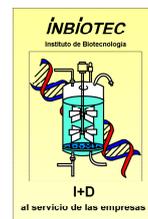


Raúl Feltre Martínez

ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE
CLOROANISOLES POR *Trichoderma
longibrachiatum*: CARACTERIZACIÓN
DEL GEN CODIFICANTE DEL ENZIMA
CLOROFENOL O-METILTRANSFERASA
(CPOMT)



Universidad de León



INBIOTEC

*A mi hermano
Jose Luís*

AGRADECIMIENTOS

Tras estos cinco años y medio de duro trabajo, finalmente me encuentro escribiendo unas líneas, como colofón a esta memoria. Suena a tópico, pero ciertamente ha habido muchos momentos en los que pensaba que no iba a poder llegar hasta el final de este camino, pues los malos momentos han sido numerosos, pero creo que este tortuoso camino ha merecido la pena y me ha permitido crecer profesional y personalmente. En cualquier caso, no ha sido una ruta que haya recorrido en solitario, muchos han estado a mi lado (aunque no estuvieran presentes) y en este momento quiero expresar mi más sentido agradecimiento a todos aquellos que me han ayudado a llegar hasta aquí.

En primer lugar al Dr. Juan José Rubio Coque, por permitirme realizar bajo su dirección esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Juan Francisco Martín Martín, por permitirme realizar mi trabajo en las magníficas instalaciones de INBIOTEC.

Al Dr. Ramón Santamaría por cedernos, de manera desinteresada, el plásmido pCF1 y los anticuerpos anti-lacasa de *P. hydnoides*.

A la Dra. María Jesús Martínez por su gran amabilidad y ayuda, así como por su generosidad al prestarnos la construcción de expresión pPEL3G.

A Josefina, Bernabé y Andrea por su excelente apoyo técnico.

A Marusela, por su simpatía y su gran ayuda en mis inicios con la FPLC.

A todos los compañeros de INBIOTEC que, en mayor o menor medida, han contribuido a que esta Tesis llegue a buen puerto. De entre todos ellos quisiera destacar al Dr. Ramiro P. Godio y al Dr. Carlos García-Estrada por ayudarme y aconsejarme en todo momento, por su paciencia y su magnífica predisposición a la hora de ayudar a cualquiera que lo necesite. Ha sido todo un privilegio poder trabajar junto a ellos. También quisiera agradecerles, tanto a ellos como a Javi S. y José Manuel el excelente ambiente de trabajo del que hemos disfrutado, convirtiéndonos en un grupo de amigos más que de compañeros de trabajo.

A Rebeca por su enorme disposición y por la gran ayuda prestada en estos últimos meses de trabajo en el laboratorio.

A todos mis amigos... A Raúl, Loren, Penalba, Bea... mis viejos amigos del colegio con los que por desgracia casi he perdido el contacto pero que me han ayudado, sin saberlo, acudiendo a mi mente en forma de recuerdos de la niñez y adolescencia. A Santi, Holo, Hero, Neus y Eli, mis grandes amigos de Valencia con los que aún tengo un contacto fluido (todo lo fluido que 700 Km de distancia permiten...) y junto a los que rememoro, siempre que podemos reunirnos, batallitas del instituto, de la universidad y de aquella estancia en Polonia... A Antonio, mi más viejo amigo, y a Sole que han estado siempre a mi lado (pese a que todavía me deban una visita a León tras más de 5

años...) tanto en buenos como en malos momentos. Gracias por nuestras largas conversaciones, por poder compartir todo con vosotros y por darme un punto de vista diferente de las cosas. Finalmente, también quiero expresar mi gratitud a mi más reciente grupo de amigos: Mónica, Carlos, Miriam, Kris, Inma, Silvia... A todos ellos los he conocido en León, y se han convertido en mi segunda familia, compartiendo junto a ellos todo tipo de experiencias tanto laborales como personales. Gracias por hacerme sentir que, al fin y al cabo, no estoy tan lejos de casa.

A Javi O., amigo de la facultad y compañero de piso en León, por compartir la añoranza de *la nostra terreta* en los fríos leoneses.

Por último quisiera dar las gracias a las personas más importantes de mi vida, mi familia. Gracias a mis padres, José y Carmen, por su amor y su cariño y por enseñarme que el mayor logro al que se puede aspirar en la vida es ser una buena persona. Gracias a mis hermanos M^ª Carmen, Merche y Jose Luís por darme una niñez en un entorno de amor y atención en el que todos los niños deberían crecer. Gracias por ayudarme a convertirme en la persona que ahora soy y gracias por hacerme sentir que pase lo que pase, nunca estaré solo. Ojala estéis la mitad de orgullosos de mí de lo que yo lo estoy de vosotros. Gracias a mi cuñado Manolo H. por ser la persona más generosa que conozco y convertirse en un hermano más. Y gracias a mis sobrinos Adrián, Roberto y Eduardo. Quiero daros las gracias por ser lo especiales que sois cada uno a su manera, por dejarme formar parte de vuestra educación y por permitirme saber qué se siente cuando uno tiene hermanos pequeños. Siento haberme perdido estos últimos años en los que os casi os habéis convertido en adultos y espero poder compensaros en el futuro...

Por último, quiero terminar dando las gracias a Tania, ya que sin ella jamás hubiera llegado a este párrafo. Gracias por estar a mi lado, por apoyarme incondicionalmente, por tener más fe en mí que yo mismo, por soportar que me traiga los enfados del trabajo a casa, por escuchar siempre, por compensar mis disgustos con una buena cena, por quererme tal y como soy, por tu inocencia y tu bondad... Gracias por TODO.

ABREVIATURAS

A: adenina, amperio.	kb: kilobase.
ADN: ácido desoxirribonucleico.	KDa: kilodalton.
DNasa: desoxirribonucleasa.	l: litro.
Ap: ampicilina.	m: metro
Aprox: aproximadamente.	M: molar.
ARN: ácido ribonucleico.	Mb: megabase.
RNasa: ribonucleasa.	MOPS: ácido morfolinopropanosulfónico.
ARNm: ARN mensajero.	MS: espectrometría de masas.
ARNr: ARN ribosómico.	N: normal.
ARNt: ARN de transferencia.	NBT: azul de nitrotetrazolio.
ATP: adenosina 5'-trifosfato.	nt: nucleótido.
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato.	ORF: marco de lectura abierto.
BrEt: bromuro de etidio.	p/v: relación peso/volumen.
BSA: seroalbúmina bovina.	pág.: página.
C: citosina.	PAGE: electroforesis en gel de
CECT: colección española de cultivos tipo.	poliacrilamida.
Ci: curio.	pb: pares de bases.
CIA: cloroformo-alcohol-isoamílico.	PCR: reacción en cadena de la
Da: dalton.	polimerasa.
ddNTP: didesoxinucleótido trifosfato.	PEG: polietilenglicol.
DEPC: dietilpirocarbonato.	PMSF: fenilmetanosulfonil fluorida.
DMSO: dimetilsulfóxido	PVDF: difluoruro de polivileno
D.O.: densidad óptica.	rpm: revoluciones por minuto.
DTT: ditiotreitól.	SDS: dodecil-sulfato sódico.
dTTP: desoxitimidina trifosfato.	T: timina.
dUTP: desoxiuridina trifosfato.	TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamina.
ed.: edición, editor.	Tris: tris (hidroximetil) aminometano.
eds.: editores.	U: unidades, uracilo.
EDTA: ácido etilendiaminotetracético.	UV: ultravioleta.
g: gramo.	v/v: relación volumen/volumen.
G: guanidina.	V: voltio.
°C: grado centígrado.	WT: <i>wild type</i> .
IPTG: 1-isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.	X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.

