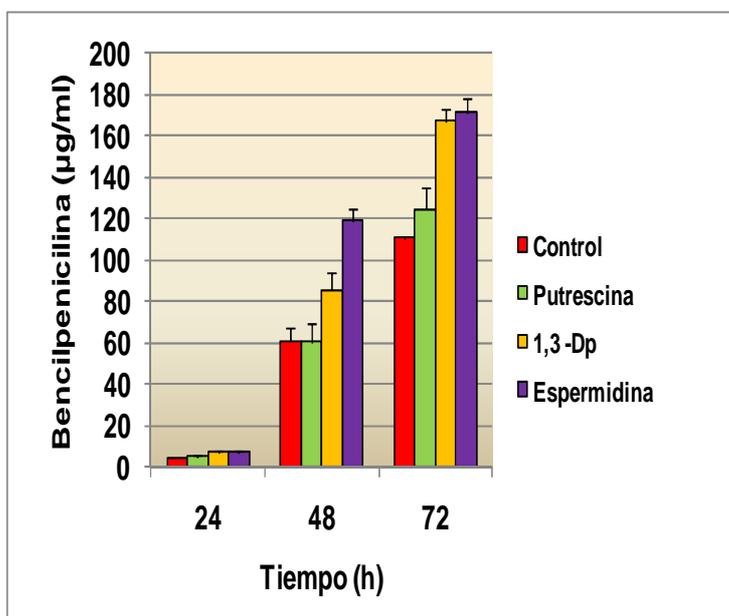


Figura 3.2.13: B. Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina de los controles y de los cultivos en medio definido de producción suplementados con 1,3-diaminopropano (1,3-Dp), Putrescina y Espermidina.

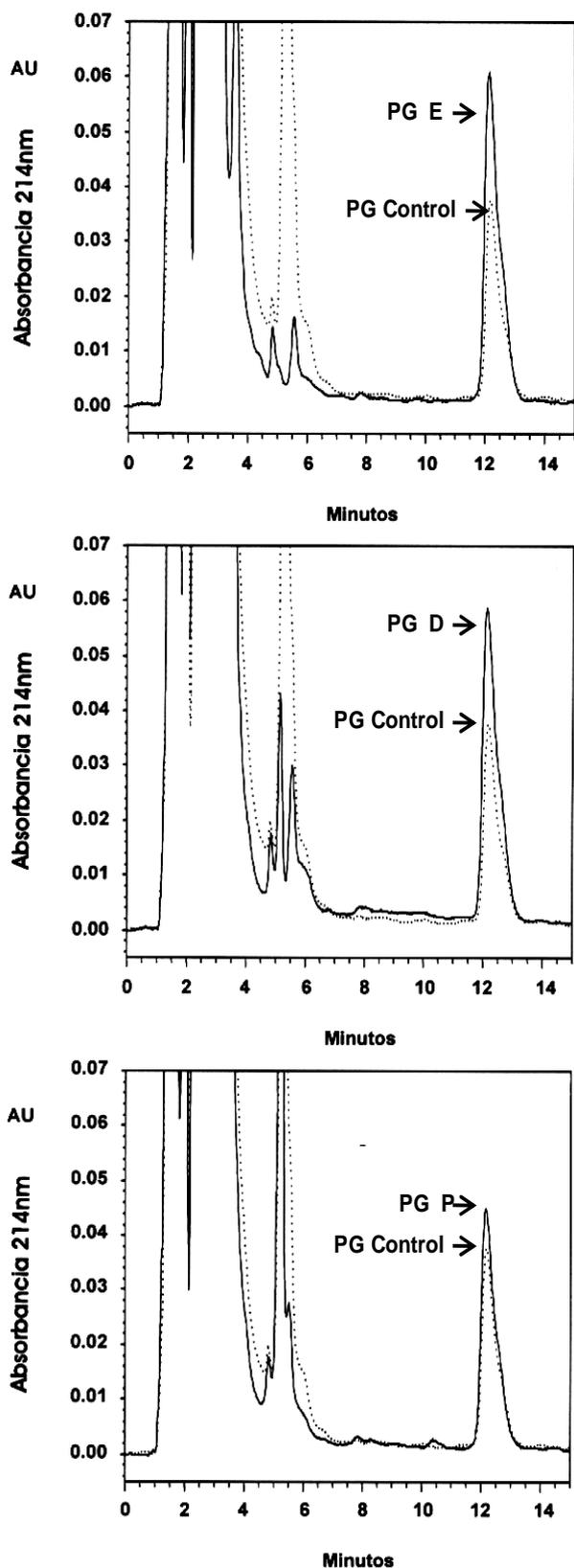


Figura 3.2.13: C. Cromatogramas de la valoración de bencilpenicilina (PG) por HPLC a las 48 horas de fermentación. **Cromatograma superior:** Comparación del control (PG Control) con cultivos crecidos con Espermidina (PG E). **Cromatograma central:** Comparación del control (PG Control) con cultivos crecidos con 1,3-diaminopropano (PG D). **Cromatograma inferior:** Comparación del Control (PG Control) con cultivos crecidos con Putrescina (PG P). Las condiciones cromatográficas se detallan en la Tabla 2.4 de Materiales y Métodos.

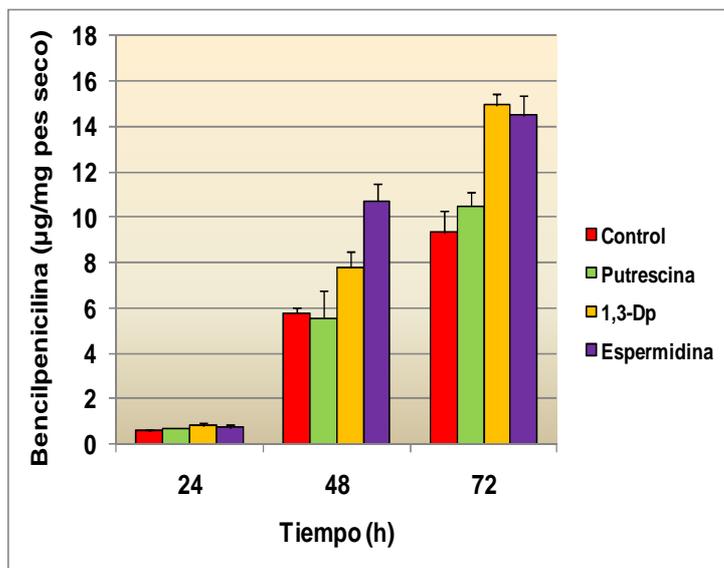


Figura 3.2.13: D. Cinética de producción específica de benzilpenicilina de los controles y de los cultivos, en medio definido de producción, suplementados con 1,3-diaminopropano (1,3-Dp), Putrescina y Espermidina.

2. Efecto de las poliaminas sobre el nivel de expresión de los genes de biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*.

Una vez comprobado el efecto inductor de las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina sobre la producción de penicilina en medio de cultivo definido de producción, se comprobó el efecto que las poliaminas ejercían sobre la transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis de penicilina. Para este propósito, se llevó a cabo una fermentación en medio definido de producción utilizando la cepa de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, añadiéndose respectivamente, las poliaminas 1,3-diaminopropano, espermidina y putrescina a la concentración de 5 mM. Como en los casos anteriores, una serie de cultivos sirvieron como controles, los cuales llevaban la cantidad equivalente de agua destilada estéril.

Para realizar los estudios de expresión génica se utilizó la técnica RT-PCR (amplificación de secuencias a partir de ARN por retrotranscripción y PCR), según el apartado 6.4.4 de Materiales y Métodos. Se empleó como molde, el ARN total de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 extraído del micelio recogido a las 48 y 72 horas de fermentación.

Se utilizaron cebadores específicos para dirigir un proceso selectivo que permitiese la amplificación de un ARNm particular a partir de una mezcla compleja (en este caso se necesitaba amplificar los ARNm que codificaban las distintas enzimas involucradas en la

biosíntesis de penicilina). Los distintos oligonucleótidos cebadores empleados en las diferentes RT-PCR realizadas están recogidos en la Tabla 2.1 del apartado 2.3.1 de Materiales y Métodos.

2.1. Análisis de la expresión del gen *pcbAB*.

Debido a la gran longitud del transcrito del gen *pcbAB* (más de 11000 nucleótidos), para estudiar el nivel de expresión de este gen se emplearon los oligonucleótidos TH10-R y TH10-F (ver Tabla 2.1 del apartado 2.3.1 de Materiales y Métodos), los cuales fueron diseñados para amplificar el ADNc que codifica el dominio tioesterasa (aproximadamente 900 pb) de la enzima ACVS codificada por dicho gen. Se realizaron diversos ensayos variando las diferentes condiciones de la RT-PCR: la temperatura de anillamiento, la cantidad de ARN molde y el número de ciclos de amplificación (apartado 6.4.4.2 de Materiales y métodos). Finalmente, las condiciones de desarrollo de la RT-PCR fueron las siguientes:

- A la mezcla de la reacción se le añadieron 2 µl de ARN molde, obtenido en el apartado 6.4.4.1 de Materiales y Métodos.
- Incubación de la reacción a 55 °C durante 30 minutos para que se lleve a cabo la síntesis de ADNc.
- Incubación de la reacción durante 2 minutos a 94 °C para inactivar la retrotranscriptasa (RT).
- Amplificación del fragmento de ADNc mediante PCR aplicando las siguientes condiciones:
 - i. Temperatura de desnaturalización: 94 °C durante 30 segundos.
 - ii. Temperatura de anillamiento de los cebadores: 58 °C durante 30 segundos.
 - iii. Temperatura de extensión: 72 °C durante 80 segundos.
 - iv. Número de ciclos: 40 (Pasos i, ii y iii).
 - v. Temperatura de extensión final: 72 °C durante 10 minutos.

El resultado de la RT-PCR mostró una banda de ADNc del tamaño esperado que se correspondía con la zona amplificada deseada, tal y como se confirmó mediante secuenciación. Las bandas generadas se cuantificaron por densitometría utilizando un programa informático "Gel-Pro Analyzer" (Media Cybernetics).

El nivel de amplificación de las bandas en las distintas condiciones fue ajustado comparando la intensidad de las bandas con respecto a la señal generada por el ADNc formado a partir del ARNm del gen de la β -actina.

Para la obtención del ADNc del gen de la β -actina se emplearon los oligonucleótidos UP y LP (ver Tabla 2.1 del apartado 2.3.1 de Materiales y Métodos), diseñados para amplificar una región de 526 pb. Las condiciones del desarrollo de la RT-PCR fueron las siguientes:

- A la mezcla de la reacción se le añadieron 2 μ l de ARN molde, obtenido en el apartado 6.4.4.1 de Materiales y Métodos.
- Incubación de la reacción a 55 °C durante 30 minutos para que se lleve a cabo la síntesis de ADNc.
- Incubación de la reacción durante 2 minutos a 94 °C para inactivar la retrotranscriptasa (RT).
- Amplificación del fragmento de ADNc mediante PCR aplicando las siguientes condiciones:
 - i. Temperatura de desnaturalización: 94 °C durante 30 segundos.
 - ii. Temperatura de anillamiento de los cebadores: 55 °C durante 30 segundos.
 - iii. Temperatura de extensión: 72 °C durante 30 segundos.
 - iv. Número de ciclos: 34 (Pasos i, ii y iii).
 - v. Temperatura de extensión final: 72 °C durante 10 minutos.

Como puede apreciarse en la Figura 3.2.14 el nivel de expresión del gen *pcbAB* se incrementó de manera significativa en los cultivos donde se habían añadido las poliaminas comparado con los controles.

A las 48 horas de fermentación el mayor nivel de expresión del gen *pcbAB* correspondió a la serie de matraces donde se había añadido el compuesto 1,3-diaminopropano. También se registró un nivel superior de expresión en los cultivos donde se habían añadido los compuestos espermidina y putrescina.

A las 72 horas de fermentación la diferencia en el nivel de expresión del gen *pcbAB* se incrementó aún más con respecto a los controles con los compuestos 1,3-diaminopropano y

espermidina, permaneciendo a un nivel constante el nivel de expresión (igual que a las 48 horas) con el compuesto putrescina.

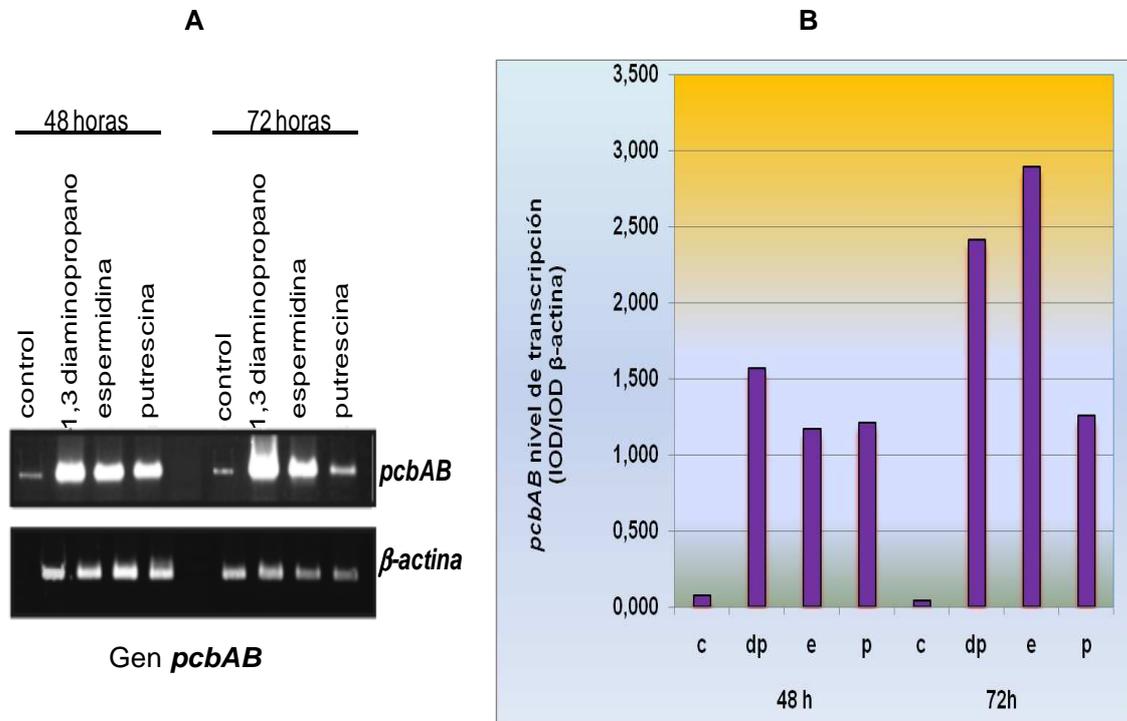


Figura 3.2.14: A. Resultado del experimento de RT-PCR donde se muestra el nivel de transcripción del gen *pcbAB* (panel superior) y del gen de la *β-actina* (panel inferior) a las 48 y 72 horas de fermentación en los cultivos control (c) y en los cultivos a los que se añadieron 1,3-diaminopropano (dp), espermidina (e) o putrescina (p). **B.** El nivel de expresión génica fue normalizado comparando la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen *pcbAB* con la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen de la *β-actina*.

2.2. Análisis de la expresión del gen *pcbC*.

Para estudiar los niveles de expresión del gen *pcbC* en las fermentaciones en medio líquido, se emplearon los oligonucleótidos *pcbC-R* y *pcbC-F* (ver Tabla 2.1 del apartado 2.3.1 de Materiales y Métodos), diseñados para amplificar un fragmento de unas 400 pb del ADNc que codifica la enzima IPNS. Se realizaron diversos ensayos variando las diferentes condiciones de la RT-PCR: la temperatura de anillamiento, la cantidad de ARN molde y el número de ciclos de amplificación. Las condiciones del desarrollo de la RT-PCR fueron las siguientes:

- A la mezcla de la reacción se le añadieron 2 μ l de ARN molde, obtenido en el apartado 6.4.4.1 de Materiales y Métodos.
- Incubación de la reacción a 55 °C durante 30 minutos para que se lleve a cabo la síntesis de ADNc.
- Incubación de la reacción durante 2 minutos a 94 °C para inactivar la retrotranscriptasa (RT).
- Amplificación del fragmento de ADNc mediante PCR aplicando las siguientes condiciones:
 - i. Temperatura de desnaturalización: 94 °C durante 30 segundos.
 - ii. Temperatura de anillamiento de los cebadores: 55 °C durante 30 segundos.
 - iii. Temperatura de extensión: 72 °C durante 30 segundos.
 - iv. Número de ciclos: 34 (Pasos i, ii y iii).
 - v. Temperatura de extensión final: 72 °C durante 10 minutos.

Como en el caso anterior, el resultado de la RT-PCR mostró una banda de ADNc del tamaño esperado que se correspondía con la zona amplificada deseada, tal y como se confirmó mediante secuenciación. Las bandas generadas se cuantificaron por densitometría utilizando un programa informático “Gel-Pro Analyzer” (Media Cybernetics). El nivel de amplificación de las bandas en las distintas condiciones fue ajustado comparando la intensidad de las bandas con respecto a la señal generada por el ADNc formado a partir del ARNm del gen de la β -actina como en el caso anterior.

Como puede apreciarse en la Figura 3.2.15 el nivel de expresión del gen *pcbC* a las 48 horas fue similar en los controles y en los cultivos donde se habían añadido las poliaminas.

Sin embargo, a las 72 horas de fermentación la diferencia en el nivel de expresión del gen *pcbC* se incrementó de forma acusada con los compuestos 1,3-diaminopropano, espermidina y putrescina.

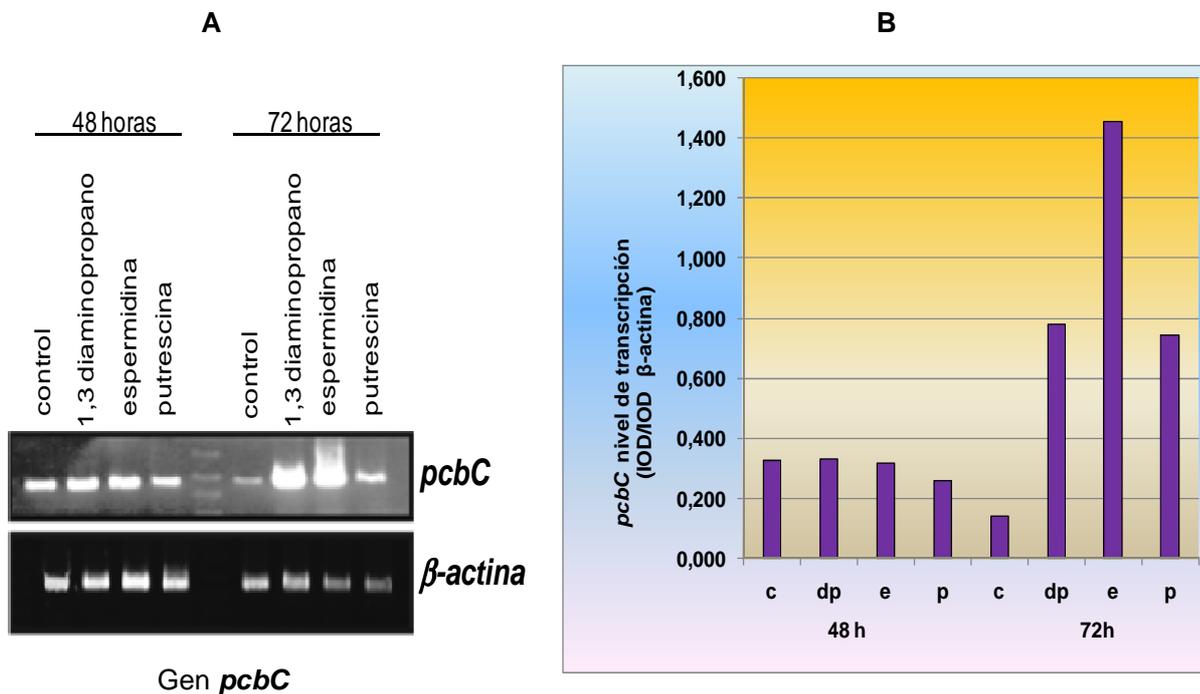


Figura 3.2.15: **A.** Resultado del experimento de RT-PCR donde se muestra el nivel de transcripción del gen *pcbC* (panel superior) y del gen de la *β-actina* (panel inferior) a las 48 y 72 horas de fermentación en los cultivos control (c) y en los cultivos a los que se añadieron 1,3-diaminopropano (dp), espermidina (e) o putrescina (p). **B.** El nivel de expresión génica fue normalizado comparando la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el *gen pcbC* con la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen de *la β-actina*.

2.3. Análisis de la expresión del gen *penDE*.

Para estudiar el nivel de expresión del gen *penDE* se emplearon los oligonucleótidos *penDE-R* y *penDE-F* (ver Tabla 2.1 del apartado 2.3.1 de Materiales y Métodos), diseñados para amplificar un fragmento de 526 pb del ADNc que codifica la enzima IAT. Se realizaron diversos ensayos variando las diferentes condiciones de la RT-PCR: la temperatura de anillamiento, la cantidad de ARN molde y el número de ciclos de amplificación. Las condiciones del desarrollo de la RT-PCR fueron las siguientes:

- A la mezcla de reacción se le añadieron 2 µl de ARN molde, obtenido en el apartado 6.4.4.1 de Materiales y Métodos.

- Incubación de la reacción a 55 °C durante 30 minutos para que se lleve a cabo la síntesis de ADNc.
- Incubación de la reacción durante 2 minutos a 94 °C para inactivar la retrotranscriptasa (RT).
- Amplificación del fragmento de ADNc mediante PCR aplicando las siguientes condiciones:
 - i. Temperatura de desnaturalización: 94 °C durante 30 segundos.
 - ii. Temperatura de anillamiento de los cebadores: 55 °C durante 30 segundos.
 - iii. Temperatura de extensión: 72 °C durante 30 segundos.
 - iv. Número de ciclos: 34 (Pasos i, ii y iii).
 - v. Temperatura de extensión final: 72 °C durante 10 minutos.

Como en el caso anterior, el resultado de la RT-PCR mostró una banda de ADNc del tamaño esperado que se correspondía con la zona amplificada deseada, tal y como se confirmó mediante secuenciación. Las bandas generadas se cuantificaron por densitometría utilizando un programa informático “Gel-Pro Analyzer” (Media Cybernetics).

El nivel de amplificación de las bandas en las distintas condiciones fue ajustado comparando la intensidad de las bandas con respecto a la señal generada por el ADNc formado a partir del ARNm del gen de la β -actina como en los casos precedentes.

Como puede apreciarse en la Figura 3.2.16 el nivel de expresión del gen *penDE* se incrementó de manera significativa a las 48 horas en los cultivos donde se habían añadido las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina. Sin embargo, no se observó un mayor nivel de expresión del gen *penDE* con el compuesto putrescina en comparación con los controles.

A las 72 horas de fermentación la diferencia en el nivel de expresión del gen *penDE* se incrementó aún más con respecto a los controles con los compuestos 1,3-diaminopropano y espermidina, permaneciendo a un nivel constante el nivel de expresión (igual que a las 48 horas) con el compuesto putrescina. Como puede observarse en la Figura 3.2.16, existe un incremento en el nivel de expresión del gen *penDE* a las 72 horas con respecto a las 48 horas, hecho que ha sido anteriormente observado por otros autores (García-Rico y col., 2008).

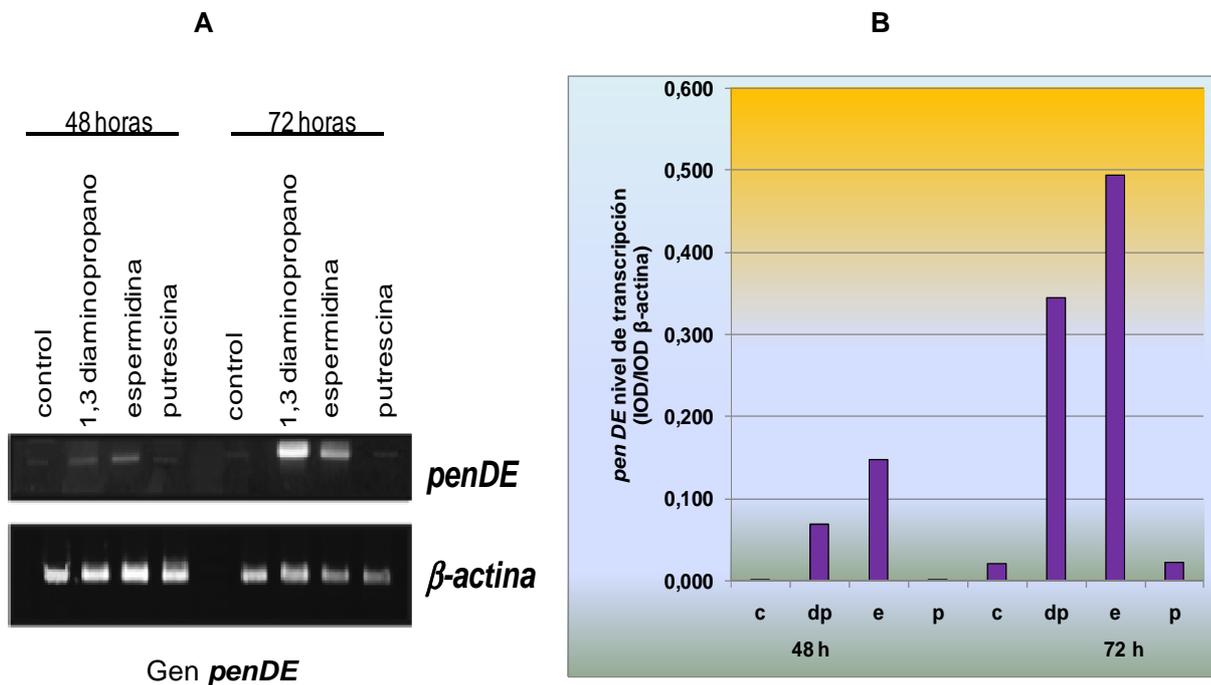


Figura 3.2.16: A. Resultado del experimento de RT-PCR donde se muestra el nivel de transcripción del gen *penDE* (panel superior) y del gen de la *β-actina* (panel inferior) a las 48 y 72 horas de fermentación en los cultivos control (c) y en los cultivos a los que se añadieron 1,3-diaminopropano (dp), espermidina (e) o putrescina (p). **B.** El nivel de expresión génica fue normalizado comparando la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen *penDE* con la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen de la *β-actina*.

2.4. Análisis de la expresión del gen *laeA*.

En *P. chrysogenum*, el gen *laeA* codifica un regulador global del metabolismo secundario. Como se comentó en la Introducción General, la sobreexpresión de este gen origina un incremento en la producción de penicilina debido a que regula positivamente la expresión del *cluster* de genes de biosíntesis de penicilina (Kosalková y col., 2009).

Dado que las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina actúan incrementando el nivel de expresión de los genes de biosíntesis de penicilina, era importante determinar si estos compuestos actúan también sobre la expresión de este gen regulador.

Para estudiar el nivel de expresión del gen *laeA* se emplearon los oligonucleótidos *laeA-5* y *laeA-6* (ver Tabla 2.4 del apartado 2.3.1 de Materiales y Métodos), diseñados para amplificar el ADNc (1284 pb) que codifica la enzima PcLaeA. Se realizaron diversos ensayos variando las diferentes condiciones de la RT-PCR: la temperatura de anillamiento, la cantidad de ARN molde y el número de ciclos de amplificación. Las condiciones del desarrollo de la RT-PCR se detallan a continuación:

- A la mezcla de la reacción se le añadieron 4 µl de ARN molde, obtenido en el apartado 6.4.4.1 de Materiales y Métodos.
- Incubación de la reacción a 55 °C durante 30 minutos para que se lleve a cabo la síntesis de ADNc.
- Incubación de la reacción durante 2 minutos a 94 °C para inactivar la retrotranscriptasa (RT).
- Amplificación del fragmento de ADNc mediante PCR aplicando las siguientes condiciones:
 - i. Temperatura de desnaturalización: 94 °C durante 15 segundos.
 - ii. Temperatura de anillamiento de los cebadores: 58 °C durante 30 segundos.
 - iii. Temperatura de extensión: 72 °C durante 90 segundos.
 - iv. Número de ciclos 40 (Pasos i, ii y iii).
 - v. Temperatura de extensión final: 72 °C durante 10 minutos.

Como en el caso anterior, el resultado de la RT-PCR mostró una banda de ADNc del tamaño esperado que se correspondía con la zona amplificada deseada, tal y como se confirmó mediante secuenciación. Las bandas generadas se cuantificaron por densitometría utilizando un programa informático “Gel-Pro Analyzer” (Media Cybernetics).

El nivel de amplificación de las bandas en las distintas condiciones fue ajustado comparando la intensidad de las bandas con respecto a la señal generada por el ADNc formado a partir del ARNm del gen de la β -actina como en los casos precedentes.

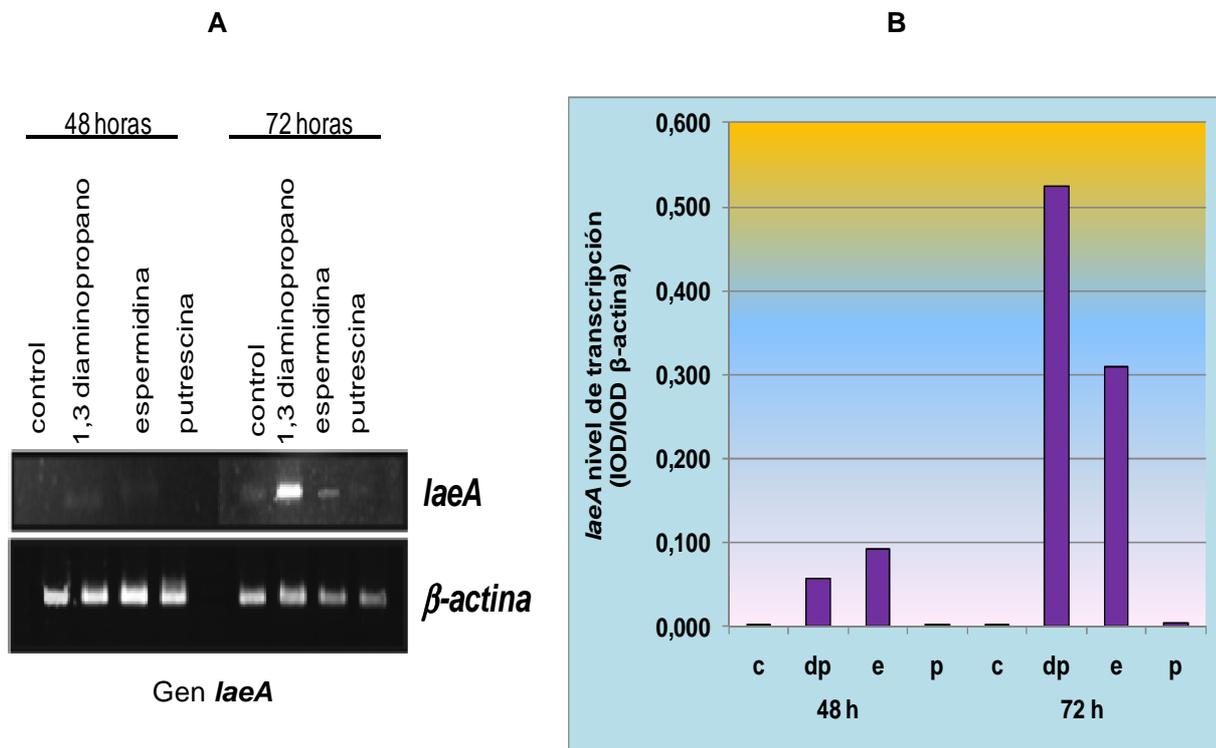


Figura 3.2.17: A. Resultado del experimento de RT-PCR donde se muestra el nivel de transcripción del gen *laeA* (panel superior) y del gen de la *β-actina* (panel inferior) a las 48 y 72 horas de fermentación en los cultivos control (c) y en los cultivos a los que se añadieron 1,3-diaminopropano (dp), espermidina (e) o putrescina (p). **B.** El nivel de expresión génica fue normalizado comparando la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen *laeA* con la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen de la *β-actina*.

Como puede apreciarse en la Figura 3.2.17 el nivel de expresión del gen *laeA* se incrementó de manera significativa a las 48 horas en los cultivos donde se habían añadido las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina. Sin embargo, no se observó un mayor nivel de expresión del gen *laeA* con el compuesto putrescina.

A las 72 horas de fermentación la diferencia en el nivel de expresión del gen *laeA* se incrementó aún más con los compuestos 1,3-diaminopropano y espermidina en comparación a los controles, permaneciendo a un nivel constante el nivel de expresión (igual que a las 48 horas) con el compuesto putrescina. Este resultado es acorde con los obtenidos anteriormente, presentando una clara evidencia de que una mayor expresión del gen *laeA* conlleva una mayor

expresión del *cluster* de genes de biosíntesis de penicilina como se ha descrito anteriormente (Kosalková y col., 2009).

2.5. Análisis de la expresión del gen *pacC*.

Como se ha descrito en la Introducción General, un valor de pH alcalino estimula la transcripción de los genes de biosíntesis de penicilina. Este efecto regulador por pH está mediado a través del factor transcripcional PacC.

Para analizar si el mayor nivel de expresión génica observado en el *cluster* de genes de biosíntesis de penicilina ejercido por las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina no era debido a un efecto regulador del pH, se analizó el nivel de expresión del gen *pacC*. Para estudiar el nivel de expresión del gen *pacC* se emplearon los siguientes oligonucleótidos; *pacC*-R y *pacC*-F (ver Tabla 2.1 del apartado 2.3.1 de Materiales y Métodos), diseñados para amplificar 500 pb del ADNc que codifica la proteína PacC. Se realizaron diversos ensayos variando las diferentes condiciones de la RT-PCR: la temperatura de anillamiento, la cantidad de ARN molde y el número de ciclos de amplificación. Las condiciones del desarrollo de la RT-PCR fueron las siguientes:

- A la mezcla de la reacción se le añadieron 2 μ l de ARN molde, obtenido en el apartado 6.4.4.1 de Materiales y Métodos.
- Incubación de la reacción a 55 °C durante 30 minutos para que se lleve a cabo la síntesis de ADNc.
- Incubación de la reacción durante 2 minutos a 94 °C para inactivar la retrotranscriptasa (RT).
- Amplificación del fragmento de ADNc mediante PCR aplicando las siguientes condiciones:
 - i. Temperatura de desnaturalización: 94 °C durante 15 segundos.
 - ii. Temperatura de anillamiento de los cebadores: 55 °C durante 30 segundos.
 - iii. Temperatura de extensión: 72 °C durante 60 segundos.
 - iv. Número de ciclos 40 (Pasos i, ii y iii).
 - v. Temperatura de extensión final: 72 °C durante 10 minutos.

Como en los casos anteriores, el resultado de la RT-PCR mostró una banda de ADNc del tamaño esperado que se correspondía con la zona amplificada deseada, tal y como se confirmó mediante secuenciación. Las bandas generadas se cuantificaron por densitometría utilizando un programa informático “Gel-Pro Analyzer” (Media Cybernetics). El nivel de amplificación de las bandas en las distintas condiciones fue ajustado comparando la intensidad de las bandas con respecto a la señal generada por el ADNc formado a partir del ARNm del gen de la β -actina como en los casos precedentes.

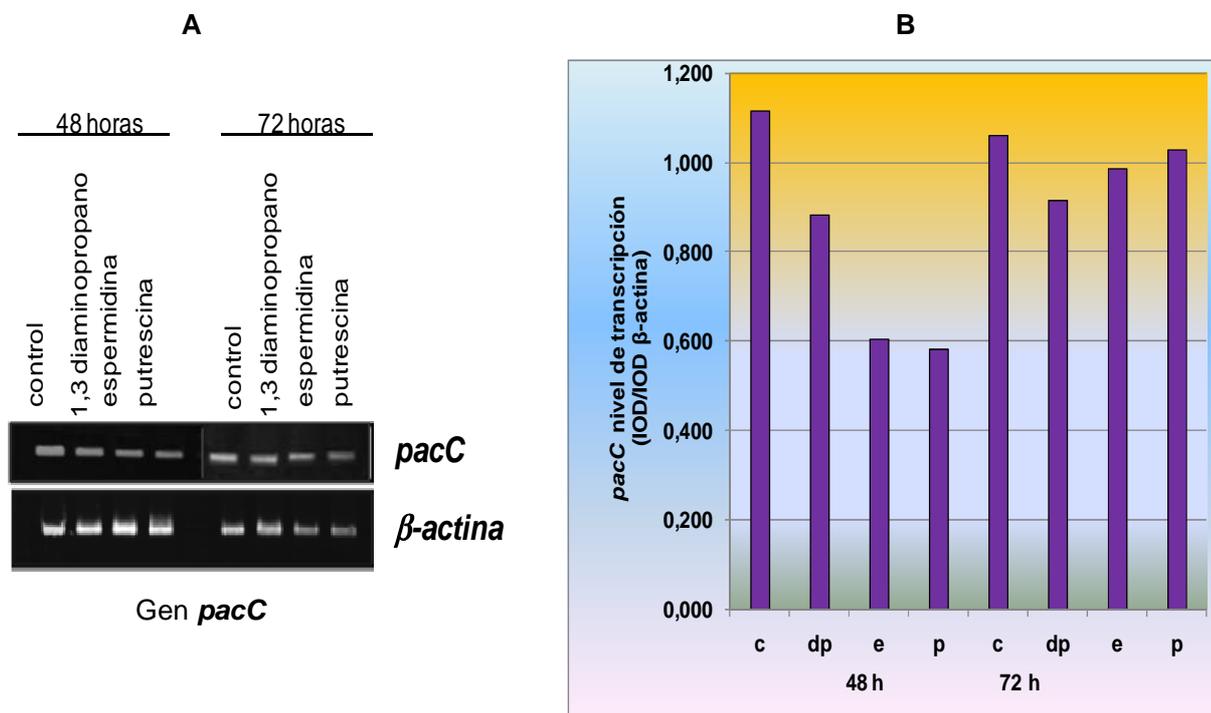


Figura 3.2.18: **A.** Resultado del experimento de RT-PCR donde se muestra el nivel de transcripción del gen *pacC* (panel superior) y del gen de la β -actina (panel inferior) a las 48 y 72 horas de fermentación en los cultivos control (c) y en los cultivos a los que se añadieron 1,3-diaminopropano (dp), espermidina (e) o putrescina (p). **B.** El nivel de expresión génica fue normalizado comparando la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen *pacC* con la intensidad de la señal de las bandas obtenidas con el gen de la β -actina.

Como puede apreciarse en la Figura 3.2.18 el gen *pacC* tiene un perfil de expresión diferente a lo visto hasta ahora. A las 48 horas de cultivo el nivel de expresión del gen *pacC* en el

control es superior al nivel de expresión de dicho gen en los cultivos donde se añadieron las poliaminas.

A las 72 horas de fermentación el nivel de expresión del gen *pacC* fue similar en todos los casos, lo que indica que el mayor nivel de expresión de los genes de biosíntesis de penicilina originado por las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina no fue debido a un incremento del factor transcripcional *pacC* como consecuencia del pH alcalino alcanzado en el medio de cultivo a las 72 horas.

3. Efecto de las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina sobre la diferenciación morfológica y la esporulación.

3.1. Efecto de las poliaminas. Incremento en la formación de vacuolas.

El efecto observado por las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina sobre el incremento de la expresión de los genes de biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* vino acompañado por una serie de cambios morfológicos, como el aumento del número de vacuolas presentes en las hifas. Según se observa en la Figura 3.2.19, las hifas procedentes de caldos donde se habían añadido las poliaminas, presentaban un grado de vacuolización diferente a los controles además de un mayor grosor. Los resultados fueron similares con cualquiera de las poliaminas 1,3-diaminopropano o espermidina.

Las diferencias fueron apreciables desde el primer día de la fermentación (muestra recogida a las 24 horas), siendo éstas menos notorias transcurridas las 72 horas de fermentación, donde el grado de vacuolización entre los controles y las células con las poliaminas fue indistinguible.

Para confirmar el fenómeno de vacuolización observado mediante microscopía confocal, las hifas se trataron con el fluoróforo lipofílico N-(3-trietilamonio)propil)-4-(p-dietilaminofenilhexatrienil) piridio dibromuro (FM 4-64, Molecular Probes Inc., OR), utilizando el protocolo detallado en el apartado 13 de Materiales y Métodos. Según se puede apreciar en la Figura 3.2.20, y debido a su carácter lipofílico, el colorante tiñó todas las membranas dejando perfectamente contorneado todo el perímetro de las vacuolas, en las cuales no penetró.

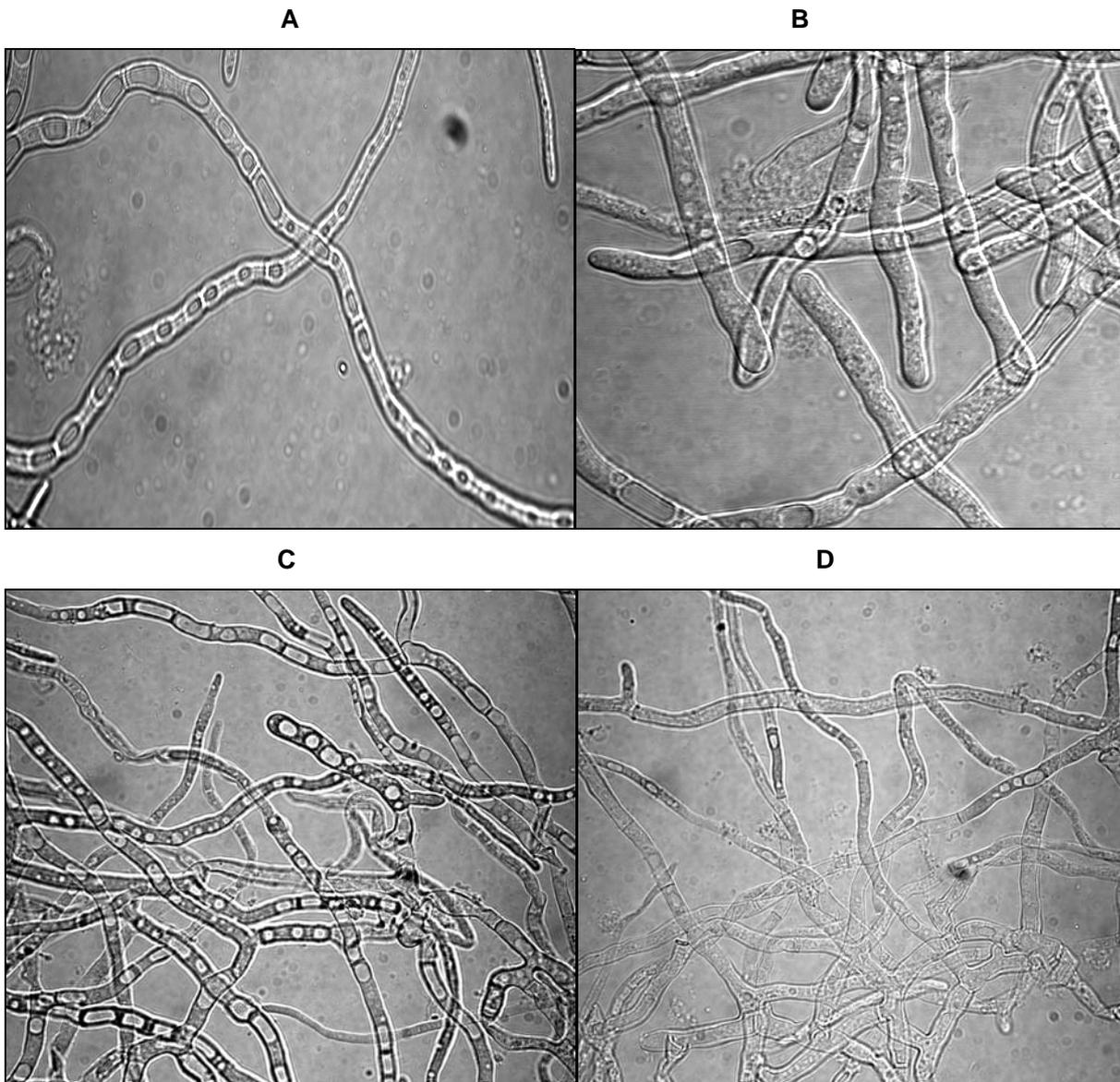


Figura 3.2.19: Imágenes correspondientes a microscopía óptica confocal. **A.** Fotografía correspondiente al caldo de cultivo suplementado con la poliamina 1,3-diaminopropano, después de 24 horas de cultivo. **B.** Fotografía correspondiente al caldo control después de 24 horas de cultivo. **C.** Fotografía correspondiente al caldo de cultivo suplementado con la poliamina 1,3-diaminopropano, después de 48 horas de cultivo. **D.** Fotografía correspondiente al caldo control después de 48 horas de cultivo. Las preparaciones de las muestras para la microscopía confocal se realizaron según el apartado 13 de Materiales y Métodos.

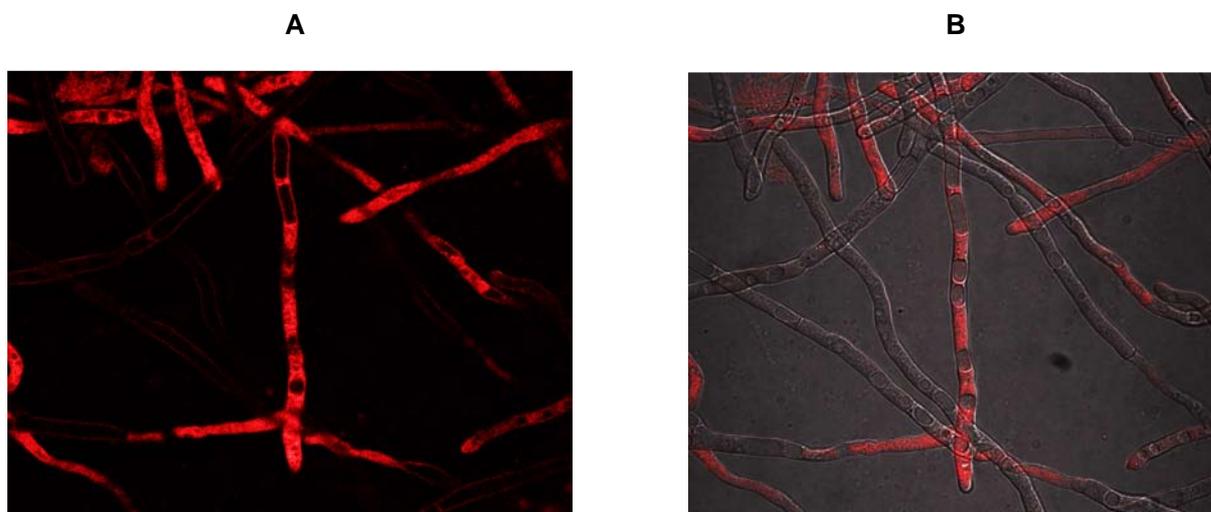


Figura 3.2.20: Imágenes correspondientes a microscopía óptica confocal de cultivos tratados con 1,3-diaminopropano. **A.** Tinciones de las membranas vacuolares utilizando el fluoróforo FM 4-64. **B.** Misma imagen combinada de las hifas (contraste de fases) y de la tinción.

3.2. Efecto de las poliaminas sobre la pigmentación y la esporulación.

Una vez verificado que las poliaminas añadidas a los medios de cultivo provocaban cambios en la morfología de las hifas, se quiso comprobar si éstas podían afectar al grado de pigmentación y/o esporulación dado que las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina afectan el nivel de expresión del regulador global *laeA*. Como se indicó en la Introducción General, una menor expresión del gen *laeA* afecta al fenotipo y a la esporulación asexual (Kosalková y col., 2009).

Para comprobar el efecto que las poliaminas podían producir sobre la pigmentación y esporulación de *P. chrysogenum*, se prepararon placas de Petri con medio Power y medio Czapek según el apartado de Materiales y Métodos 5.2.1.2 y 8.2, respectivamente y suplementadas con la poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina a una concentración de 5 mM. Otra serie de placas sin poliaminas sirvieron de controles.

Para la siembra de esporas se utilizó la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 procedente de un mismo glicerol. Las placas se incubaron a 28 °C. Después de 4 días de incubación las placas presentaban diferente grado de pigmentación y esporulación. Aquellas placas en las cuales se habían añadido las poliaminas presentaban un fenotipo diferente

consistente en una mayor pigmentación. En la Figura 3.2.21, se puede observar que la placa suplementada con 1,3-diaminopropano (B) presenta mayor grado de pigmentación que la placa control (A).

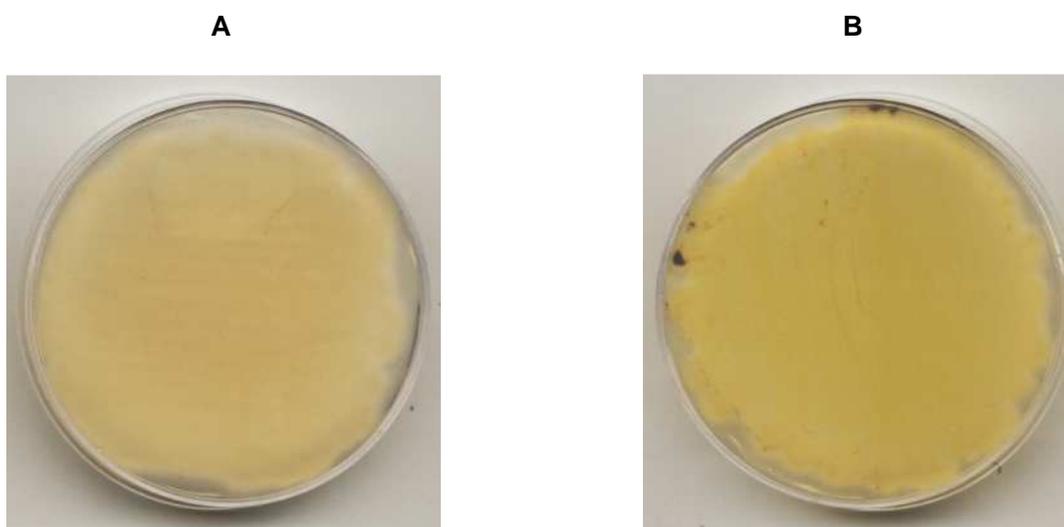


Figura 3.2.21: **A.** Placa control de *P. chrysogenum* sembrado en medio Czapek. **B.** Placa de *P. chrysogenum* sembrado en medio Czapek suplementado con 5 mM de 1,3-diaminopropano.

Las placas suplementadas con las poliaminas también presentaron un mayor grado de esporulación que los controles. Se pudo comprobar, que todas las placas que contenían poliaminas en el medio inicial presentaban un color más verde que los controles, con una tonalidad más fuerte y más pubescente (cubierto de un número mayor de hifas con el aspecto de una superficie menos rugosa) (Figura 3.2.22).

Mediante microscopía óptica de campo claro se pudieron observar las diferencias en el nivel de esporulación entre las placas usadas como controles y las placas suplementadas con las poliaminas (Figura 3.2.23).

También se pudieron ver las diferencias en el grado de esporulación mediante el empleo de microscopía electrónica de barrido entre las placas usadas como controles y las placas suplementadas con las poliaminas (Figura 3.2.24).

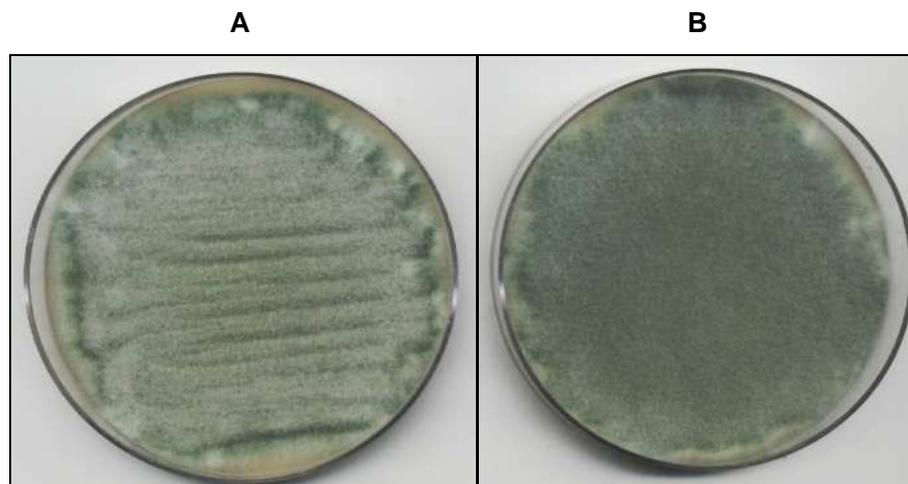


Figura 3.2.22: **A.** Placa control de *P. chrysogenum* sembrado en medio Power después de 4 días de incubación. **B.** Placa de *P. chrysogenum* sembrado en medio Power suplementado con 5 mM de 1,3-diaminopropano después de 4 días de incubación.

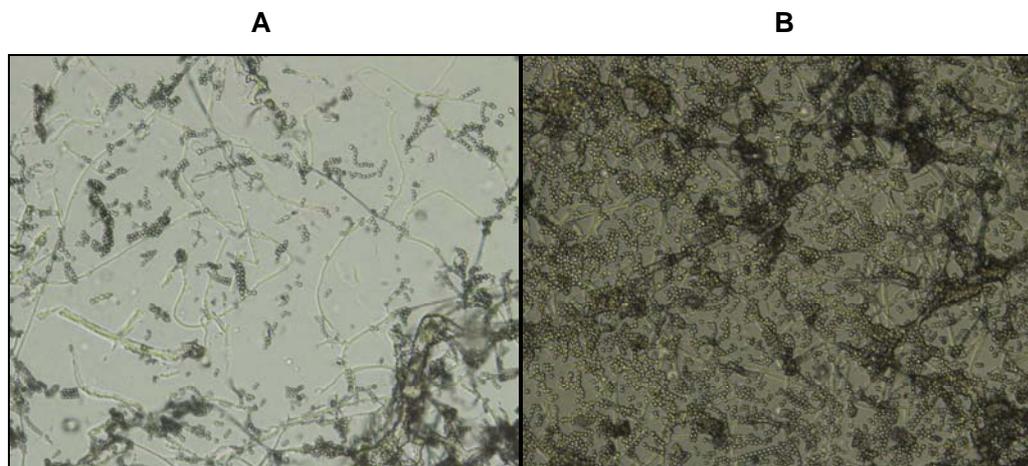


Figura 3.2.23: **A.** Fotografía de microscopía de campo claro (200x) con esporas procedentes de una placa control de medio Power. **B.** Fotografía de microscopía de campo claro (200x) con esporas procedentes de una placa de medio Power suplementada con 1,3-diaminopropano (5 mM). Las fotografías fueron realizadas con el sistema de Microscopio modelo BX60 **Olympus Corporation** con sistema automático para fotomicrografía PM20.

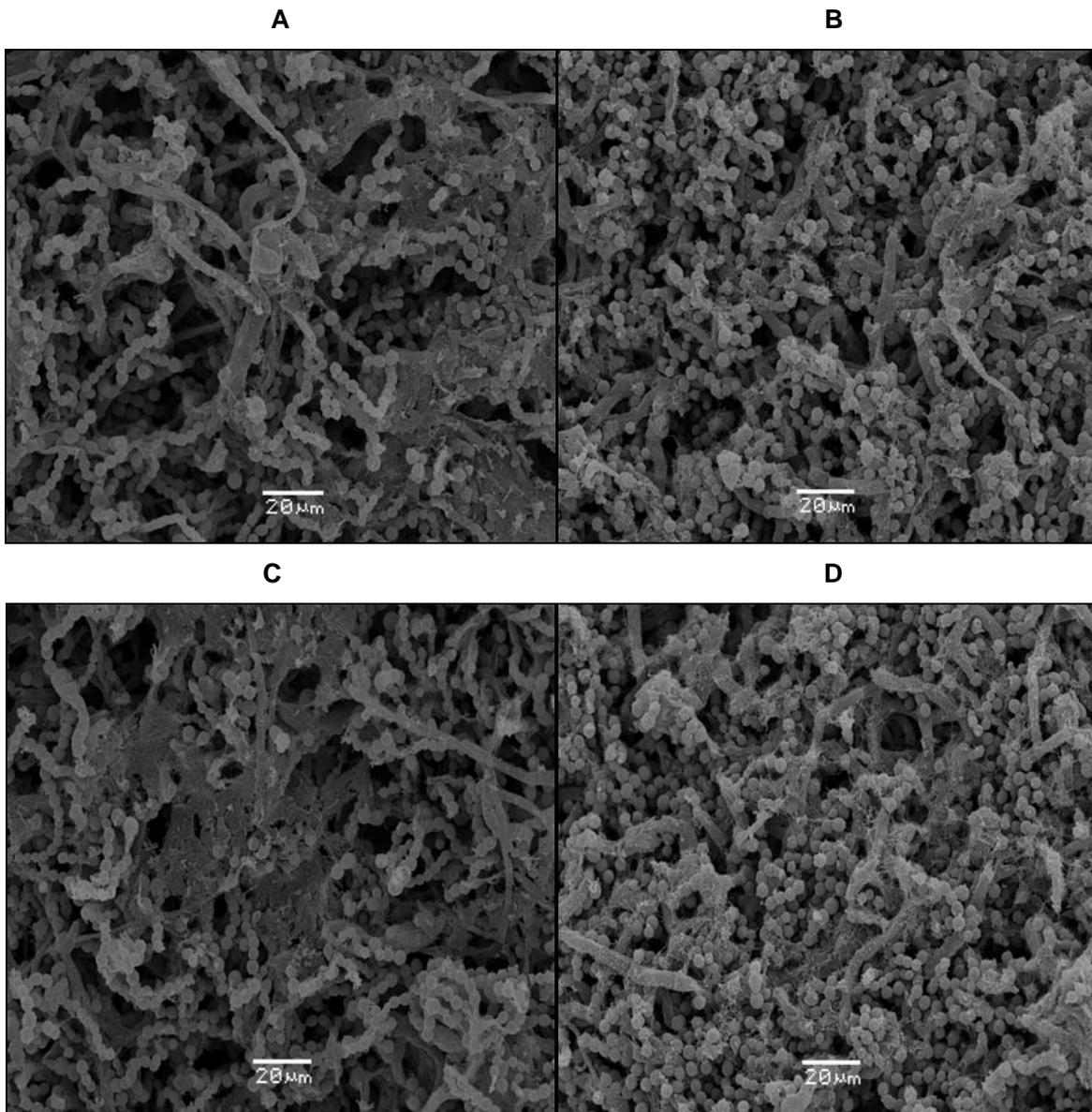


Figura 3.2.24: Figuras A y C. Fotografías de microscopía electrónica de barrido (650x) con esporas procedentes de diferentes placas control de medio Power. **Figuras B y D.** Fotografías de microscopía electrónica de barrido (650x) con esporas procedentes de diferentes placas de medio Power suplementadas con 1,3-diaminopropano 5 mM. Las imágenes fueron obtenidas con el sistema de Microscopio Electrónico de Barrido JEOL 6100 (Apartado 14 de Materiales y Métodos).

Se estudió también mediante microscopía electrónica de barrido, si las poliaminas afectaban a la morfología de la espora. No se observaron mediante esta técnica diferencias

significativas entre las esporas de las placas control y las esporas procedentes de las placas suplementadas con las poliaminas (Figura 3.2.25).

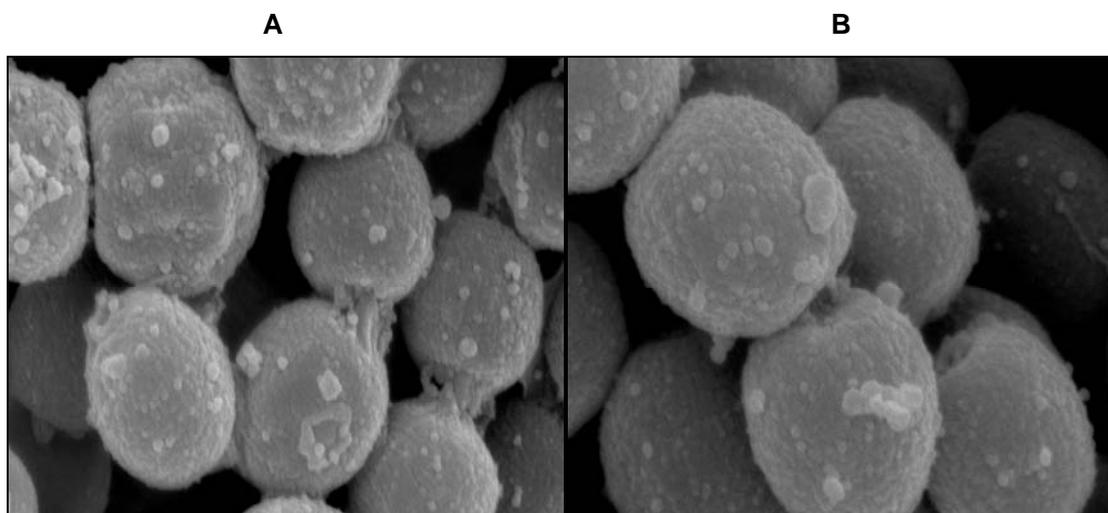


Figura 3.2.25: **A.** Fotografía de microscopía electrónica de barrido (12000x) con esporas procedentes de una placa control de medio Power. **B.** Fotografía de microscopía electrónica de barrido (15000x) con esporas procedentes de una placa de medio Power suplementada con 1,3-diaminopropano (5 mM). Las fotografías fueron realizadas con el sistema de Microscopio Electrónico de Barrido JEOL 6100. (Apartado 14 de Materiales y Métodos).

4. Efecto de las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina sobre la producción de penicilina en fermentaciones realizadas a escala semi-industrial en Planta Piloto de Fermentación.

Hasta este momento, el efecto de las poliaminas a nivel de formación de metabolitos secundarios en concreto bencilpenicilina por el hongo *P. chrysogenum*, ha sido estudiado a escala de laboratorio. Está bien establecido, en el campo de la Microbiología Industrial, que un proceso o efecto que funciona bien a escala de laboratorio puede ser que no funcione en absoluto o muy pobremente cuando se intenta realizarlo a otra escala. Se debe tener en cuenta que, en muchas ocasiones, no es posible tomar las condiciones de fermentación que han funcionado en el laboratorio y aplicarlas a un equipo de diferente escala.

El objetivo buscado en este apartado fue ver si el efecto ejercido por las poliaminas a escala de matraz era repetitivo en una escala superior (fermentadores de 5 litros de capacidad), donde se pudieran controlar y variar diferentes parámetros físicos y/o químicos como los expuestos a continuación:

- Temperatura. Los fermentadores contenían una camisa de refrigeración que permitía llevar a cabo la fermentación en el rango mesófilo (temperatura de 25 °C). Lo más importante era conseguir una temperatura constante durante todo el proceso de fermentación.
- Aireación. Los fermentadores poseían un sistema de aireación que posibilitaba ajustar la dosificación de ésta en función de la cantidad de oxígeno requerida.
- Presión. A fin de minimizar el riesgo de contaminación ambiental los fermentadores se podían presurizar (entre 0.2 ó 0.5 kg/cm²), además de poder influir en la solubilidad del oxígeno y dióxido de carbono en la solución de nutrientes.
- Agitación. Los fermentadores presentaban un árbol de agitación con paletas impulsoras que permitía ajustar diferentes velocidades de agitación en función de la demanda de oxígeno disuelto.
- Sonda de pH. Los fermentadores presentaban un electrodo de pH acoplado a un lazo de control para dosificar ácido o base y poder mantener el rango de pH seleccionado.
- Lectura de CO₂. Los fermentadores disponían de un dispositivo por el cual se podía determinar el CO₂ generado en la fermentación.

4.1. Efecto de las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina en medio definido.

En un primer estudio, se decidió probar las nuevas condiciones de fermentación con el medio definido utilizado hasta el momento según el apartado de Materiales y Métodos 4.2.

Como en las fermentaciones anteriores, se determinó la cinética del crecimiento y de la producción según los apartados 5.3 y 8.3 de Materiales y Métodos. En todos los ensayos realizados, se añadieron los compuestos 1,3-diaminopropano y espermidina al inicio de la

fermentación a una concentración final de 5 mM. Como control, se realizó una fermentación añadiendo la cantidad equivalente de medio estéril.

La toma de muestras se realizó a las 24, 48 y 72 horas para determinar el peso seco, la producción volumétrica y la producción específica de bencilpenicilina.

Los resultados obtenidos en las fermentaciones evidenciaron que las poliaminas añadidas surtían el mismo efecto que cuando se realizaron cultivos en matraz en cuanto a acelerar el crecimiento del microorganismo al inicio de la fermentación (Figura 3.2.26).

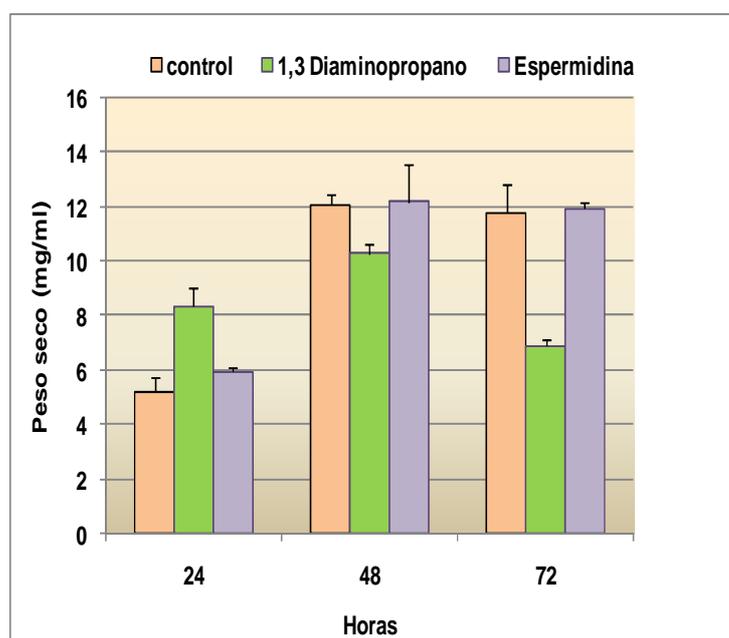


Figura 3.2.26: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido en medio definido de producción a partir de las fermentaciones control y de las suplementadas con poliaminas.

Las diferencias más notorias se observaron con el compuesto 1,3-diaminopropano. En las fermentaciones con este compuesto se tuvo que incrementar el aporte del caudal de aire y la agitación en las primeras 24 horas para mantener el nivel de oxígeno disuelto, señal inequívoca de un mayor crecimiento. Este mismo hecho sucedió de forma menos acusada con la poliamina espermidina.

Una segunda indicación de un crecimiento más acelerado por parte de los fermentadores con las poliaminas, fue el mayor consumo (el doble) en las primeras horas de fermentación de la solución básica conectada al fermentador para mantener el control del pH al punto de consigna ajustado de 6.5, junto a un mayor nivel de CO₂ generado en la fermentación. Mientras en los

controles se obtenía un valor de 0.29 % de CO₂ a las 24 horas, con las fermentaciones suplementadas con poliaminas se obtenían valores de 0.80 % para el 1,3-diaminopropano y 0.58 % para la espermidina.

En todas las fermentaciones realizadas, se observó un fenómeno de lisis celular a partir de las 48 horas en los fermentadores donde se había añadido el compuesto 1,3-diaminopropano, adquiriendo éstos una tonalidad verdosa (se comprobó la presencia de hifas lisadas por microscopía óptica con el objetivo de inmersión 100x). Este hecho se atribuyó a un agotamiento temprano de nutrientes, ya que el crecimiento desde el inicio de la fermentación fue superior al resto, alcanzando valores superiores de hasta el 60 % respecto a los controles y algo menores en relación a los fermentadores donde se había añadido la espermidina.

Los caldos de fermentación tomados a diferentes tiempos se analizaron mediante cromatografía HPLC, según el apartado 8.3.2 de Materiales y Métodos para la cuantificación de la producción de bencilpenicilina. El antibiótico comenzó a producirse a las 24 horas de fermentación incrementándose de forma lineal hasta las 72 horas, excepto en las fermentaciones donde se había añadido la poliamina 1,3-diaminopropano.

Las primeras muestras valoradas a las 24 horas de fermentación permitieron correlacionar el mayor incremento de crecimiento observado en las fermentaciones suplementadas con poliaminas con un aumento de la producción volumétrica superior al 100 % con respecto a los controles.

A las 48 horas de fermentación estas diferencias de producción volumétrica de bencilpenicilina con respecto a los controles se vieron disminuidas. En el caso de los fermentadores con el 1,3-diaminopropano, éstas fueron del orden del 58 % y del 22 % con la espermidina. A las 72 horas de fermentación la producción volumétrica con el 1,3-diaminopropano fue inferior a los controles, debido a la temprana lisis celular. Sin embargo, dicha producción se mantuvo un 20-25 % superior a los controles con la espermidina (Figuras 3.2.27 y 3.2.28).

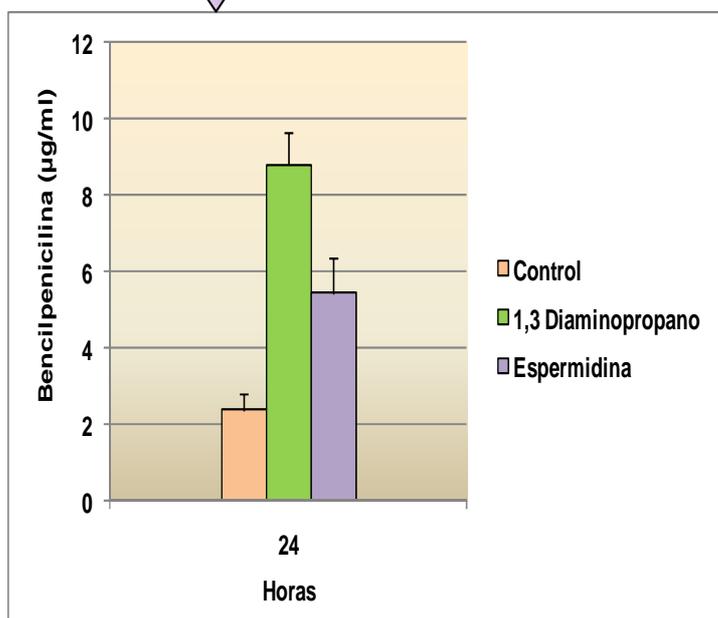
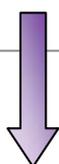
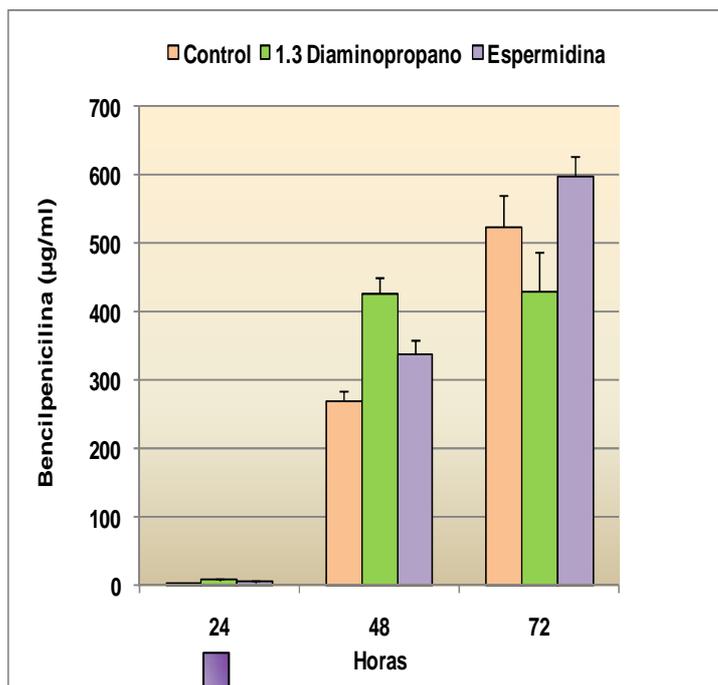


Figura 3.2.27: Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina, en medio definido de producción, de las fermentaciones control y de las fermentaciones suplementadas con las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina. La gráfica inferior corresponde a la producción a las 24 horas (con un cambio de escala del eje de las ordenadas para facilitar su visualización).

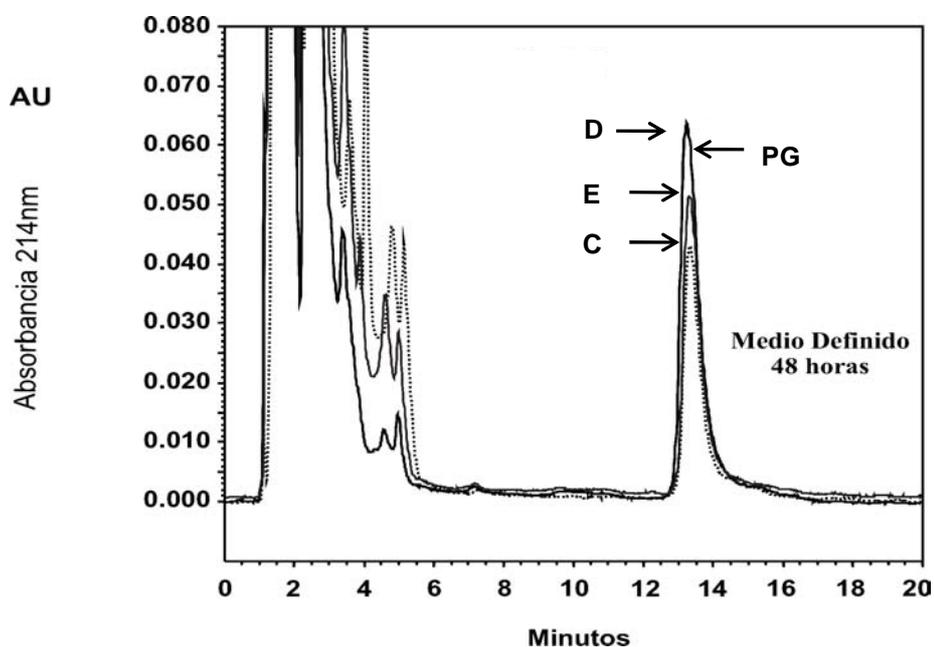


Figura 3.2.28: Cromatograma de la valoración de bencilpenicilina (PG) por HPLC a las 48 horas de fermentación. Comparación entre el control (C) y las fermentaciones suplementadas con 1,3-diaminopropano (D) y espermidina (E). Las condiciones cromatográficas se detallan en la Tabla 2.4, apartado 8 de Materiales y Métodos.

En cuanto a la producción específica de bencilpenicilina (Figura 3.2.29), se observó una mayor producción con el compuesto 1,3-diaminopropano durante toda la fermentación, alcanzando un incremento superior al 100 % al inicio de ésta con respecto a los controles para disminuir al 85 % y 40 % respectivamente, a las 48 y 72 horas de fermentación.

Con la espermidina se mantuvo inicialmente un valor similar al alcanzado con el 1,3-diaminopropano, disminuyendo éste progresivamente a medida que avanzaba la fermentación hasta incrementos de un 25 % a las 48 horas y un 15 % a las 72 horas de fermentación respecto al control.

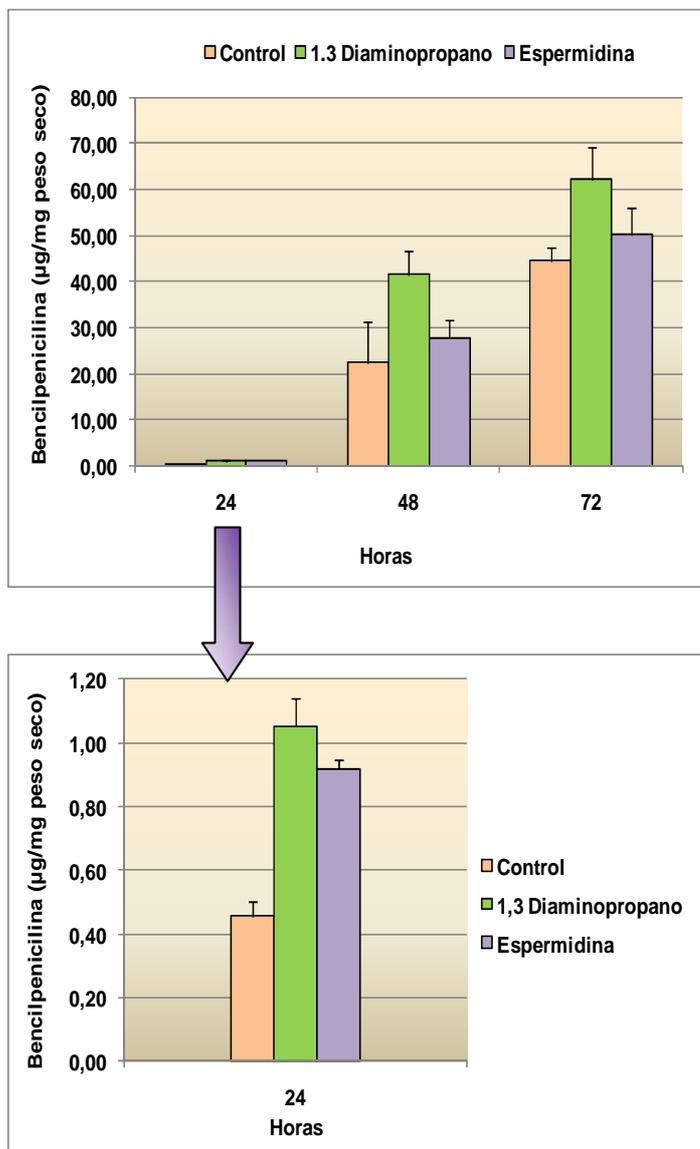


Figura 3.2.29: Producción específica de bencilpenicilina de las fermentaciones control y de las fermentaciones suplementadas con las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina. La gráfica inferior corresponde a la producción a las 24 horas (con un cambio de escala del eje de las ordenadas para facilitar su visualización).

4.2. Efecto de las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina en medio complejo.

En este apartado se decidieron probar las nuevas condiciones de fermentación a escala semi-industrial con un medio complejo según se describe en el apartado 4.2.2 de Materiales y Métodos. El hecho de utilizar un medio complejo podría enmascarar el efecto producido por las poliaminas, ya que algunos componentes del medio complejo como el líquido de maceración del maíz, presentan en su composición diferentes porcentajes de poliaminas como la putrescina o

cadaverina. Como en las fermentaciones anteriores, se determinó la cinética del crecimiento y de la producción según los apartados 5.3 y 8.3 de Materiales y Métodos. En todos los ensayos realizados se añadieron los compuestos 1,3-diaminopropano y espermidina al inicio de la fermentación a una concentración final de 5 mM. Como controles se realizaron fermentaciones a las que se añadió la cantidad equivalente de medio estéril.

La toma de muestras se realizó a las 24, 48, 72 y 86 horas para determinar el peso seco, la producción volumétrica y la producción específica de bencilpenicilina. En cuanto al crecimiento, los resultados obtenidos utilizando el medio complejo fueron diferentes al caso anterior donde se utilizó un medio definido.

El crecimiento fue similar tanto en las fermentaciones donde se añadieron las poliaminas como en aquellas que sirvieron de controles (Figura 3.2.30). En ese sentido, el medio complejo anuló el efecto provocado por las poliaminas de acelerar el crecimiento desde el inicio de la fermentación.

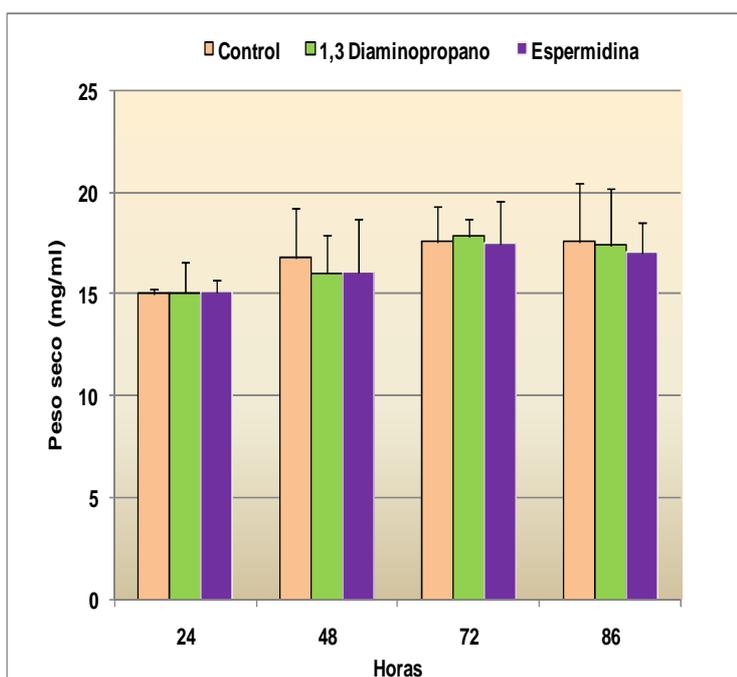


Figura 3.2.30: Cinética de crecimiento determinada en función del peso seco obtenido en medio complejo de producción a partir de las fermentaciones control y de las suplementadas con poliaminas.

Los caudales de aireación y las rpm de la agitación permanecieron constantes hasta las 48 horas de fermentación. Las únicas diferencias observables en este intervalo horario (24-48 horas) entre las fermentaciones suplementadas con las poliaminas y los controles fueron: un

mayor consumo de la disolución básica en los primeros, un valor del oxígeno disuelto más bajo (64 % para el 1,3-diaminopropano y 69 % para la espermidina) en los fermentadores con las poliaminas frente a un 88 % para los controles y un valor de % de CO₂ generado más alto en los fermentadores con las poliaminas (0.41 %), con respecto a los controles (0.31 %).

Entre las 48 y 86 horas de fermentación se incrementaron las rpm en todos los fermentadores para mantener un nivel de oxígeno disuelto por encima del 50 %. Los valores máximos de agitación fueron de 475 rpm para los fermentadores con las poliaminas frente a 450 rpm en los controles.

El consumo de ácido y base fue mayor en los fermentadores con las poliaminas (hasta un 50 % de incremento). Se mantuvo durante toda la fermentación un mayor nivel de CO₂ generado en los fermentadores con las poliaminas con respecto a los controles (0.59 % frente al 0.39 %). Los caldos de fermentación tomados a diferentes tiempos se analizaron mediante cromatografía HPLC según el apartado 8.3.2 de Materiales y Métodos para la cuantificación de producción de bencilpenicilina.