Prefijos utilizados en los Sistemas de Unidades Internacionales

G	giga	10 ¹²			
M	mega	10 ⁶	c	centi	10 ⁻²
K	kilo	10 ³	m	mili	10 ⁻³
H	hecto	10 ²	μ	micro	10 ⁻⁶
D	deca	10 ¹	n	nano	10 ⁻⁹
d	deci	10 ⁻¹	p	pico	10 ⁻¹²

Índice

Introducción	1
I-1. El corcho: historia, propiedades y relación con el vino	3
I-1.1 Breve historia del corcho y sus aplicaciones	3
I-1.2 Estructura y composición química del corcho	4
I-1.2.1 Composición química del corcho	4
I-1.2.2 Estructura del corcho	6
I-1.3 Propiedades del corcho como tapón de botellas de vino	6
I-1.4 Proceso general de fabricación de un tapón de corcho	7
I-1.4.1 Generalidades sobre el proceso de fabricación del tapón	7
I-1.4.2 Tipos de tapones	7
I-1.4.3 Proceso de fabricación de tapones de corcho	8
I-1.4.3.1 Fabricación de tapones naturales	8
I-1.4.3.2 Fabricación del tapón colmatado	10
I-1.4.3.3 Fabricación del tapón aglomerado	10
I-2. Microbiología del corcho: composición de las poblaciones microbianas detectadas en el corcho	11
I-3. Importancia de los haloanisoles como contaminantes de alimentos: el <i>cork taint</i>	13
I-3.1 Estructura química de anisoles: cloroanisoles y bromoanisoles	14
I-3.2 Los cloroanisoles como contaminantes de alimentos	14
I-3.3 Impacto económico y comercial de la contaminación del vino por cloroanisoles y bromoanisoles	16
I-4. Mecanismos moleculares de formación de cloroanisoles	18
I-4.1 Compuestos clorofenólicos y bromofenólicos: usos industriales	18
I-4.1.1 Clorofenoles	18
I-4.1.2 Bromofenoles	19
I-4.2 La biometilación de clorofenoles y bromofenoles como origen de cloroanisoles y bromoanisoles	20
I-4.2.1 Mecanismos de formación de bromoanisoles y cloroanisoles	20
I-4.2.2 La biometilación de bromoanisoles y cloroanisoles como origen del <i>cork taint</i>	22
I-4.2.3 Significado de la biometilación de clorofenoles: los cloroanisoles como productos resultantes de la detoxificación de clorofenoles	22
I-5. Biodegradación y biorremediación: una solución biotecnológica al problema del <i>cork taint</i>	25
I-5.1 Introducción	25
I-5.2 Biodegradación de clorofenoles	26
I-5.3 Biodegradación de cloroanisoles	27
I-5.4 Características generales del género <i>Trichoderma</i>	28
I-5.5 <i>T. longibrachiatum</i> : organismo idóneo para su utilización como agente de control biológico frente al <i>cork taint</i>	28
I-5.6 Objetivos de este trabajo	29
Materiales y Métodos	31
II-1. Microorganismos utilizados	33
II-1.1 Cepas bacterianas	33
II-1.2 Cepas fúngicas	33
II-2. Vectores fágicos y plasmídicos	34
II-2.1 pGEM-T Easy	34
II-2.2 Pbluescript (KS/SK)	34
II-2.3 pALGEN3	35
II-2.4 pJL43gdh	35

II-2.5 pRLMex30.....	35
II-2.6 pPEL3G.....	35
II-2.7 λ -DASH II.....	35
II-2.8 Vectores plasmídicos construidos para el desarrollo de esta tesis.....	36
II-2.8.1 pEXLAC.....	36
II-2.8.2 pARNiMT265.....	36
II-2.8.3 pBMT-PHint.....	36
II-3. Productos y Reactivos	36
II-3.1 Proveedores.....	36
II-3.2 Reactivos específicos para biología molecular	37
II-3.2.1 Marcadores de peso molecular.....	37
II-3.2.2 Oligonucleótidos	37
II-3.2.3 Antibióticos	37
II-3.2.4 Enzimas de restricción y modificadoras.....	37
II-3.3 Marcadores de peso molecular para electroforesis de proteínas.....	38
II-3.4 Otros sistemas empleados (kits comerciales)	39
II-4. Instrumental.....	39
II-5 Medios de cultivo	41
II-5.1 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	41
II-5.2 Medios de cultivo para hongos	42
II-5.3 Soluciones de antibióticos	44
II-6 Mantenimiento y cultivo de microorganismos	44
II-6.1 Crecimiento de microorganismos.....	44
II-6.1.1 Crecimiento de cepas bacterianas.....	44
II-6.1.2 Cultivos de bacteriófagos	45
II-6.1.3 Crecimiento de cepas fúngicas.....	45
II-6.2 Mantenimiento de microorganismos	45
II-7. Métodos de extracción y análisis de ADN	46
II-7.1 Extracción de ADN	46
II-7.1.1 Limpieza y purificación del ADN	46
II-7.1.2 Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i> a pequeña escala (Minipreps)	47
II-7.1.3 Aislamiento de ADN plasmídico a gran escala (Lisis Alcalina)	47
II-7.1.4 Aislamiento de ADN total a partir de micelio y esporas de hongos.....	48
II-7.2 Análisis y modificación del ADN.....	49
II-7.2.1 Cuantificación y análisis de la pureza de ácidos nucleicos.....	49
II-7.2.2 Eliminación selectiva de ácidos nucleicos	49
II-7.2.3 Digestión de ADN con enzimas de restricción	49
II-7.2.4 Reacciones de modificación de ADN.....	50
II-7.2.4.1 Desfosforilación de los extremos 5' de fragmentos de ADN.....	50
II-7.2.4.2 Ligación de fragmentos de ADN.....	50
II-7.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	50
II-7.3 Electroforesis de ácidos nucleicos	52
II-7.3.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	52
II-7.3.2 Extracción de ADN de geles de agarosa.....	53
II-7.3.2.1 Método de congelación rápido.....	53
II-7.3.2.2 Sistema “ <i>GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i> ”.....	54
II-7.4 Transferencia de ADN a soportes sólidos.....	55
II-7.5 Procedimientos para la hibridación de ADN	56
II-7.5.1 Marcaje de sondas de ADN.....	56
II-7.5.1.1 Marcaje mediante “ <i>High Prime DNA labeling random kit</i> ”	56
II-7.5.1.2 Cuantificación de marcaje.....	57

II-7.5.2 Hibridación de ADN	58
II-7.6 Secuenciación de ADN.....	60
II-7.6.1 Sistema de secuenciación <i>ABI Prism</i>	60
II-7.7 Análisis informático	61
II-8. Métodos de extracción y análisis de ARN	62
II-8.1 Obtención de ARN total de <i>T. longibrachiatum</i>	62
II-8.2 Electroforesis de ARN.....	63
II-8.2.1 Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes.....	63
II-8.3 Retrotranscripción de ARN.....	64
II-8.3.1 Retrotranscripción de ARN y amplificación por PCR (RT-PCR)	64
II-8.3.2 Retrotranscripción de ARN	65
II-9. Manipulación de genotecas en vectores fágicos	66
II-9.1 Construcción de genotecas	66
II-9.2 Amplificación de bacteriófagos	69
II-9.2.1 Amplificación de genotecas.....	69
II-9.2.2 Amplificación de un bacteriófago recombinante.....	69
II-9.3 Rastreo de genotecas construidas en vectores fágicos	69
II-9.4 Infección en medio líquido y extracción de ADN de fagos recombinantes	71
II-10. Transformación genética de microorganismos.....	72
II-10.1 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	72
II-10.1.1 Inducción del estado de competencia de células de <i>Escherichia coli</i>	72
II-10.1.2 Proceso de transformación de <i>Escherichia coli</i>	73
II-10.2 Transformación de <i>T. longibrachiatum</i>	73
II-10.2.1 Obtención de protoplastos de <i>T. longibrachiatum</i>	73
II-10.2.2 Transformación de protoplastos	74
II-11. Métodos generales de análisis de proteínas y ensayos enzimáticos.....	75
II-11.1 Obtención de extractos proteicos libres de células de <i>T. longibrachiatum</i>	75
II-11.2 Cuantificación de proteínas	75
II-11.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	75
II-11.4 Ensayo enzimático de la actividad 2,4,6-TCP metiltransferasa	77
II-11.5 Análisis por HPLC de la bioconversión de 2,4,6-TCP a 2,4,6-TCA en fracciones proteicas.....	77
II-11.6 Detección del enzima 2,4,6-TCP metiltransferasa por marcaje radioactivo	78
II-11.7 Ensayo enzimático de la actividad lacasa.....	79
II-11.8 Inmunodetección de proteínas.....	79
II-11.8.1 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	79
II-11.8.2 Inmunoadsorción.....	80
II-12. Técnicas generales para la purificación de proteínas.....	81
II-12.1 Desalado y cambio de tampones de muestras proteicas.....	81
II-12.2 Concentración de muestras proteicas	81
II-12.3 Cromatografía de interacción hidrofóbica	81
II-12.4 Cromatografía de intercambio iónico	82
II-12.5 Cromatografía en columnas de hidroxiapatito	82
II-12.6 Cromatografía de gel-filtración	83
II-13. Purificación de la actividad 2,4,6-TCP-O- metiltransferasa de <i>T. longibrachiatum</i>.....	84
II-13.1 Paso 1: Obtención de extractos libres de células.....	84
II-13.2 Paso 2: Cromatografía de intercambio aniónico en una columna HiTrap DEAE Fast Flow de 5ml.....	84
II-13.3 Paso 3: Cromatografía en columna de hidroxiapatito <i>Bio-Scale CHT-1</i>	85
II-13.4 Paso 4: Cromatografía de intercambio aniónico en columna <i>ResourceQ</i>	85
II-13.5 Paso 5: Ultrafiltración	86