El antibiótico comenzó a producirse a las 24 horas de fermentación incrementándose de forma lineal hasta las 86 horas (Figuras 3.2.31 y 3.2.32). Aunque el crecimiento fue similar en todos los fermentadores, sí se apreció una mayor producción volumétrica desde el comienzo de la fermentación en los fermentadores donde se habían añadido las poliaminas.

El promedio de los valores de producción volumétrica alcanzados a las diferentes horas de fermentación osciló entre un 20-30 % de incremento con el compuesto 1,3-diaminopropano y un 15-25 % con la espermidina.

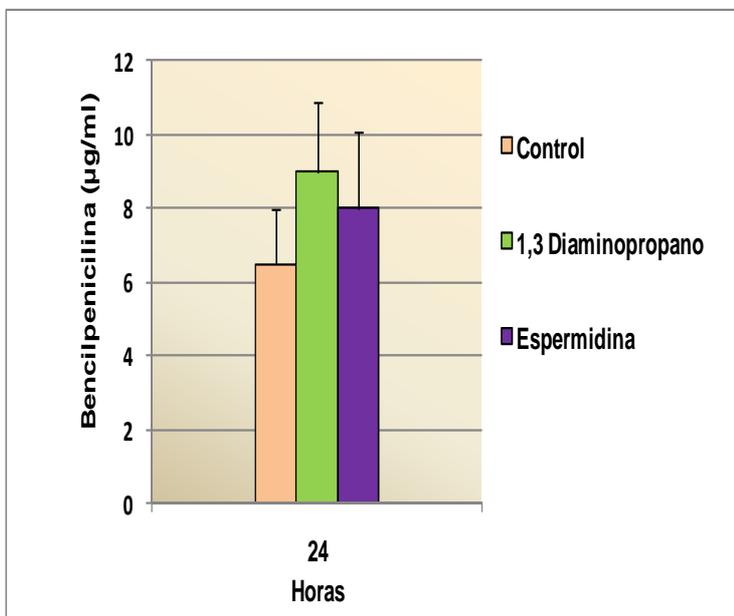
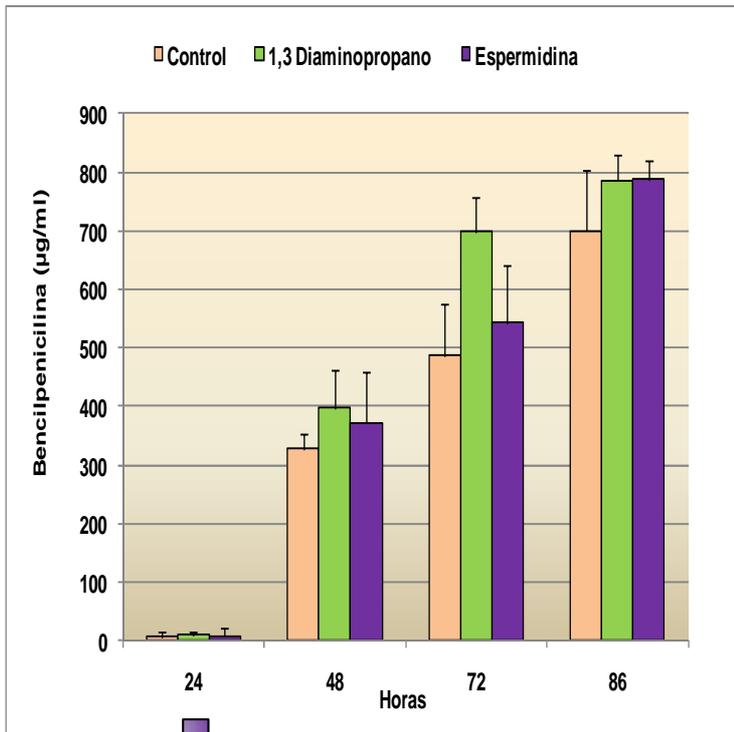


Figura 3.2.31: Cinética de producción volumétrica de bencilpenicilina en medio complejo de producción de las fermentaciones control y de las fermentaciones suplementadas con las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina. La gráfica inferior corresponde a la producción a las 24 horas (con un cambio de escala del eje de las ordenadas para facilitar su visualización).

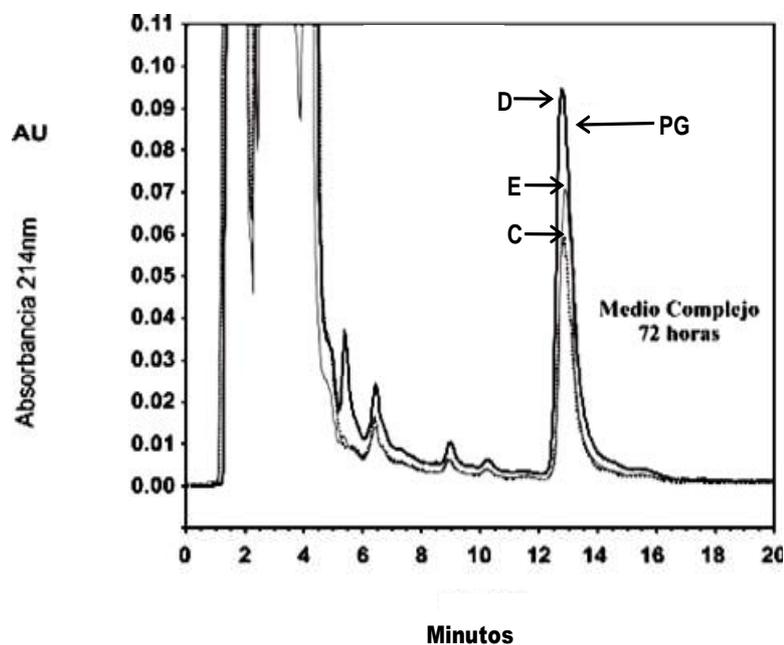


Figura 3.2.32: Cromatograma de la valoración de bencilpenicilina (PG) por HPLC a las 48 horas de fermentación. Comparación entre el control (C) y las fermentaciones suplementadas con 1,3-diaminopropano (D) y espermidina (E). Las condiciones cromatográficas se detallan en la Tabla 2.4, apartado 8 de Materiales y Métodos.

En cuanto a la producción específica alcanzada (Figura 3.2.33), se observó un valor promedio mayor de este parámetro en los fermentadores con las poliaminas añadidas. Los promedios de los valores alcanzados oscilaron entre un 20-30 % durante las primeras 72 horas de fermentación, disminuyendo al 15 % de incremento con respecto a los controles al final de ésta. Este resultado pone de manifiesto el gran potencial de estas poliaminas para su uso a escala industrial de producción de antibióticos.

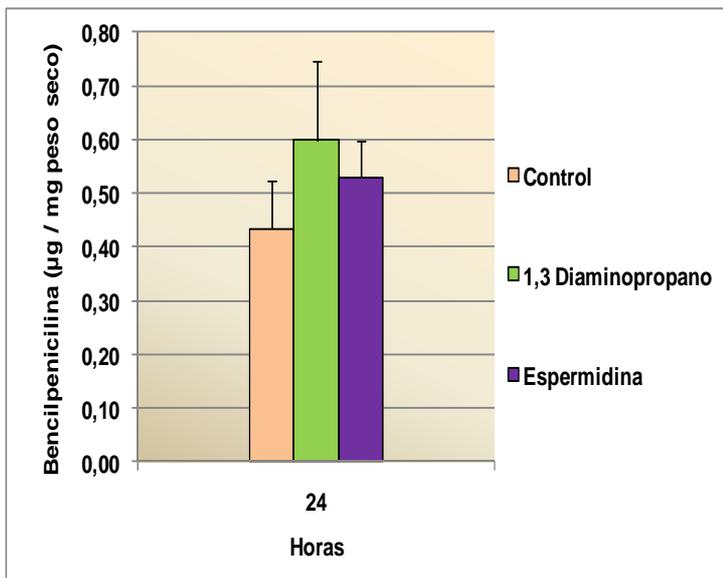
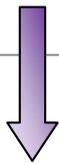
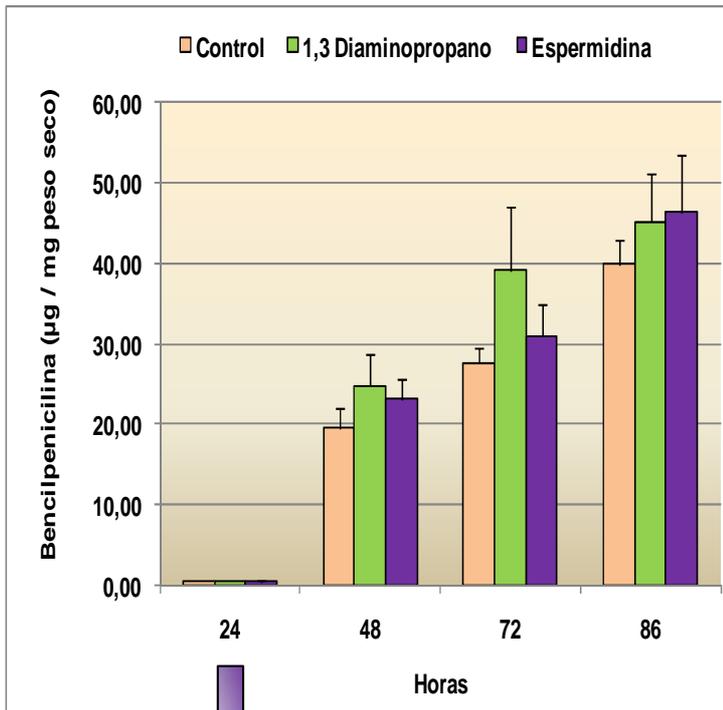


Figura 3.2.33: Producción específica de bencilpenicilina de las fermentaciones control y de las fermentaciones suplementadas con las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina. La gráfica inferior corresponde a la producción a las 24 horas (con un cambio de escala del eje de las ordenadas para facilitar su visualización).

5. Efecto de las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina sobre la producción de otros metabolitos secundarios en *P. chrysogenum*.

Para comprobar si las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina también inducían la producción de otros metabolitos secundarios en *P. chrysogenum*, se analizaron por cromatografía HPLC los caldos obtenidos en cultivos control y suplementados con poliaminas.

Los caldos filtrados obtenidos a las 48 y 72 horas de las diferentes fermentaciones realizadas con medio definido de producción con la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 fueron tratados con 4 volúmenes de cloroformo. Las fases acuosa y orgánica fueron separadas por centrifugación a 4800 rpm durante 10 minutos.

La fase acuosa obtenida fue extraída de nuevo con cloroformo. Las dos fracciones, acuosa y orgánica fueron evaporadas a sequedad en un rotavapor concentrador y posteriormente las muestras fueron disueltas en 1 ml de metanol.

Las muestras se analizaron en el HPLC siguiendo el método descrito en el apartado 8.3.2 de Materiales y Métodos, pero en este caso a unas longitudes de onda de 260 y 240 nm en lugar de 214 para diferenciar los picos cromatográficos correspondientes a la bencilpenicilina. Los resultados (Figuras 3.2.34 y 3.2.35) muestran diferencias en algunos metabolitos hidrofílicos e hidrofóbicos secretados al medio de cultivo.

En los cromatogramas de la fracción acuosa y orgánica se indican con flechas los metabolitos que varían entre los caldos tratados con las poliaminas, especialmente 1,3-diaminopropano y los controles.

Los resultados de los cromatogramas ponen de manifiesto que el compuesto 1,3-diaminopropano actúa incrementando la formación de otros metabolitos observables tanto en la fracción acuosa como en la orgánica, siendo la diferencia más notoria a las 72 horas de fermentación.

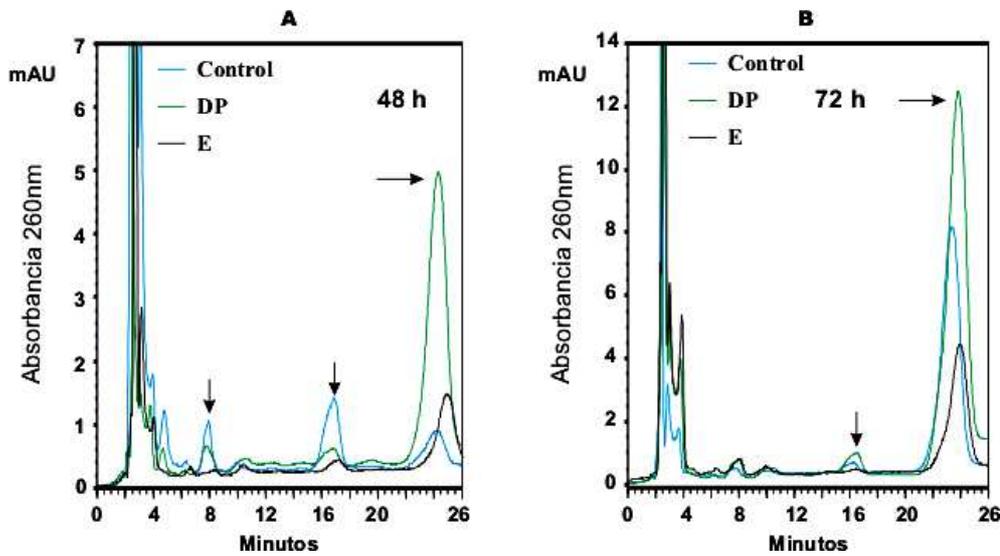


Figura 3.2.34: **A.** Análisis mediante HPLC de los metabolitos secretados procedentes de la fracción acuosa obtenida de muestras extraídas a las 48 horas de fermentación. Las flechas indican las diferencias entre los distintos caldos. **B.** Análisis mediante HPLC de los metabolitos secretados procedentes de la fracción acuosa obtenida de muestras extraídas a las 72 horas de fermentación. Las flechas indican las diferencias entre los distintos caldos.

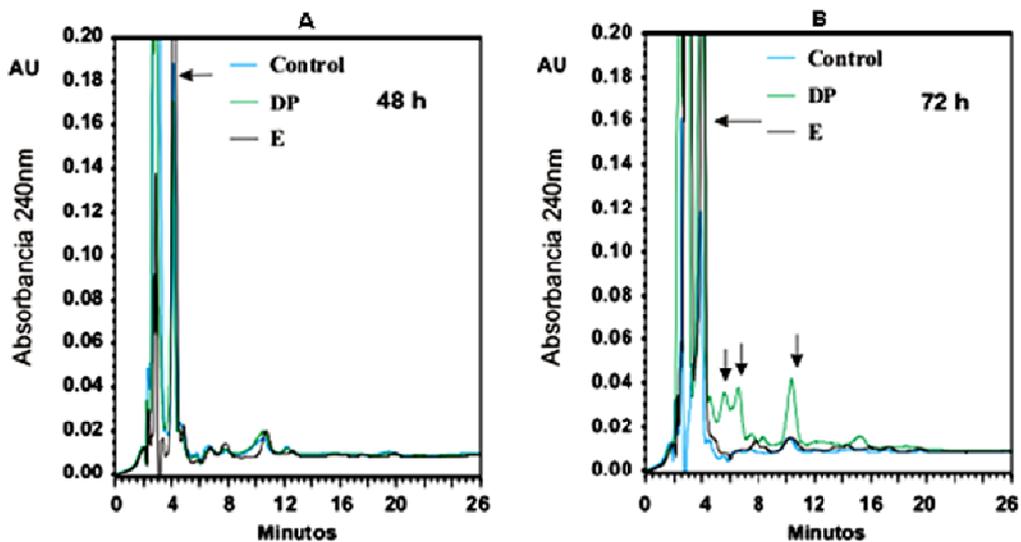


Figura 3.2.35: **A.** Análisis mediante HPLC de los metabolitos secretados procedentes de la fracción orgánica obtenida de muestras extraídas a las 48 horas de fermentación. Las flechas indican las diferencias entre los distintos caldos. **B.** Análisis mediante HPLC de los metabolitos secretados procedentes de la fracción orgánica obtenida de muestras extraídas a las 72 horas de fermentación. Las flechas indican las diferencias entre los distintos caldos.

CAPÍTULO 3

EFFECTO DE LAS POLIAMINAS SOBRE EL PROTEOMA DE *P. chrysogenum*.

OBJETIVOS CAPÍTULO 3:

- Efecto de la poliamina 1,3-diaminopropano sobre el proteoma intracelular de *P. chrysogenum*.
- Efecto de la poliamina espermidina sobre el proteoma intracelular de *P. chrysogenum*.

1. Efecto de la poliamina 1,3-diaminopropano sobre el proteoma intracelular de *P. chrysogenum*.

Con el fin de proporcionar una visión global acerca de los mecanismos biológicos que son inducidos por el compuesto 1,3-diaminopropano, se llevaron a cabo estudios de proteómica, (apartado 15.1 de Materiales y Métodos) a partir de muestras de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cultivadas en presencia y ausencia de este compuesto a una concentración 5 mM como se describió en el apartado 1.1 del Capítulo 2. Las proteínas intracelulares se extrajeron (apartado 15.2 de Materiales y Métodos) y analizaron mediante electroforesis bidimensional (2-DE); isoelectroenfoque (primera dimensión) y electroforesis en geles de poliacrilamida (segunda dimensión).

En el isoelectroenfoque las proteínas se separaron en base a su punto isoeléctrico en gradientes de pH inmovilizados (IPGs). En este caso, el enfocamiento isoeléctrico fue desarrollado con tiras de gradientes de pH inmovilizados (IPG) de 18 cm, con un rango de pH 3-10 no lineal (GE Healthcare), (apartado 15.3 de Materiales y Métodos).

Para la segunda dimensión, las tiras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5 % utilizando el equipo Ettan Dalt Six (GE Healthcare) con una potencia de corriente de 3 Vatios/gel durante 45 minutos seguido de una potencia de corriente de 18 Vatios/gel durante 4 horas. Se utilizaron patrones estándar de proteínas de concentración conocida (Bio-Rad) como marcadores de peso molecular (apartado 15.3 de Materiales y Métodos).

Posteriormente, se realizó una identificación proteica por espectrometría de masas MALDI-TOF y MS/MS en tándem (apartado 15.5 de Materiales y Métodos).

Los geles obtenidos con ambas condiciones se compararon entre sí (Figura 3.3.1), mostrando que la intensidad de 40 manchas o “spots” (que incluyen 46 proteínas) estaba aumentada y la intensidad de 27 manchas (que incluyen 34 proteínas) estaba disminuida tras la adición del compuesto 1,3-diaminopropano a los medios de cultivo (Figura 3.3.2). Las proteínas que están presentes en esas manchas se agruparon en categorías funcionales (Tablas 3.3.1 y 3.3.2). Tanto las Tablas 3.3.1 y 3.3.2 como una ampliación de la Figura 3.3.1, se encuentran en el apartado de anexos. Los resultados principales se resumen a continuación.

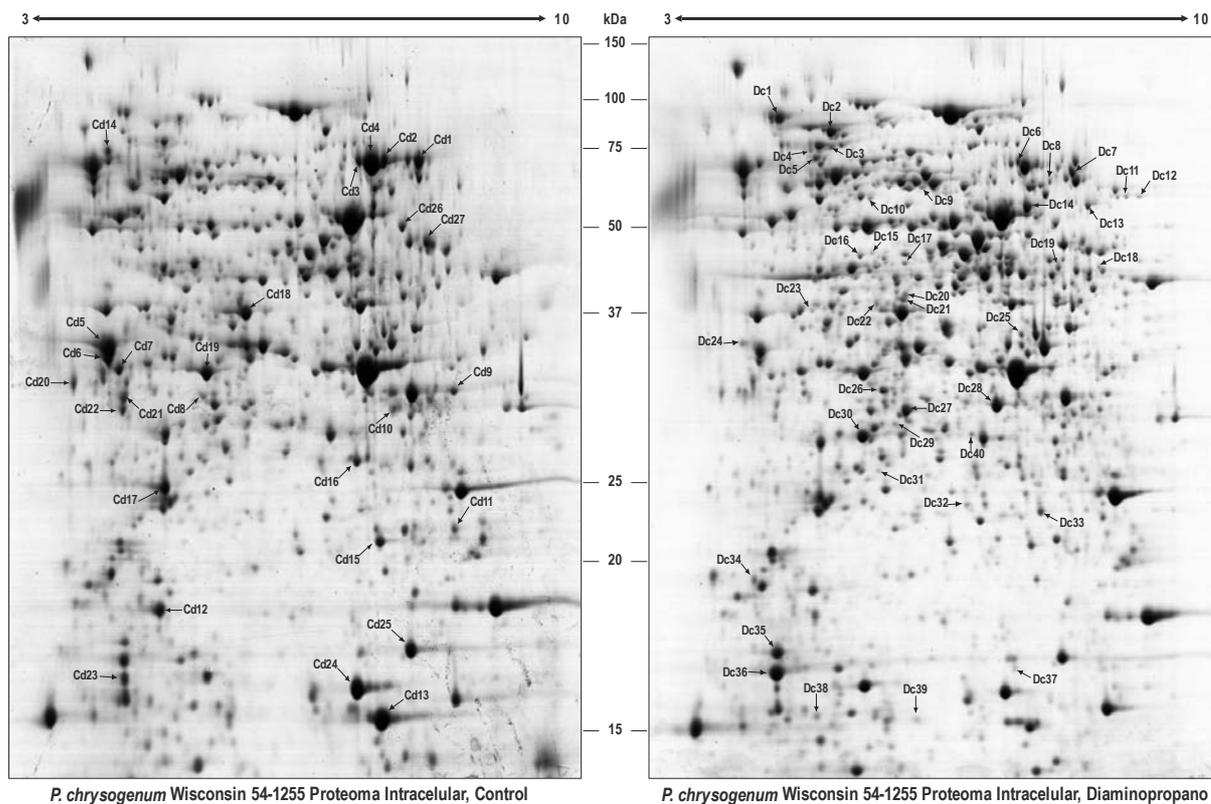


Figura 3.3.1: Comparación de los proteomas intracelulares de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con y sin la adición de 1,3-diaminopropano. Geles 2-DE de los proteomas intracelulares de la cepa Wisconsin 54-1255 crecida durante 40 horas en ausencia (control) o presencia del compuesto 1,3-diaminopropano. Las proteínas se separaron mediante 2-DE usando tiras IPG de 18-cm (pH 3-10 NL) y geles de SDS-PAGE del 12.5 % y se tiñeron con Coomassie coloidal siguiendo el método de tinción "Blue Silver". Las manchas cuya intensidad se vio disminuida tras la adición de esta poliamina se designaron como "Cd", mientras que aquellas manchas cuya intensidad aumentó tras añadir el 1,3-diaminopropano, se identificaron como "Dc". A todas las manchas se les añadió un número identificativo, que se corresponde con el mostrado en las Tablas 3.3.1. y 3.3.2.

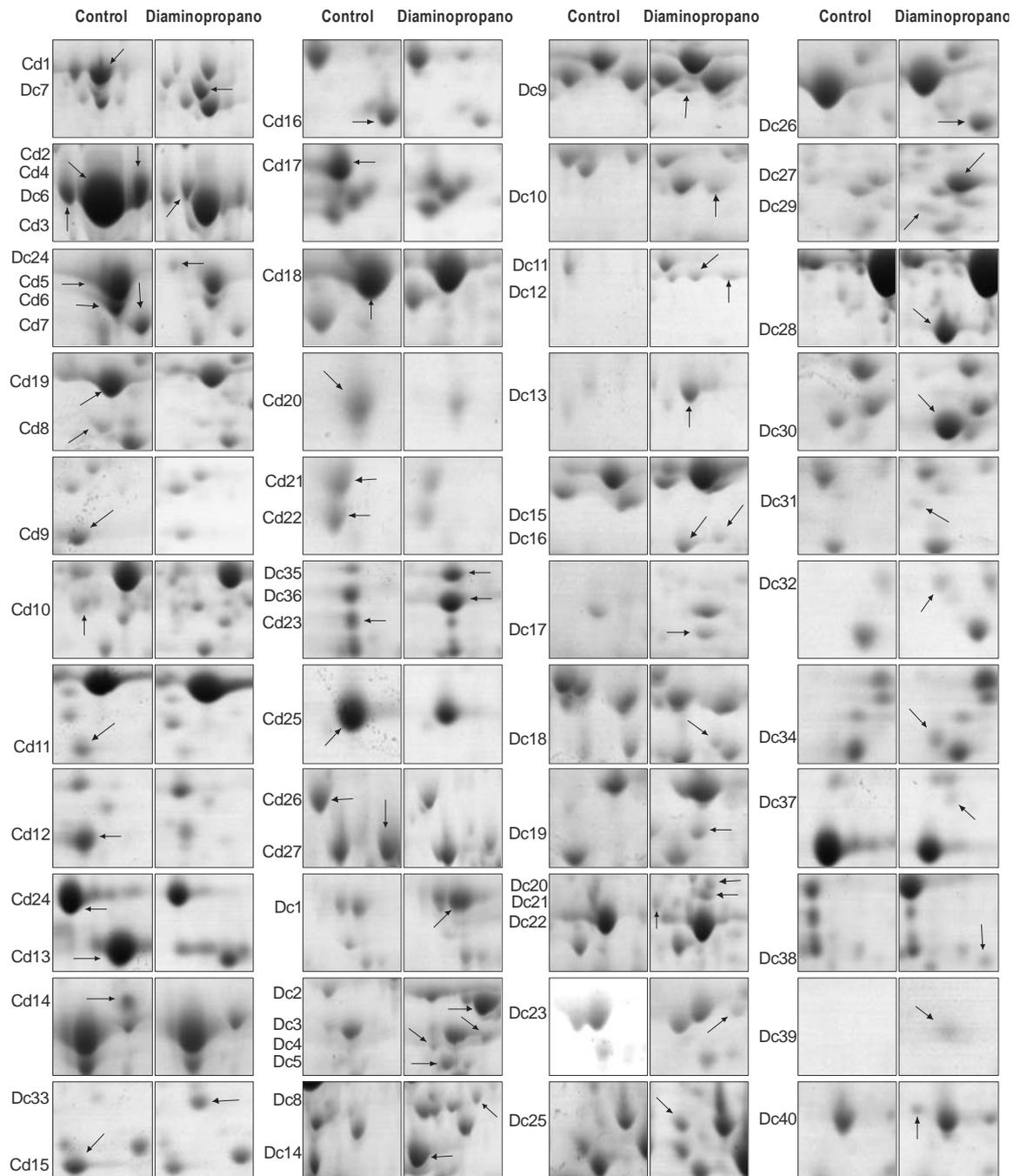


Figura 3.3.2: Imagen aumentada de las manchas cuya intensidad se vio modificada tras la adición de 1,3-diaminopropano. Los fragmentos de los geles mostrados en la Figura 3.3.1 se amplificaron para una mejor observación de las diferencias. Las manchas cuya intensidad se vio disminuida tras la adición de esta poliamina se designaron como "Cd", mientras que aquellas manchas cuya intensidad aumentó tras añadir 1,3-diaminopropano, se identificaron como "Dc". A todas las manchas se les añadió un número identificativo, que se corresponde con el mostrado en las Tablas 3.3.1. y 3.3.2.

1.1. Metabolismo y energía.

Dos proteínas cuya síntesis está aumentada tras la adición del 1,3-diaminopropano son especialmente relevantes. La primera de ellas es la acil-coenzima A: isopenicilina N aciltransferasa (IAT) (mancha Dc40), la cual está implicada en la última etapa de la biosíntesis de penicilina. Una de las isoformas de esta proteína sólo se detecta en presencia del inductor (ver Discusión), correlacionándose bien este resultado con el incremento que se observó previamente en los títulos de penicilina tras la adición del 1,3-diaminopropano a los medios de cultivo (Figura 3.2.2 y Figura 3.2.3 del Capítulo 2). La segunda proteína de especial relevancia es una probable espermidina sintasa Spe3 (mancha Dc26), cuya síntesis está aumentada 3,28 veces en presencia del 1,3-diaminopropano. Como se ha indicado anteriormente, el 1,3-diaminopropano es un subproducto de la degradación de espermidina en muchos microorganismos (ver Discusión).

Otra enzima interesante que se detecta solamente bajo estas condiciones es una probable UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa Ugp1 (mancha Dc8). Esta enzima, conocida también como UDP-glucosa pirofosforilasa, cataliza la interconversión de MgUTP + glucosa-1-fosfato y UDP-glucosa + MgPPi y además de su papel en la glicogénesis, se ha sugerido que es esencial para que se complete el desarrollo de la ameba *Dictyostelium discoideum* (Sussman y Osborn, 1964; Dimond y col., 1976; Ragheb y Dottin, 1987). También es digno de mención el aumento (6,10 veces) de una probable proteína de utilización de sorbitol Sou2 (mancha Dc30) en presencia de 1,3-diaminopropano.

Tras la adición del 1,3-diaminopropano a los medios de cultivo, la biosíntesis de acetil-CoA parece verse favorecida. Este compuesto es esencial para el equilibrio entre el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Los mecanismos para la producción de acetil-CoA están representados por una probable ATP citrato liasa ACL1 (manchas Dc18 y Dc19, sólo detectadas bajo estas condiciones), la cual está implicada en la biosíntesis de acetil-CoA en el citoplasma y un probable precursor de la dihidrolipoamida deshidrogenasa Lpd1 (mancha Dc14, aumentado 2,05 veces), que es el componente E3 del complejo piruvato deshidrogenasa catalizador de la conversión oxidativa de piruvato en acetil-CoA en las mitocondrias. La producción de ATP también está favorecida por el 1,3-diaminopropano, ya que sólo se detectan bajo estas condiciones dos isoformas de la subunidad alfa de una probable F1-ATPasa mitocondrial ATP1 (manchas Dc11 y Dc12). El complejo ATP sintasa utiliza fuerza protón motriz para generar ATP a partir de ADP y Pi (Boyer, 1997) y su estructura está altamente conservada entre diversos

organismos. Ésta consiste en dos componentes principales, el complejo F1 soluble (incluye el núcleo catalítico) y el complejo unido a la membrana F0 (Devenish y col., 2000). Se ha observado que aunque ATP1 es esencial para la función ATP sintasa, no es esencial para la vida en levaduras y la delección del gen que codifica ATP1 provoca un fenotipo "*petite*" de crecimiento lento e incapaz de sobrevivir en fuentes de carbono no fermentables (Takeda y col., 1986).

También es interesante resaltar que se detectan cuatro isoformas de una hipotética aldehído deshidrogenasa tras la inducción con 1,3-diaminopropano (manchas Dc17, Dc20, Dc21 y Dc22). Esta enzima muestra una alta similitud con aldehído deshidrogenasas de diferentes ascomicetos (p ej. 95 % similitud y 87 % identidad con la proteína ALD3 de *Neosartorya fischeri*). Se ha descrito que los genes que codifican las proteínas ALD2 y ALD3 son necesarios para la biosíntesis de β -alanina (ácido 3-aminopropiónico) en *S. cerevisiae* (White y col., 2003). En relación con estos resultados está el aumento (2,75 veces) de una probable 4-aminobutirato transaminasa (mancha Dc13). Ésta, está implicada en la conversión de 4-aminobutanoato (GABA) + 2-oxoglutarato a succinato semialdehído + L-glutamato que participa en el metabolismo de β -alanina (ver Discusión).

El metabolismo de las purinas también está aumentado tras la adición de 1,3-diaminopropano. La intensidad de una probable IMP deshidrogenasa IMH3 (mancha Dc7), la cual está implicada en la biosíntesis *de novo* de GMP, está aumentada 3,46 veces. Relacionado con este resultado está el hecho de que sólo se detecten bajo estas condiciones una proteína similar a una purina sintasa bifuncional (mancha Dc23) y una adenilil sulfato kinasa AAA81521 (mancha Dc40), que además de su papel en la biosíntesis de ADP, también participa en el metabolismo de selenoaminoácidos y en el metabolismo de azufre catalizando la síntesis de sulfato activado.

El catabolismo de leucina es predominante tras la inducción, ya que se detectan bajo estas condiciones una probable 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (mancha Dc6) y una proteína similar a una isovaleril-coenzima A deshidrogenasa (mancha Dc16), ambas implicadas en la cuarta y tercera etapas, respectivamente, de la degradación de leucina.

Como se ha estado viendo hasta el momento, el 1,3-diaminopropano parece incrementar la biosíntesis de varias proteínas relacionadas con la categoría de metabolismo y energía. Sin embargo, algunas proteínas de esta categoría también sufren una disminución en su síntesis, la cual está en el rango de 2 veces. Algunos ejemplos los constituyen una probable isocitrato liasa

implicada en la biosíntesis de carbohidratos a partir de ácidos grasos (mancha Cd1), la subunidad T de una probable glicina descarboxilasa (mancha Cd26) requerida para el catabolismo de glicina y su conversión en 5,10-metileno-tetrahidrofolato, o una probable metilcitrato sintasa (mancha Cd27), la cual está implicada en la oxidación de propionato a piruvato a través del ciclo del metilcitrato.

1.2. Proteínas de rutas de información.

Algunas proteínas diferencialmente representadas tras la adición de 1,3-diaminopropano están involucradas en mecanismos de destino proteico (ver Discusión). El tratamiento con 1,3-diaminopropano induce la síntesis de tres isoformas de una probable chaperona molecular de tipo dnaK Ssb2 (manchas Dc3, Dc4 y Dc5), un probable inhibidor de la disociación de GDP en la ruta secretora Gdi1 (mancha Dc10), el cual desempeña una función esencial en el tráfico a través de las membranas y en el reciclado de proteínas de la familia Sec4/Ypt/rab desde sus membranas de destino hacia las vesículas de almacenamiento (Garrett y col., 1994) y una isoforma de una probable subunidad Ens1 de la endonucleasa Scel-75 kDa (mancha Dc2), la cual es una versión mitocondrial de la proteína de choque térmico de 70 kDa (Morishima y col., 1990). Aunque el 1,3-diaminopropano induce la biosíntesis de esas chaperonas, este compuesto parece ejercer un efecto más marcado que lleva a la reducción en la síntesis de varias chaperonas y “foldasas”, tales como una probable proteína de choque térmico HSP70 (manchas Cd5, Cd6, Cd21 y Cd21), la calreticulina y una probable proteína disulfuro isomerasa A (PdiA) (ambas localizadas en la mancha Cd14 y sólo detectables sin 1,3-diaminopropano), una probable chaperona molecular de tipo dnaK BiPA (mancha Cd20, 2,10 veces disminuida), otra isoforma de una probable subunidad Ens1 de la endonucleasa Scel-75 kDa (mancha Cd7, 3,44 veces disminuida) y una probable ciclofilina B (mancha Cd25, 2,03 veces disminuida), que está implicada en el plegamiento de proteínas recién sintetizadas.

Una proteína interesante cuya síntesis está aumentada tras la adición del 1,3-diaminopropano es una probable proteína Mpt4 supresora de tom1. Esta proteína, localizada en las manchas Dc32 (sólo detectada bajo estas condiciones) y Dc33 (4,30 veces aumentada), está asociada a los ribosomas en *S. cerevisiae* y es necesaria para una óptima traducción bajo condiciones de estrés nutricional (van Dyke y col., 2006). Relacionado con este resultado está el hecho de que un probable factor de elongación 1beta EF-1 sólo se detecte bajo estas condiciones (mancha Dc24). Un probable complejo alfa-NAC (mancha Dc36), el cual funciona como coactivador transcripcional (Yotov y col., 1998), se encuentra 2,64 veces aumentado bajo

estas condiciones, Sin embargo, el 1,3-diaminopropano también disminuye la biosíntesis de proteínas relacionadas con la síntesis proteica, tales como un probable factor de elongación 1-gamma 1 Tef3 (mancha Cd17).

1.3. Transporte celular y rutas de transporte.

La adición de 1,3-diaminopropano parece incrementar la generación de gradiente de protones a través de las membranas, ya que sólo se detectan bajo estas condiciones dos subunidades de la ATPasa vacuolar transportadora de protones (manchas Dc3 y Dc9). Las ATPasas vacuolares acidifican varios orgánulos intracelulares y bombean los protones a través de las membranas plasmáticas de numerosos tipos de células (ver Discusión).

Por el contrario, este compuesto disminuye la síntesis de una probable ciclofilina CypD (mancha Cd17). Esta proteína juega un papel importante en la permeabilidad mitocondrial, en la cual, los poros se abren, conduciendo a la muerte celular en mamíferos (Lin y Lechleiter, 2002; Baines y col., 2005).

1.4. Proteínas de respuesta a estímulos.

Dos de las proteínas cuya intensidad se ve aumentada por efecto del 1,3-diaminopropano están involucradas en el mantenimiento del equilibrio redox celular. La intensidad de una proteína similar a una peroxirredoxina tipo 2 está aumentada 3,24 veces (mancha Dc35), mientras que una probable glutatión reductasa Glr1 sólo se detecta bajo estas condiciones en la mancha Dc8. Se ha visto que la síntesis de esta última proteína también se encuentra incrementada en la cepa de alta producción de penicilina AS-P-78 (Jami y col., 2010). Otro resultado interesante está presente en la mancha Dc10, la cual, sólo se detecta tras la adición de 1,3-diaminopropano e incluye una probable colina sulfatasa BetC. Esta proteína está implicada en la conversión de colina-O-sulfato y, en menor medida, fosforilcolina, en colina. La colina es el precursor de la glicina betaína, que es un potente osmoprotector acumulado por *Sinorhizobium meliloti* para combatir el estrés osmótico (Osteras y col., 1998).

Entre las proteínas que encuentran disminuida su síntesis tras la adición de 1,3-diaminopropano, es llamativo que dos de ellas pertenezcan a la ruta del homogentisato, una ruta empleada para la degradación de ácido fenilacético, que es el precursor de la cadena lateral de la bencilpenicilina (ver Discusión). La primera posee tres isoformas y es una probable fumarilacetoacetasa (manchas Cd8, Cd12 y Cd19). Esta enzima cataliza la hidrólisis del enlace

carbono-carbono en el fumarilacetoacetato para dar lugar a fumarato y acetoacetato en la etapa final de la degradación de fenilalanina y tirosina (Bateman y col., 2001). La otra enzima, implicada en la penúltima etapa de la ruta del homogentisato, es una probable maleilacetoacetato isomerasa, cuya intensidad está disminuida 2,73 veces (mancha Cd16). También es digno de mención que la intensidad de tres isoformas de una probable acetil-CoA hidrolasa Ach1 (manchas Cd2, Cd3 and Cd4) se encuentre incrementada tras la inducción con 1,3-diaminopropano. Esta proteína está involucrada en la detoxificación mitocondrial de acetato mediante la transferencia de un CoASH desde succinil-CoA a acetato conservando energía en vez de realizar la hidrólisis de acetil-CoA, que es un paso que consume energía (Fleck y Brock, 2009).

1.5. Proteínas de los procesos del desarrollo fúngico.

El 1,3-diaminopropano parece que induce la síntesis de proteínas implicadas en la biosíntesis de la pared celular fúngica y en el mantenimiento del citoesqueleto (ver Discusión). Una probable beta (1-3) glucanosiltransferasa Gel3 anclada a glicosilfosfatidilinositol se encuentra incrementada 3,51 veces en la mancha Dc1. Por otro lado, la gamma-actina sólo se detecta tras la adición de 1,3-diaminopropano (mancha Dc15). La actina es una proteína implicada en procesos cruciales para la célula, tales como la movilidad, la regulación del crecimiento celular y diferenciación, los procesos de endo y exocitosis y el mantenimiento de la estabilidad estructural (Sheterline y col., 1995).

1.6. Otras proteínas.

La mancha Dc28, que incluye una proteína hipotética Ta1372, muestra una alta intensidad y sólo se detecta tras la inducción con 1,3-diaminopropano. Esta proteína también está presente en la mancha Dc29 y su función es desconocida. También es interesante recalcar que la biosíntesis del alérgeno específico de 16-kDa de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 se encuentra aumentada 2,64 veces tras la inducción. La intensidad de algunas proteínas de función desconocida se aumenta o disminuye al añadir 1,3-diaminopropano y su papel e implicación en la producción de penicilina requerirá una caracterización posterior.

2. Efecto de la poliamina espermidina sobre el proteoma intracelular de *P. chrysogenum*.

Debido a que los niveles de la espermidina sintasa se incrementaron tras la adición del compuesto 1,3-diaminopropano a los medios de cultivo y a que la espermidina proporcionó un efecto similar al 1,3-diaminopropano en términos de producción de penicilina y tasa de crecimiento (ver Figuras 3.2.13 A, B, C, D, del Capítulo 2), se llevaron a cabo estudios de proteómica para evaluar los mecanismos biológicos inducidos por la espermidina (apartado 15.1 de Materiales y Métodos). Para ello se realizaron cultivos de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 en presencia y ausencia de esta poliamina a una concentración 5 mM.

Las proteínas intracelulares se extrajeron (apartado 15.2 de Materiales y Métodos) y analizaron mediante electroforesis bidimensional (2-DE); isoelectroenfoque (primera dimensión) y electroforesis en geles de poliacrilamida (segunda dimensión).

En el isoelectroenfoque las proteínas se separaron en base a su punto isoeléctrico en gradientes de pH inmovilizados (IPGs). En este caso, el enfocamiento isoeléctrico fue desarrollado con tiras de gradientes de pH inmovilizados (IPG) de 18 cm, con un rango de pH 3-10 no lineal (GE Healthcare), (apartado 15.3 de Materiales y Métodos).

Para la segunda dimensión, las tiras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5 % utilizando el equipo Ettan Dalt Six (GE Healthcare) con una potencia de corriente de 3 Vatios/gel durante 45 minutos seguido de una potencia de corriente de 18 Vatios/gel durante 4 horas. Se utilizaron patrones estándar de proteínas de concentración conocida (Bio-Rad) como marcadores de peso molecular (apartado 15.3 de Materiales y Métodos).

Posteriormente, se realizó una identificación proteica por espectrometría de masas MALDI-TOF y MS/MS en tándem (apartado 15.5 de Materiales y Métodos).

Los geles obtenidos para ambas condiciones se compararon entre sí (Figura 3.3.3), mostrando que la intensidad de 53 manchas (que incluyen 62 proteínas) estaba aumentada y la intensidad de 35 manchas (que incluyen 40 proteínas) estaba disminuida tras la adición de espermidina (Figura 3.3.4). Las proteínas que están presentes en esas manchas se agruparon en categorías funcionales (Tablas 3.3.3 y 3.3.4). Algunas proteínas cuya síntesis se vio

modificada tras la inducción con espermidina coinciden con las proteínas cuya intensidad se modificó tras la inducción con 1,3-diaminopropano y están indicadas en la Tabla 3.3.5. Tanto las Tablas 3.3.3, 3.3.4 y 3.3.5 como una ampliación de la Figura 3.3.3, se encuentran en el apartado de anexos. Los resultados principales se resumen a continuación.

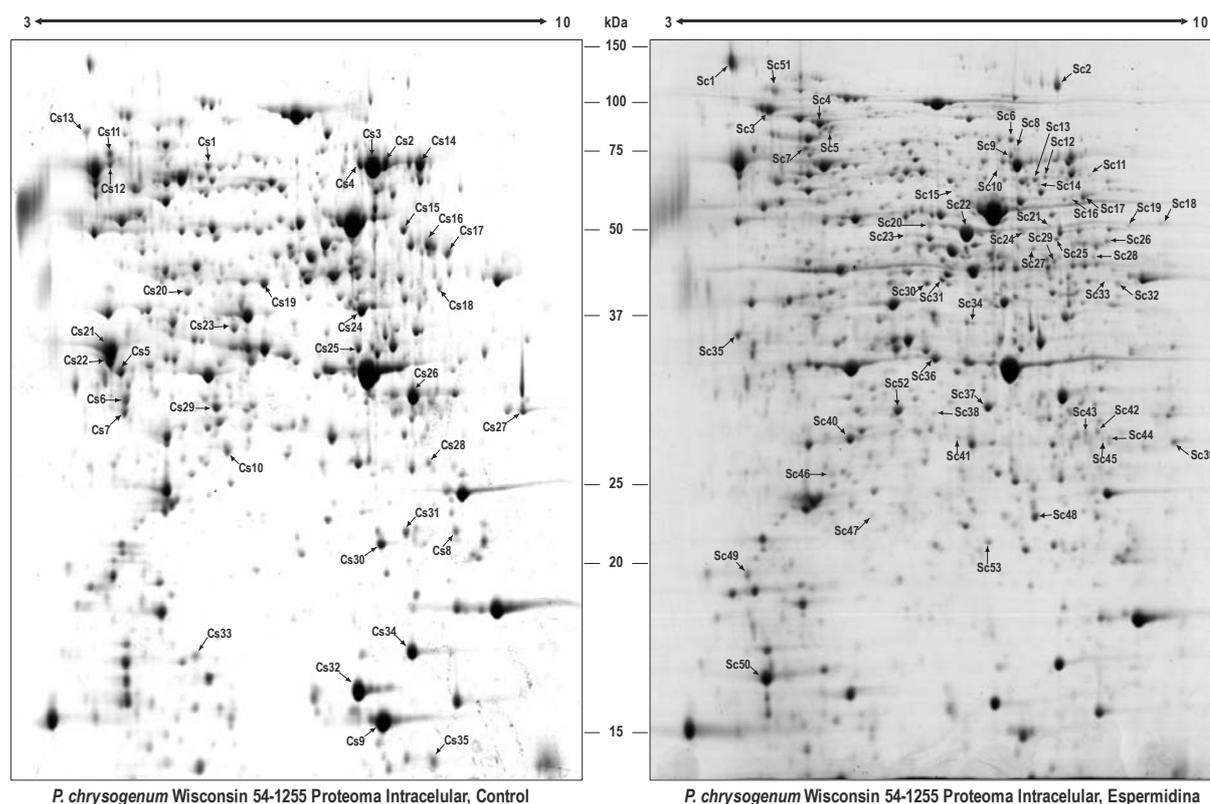


Figura 3.3.3: Comparación de los proteomas intracelulares de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con y sin la adición de espermidina. Geles 2-DE de los proteomas intracelulares de la cepa Wisconsin 54-1255 crecida durante 40 horas en ausencia (control) o presencia de espermidina. Las proteínas se separaron mediante 2-DE usando tiras IPG de 18-cm (pH 3-10 NL) y geles de SDS-PAGE del 12.5 % y se tiñeron con Coomassie coloidal siguiendo el método de tinción "Blue Silver". Las manchas cuya intensidad se vio disminuida tras la adición de esta poliamina se designaron como "Cs", mientras que aquellas manchas cuya intensidad aumentó tras añadir espermidina, se identificaron como "Sc". A todas las manchas se les añadió un número identificativo, que se corresponde con el mostrado en las Tablas 3.3.3. y 3.3.4.

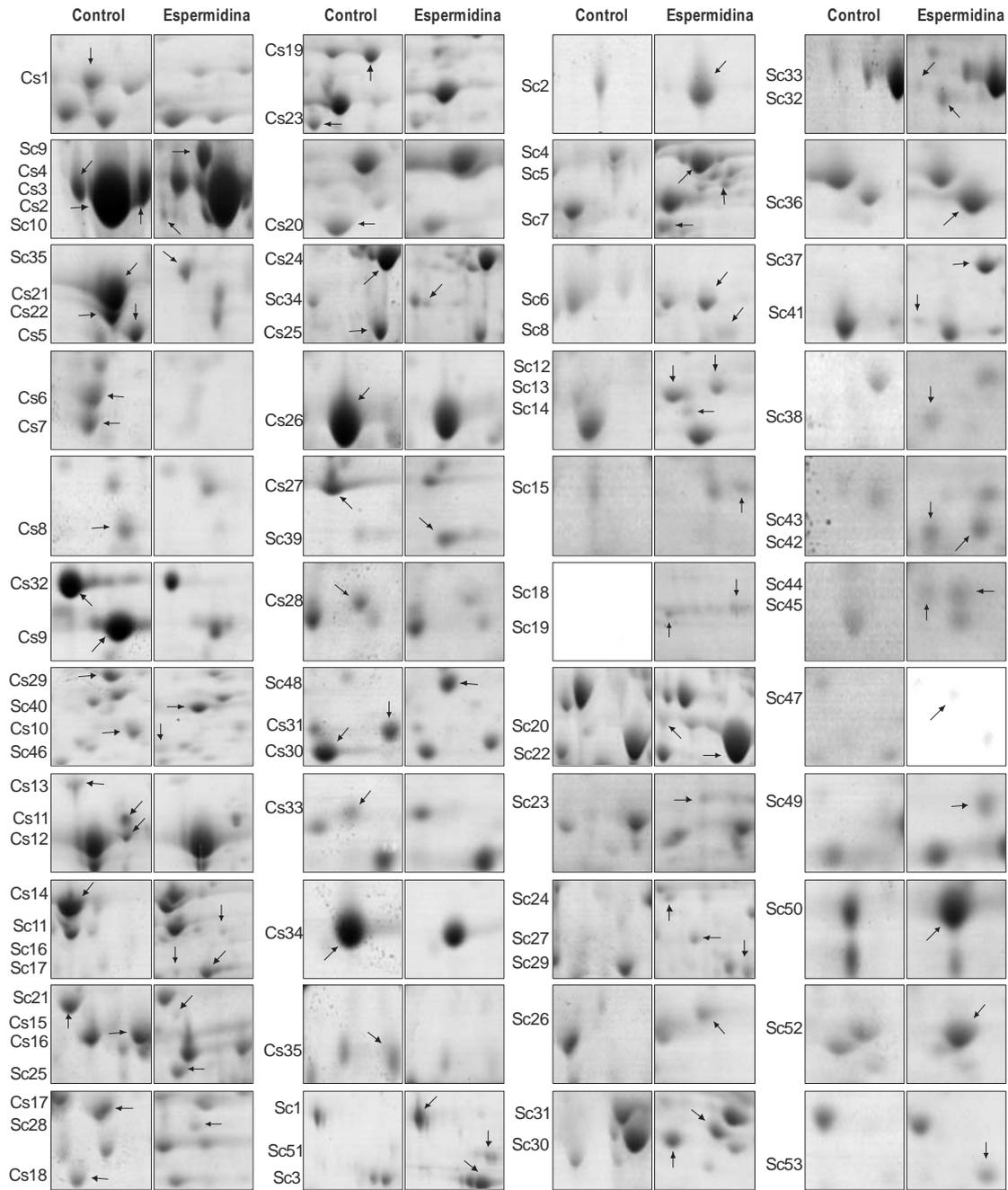


Figura 3.3.4: Imagen aumentada de las manchas cuya intensidad se vio modificada tras la adición de espermidina. Los fragmentos de los geles mostrados en la Figura 3.3.3 se aumentaron para una mejor observación de las diferencias. Las manchas cuya intensidad se vio disminuida tras la adición de esta poliamina se designaron como "Cs", mientras que aquellas manchas cuya intensidad aumentó tras añadir espermidina, se identificaron como "Sc". A todas las manchas se les añadió un número identificativo, que se corresponde con el mostrado en las Tablas 3.3.3. y 3.3.4.

2.1. Metabolismo y energía.

El resultado más relevante encontrado en esta categoría es que una de las isoformas de la IAT, que está implicada en la última etapa de la biosíntesis de penicilina, sólo se detecte tras la adición de espermidina a los medios de cultivo (mancha Sc41). Esta isoforma (Figura 3.3.5.) también se vio inducida tras la adición de 1,3-diaminopropano (ver Discusión). Este resultado se correlaciona bien con el incremento que se observó previamente en los títulos de penicilina tras la adición de espermidina (Figuras 3.2.13 B y C del Capítulo 2).

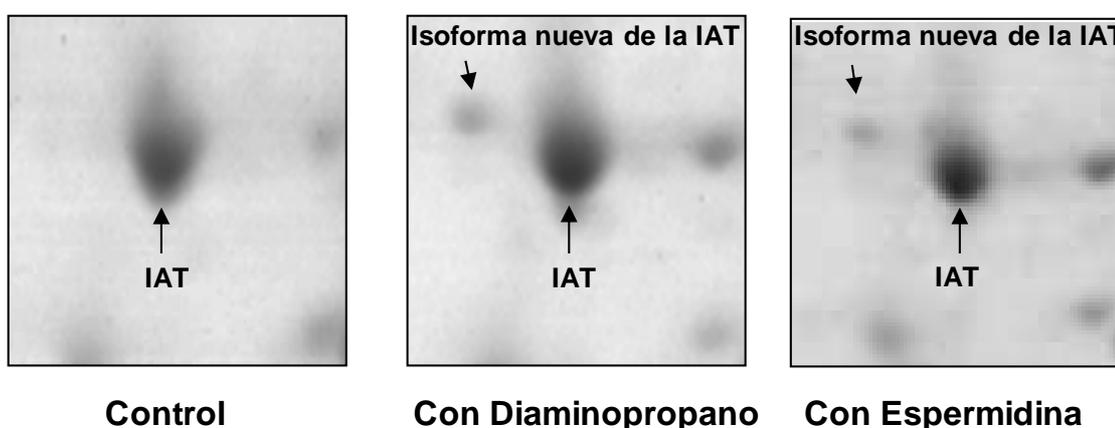


Figura 3.3.5: Imagen aumentada de las regiones de los geles 2-DE donde se encuentra la IAT. Los fragmentos de los geles mostrados en las Figuras 3.3.1 y 3.3.3 donde se encuentra la IAT se aumentaron para ver mejor la aparición de una nueva isoforma de esa proteína tras la adición de 1,3-diaminopropano y espermidina.

Otro resultado interesante es que dos proteínas que juegan un papel importante en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos sólo se detecten tras la inducción con espermidina. La primera enzima es una probable fosfogluconato deshidrogenasa Gnd1 (mancha Sc20), la cual cataliza una reacción de regeneración de NADPH en la ruta de las pentosas fosfato. La segunda proteína es una probable tiamina-fosfato pirofosforilasa/hidroxietiltiazol kinasa (mancha Sc15) (ver Discusión).

Del mismo modo que con el 1,3-diaminopropano, se detecta solamente tras la adición de espermidina una probable UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa Ugp1 (mancha Sc12). Esta enzima está implicada en la glicogénesis y se ha sugerido que es esencial para que se complete el desarrollo de la ameba *D. discoideum* (Sussman y Osborn, 1964; Diamond y col., 1976;

Ragheb y Dottin, 1987). También se vio incrementada la síntesis de una probable proteína de utilización de sorbitol Sou2 (mancha Sc40), tal y como se observó con el 1,3-diaminopropano.

La biosíntesis de acetil-CoA parece que se ve favorecida tras la adición de espermidina. En este caso, la principal ruta para la producción de acetil-CoA está representada por dos isoformas de una probable ATP citrato liasa ACL1 (manchas Sc28 y Sc29, los cuales sólo se detectan bajo estas condiciones), que también estaban inducidas por el 1,3-diaminopropano, y por una probable subunidad alfa E1 del complejo de la piruvato deshidrogenasa Pda1 (mancha Sc23).

La presencia de tres isoformas de una probable fumarato reductasa citoplasmática soluble, que convierte fumarato en succinato, se detecta solamente tras la inducción con espermidina (manchas Sc42, Sc43 y Sc45) y podría indicar un cambio en el metabolismo, ya que se ha descrito que la fumarato reductasa es importante para el metabolismo microbiano formando parte de la respiración anaeróbica (Iverson y col., 1999).

Dos proteínas alcohol deshidrogenasas diferentes se detectan solamente tras la adición de espermidina. La primera es una probable alcohol deshidrogenasa AlkJ (mancha Sc11), que convierte alcoholes primarios producidos por el sistema de utilización de alcanos de *Pseudomonas oleovorans* (el sistema bacteriano más ampliamente caracterizado para la oxidación de alcanos en el rango de C5 a C12) en aldehídos (Eggink y col., 1987; van Beilen y col., 2001). La segunda proteína es una probable alcohol deshidrogenasa (NADP⁺) ALR (mancha Sc34), la cual cataliza la reducción dependiente de NADPH de una variedad de aldehídos aromáticos y alifáticos a sus correspondientes alcoholes. Cataliza la reducción de mevaldato a ácido mevalónico y de gliceraldehído a glicerol y juega un papel importante en la activación de procarcinógenos, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos *trans*-dihidrodióles y en el metabolismo de varios xenobióticos y drogas, incluyendo las antraciclinas doxorubicina y daunorubicina (Palackal y col., 2001; Bains y col., 2008).

Varias enzimas implicadas en el metabolismo lipídico también están inducidas por espermidina, como una probable triacilglicerol lipasa (4,50 veces aumentada su intensidad, mancha Sc2), una proteína similar a una acil-CoA deshidrogenasa (sólo detectada bajo estas condiciones en la mancha Sc18), dos isoformas de una probable acetil-CoA C-aciltransferasa POT1 peroxisomal (sólo detectada bajo estas condiciones en las manchas Sc25 y Sc26) o una

probable proteína trifuncional de la beta-oxidación fox-2 (sólo detectada bajo estas condiciones en la mancha Sc33).

En relación con la biosíntesis de β -alanina, se encontró que la síntesis de dos isoformas de una probable 4-aminobutirato transaminasa está 4,47 veces aumentada (mancha Sc17). También se encontró otra isoforma de esta proteína en la mancha Sc16 (sólo detectada bajo estas condiciones) tras la adición de espermidina (ver Discusión). Esta proteína, que se requiere para la tolerancia al estrés oxidativo y la utilización de nitrógeno (Ramos y col., 1985; Coleman y col., 2001), también se encontró aumentada en presencia del 1,3-diaminopropano.

Tal y como se indicó para el 1,3-diaminopropano, el metabolismo de purinas también se ve favorecido tras la adición de espermidina. Una probable guanilato kinasa Guk1 (mancha Sc48), la cual cataliza la fosforilación ATP-dependiente de GMP en GDP y es esencial para el reciclado de GMP e indirectamente, de GMPc (Stehle y Schulz, 1992), tiene aumentada su intensidad 5,74 veces. Correlacionado con este resultado está la identificación de una adenililsulfato kinasa en la mancha Sc41 (inducida también por 1,3-diaminopropano) y una adenilato kinasa Adk1, ambas requeridas para la biosíntesis de ADP y sólo detectadas bajo estas condiciones.

El catabolismo de leucina es predominante tras la adición de espermidina. Tal y como se observó con el 1,3-diaminopropano, una probable 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (mancha Sc9), que cataliza la cuarta etapa en la degradación de leucina, sólo se detecta bajo estas condiciones.

También es interesante la identificación de una probable ácido 5-aminolevulínico sintasa HemA (mancha Sc10), la cual sólo se detecta tras la adición de espermidina. Esta enzima cataliza la condensación dependiente de piridoxal fosfato de succinil-CoA y glicina para dar ácido 5-aminolevulínico, que es el primer compuesto de la ruta de biosíntesis de porfirinas. En relación con este resultado se encuentra el incremento en 2,56 veces de una probable coproporfinógeno oxidasa III Hem13 (mancha Sc31), la cual cataliza la sexta etapa del metabolismo de porfirinas (ver Discusión).

De un modo similar al 1,3-diaminopropano, pocas proteínas de esta categoría se vieron disminuidas tras la adición de espermidina, manteniéndose el descenso de la intensidad para la mayoría de ellas en un rango de 2 veces. Algunos ejemplos que siguen este patrón son una probable isocitrato liasa implicada en la biosíntesis de carbohidratos a partir de ácidos grasos

(mancha Cs14), la subunidad T de una probable glicina descarboxilasa (mancha Cs15) requerida para el catabolismo de glicina y su conversión en 5,10-metileno-tetrahidrofolato, o una probable metilcitrato sintasa (mancha Cs16), la cual está implicada en la oxidación de propionato a piruvato a través del ciclo del metilcitrato.

Un resultado llamativo es que la espermidina de lugar a un descenso de 2,21 veces en la síntesis de una cisteína sintasa (mancha Cs18), una enzima que forma cisteína a partir de serina (ver Discusión). Además de esta proteína, también se encuentran disminuidas en intensidad dos isoformas de una probable aconitato hidratasa mitocondrial Aco1 (manchas Cs1 y Cs28) y dos enzimas implicadas en la fosforilación oxidativa; la proteína I de una probable ubiquinol-citocromo-c reductasa beta-MPP (manchas Cs10), y una probable sulfuro deshidrogenasa mitocondrial (mancha Cs17).

2.2. Proteínas de rutas de información.

Algunas proteínas implicadas en mecanismos de destino proteico cuya intensidad está modificada tras la adición de espermidina, son las mismas cuya síntesis se vio modificada tras la adición de 1,3-diaminopropano (ver Discusión). El tratamiento con espermidina induce la síntesis de dos isoformas de una chaperona molecular de tipo dnaK Ssb2 (manchas Sc5 y Sc7) y de una isoforma de una probable subunidad Ens1 de la endonucleasa Scel-75 kDa (mancha Sc4), la cual es una versión mitocondrial de la proteína de choque térmico de 70-kDa (Morishima y col., 1990). Aunque la espermidina induce la síntesis de esas chaperonas, este compuesto parece ejercer un efecto más marcado que lleva a la reducción en la síntesis de varias chaperonas y “foldasas”. Este es el caso de una probable proteína de choque térmico HSP70 (disminuida su intensidad en las manchas Cs6, Cs7, Cs21 y Cs22), la calreticulina (mancha Cs11), una probable proteína disulfuro isomerasa A (PdiA) (manchas Cs11 y Cs12), otra isoforma de una probable subunidad Ens1 de la endonucleasa Scel-75 kDa (mancha Cs5) y la probable ciclofilina B (mancha Cs34, disminuida su intensidad 2,29 veces), la cual está implicada en el plegamiento de proteínas recién sintetizadas.

Tal y como se observó con el 1,3-diaminopropano, la adición de espermidina también induce la síntesis de una probable proteína Mpt4 supresora de tom1, la cual está presente en las manchas Sc39 (aumentada 7,63 veces) y Sc48 (aumentada 5,74 veces). Como se indicó anteriormente, esta proteína está asociada a los ribosomas en *S. cerevisiae* y es necesaria para una óptima traducción bajo condiciones de estrés nutricional (van Dyke y col., 2006). La síntesis

de un probable complejo alfa-NAC (mancha Sc50, aumentada su intensidad 3,1 veces), el cual funciona como coactivador transcripcional (Yotov y col., 1998) y la de un probable factor de elongación 1beta EF-1 (mancha Sc35, sólo detectado bajo estas condiciones) también se vio aumentada por el 1,3-diaminopropano.

Las proteínas que incrementaron su síntesis específicamente por la espermidina están implicadas en procesos de traducción, tales como un probable factor de la elongación de la traducción eEF-2 (mancha Sc36, 2,80 veces aumentado), o en la regulación de la función proteica. Algunos ejemplos de esto último los constituyen una probable cadena reguladora 12 del proteasoma 26S Rpn12 (mancha Sc30, sólo detectado tras la adición de espermidina) y una probable subunidad reguladora de la proteína kinasa dependiente de AMPc PkaR, (mancha Sc34, detectado únicamente bajo estas condiciones). Las proteínas específicamente disminuidas en su síntesis por la espermidina son el alérgeno Pen n 18 (una serina proteinasa vacuolar presente en la mancha Cs26 cuya síntesis disminuye 2,31 veces) o una probable enzima de conjugación con ubiquitina Ubc4 (mancha Cs33, sólo detectada sin espermidina), la cual media en la degradación selectiva de proteínas aberrantes y de vida corta (Seufert y Jentsch, 1990).

2.3. Proteínas de respuesta a estímulos.

Un resultado coincidente con el observado tras la adición del 1,3-diaminopropano es que una probable glutatión reductasa Glr1 se detecte solamente tras la adición de espermidina (mancha Sc14). Como se indicó anteriormente, la síntesis de esta proteína también se encuentra incrementada en la cepa de alta producción de penicilina AS-P-78 (Jami y col., 2010).

Sorprendentemente, se encontró aumentada la intensidad de dos isoformas de una probable fumarilacetoacetasa tras la adición de espermidina (manchas Sc19, sólo detectada bajo estas condiciones y Sc22, aumentada 3,35 veces), mientras que esta proteína fue afectada negativamente por el 1,3-diaminopropano. Esta enzima pertenece a la ruta del homogentisato y cataliza la hidrólisis del enlace carbono-carbono en el fumarilacetoacetato para dar lugar a fumarato y acetoacetato en la etapa final de la degradación de fenilalanina y tirosina (Bateman y col., 2001). En relación con este resultado está la presencia de dos isoformas de una probable 3,4-dihidroxifenilacetato 2,3-dioxigenasa HmgA en las manchas Sc16 y Sc30. Esta enzima, también conocida como homogentisato dioxigenasa, sólo se detecta tras la adición de espermidina y cataliza la conversión de 2,5-dihidroxifenilacetato en maleil acetoacetato a través de la ruta del homogentisato. Curiosamente, la intensidad de otra isoforma de esta misma

enzima se encuentra aumentada 2,1 veces al añadir espermidina (mancha Cs19). Por tanto, la ruta del homogentisato parece ser afectada en gran medida por la espermidina, tanto en forma positiva, como en forma negativa. Como se indicó con anterioridad, esta ruta se emplea para la degradación de ácido fenilacético, que es el precursor de la cadena lateral de la bencilpenicilina (ver Discusión). Otras proteínas cuya síntesis se vio disminuida tras la adición de espermidina son tres isoformas de una probable acetil-CoA hidrolasa Ach1 (manchas Cs2, Cs3 y Cs4). Este resultado también se obtuvo con el 1,3-diaminopropano y como se indicó anteriormente, esta proteína está involucrada en la destoxificación mitocondrial de acetato mediante la transferencia de un CoASH desde succinil-CoA a acetato conservando energía mediante la destoxificación de acetato mitocondrial en vez de realizar la hidrólisis de acetil-CoA, que es un paso que consume energía (Fleck y Brock, 2009). Además, también se encontraron dos probables superóxido dismutasas (manchas Cs31 y Cs32) cuya síntesis disminuye tras añadir espermidina.

2.4. Proteínas de los procesos del desarrollo fúngico.

Del mismo modo que se observó para el 1,3-diaminopropano, la espermidina parece ejercer un efecto inductor sobre la síntesis de proteínas implicadas en la biosíntesis de la pared celular fúngica, tal y como lo demuestra el incremento de 3,45 veces en la intensidad de una probable beta (1-3) glucanosiltransferasa Gel3 anclada a glicosilfosfatidilinositol (mancha Sc3) (ver Discusión). Por el contrario, una de las proteínas que vio disminuida su síntesis tras la adición de espermidina es una hipotética proteína de pared celular BinB. Esta proteína muestra una similitud del 74 % y una identidad del 62 % con la proteína PhiA de *A. nidulans*, la cual se ha descrito que es esencial para el desarrollo de las hifas en este microorganismo (Melin y col., 2003).

2.5. Otras proteínas.

La mancha Sc37, la cual incluye una proteína hipotética Ta1372, muestra una gran intensidad y únicamente se detecta bajo condiciones de inducción, ya sea con 1,3-diaminopropano o con espermidina. Es interesante recalcar que la síntesis del alérgeno específico de 16-kDa de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 está aumentada 3,11 veces tras la adición de espermidina, resultado que coincide con el proporcionado por el 1,3-diaminopropano. La síntesis de varias proteínas de función desconocida se encuentra tanto aumentada, como disminuida tras la inducción. Sin embargo, su papel e implicación en la producción de penicilina requerirá una caracterización posterior.

4. DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Al ser la penicilina uno de los metabolitos secundarios más importantes sintetizados por hongos filamentosos, no es de extrañar que durante las últimas décadas se hayan realizado grandes esfuerzos para optimizar el proceso de fermentación industrial de obtención de penicilina y mejora de cepas. El motivo principal para el desarrollo industrial de cepas es el económico, ya que las concentraciones de metabolitos producidas por las cepas silvestres son generalmente demasiado bajas para la economía de los procesos. Para que un proceso sea rentable, el microorganismo que se va a utilizar para la obtención de un determinado producto debe poseer una serie de características; entre las más importantes cabe destacar que se puedan regular las rutas biosintéticas de producción de metabolitos.

Como ya se indicó en la Introducción General, la biosíntesis de este antibiótico está controlada por reguladores globales del metabolismo secundario más que por un regulador específico, por lo que se planteó como objetivo de esta memoria, la purificación y caracterización de una molécula inductora que actúe a nivel de regulación génica en el hongo filamentoso *P. chrysogenum*, para incrementar los títulos de penicilina en fermentaciones en cultivo sumergido. Para ello se ha abordado este trabajo en varios enfoques, estudiados en tres capítulos.

Capítulo 1.

1. Búsqueda inicial de moléculas inductoras en *P. chrysogenum*.

La búsqueda de moléculas que actúen como inductores de la expresión génica se remonta a la década de los años 70, cuando se descubrió que los microorganismos patógenos que infectaban a vegetales producían una serie de compuestos (polisacáridos y proteínas) cuyo efecto en el organismo infectado era la superproducción, por parte de éste, de fitoalexinas alrededor del tejido dañado (Keen, 1975).

En este contexto, se definió el término inglés “*elicitor*” o elicitación y que se puede definir como aquel compuesto señal que cuando es introducido en pequeñas concentraciones en un

organismo (del rango mM), induce o potencia la síntesis de componentes específicos, como la producción de metabolitos.

En *P. chrysogenum*, se ha descrito que algunos carbohidratos actúan como moléculas inductoras de rutas biosintéticas de metabolitos secundarios, entre ellas, la ruta de biosíntesis de penicilina. Los primeros trabajos de investigación sobre el efecto generado por los carbohidratos sobre la producción de penicilina fueron publicados en la década de los años 90. Como resultado de las investigaciones llevadas a cabo, se llegó a la conclusión de que los oligosacáridos actuaban como elicitores o potenciadores de la producción de penicilina en *P. chrysogenum* cuando se añadían en pequeñas concentraciones a los medios de cultivo (Ariyo y col, 1997; 1998).

Con el propósito de determinar la existencia de moléculas que fueran sintetizadas por el propio microorganismo se decidió, como primer objetivo de esta Tesis Doctoral, realizar un “*screening*” o búsqueda de nuevas moléculas que actuaran como “autoinductores” (es decir, sintetizados por la propia cepa productora de penicilina) de forma similar a la observada con los oligosacáridos. Uno de los aspectos o enfoques iniciales en este trabajo, con el fin de tener éxito en el método de selección para los ensayos de actividad biológica, se ha referido a la necesidad de concebir un procedimiento analítico para poder cuantificar la producción de penicilina.

Para este propósito, se diseñó un sistema de bioensayo en placa, el cual, permitió poder detectar la actividad de los diferentes compuestos en relación a su poder para potenciar la producción de penicilina en *P. chrysogenum*. Con este tipo de método de ensayo se consiguió poder analizar gran cantidad de compuestos bien de forma aislada, o realizando todo tipo de combinaciones y en diferentes rangos de concentraciones.

En la primera fase del análisis realizado, se buscaron compuestos que potenciaran la síntesis de penicilina en bioensayo en placa pero sin poder diferenciar si el compuesto era un posible inductor, un precursor de dicha síntesis o un ingrediente del medio de cultivo con efecto potenciador del crecimiento.

En una segunda fase del estudio, se seleccionaron aquellos compuestos que habían producido un incremento de la producción en bioensayo en placa y se eligió como procedimiento de selección la realización de fermentaciones en cultivo sumergido. De esta forma pudieron valorarse, mediante la producción específica de bencilpenicilina, aquellas

sustancias que incrementaban la producción de penicilina teniendo en cuenta el posible efecto potenciador del crecimiento.

El resultado final después de las dos fases de análisis realizados evidenció que los caldos de cultivo fermentados de diferentes cepas de *P. chrysogenum* y de *A. chrysogenum* y la levadura *C. albicans*, contenían algún compuesto que añadido al medio de cultivo de *P. chrysogenum* potenciaba la síntesis de penicilina. El hecho de que el caldo obtenido a partir de la fermentación de la levadura *C. albicans*, contuviese una posible molécula inductora de la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* no fue inesperado, ya que este fenómeno ya se había observado en nuestro laboratorio en diferentes fermentaciones de *Penicillium* contaminadas a propósito con levaduras (es decir, un cultivo mixto). Las conclusiones que obtuvimos de los experimentos realizados fueron las siguientes:

- Si la inoculación de la levadura ocurría al inicio de la fermentación, la producción de penicilina era menor que el respectivo control ya que la levadura predominaba sobre *P. chrysogenum* (datos no mostrados).
- Cuando la inoculación de la levadura se realizaba a las 48 horas de fermentación, la producción de penicilina se incrementaba con respecto al control (datos no mostrados).

Revisando en la literatura el efecto de añadir a un medio de cultivo caldos fermentados de levaduras, encontramos que este fenómeno ya se había presentado en otras especies fúngicas como *Monascus sp*, donde tras suplementar el medio de cultivo de este microorganismo con un caldo procedente de la fermentación de *S. cerevisiae*, se observó que dicho caldo actuó como inductor para la producción de ácido linoleico y ácido oleico por parte del hongo (Suh, J y Shin, CS, 2000).

Con respecto al resto de los caldos obtenidos a partir de cepas fúngicas, bien de la misma especie o de una especie filogenéticamente muy cercana a *P. chrysogenum* como es *A. chrysogenum*, no es extraño que pueda existir alguna molécula producida por el mismo microorganismo y que actúe como una señal química de comunicación intercelular (Martín, 2000a).

2. Desarrollo de un método de purificación del compuesto inductor.

Como segundo objetivo de esta Tesis Doctoral, se propuso el desarrollo de un método para la purificación de la molécula inductora. De todas las cepas analizadas que producían el principio activo, se seleccionó la cepa de *A. chrysogenum* N-2 porque era la que producía péptidos intermediarios de la ruta de biosíntesis de penicilina y éstos podían ser los responsables del incremento de producción observado.

La purificación de una molécula a partir de caldos de cultivo fermentados tiene el problema de partir inicialmente de una mezcla heterogénea de compuestos, que son el resultado de rutas anabólicas y catabólicas del microorganismo además de las rutas de biosíntesis relacionadas con el metabolismo secundario. La selección de las etapas apropiadas de purificación depende en gran medida de la naturaleza del compuesto que se quiere purificar, su concentración, estabilidad y grado de purificación necesario. Dado que se desconocía por completo la naturaleza química del inductor, se procedió al desarrollo de un método de purificación aplicando técnicas cromatográficas clásicas y disponibles en nuestro laboratorio para el aislamiento de compuestos desde los caldos de fermentación obtenidos.

La principal dificultad a la que nos enfrentamos durante el proceso de purificación y posterior identificación del compuesto inductor, consistió en la optimización de las condiciones para el desarrollo de las diferentes técnicas cromatográficas.

En la cromatografía HPLC, último paso en los protocolos de aislamiento de compuestos bioactivos, surgieron los mayores problemas, ya que en los primeros cromatogramas realizados los picos cromatográficos aparecían con pérdida de resolución, rotos, redondeados o con cola desde que se inyectaban. Con esta situación, era muy difícil por no decir imposible poder purificar ningún compuesto.

La utilización de diferentes tipos de columnas cromatográficas y de diferentes tipos de disolventes orgánicos para la preparación de las fases móviles, junto con diferentes ajustes de pH así como diferentes volúmenes de inyección de muestra, dieron como resultado final una buena resolución de los picos cromatográficos.

Tras una optimización de los pasos que resultaron efectivos para dicha purificación y del orden de los mismos, se obtuvo al final un método de purificación para el compuesto inductor. La identidad del compuesto purificado por el método desarrollado se comprobó mediante diversas técnicas. Los resultados aportados por la espectroscopía de masas y la resonancia magnética nuclear de protón mostraron que las señales correspondían a la poliamina 1,3-diaminopropano.

Capítulo 2.

1. Influencia de la suplementación de los medios de cultivo con poliaminas en la producción de penicilina.

Las células de todos los organismos contienen pequeñas moléculas orgánicas nitrogenadas cargadas positivamente denominadas poliaminas. Aunque sus funciones no están completamente caracterizadas, las poliaminas se consideran de forma genérica moduladoras del crecimiento y metabolismo celular.

Las poliaminas son aminas alifáticas imprescindibles para la vida en casi todos los organismos conocidos, estando ampliamente distribuidas en los sistemas biológicos, aunque las concentraciones relativas de putrescina, espermidina y espermina (poliaminas más comunes) varían notablemente entre los distintos tipos celulares. En general, los procariontes tienen concentraciones más altas de putrescina que de espermidina y carecen de espermina (Tabor y Tabor, 1985). Estas moléculas sencillas poseen un tamaño similar a los aminoácidos y se encuentran presentes a unas concentraciones importantes (en el rango mM), regulando múltiples procesos vitales para el mantenimiento y el crecimiento celular.

A pesar de su indudable importancia y quizá por la falta de un conocimiento más detallado sobre sus mecanismos de acción, las poliaminas son aún “grandes desconocidas” en bioquímica y biología celular (Leitao y col., 1999).

La estructura química de las poliaminas se puede observar en la Figura 4.1. A pH fisiológico poseen cargas positivas, responsables de sus interacciones, inespecíficas en algunos casos o totalmente específicas en otros, con múltiples proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares cargados negativamente. Mediante estas interacciones, las

poliaminas ejercen muchas de sus funciones regulando, por ejemplo, la actividad de muchas proteínas o la expresión de determinados genes.

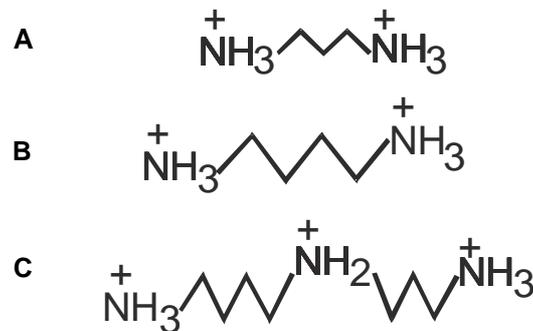


Figura 4.1: Estructura química de las poliaminas empleadas en el desarrollo de este trabajo en su forma protonada. **A.** 1,3-Diaminopropano. **B.** Putrescina. **C.** Espermidina.

La concentración de poliaminas y la proporción entre ellas determinarán de qué forma regulan cada proceso en el que están implicadas. En este sentido, se conocen más de 20 proteínas distintas que en su conjunto determinan los niveles de poliaminas, regulando su síntesis, degradación, interconversión y transporte. El sistema de regulación de los niveles de poliaminas es uno de los más complejos presentes en células procariontas y eucariotas, presentando mecanismos muy elaborados y, en algunos casos, únicos. La gran complejidad de la regulación de los niveles de poliaminas indica la importancia de estas moléculas y la relevancia del control riguroso de su concentración (Tabor y Tabor, 1985).

Las principales y más abundantes poliaminas en organismos superiores son tres: putrescina, espermidina y espermina. Son aminas alifáticas de tamaño sucesivamente mayor, que poseen 2, 3 y 4 grupos amino, respectivamente. La putrescina (1,4-diaminobutano) normalmente es el precursor de las poliaminas mayores, espermidina (1,8-diamino-4-azaoctano) y espermina (1,12-diamino-4,9-diazaoctano). Sin embargo, también se han encontrado otras poliaminas minoritarias como 1,3-diaminopropano, cadaverina o agmatina, tanto en procariontas como en eucariotas. También se conocen otras poliaminas más complejas, como termina o termoespermina encontradas especialmente en bacterias termófilas, y ciertas moléculas derivadas de poliaminas, como formas conjugadas con compuestos fenólicos o alcaloides en plantas o formas acetiladas de las poliaminas en mamíferos.

En los caldos fermentados obtenidos de diferentes microorganismos utilizados en este trabajo, detectamos por cromatografía HPLC, las poliaminas 1,3-diaminopropano, putrescina y espermidina. No pudimos evaluar la posible existencia de otras poliaminas, como por ejemplo, las poliaminas agmatina y espermina ya que no poseíamos patrones que nos sirvieran de referencia para poder identificarlas.

Uno de los efectos observados al suplementar los medios de cultivo con las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina al inicio de la fermentación, quedó reflejado en una mayor actividad metabólica de *P. chrysogenum*, que se tradujo en un mayor crecimiento del microorganismo en las horas iniciales y una mayor producción de bencilpenicilina con respecto a los controles. Sin embargo, pudimos concluir que no todas las poliaminas ejercen el mismo efecto de incrementar la actividad biológica de *P. chrysogenum*, ya que en los medios de cultivo suplementados con la poliamina putrescina, el microorganismo no presentó el mismo perfil de crecimiento y de producción que cuando se añadían las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina.

2. Interacciones moleculares de las poliaminas con los ácidos nucleicos.

Como ya se comentó en el apartado anterior, los grupos amino de las poliaminas se encuentran protonados a pH fisiológico y por tanto estas moléculas se encuentran cargadas positivamente. A mayor número de grupos amino la carga neta de la molécula será mayor; así el 1,3-diaminopropano y la putrescina tienen dos cargas positivas y la espermidina tres. Este hecho hace que las poliaminas interactúen electrostáticamente con diversos componentes celulares que tienen cargas negativas. Por otro lado, las cadenas carbonadas de estas moléculas permiten que también se establezcan interacciones hidrofóbicas, así como que exista cierta flexibilidad conformacional, que en conjunto permite a las poliaminas establecer interacciones más fuertes y específicas con diversas biomoléculas (Marton y Pegg, 1995; Thomas y Thomas, 2001).

Estas propiedades químicas de las poliaminas hacen que sean moléculas con una gran promiscuidad en sus interacciones, lo que conlleva que en la célula la mayor parte de ellas se encuentren unidas a diversas biomoléculas (ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos), mientras que la proporción en forma libre (no unidas a ningún componente celular) se cree que es minoritaria. Algunos estudios describen que la concentración de poliaminas libres, tanto en

bacterias como en células eucariotas, es inferior al 10 %, mientras que la mayoría se encontrarían unidas a ARN (Watanabe y col., 1991).

Otro aspecto importante que puede determinar la acción llevada a cabo por las poliaminas, es la proporción que existe entre cada una de ellas, la cual varía entre distintos rangos de concentración. En la mayoría de las células estudiadas las concentraciones de espermidina y espermina son del orden de mM, mientras que las de putrescina suelen ser un orden de magnitud menor (Cohen, 1998). Los mecanismos que regulan los niveles intracelulares de poliaminas están mediados por múltiples proteínas y regulados por diversos estímulos y factores externos, determinando diferentes concentraciones. Los principales mecanismos de acción por los que las poliaminas ejercen sus distintas funciones se pueden resumir en cuatro, que comprenden:

- Interacciones electrostáticas con moléculas cargadas negativamente.
- Uniones covalentes catalizadas por enzimas específicas.
- Secuestro de radicales libres.
- Producción de aldehídos citotóxicos y especies reactivas oxigenadas.