II-13.6 Paso 6: Cromatografía de gel filtración en una columna <i>Superdex 200</i> [®]	86
II-14. Cultivo de cepas seleccionadas de <i>T. longibrachiatum</i> en granulado de corcho.....	87
II-14.1 Cultivo sobre granulado de corcho.....	87
II-14.2 Extracción de los clorofenoles y cloroanisoles.....	87
Resultados y Discusión.....	89
III-1. Purificación del enzima clorofenol-<i>O</i>-metiltransferasa (CPOMT) de <i>T. longibrachiatum</i> implicada en la formación de 2,4,6-tricloroanisol.....	91
III-1.1 Optimización del ensayo enzimático para la actividad clorofenol- <i>O</i> -metiltransferasa (CPOMT).....	91
III-1.1.1 Periodo de incubación de la reacción enzimática.....	91
III-1.1.2 Extracción de la fase acuosa.....	91
III-1.2 Purificación de la actividad 2,4,6-TCP metiltransferasa.....	92
III-1.2.1 Obtención de extractos enzimáticos libres de células.....	92
III-1.2.2 Cromatografía de intercambio aniónico en columna <i>HiTrap DEAE FF</i>	92
III-1.2.3 Cromatografía en columna de hidroxiapatito <i>Bio-Scale CHT-1</i>	93
III-1.2.4 Cromatografía de intercambio aniónico en columna <i>Resource-Q</i>	93
III-1.2.5 Ultrafiltración.....	93
III-1.2.6 Cromatografía de gel filtración en columna <i>Superdex 200</i>	94
III-1.2.7 Identificación del enzima CPOMT mediante fotomarcaje con S-adenosil-L-metionina radiactiva.....	95
III-2. Secuenciación de péptidos internos de la proteína CPOMT.....	96
III-3. Clonación, secuenciación y caracterización del gen <i>cpomt</i> de <i>T. longibrachiatum</i>.....	98
III-3.1 Construcción de una genoteca de ADN genómico de <i>T. longibrachiatum</i> en el vector fágico λ -DASH [®] II/ <i>Bam</i> H.....	98
III-3.1.1 Digestión parcial del ADN total de <i>T. longibrachiatum</i> con el enzima de restricción <i>Sau</i> 3AI y ligación a los brazos <i>Bam</i> H del vector λ -DASH [®] II/ <i>Bam</i> H.....	98
III-3.1.2 Titulación de la genoteca.....	99
III-3.2 Amplificación de un fragmento interno del gen <i>cpomt</i> mediante PCR.....	100
III-3.3 Rastreo por PCR de la genoteca genómica de <i>T. longibrachiatum</i>	101
III-3.4 Determinación y análisis de la secuencia nucleotídica.....	102
III-3.5 Análisis del número de copias del gen <i>cpomt</i> en el genoma de <i>T. longibrachiatum</i>	107
III-3.6 Análisis de la secuencia de aminoácidos de la <i>O</i> -metiltransferasa de <i>T. longibrachiatum</i> deducida a partir del gen <i>cpomt</i>	108
III-3.6.1 Análisis funcional de la secuencia: búsqueda de homólogos.....	108
III-3.6.2 Caracterización de la estructura primaria.....	110
III-3.6.2.1 Composición aminoacídica, peso molecular y secuencias repetidas.....	110
III-3.6.2.2 Predicción de dominios.....	111
III-3.6.2.3 Predicción de sitios de glicosilación.....	112
III-3.6.2.4 Predicción de la formación de puentes disulfuro.....	113
III-3.6.3 Predicción de la estructura secundaria.....	113
III-3.6.4 Predicción de la estructura tridimensional.....	114
III-3.7 Análisis de las regiones adyacentes al gen <i>cpomt</i>	115
III-3.8 Análisis de la inducción por 2,4,6-TCP del promotor del hipotético gen <i>cpomt</i>	116
III-4. Transformación génica de <i>T. longibrachiatum</i>.....	117
III-4.1 Obtención de protoplastos.....	117
III-4.2 Marcadores de selección.....	118
III-4.3 Selección de plásmidos transformantes.....	118
III-5 Disrupción del gen <i>cpomt</i> por doble recombinación homóloga.....	121

III-5.1 Construcción del vector de interrupción pBMT-PHint.....	121
III-5.2 Análisis de los transformantes mediante amplificación por PCR	123
III-6 Atenuación del gen <i>cpomt</i> mediante ARN's de interferencia.....	124
III-6.1 Construcción del vector de atenuación pARNi-MT265.....	126
III-6.2 Análisis de los transformantes mediante amplificación por PCR	126
III-6.3 Verificación de los transformantes mediante hibridación de ácidos nucleicos	127
III-6.4 Producción de 2,4,6-TCA en los transformantes MTaten.....	128
III-6.5 Expresión diferencial del gen <i>cpomt</i> en el transformante MTaten-37	129
III-6.6 Ensayos enzimáticos de la actividad CPOMT en el transformante MTaten-37	130
III-6.7 Ensayos de resistencia a 2,4,6-TCP	131
III-6.8 Ensayos sobre corcho granulado.....	132
III-7 Expresión heteróloga de las lacasas de <i>Polyporus hydnoides</i> y <i>Pleurotus eryngii</i> en <i>T. longibrachiatum</i>.....	133
III-7.1 Expresión del gen <i>lacI</i> de <i>P. hydnoides</i> en <i>T. longibrachiatum</i>	134
III-7.1.1 Construcción del vector de expresión de la lacasa de <i>Polyporus hydnoides</i> : pEXLAC	134
III-7.1.2 Análisis de los transformantes mediante amplificación por PCR	135
III-7.1.3 Verificación de los transformantes mediante hibridación de ácidos nucleicos	136
III-7.1.4 Ensayos de la actividad lacasa en los transformantes pEXLAC confirmados.....	137
III-7.1.5 Análisis de la expresión del gen <i>lac</i> de <i>P. hydnoides</i>	137
III-7.1.5.1 Análisis transcripcional del gen <i>lac</i> de <i>P. hydnoides</i>	137
III-7.1.5.2 Expresión de la proteína LAC1 de <i>P. hydnoides</i>	138
III-7.2 Expresión del gen <i>peB</i> de <i>P. eryngii</i> en <i>T. longibrachiatum</i>	139
III-7.2.1 Vector para la de expresión en <i>T. longibrachiatum</i> del gen <i>peB</i> de <i>P. eryngii</i> ..	139
III-7.2.2 Ensayos en medio sólido de la actividad lacasa en los transformantes pPEL3G.	140
III-7.2.3 Análisis de los transformantes mediante amplificación por PCR	141
III-7.2.4 Verificación de los transformantes mediante hibridación de ácidos nucleicos	142
III-7.2.5 Ensayos enzimáticos en medio líquido de la actividad lacasa en los transformantes pPEL3G	143
III-7.2.6 Ensayos sobre corcho granulado.....	143
Discusión general	145
IV-1 Identificación, donación y secuenciación del gen del enzima CPOMT de <i>T. longibrachiatum</i>.....	147
IV-1.1 Introducción	147
IV-1.2 Idoneidad de la técnica de secuenciación <i>de novo</i> para la identificación de proteínas	148
IV-1.3 Identificación de CPOMT como una <i>O</i> -metiltransferasa	150
IV-2 El enzima CPOMT. Función y sentido biológico	151
IV-2.1 Análisis filogenético de la actividad metiltransferasa sobre compuestos fenólicos. Búsqueda de homólogos.....	151
IV-2.2 Inducción del gen <i>cpomt</i>	154
IV-2.3 Significado biológico de la actividad CPOMT	155
IV-3 Expresión heteróloga de lacasas en <i>T. longibrachiatum</i>	156
IV-4 Perspectivas futuras.....	157
Conclusiones	161
Bibliografía	165

I-1. El corcho: historia, propiedades y relación con el vino.

I-1.1 Breve historia del corcho y sus aplicaciones.