Las interacciones electrostáticas de las poliaminas se ejercen fundamentalmente sobre los elementos cargados negativamente de los ácidos nucleicos y las proteínas, regulando así múltiples procesos vitales en la célula y relacionados con el crecimiento celular.

Las interacciones de poliaminas con el ADN se han demostrado mediante múltiples experimentos. Estas interacciones son independientes de la secuencia del ADN, ya que las cargas positivas de los grupos amino de las poliaminas interactúan con las cargas negativas de los grupos fosfato presentes en las cadenas polinucleotídicas. Se ha descrito que las poliaminas pueden acoplarse en el surco menor de la doble hélice del ADN (Feuerstein y col., 1990; 1991; Deng y col., 2000), incrementando la temperatura de fusión del ADN (Thomas y Bloomfield, 1984), por lo que pueden tener una importante función de estabilizar el ADN *in vivo*. Por otro lado, también se ha descrito que las poliaminas pueden interactuar con el surco mayor del ADN e inducir curvaturas que podrían regular la transcripción de genes (Feuerstein y col., 1986; 1989; Rouzina y Bloomfield, 1998; Childs y col., 2003).

Las poliaminas interactúan de forma electrostática con proteínas, en muchos casos quizá meramente compensando sus cargas negativas, pero en otros múltiples casos conocidos afectando de forma concreta la actividad o la función de esas proteínas. Se ha observado, que tanto espermidina como espermina regulan la actividad de diversas enzimas implicadas en el metabolismo del ADN, activando ADN polimerasas, topoisomerasas, transcriptasa inversa, ADNasas, ARNasas o inhibiendo otras enzimas como ciertas endonucleasas de restricción o metilasas de ADN (Matthews, 1993; Ruiz-Herrera y col., 1997; Alm y col., 1999). También se conocen ejemplos donde las poliaminas son capaces de modular la fosforilación de determinados factores de transcripción, regulando su capacidad de unión al ADN (Wang y col., 1999; Pfeffer y col., 2000). En muchos casos, la acción activadora o inhibidora depende de la concentración de la poliamina.

También se ha demostrado que las poliaminas pueden condensar moléculas de ADN de alto peso molecular (Arscott y col., 1990), inducir cambios conformacionales que determinan transiciones entre las formas ADN-B y ADN-Z (Hasan y col., 1995), o formas alteradas del ADN dúplex, como apareamientos incorrectos, etc. (Hou y col., 2001). Igualmente, las poliaminas participan en la estabilización de los nucleosomas y de niveles estructurales superiores de la cromatina (Morgan y col., 1987; Matthews, 1993). Estas interacciones con el ADN pueden modificar su compactación y por tanto, la accesibilidad de las múltiples proteínas necesarias para la replicación y transcripción. Además, su acción sobre diferentes proteínas o enzimas que participan en dichos procesos de replicación, transcripción o remodelado de la cromatina, puede contribuir a su regulación.

Más concretamente, se ha demostrado que una variación de la concentración de poliaminas es capaz de modificar la afinidad de varios factores de transcripción por su sitio de unión al ADN (Thomas y Thomas, 1993; Panagiotidis y col., 1995; Desiderio y col., 1999).

De manera similar, las poliaminas son capaces de interactuar con los diversos tipos de ARN. De hecho, algunos investigadores sostienen que la mayor parte de las poliaminas presentes en la célula se encuentran unidas a ARN (Igarashi y Kashigawi, 2000). Existen diversos trabajos que describen las interacciones de estas moléculas con ARNm, ARNr y ARNt (Quigley y col., 1978; Igarashi y Kashigawi, 2000; 2006), modulando su plegamiento o estabilidad. Además se conocen varios ejemplos, tanto en bacterias como en eucariotas, donde las poliaminas son capaces de interactuar específicamente con secuencias nucleotídicas muy concretas, estimulando la traducción de determinadas moléculas de ARNm.

En este sentido, en el presente trabajo se realizaron diferentes experimentos para comprobar si las poliaminas eran capaces de interactuar con las secuencias de ADN que contienen los genes de biosíntesis de penicilina e incrementar su nivel de expresión. En concreto, se observaron diferencias notorias entre los cultivos suplementados con las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina, los controles sin suplementar y los cultivos suplementados con la poliamina putrescina. Pudimos concluir que las dos primeras poliaminas mencionadas estimulaban en *P. chrysogenum* los niveles de transcripción de los genes de biosíntesis de penicilina además de un regulador global del metabolismo secundario (LaeA).

El hecho de que el aporte de poliaminas a los medios de cultivo incrementase el nivel de expresión del gen que codifica el regulador global del metabolismo secundario LaeA explica el efecto observado en aquellos medios suplementados con las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina, las cuales inducían en *P. chrysogenum* efectos atribuidos a este regulador global (Kosalková y col., 2009), tales como cambios en el perfil de producción de otros metabolitos secundarios y cambios en la diferenciación asexual incrementando la formación de esporas.

Otro de los principales mecanismos de acción de estas moléculas está relacionado con su capacidad de secuestrar radicales libres. Los radicales libres o especies reactivas del oxígeno, son sustancias tóxicas generadas en el metabolismo celular que pueden dañar distintas biomoléculas, destacando su potencial mutagénico sobre el ADN. Se sabe que las poliaminas son capaces de proteger el ADN frente a estas sustancias reactivas, especialmente el ADN bacteriano. Las poliaminas pueden realizar esta acción protectora mediante su unión al ADN, compactándolo y reduciendo así la accesibilidad de las especies reactivas, o mediante el secuestro de los radicales libres al reaccionar directamente con ellos (Spotheim-Maurizot y col., 1995; Ha y col., 1998).

En otros casos, las poliaminas pueden tener una acción pro-oxidante (Lovaas, 1997) y es que, además de su posible efecto potenciador de especies reactivas del oxígeno en determinadas condiciones (Pedreño y col., 2005), las poliaminas pueden generar H₂O₂ cuando son utilizadas como sustratos por las poliamino-oxidasas. Por ello, niveles elevados de poliaminas tanto intracelulares como extracelulares, pueden resultar citotóxicos y producir la muerte celular mediada en gran medida por los aminoaldehídos generados y los productos derivados de los mismos (Seiler, 2004a).

Este hecho explicaría el efecto inhibitorio observado en nuestro caso cuando se añadieron a los medios de cultivo de *P. chrysogenum* concentraciones superiores a 10 mM de la

poliamina espermidina. Está demostrado que la máxima síntesis de la enzima poliamino-oxidasa en *P. chrysogenum* se alcanza con una concentración de espermidina de 14 mM. La oxidación de la espermidina por efecto de la enzima poliamino-oxidasa genera H₂O₂ y aminoaldehidos, además de putrescina y 1,3-diaminopropano en muchos microorganismos (Yamada y col., 1980).

3. Metabolismo de las poliaminas.

Los niveles intracelulares de poliaminas vienen determinados por el balance entre los procesos de síntesis, degradación, interconversión y transporte de las mismas. Putrescina y espermidina son sintetizadas “*de novo*” por la célula a partir de los aminoácidos L-arginina y L-metionina, por medio de reacciones catalizadas por enzimas específicas y que se encuentran en algunos casos sometidas a una estricta regulación.

Se sabe que la concentración de poliaminas está fuertemente influenciada por las condiciones de cultivo, el pH del medio, condiciones de aireación, presencia de aminoácidos como la arginina y lisina, edad del cultivo y tasa de crecimiento (Tabor y Tabor, 1985). Los microorganismos sintetizan poliaminas por descarboxilación de los aminoácidos ornitina, arginina y lisina por lo que un medio de cultivo para *P. chrysogenum* enriquecido con los aminoácidos precursores de poliaminas podría favorecer un mayor nivel de biosíntesis de éstas.

La ruta de biosíntesis de la putrescina (Figura 4.2) se inicia con la transformación de L-arginina en L-ornitina catalizada por la enzima arginasa. A continuación, la L-ornitina sufre una descarboxilación mediada por ornitina descarboxilasa (ODC) transformándose en putrescina. La ODC que es la primera enzima de la biosíntesis de poliaminas es una enzima de vida corta, que está estrechamente regulada.

La actividad ODC es inducida por muchos factores de crecimiento y suprimida por inhibidores selectivos como la difluorometilornitina en células animales (Farriol y col., 1999). Por otra parte la actividad ODC está regulada por las propias poliaminas vía mecanismo “*feed-back*” mediante la inhibición de la traducción del ARNm de la enzima y además porque puede elevar los niveles de una proteína inhibitoria o antizima que se une a la ODC inactivándola (Farriol y col., 1999).

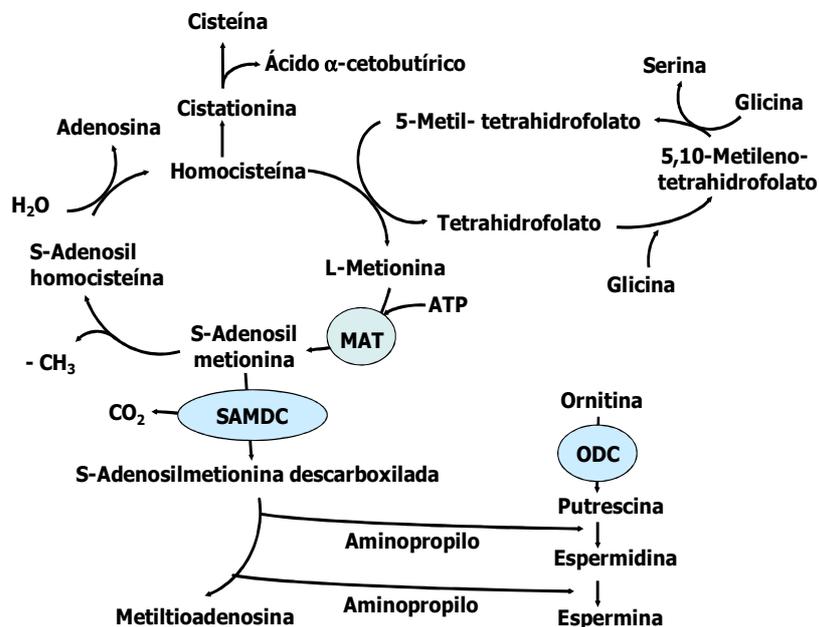


Figura 4.2: Ruta biosintética de las poliaminas.

Para comprobar la existencia de la ODC en *P. chrysogenum* utilizamos el programa de análisis de comparación de secuencias BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool Protein) del National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se realizó una búsqueda con la secuencia de la proteína ODC de *S. cerevisiae* (número de acceso AAA34829) y de otros hongos, como *Aspergillus fumigatus* (número de acceso XP_748770) frente a la base de datos de *P. chrysogenum*. A la luz de los resultados proporcionados por estas dos proteínas, en *P. chrysogenum* existen dos supuestas ODC; Pc13g07510 (47 % de identidad, 63 % de homología con la proteína de *S. cerevisiae*; 37 % de identidad, 56 % de homología con la proteína de *A. fumigatus*) y Pc21g18390 (42 % de identidad, 59 % de homología con la proteína de *S. cerevisiae*; 36 % de identidad, 54 % de homología con la proteína de *A. fumigatus*). Además, realizando búsquedas en el genoma de *P. chrysogenum* se encontró que también está presente la supuesta antizima de la ODC (Pc21g11340), indicando que los mecanismos de regulación anteriormente descritos, también podrían estar presentes en este hongo filamentoso.

La poliamina putrescina es la precursora de las poliaminas mayores en dos etapas sucesivas. Estas etapas consisten en la transferencia de grupos aminopropilo a ambos extremos de la molécula de putrescina. En primer lugar tiene lugar la condensación de un aminopropilo con un grupo amino de la putrescina, catalizado por la espermidina sintasa, produciéndose espermidina. Esta enzima también ha sido encontrada en el genoma de *P. chrysogenum* (Pc13g12400), cuya secuencia muestra una alta homología (88 % de identidad, 95 % de homología) con espermidinas sintasas de *A. fumigatus*, *A. clavatus* o *A. niger*.

Los grupos aminopropilo necesarios para la síntesis de las poliaminas mayores, proceden de la S-adenosilmetionina (SAM) descarboxilada. La descarboxilación de SAM es catalizada por la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa. A su vez, la SAM es formada a partir de L-metionina y ATP por medio de la metionina adenosil transferasa. Existe una ruta alternativa, al menos en plantas y bacterias, para la síntesis de poliaminas, también a partir de L-arginina, pero en la que participan dos enzimas diferentes, arginina descarboxilasa y agmatinasa.

4. Ruta de retroconversión.

Existe una ruta inversa que transforma las diferentes poliaminas en sus moléculas precursoras inmediatas. Es la denominada ruta de retroconversión. En primer lugar las poliaminas son acetiladas, mediante la espermidina acetiltransferasa, enzima que acetila un grupo amino primario de la espermidina a partir de acetil-CoA, dando lugar a la formación de N1-acetil espermidina (Casero y Pegg, 1993). Una vez acetiladas, las poliaminas pueden ser convertidas en su precursor inmediato, mediante la acción de la enzima poliamino-oxidasa, una flavoproteína de localización peroxisomal.

Esta enzima cataliza la escisión de la poliamina acetilada por el grupo amino secundario dando lugar a la poliamina menor y liberando H₂O₂. Como se ha indicado anteriormente, la oxidación de la espermidina por efecto de la enzima poliamino-oxidasa genera H₂O₂ y aminoaldehidos, además de putrescina y 1,3-diaminopropano (Yamada y col., 1980). Esto puede explicar el efecto similar que ejercen tanto el 1,3-diaminopropano, como la espermidina al ser añadidos a los caldos de cultivo. Esta ruta de retroconversión contribuye al mantenimiento de unos niveles adecuados de cada una de las poliaminas. Por otro lado la producción de H₂O₂ se ha relacionado con la capacidad de las poliaminas de inducir apoptosis en determinadas condiciones (Parchment, 1993).

El hecho de que *P. chrysogenum* forme la poliamina 1,3-diaminopropano como también sucede en el hongo *Neurospora crassa* (Tabor y Tabor, 1985), hace pensar que la ruta de retroconversión está presente en la mayoría de los microorganismos. Para comprobar la presencia de poliamino-oxidasas en *P. chrysogenum*, se realizó una búsqueda en el genoma de dicho microorganismo. Se encontraron tres ORFs que codificaban proteínas con una supuesta función poliamino-oxidasa: Pc12g08750, Pc18g02250 y Pc22g02950. Mediante el programa de comparación de secuencias BLASTP se realizó una búsqueda con cada una de estas proteínas y se encontró que Pc12g08750 proporcionó una homología del 75 % (identidad del 58 %) con una poliamino-oxidasa de *Microsporium canis*. Por su parte, Pc18g02250 mostró una homología del 80 % (identidad del 68 %) con una poliamino-oxidasa de *A. flavus*, mientras que Pc22g02950 proporcionó una homología del 74 % (identidad del 62 %) con una poliamino-oxidasa de *A. fumigatus*.

5. Transporte de poliaminas al interior celular y localización subcelular.

Se conocen distintos mecanismos de transporte de poliaminas que contribuyen de manera importante a establecer los niveles intracelulares de poliaminas. Se ha comprobado que la mayoría de las células son capaces de captar poliaminas extracelulares. Los procesos de secreción de poliaminas parecen más limitados, aunque el conocimiento sobre estos es menor. Los sistemas de transporte de poliaminas han sido descritos y caracterizados molecularmente en procariontes, donde los genes *PotD*, *PotE* y *PotF* codifican proteínas transportadoras en *E. coli* (Igarashi y Kashiwagi, 1999; Tomitori y col., 1999; Igarashi y col., 2001). En eucariotes unicelulares se ha descrito que la levadura *S. cerevisiae* posee una proteína Gap1p en la membrana plasmática, que además de catalizar la toma de aminoácidos, transporta hacia el interior celular las poliaminas putrescina y espermidina (Uemura y col., 2005). Estos mismos investigadores han encontrado proteínas transportadoras más específicas para las poliaminas, localizadas en la membrana plasmática y codificadas por los genes *DUR3* y *SAM3* en *S. cerevisiae* (Uemura y col., 2007).

Para comprobar si *P. chrysogenum* posee una proteína Gap1p como sucede en *S. cerevisiae*, utilizamos el programa de análisis de comparación de secuencias BLASTP. Se realizó una búsqueda con la secuencia de la proteína Gap1p de *S. cerevisiae* frente a la base de datos de *P. chrysogenum*. El resultado dio una identidad de un 54 % y homología del 71 %

con la ORF Pc21g04450 (descrita como una permeasa general de aminoácidos Gap1). Este dato nos indica que el hongo *P. chrysogenum* posee una proteína en la membrana plasmática similar a la existente en la levadura *S. cerevisiae* que posiblemente transportará, además de aminoácidos, poliaminas al interior celular.

También se comprobó la existencia de proteínas homólogas en *P. chrysogenum* a las proteínas DUR3 y SAM3 de *S. cerevisiae*. Se realizó una búsqueda con la secuencia de la proteína DUR3 (número de acceso AAA34582) frente a la base de datos de *P. chrysogenum*. El resultado dio una identidad de un 51 % y homología del 66 % con la ORF Pc16g09650 (descrita como un probable transportador de urea), una identidad de un 39 % y homología del 58 % con la ORF Pc22g01110 (descrita como un probable transportador de urea) y una identidad de un 34 % y homología del 56 % con la ORF Pc12g14180 (descrita como un probable transportador de urea).

Por su parte, la proteína SAM3 (número de acceso CAY86686) dio como resultado una identidad del 43 % y homología del 62 % con la ORF Pc21g04450 (descrita como una permeasa general de aminoácidos Gap1), un 34 % y homología del 53 % con la ORF Pc13g03760 (descrita como una permeasa de aminoácidos dicarboxílicos) y un 34 % y homología del 54 % con la ORF Pc12g05510 (descrita como una permeasa de aminoácidos dicarboxílicos), entre otras proteínas.

Estos datos nos indican que el hongo *P. chrysogenum* posee proteínas en la membrana plasmática similares a las existentes en la levadura *S. cerevisiae* que son más específicas para el transporte de poliaminas al interior celular que la proteína Gap1p.

En el hongo *N. crassa* se han realizado estudios concernientes a la localización y compartimentalización de las poliaminas en vacuolas. Como se comentó anteriormente, este microorganismo forma las poliaminas 1,3-diaminopropano, putrescina, espermidina y cantidades pequeñas de espermina. Paulus y colaboradores (1982; 1983) realizaron estudios del flujo metabólico de las poliaminas en este microorganismo llegando a la conclusión de que las poliaminas transportadas al interior celular son secuestradas en vacuolas.

Este hecho explicaría el efecto observado en *P. chrysogenum* de un mayor grado de vacuolización generado en aquellos cultivos que fueron suplementados con las poliaminas.

Capítulo 3.

1. Análisis proteómico en *P. chrysogenum*.

Está ampliamente descrito que las poliaminas controlan numerosos procesos metabólicos, tales como la estabilización de macromoléculas bajo condiciones de estrés, la estabilización de la membrana celular o la estabilización de los ácidos nucleicos, afectando este último proceso a la expresión génica, recombinación y mecanismos de reparación del ADN (Behe y Felsenfeld, 1981; Pegg, 1985; 1998; Pingoud, 1985; Garner y Felsenfeld, 1987; Feuerstein y col., 1991; Hampel y col., 1991). En este capítulo, hemos tratado de profundizar en el conocimiento de alguna de las modificaciones inducidas tanto por el compuesto 1,3-diaminopropano como por la espermidina en *P. chrysogenum* usando un enfoque proteómico y prestando especial atención a aquellos mecanismos relacionados con la biosíntesis de penicilina.

Puesto que el 1,3-diaminopropano induce la síntesis de la espermidina sintasa, es probable que la biosíntesis de espermidina también esté incrementada tras la adición de 1,3-diaminopropano a los medios de cultivo. De hecho, ha sido descrito con anterioridad que el N-(n-butil)-1,3-diaminopropano incrementa los niveles de espermidina e inhibe la síntesis de espermina (Pegg y Coward, 1993). El 1,3-diaminopropano es un sub-producto generado tras la oxidación de la espermidina por la acción de la poliamino-oxidasa en muchos microorganismos (Yamada y col., 1980) y de acuerdo con nuestros resultados, parece ejercer un efecto regulador positivo de retroalimentación sobre la espermidina sintasa. Esto podría indicar que muchas de las modificaciones observadas tras la adición de 1,3-diaminopropano podrían ser realmente atribuidas al aumento de los niveles de espermidina. De hecho, algunas proteínas cuya síntesis se vio afectada tras la inducción con espermidina coinciden con algunas proteínas cuya síntesis se vio modificada tras la adición de 1,3-diaminopropano (Tabla 3.3.5), lo que apoya nuestra hipótesis. Otras proteínas, sin embargo, mostraron tras la inducción un patrón específico de expresión atribuible a mecanismos específicos tanto del 1,3-diaminopropano como de la espermidina. Centrándonos en mecanismos de acción comunes para estas dos poliaminas, hay algunos de ellos que podrían explicar su efecto beneficioso sobre la producción de penicilina.

El primer mecanismo afecta directamente a una de las enzimas biosintéticas, la IAT. Esta enzima se sintetiza como un precursor de 40 kDa (proaciltransferasa, proIAT), el cual sufre un

procesamiento autocatalítico entre los residuos Gly102-Cys103 en *P. chrysogenum*. La proteína procesada constituye un heterodímero formado por las subunidades α (11 kDa, correspondiente al fragmento N-terminal) y β (29 kDa, correspondiente a la región C-terminal) (Barredo y col., 1989; Whiteman y col., 1990; Tobin y col., 1990; 1993). Tras el análisis de los geles 2-DE observamos que una nueva isoforma de la subunidad β de la IAT (sólo se detecta esta subunidad con los geles 2-DE (Jami y col., 2010)) apareció tras la adición de 1,3-diaminopropano y espermidina (Figura 3.3.5), mientras que la isoforma principal permaneció constante. Una posible explicación a este hecho es que las poliaminas induzcan la modificación post-traducciona l de esta proteína, dando lugar a una isoforma con mayor actividad, incrementándose de este modo los títulos de penicilina.

Otro mecanismo implicado en la biosíntesis de penicilina que se ve favorecido por la adición de poliaminas es la biosíntesis de β -alanina. Este aminoácido es un intermediario de la biosíntesis del ácido pantoténico (vitamina B5), el cual se convierte en 4'-fosfopanteteína y subsecuentemente en coenzima A. La 4'-fosfopanteteína es un grupo prostético esencial para varias enzimas, entre las que destaca la δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV) sintetasa, que es la primera enzima de la ruta de biosíntesis de penicilina (Baldwin y col., 1991; Stein y col 1994; Kleinkauf y Von Dohren, 1996). En bacterias, el ácido pantoténico se sintetiza mediante la condensación de pantoato, un intermediario de la biosíntesis de valina, con β -alanina, la cual es producida por la descarboxilación de L-aspartato (Williamson y Brown, 1979; Jackowski, 1996). En levaduras, la síntesis de pantoato implica las mismas etapas que en bacterias, mientras que la biosíntesis de β -alanina es diferente, dependiendo de la biosíntesis de poliaminas y de la amina oxidasa codificada por el gen *fms1* (White y col., 2001). Las amina oxidasas pueden degradar poliaminas con la producción del aldehído 3-aminopropanal (Holttá, 1977; Large, 1992), lo que implica que la posterior oxidación del 3-aminopropanal por una aldehído deshidrogenasa también se requeriría para la biosíntesis de β -alanina en levaduras (White y col., 2003). Este resultado se correlaciona bien con el incremento en la espermidina sintasa (que da lugar a altos niveles de espermidina posteriormente degradada por amina oxidasas) y con el incremento de la biosíntesis de acetil-CoA por la ATP citrato liasa ACL1 y dihidrolipoamida deshidrogenasa Lpd1, ya que la β -alanina es un intermediario en la biosíntesis de coenzima A. Estos resultados sugieren que la biosíntesis de β -alanina se ve incrementada tras la adición de estas poliaminas y están en consonancia con informes previos que sugieren que la espermina, espermidina y 1,3-diaminopropano son precursores de la β -alanina en brotes de maíz y en bacterias (Razin y col., 1958).

Algunas enzimas de la ruta del homogentisato, el cual se emplea para la degradación del ácido fenilacético, se ven también influidas por las poliaminas, lo que podría también explicar el incremento en los títulos de penicilina. El ácido fenilacético se emplea a escala industrial como precursor de la cadena lateral para la producción de bencilpenicilina en fermentaciones sumergidas. Se conoce bien desde el comienzo de la producción industrial de penicilina que la adición de precursores de la cadena lateral a las fermentaciones tiene un efecto positivo sobre la producción de antibiótico (Moyer y Coghill, 1947). Debido a la amplia especificidad de sustrato de las varias isoenzimas de la IAT, el ácido fenilacético debe añadirse en exceso para promover la biosíntesis de penicilina en detrimento de otras penicilinas naturales (Hersbach y col., 1984). La efectividad de este precursor de la cadena lateral parece depender de su resistencia a la oxidación por parte de *P. chrysogenum* (Hillenga y col., 1995). La primera etapa de la ruta catabólica del ácido fenilacético consiste en una 2-hidroxilación por parte de una citocromo P450 monooxigenasa microsomal, y es bien sabido que modificaciones en esta enzima son responsables de una menor degradación del ácido fenilacético y del aumento de la producción de penicilina (Rodríguez-Saiz y col., 2001). Por lo tanto, existe una clara correlación entre la primera enzima de la ruta del ácido homogentísico y la biosíntesis de penicilina. Las poliaminas, especialmente el 1,3-diaminopropano, provocaron también una reducción de la síntesis de enzimas tardías de la ruta del homogentisato, por lo que no puede descartarse que el incremento en los títulos de penicilina que se observa tras la adición de las poliaminas, esté también relacionado con la regulación negativa de estas enzimas tardías.

Tras el tratamiento con las poliaminas, la síntesis de algunas chaperonas y “foldasas” está aumentada y en otros casos, disminuida. La razón de esta variabilidad probablemente se debe a la complejidad de las interacciones que ocurren en el retículo endoplasmático entre diferentes chaperonas y “foldasas” y a la multifuncionalidad de estas proteínas. De este modo, algunos procesos en los que estas proteínas están implicadas podrían ser beneficiosos para la sobreproducción de algunas proteínas, mientras que otros procesos, afectarían negativamente la producción final, como se ha visto con las proteínas BiP o calnexina (Conesa y col., 2002). En el caso del 1,3-diaminopropano y la espermidina, la expresión diferencial de varias chaperonas parece ser beneficioso para la biosíntesis de penicilina. De hecho, no puede descartarse que la variabilidad en la biosíntesis de chaperonas pueda ser responsable de la detección de la nueva isoforma de la IAT que se observó tras la adición de las poliaminas, la cual podría ser responsable del incremento de los títulos de penicilina originados tras la inducción.

Aunque inicialmente no está relacionada con la biosíntesis de penicilina, otra característica común que se apreció con el 1,3-diaminopropano y la espermidina es que ambas poliaminas indujeron la síntesis de una probable beta (1-3) glucanosiltransferasa Gel3 anclada a glicosilfosfatidilinositol, la cual juega un papel activo en la biosíntesis de la pared celular fúngica y en la morfogénesis. El componente estructural principal de la pared celular es el β -1,3-glucán, el cual sufre varias modificaciones posteriores, lo que se traduce en extensas ramificaciones y uniones a otros componentes de la pared celular (Mouyna y col., 2000; Klis y col., 2002). Entre las enzimas claves que están implicadas en la modificación posterior del β -1,3-glucán están las beta (1-3) glucanosiltransferasas, una familia de glicoproteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol. Por lo tanto, parece que existe una correlación positiva entre las importantes modificaciones en la morfología de las hifas inducidas por las poliaminas y el aumento en la biosíntesis de esta proteína tras la inducción.

Además de estos mecanismos comunes, cada una de estas dos poliaminas afecta particularmente a la biosíntesis de proteínas implicadas en rutas indirectamente relacionadas con la biosíntesis de penicilina. Ejemplos de estos mecanismos los proporciona principalmente la espermidina, la cual induce la síntesis de una probable fosfogluconato deshidrogenasa Gnd1 y una probable tiamina-fosfato pirofosforilasa/hidroxiethyliazol kinasa. La primera enzima cataliza una reacción de regeneración de NADPH en la ruta de las pentosas fosfato. El incremento en los niveles de NADPH se ha correlacionado positivamente con la producción de antibióticos β -lactámicos (Jørgensen y col., 1995; Henriksen y col., 1996; van Gulik y col., 2000) y está descrito que la producción de penicilina en las cepas de alta producción constituye una gran carga para el suplemento de NADPH (Kleijn y col., 2007) (biosíntesis de 1 mol de penicilina requiere 8–10 moles de NADPH). La segunda proteína está implicada en la síntesis *de novo* de tiamina (Nosaka y col., 1994; Mizote y col., 1999), que actúa como cofactor de aminotransferasas. El pirofosfato de tiamina está involucrado en la biosíntesis de aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) regulando la acetolactato sintasa, la enzima limitante de esta ruta. Por lo tanto, el incremento en los niveles de pirofosfato de tiamina favorecería la acumulación de valina, que es uno de los precursores de los antibióticos β -lactámicos.

Un resultado llamativo que se obtuvo únicamente tras la adición de espermidina es el descenso en la intensidad de la cisteína sintasa, la cual cataliza la biosíntesis de cisteína a partir de serina. La cisteína es uno de los tres aminoácidos precursores del tripéptido ACV y su disponibilidad influye notablemente en los flujos de producción de penicilina (Nasution y col., 2008). Aparentemente, este resultado podría parecer contradictorio con el hecho de que la

adición de espermidina provoque un incremento en la producción de penicilina. Sin embargo, la cisteína también puede ser sintetizada a partir de metionina mediante transulfuración por la cistationina beta sintasa. Por lo tanto, parece que el descenso mediado por espermidina en la síntesis de la cisteína sintasa no afecta a la biosíntesis de penicilina, probablemente debido a que la otra ruta para la biosíntesis de cisteína proporciona suficiente aminoácido precursor para la biosíntesis de ACV. La importancia de la cistationina beta sintasa en la biosíntesis de penicilina está apoyada por el hecho de que la síntesis de esta enzima se encuentre aumentada en la cepa de alta producción AS-P-78 (Jami y col., 2010).

Un ejemplo de proteínas inducidas exclusivamente por el 1,3-diaminopropano y que podrían estar implicadas en rutas metabólicas indirectamente relacionadas con la biosíntesis de penicilina lo constituye la ATPasa vacuolar transportadora de protones. Esta enzima heteromultimérica acopla la energía proveniente de la hidrólisis del ATP al transporte de protones a través de las membranas de células eucariotas usando estos gradientes para proporcionar energía para el transporte de solutos, para el mantenimiento de un pH intracelular constante y para proporcionar una señal para los procesos intravesiculares (Nelson y col., 2000). Varios transportadores, tales como los que están implicados en la incorporación de nutrientes, utilizan el gradiente electroquímico de los protones o fuerza protón motriz que existe a través de la membrana plasmática para proveer de energía al transporte (Burgstaller, 1997). Por tanto, el transporte de determinados nutrientes y otros solutos que son relevantes para la biosíntesis de penicilina pueden verse favorecidos por el 1,3-diaminopropano.

Otra ruta metabólica que parece verse favorecida específicamente por la espermidina es la biosíntesis de porfirinas. Algunas de las enzimas que catalizan varias etapas de esta ruta, tales como una probable ácido 5-aminolevulínico sintasa HemA y una probable coproporfirinógeno oxidasa III Hem13, vieron incrementada su síntesis al añadirse espermidina. Las porfirinas son un grupo de compuestos orgánicos bien conocidos por ser el pigmento de los glóbulos rojos y podrían ser responsables, al menos en parte, del incremento en la intensidad de la coloración observada en los medios sólidos tras crecer *P. chrysogenum* suplementado con espermidina. Ya que el 1,3-diaminopropano también dio lugar a una coloración más intensa, pero parece no incrementar la síntesis de porfirinas, tampoco puede excluirse la inducción de la biosíntesis de otros pigmentos por estas poliaminas.

En conclusión, hemos observado que la adición de las poliaminas 1,3-diaminopropano y espermidina conduce a la modificación de la síntesis de varias enzimas implicadas en

numerosos procesos metabólicos. Como resultado de efectos directos e indirectos sobre enzimas implicadas en la biosíntesis de penicilina y compuestos precursores, hemos comprobado que las poliaminas son responsables del incremento de la biosíntesis del antibiótico β -lactámico penicilina.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

Una vez finalizado el proceso de recolección y análisis de datos experimentales, se obtuvieron unos resultados que han permitido presentar el siguiente conjunto de conclusiones:

- Se ha purificado a partir de diversos caldos procedentes de la fermentación con hongos productores de antibióticos β -lactámicos, una molécula (1,3-diaminopropano) que actúa como inductora de la biosíntesis de penicilina en el microorganismo *P. chrysogenum*. Se ha comprobado que la poliamina espermidina, una molécula cuyo catabolismo da lugar al compuesto inductor, produce el mismo efecto en el microorganismo que el compuesto purificado 1,3-diaminopropano.
- La suplementación de los medios de cultivo de *P. chrysogenum* con las poliaminas 1,3-diaminopropano o espermidina a concentraciones semejantes, incrementa los niveles de transcripción de los genes biosintéticos de penicilina *pcbAB*, *pcbC* y *penDE*.
- La suplementación de los medios de cultivo de *P. chrysogenum* con las poliaminas 1,3-diaminopropano o espermidina a concentraciones semejantes, provoca la aparición de una serie de cambios en el microorganismo relacionados con la morfología, pigmentación, esporulación y metabolismo secundario.
- La adición de las poliaminas a los caldos de cultivos de *P. chrysogenum* es responsable de que se vea modificado el patrón de síntesis de algunas enzimas relacionadas directa o indirectamente con la biosíntesis de penicilina, tal y como pudo observarse mediante estudios comparativos de proteómica.
- En base a las pruebas realizadas con las moléculas inductoras a escala de Planta Piloto y su resultado positivo sobre la producción de penicilina, se abre la posibilidad de su posible uso a escala industrial para la obtención de mayores títulos de antibiótico.

6. BIBLIOGRAFÍA

A

Aharonowitz, Y., Cohen, G. y Martin, J.F.(1992). Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* **46**: 461-95.

Andrade, A.C., Van Nistelrooy, J.G., Peery, R.B., Skatrud, P.L. y De Waard M.A. (2000). The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production. *Mol. Gen. Genet.* **263**; 966–997.

Andre, B. (1995). An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**; 1575-1611. (Review).

Aplin, R.T., Baldwin, J.E., Cole, S.C., Sutherland, J.D. y Tobin, M.B. (1993a). On the production of α , β -heterodimeric acyl-coenzyme A: isopenicillin N-acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. Studies using a recombinant source. *FEBS. Lett.* **319**; 166-170.

Aplin, R.T., Baldwin, J.E., Roach, P.L., Robinson, C.V. y Schofield, C.J. (1993b). Investigations into the post-translational modification and mechanism of isopenicillin N:acyl-CoA acyltransferase using electrospray mass spectrometry. *Biochem. J.* **294**; 357-363.

Ariyo, B., Bucke, C. y Keshavarz, T.(1997). Alginate oligosaccharides as enhancers of penicillin production in cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng.* **5**; 53:17-20.

Ariyo, B., Tamerler, C., Bucke, C. y Keshavarz, T. (1998). Enhanced penicillin production by oligosaccharides from batch cultures of *Penicillium chrysogenum* in stirred-tank reactors. *FEMS Microbiol Lett.*; **166**:165-70.

Arcott, P.G., Li, A.Z., Bloomfield, V.A. (1990). Condensation of DNA by trivalent cations. 1. Effects of DNA length and topology on the size and shape of condensed particles. *Biopolymers*, **30**, 619-630.

Arst HN, Jr., Bignell, E. y Tilburn J. (1994). Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **15**; 245:787-90.

Avanzini, F. y Valenti P. (1980). Peptide presence constituted by α -amino adipic acid (α -AAA) and valine in *P.chrysogenum* fermentation broth. Abstracts 6th International Ferm. Symp. London, Ontario, p. 18.

Avanzini, F. y Morelli, S. (1984). Amino acids and peptides in penicillin industrial fermentation broths by different *P. chrysogenum* strains. In Abstracts of the VII International Biotechnology Symposium, volume 2, pp. 368-369, New Delhi, India.

B

- Backus, M.P. y Stauffer, J.F. (1955).** The production and selection of a family of strains in *Penicillium chrysogenum*. *Mycologia*. **47**; 429-463.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., Robbins, J. y Molkentin, J.D. (2005).** Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. **434**: 658-62.
- Bains, O.S., Takahashi, R.H., Pfeifer, T.A., Grigliatti, T.A., Reid, R.E y Riggs, K.W. (2008).** Two allelic variants of aldo-keto reductase 1A1 exhibit reduced in vitro metabolism of daunorubicin. *Drug Metab Dispos*. **5**: 904-10.
- Baldwin, J.E., Bird, J.W., Field, R.A., O'Callaghan, N.M. y Schofield, C.J. (1990).** Isolation and partial characterization of ACV synthetase from *Cephalosporium acremonium* and *Streptomyces clavuligerus*. *J. Antibiot*. **43**; 1055-1057.
- Baldwin, J.E., Bird, J.W., Field, R.A., O'Callaghan, N.M., Schofield, C.J. y Willis, A.C. (1991).** Isolation y partial characterisation of ACV synthetase from *Cephalosporium acremonium* and *Streptomyces clavuligerus*: evidence for the presence of phosphopantothenate in ACV synthetase. *J. Antibiot*. **44**; 241-248.
- Barredo J.L., Álvarez E., Cantoral J.M., Díez B. y Martín J.F. (1988).** Glucokinase-deficient mutant of *Penicillium chrysogenum* is derepressed in glucose catabolite regulation of both beta-galactosidase and penicillin biosynthesis. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **32** :1061-7.
- Barredo J.L., Díez B., Álvarez E. y Martín J.F. (1989a).** Large amplification of a 35-Kb DNA fragment carrying two penicillin biosynthetic genes in high penicillin producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet*. **16**; 453-459.
- Barredo, J.L., Cantoral, J.M., Álvarez, E., Díez, B. y Martín, J.F. (1989b).** Cloning, sequence analysis and transcriptional study of the isopenicillin N synthase of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78. *Mol. Gen. Genet*. **216**; 91-98.
- Barredo J.L., van Solingen P., Díez B., Álvarez E., Cantoral J.M., Kattevilder A., Smaal E. B., Groenen M. A.M., Veenstra A.E. y Martín J.F. (1989c).** Cloning and characterization of the acyl coenzyme A: 6 aminopenicilanic acid acyltransferase gene of *Penicillium chrysogenum*. *Gene*. **83**; 291-300.
- Barrios-González, J., Montenegro, E. y Martín, J. F. (1993).** Penicillin production by mutants resistant to phenylacetic acid. *J. Ferment. Bioeng*. **76**; 455-458.
- Bassler, R.B.L. (1999).** How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol*. **2**: 582-587.

- Batchelor, F.R., Doyle, P.D., Nayler, J.H.C. y Rolinson, G.N. (1959).** Synthesis of penicillin: 6-amino-penicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature* **183**; 257-258.
- Bateman, R.L., Bhanumoorthy, P., Witte, J.F., McClard, R.W., Grompe, M. y Timm, D.E. (2001).** Mechanistic inferences from the crystal structure of fumarylacetoacetate hydrolase with a bound phosphorus-based inhibitor. *J Biol Chem.* **276**: 15284-91.
- Beato, M. (1991).** Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB J.* **5**: 2044-51.
- Behe, M. y Felsenfeld, G. (1981).** Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: the B-Z transition in poly(dG-m5dC).poly(dG-m5dC). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78**:1619-23.
- Benko, P.V., Word, T.C. y Segel, I.H. (1967).** Specificity and regulation of methionine transport in filamentous fungi. *Arch Biochem Biophys.* **122**; 783-804.
- Benko, P.V., Wood, T.C. y Segel, I.H. (1969).** Multiplicity and regulation of amino acid transport in *Penicillium chrysogenum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **129**; 498-508.
- Bergh, K.T., Litzka, O. y Brakhage, A.A. (1996).** Identification of a major cis-acting DNA element controlling the bidirectionally transcribed penicillin biosynthesis genes *acvA* (*pcbAB*) and *ipnA* (*pcbC*) of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **178**: 3908-16.
- Berteaux-Lecellier, V., Picard, M., Thompson Coffe, C., Zickler, D., Panvier-Adoutte, A. y Simonet, J.M. (1995).** A nonmammalian homolog of the PAF1 gene (Zellweger syndrome) discovered as a gene involved in caryogamy in the fungus *Podospora anserina*. *Cell.* **81**; 1043-1051.
- Bolatito, Ariyo., Candan, Tamerler., Christopher, Bucke y Tajalli Keshavarz. (1998).** Enhanced penicillin production by oligosaccharides from batch cultures of *Penicillium chrysogenum* in stirred-tank reactors. *FEMS Microbiology Letters* **166**; 165-170.
- Boyer, P.D. (1997).** The ATP synthase a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* **66**: 717-49.
- Boyle, G.M., Roucou, X., Nagley, P., Devenish, R.J. y Prescott, M. (2000).** Modulation at a distance of proton conductance through the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial F1F0-ATP synthase by variants of the oligomycin sensitivity-conferring protein containing substitutions near the C-terminus. *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**: 595-607.
- 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. (1997).** Molecular regulation of penicillin biosynthesis in *Aspergillus* (*Emericella*) *nidulans*. *FEMS Microbio.l Lett.* **148**; 1-10.

Brakhage, A.A. (1998). Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**; 547-585.

Brakhage, A.A. y Turner, G. (1995). Biotechnical genetics of antibiotics biosynthesis. En: *The Mycota II. Genetics and biotechnology*. Ed. Kück U. Springer, Berlin Heidelberg, New York, p 263.

Brakhage, A.A., Andrianopoulos, A., Kato, M., Steidl, S., Davis, M.A., Tsukagoshin, N. y Hynes, M.J. (1999). HAP-likes CCAAT-binding complexes in filamentous fungi: implications for biotechnology. *Fungal Genet. Biol.* **27** : 243-52. Review.

Brakhage, A.A., Spröte, P., Al-Abdallah, Q., Gehrke, A., Plattner, H. y Tüncher, A. (2004). Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **88**: 45-90.

Bruckmann, A., Hensbergen, P.J., Balog, C.I., Deelder, A.M., Brandt, R., Snoek, I., Steensma, H.Y. y van Heusden, G.P. (2009). Proteome analysis of aerobically anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J. Proteomics* **71**, 662-669.

Buratowski, S. (1994). The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell.* **8**; 77: 1-3.

Burgstaller, W. (1997). Transport of small ions and molecules through the plasma membrane of filamentous fungi. *Crit Rev Microbiol.*; **23**: 1-46.

C

Caddick, M.X., Brownlee, A.G. y Arst, J.H.N. (1986). Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **203**; 346–353.

Caddick, M.X., Peters, D. y Platt, A. (1994). Nitrogen regulation in fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **65**: 169-77.

Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. y Righetti, P.G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327-1333.

Cantwell, C., Beckmann, R., Whiteman, P., Queene, R.S.W. y Abraham, E.P. (1992). Isolation of deacetoxycephalosporin C from fermentation broths of *Penicillium chrysogenum* transformants: construction of a new fungal biosynthetic pathway. *Proc. Biol. Sci.* **248**; 283-289.

Carr, L.G., Skatrud, P.L., Scheetz, M.E., Queener, S.W. e Ingolia, T.D. (1986). Cloning and expression of the isopenicillin N synthetase gene from *Penicillium chrysogenum*. *Gene.* **48**; 257-266.

- Casero, R.A.Jr. y Pegg, A.E. (1993).** Spermidine/spermine N1-acetyltransferase—the turning point in polyamine metabolism. *FASEB J.*, **7**, 653-661.
- Casqueiro, J., Gutiérrez, S., Bañuelos, O., Fierro, F., Velasco, J. y Martín J.F. (1998).** Characterization of the *lys2* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding alpha-aminoadipic acid reductase. *Mol. Gen. Genet.* **259**: 549-56.
- Casqueiro, J., Gutiérrez, S., Bañuelos, O., Hijarrubia, M.J. y Martín, J.F. (1999).** Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction. *J. Bacteriol.* **181**; 1181-1188.
- Castro, J.M., Liras, P., Laíz, L., Cortés, J. y Martín J.F. (1988).** Purification and characterization of the isopenicillin N synthase of *Streptomyces lactamdurans*. *J. Gen. Microbiol.* **134**; 133-141.
- Chain, E., Florey, H.W. y Gardner, A.D. (1940).** Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*; ii; 226-228.
- Chang, L.T., McGrory, E.L y Elander, R.P. (1990).** Penicillin production by glucose-derepressed mutants of *Penicillium chrysogenum*. *J. Ind. Microbiol.* **6**: 165-9.
- Childs, A.C., Mehta, D.J., Gerner, E.W. (2003).** Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol. Life Sci.*, **60**, 1394-1406.
- Christensen, L.H., Henriksen, C.M., Nielsen, J. y Villadsen, J. (1995).** Continuous cultivation of *Penicillium chrysogenum*. Growth on glucose and penicillin production. *J. Biotechnol.* **42**; 95–107.
- Chu, Y.W., Renno, D. y Saunders, G. (1995).** Detection of a protein which binds specifically to the upstream region of the *pcbAB* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* **28**: 184-9.
- Chu, Y.W., Renno, D. y Saunders, G. (1997).** Extracellular pH affects regulation of the *pcbAB* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **47**; 250-254.
- Clarke, H.T., Johnson, J.R. y Robinson, R. (1949).** The chemistry of penicillin. Ed. Robinson R. Princeton University Press.
- Clutterbuck, P.W., Lovel, I.R. y Raistrick, H. (1932).** Studies in the biochemistry of the microorganisms. XXVI. The formation from glucose by members of the *Penicillium chrysogenum* species of a pigment, an alkali soluble protein and penicillin. The antibacterial substance of Fleming. *Biochem. J.* **26**; 1907-1918.
- Cohen, G., Argaman, A., Schreiber, R., Mislovati, M. y Aharonowitz, Y. (1994).** The thioredoxin system of *Penicillium chrysogenum* and its possible role in penicillin biosynthesis. *J. Bacteriol.* **176**; 973- 984.

Cohen, S.S. (1998). A guide to the polyamines. *New York, Oxford University Press.*

Coleman, C.S y Pegg, A.E. (2001). Polyamine analogues inhibit the ubiquitination of spermidine/spermine N1-acetyltransferase and prevent its targeting to the proteasome for degradation. *Biochem J.* **15**; 358: 137-45.

Conesa, A., Jeenes, D., Archer, D.B., van den Hondel, C.A. y Punt, P.J. (2002). Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 846-51.

Cooper, R.D.G. (1993). The enzymes involved in the biosynthesis of penicillin and cephalosporin: their structure and function. *Bioorg. Medic. Chem.* **1**; 1-17.

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.

Coque, J.J.R., de la Fuente, J.L., Liras, P. y Martín, J.F. (1996). Overexpression of the *Nocardia lactamdurans* α -amino adipyl-cysteinyl-valine synthetase in *Streptomyces lividans*. The purified multienzyme uses cystathionine and 6-oxopiperidine 2-carboxylate as substrates for synthesis of the tripeptide. *Eur. J. Biochem.* **242**; 264-270.

D

Deeley, R.G. y Cole, S.P.C. (1997). Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin. Cancer. Biol.* **8**; 193-204.

del Carmen Mateos, R. y Sánchez, S. (1990). Transport of neutral amino acids and penicillin formation in *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Genet.* **254**; 417-426.

De Lucas, J.R., Valenciano, S., Domínguez, A.I., Turner, G. y Laborda, F. (1997). Characterization of oleate-nonutilizing mutants of *Aspergillus nidulans* isolated by the 3-amino-1,2,4-triazole positive selection method. *Arch. Microbiol.* **168**; 504-51.

Demain, A.L. (1957). Inhibition of penicillin formation by lysine. *Arch. Biochem. Biophys.* **67**: 244-6.

Demain, A.L. (1983). Biosynthesis of β -lactam antibiotics. En: *Antibiotics containing the β -lactam structure*. Eds. Demain A.L. y Solomon N.A. Springer. Berlin Heidelberg. New York. pp 189-228.

Demain, A.L., Martín, J.F. y Elander, R.P. (1998). Penicillin biochemistry and genetics. En: *Penicillin. A paradigm for biotechnology* (pp. 93-114). R.I. Mateles (Ed). Candida Corporation, Chicago.

Demain, A.L. y Elander, R.P. (1999). The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **75**: 5-19.

Deng, H., Bloomfield, V.A., Benevides, J.M., Thomas, G.J.Jr. (2000). Structural basis of polyamine-DNA recognition: spermidine and spermine interactions with genomic B-DNAs of different GC content probed by Raman spectroscopy. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 3379-3385.

de Nobel, J.G. (1991). Permeability of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. PhD thesis. University of Amsterdam.

de Nobel, J.G. y Barnett, J.A. (1991). Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay review. *Yeast* **7**; 313-323.

Desiderio, M.A., Dansi, P., Tacchini, L., Bernelli-Zazzera, A. (1999) Influence of polyamines on DNA binding of heat shock and activator protein 1 transcription factors induced by heat shock. *FEBS Lett.* **455**, 149-153.

de Zoysa, P.A. y Connerton, I.F. (1994). The function and specificity of the C-terminal tripeptide glyoxysomal targeting signal in *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* **26**; 430-437.

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-cysteinylvaline synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. *J. Biol. Chem.* **265**; 16358-16365.

Díez, B., Mellado, E., Rodríguez, M., Fouces, R. y Barredo, J.L. (1997). Recombinant microorganisms for industrial production of antibiotics. *Biotechnol. Bioeng.* **55**; 216-226.

Dimond, R.L., Farnsworth, P.A. y Loomis, W.F. (1976). Isolation and characterization of mutations affecting UDPG pyrophosphorylase activity in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol.*; **50**: 169-81.

E

Eggink, G., Lageveen, R.G., Altenburg, B. y Witholt, B. (1987). Controlled and functional expression of the *Pseudomonas oleovorans* alkane utilizing system in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **262**: 17712-8.

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**: 6171-7.

Elander, R.P. (2003). Industrial production of β - lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**; 385-392.

Entian, K.D. y Fröhlich, K.U. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* mutants provide evidence of hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* **158**: 29-35.

Eriksen, S.H., Jensen, B., Schneider, I., Kaasgaard, S. y Olsen, J. (1995). Uptake of phenoxyacetic acid by *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**; 945-950.

Eriksen, S.H., Soderblom, T.B., Jensen, B. y Olsen, J. (1998). Uptake of phenylacetic acid by two strains of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* **60**; 310-316.

Espeso, E.A., Tilburn, J., Arst H.N, Jr. y Peñalva, M.A. (1993). pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12**: 3947-56.

Evers, M.E., Trip, H., van den Berg, M.A., Bovenberg, R.A. y Driessen, A.J. (2004). Compartmentalization and transport in β -lactam antibiotics biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **88**; 111-135.

F

Farriol, M., Segovia, T., Venero., T y Orta, X. (1999). Importancia de las poliaminas: revisión de la literatura. *Nutr Hosp* **14**; 101-113.

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. Microbiol.* **60**: 4432-9.

Feng, B., Friedlin, E. y Marzluf, G.A. (1995). Nuclear DNA-binding proteins which recognize the intergenic control region of penicillin biosynthetic genes. *Curr. Genet.* **27**: 351-8.

Fernandez-Acero, F.J., Jorge, I., Calvo, E., Vallejo, I., Carbu, M., Camafeita, E., Lopez, J.A., Cantoral, J.M. y Jorriñ, J. (2006) Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics* **6**, S88–S96.

Fernández-Cañón, J.M., Reglero, A., Martínez-Blanco, H., Ferrero, M.A. y Luengo, J.M. (1989a). Phenylacetic acid transport system in *Penicillium chrysogenum* Wis 54-1255: molecular specificity of its induction. *J. Antibiot. (Tokyo)* **42**; 1410-1415.

Fernández-Cañón, J.M., Reglero, A., Martínez-Blanco, H. y Luengo, J.M. (1989b). Uptake of phenylacetic acid by *Penicillium chrysogenum* Wis 54-1255: a critical regulatory point in benzylpenicillin biosynthesis. *J. Antibiot. (Tokyo)* **42**; 1398-1409.

Fernández-Cañón, J.M. y Peñalva, M.A. (1995). Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **246**; 110-118.

- Feuerstein, B.G., Pattabiraman, N., Marton, L.J. (1986).** Theoretical models of spermine/DNA interactions. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **482**, 251-254.
- Feuerstein, B.G., Pattabiraman, N., Marton, L.J. (1989).** Molecular dynamics of spermine-DNA interactions: sequence specificity and DNA bending for a simple ligand. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 6883-6892.
- Feuerstein, B.G., Pattabiraman, N., Marton, L.J. (1990).** Molecular mechanics of the interactions of spermine with DNA: DNA bending as a result of ligand binding. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1271-1282.
- Feuerstein, B.G., Williams, L.D., Basu, H.S., Marton, L.J. (1991).** Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions. *J.Cell Biochem.*, **46**, 37-47.
- Fierro, F., Gutiérrez, S., Díez, B., Martín J.F. (1993).** Resolution of four large chromosomes in penicillin-producing filamentous fungi: the penicillin gene cluster is located on chromosome II (9.6 Mb) in *Penicillium notatum* and chromosome I (10.4 Mb) in *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Gen. Genet.* **241**; 573-578.
- 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., García-Estrada, C., Castillo, N.I., Rodríguez, R., Velasco-Conde, T. y Martín J.F. (2006).** Transcriptional and bioinformatic analysis of the 56.8 Kb DNA region amplified in tandem repeats containing the penicillin gene cluster in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal. Genet. Biol.* **43**; 618-629.
- Fleck, C.B. y Brock, M. (2009).** Re-characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* Ach1p: fungal CoA-transferases are involved in acetic acid detoxification. *Fungal Genet Biol.* (6-7): 473-85.
- Fleming, A. (1929).** On the antibacterial action of a *Penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B.influenzae*. *Brit. J. Exp. Pathol.* **10**; 226-236.
- Flores, H.E., Galston, A.W. (1982).** Analysis of Polyamines in Higher Plants by High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiol.* **69** : 701-706.
- Frère, J.M., Nguyen-Distéche, M., Coyette, J. y Joris B. (1993).** Mode of action: interaction with the penicillin binding proteins. En: *The Chemistry of β -lactams*. Ed. Page M.I. Blackie Academic and Professional. London, United Kingdom. pp 148-197.
- Friedrich, C.G, Demain, A.L. (1978).** Uptake and metabolism of alpha-aminoadipic acid by *Penicillium chrysogenum* Wis 54-1255. *Arch. Microbiol.* **4**;119: 43-7.

Fu, Y.H. y Marzluf, G.A. (1990). Site-directed mutagenesis of the 'zinc finger' DNA-binding domain of the nitrogen-regulatory protein NIT2 of *Neurospora*. *Mol. Microbiol.* **4**: 1847-52.

G

Gajiwala, K.S., Chen, H., Cornille, F., Roques, B.P., Reith, W., Mach, B. y Burley S.K. (2000). Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature.* **24**; 403: 916-21.

Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 334-61.

García-Domínguez, M., Liras, P. y Martín, J.F. (1991). Cloning and characterization of the isopenicillin N synthase gene of *Streptomyces griseus* NRRL3851 and studies of expression and complementation of the cephamycin pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents. Ch.* **35**; 44-52.

García-Estrada, C. y Martín J.F. (2007). Penicillin biosynthesis and secretion: Precursor and enzyme localization. En: *Mycotechnology: Present Status and Future Prospects*. Ed. Mahendra Rai. I.K. International Publishing House Pvt Ltd, New Delhi. pp 55 to 83.

García-Estrada, C., Ullán, R.V., Velasco-Conde, T., Godio, R.P., Teijeira, F., Vaca, I., Feltrer, R., Kosalková, K., Mauriz, E. y Martín J.F. (2008a). Post-translational enzyme modification by the phosphopantethenyl transferase is required for lysine and penicillin biosynthesis but not for roquefortine or fatty acid formation in *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. J.* **415**: 317-324.

García-Estrada, C., Vaca, I., Fierro, F., Sjollema, K., Veenhuis, M. y Martín J.F. (2008b). The unprocessed preprotein form IATC103S of the isopenicillin N acyltransferase is transported inside peroxisomes and regulates its self-processing. *Fungal. Genet. Biol.* **45**: 1043-52.

García-Estrada, C., Vaca, I., Ullán, R.V., van den Berg, M.A., Bovenberg, R.A. y Martín J.F. (2009). Molecular characterization of a fungal gene paralogue of the penicillin *penDE* gene of *Penicillium chrysogenum*. *BMC. Microbiology.* **9**: 104.

García, J., González, R., Gómez, D. y Schazzochio, C. (2004). Chromatin rearrangements in the prnD-prnB bidirectional promoter: dependence on transcription factors. *Eukaryotic Cell.* **3**: 144-156.

Garner, M.M. y Felsenfeld. G. (1987). Effect of Z-DNA on nucleosome placement. *J Mol Biol.* **5**; 196: 581-90.

Garrett, M.D., Zahner, J.E., Cheney, C.M. y Novick, P.J. (1994). GDI1 encodes a GDP dissociation inhibitor that plays an essential role in the yeast secretory pathway. *EMBO J.* **13**:1718-28.

Giesbrecht, P., Franz, M., Krüeger, D., Labischinski, H. y Wecke, J. (1991). Bacteriolysis of *Staphylococci* is only a side-effect of penicillin induced death. En: *50 years of penicillin application, history and trends*. Eds. Kleinkauf H. y von Döhren H. PUBLIC Ltd., Czech Republic, pp 353-363.

Gledhill, L., Greaves, P.A. y Griffin, J.P. (1997). Phenylacetyl-CoA ligase from *Penicillium chrysogenum*. Patent IPN WO97/02349, Smithkline Beecham UK.

Gooday, G.W. (1995b). Cell membrane. En: *The Growing Fungus*. Eds. Gow N.A.R y Gadd G.M. Chapman & Hall, London. pp 63-74.

Guo, S., Evans, S.A., Wilkes, M.B. y Bhattacharjee, J.K. (2001). Novel posttranslational activation of the LYS2-encoded alpha-aminoadipate reductase for biosynthesis of lysine and site-directed mutational analysis of conserved amino acid residues in the activation domain of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 183: 7120-5.

Gutiérrez, S., Díez, B., Montenegro, E. y Martín, J.F. (1991a). Characterization of the *Cephalosporium acremonium pcbAB* gene encoding α -aminoadipylcysteinyl- 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.* 17; 2354-2365.

Gutiérrez, S., Díez, B., Álvarez, E., Barredo, J.L. y Martín, J.F. (1991b). Expression of the *penDE* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding isopenicillin N acyltransferase in *Cephalosporium acremonium*: production of benzylpenicillin by the transformants. *Mol. Gen. Genet.* 225; 56-64.

Gutiérrez, S., Marcos, A.T., Casqueiro, J., Kosalková, K., Fernández, F., Velasco, J. y Martín, J.F. (1999). 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: 317-24.

H

Ha, H.C., Sirisoma, N.S., Kuppusamy, P., Zweier, J.L., Woster, P.M., Casero, R.A.Jr. (1998). The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A*, 95, 11140-11145.

Haas, H., Bauer, B., Redl, B., Stöffle, G. y Marzluf G.A. (1995). Molecular cloning and analysis of *nre*, the major nitrogen regulatory gene of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* 27:150-8.

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: 177-83.

Hampel, K.J., Crosson, P. y Lee, J.S. (1991). Polyamines favor DNA triplex formation at neutral pH. *Biochemistry*. 7; 30: 4455-9.

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, vol 1*. Glover D.M. (ed), IRL Press, Oxford, pp 109.

Harvey, W.R. y Nelson, N. (1992). Physiology of VATPases. *J. Exp. Biol.* **172**; 1-17. Review.

Hasan, R., Alam, M.K., Ali, R. (1995). Polyamine induced Z-conformation of native calf thymus DNA. *FEBS Lett.*, **368**, 27-30.

Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M. y Shevchenko, A. (2003). Fast response proteomics by accelerated in gel digestion of proteins. *Anal Chem.* **75**, 1300-1306.

Henriksen, C.M. (1996). Metabolic characterization of *Penicillium chrysogenum*. PhD Thesis. *Technical University of Denmark, Lyngby*.

Henriksen, C.M., Christensen, L.H., Nielsen, J. y Villadsen, J. (1996). Growth energetic and metabolic fluxes in continuous cultures of *Penicillium chrysogenum*. *J. Biotechnol.* **45**, 149-164.

Hersbach, G.J.M., van der Beek, C.P. y van Dijck, P.W.M. (1984). The penicillins: properties, biosynthesis, and fermentation. En: *Biotechnology, of Industrial Antibiotics*. Ed. Vandamme E.J. Marcel Dekker, New York. pp 45-140.

Hetteema, E.H., van Roermund, C.W., Distel, B., van den Berg, M., Vilela, C., Rodrigues-Pousada, C., Wanders, R.J. y Tabak, H.F. (1996). The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo. J.* **15**; 3813-3822.

Hillenga, D.J., Versantvoort, H.J., Driessen, A.J. y Konings, W.N. (1994). Structural and functional properties of plasma membranes from the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Eur. J. Biochem.* **224**; 581-587.

Hillenga, D.J., Versantvoort, H., van der Molen, S., Driessen, A. y Konings, W.N. (1995). *Penicillium chrysogenum* takes up the penicillin G precursor phenylacetic acid by passive diffusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**; 2589-2595.

Hollander, I.J., Shen, I.Q., Heim, J. y Demain, A.L. (1984). A pure enzyme catalyzing penicillin biosynthesis. *Science.* **224**; 610-612.

Hölttä, E. (1977). Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: purification and properties of polyamine oxidase. *Biochemistry.* 11; 16: 91-100.

Hönlinger, C. y Kubicek, C.P. (1989). Metabolism and compartmentation of α -amino adipic acid in penicillin-producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **993**; 204-211.

Horak, J. (1986). Amino acid transport in eukaryotic microorganisms. *Biochim Biophys Acta* **864**; 223- 256.

Horak, J. y Wolf, D.H. (1997). Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole. *J. Bacteriol.* **179**; 1541-1549.

Hou, M.H., Lin, S.B., Yuann, J.M., Lin, W.C., Wang, A.H., Kan, L.L. (2001). Effects of polyamines on the thermal stability and formation kinetics of DNA duplexes with abnormal structure. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 5121-5128.

Hunter, D.R. y Segel, I.H. (1971). Acidic and basic amino acid transport systems of *Penicillium chrysogenum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **144**; 168-183.

Hwang, K.H., Carapito, C., Bohmer, S., Leize, E., Van Dorselaer, A. y Bernhardt, R.(2006). Proteome analysis of *Schizosaccharomyces pombe* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **6**, 4115-4129.

I

Igarashi, K. (2006). Physiological functions of polyamines and regulation of polyamine content in cells. *Yakugaku Zasshi*, **126**, 455-471.

Igarashi, K., Kashiwagi, K. (1999). Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem. J.*, **344**, 633-642.

Igarashi, K., Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 559-564.

Igarashi, K., Ito, K., Kashiwagi, K. (2001). Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.*, **152**, 271-278.

Ingolia, T.D. y Queener, S.W. (1989). β -lactam biosynthetic genes. *Med Research Rev* **9**; 245-264.

Ishida, C., Aranda, C., Valenzuela, L., Riego, L., Deluna, A., Recillas-Targa, F., Filetici, P., López-Revilla, R. y González, A. (2006). The UGA3-GLT1 intergenic region constitutes a promoter whose bidirectional nature is determined by chromatin organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **59**: 1790-806.

Iverson, T.M., Luna-Chávez, C., Cecchini, G. y Rees, D.C. (1999). Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science*. 284: 1961-6.

J

Jack, D.L., Paulsen, I.T. y Saier, M.H. (2000). The aminoacid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transports specific for aminoacids, polyamines and organocations. *Microbiology* **146**; 1797-1814.

Jackowski, S. (1996). Cell cycle regulation of membrane phospholipid metabolism. *Biol Chem*. **271**; 20219-22.

Jaklitsch, W.M., Hampel, W., Rohr, M., Kubicek, C.P. y Gamerith, G. (1986). α -aminoadipate pool of *Penicillium chrysogenum*. *Can. J. Microbiol.* **32**; 473-480.

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.* **1**; 269: 247-53.

Jami, M.S., Barreiro, C., García-Estrada, C. y Martín, J.F. (2010). Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: Characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Mol Cell Proteomics*. **9**; 1182-1198.

Jensen, S.E., Leskiw, B.K., Vining, N.C., Aharanowitz, Y., Westlake, D.W.S. y Wolfe, S. (1986). Purification of isopenicillin N synthetase from *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.* **32**; 953-958.

Jensen, S.E., Wong, A., Rolins, M. y Wetlake, D.W.S. (1990). Purification and partial characterization of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl- D-valine synthetase from *Streptomyces clavuligerus*. *J. Bacteriol.* **172**; 7269-7271.

Jørgensen, H., Nielsen, J., Villadsen, J. y Møllgaard, H. (1995). Metabolic flux distributions in *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.* **46**; 117-131.

K

Keen, N.T. Specific Elicitors of Plant Phytoalexin Production: Determinants of Race Specificity in Pathogens? *Science*. 1975 Jan **10**; 187: 74-75.

Keszenman-Pereyra, D., Lawrence, S., Twfieg, M.E., Price, J. y Turner, G. (2003). The *npgA/cfwA* gene encodes a putative 4'-phosphopantetheinyl transferase which is essential for penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **43**: 186-90.

- Khokhlov, A.S., Tovarova, I.I., Borisova, L.N., Pliner, S.A., Shevchenko, L.N., Kornitskaia, E., Ivkina, N.S. y Rapoport, I.A. (1967).** The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*. *Doki Akad Nauk SSSR*. **177**: 232-235.
- Ki-bong, Oh., Hiroshi, Miyazawa., Toshimichi, Naito. e Hideaki, Matsuoka. (2001).** Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *PNAS* .**8**: 4664-4668.
- Kiel, J.A., van der Klei, I.J., van den Berg, M.A., Bovenberg, R.A. y Veenhuis, M. (2005).** Overproduction of a single protein, Pc-Pex11p, results in 2-fold enhanced penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet. Biol.* **42**: 154-64.
- Kiel, J.A., van den Berg, M.A., Fusetti, F., Poolman, B., Bovenberg, R.A.L., Veenhuis, M. y van der Klei, I.J. (2009).** Matching the proteome to the genome: the microbody of penicillin-producing *Penicillium chrysogenum* cells. *Funct. Integr. Genomics*. **9**: 167-184.
- Kionka, C. y Kunau, W.H. (1985).** Inducible β - oxidation pathway in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **161**; 153-157.
- Kirschbaum, J. (1986).** Penicillin G potassium. En: *Analytical profiles of drugs substances*. Ed. Florey K. Academic Press, New York. Vol 15, pp 427-509.
- Kleijn, R.J., Liu, F., van Winden, W.A., van Gulik, W.M., Ras, C. y Heijnen, J.J. (2007).** Cytosolic NADPH metabolism in penicillin-G producing and non-producing chemostat cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Metab. Eng.* **9**, 112-123.
- Kleinkauf, H. y Von Döhren, H. (1996).** A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur J Biochem.* **1**; 236: 335-51.
- Klionsky, D.J., Herman, P.K. y Emr, S.D. (1990).** The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **54** ; 266-292.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K. y Brul, S. (2002).** Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* **26**: 239-56.
- Koetsier, M.J., Gombert, A.K., Fekken, S., Bovenberg, R.A., van den Berg, M.A., Kiel, J.A., Jekel, P.A., Janssen, D.B., Pronk, J.T., van der Klei, I.J. y Daran, J.M. (2010).** The *Penicillium chrysogenum* *aclA* gene encodes a broad-substrate-specificity acyl-coenzyme A ligase involved in activation of adipic acid, a side-chain precursor for cephem antibiotics. *Fungal Genet. Biol.* **47**: 33-42.
- Kosalková, K., Marcos, A.T., Fierro, F., Hernando-Rico, V., Gutiérrez, S. y Martín, J.F. (2000).** A novel heptameric sequence (TTAGTAA) is the binding site for a protein required for

high level expression of *pcbAB*, the first gene of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *J. Biol. Chem.* **28**; 275: 2423-30.

Kosalková, K., Rodríguez-Sáiz, M., Barredo, J.L y Martín, J.F. (2007). Binding of the PTA1 transcriptional activator to the divergent promoter region of the first two genes of the penicillin pathway in different *Penicillium* species. *Curr. Genet.* **52**: 229-37.

Kosalková, K., García-Estrada, C., Ullán, R.V., Godio, R.P., Feltrer, R., Teijeira, F., Mauriz, E. y Martín, J.F. (2009). The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie.* **91**: 214-25. Epub 2008 Oct 9.

Krämer, R. (1996). Analysis and modeling of substrate uptake and product release by prokaryotic and eukaryotic cells. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* **54**; 31–74.

Kubicek, C.P., Hönliger, C.H., Jaklitsch, W.M., Affenzeller, K., Mach, R., Gerngross, T.U. y Ying, L. (1990). Regulation of lysine biosynthesis in the fungus *Penicillium chrysogenum*. En: *Amino Acids: Chemistry, Biology and Medicine*. Eds. Lubec G. y Rozenhal G.A. ESCOM, Science Publishers B.V., Leiden, The Netherlands.

Kubicek-Pranz, E.M. y Kubicek, C.P. (1991). Production and biosynthesis of amino acids by fungi In. En: *Handbook of Applied Mycology*. Vol. 4: *Fungal Biotechnology*. Eds. Arora D.K., Elander R.P. y Mukerji K.G. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 313-356.

Kudla, B., Caddick, M.X., Langdon, T., Martinez-Rossi, N.M., Bennett, C.F., Sibley, S., Davies, R.W. y Arst, H.N.Jr. (1990). The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBO. J.* **9**: 1355-64.

Kuhn, P.J., Trinci, A.P.J., Jung, M.J., Goosey, M.W. y Copping, L.G. (1989). *The Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi*. Springer Verlag, Berlin.

Kurylowicz, W., Kurzatkowski, W. y Kurzatkowski, J. (1987). Biosynthesis of benzylpenicillin by *Penicillium chrysogenum* and its Golgi apparatus. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* **35**; 699-724.

Kurzatkowski, W., Palissa, H., Van Liempt, H., von Döhren, H., Kleinklauf, H., Wolf, W.P. y Kurylowicz, W. (1991). Localization of isopenicillin N synthase in *Penicillium chrysogenum* PQ-96. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**; 517-520.

L

Lamas-Maceiras, M., Vaca, I., Rodríguez, E., Casqueiro, J. y Martín, J.F. (2006). Amplification and disruption of the phenylacetyl-CoA ligase gene of *Penicillium chrysogenum*

encoding an arylcapping enzyme that supplies phenylacetic acid to the isopenicillin N-acyltransferase. *Biochem. J.* **395**; 147-155.

Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C., y Walsh, C.T. (1996). A new enzyme superfamily the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* **3**: 923-36.

Landan, G., Cohen, G., Aharonowitz, Y., Shuali, Y., Graur, D., Shiffman, D. (1990). Evolution of isopenicillin N synthase genes may have involved horizontal gene transfer. *Mol Biol Evol* **7**; 399-406.

Large, P.J. (1992). Enzymes and pathways of polyamine breakdown in microorganisms. *FEMS Microbiol Rev.* **8**: 249-62.

Lein, J. (1986). The Panlabs penicillin strain improvement program. En: *Overproduction of microbial metabolites*. Eds. Vanek Z. y Hostalek Z. Butterworths, Boston. pp. 105–139.

Leitao, A.L., Enguita, F.J., de la Fuente, J.L., Liras, P y Martín, J.F. (1999). Inducing Effect of Diamines on Transcription of the Cephamycin C Genes from the *lat* and *pcbAB* Promoters in *Nocardia lactamdurans*. *J.Bacteriology.* **181**: 2379-2384.

Lendenfeld, T., Ghali, D., Wolschek, M., Kubicek- Pranz, E.M. y Kubicek, C.P. (1993). Subcellular compartmentation of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. The amino acid precursors are derived from the vacuole. *J. Biol. Chem.* **268**; 665-671.

Le Page, G.A. y Campbell, E. (1946). Preparation of streptomycin. *J. Biol. Chem.* **162**; 163-171.

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.

Liggett, R.W. y Koffler, H. (1948). Corn steep liquor in microbiology. *Bacteriol. Rev.* **12**: 297-311.

Lin, D.T. y Lechleiter, J.D. (2002). Mitochondrial targeted cyclophilin D protects cells from cell death by peptidyl prolyl isomerization. *J Biol Chem.* **277**: 31134-41.

Litzka O., Then Bergh K. y Brakhage A.A. (1996). The *Aspergillus nidulans* penicillin-biosynthesis gene *aat* (*penDE*) is controlled by a CCAAT-containing DNA element. *Eur. J. Biochem.* **15**; 238: 675-82.

Litzka, O., Papagiannopolous, P., Davis, M.A., Hynes, M.J. y Brakhage, A.A. (1998). The penicillin regulator PENR1 of *Aspergillus nidulans* is a HAP-like transcriptional complex. *Eur. J. Biochem.* **1**; 251: 758-67.

Liu, Gang., Casqueiro, Javier., Gutiérrez, Santiago., Kosalková, Katarina., Castillo, Nancy-Isabel. y Martín, J.F. (2001). Elicitation of penicillin biosynthesis by alginate in *Penicillium chrysogenum*, exerted on *pcbAB*, *pcbC*, and *penDE* genes at the transcriptional level. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 812-818.

López-Nieto, M.J., Ramos, F.R., Luengo, J.M. y Martín, J.F. (1985). Characterization of the biosynthesis *in vivo* of α -aminoadipyl-cysteinylvaline in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**; 343-351.

Lösel, D.M. (1989). Lipids in the structure and function of fungal membranes. En: *The Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi*. Eds. Kuhn P.J., Trinci A.P.J., Jung M.J., Goosey M.W. y Copping L.G. Springer Verlag, Berlin.

Lovaas, E. (1997). Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. *Adv. Pharmacol.*, **38**, 119-149.

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**: 207-11.

Luengo, J.M., Domínguez, J.M., Cantoral, J.M. y Martín, J.F. (1986a). Formation of bulges associated with penicillin production in high producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Microbiol.* **13**; 203-207.

M

MacCabe, A.P., van Liempt, H., Palissa, H., Unkles, S., Riach, M.B.R., Pfeifer, E., von Dörhen, H. y Kinghorn, J.R. (1991). δ -(L- α -aminoadipyl)-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.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. ColdSpring Harbor Laboratory Press, New York.

Márquez-Fernández, O., Trigos, A., Ramos-Balderas, J.L., Viniestra-González, G., Deising, H.B. y Aguirre, J. (2007). Phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development. *Eukaryot. Cell.* **6**: 710-20.

Martín, J.F. (1992). Clusters of genes for the biosynthesis of antibiotics: regulatory genes and overproduction of pharmaceuticals. *J. Ind. Microbiol.* **9**; 73-90.

Martín, J.F. (1998). New aspects of gene and enzymes for β -lactam antibiotic biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**; 1-15.

- Martín, J.F. (2000a).** α -Aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetases in β -lactam producing organisms. From Abraham's discoveries to novel concepts of non-ribosomal peptide synthesis. *J. Antibiot.* **53**; 1008-1021.
- Martín, J.F. (2000b).** Molecular control of expression of penicillin biosynthesis genes in fungi: regulatory proteins interact with a bidirectional promoter region. *J. Bacteriol.* **182**; 2355–2362.
- Martín, J.F. y Demain, A.L. (1980).** Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* **44**; 230-251.
- Martín, J.F. y Liras, P. (1989a).** Enzymes involved in penicillin, cephalosporin and cephamycin biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng/Biotechnol.* **39**; 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., Ingolia, T.D., y Queener, S.W. (1990).** Molecular genetics of penicillin and cephalosporin antibiotic biosynthesis. In *Molecular Industrial Mycology: Systems and Applications for Filamentous Fungi*. Eds., Leong S.A. y R.M. Berka, pp. 149-196, Marcel Dekker, New York.
- Martín, J.F., Gutiérrez, S., Fernández, F.J., Velasco, J., Fierro, F., Marcos, A.T. y Kosalkova, K. (1994).** Expression of genes and processing of enzymes for the biosynthesis of penicillins and cephalosporins. *Antonie van Leeuwenhoek* **65**; 227-243.
- Martín, J.F. y Gutiérrez, S. (1995).** Genes for β -lactam antibiotic biosynthesis. *Antonie. Leeuwenhoek.* **67**; 182-200.
- Martín, J.F., Casqueiro, J., Kosalková, K., Marcos, A.T. y Gutiérrez, S. (1999).** Penicillin and cephalosporin biosynthesis: mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **75**: 21-31.
- Martín, J.F., Casqueiro, J. y Liras, P. (2005).** Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. *Curr Opin Microbiol* **8**; 282-293.
- Martín, J.F., Ullán, R.V. y García-Estrada, C. (2010).** Regulation and compartmentalization of β -lactam biosynthesis. *Microbial Biotechnology* **3**; 285–299.
- Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Ferrero, M.A., Fernández-Cañón, J.M. y Luengo, J.M. (1989).** Repression of phenylacetic acid transport system in *Penicillium chrysogenum* Wis 54-1255 by free amino acids and ammonium salts. *J. Antibiot. (Tokyo)* **42**; 1416-1423.
- Marion, L.J., Pegg, A.E. (1995).** Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **35**, 55-91.

Marzluf, G.A. (1993). Regulation of sulfur and nitrogen metabolism in filamentous fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:31-55.

Marzluf, G.A. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 17-32.

Masurekar, P.S. y Demain, A.L. (1974). Insensitivity of homocitrate synthase in extracts of *Penicillium chrysogenum* to feedback inhibition by lysine. *Appl. Microbiol.* **28**: 265-70.

Matthews, H.R. (1993). Polyamines, chromatin structure and transcription. *Bioessays*, **15**, 561-566.

Mcknight, S., Tjian, R. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell.***12**: 46: 795-805.

Melin, P., Schnurer, J., y Wagner, E.G. (2002). Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. *Mol. Genet. Genomics* **267**, 695-702.

Melin, P., Schnürer, J. y Wagner, E.G. (2003). Characterization of *phiA*, a gene essential for phialide development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 40: 234-41.

Meister, A. y Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**; 711-760. (Review).

Miller, J.H. (1972). "Experiments in molecular genetics". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Miller, J., Mclachlan, A.D. y Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor III A from *Xenopus* oocytes. *EMBO. J.* **4**: 1609-14.

Mizote, T., Tsuda, M., Smith, D.D., Nakayama, H. y Nakazawa, T. (1999). Cloning and characterization of the *thiD/J* gene of *Escherichia coli* encoding a thiamin-synthesizing bifunctional enzyme, hydroxymethylpyrimidine kinase/phosphomethylpyrimidine kinase. *Microbiology* **145**, 495-501.

Montenegro, E., Barredo, J.L., Gutiérrez S., Díez, B., Álvarez, E., Martín, J.F. (1990). Cloning, characterization of the acyl-CoA: 6-amino penicillanic acid acyltransferase gene of *Aspergillus nidulans* and linkage to the isopenicillin N synthase gene. *Mol. Gen. Genet.* **221**; 322-330.

Morgan, J.E., Blankenship, J.W., Matthews, H.R. (1987). Polyamines and acetylpolyamines increase the stability and alter the conformation of nucleosome core particles. *Biochemistry*, **26**, 3643-3649.

- Morishima, N., Nakagawa, K., Yamamoto, E. y Shibata, T. (1990).** A subunit of yeast site-specific endonuclease Scel is a mitochondrial version of the 70-kDa heat shock protein. *J Biol Chem.* 265: 15189-97.
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R.P. y Latgé, J.P. (2000).** Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem.* 19; 275: 14882-9.
- Moyer, A.J. y Coghill, R.D. (1946a).** Penicillin VIII. Production of penicillin in surface cultures. *J. Bacteriol.* **51**; 57-78.
- Moyer, A.J. y Coghill, R.D. (1946b).** Penicillin IX. The laboratory scale production of penicillin in submerged cultures by *Penicillium notatum* Westling (NRRL 832). *J. Bacteriol.* **51**; 79-93.
- Moyer, A.J. y Coghill, R.D. (1947).** Penicillin IX. The effect of phenylacetic acid on penicillin production. *J. Bacteriol.* **53**; 329-341.
- Müller, M.M., Gerster, T. y Schaffner, W. (1988).** Enhancer sequences and the regulation of gene transcription. *Eur. J. Biochem.* **176**: 485-95.
- Müller, W.H. (1991).** Localization of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. PhD Thesis. University of Utrecht, Utrecht.
- Müller, W.H., van der Krift, T.P., Krouwer, A.J., Wösten, H.A., van der Voort, L.H., Smaal E.B., Verkleij, A.J. (1991).** Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.* **10**; 489-495.
- Müller, W.H., Bovenberg, R.A., Groothuis, M.H., Kattevilder, F., Smaal, E.B., van der Voort, L.H., Verkleij, A.J. (1992).** Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1116**; 210-213.
- Müller, W.H., Essers, J., Humbel, B.M., Verkleij, A.J. (1995).** Enrichment of *Penicillium chrysogenum* microbodies by isopycnic centrifugation in nycodenz as visualized with immunoelectron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* **1245**; 215-220.
- Mullis, K.B. y Faloona, F.A. (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**; 335-350.

N

- Nasution, U., van Gulik, W.M., Ras, C., Proell, A. y Heijnen, J.J. (2008).** A metabolome study of the steady-state relation between central metabolism, amino acid biosynthesis and penicillin production in *Penicillium chrysogenum*. *Metab. Eng.* **10**, 10-23.

Nelson, N., Perzov, N., Cohen, A., Hagai, K., Padler, V. y Nelson, H. (2000). The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *J Exp Biol.*; 203: 89-95.

Neuss, N., Miller, R.D., Affolder, C.A., Nakatsukosa, W., Mabe, J., Huckstepp, L., De la Higuera, A., Hunt, H., Occolowitz, J. y Gilham, J.H. (1980). High performance liquid chromatography (HPLC) of natural products. 3. Isolation of new tripeptides from the fermentation broth of *P. chrysogenum*. *Helv. Chim. Acta.* 63: 1119 -1129.