El corcho es un biopolímero de origen vegetal obtenido a partir de la corteza externa del alcornoque (*Quercus suber* L.). Este árbol es típico de la región mediterránea y ocupa principalmente extensas zonas de España, Portugal, Francia, Italia, Grecia, Argelia, Marruecos y Túnez. En estos países existen aproximadamente un total de 2.178.000 hectáreas de alcornocales. La mayor extensión corresponde a Portugal con 725.000 hectáreas (33%), situándose España a continuación con un total de 510.000 hectáreas, las cuales se localizan casi exclusivamente en Extremadura y Andalucía.

El corcho es un producto que tiene como principales propiedades una baja densidad, y una gran elasticidad, impermeabilidad, adherencia y compresibilidad. Además el corcho tiene otra serie de cualidades fundamentales: es compacto, resistente y se puede considerar inalterable. Estas características son bien conocidas desde la antigüedad. De hecho, ya se utilizaba 3000 años antes de Cristo en China como elemento de flotación en artes de pesca. Más tardíamente se utilizó en la Grecia antigua para cerrar vasijas de vino y aceite. Posteriormente, en el siglo I, el historiador Plinio en su célebre obra *Historia Natural* hace referencia al significado del corcho en el mundo griego, adorado como símbolo de libertad y de honra, razón por la cual sólo los sacerdotes lo podían cortar.

También durante el Imperio romano se utilizaron las extraordinarias propiedades del corcho como elemento capaz de proporcionar un cierre eficaz, como lo atestigua el hallazgo de ánforas cerradas con corcho en excavaciones en Pompeya, Campania o en innumerables barcos romanos hundidos a lo largo del mar Mediterráneo.

El corcho fue utilizado también durante siglos en la construcción de embarcaciones, ya que es resistente, impermeable y jamás se pudría.

Sin duda, uno de los más célebres encuentros entre el corcho y el mundo de la ciencia ocurrió en el siglo XVIII cuando el físico inglés Robert Hooke obtuvo la primera imagen microscópica de las células que componen la corteza del alcornoque. Es en este siglo cuando el corcho comienza a utilizarse de manera regular en la industria, sobre todo después de que el abad Dom Pérignon reinventara el tapón de corcho, ya utilizado por griegos y romanos, aunque otros autores creen que tomó la idea de peregrinos españoles que visitaban la abadía (<http://www.apcor.pt>).

En la actualidad la principal aplicación del corcho es la fabricación de tapones para embotellar vinos y espumosos, alcanzando la producción mundial valores en torno a los 20.000 millones de unidades anuales, aunque en los últimos años la producción a caído hasta los 16.300 millones (<http://www.amorimcork.com>, <http://www.eleconomista.es>) a causa de campañas de desprestigio contra el corcho debido al problema del *cork taint*,

o contaminación del corcho, fenómeno por el cual el tapón de corcho sería el responsable de contaminar el vino con compuestos químicos de origen microbiano confiriéndole un olor y/o sabor muy desagradable que impide su consumo.

En menor medida el corcho se utiliza en la fabricación desde utensilios domésticos hasta pernos, plumillas, papel de corcho, chalecos salvavidas, etc. También es importante como elemento aislante y decorativo en construcción.

I-1.2 Estructura y composición química del corcho.

La pared celular es uno de los rasgos más característicos de las células vegetales. Consiste en una capa rígida que se localiza en el exterior de la membrana plasmática y actúa como compartimiento celular mediando en todas las relaciones de la célula con el entorno. Además, la pared celular protege los contenidos de la célula, da rigidez a la estructura celular de los hongos y define la estructura y otorga soporte a los tejidos de las plantas. Hay casos como el del alcornoque en el que la existencia del felógeno o cámbium suberoso produce un crecimiento transversal del tallo. Las células de éstos tienen la capacidad de producir una pared celular secundaria además de la primaria. Esta pared secundaria considerablemente engrosada es lo que conocemos como corcho.

I-1.2.1 Composición química del corcho.

El corcho es un heteropolímero muy complejo en el que químicamente se distinguen varias fracciones: suberina, celulosa, ceras, polifenoles y polisacáridos.

La **suberina** es el componente mayoritario del corcho (45%) y es además el principal agente responsable de su elasticidad. Desde un punto de vista químico, la suberina de corcho de alcornoque es una mezcla compleja de ácidos fenólicos (como el ácido ferúlico que es el más abundante) esterificados a ácidos grasos de cadena larga (C_{14} - C_{30}). Estos compuestos le confieren un carácter hidrofóbico, aportando impermeabilidad a la estructura. Además también encontramos ácidos α,ω -dicarboxílicos y ω -hidroxiácidos (García-Vallejo *et al.*, 1997). Análisis realizados con suberina de peridermo de patata indican que los principales componentes de la fracción fenólica son polímeros derivados del ácido hidroxicinámico (Bernards *et al.*, 1995). Además se ha demostrado la presencia de moléculas de glicerol intercaladas entre los dominios alifáticos y aromáticos de la suberina (Moire *et al.*, 1998). Una representación esquemática de su estructura se puede apreciar en la **Figura I-1**.

La composición en **polifenoles** del corcho es muy variable (representan aproximadamente un 33% de su peso), pero el principal componente de esta naturaleza es la lignina. La **lignina** (que representa aproximadamente el 27% en peso) es un polímero constituido por restos fenilpropanoides derivados casi exclusivamente de los ácidos *p*-cumárico, coniferílico y sinapílico, unidos entre sí por enlaces éter o carbono-carbono (Azcón-Bieto y Talón, 1993). Es una estructura muy estable y extremadamente resistente

complejas de compuestos alifáticos, siendo los mayoritarios los alcanos de número impar de carbonos (C_{29} - C_{31}). También podemos encontrar varios compuestos terpenoides, concretamente triterpenos como cerina y friedelina (Caldas *et al.*, 1985).

Finalmente el 5% restante está constituido por agua, minerales, sales y otros componentes minoritarios como la glicerina.

I-1.2.2 Estructura del corcho.

El corcho desde el punto de vista estructural se podría definir como un parénquima suberoso, producido por el meristemo felodérmico de *Quercus suber*, que recubre el tronco y ramas del árbol, y que tiene una gran capacidad de regeneración cada vez que es retirado del árbol, por término medio una vez cada 8-11 años. Observado al microscopio, se aprecia que está compuesto por células poligonales, ligeramente aplanadas, ocupadas principalmente por aire (Pérez y Pérez, 1996) y que presentan una disposición bastante regular en capas superpuestas. Esta estructura particular es consecuencia del proceso de suberificación que se da durante el ciclo vegetativo de la planta. Durante este proceso el lumen celular se restringe y el protoplasto desaparece al ser totalmente reabsorbido. De la célula original sólo queda la pared, formada por tres capas:

1. **Capa celulósica**, en contacto con las cavidades celulares.

2. **Capa suberificada** de mayor espesor, que está compuesta por estratos superpuestos de suberina y cera y que es la que confiere al corcho su elasticidad especial.

3. **Capa lignificada**, la más externa.

El tejido suberoso no es homogéneo, y de hecho está atravesado en su interior por poros o canales, con paredes más o menos lignificadas, que constituyen las lenticelas, rellenas de polvo rico en taninos (Suárez, 1992). La forma, tamaño y porcentaje de lenticelas son responsables de la porosidad del corcho y dependen fundamentalmente de factores genéticos.

I-1.3 Propiedades del corcho como tapón de botellas de vino.

Como consecuencia de las características químicas y estructurales anteriormente citadas, el corcho tiene unas propiedades físicas muy características y que son el motivo de su gran utilización a lo largo de la historia. Estas propiedades se detallan a continuación.

La **impermeabilidad** a líquidos y a la mayor parte de los gases, aunque se ha demostrado que esta impermeabilidad no es total, debido a la estructura parcialmente hueca del corcho. Esta característica permite el intercambio de gases y la correcta evolución del vino embotellado (Mas *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2006).

La **compresibilidad** y **elasticidad**, debidas al deslizamiento entre las capas de suberina y de cerina. Estas características a su vez dependen de la cantidad de agua presente en el mismo.

La **adherencia** en contacto con una superficie lisa, como consecuencia de las numerosas cavidades que actúan a modo de ventosa que presenta una superficie de corcho cortada. Esto es debido a los espacios y cavidades propios de su estructura.

Todas estas características hacen del corcho un material idóneo para el correcto embotellamiento del vino.

I-1.4 Proceso general de fabricación de un tapón de corcho.