Newbert, R.W., Barton, B., Greaves, P., Harper, J. y Turner, G. (1997). Analysis of a commercially improved *Penicillium chrysogenum* strain series: involvement of recombinogenic regions in amplification and deletion of the penicillin biosynthesis gene cluster. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19; 18-27.

Nielsen, J. (1995). Physiological engineering aspects of *Penicillium chrysogenum*. PhD. Polyteknisk Forlag, Lyngby, Denmark.

Nielsen, J. (1998). The role of metabolic engineering in the production of secondary metabolites. *Curr. Opin. Microbiol.* 1; 330-336.

Nosaka, K., Nishimura, H., Kawasaki, Y., Tsujihara, T. y Iwashima, A. (1994). Isolation and characterization of the *THI6* gene encoding a bifunctional thiamin-phosphate pyrophosphorylase/hydroxyethylthiazole kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 30510-30506.

O

Ogbourne, S., Antalis, T.M. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.* 1; 331: 1-14. Review.

Osteras, M., Boncompagni, E., Vincent, N., Poggi, M.C. y Le Rudulier, D. (1998). Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* bet operon: choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 11394-9.

O'Sullivan, J. y Sykes, R.B. (1986). β -Lactam antibiotics. En: *Biotechnology, a comprehensive treatise in 8 volumes*, vol 4. Eds. Pape H. y Rehm H-J. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany. pp 247-281.

Özdestan, Ö y Üren, A. (2009). A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Talanta.* 15;78: 1321-6. Epub 2009 Feb 10.

P

Pabo, C.O., Sauer, R.T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61; 1053-95. Review.

- Palackal, N.T., Burczynski, M.E., Harvey, R.G y Penning, T.M. (2001).** Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols by ubiquitously expressed aldehyde reductase (AKR1A1). *Chem Biol Interact.* 130-132: 815-24.
- Pang, C.P., Chakravarti, B., Adlington, R.M., Ting, H.H., White, R.L., Jayatilake, G.S., Baldwin, J.E. y Abraham, E.P. (1984).** Purification of the isopenicillin N synthetase. *Biochem. J.* **222**; 789-795.
- Panagiotidis, C.A., Artandi, S., Calame, K., Silverstein, S.J. (1995).** Polyamines alter sequence-specific DNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 1800-1809.
- Papagiannopoulos, P., Andrianopoulos, A., Sharp, J.A., Davis, M.A. y Hynes, M.J. (1996).** The *hapC* gene of *Aspergillus nidulans* is involved in the expression of CCAAT-containing promoters. *Mol. Gen. Genet.* **24**; 251: 412-21.
- Parchment, R.E. (1993).** The implications of a unified theory of programmed cell death, polyamines, oxyradicals and histogenesis in the embryo. *Int.J.Dev.Biol.*, **37**, 75-83.
- Paulus, T.J. y Davis, R.H. (1982).** Metabolic sequestration of putrescine in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**:228-233.
- Paulus, T.J., Cramer, C.L. y Davis, R.H. (1983).** Compartmentation of spermidine in *Neurospora crassa*. *J.Biol.Chem.***258**:8608-8612.
- Pedreño, E., Lopez-Contreras, A.J., Cremades, A., Peñafiel, R. (2005).** Protecting or promoting effects of spermine on DNA strand breakage induced by iron or copper ions as a function of metal concentration. *J.Inorg.Biochem.*, **99**, 2074-2080.
- Pegg, A.E. y Coward, J.K. (1985).** Growth of mammalian cells in the absence of the accumulation of spermine. *Biochem Biophys Res Commun.* **27**; 133: 82-9.
- Pegg, A.E. y Coward, J.K. (1993).** Effect of N-(n-butyl)-1,3-diaminopropane on polyamine metabolism, cell growth and sensitivity to chloroethylating agents. *Biochem Pharmacol.* **17**; 46: 717-24.
- Pegg, A.E., Xiong, H., Feith, D.J. y Shantz, L.M. (1998).** S-adenosylmethionine decarboxylase: structure, function and regulation by polyamines. *Biochem Soc Trans.* **26**: 580-6.
- Peñalva, M.A., Moya, A., Dopazo, J., Ramón, D. (1990).** Sequences of isopenicillin N synthetase genes suggest horizontal gene transfer from prokaryotes to eukaryotes. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* **241**; 164-169.

Pfeffer, L.M., Yang, C.H., Pfeffer, S.R., Murti, A., McCormack, S.A., Johnson, L.R. (2000). Inhibition of ornithine decarboxylase induces STAT3 tyrosine phosphorylation and DNA binding in IEC-6 cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **278**, C331-C335.

Pingoud, A. (1985). Spermidine increases the accuracy of type II restriction endonucleases. Suppression of cleavage at degenerate, non-symmetrical sites. *Eur J Biochem.* 15; 147: 105-9.

Q

Queener, S.F. y Neuss, N. (1982). The biosynthesis of β -lactam antibiotics. En: *The chemistry and biology of β -lactam antibiotics*. Eds. Morin R. B. y Morgan N. Academic Press. London. pp. 1-81.

Quigley, G.J., Teeter, M.M., Rich, A. (1978). Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S A*, **75**, 64-68.

R

Radman, Romeo., Saez, Teresa., Bucke, Chirstopher. y Keshavarz, Tajalli. (2003). Elicitación of plants and microbial cell system. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**. 91-102.

Radman, Romeo., Bucke, Chirstopher. y Keshavarz, Tajalli. (2004). Elicitor effects on *Penicillium chrysogenum* morphology in submerged cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **40**. 229-233.

Ragheb, J.A. y Dottin, R.P. (1987). Structure and sequence of a UDP glucose pyrophosphorylase gene of *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* 15: 3891-906.

Ramón, D., Carramolino, L., Patiño, C., Sánchez, F. y Peñalva, M.A. (1987). Cloning and characterization of the isopenicillin N synthetase gene mediating the formation of the β -lactam ring in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* **57**; 171-181.

Ramos, F.R., López-Nieto, M.J. y Martín ,J.F. (1985). Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts δ -(L- α - amino adipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **27**; 380-387.

Ransom, R.W., Stec, N.L. (1988). Cooperative modulation of [3H] MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J.Neurochem.*, **51**, 830-836.

Raper, K.B. (1946). The development of improved penicillin-producing molds. *Ann. NY. Acad. Sci.* **58**; 41-56.

- Razin, S., Bachrach, U. y Gery, I. (1958).** Formation of beta-alanine from spermine and spermidine by *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature*. 8; 181: 700-1.
- Rea, P.A., Li, S., Lu, Y.P., Drozdowicz, Y.M. y Martinoia, E. (1998).** From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **49**; 727-760.
- Regenberg, B., Düring-Olsen, L., Kielland-Brandt, M.C. y Holmberg, S. (1999).** Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **36**; 317-328.
- Renno, D.V., Saunders, G., Bull, A.T y Holt, G. (1992).** Transcript analysis of penicillin genes from *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* 21: 49-54.
- Revilla, G., López-Nieto, M.J., Luengo, J.M. y Martín, J.F. (1984).** Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **37**: 781-9.
- Revilla, G., Ramos, F.R., López-Nieto, M.J., Álvarez, E. y Martín, J.F. (1986).** Glucose represses formation of delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine and isopenicillin N synthase but not penicillin acyltransferase in *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* **168**: 947-52.
- Roach, P.L., Clifton, I.J., Fülöp, V., Harlos, K., Barton, G.J., Hajdu, J., Andersson, I., Schofield, C.J., Baldwin, J.E. (1995).** Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes. *Nature*. **375**; 700-704.
- Roach, P.L., Clifton, I.J., Hensgens, C.M.H., Shibata, N., Schofield, C.J., Hajdu, J. y Baldwin, J.E. (1997).** Structure of isopenicillin N synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation. *Nature*. **387**; 827-830.
- Rodríguez-Sáiz, M., Barredo, J.L., Moreno, M.A., Fernández-Cañón, J.M., Peñalva, M.A. y Díez, B. (2001).** Reduced Function of a Phenylacetate-Oxidizing Cytochrome P450 Caused strong Genetic Improvement in Early Phylogeny of Penicillin-Producing Strains. *J. Bacteriol.* **183**; 5465-5471.
- Rouzina, I., Bloomfield, V.A. (1998).** DNA bending by small, mobile multivalent cations. *Biophys.J.*, **74**, 3152-3164.
- Ruijter, G.J. y Visser, J. (1997).** Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151: 103-14.
- Ruíz-Herrera, J., Ruíz-Medrano, R., Domínguez, A. (1995).** Selective inhibition of cytosine DNA methylases by polyamines. *FEBS Lett.*, **357**, 192-196.

S

- Salmond, G.P.C., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B. y Williams, P. (1997).** Bacterial N-acyl-homoserine-lactone-dependent signaling and its potencial biotechnological applications. *Trends Biotech.* **15**:458-464.
- Sambrook, J., Maniatis, T y Fritsch, E.F. (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001).** *Molecular Cloning : a laboratory manual.* 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samson, S.M., Belagaje, R., Blankenship, D.T., Chapman, J.L., Perry, D., Skatrud, P.L., van Frank, R.M., Abraham, E.P., Baldwin, J.E., Kiner, S.W. e Ingolia, T.D. (1985).** Isolation, sequence, determination and expression in *E. coli* of the isopenicillin N synthase from *Cephalosporium acremonium*. *Nature.* **318**; 191-194.
- Sánchez, L y Braña, A. (1996).** Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology.* **142**, 1209-1220.
- Schilling, B. y Lerch, K. (1995).** Cloning, sequencing and heterologous expression of the monoamine oxidase gene from *Aspergillus niger*. *Mol. Gen. Genet.* **247**; 430-438.
- Schwartz, R., Lucas, M., T., Escalante, L., Vázquez, G. y Sánchez, S. (1988).** Glutathione formation in *Penicillium chrysogenum*: stimulatory effect of ammonium. *J Gen Microbiol* **134**; 1117-1121.
- Seaston, A., Inkson, C. y Eddy, A.A. (1973).** The absorption of protons with specific amino acids and carbohydrates by yeast. *Biochem. J.* **134**; 1031-140.
- Seiler, N. (2004a).** How important is the oxidative degradation of spermine?: minireview article. *Amino. Acids*, **26**, 317-319.
- Seiler, N., Delcros, J.G., Moulinoux, J.P. (1996).** Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28**, 843-861.
- Seno, E.T. y Baltz, R.H. (1989).** Structural organization and regulation of antibiotic biosynthesis and resistance genes in actinomycetes. En: *Regulation of secondary metabolism in actinomycetes*. Ed. Shapiro S. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. pp. 1-48.
- Seufert, W. y Jentsch, S.(1990).** Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* **2**: 543-50.

- Shen, Y.Q., Heim, J., Solomon, N.A., Wolfe, S. y Demain, A.L. (1984).** Repression of β -lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources. *J. Antibiot. (Tokyo)* **37**; 503-511.
- Sheterline, P., Clayton, J. y Sparrow, J. (1995).** Actin. *Protein Profile.* (1):1-103.
- Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H. y Mann, M. (1996).** Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14440-14445.
- Shwab, E.K., Bok, J.W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S. y Keller, N.P. (2007).** Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryot. Cell.* **6**:1656-64.
- Singh, I., Lazo, O., Dhaunsi, G.S. y Contreras, M. (1992).** Transport of fatty acids into human and rat peroxisomes. Differential transport of palmitic and lignoceric acids and its implication to Xadrenoleukodystrophy. *J. Biol. Chem.* **267**; 13306- 13313.
- Skatrud, P.L. (1992).** Genetic engineering of β - lactam antibiotic biosynthetic pathways in filamentous fungi. *Trends Biotechnol.* **10**; 324-329.
- Skye, G.E. y Segel, I.H. (1970).** Independent regulation of cysteine and cystine transport in *Penicillium chrysogenum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **138**; 306-318.
- Slocum, R.D., Flores, H.E., Gaiston, A.W. y Weinstein, L.H. (1988).** Improved method for HPLC analysis of polyamines, agmatine and aromatic monoamines in plant tissue. *Plant Physiol.* **89**, 512-517.
- Smith, D.J., Bull, J.H., Edwards, J. y Turner, G. (1989).** Amplification of the isopenicillin N synthetase gene in a strain of *Penicillium chrysogenum* producing high levels of penicillin. *Mol. Gen. Genet.* ; **216**: 492-7.
- Smith, D.J., Burnham, M.K., Edwards, J., Earl, A.J. y Turner, G. (1990a).** Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology. (NY)* **8**; 39-41.
- Smith, G. (1960).** *An Introduction to Industrial Mycology.* 5th . Ed. Edward Arnold, Ltd. London.
- Spotheim-Maurizot, M., Ruiz, S., Sabattier, R., Charlier, M. (1995).** Radioprotection of DNA by polyamines. *Int.J.Radiat.Biol.*, **68**, 571-577.
- Spröte, P., Hynes, M.J., Hortschansky, P., Shelest, E., Scharf, D.H., Wolke, S.M. y Brakhage, A.A. (2008).** Identification of the novel penicillin biosynthesis gene *aatB* of *Aspergillus nidulans* and its putative evolutionary relationship to this fungal secondary metabolism gene cluster. *Mol Microbiol.* **70**: 445-61.

Stehle, T. y Schulz, G.E. (1992). Refined structure of the complex between guanylate kinase and its substrate GMP at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol.* 224: 1127-41.

Steidl, S., Papagiannopoulos, P., Litzka, O., Andrianopoulos, A., Davis, M.A., Brakhage A.A. e Hynes, M.J. (1999). AnCF, the CCAAT binding complex of *Aspergillus nidulans*, contains products of the *hapB*, *hapC*, and *hapE* genes and is required for activation by the pathway-specific regulatory gene *amdR*. *Mol. Cell. Biol.* 19: 99-106.

Stein, T., Kluge, B., Vater, J., Franke, P., Otto, A. y Wittmann-Liebold, B. (1995). Gramicidin S synthetase 1 (phenylalanine racemase), a prototype of amino acid racemases containing the cofactor 4'-phosphopantetheine. *Biochemistry.* 34: 4633-42.

Suárez, T. y Peñalva, M.A. (1996). Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol. Microbiol.* 20: 529-40.

Suh, J.H., Shin, C.S. (2000). Analysis of the morphologic changes of *Monascus* sp. J101 cells cocultured with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* 193: 143-7.

Sulter, G.J., Harder, W. y Veenhuis, M. (1993). Structural and functional aspects of peroxisomal membranes in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 11; 285-297.

T

Tabak, H.F., Elgersma, Y., Hetteema, E., Franse, M.M., Voorn-Brouwer, T. y Distel, B. (1995). Transport of proteins and metabolites across the impermeable membrane of peroxisomes. *Cold.Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 60; 649-655.

Tabor, W.C y Tabor, H. (1985). Polyamines in Microorganisms. *Microbiological Reviews* 49 p 81-99.

Takeda, M., Chen, W.J., Saltzgaber, J. y Douglas, M.G. (1986). Nuclear genes encoding the yeast mitochondrial ATPase complex. Analysis of ATP1 coding the F1-ATPase alpha-subunit and its assembly. *J Biol Chem.* 261: 15126-33.

Theilgaard, H.B.A., Kristiansen, K.N., Enriksen, C.M. y Nielsen, J. (1997). Purification and characterization of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl- D-valine synthetase from *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. J.* 327; 185-191.

Thieringer, R. y Kunau, W.H. (1991a). The β - oxidation system in catalase-free microbodies of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Purification of a multifunctional protein possessing 2-enoyl-CoA hydratase, L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, and 3-hydroxyacyl-CoA epimerase activities. *J Biol Chem* 266; 13110-13117.

- Thieringer, R. y Kunau, W.H. (1991b).** β -oxidation system of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Structural characterization of the trifunctional protein. *J Biol Chem* **266**; 13118-13123.
- Thomas, T.J., Bloomfield, V.A. (1984).** Ionic and structural effects on the thermal helix-coil transition of DNA complexed with natural and synthetic polyamines. *Biopolymers*, **23**, 1295-1306.
- Thomas, T., Thomas, T.J. (1993).** Structural specificity of polyamines in modulating the binding of estrogen receptor to potential Z-DNA forming sequences. *J.Recept.Res.*, **13**, 1115-1133.
- Thomas, T., Thomas, T.J. (2001).** Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell.Mol.Life Sci.* ,**58**, 244-258.
- Tice-Baldwin, K., Fink, G.R. y Arndt, K.T. (1989).** BAS1 has a Myb motif and activates HIS4 transcription only in combination with BAS2. *Science*. **17**; 246: 931-5.
- Tilburn, J., Sarkar S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A. y Arst HN Jr. (1995).** The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **15**; 14: 779-90.
- Timothy G, Shimmel., Allen D, Coffman. y Sarah J, Parsons. (1998).** Effect of butyrolactone I on the producing fungus *Aspergillus terreus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3707-3712.
- Tjian, R y Maniatis, T. (1994).** Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell.* **8**; 77: 5-8.
- Tobin, M.B., Fleming, M.D., Skatrud, P.L. y Miller, J.R. (1990).** Molecular characterization of the acylcoenzyme A:isopenicillin N acyltransferase gene (*penDE*) from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans* and activity of recombinant enzyme in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**; 5908-5914.
- Tobin, M.B., Kovacevic, S., Madduri, K., Hoskins, J.A., Skatrud, P.L., Vining, L.C., Stuttard, C. y Miller, J.R. (1991).** Localization of the lysine ϵ - aminotransferase (*lat*) and δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl- D-valine synthetase (*pcbAB*) genes from *Streptomyces clavuligerus* and production of lysine epsilon-aminotransferase activity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**; 6223-6229.
- Tobin, M.B., Baldwin, J.E., Cole, S.C.J., Miller, J.R., Skatrud, P.L. y Sutherland, J.D. (1993).** The requirement for subunit interaction in the production of *Penicillium chrysogenum* acyl-coenzyme A: isopenicillin N acyltransferase in *Escherichia coli*. *Gene.* **132**; 199-206.
- Tomitori, H., Kashiwagi, K., Sakata, K., Kakinuma, Y., Igarashi, K. (1999).** Identification of a gene for a polyamine transport protein in yeast. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3265-3267.

Trip, H., Evers, M.E., Konings, W.N. y Driessen, A.J. (2002). Cloning and characterization of an aromatic amino acid and leucine permease of *Penicillium chrysogenum*. *Biochi. Biophys. Acta.* **1565**; 73-80.

U

Uemura, T., Kashiwagi, K., Igarashi, K. (2005). Uptake of putrescine and spermidine by Gap1p on the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* **328**: 1028-33.

Uemura, T., Kashiwagi, K., Igarashi, K. (2007). Polyamine uptake by DUR3 and SAM3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.*, **282**, 7733-7741.

Ullán, R.V., Casqueiro, J., Bañuelos, O., Fernández, F.J., Gutiérrez, S. y Martín, J.F. (2002a). A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in *Acremonium chrysogenum*. *J. Biol. Chem.* **277**; 46216-46225.

Ullán, R.V., Liu, G., Casqueiro, J., Gutiérrez, S., Bañuelos, O. y Martín, J.F. (2002b). The *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a putative multidrug efflux pump protein that significantly increases cephalosporin C production. *Mol. Genet. Genomics.* **267**; 673-683.

Ullán, R.V., Campoy, S., Casqueiro, J., Fernández, F.J. y Martín, J.F. (2007). Deacetylcephalosporin C production in *Penicillium chrysogenum* by expression of the isopenicillin N epimerization, ring expansion, and acetylation genes. *Chem. Biol.* **14**; 329-339.

V

Valenciano, S., de Lucas, J.R., Pedregosa, A., Monistrol, I.F. y Laborda, F. (1996). Induction of β -oxidation enzymes and microbody proliferation in *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol* **166**; 336-341.

Valenciano, S., de Lucas, J.R., van der Klei, I., Veenhuis, M. y Laborda F. (1998). Characterization of *Aspergillus nidulans* peroxisomes by immunoelectron microscopy. *Arch Microbiol* **170**; 370-376.

van Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A.G., Röthlisberger, M. y Witholt, B. (2001). Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk* genes. *Microbiology.* **147**: 1621-30.

van de Kamp, M., Driessen, A.J. y Konings, W.N. (1999). Compartmentalization and transport in β -lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* **75**; 41-78.

- van den Berg, M. A., Westerlaken, I., Leeflang, C., Kerkman, R. y Bovenberg, R.A. (2007).** Functional characterization of the penicillin biosynthetic gene cluster of *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255. *Fungal. Genet. Biol.* **44**; 830-844.
- van den Bossche, H. (1989).** Importance and role of sterols in fungal membranes. En: *The Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi*. Eds. Kuhn P.J., Trinci A.P.J., Jung M.J., Goosey M.W. y Copping L.G. Springer-Verlag, Berlin. pp 135–157.
- van der Lende, T.R., van de Kamp, M., Berg, M., Sjollem, K., Bovenberg, R.A., Veenhuis, M., Konings, W.N. y Driessen, A.J. (2002a).** δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, that mediates the first committed step in penicillin biosynthesis, is a cytosolic enzyme. *Fungal. Genet. Biol.* **37**; 49-55.
- van der Lende, T.R., Breeuwer, P., Abee, T., Konings, W.N. y Driessen, A.J. (2002b).** Assessment of the microbody luminal pH in the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Biochim Biophys Acta* **1589**; 104-111.
- van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. y Konings, W.N. (1995).** The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **59**; 304–322.
- van Dijken, J.P. y Veenhuis, M. (1980).** Cytochemical localization of glucosa oxidase in peroxisomes of *Aspergillus niger*. *Eur J. Appl. Microbiol.* **9**; 275-283.
- van Dyke, N., Baby, J. y Van Dyke, M.W. (2006).** Stm1p, a ribosome-associated protein, is important for protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under nutritional stress conditions. *J Mol Biol.* **358**: 1023-31.
- van Gulik, W.M., de Laat, W.T., Vinke, J.L. y Heijnen, J.J. (2000).** Application of metabolic flux analysis for the identification of metabolic bottlenecks in the biosynthesis of penicillin-G. *Biotechnol. Bioeng.* **68**, 602-618
- van Liempt, H., von Döhren, H. y Kleinkauf, H. (1989).** δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cystenyl-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. The first enzyme in penicillin biosynthesis is a multifunctional peptide synyhetase. *J Biol Chem.* **264**; 3680-3684.
- van Roermund, C.W., Elgersma, Y., Singh, N., Wanders, R.J. y Tabak, H.F. (1995).** The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under *in vivo* conditions. *Embo. J.* **14**; 3480- 3486.
- Velasco, J., Gutierrez, S., Fernandez, F.J., Marcos, A.T., Arenos, C. y Martin, J.F. (1994).** Exogenous methionine increases levels of mRNAs transcribed from *pcbAB*, *pcbC*, and *cefEF* genes, encoding enzymes of the cephalosporin biosynthetic pathway, in *Acremonium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* **176**: 985-91.

Vida, T.A. y Em, S.D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.* **128**, 779-792.

Vodisch, M., Albrecht, D., Lessing, F., Schmidt, A.D., Winkler, R., Guthke, R., Brakhage, A.A., y Knemeyer, O. (2009). Two-dimensional proteome reference maps for the human pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Proteomics* **9**, 1407-1415

Vousden, W. y Turner, G. (2001). Fungal Genetics Conference. Fungal Genet Newsletter 48:160.

W

Waksman, S. A. (1947). What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Micology.* **39**; 565-569.

Wang, Y., Xiao, L., Thiagalingam, A., Nelkin, B.D., Casero, R.A.Jr. (1998). The identification of a cis-element and a trans-acting factor involved in the response to polyamines and polyamine analogues in the regulation of the human spermidine/spermine N1-acetyltransferase gene transcription. *J. Biol. Chem.*, **273**, 34623-34630.

Wang, F.Q., Liu, J., Dai, M., Ren, Z.H., Su, C.Y. y He, J.G. (2007). Molecular cloning and functional identification of a novel phenylacetyl-CoA ligase gene from *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**; 453-458.

Wanner, G. y Theimer, R.R. (1982). Two types of microbodies in *Neurospora crassa*. *Ann. NY. Acad. Sci.* **286**; 269-284.

Watanabe, S., Kusama-Eguchi, K., Kobayashi, H., Igarashi, K. (1991). Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J. Biol. Chem.*, **266**, 20803-20809.

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.

White, W.H., Gunyuzlu, P.L., Toyn, J.H. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* is capable of de Novo pantothenic acid biosynthesis involving a novel pathway of beta-alanine production from spermine. *J Biol Chem.* **6**; 276: 10794-800.

White, W.H., Skatrud, P.L., Xue, Z. y Toyn, J.H. (2003). Specialization of function among aldehyde dehydrogenases: the *ALD2* and *ALD3* genes are required for beta-alanine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **163**: 69-77.

Whiteman, P.A., Abraham, E.P., Baldwin, J.E., Fleming, M.D. y Schofield, C.J. (1990). Acylcoenzyme A: 6-aminopenicillanic acid acyltransferase from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans*. *FEBS. Lett.* **262**; 342-344.

Williams, K., Romano, C., Molinoff, P.B. (1989). Effects of polyamines on the binding of [3H]MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. *Mol.Pharmacol.* **36**, 575-581.

Williamson, J.M. y Brown, G.M. (1979). Purification and properties of L-Aspartate-alpha-decarboxylase, an enzyme that catalyzes the formation of beta-alanine in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **25**; 254: 8074-82.

X

Xie, X., Gillies R.J., Gerner, E.W. (1997). Characterization of a diamine exporter in Chinese hamster ovary cells and identification of specific polyamine substrates. *J. Biol. Chem.*, **272**, 20484-20489.

Y

Yamada, H., Kimiyasu, I. y Yoshiki, T. (1980). Oxidation of Polyamines by Fungal Enzymes. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2469-2476.

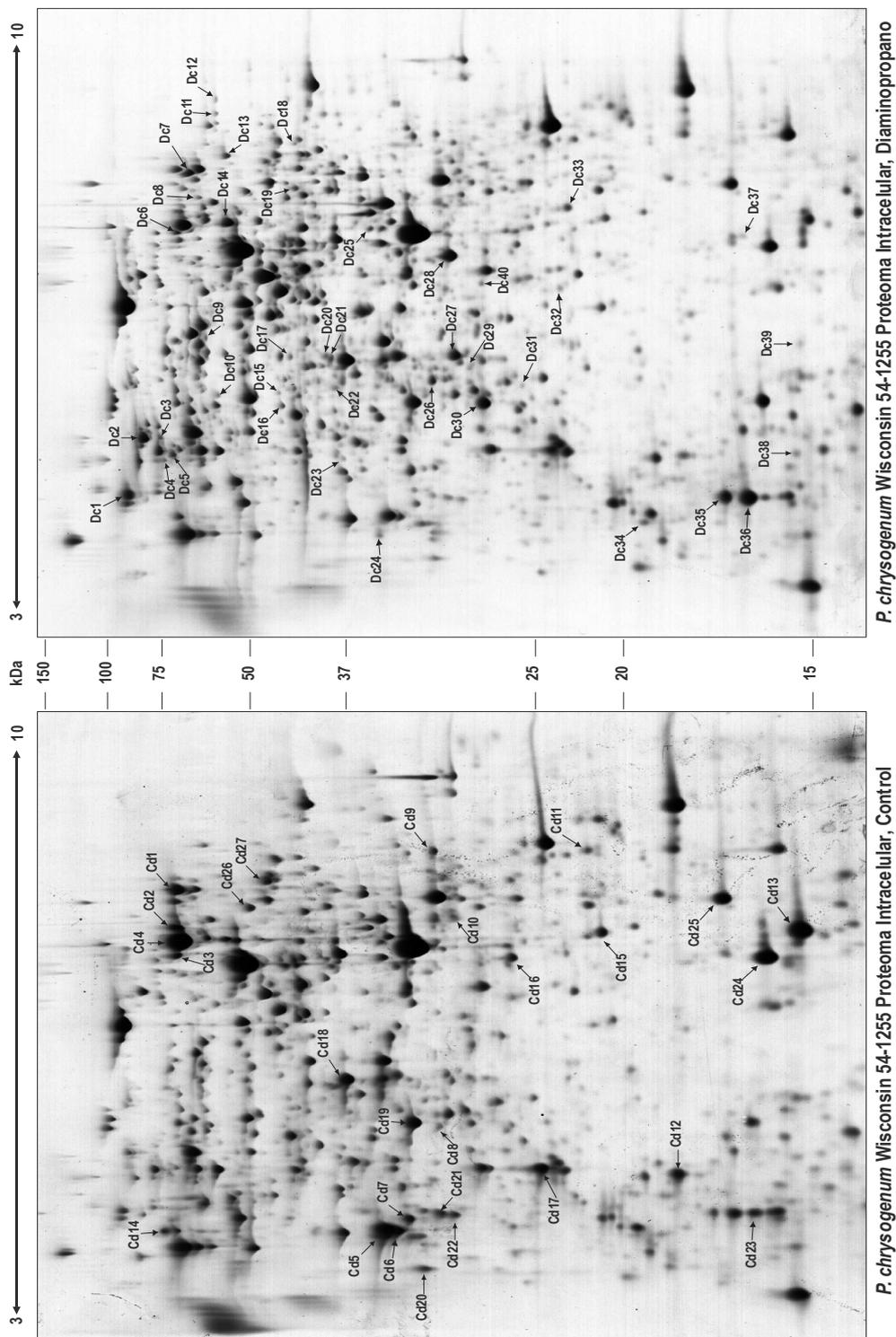
Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J. y Serrano, R. (2005). pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol. Cell Biol.* **25**, 8683-8692.

Yotov, W..V, Moreau, A. y St-Arnaud, R. (1998). The alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex functions as a transcriptional coactivator. *Mol Cell Biol.* **18**: 1303-11.

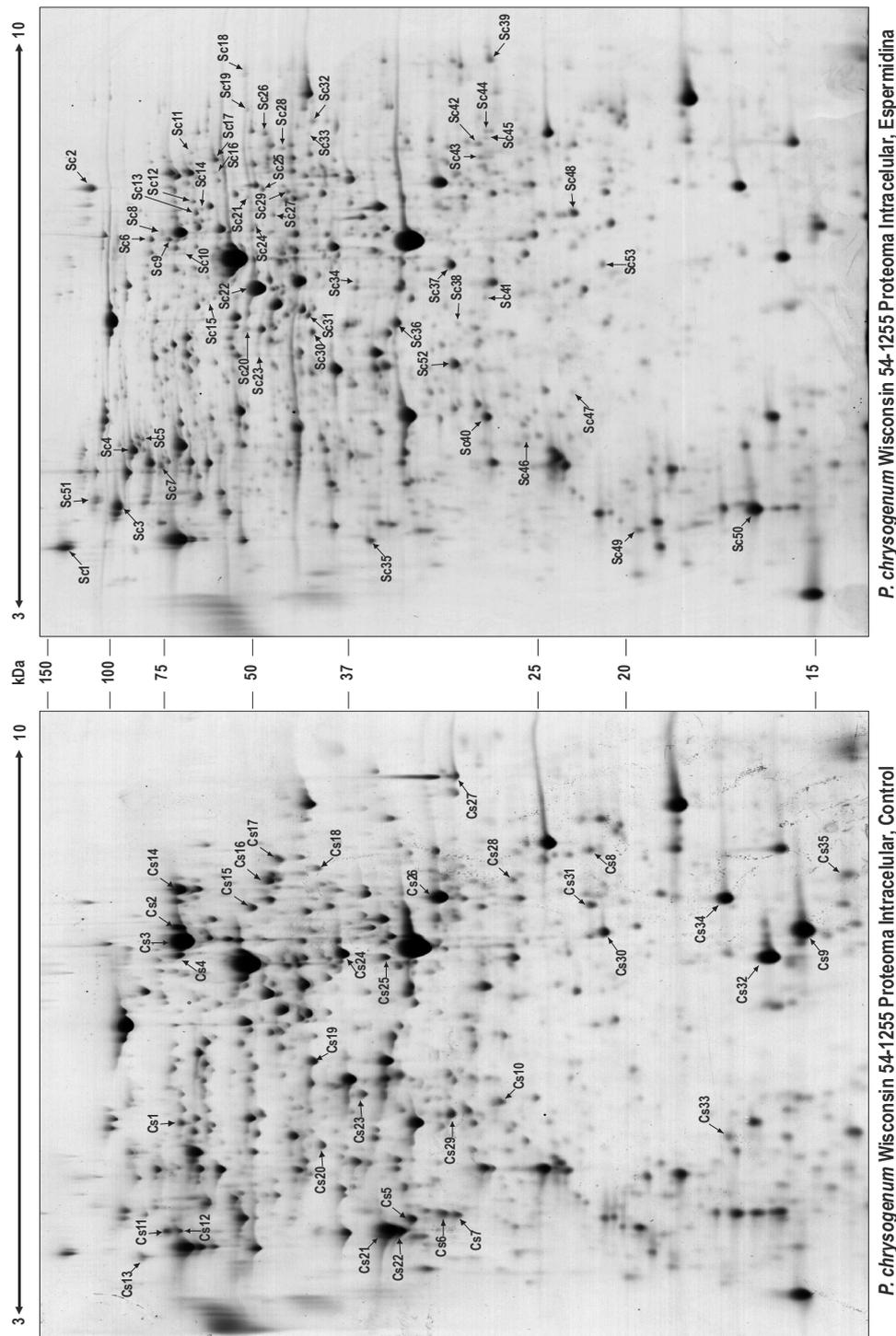
Z

Zinser, E. y Daum, G. (1995). Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**; 493-536.

7. ANEXOS



Anexo 1: Ampliación Figura 3.3.1: Comparación de los proteomas intracelulares de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con y sin la adición de 1,3-diaminopropano.



P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 Proteoma Intracelular, Espermidina

P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 Proteoma Intracelular, Control

Anexo 2: Ampliación Figura 3.3.3: Comparación de los proteomas intracelulares de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con y sin la adición de espermidina.

Tabla 3.3.1: Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve aumentada tras la adición del 1,3-diaminopropano. Se indica el número de veces que aumenta la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que sólo se detectan tras la adición del 1,3-diaminopropano se indican como N/A.

Manchas	Nombre de la ORF	No. Acoso	Título	Término	Estimado	Cóndida	No coinciden	Puntuación	Cantidad de la proteína (%)	Veces que aumenta	valor p	Función		
Metabolismo y Energía														
Dc6	Pc21g01110	gJ25563269	strong similarity to 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) non-beta-containing beta subunit like protein A07092420 - <i>Aspergillus niger</i>	62.6	7.7	64.7	7.1	19	41	683	44	N/A	Metabolismo de leucina	
Dc7	Pc19g03320	gJ21183702	strong similarity to IMP dehydrogenase IMH3 - <i>Candida albicans</i>	57.9	6.5	60.3	7.8	17	46	686	45	3.4E-04	Metabolismo de purinas	
Dc8	Pc21g12790	gJ21153017	strong similarity to UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase Ugt1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37.7	6.4	39.1	7.5	19	46	552	51	N/A	Glicogenosis	
Dc11	Pc19g03370	gJ211531841	strong similarity to mitochondrial F1-ATPase alpha-subunit Atp1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59.8	9.0	55.1	8.4	18	19	614	39	N/A	Biosíntesis de ATP	
Dc12	Pc19g03370	gJ211531841	strong similarity to mitochondrial F1-ATPase alpha-subunit Atp1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59.8	9.0	55.1	8.6	22	32	575	43	N/A	Biosíntesis de ATP	
Dc13	Pc21g17880	gJ211530494	strong similarity to 4-aminobutylate transaminase Gaa - <i>Aspergillus nidulans</i>	55.2	8.8	53.6	8.0	27	33	683	72	2.75E-04	Biosíntesis de l-alanina	
Dc14	Pc21g04720	gJ211537149	strong similarity to precursor of dehydrodolichide dehydrogenase Ufd1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54.6	7.7	51.7	7.3	30	29	989	64	2.05	Biosíntesis de acetyl-CoA	
Dc16	Pc21g01100	gJ25563267	strong similarity to isoenzyme A dehydrogenase like protein A07092420 - <i>Aspergillus niger</i>	47.0	5.8	43.2	5.2	25	39	745	63	3.06E-04	Metabolismo de leucina	
Dc17	Pc19g02760	gJ211536850	strong similarity to hypothetical aldehyde dehydrogenase C0B63554.1 - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	54.2	5.5	42.3	5.8	17	48	712	46	N/A	Biosíntesis de l-alanina	
Dc18	Pc21g04480	gJ25565655	strong similarity to ATP citrate lyase Acl1 - <i>Sordaria macrospora</i>	71.9	7.6	42.3	8.1	15	48	784	27	N/A	Biosíntesis de acetyl-CoA	
Dc19	Pc21g04480	gJ25565655	strong similarity to ATP citrate lyase Acl1 - <i>Sordaria macrospora</i>	71.9	7.6	42.1	7.6	20	44	657	31	N/A	Biosíntesis de acetyl-CoA	
Dc20	Pc19g02760	gJ211536850	strong similarity to hypothetical aldehyde dehydrogenase C0B63554.1 - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	54.2	5.5	38.5	5.8	19	46	731	47	N/A	Biosíntesis de l-alanina	
Dc21	Pc19g02760	gJ211536850	strong similarity to hypothetical aldehyde dehydrogenase C0B63554.1 - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	54.2	5.5	37.9	5.8	17	43	786	46	N/A	Biosíntesis de l-alanina	
Dc22	Pc19g02760	gJ211536850	strong similarity to hypothetical aldehyde dehydrogenase C0B63554.1 - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	54.2	5.5	37.4	5.4	10	38	401	32	N/A	Biosíntesis de l-alanina	
Dc23	Pc21g16500	gJ255642767	strong similarity to bifunctional purine synthase like protein A050570 - <i>Aspergillus niger</i>	85.1	5.3	36.6	4.7	4	10	289	9	N/A	Metabolismo de purinas	
Dc25	Pc21g16500	gJ211537455	strong similarity to mitochondrial malate dehydrogenase Mdh1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36	8.4	34.5	7.2	16	12	1030	62	N/A	Cofo de Krebs	
Dc26	Pc19g12400	gJ211534276	strong similarity to spermidine synthase Sps3 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33	5.5	30.4	5.5	11	54	413	40	3.28	Metabolismo de poliaminas	
Dc30	Pc19g08300	gJ211531603	strong similarity to subtilisin-like protease subunit - <i>Candida albicans</i>	29	5.3	27.4	5.2	17	47	531	80	6.10	6.33E-07	Metabolismo de carbohidratos
Dc37	Pc22g10040	gJ211532030	strong similarity to glucosamine-6-phosphate deaminase like protein A0506070 - <i>Aspergillus niger</i>	40	6.1	14.8	7.1	7	23	368	36	N/A	Metabolismo de aminoazúcares	
Dc37	Pc19g08270	gJ211530872	acyl-coenzyme A synthetase (acyltransferase) AAT1 - <i>Penicillium chrysogenum</i>	24	6.0	27.1	6.6	12	53	321	72	N/A	Metabolismo de purinas, seleno aminoácidos y azufre	
Dc40	Pc21g01370	gJ211530823	acyl-coenzyme A synthetase (acyltransferase) AAT1 - <i>Penicillium chrysogenum</i>	40	6.2	27.1	6.6	11	54	281	37	N/A	Biosíntesis de penicilina	
Rutas de información														
Dc2	Pc22g16880	gJ211532916	strong similarity to endonuclease ScaI 75 kDa subunit Eri1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72.6	5.6	80.5	4.9	28	34	769	49	4.39	Destino proteico	
Dc3	Pc22g10220	gJ211532947	strong similarity to cdk-tyrosine molecular chaperone Sst2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67.0	5.3	69.7	4.9	11	54	232	31	N/A	Destino proteico	
Dc4	Pc22g10220	gJ211532947	strong similarity to cdk-tyrosine molecular chaperone Sst2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67.0	5.3	68.5	4.6	20	44	705	47	N/A	Destino proteico	
Dc5	Pc22g10220	gJ211532947	strong similarity to cdk-tyrosine molecular chaperone Sst2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67.0	5.3	65.8	4.7	25	38	1080	50	4.70	Destino proteico	
Dc10	Pc19g06640	gJ211534813	strong similarity to GDP dissociation inhibitor in the secretory pathway Gdi1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52.1	5.3	54.6	5.4	19	46	293	54	N/A	Destino proteico	
Dc24	Pc19g08810	gJ211533026	strong similarity to elongation factor 1beta EF-1 - <i>Oryzias latipes</i>	25.0	4.4	33.9	3.8	8	14	748	59	N/A	Síntesis proteica	
Dc31	Pc19g01190	gJ211535160	strong similarity to actin-binding protein like protein A0309860 - <i>Aspergillus niger</i>	84	4.9	24.8	5.5	11	14	462	20	N/A	Proteína con función de unión o requerimiento de cofactores	
Dc32	Pc19g06660	gJ255642327	weak similarity to suppressor of tom1 protein Npt4 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34.5	9.7	22.7	6.5	9	36	143	28	N/A	Síntesis proteica	
Dc33	Pc19g06660	gJ255642327	weak similarity to suppressor of tom1 protein Npt4 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34.5	9.7	22.6	7.4	11	54	347	30	4.30	Síntesis proteica	
Dc34	Pc21g05140	gJ211535098	strong similarity to cell cycle regulator 021 protein wsc20 - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	22	4.5	18.6	4.0	9	54	203	39	N/A	Cofo celular y procesamiento del ADN	
Dc36	Pc21g13270	gJ211538542	strong similarity to resect polypeptide-associated complex alpha chain alpha-MC - <i>Mus musculus</i>	22	4.7	14.8	4.2	3	62	88	20	2.64	Transcripción	
Dc38	Pc22g16880	gJ211532618	strong similarity to steroid membrane binding protein like protein A0405050 - <i>Agaricus niger</i>	14	5.1	13.1	4.7	8	48	464	80	N/A	Proteína con función de unión o requerimiento de cofactores	
Transporte celular y rutas de transporte														
Dc3	Pc22g15100	gJ211530231	strong similarity to H-transferring ATPase vma-1 - <i>Neurospora crassa</i>	66.6	5.2	69.7	4.9	23	42	483	49	N/A	Transporte de protones	
Dc9	Pc22g13480	gJ211532291	strong similarity to vacuolar H(+)-transferring ATPase subunit B Vma2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56.1	5.7	57.6	6.0	22	39	788	55	N/A	Transporte de protones	
Percepción y respuesta a estímulos														
Dc8	Pc19g13280	gJ211536250	strong similarity to galactose reductase Grl1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51.5	6.2	59.1	7.5	11	54	338	33	N/A	Rescate celular, defensa y virulencia	
Dc10	Pc22g10200	gJ255641670	strong similarity to choline sulfatase Bsc1 - <i>Saccharomycetozoa malioti</i>	66.5	5.7	54.6	5.4	22	40	653	53	N/A	Rescate celular, defensa y virulencia	
Dc35	Pc22g02760	gJ211532284	strong similarity to type 2 peroxisomal protein A0206570 - <i>Aspergillus niger</i>	19	4.9	15.5	4.2	12	53	752	68	3.24	3.74E-05	Rescate celular, defensa y virulencia
Procesos del desarrollo														
Dc1	Pc22g06980	gJ211531967	strong similarity to glycosylphosphatidylinositol-anchored beta(1-3)glucanase/transferrase g60 - <i>Aspergillus fumigatus</i>	57.6	4.9	82.4	4.2	11	36	427	24	3.51	3.54E-04	Biogénesis de componentes celulares
Dc15	Pc21g16300	gJ211538384	gamma-actin act-1 - <i>Penicillium chrysogenum</i>	41.8	5.5	44.4	5.4	5	17	343	17	N/A	Biogénesis de componentes celulares	
Dc22	Pc22g04410	gJ211531465	strong similarity to N-glycosyltransferase Ngt1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38.8	5.4	37.4	5.4	7	44	242	31	N/A	Desconocida	
Dc27	Pc21g12310	gJ25565019	hypothetical protein [Penicillium chrysogenum]	30.4	5.6	28.9	5.8	16	38	505	67	3.03	3.52E-04	Desconocida
Dc28	Pc19g08070	gJ211532258	weak similarity to hypothetical protein Ia3372 - <i>Thermoplasma acidophilum</i>	27	5.0	28.8	6.9	13	49	418	61	N/A	Desconocida	
Dc29	Pc19g08070	gJ211532258	weak similarity to hypothetical protein Ia3372 - <i>Thermoplasma acidophilum</i>	27	5.0	28.8	6.9	13	49	418	61	N/A	Desconocida	
Dc36	Pc14452739	gJ14452739	16 kDa allergen [Penicillium chrysogenum]	16	5.2	14.8	4.2	4	18	222	25	N/A	Desconocida	
Dc39	Pc22g07680	gJ25564947	strong similarity to hypothetical protein congl1487.1 Ha_5200 - <i>Aspergillus fumigatus</i>	16.3	9.1	13.0	5.9	5	35	314	40	N/A	Desconocida	

Anexo 3: Tabla 3.3.1: Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve aumentada tras la adición del 1,3-diaminopropano. Se indica el número de veces que aumenta la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que sólo se detectan tras la adición del 1,3-diaminopropano se indican como N/A.