I-1.4.1 Generalidades sobre el proceso de fabricación del tapón.

El proceso de fabricación del tapón de corcho es un proceso complejo y dilatado en el tiempo, ya que sólo los alcornoques de cierta edad pueden producir corcho de un grosor suficiente para permitir la obtención de tapones. Desde el inicio del ciclo vital del alcornoque, a partir de una bellota plantada y bajo condiciones ideales, se necesitan aproximadamente 40-45 años para recoger el primer corcho comercialmente apto.

Como norma general las etapas que el árbol tiene que pasar hasta que podemos obtener una plancha de corcho de un grosor suficiente que permita su manufactura son las siguientes:

- La primera corteza o **corcho virgen** es retirada después de unos 25 años, cuando el grosor del tronco ha alcanzado un mínimo de 70 cm y un altura de 1.2 m. Este primer corcho no es adecuado para fabricar tapones y se suele utilizar para la fabricación de elementos decorativos.

- Después de 9 años se retira la segunda producción de corteza, la cual no suele ser lo bastante homogénea estructuralmente todavía para producir tapón natural (de una pieza). Se trata de un corcho denominado **corcho segundero**.

- Sólo la tercera generación de corteza, **amadia**, es considerada una corteza madura e ideal para la producción de tapones. Su tiempo de recogida (cada 8-11 años por término medio), y por tanto su grosor, depende de las condiciones climáticas locales, así como del diámetro deseado de los tapones (Caritat *et al.*, 2000).

I-1.4.2 Tipos de tapones.

La clasificación de los tapones se realiza en base a su longitud y a su diámetro, según la norma ISO nº 3863, además de por su aspecto externo (número de lenticelas, manchas de distintos colores, galerías de insectos, cortes o defectos físicos, etc.) y el método de fabricación (Aleixandre y García, 1993).

Considerando la calidad del tapón y el método de fabricación empleado los tapones más frecuentemente utilizados se clasifican en:

- **Tapones naturales.** Se trata de tapones de una sola pieza, siendo los de mayor calidad y precio en el mercado. Se utilizan preferentemente en el embotellado de vinos de calidad y crianza.

- **Tapones colmatados.** Se trata de un tapón natural de baja calidad que presenta una porosidad acentuada y defectos de estructura, siendo sometido a un

tratamiento complementario, denominado colmatado, para tapar las lenticelas con polvo de corcho mezclado con una cola (látex natural) y así disimular las imperfecciones y asegurar la estanqueidad del tapón en la botella.

- **Tapones aglomerados.** Son aquellos obtenidos a partir de granulado de corcho, el cual es tratado con una serie de sustancias químicas como poliuretano, ceras o látex, que permiten su aglomeración y posterior prensado.

Los tapones colmatados y sobre todo los aglomerados son utilizados para embotellar vinos de mesa (de una calidad inferior) y otros productos.

- **Tapones para vinos espumosos** (cava y champagne). Se trata de tapones formados por un cuerpo central de aglomerado de corcho al que en su base se le pegan dos discos de corcho natural.

- **Tapones de corcho de tres piezas** (1+1). Se componen de un cuerpo central de aglomerado y de 2 discos de corcho natural, uno en cada extremo. Pensados para vinos jóvenes y crianzas.

I-1.4.3 Proceso de fabricación de tapones de corcho.

I-1.4.3.1 Fabricación de tapones naturales.

El proceso de fabricación de tapones es laborioso y consta de varias etapas, que varían dependiendo del tipo de tapón (natural, colmatado o aglomerado) y de la tecnología empleada por la empresa fabricante (ver, por ejemplo, <http://www.rxgroup.com/es/produccio.htm>) aunque podemos destacar las siguientes fases en el proceso de manufactura del tapón natural:

1. **Proceso de descorche.** Es el proceso por el cual se retiran del árbol planchas de aproximadamente 150 por 40 cm de corteza de alcornoque, que debe tener una antigüedad mínima de 8-11 años. Su espesor normalmente oscila entre 30 y 80 mm en función de la calidad y edad del árbol (Gruart, 1989; Aleixandre y García, 1993). Las operaciones de extracción se realizan, generalmente durante los meses de julio y agosto.

2. **Fase de reposo a la intemperie.** A continuación el corcho se apila para reposar por un periodo de tiempo variable (hasta varios meses) en el monte, en el propio lugar de descorche, o a veces también en la factoría. Durante este periodo las planchas pierden humedad y ganan en flexibilidad y ductibilidad. Ello facilitará su posterior manipulación en fábrica que suele comenzar con las primeras lluvias de octubre.

3. **Fase de cocido.** Las planchas son entonces transportadas a las factorías donde se clasifican y se someten a una limpieza inicial que tiene como objetivo fundamental la eliminación de la capa de corteza más externa o raspa. A continuación se cuecen durante 30-50 minutos por inmersión en grandes balsas de agua a una temperatura que oscila entre los 80-95°C. Este tratamiento, variable dependiendo del fabricante, tiene una función esterilizante y desparasitadora, a la vez que ablanda las planchas obteniéndose un corcho elástico y de menos densidad (Pérez y Pérez, 1996).

4. **Fase de reposo o maduración en bodega.** Más tarde las planchas se almacenan en bodega para su maduración a una temperatura de 15–20°C durante unas tres semanas. En esta fase tiene lugar un crecimiento masivo de microorganismos sobre el corcho, fundamentalmente hongos, que parecen jugar un papel muy importante en la adquisición de las propiedades de flexibilidad y manejabilidad que permiten su posterior procesamiento. El crecimiento de hongos forma gruesas capas sobre las planchas que son vulgarmente conocidas como “barbas del corcho”.

5. **Obtención del tapón bruto.** A partir de las planchas y mediante corte mecánico se obtiene el tapón bruto, de unas dimensiones similares, aunque mayores que las del tapón final. En el caso de fabricación de tapón natural en esta fase se desecha aproximadamente el 70% del material de partida

6. **Fase de tratamiento mecánico y selección.** Este proceso tiene como objetivo rebajar el tapón bruto dándole la medida exacta de su longitud. Después del rebaje se clasifican los tapones en función de su mayor o menor porosidad, el tipo de corte y la cantidad de lenticelas. Esta selección en la actualidad es realizada por operarios mediante procedimientos neumáticos o utilizando modernos sistemas de análisis de imagen.

7. **Lavado.** Finalmente los tapones ya clasificados son lavados. El proceso de lavado suele consistir en un tratamiento con ácido oxálico y agua oxigenada en el que además de desinfectar el tapón, se blanquean las partes leñosas de éste (Puerto, 1995).

Hasta hace relativamente pocas fechas este tratamiento consistía en lavar el tapón durante aproximadamente dos minutos con una solución de hipoclorito cálcico (30 g/l), para a continuación mantenerlo a temperatura ambiente durante unas dos horas y ser lavado a continuación con una solución de ácido oxálico (6–8 g/l) que tenía un doble objetivo: por un lado neutralizar el efecto oxidante del hipoclorito y por otro producir un depósito de oxalato cálcico que mejora la calidad visual del tapón al simular una estructura y superficie más finas y homogéneas (Butzke *et al.*, 1999). Este tratamiento, sin embargo, ha caído en la actualidad en desuso, debido a que el blanqueo con soluciones de hipoclorito ha sido señalado como un posible origen del perjudicial fenómeno conocido como *cork taint* o contaminación del corcho y de cuyo estudio nos ocuparemos en este trabajo.

Por esta razón, en la actualidad se usa un procedimiento alternativo que consiste en blanquear el tapón con una solución de peróxido de hidrógeno (10%) que contiene un 5% de amonio. A continuación se realiza una neutralización con ácido oxálico que a veces es sustituida por tratamiento con ácido cítrico (1%). Más tarde los tapones son aclarados con agua y seguidamente secados hasta reducir el contenido de agua al 5.5–8%, niveles que no permiten el crecimiento de microorganismos, pero que todavía permiten que el corcho mantenga sus propiedades de flexibilidad.

8. **Secado.** Mediante el empleo de aire caliente.

9. **Clasificación electrónica y visual.** A fin de eliminar aquellos que presenten defectos y poder clasificarlos por categorías.

10. **Marcaje del tapón.** Posteriormente, los tapones se marcan con el sello de la firma embotelladora o con anagramas o distintivos de las cosechas, a fuego o por impresión con rodillo de tinta.

11. **Estabilización.** Etapa necesaria para que los tapones alcancen un correcto porcentaje de humedad.

12. **Tratamiento de superficie.** Finalmente los tapones sufren el suavizado para paliar el carácter abrasivo del corcho y facilitar la entrada y salida de la botella. Para ello algunos fabricantes los revisten con una mezcla de silicona y parafina.

13. **Embolsado y esterilizado.** En algunos casos y a petición del fabricante el tapón puede ser sometido a un tratamiento con SO_2 como medida para frenar el crecimiento de microorganismos durante el transporte y posterior almacenamiento. Este tratamiento es especialmente efectivo para evitar el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras sin necesidad de esterizarlos. De hecho este tratamiento es capaz de disminuir el número de células vivas de *Penicillium* en un 96% y de *Trichoderma* de un 12% a un 32 % (Lefebvre *et al.*, 1983).

I-1.4.3.2 Fabricación del tapón colmatado.

Básicamente y tras el lavado y esterilizado los tapones que tienen una presentación deficiente son a veces colmatados, a fin de rellenar poros, cavidades y otras imperfecciones sin que cambien por ello sus propiedades mecánicas. Esta operación se realiza en un tambor giratorio en presencia de polvo de corcho (partículas de corcho de una granulometría inferior a 0.2 mm de diámetro) y látex natural (sustancia cuyo uso y contacto está aprobado para productos alimenticios). Las características químicas del látex deben ser conocidas y es muy importante que haya buena adhesión del polvo para reparar todas aquellas imperfecciones. Posteriormente los tapones son sometidos a un proceso de lavado con productos exentos de cloro y un suavizado.

I-1.4.3.3 Fabricación del tapón aglomerado.

En el caso de la fabricación de tapón aglomerado se usa como material de partida restos de corcho del proceso de fabricación de tapón natural.

Estos restos son seleccionados y lavados para a continuación someterse a un proceso mecánico que permite la obtención de un granulado homogéneo y de diámetro variable. Este granulado se mezcla con colas, látex y poliuretano y se empaqueta para formar largos cilindros, a partir de los cuales se recortan los tapones en bruto.

I-2. Microbiología del corcho: composición de las poblaciones microbianas detectadas en el corcho.

El corcho es, desde el punto de vista microbiano, un ecosistema muy complejo en el que se pueden encontrar una gran cantidad y variedad de microorganismos, y ello a pesar de que el corcho es un material que por sus características propias tiende a limitar el crecimiento de los microorganismos. Entre ellas citaremos, cabe destacar:

1. La relativamente **baja concentración de nutrientes**. La compleja estructura del corcho determina que únicamente aquellos microorganismos con capacidad suberolítica y/o ligninolítica, o con capacidad para degradar celulosas y hemicelulosas (aproximadamente el 12% del peso total del corcho) puedan, mediante su capacidad degradativa, acceder a compuestos más sencillos y fácilmente metabolizables.

2. **Baja actividad de agua**. El valor de actividad del agua calculado para tapones de corcho almacenados en bolsas herméticamente cerradas es de 0.55–0.56, por debajo del valor considerado como límite del crecimiento microbiano (Beuchat, 1983; Sarrete *et al.*, 1992), aunque suficiente para permitir la supervivencia de los microorganismos. La disponibilidad de agua no siempre es un factor limitante, ya que como hemos reseñado anteriormente, a lo largo del proceso de fabricación del tapón existen fases que suponen un incremento notable de los niveles de humedad del corcho.

Ambos factores determinan que los microorganismos se desarrollen preferentemente en la **superficie** del corcho. Estudios realizados mediante técnicas de microscopía electrónica confirman que en la mayor parte de los casos los hongos filamentosos, sin duda los de mayor capacidad invasiva, no penetran en profundidad más allá de ocho a 15 niveles celulares (Silva Pereira *et al.*, 2000a).

Estos microorganismos se pueden dividir en dos grandes grupos:

A. Aquellos con capacidad **para desarrollarse y crecer** a expensas del corcho (microorganismos saprófitos del corcho).

B. Microorganismos **naturales de otros nichos ecológicos** (suelo, material vegetal, etc.) y que aparecen como contaminantes ocasionales del corcho.

Sin embargo, diferenciar entre ambos grupos es prácticamente imposible. La mayoría de los microorganismos aislados se encuentran en el corcho ya en el momento de la extracción del árbol, mientras que otros lo colonizan durante la etapa de reposo, en el proceso de manufacturación, en la fase de bodega o durante el almacenamiento en fábrica (Silva Pereira *et al.*, 2000a).

Existe una extensa bibliografía que versa sobre la microbiota del corcho. Esta microbiota es muy variada y podemos destacar la presencia de un elevado número de bacterias y de hongos tanto filamentosos como levaduras (Bureau *et al.*, 1974; Davis *et al.*, 1981; Lefebvre *et al.*, 1983; Simpson y Lee, 1990; Lee y Simpson, 1993; Danesh *et al.*, 1997). Algunos de estos estudios se han realizado en España. Así, a partir de

cortezas de alcornoques y diferentes muestras de corcho (correspondientes a las distintas etapas del proceso de fabricación de tapón natural) obtenidas de robledales de Cataluña se han llegado a aislar un número elevado de microorganismos: casi 50 especies de hongos filamentosos o mohos, tres levaduras (*Cryptococcus* sp., *Rhodotorula glutinis* y *Saccharomyces cerevisiae*) y varias cepas bacterias pertenecientes a nueve géneros diferentes (Codina *et al.*, 1993, Calvo *et al.*, 1993; Calvo y Agut, 1996; Calvo *et al.*, 1995).

Bacterias	Hongos filamentosos	Hongos filamentosos	Levaduras
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Aureobasidium</i> sp.
<i>B. cereus</i>	<i>A. charticola</i>	<i>P. variotii</i>	<i>A. pullulans</i>
<i>B. circularis</i>	<i>A. roseum</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Candida</i> sp.
<i>B. firmus</i>	<i>A. strictum</i>	<i>P. chermesinum</i>	<i>C. famata</i>
<i>B. sedentarius</i>	<i>Alternaria</i> sp.	<i>P. chrysogenum</i>	<i>Cryptococcus</i> sp.
<i>B. subtilis</i>	<i>Aphanocladium</i> sp.	<i>P. citrinum</i>	<i>Rhodotorula</i> sp.
<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>A. album</i>	<i>P. corylophyllum</i>	<i>R. glutinis</i>
<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Armillaria</i> sp.	<i>P. decumbens</i>	<i>Saccharomyces</i> sp.
<i>Kurthia</i> sp.	<i>A. mellea</i>	<i>P. expansum</i>	<i>Sporodibolus</i> sp.
<i>Listeria</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>P. frequentans</i>	<i>S. johnsonii</i>
<i>Micrococcus</i> sp.	<i>A. flavus</i>	<i>P. funiculosum</i>	
<i>M. luteus</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>P. glabrum</i>	
<i>M. lyae</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. granulatum</i>	
<i>Nocardia</i> sp.	<i>A. niveus</i>	<i>P. meleagrinum</i>	
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>A. ochraceus</i>	<i>P. purpurogenum</i>	
<i>Streptomyces</i> sp.	<i>A. parasiticus</i>	<i>P. roquefortii</i>	
<i>S. griseus</i>	<i>A. terreus</i>	<i>P. rugulosum</i>	
	<i>A. versicolor</i>	<i>P. variable</i>	
	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>P. viridicatum</i>	
	<i>C. cladosporioides</i>	<i>Phoma</i> sp.	
	<i>C. herbarum</i>	<i>P. herbarum</i>	
	<i>C. macrocarpum</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	
	<i>Chrysonilia</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	
	<i>C. sitophila</i>	<i>R. arrhizus</i>	
	<i>Epicocum</i> sp.	<i>R. stolonifer</i>	
	<i>Eurotium</i> sp.	<i>Stachybotrys</i> sp.	
	<i>E. herbarorium</i>	<i>S. atra</i>	
	<i>E. repens</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	
	<i>E. versicolor</i>	<i>T. harzianum</i>	
	<i>Fusarium</i> sp.	<i>T. longibrachiatum</i>	
	<i>F. moniliforme</i>	<i>T. viride</i>	
	<i>F. oxysporium</i>	<i>Troncatella</i> sp.	
	<i>Mucor</i> sp.	<i>T. truncata</i>	
	<i>M. hiemalis</i>	<i>Verticillium</i> sp.	
	<i>M. mucedo</i>	<i>V. fusicolorum</i>	
	<i>Neurospora</i> sp.		
	<i>N. crassa</i>		

Tabla I-I: Microorganismos comúnmente aislados del corcho por varios autores (Davis *et al.*, 1981; Calvo *et al.*, 1993; Calvo *et al.*, 1995; Danesh *et al.*, 1997; Silva-Pereira *et al.*, 2000b; Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002a; Villa-Carbajal *et al.*, 2004; Belloch *et al.*, 2007).