Tabla 3.3.2. Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve disminuida tras la adición del 1,3-diaminopropano. Se indica el número de veces que disminuye la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que desaparecen tras la adición del 1,3-diaminopropano se indican como N/A.

Manchas	Nombre de la DfP	No. Acceso	Título	Télico		Estímulo		Coinciden	No coinciden	Puntuación	Cobertura de la proteína (%)	Veces que aumenta	valor p	Función
				Masa (kDa)	pI	Masa (kDa)	pI							
Rutas de información														
Cd5	Pc2g11240	g 21150208	strong similarity to heat shock protein 70 hsp70 - <i>Aspergillus capsulatus</i>	68.7	5.03	32.9	4.0	18	47	586	39	2.92	7.0E-04	Destro proteico
Cd6	Pc2g11240	g 21150208	strong similarity to heat shock protein 70 hsp70 - <i>Aspergillus capsulatus</i>	68.7	5.03	32.1	4.0	15	46	469	32	3.16	1.1E-03	Destro proteico
Cd7	Pc2g10990	g 21150218	strong similarity to endonuclease SacI 75 kDa subunit Est1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67.6	5.58	31.4	4.1	19	46	438	27	3.44	1.3E-04	Destro proteico
Cd8	Pc21g02360	g 21150311	strong similarity to Gd4 nucleic-binding protein 1 Act1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47.8	6.4	29.8	8.3	13	36	662	40	2.50	7.3E-04	Proteína con función de unión o equipamiento de cobedores
Cd11	Pc21g11880	g 255954635	strong similarity to RNA binding protein 47 RBP47 - <i>Nicotiana glauca</i>	44.0	6.00	20.9	8.3	10	42	387	35	3.17	1.8E-04	Proteína con función de unión o equipamiento de cobedores
Cd14	Pc2g02080	g 61300663	calreticulin [<i>Penicillium chrysogenum</i>] strong similarity to calcium-binding protein precursor cnp1 - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	61.8	4.78	67.4	4.0	10	55	324	22	N/A	N/A	Destro proteico
Cd17	Pc21g11280	g 211508871	strong similarity to protein disulfide isomerase A pDI4 - <i>Aspergillus niger</i>	57	4.7	67.4	4.0	11	54	222	28	N/A	N/A	Destro proteico
Cd17	Pc2g11850	g 211509406	strong similarity to elongation factor 1-gamma 1 Ecf1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46	5.8	23.3	4.7	7	58	112	24	2.01	1.2E-05	Síntesis proteica
Cd20	Pc21g10670	g 255930653	strong similarity to drak-type molecular chaperone Dnp4 - <i>Aspergillus niger</i>	73.7	4.81	30.4	3.6	8	22	472	14	2.10	4.1E-06	Destro proteico
Cd21	Pc2g11240	g 21150208	strong similarity to heat shock protein 70 hsp70 - <i>Aspergillus capsulatus</i>	68.7	5.03	29.3	4.2	16	46	582	33	3.20	3.0E-03	Destro proteico
Cd22	Pc2g11240	g 21150208	strong similarity to heat shock protein 70 hsp70 - <i>Aspergillus capsulatus</i>	68.7	5.03	28.4	4.2	14	51	428	29	2.27	1.9E-03	Destro proteico
Cd23	Pc21g03140	g 211508389	strong similarity to cell cycle regulator c21 protein wsc2p - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	22	4.5	14.1	4.2	10	55	315	39	2.31	7.0E-03	Ciclo celular y procesamiento de ADN
Cd25	Pc21g10360	g 211508228	strong similarity to cyclophilin cybB - <i>Aspergillus nidulans</i>	18	6.9	15.1	7.7	8	57	408	44	2.03	3.9E-04	Destro proteico
Percepción y respuesta a estímulos														
Cd2	Pc2g03030	g 211501816	strong similarity to acetyl-CoA hydrolase Ach1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58.3	6.17	63.4	7.4	23	42	687	63	5.61	7.0E-05	Rescate celular, defensa y virulencia
Cd8	Pc21g03130	g 211501816	strong similarity to acetyl-CoA hydrolase Ach1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58.3	6.17	63.4	7.1	26	35	746	63	3.31	3.4E-03	Rescate celular, defensa y virulencia
Cd4	Pc21g03130	g 211501816	strong similarity to acetyl-CoA hydrolase Ach1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58.3	6.17	62.0	7.2	22	42	758	63	3.57	4.0E-07	Rescate celular, defensa y virulencia
Cd8	Pc21g03030	g 255930249	strong similarity to human/leucylase-Homo sapiens	46.6	6.01	29.4	5.2	12	53	297	31	2.53	1.8E-04	Ruta del homogenisado
Cd12	Pc21g03030	g 255930249	strong similarity to human/leucylase-Homo sapiens	46.6	6.01	16.8	4.6	6	14	320	22	3.41	6.7E-06	Ruta del homogenisado
Cd16	Pc21g06020	g 255930247	strong similarity to male/leucylase somese male4 - <i>Aspergillus nidulans</i>	24.9	6.45	25.0	7.0	18	47	667	64	2.73	1.4E-03	Ruta del homogenisado
Cd19	Pc21g03030	g 255930249	strong similarity to human/leucylase-Homo sapiens	46.6	6.01	31.0	5.2	14	50	580	40	2.13	9.0E-04	Ruta del homogenisado
Cd24	Pc21g16940	g 255959883	strong similarity to Co2h superoxide dismutase sodC - <i>Aspergillus fumigatus</i>	16.0	5.94	13.6	7.1	11	54	582	88	2.12	1.7E-03	Rescate celular, defensa y virulencia
Metabolismo y Energía														
Cd1	Pc2g03680	g 211501424	strong similarity to isocitrate lyase acD - <i>Aspergillus nidulans</i>	60.1	6.52	63.0	7.8	19	28	523	49	3.98	1.0E-05	Metabolismo del glucólito y dicarboxilato
Cd6	Pc06g01600	g 255930411	strong similarity to FAD dependent L-lysine dehydrogenase SDH-Gluconobacter oxydans	65.3	6.1	28.5	7.5	11	54	288	28	2.55	2.8E-04	Síntesis de ácido L-ascórbico
Cd10	Pc2g10040	g 211502030	strong similarity to glucosamine-6-phosphate deaminase like protein A16g08070 - <i>Aspergillus niger</i>	40	6.1	26.5	7.5	10	55	133	43	2.55	2.8E-04	Metabolismo de aminazucaras
	Pc21g08070	g 211502144	strong similarity to succinyl coenzyme A synthase alpha subunit SVT53A - <i>Pellus norvegicus</i>	35	8.9	26.5	7.5	8	57	123	31	2.55	2.8E-04	Ciclo de Krebs
Cd26	Pc21g04650	g 211501953	strong similarity to pyrimidine nucleic phosphatase-Bos taurus	33	5.9	26.5	7.5	7	58	98	35	2.55	2.8E-04	Metabolismo de purinas
Cd26	Pc06g07470	g 211508955	strong similarity to glycine decarboxylase subunit T Gcv1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52	8.9	47.6	7.6	24	39	953	64	2.19	2.1E-04	Catabolismo de glicina hacia 5,10-metilen-tetrahidrobio
Cd27	Pc2g013510	g 211508955	strong similarity to methylcitrate synthase msr4 - <i>Aspergillus nidulans</i>	51	8.4	45.2	7.9	23	40	645	59	4.01	1.8E-04	Oxidación de propionato a piruvato a través del ciclo del melicitrato
Transporte celular y rutas de transporte														
Cd17	Pc2g04810	g 211507157	strong similarity to estrogen receptor-binding cyclophilin cydD - <i>Bes primigenis</i> taurus	41	5.9	23.3	4.7	10	55	478	37	2.01	1.2E-06	Componente del lástido de la permeabilidad mitocondrial regulado la apertura del poro
Otras proteínas														
Cd8	Pc2g03010	g 255949466	strong similarity to hypothetical protein SPAC1F3.09 - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	64.5	5.71	28.4	5.2	13	52	115	29	2.53	1.8E-04	Desconocida
Cd13	Pc21g00650	g 211501686	strong similarity to hypothetical protein CC302 - <i>Caillardiaceae crescentis</i>	15	6.1	12.5	7.4	12	53	811	95	3.45	2.1E-04	Desconocida
Cd15	Pc2g03030	g 255951667	hypothetical protein BA02546 - <i>Penicillium chrysogenum</i>	23.5	6.05	20.2	7.3	11	54	605	47	2.33	4.9E-04	Desconocida
Cd15	Pc04g02750	g 04392437	hypothetical protein [<i>Penicillium chrysogenum</i>]	23.2	5.58	20.2	7.3	9	56	442	36	2.33	4.3E-04	Desconocida
Cd18	Pc21g02210	g 211508957	strong similarity to hypothetical protein conf1g1_1art_ii.16_2193g - <i>Aspergillus fumigatus</i>	35	5.6	33.1	5.9	6	4	489	23	2.23	1.8E-06	Desconocida

Anexo 4: Tabla 3.3.2: Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve disminuida tras la adición del 1,3-diaminopropano. Se indica el número de veces que disminuye la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que desaparecen tras la adición del 1,3-diaminopropano se indican como N/A.

Tabla 3.3.3: Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve aumentada tras la adición de espermidina. Se indica el número de veces que aumenta la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que solo se detectan tras la adición de espermidina se indican como N/A.

Manchas	Nombres de la ORF	No. Acceso	Título	Télico		Estimado		Coinciden	No coinciden	Puntaje	Cobertura de la proteína (%)	Veces que aumenta	valor p	Función	
				Masa (kDa)	pI	Masa (kDa)	pI								
Metabolismo y Energía	S62	Pc-22g00570	g 25394670	strong similarity to ribosylated lipase (p) - <i>Geotrichum carolinense</i>	61.2	6.5	10.5	7.7	22	43	1000	39	4.50	2.30E-04	Metabolismo lipídico
	S66	Pc-06g01600	g 25393041	strong similarity to FAD-dependent L-sorbose dehydrogenase SDH - <i>Glicoderma cylindricum</i>	65.3	6.1	68.2	7.2	28	37	691	69	2.55	4.76E-04	Síntesis de ácido L-ascórbico
	S69	Pc-21g1110	g 25395285	strong similarity to 5-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) monodomain-containing beta subunit like protein A071914270 - <i>Aspergillus niger</i>	62.6	7.7	62.9	7.1	22	39	813	46	N/A	N/A	Metabolismo de lactato
	S610	Pc-22g3300	g 25394901	strong similarity to 5-aminolevulinic acid synthase hemA - <i>Aspergillus nidulans</i>	69.2	8.6	59.1	7.0	23	42	436	53	N/A	N/A	Biosíntesis de porfirinas
	S611	Pc-22g1020	g 21159202	strong similarity to alcohol dehydrogenase alk1 - <i>Pseudomonas oleovorans</i>	60.3	5.9	57.2	8.1	27	37	549	50	N/A	N/A	Metabolismo alcohólico
	S612	Pc-21g1270	g 21159001	strong similarity to UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase Ugp1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57.7	6.4	56.6	7.5	24	37	748	58	N/A	N/A	Glicogénesis
	S615	Pc-13g0360	g 25393554	strong similarity to thiamin-phosphate pyrophosphorylase/hydroxyethylthiazole kinase Thi6 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54.2	6.0	53.2	6.4	21	34	657	58	N/A	N/A	Biosíntesis de tiamina
	S616	Pc-21g1780	g 21159049	strong similarity to 4-aminobutyrate transaminase gdaA - <i>Aspergillus nidulans</i>	55.2	8.8	51.7	7.9	22	43	431	53	N/A	N/A	Biosíntesis de peptidina
	S617	Pc-21g1780	g 21159049	strong similarity to 4-aminobutyrate transaminase gdaA - <i>Aspergillus nidulans</i>	55.2	8.8	51.7	8.0	30	28	950	76	4.47	1.1E-04	Biosíntesis de peptidina
	S618	Pc-21g1780	g 21159049	strong similarity to acyl-CoA dehydrogenase like protein Ant701150 - <i>Aspergillus niger</i>	49.0	8.7	47.0	8.9	25	40	889	64	N/A	N/A	Metabolismo lipídico
S620	Pc-12g10940	g 21159253	strong similarity to phosphoglycerate dehydrogenase Gnd1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56.1	5.9	46.8	6.1	26	38	1010	58	N/A	N/A	Ruta de las pentosas fosfato	
S621	Pc-22g1690	g 25394861	strong similarity to multidomain-containing factor activator like protein A0303000 - <i>Aspergillus niger</i>	63.1	5.8	46.7	7.6	25	40	911	52	N/A	N/A	Biosíntesis de cofactores	
S623	Pc-22g11710	g 21159213	strong similarity to alpha subunit E1 of the pyruvate dehydrogenase complex Pdh1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45.4	8.5	45.4	5.9	14	51	226	37	N/A	N/A	Biosíntesis de acetyl-CoA	
S625	Pc-13g2830	g 25393736	strong similarity to penicillin acetyl-CoA C-acyltransferase POT1 - <i>Yarrowia lipolytica</i>	44.7	6.9	44.9	7.7	23	41	725	65	N/A	N/A	Metabolismo lipídico	
S626	Pc-22g0820	g 253947884	strong similarity to penicillin acetyl-CoA C-acyltransferase POT1 - <i>Yarrowia lipolytica</i>	43.5	8.1	44.6	8.3	20	44	821	52	N/A	N/A	Metabolismo lipídico	
S627	Pc-22g10010	g 21159202	strong similarity to N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase CalM02 - <i>Candida albicans</i>	46.1	5.8	43.8	7.4	13	52	99	61	N/A	N/A	Metabolismo de aminoazúcares	
S628	Pc-21g0340	g 25395656	strong similarity to ATP citrate lyase ACL1 - <i>Sordaria macrospora</i>	71.9	7.6	42.5	8.1	22	41	881	36	N/A	N/A	Biosíntesis de acetyl-CoA	
S629	Pc-21g0340	g 25395656	strong similarity to ATP citrate lyase ACL1 - <i>Sordaria macrospora</i>	71.9	7.6	42.0	7.6	8	26	143	15	N/A	N/A	Biosíntesis de acetyl-CoA	
S631	Pc-12g0530	g 21159200	strong similarity to coproporphyrinogen oxidase III hcm13 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50.0	7.2	38.5	6.4	10	45	218	25	2.56	2.96E-05	Biosíntesis de porfirinas	
S633	Pc-13g05940	g 25393000	strong similarity to ribonucleoside triphosphate 4-epimerase 2 - <i>Neurospora crassa</i>	97.3	8.6	38.8	8.3	10	41	155	14	N/A	N/A	Metabolismo lipídico	
S634	Pc-21g01220	g 21159180	strong similarity to alcohol dehydrogenase (NADP+) ALR - <i>Sus scrofa</i>	35.4	6.0	35.3	6.7	8	57	194	38	N/A	N/A	Metabolismo alcohólico	
S640	Pc-12g00830	g 21159160	strong similarity to sorbitol utilization protein sou2 - <i>Candida albicans</i>	28.7	5.3	27.4	5.2	20	39	820	83	3.15	1.04E-03	Metabolismo de carbohidratos	
S641	Pc-13g05270	g 21159387	adenylylsulfate kinase AA08152 - <i>Penicillium chrysogenum</i>	23.6	6.0	26.8	6.5	12	53	365	56	N/A	N/A	Metabolismo de purinas, seleno aminoácidos y azútre	
S642	Pc-21g21370	g 21159162	acyl-coenzyme A:aspartic acid N-acyltransferase (acyltransferase) AAT1 PenDE - <i>Penicillium chrysogenum</i>	40.2	6.2	26.8	6.5	9	56	78	33	N/A	N/A	Biosíntesis de penicilina	
S643	Pc-12g0390	g 21159181	strong similarity to soluble cytoplasmic fumarate reductase YEL047C - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66.8	6.2	27.1	8.2	14	22	519	20	N/A	N/A	Respiración anaeróbica	
S643	Pc-12g0390	g 21159181	strong similarity to soluble cytoplasmic fumarate reductase YEL047C - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66.8	6.2	27.0	8.0	11	19	385	18	N/A	N/A	Respiración anaeróbica	
S644	Pc-12g05310	g 25393164	strong similarity to adenylyl kinase Auk1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28.6	7.0	26.8	8.3	14	42	538	54	N/A	N/A	Metabolismo de purinas	
S645	Pc-12g0390	g 21159181	strong similarity to soluble cytoplasmic fumarate reductase YEL047C - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66.8	6.2	26.8	8.2	13	37	350	18	N/A	N/A	Respiración anaeróbica	
S646	Pc-21g0340	g 21159311	strong similarity to ribose-phosphate-s-transferase (pf) from patent WO/070464-A - <i>Aspergillus niger</i>	27.2	5.3	24.4	5.0	11	46	154	50	N/A	N/A	Metabolismo de carbohidratos	
S648	Pc-16g01640	g 21159318	strong similarity to guanylate kinase Guk1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22.0	6.2	22.2	7.5	6	59	191	42	5.74	2.95E-05	Metabolismo de purinas	
S651	Pc-18g0280	g 21159383	strong similarity to acid phosphatase APPhxA - <i>Aspergillus fumigatus</i>	50.2	5.0	98.3	4.2	6	20	280	13	N/A	N/A	Metabolismo del fosfato	

Anexo 5: Tabla 3.3.3-1ª parte: Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve aumentada tras la adición de espermidina. Se indica el número de veces que aumenta la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que sólo se detectan tras la adición de espermidina se indican como N/A.

Tabla 3.3.3: Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve aumentada tras la adición de espermidina. Se indica el número de veces que aumenta la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que sólo se detectan tras la adición de espermidina se indican como N/A.

Manchas	Nombre de la ORF	No. Acceso	Título	Teórico		Estimado		Coinciden	No coinciden	Puntuación	Cobertura de la proteína (%)	Veces que aumenta	valor p	Función
				Masa (kDa)	pl	Masa (kDa)	pl							
Percepción y respuesta a estímulos														
Sc1	Pc18g02900	gi211586864	lysophospholipase phospholipase B plb1 - <i>Penicillium chrysogenum</i>	68,7	4,4	12,2	3,8	7	27	610	14	3,07	1,41E-03	Rescate celular, defensa y virulencia
Sc8	Pc12g03130	gi211581818	strong similarity to acetyl-CoA hydrolase Ach1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58,3	6,2	65,0	7,2	19	22	530	38	N/A	N/A	Rescate celular, defensa y virulencia
Sc14	Pc16g13280	gi211586250	strong similarity to glutathione reductase Grl1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51,5	6,2	54,6	7,5	22	40	939	63	N/A	N/A	Rescate celular, defensa y virulencia
Sc16	Pc12g03040	gi255932351	strong similarity to 3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase hmgA - <i>Aspergillus nidulans</i>	50,4	5,9	51,7	7,9	9	56	203	28	N/A	N/A	Ruta del homogenisato
Sc19	Pc12g03030	gi211582350	strong similarity to fumarylacetoacetase - <i>Homo sapiens</i>	46,6	6,0	46,8	8,5	9	47	121	37	N/A	N/A	Ruta del homogenisato
Sc22	Pc12g03030	gi211582350	strong similarity to fumarylacetoacetase - <i>Homo sapiens</i>	46,6	6,0	44,5	6,7	14	17	812	50	3,35	1,88E-04	Ruta del homogenisato
Sc27	Pc13g12030	gi211584240	strong similarity to foalhemoglobin Fhp - <i>Alcaligenes eutrophus</i>	47,8	7,8	43,6	7,4	18	45	686	53	N/A	N/A	Rescate celular, defensa y virulencia
Sc30	Pc12g03040	gi255932351	strong similarity to 3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase hmgA - <i>Aspergillus nidulans</i>	50,4	5,9	40,7	5,8	7	44	168	22	N/A	N/A	Ruta del homogenisato
Procesos del desarrollo														
Sc3	Pc22g03380	gi211581967	strong similarity to glycosylphosphatidylinositol-anchored beta(1-3)glucanoyltransferase gel3 - <i>Aspergillus fumigatus</i>	57,6	4,9	79,9	4,3	10	30	427	21	3,45	2,14E-05	Biogénesis de componentes celulares
Otras proteínas														
Sc34	Pc14g02010	gi211584816	strong similarity to hypothetical protein contig_1_98_scaffold_6.tta_1090c - <i>Aspergillus nidulans</i>	44,2	6,2	45,7	7,3	15	50	466	60	N/A	N/A	Desconocida
Sc37	Pc12g03070	gi211582258	weak similarity to hypothetical protein Tat1372 - <i>Thermoplasma acidophilum</i>	27,3	5,0	28,7	6,8	13	51	771	61	N/A	N/A	Desconocida
Sc38	Pc21g02210	gi211580897	strong similarity to hypothetical protein contig31_part_ii.tta_2190w - <i>Aspergillus fumigatus</i>	34,7	5,6	28,4	6,2	8	52	375	39	N/A	N/A	Desconocida
Sc47	Pc22g03110	gi211581371	strong similarity to hypothetical protein An01g08830 - <i>Aspergillus niger</i>	24,3	7,9	21,5	5,5	9	44	282	43	N/A	N/A	Desconocida
Sc50		gi144952798	16 kDa allergen - <i>Penicillium chrysogenum</i>	16,4	5,2	13,3	4,2	4	48	395	21	3,11	4,53E-05	Desconocida
Sc52	Pc21g12310	gi255955019	hypothetical protein <i>Penicillium chrysogenum</i>	30,4	5,6	29,0	5,8	20	43	831	69	3,02	2,54E-04	Desconocida
Sc53	Pc23g00350	gi255951667	hypothetical protein BAC82546- <i>Penicillium chrysogenum</i>	22,5	6,1	19,8	6,9	10	28	549	45	N/A	N/A	Desconocida
	Pc24g02750	gi34392437	hypothetical protein [<i>Penicillium chrysogenum</i>]	23,2	5,6	19,8	6,9	8	32	369	34	N/A	N/A	Desconocida

Anexo 5: Tabla 3.3.3-2ª parte: Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve aumentada tras la adición de espermidina. Se indica el número de veces que aumenta la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que sólo se detectan tras la adición de espermidina se indican como N/A.

Tabla 3.3.4: Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve disminuida tras la adición de espermidina. Se indica el número de veces que disminuye la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que desaparecen tras la adición de espermidina se indican como N/A.

Manchas	Nombre de la ODR	No. Aceite	Título	Teórico		Estimado		Coincidencia	No coinciden	Puntuación	Cobertura de la proteína (%)	Voces que aumenta	valor p	Función
				Masa (kDa)	pI	Masa (kDa)	pI							
Metabolismo y Energía														
Cs1	Pc22g02000	g 211591261	strong similarity to mitochondrial acyl-CoA oxidase Aco1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85.9	6.0	61.4	5.2	26	34	912	35	3.65	6.64E-05	Ciclo de Krebs
Cs10	Pc16g12780	g 255941616	strong similarity to core protein 1 of ubiquinol-cytochrome c reductase beta-MFP - <i>Neurospora crassa</i>	53.1	5.7	25.8	5.5	10	44	443	25	2.42	4.08E-04	Fosforilación oxidativa
Cs13	Pc21g13870	g 255952963	strong similarity to enzyme with sugar transferase activity like protein An1g10530 - <i>Aspergillus niger</i>	107.3	4.9	72.4	3.7	15	50	473	15	2.47	9.37E-03	Metabolismo de carbohidratos
Cs14	Pc22g03660	g 211591424	strong similarity to succinate lyase acdC - <i>Aspergillus nidulans</i>	60.1	6.5	61.4	7.8	24	40	727	62	2.23	1.47E-04	Metabolismo del glicolato y dicarboxilato
Cs15	Pc16g07470	g 211595895	strong similarity to glycine acetyltransferase subunit 1 Gcv1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51.6	8.9	46.7	7.6	23	42	885	71	2.21	1.17E-04	Catabolismo de glicina para 5,10-metileno
Cs16	Pc20g13510	g 211598865	strong similarity to methylcrotonate synthase mscA - <i>Aspergillus nidulans</i>	51.0	8.4	44.5	7.9	23	39	492	55	3.25	1.18E-05	Oxidación de propionato a piruvato a través del ciclo del malictrato
Cs17	Pc22g05620	g 255947884	strong similarity to penicillin acetyl-CoA C-acyltransferase POT1 - <i>Yarrowia lipolytica</i>	43.5	8.1	43.6	8.2	13	52	519	45	2.12	1.21E-03	Metabolismo lipídico
Cs18	Pc21g14930	g 211592518	strong similarity to mitochondrial sulfide dehydrogenase (coenzyme Q2) SPC205.0bc - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	48.3	8.8	43.6	8.2	22	43	389	53	2.12	1.21E-03	Fosforilación oxidativa
Cs18	Pc21g14930	g 211592513	cysteine synthase BAC8256c - <i>Penicillium chrysogenum</i>	40.1	8.6	39.1	8.1	22	16	1100	73	2.21	5.78E-05	Biosíntesis de cisteína
Cs20	Pc21g17460	g 211590454	strong similarity to adenine phosphoribosyl transferase like protein An1g01530 - <i>Aspergillus nidulans</i>	38.4	5.4	38.6	5.0	16	49	861	53	2.05	2.82E-04	Metabolismo de purinas
Cs23	Pc22g04850	g 211591539	strong similarity to Darabiose dehydrogenase Avn1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36.6	5.5	35.0	5.6	16	49	716	48	2.07	5.00E-03	Metabolismo de carbohidratos
Cs28	Pc22g02000	g 211591381	strong similarity to mitochondrial acyl-CoA oxidase Aco1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85.9	6.0	25.1	7.9	13	44	254	18	2.07	8.15E-04	Ciclo de Krebs
Cs29	Pc18g01220	g 211598700	strong similarity to fructose-bisphosphate aldolase Fla1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39.5	5.4	28.8	5.3	9	40	203	28	2.09	1.21E-04	Glicólisis y gluconeogénesis
Rutas de información														
Cs5	Pc22g19890	g 211592518	strong similarity to endonuclease Sap1 75.0Da subunit Eis1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72.6	5.6	31.4	4.2	14	51	425	21	6.34	4.38E-05	Destino proteico
Cs6	Pc22g11240	g 211592088	strong similarity to heat shock protein 70 hsp70 - <i>Allopyrococcus capsulatus</i> (allergan Pen c.19)	69.7	5.0	29.3	4.2	14	43	480	29	5.88	4.34E-03	Destino proteico
Cs7	Pc22g11240	g 211592088	strong similarity to heat shock protein 70 hsp70 - <i>Allopyrococcus capsulatus</i> (allergan Pen c.19)	69.7	5.0	28.4	4.2	17	48	557	35	4.57	1.86E-04	Destino proteico
Cs8	Pc21g18900	g 255954635	strong similarity to RNA binding protein 47 REP47 - <i>Micoflora plumbeogenitalis</i>	44.0	6.0	20.2	8.3	11	53	415	27	4.83	7.44E-07	Proteína con función de unión o requerimiento de cofactores
Cs11	Pc22g02800	g 211591341	calcitriol (<i>Penicillium chrysogenum</i>), strong similarity to calcitriol-binding protein precursor cxb1p - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	62.0	4.8	65.6	4.0	10	47	349	20	2.68	1.33E-03	Destino proteico
Cs11	Pc21g12900	g 211598871	strong similarity to protein disulfide isomerase A. pdiA - <i>Aspergillus niger</i>	56.6	4.7	65.6	4.0	11	46	272	27	2.68	1.33E-03	Destino proteico
Cs12	Pc21g12900	g 211598871	strong similarity to protein disulfide isomerase A. pdiA - <i>Aspergillus niger</i>	56.6	4.7	61.8	4.0	20	45	507	48	2.29	8.59E-03	Destino proteico
Cs21	Pc22g11240	g 211592088	strong similarity to heat shock protein 70 hsp70 - <i>Allopyrococcus capsulatus</i> (allergan Pen c.19)	69.7	5.0	32.9	4.1	13	24	384	31	9.88	1.59E-04	Destino proteico
Cs22	Pc22g11240	g 211592088	strong similarity to heat shock protein 70 hsp70 - <i>Allopyrococcus capsulatus</i> (allergan Pen c.19)	69.7	5.0	32.1	4.0	18	47	565	40	2.41	5.54E-03	Destino proteico
Cs26	Pc21g16970	g 1963302	strong similarity to heat shock protein 70 hsp70 - <i>Allopyrococcus capsulatus</i> (allergan Pen c.19)	69.7	5.0	29.4	7.7	8	36	221	23	2.31	1.44E-05	Destino proteico
Cs34	Pc16g01160	g 211598897	strong similarity to ubiquitin conjugating enzyme Uba2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52.5	6.1	29.4	7.7	8	36	221	23	2.31	1.44E-05	Destino proteico
Cs34	Pc16g13060	g 211598228	strong similarity to ubiquitin conjugating enzyme Uba2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17.4	5.3	13.7	5.1	5	47	90	46	N/A	N/A	Destino proteico
Percepción y respuesta a estímulos														
Cs2	Pc12g03130	g 211591818	strong similarity to cyclophilin cybB - <i>Aspergillus nidulans</i>	18.1	6.9	13.7	7.7	10	55	352	51	2.29	9.72E-05	Destino proteico
Cs3	Pc12g03130	g 211591818	strong similarity to acetyl-CoA hydrolase Ach1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58.3	6.2	61.8	7.4	26	39	805	72	5.06	9.04E-05	Rescate celular, defensa y viulencia
Cs4	Pc12g03130	g 211591818	strong similarity to acetyl-CoA hydrolase Ach1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58.3	6.2	60.4	7.3	30	32	822	80	3.23	4.23E-06	Rescate celular, defensa y viulencia
Cs4	Pc12g03130	g 211591818	strong similarity to acetyl-CoA hydrolase Ach1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58.3	6.2	61.8	7.1	30	33	816	80	4.23	1.34E-03	Rescate celular, defensa y viulencia
Cs19	Pc12g05040	g 255952351	strong similarity to 3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase hmgA - <i>Aspergillus nidulans</i>	50.4	5.9	39.6	5.9	18	47	671	58	2.10	3.52E-04	Ruta del homogentisato
Cs24	Pc20g15980	g 211598765	strong similarity to NADPH-dependent aldehyde reductase - <i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	37.3	6.1	36.5	7.1	19	46	1020	72	2.18	3.26E-05	Rescate celular, defensa y viulencia
Cs31	Pc22g04680	g 211591523	strong similarity to superoxide dismutase like protein An04g04870 - <i>Aspergillus niger</i>	24.7	8.7	20.2	7.7	4	36	148	27	2.15	8.01E-07	Rescate celular, defensa y viulencia
Cs32	Pc21g16940	g 255955983	strong similarity to Cu,Zn superoxide dismutase sodC - <i>Aspergillus fumigatus</i>	16.0	5.9	12.1	7.1	10	55	454	87	2.48	9.42E-04	Rescate celular, defensa y viulencia
Procesos del desarrollo														
Cs33	Pc22g00190	g 255946596	strong similarity to hypothetical cell wall protein b1b - <i>Aspergillus nidulans</i>	19.1	5.6	13.7	5.1	3	48	152	12	N/A	N/A	Biosíntesis de componentes celulares
Otras proteínas														
Cs9	Pc12g06500	g 211591598	strong similarity to hypothetical protein CC3892 - <i>Cambacter crescentus</i>	15.0	6.1	11.0	7.4	7	22	617	67	4.21	8.48E-05	Desconocida
Cs12	Pc22g17870	g 211592713	strong similarity to hypothetical E0633 homolog SPC123.12c - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	41.2	4.6	61.8	4.0	13	52	297	39	2.29	8.56E-03	Desconocida
Cs25	Pc22g17250	g 255949742	strong similarity to hypothetical protein mgd084.1 - <i>Magnaporthe oryzae</i>	35.9	6.5	33.3	7.1	11	45	489	45	2.08	2.16E-04	Desconocida
Cs27	Pc22g17860	g 211592721	strong similarity to hypothetical protein contig04.0.68bvg - <i>Aspergillus fumigatus</i>	36.0	9.5	28.5	9.1	8	29	289	30	2.34	5.44E-03	Desconocida
Cs30	Pc23g03950	g 255951687	hypothetical protein BAC8254c - <i>Penicillium chrysogenum</i>	22.5	6.1	19.4	7.4	13	52	571	49	2.14	7.64E-04	Desconocida
Cs30	Pc24g02750	g 15432437	hypothetical protein (<i>Penicillium chrysogenum</i>)	23.2	5.6	19.4	7.4	11	54	540	37	2.14	7.64E-04	Desconocida
Cs35	Pc23g06580	g 255951687	hypothetical protein BAC8254c - <i>Penicillium chrysogenum</i>	22.5	6.1	9.8	8.0	9	56	375	32	3.25	8.38E-04	Desconocida

Anexo 6: Tabla 3.3.4: Manchas del proteoma intracelular de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 cuya intensidad se ve disminuida tras la adición de espermidina. Se indica el número de veces que disminuye la intensidad y el valor p. Aquellas manchas que desaparecen tras la adición de espermidina se indican como N/A.

Tabla 3.3.5: Proteínas comunes cuya síntesis varía tras la adición tanto del 1,3-diaminopropano, como de espermidina. Estas proteínas están ordenadas de acuerdo al nombre de su ORF.

Nombre del ORF	No. Acceso	Título
Pc06g01600	gij 255930411	strong similarity to FAD dependent L-sorbose dehydrogenase SDH - <i>Gluconobacter oxydans</i>
Pc12g00650	gij 211581586	similarity to hypothetical protein CC3092 - <i>Caulobacter crescentus</i>
Pc12g00830	gij 211581603	strong similarity to sorbitol utilization protein <i>sou2</i> - <i>Candida albicans</i>
Pc12g03130	gij 211581818	strong similarity to acetyl-CoA hydrolase Ach1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pc12g08070	gij 211582258	weak similarity to hypothetical protein Ta1372 - <i>Thermoplasma acidophilum</i>
Pc12g09030	gij 211582350	strong similarity to fumarylacetoacetase - <i>Homo sapiens</i>
Pc12g09040	gij 255932351	strong similarity to 3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase hmgA - <i>Aspergillus nidulans</i>
Pc13g08270	gij 211583872	adenylylsulfate kinase AAA81521- <i>Penicillium chrysogenum</i>
Pc13g08810	gij 211583926	strong similarity to elongation factor 1beta EF-1 - <i>Oryctolagus cuniculus</i>
Pc16g07470	gij 211585695	strong similarity to glycine decarboxylase subunit T Gcv1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pc16g13060	gij 211586228	strong similarity to cyclophilin cypB - <i>Aspergillus nidulans</i>
Pc16g13280	gij 211586250	strong similarity to glutathione reductase Glr1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pc18g00860	gij 255942327	weak similarity to suppressor of tom1 protein Mpt4 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pc20g13270	gij 211588542	strong similarity to nascent polypeptide-associated complex alpha chain alpha-NAC - <i>Mus musculus</i>
Pc20g13510	gij 211588565	strong similarity to methylcitrate synthase <i>mcsA</i> - <i>Aspergillus nidulans</i>
Pc21g01110	gij 255952859	strong similarity to 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) non-biotin-containing beta subunit like protein An07g04270 - <i>Aspergillus niger</i>
Pc21g02210	gij 211588997	strong similarity to hypothetical protein contig31_part_ii.tfa_2190wg - <i>Aspergillus fumigatus</i>
Pc21g02360	gij 211589011	strong similarity to GU4 nucleic-binding protein 1 Arc1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pc21g03140	gij 211589089	strong similarity to cell cycle regulator p21 protein <i>wos2p</i> - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Pc21g11280	gij 211589871	strong similarity to protein disulfide isomerase A pdiA - <i>Aspergillus niger</i>
Pc21g11890	gij 255954935	strong similarity to RNA binding protein 47 RBP47 - <i>Nicotiana glauca</i>
Pc21g12310	gij 255955019	hypothetical protein <i>Penicillium chrysogenum</i>
Pc21g12790	gij 211590017	strong similarity to UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase Ugp1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pc21g17880	gij 211590494	strong similarity to 4-aminobutyrate transaminase gatA - <i>Aspergillus nidulans</i>
Pc21g20480	gij 255956565	strong similarity to ATP citrate lyase ACL1 - <i>Sordaria macrospora</i>
Pc21g21370	gij 211590823	acyl-coenzyme A:isopenicillin N acyltransferase (acyltransferase) AAT / PenDE - <i>Penicillium chrysogenum</i>
Pc22g02800	gij 211591341	calreticulin [<i>Penicillium chrysogenum</i>]. strong similarity to calcium-binding protein precursor <i>cnx1p</i> - <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Pc22g03660	gij 211591424	strong similarity to isocitrate lyase <i>acuD</i> - <i>Aspergillus nidulans</i>
Pc22g06820	gij 255947884	strong similarity to peroxisomal acetyl-CoA C-acyltransferase POT1 - <i>Yarrowia lipolytica</i>
Pc22g09380	gij 211591967	strong similarity to glycosylphosphatidylinositol-anchored beta(1-3)glucanoyltransferase gel3 - <i>Aspergillus fumigatus</i>
Pc22g10220	gij 211592047	strong similarity to dnaK-type molecular chaperone Ssb2 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pc22g11240	gij 211592088	strong similarity to heat shock protein 70 <i>hsp70</i> - <i>Ajellomyces capsulatus</i> (allergen Pen c 19)
Pc22g19990	gij 211592918	strong similarity to endonuclease Scel 75 kDa subunit Ens1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pc23g00350	gij 255951667	hypothetical protein BAC82546- <i>Penicillium chrysogenum</i>
Pc24g02750	gij 34392437	hypothetical protein [<i>Penicillium chrysogenum</i>]
	gij 144952798	16 kDa allergen - <i>Penicillium chrysogenum</i>

Anexo 7: Tabla 3.3.5: Proteínas comunes cuya síntesis varía tras la adición tanto del 1,3-diaminopropano, como de espermidina. Estas proteínas están ordenadas de acuerdo al nombre de su ORF.