Más recientemente se han realizado estudios de la microbiota de muestras de corcho extremeño, corroborándose que las especies de los hongos filamentosos *Chrysonilia*, *Trichoderma* o *Penicillium* son universales en todos los estudios realizados y que por tanto deberían considerarse saprófitos del corcho. La población de levaduras presentes en el corcho también ha sido analizada (Villa-Carvajal *et al.*, 2004), habiéndose descrito por primera vez la especie *Rhodotorula subericola* (Belloch *et al.*, 2007).

En cualquier caso parece claro que la microbiota del corcho puede variar considerablemente en función de parámetros como su origen, tipo de muestra (corteza, tapón, etc.) y condiciones ambientales.

A pesar de las limitaciones del corcho para el crecimiento de los microorganismos se trata de un material capaz de soportar poblaciones microbianas considerables. De hecho en corteza de corcho se han detectado niveles de hasta 3×10^6 hongos filamentosos y 7×10^5 bacterias por gramo de corcho. Estos niveles aumentan hasta alcanzarse en la fase de maduración en bodega unos niveles máximos de 1×10^8 hongos filamentosos y 5×10^3 bacterias por gramo de corcho (Calvo y Agut, 1996, Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002a).

Pese a su alto contenido microbiano sabemos muy poco acerca de la posible influencia de la microbiota asociada a corcho en la calidad final del tapón. No obstante, los productores tradicionalmente han venido manteniendo que los hongos que crecen sobre corcho tendrían un cierto efecto beneficioso, ya que producirían un ablandamiento que favorecería su manejo, además de producir el colapso de las lenticelas, lo cual resulta en un tapón más compacto y con menor posibilidad de pérdidas. Sin embargo, estas afirmaciones deben ser tomadas con cautela, ya que no existen datos experimentales que permitan su confirmación (Silva Pereira *et al.*, 2000a).

I-3. Importancia de los haloanisoles como contaminantes de alimentos: el *cork taint*.

El término *cork taint*, o contaminación del vino por corcho, hace alusión al aroma terroso y/o mohoso que presentan en ocasiones los vinos, y que impide su comercialización. Este fenómeno es reconocido como un problema muy serio en la industria del vino, ya que causa la pérdida de sus características frutales y enmascara su aroma (Amón *et al.*, 1989).

Son muchas (unos 100 compuestos volátiles) las sustancias identificadas como posibles agentes causantes del *cork taint* (Amón *et al.*, 1989). Entre ellos destacan los **cloroanisoles**, como el pentacloroanisol (PCA), el 2,3,4,6-tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA) y el **2,4,6-tricloroanisol** (2,4,6-TCA) como los agentes que contribuyen en mayor medida a este problema. Especialmente importante es el papel del 2,4,6-TCA, considerado como el compuesto responsable del 80% de los casos detectados, y que en un estudio sobre vinos australianos afectados por este problema llegó a detectarse en el 100% de las

botellas (Pollnitz *et al.*, 1996). Además, algunos estudios establecen una clara correlación entre la presencia 2,4,6-TCA en vino y tapón o entre la presencia de 2,4,6-TCA en el vino y la intensidad de la contaminación del corcho (Peña-Neira *et al.*, 2000).

De menor importancia son otras sustancias volátiles como el guayacol (un derivado del ácido vainílico) que proporciona al vino un sabor medicinal, fenólico o a quemado y que podría originarse por la acción de bacterias capaces de llevar a cabo la degradación de la lignina (Maga, 1978; Pometto *et al.*, 1981). Se ha demostrado recientemente que los hongos filamentosos no producen este compuesto creciendo en corcho (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2003).

Se cree que estas sustancias son producidas por microorganismos que crecen sobre el corcho que se utiliza en el taponado de las botellas de vino, aunque las evidencias al respecto son escasas. Sin embargo, es necesario mencionar que el fenómeno de la contaminación del corcho es muy complejo, ya que a menudo no es posible establecer una relación directa entre el *cork taint* y una única sustancia en una matriz tan compleja químicamente como el vino. Así, Silva Pereira *et al.* (2000a) sostienen que es probable que en la mayoría de los casos, varios compuestos contribuyan de manera simultánea al mismo efecto, posiblemente de forma sinérgica, siendo la contribución parcial de cada compuesto químico imposible de determinar.

I-3.1 Estructura química de anisoles: cloroanisoles y bromoanisoles.

Los haloanisoles, y especialmente cloroanisoles y bromoanisoles, más comúnmente identificados en vinos afectados por el *cork taint* son 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA), 2,3,4,6-tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA), pentacloroanisol (PCA) y 2,4,6-tribromosanisol (2,4,6-TBA). Las estructuras químicas de los principales haloanisoles involucrados en el *cork taint* se indican en la **Figura I-2**.

Estructuralmente podrían ser considerados como derivados del anisol (o metoxibenceno). El anisol es un derivado metilado del fenol, y es un compuesto presente en una gran variedad de sustancias volátiles, usualmente, con un olor muy intenso. Así pues, los haloanisoles están formados por moléculas de anisol a las que se le habría unido al menos una molécula de alguno de los cuatro halógenos que existen: flúor (F), cloro (Cl), Bromo (Br) y yodo (I). Los compuestos resultantes se denominan respectivamente fluoroanisoles, cloroanisoles, bromoanisoles y iodoanisoles.

I-3.2 Los cloroanisoles como contaminantes de alimentos.

Además del papel ya mencionado de los anisoles, especialmente el 2,4,6-TCA, como agentes responsables del *cork taint* en el vino, podemos encontrar en la bibliografía algún ejemplo más en los que se cita a los anisoles como agentes responsables de olores y sabores desagradables en distintos alimentos.

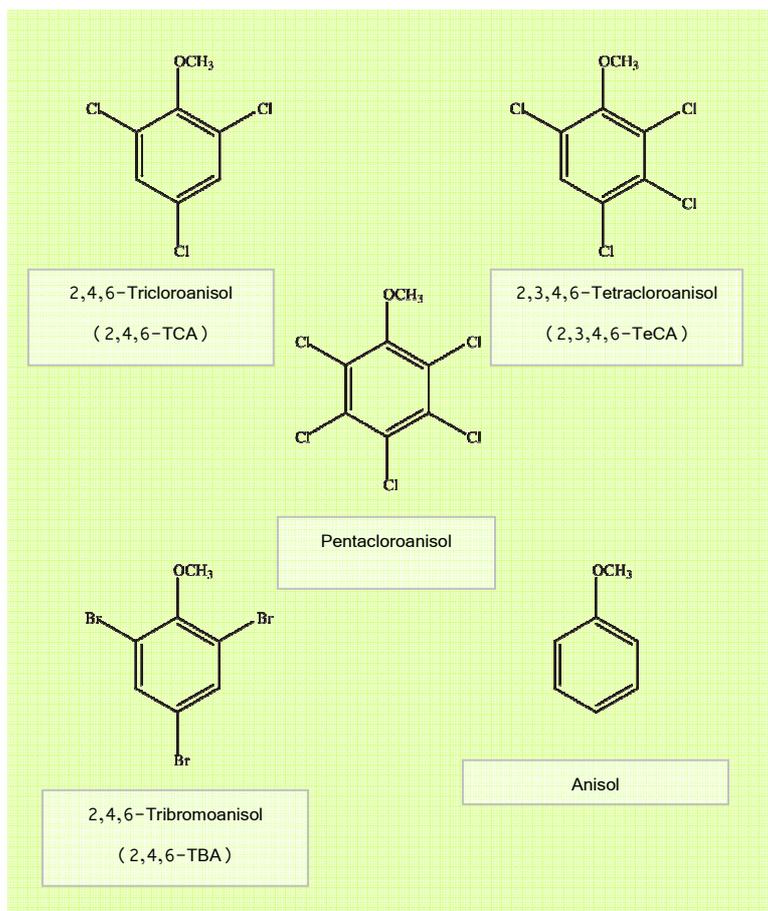


Figura I-2: Estructura química del anisol y los principales haloanisoles involucrados en la contaminación del vino con aromas fúngicos

La primera mención que se conoce en la literatura sobre el papel de los cloroanisoles como contaminantes de alimentos data del año 1966, cuando Engel y colaboradores informaron de la presencia de 2,3,4,6-TeCA en partidas de huevos y pollo con un desagradable sabor a moho (Engel *et al.*, 1966; Bemelmans *et al.*, 1974).

Posteriormente se demostró que el 2,3,4,6-TeCA era el agente responsable del mal olor de un lote de pollos (Curtis *et al.*, 1972 y 1974). Estos autores además demuestran que la biosíntesis de este compuesto podía ser llevada a cabo a partir de 2,3,4,6-TeCP por hongos filamentosos que crecían sobre el pollo como *Penicillium crustosum*, *Aspergillus sydowi* y *Scopulariopsis brevicaulis*. Estos microorganismos también podían metilar PCP.

En un trabajo paralelo Gee y Peel (1974) aislaron a partir de restos de comida tirados a la basura en un restaurante (parrilla), un total de 116 aislados fúngicos pertenecientes a un total de 26 especies. De ellos 99 (el 85.3%) podían metabolizar 2,3,4,6-TeCP, mientras que 58.6% (68 de 116) eran capaces de metilar este compuesto a 2,3,4,6-TeCA, siendo las especies que mostraron una mayor capacidad de producción *Penicillium corylophilum*, *Paecilomyces variotii* y *Aspergillus sydowi*.

También se ha demostrado la implicación del 2,4,6-TCA y el 2,3,4,6-TeCA como los compuestos responsables del desagradable olor y sabor de un lote de frutos secos. En este caso se concluyó que estos compuestos se originaron a partir de los

clorofenoles presentes en grandes cantidades en los embalajes de cartón reciclado utilizados, de donde pasaron a los alimentos (Whitfield *et al.*, 1985; Tindale *et al.*, 1989). El microorganismo identificado como responsable fue el hongo *Paecilomyces variotii* (Whitfield *et al.*, 1991).

En otros estudios se ha demostrado la presencia de cloroanisoles en una partida brasileña de café contaminada con un desagradable olor fúngico (Spadone *et al.*, 1990).

Además estos compuestos han sido señalados como productores de olores y sabores desagradables en agua para el consumo humano (Nystrom *et al.*, 1992). En este caso el análisis de muestras de agua, tanto cloradas como no cloradas, permitió detectar niveles significativos de 2,4,6-TCA. De hecho, este estudio muestra que este compuesto está ampliamente distribuido en los ecosistemas acuáticos de agua dulce, tanto ríos como lagos, de Suecia. Estos autores apuntan a que el 2,4,6-TCA probablemente se originaría por metilación de 2,4,6-TCP, el cual podría aparecer en las muestras de agua como consecuencia del proceso de cloración. En este estudio se aislaron varios microorganismos que podrían ser responsables de la metilación del 2,4,6-TCP (incluyendo varios hongos filamentosos de los géneros *Acremonium*, *Phialophora* y *Penicillium*) y sorprendentemente también varios actinomicetos con esta capacidad. Más recientemente se ha identificado el 2,4,6-TCA como agente causante de un desagradable aroma en el *sake* (bebida tradicional japonesa) (Miki *et al.*, 2005). En este caso el 2,4,6-TCA se produce a partir de los instrumentos de madera, contaminada con 2,4,6-TCP, que se utilizan en la preparación de la pasta de arroz, siendo el hongo responsable *Aspergillus oryzae*.

En general los clorofenoles y cloroanisoles pueden contaminar cualquier organismo vivo que haya entrado en contacto con ellos pasando así a formar parte de la cadena trófica. Valga como ejemplo el estudio realizado por Vorkamp *et al.*, (2004) de la biota de Groenlandia.

1-3.3 Impacto económico y comercial de la contaminación del vino por cloroanisoles y bromoanisoles.

A pesar de ser un gran problema para las bodegas en todo el mundo, hay muchas discrepancias sobre la verdadera incidencia y sobre la cuantificación de las pérdidas económicas producidas por el *cork taint* ocasionado por los haloanisoles. Esto se debe principalmente a la carencia de transparencia en los datos que ofrecen tanto las bodegas como las empresas de corcho que se ven implicadas en esta situación.

La cuantificación de las pérdidas económicas de las bodegas en todo el mundo debida a la contaminación del vino por cloroanisoles es casi imposible de determinar. Sin embargo, algunos datos publicados nos hacen tomar consciencia de la verdadera dimensión del problema:

Según Butzke y colaboradores (1999) se ha estimado que las bodegas de todo el mundo presentan unas pérdidas a causa del corcho de más de 10000 millones de

dólares. Aquí también se incluyen pérdidas a causa de defectos físicos del corcho que producen fugas del vino u oxidaciones no deseadas. Se ha calculado que, solo en el estado de California se pierden cada año entre 180 y 360 millones de dólares (en precio de mercado) debido al *cork taint*, aunque se cree que esta es una cuantificación algo exagerada.

Otros expertos como el Dr. Pascal Chatonnet apuntan que las pérdidas acumuladas de las bodegas desde que el problema del *cork taint* se detectó por primera vez podrían rondar los 1000 millones de dólares (El Mundo Vino, publicado en enero de 2004, en <http://elmundovino.elmundo.es>).

En cuanto a la verdadera incidencia del problema existen grandes discrepancias según si el estudio se realiza desde el sector relacionado con los productores de corcho, de los viticultores o de los productores de tapones sintéticos. Atendiendo a datos científicos podemos mencionar los siguientes trabajos:

- Lee y Simpson (1993) estimaron un porcentaje de incidencia de entre un 0.5 a un 6%.

- Posteriormente se ha sugerido que la incidencia podría estar entorno al 2-7% de las botellas (Butzke *et al.*, 1999).

- Más recientemente, Soleas y colaboradores (2002) han realizado un estudio de más de 2400 botellas de vino procedentes de varios países. Se realizó una cata de vino por parte de un grupo de expertos capaces de detectar una concentración de 2,4,6-TCA menor de 2 ng/l. Las conclusiones a las que llegaron son las siguientes:

1. De los vinos catados un **61%** fue catalogado como **“afectado por aromas fúngicos”**.

2. Un segundo análisis de estos vinos por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS) reveló que solo el **51%** de vinos afectados tenían una concentración de 2,4,6-TCA superior a 2 ng/l. Por tanto el **49%** de vino inicialmente definidos como afectados por cork taint sufrían una contaminación por otros compuestos diferentes al 2,4,6-TCA y probablemente, **esta alteración del vino no pueda ser atribuida al tapón de corcho**.

Así pues podemos concluir que el *cork taint* es un problema que causa pérdidas millonarias en el sector vinícola pero que debe ser estudiado en profundidad para esclarecer tanto las causas que dan lugar al problema como la verdadera incidencia del mismo en el producto.

I-4. Mecanismos moleculares de formación de cloroanisoles.

I-4.1 Compuestos clorofenólicos y bromofenólicos: usos industriales.

I-4.1.1 Clorofenoles.

Los clorofenoles no son compuestos naturales y por tanto los que podemos encontrar en la naturaleza son de origen antropogénico. Debido a su origen sintético son escasos los organismos vivos que pueden degradarlos y, como consecuencia, son muy recalcitrantes y pueden persistir en los ecosistemas durante largo tiempo (hasta décadas). Estos compuestos se obtienen a escala industrial mediante la cloración del fenol o por la hidrólisis de clorobencenos.

Se han propuesto varios orígenes para los clorofenoles detectados en ambientes naturales (Czaplicka 2004, 2006):

1. Cuantitativamente, la mayor fuente de clorofenoles podría ser debida al uso masivo por diferentes industrias en los últimos cincuenta años. El PCP se ha usado como agente preservante de la madera, pinturas, fibras vegetales y pieles. También ha sido usado como herbicida, fungicida e insecticida, así como intermediario en la producción de numerosos productos farmacéuticos, tintes, desinfectantes y pesticidas (para más información visitar <http://www.gtz.de/uvp>). Por lo tanto, podemos asumir que la **causa principal** de la presencia de clorofenoles en la naturaleza es el uso masivo en todo el mundo de **PCP y 2,4,6-TCP** como pesticidas, pese a que su uso en la Unión Europea se prohibió a principios de la década de los 90 del siglo pasado.

Hay varios motivos por los que los clorofenoles han sido tan utilizados como pesticidas: su **síntesis** es **muy sencilla** para las industrias químicas, son muy **baratos**, son **liposolubles**, por lo que pueden **atravesar** de manera efectiva **las membranas** celulares penetrando en las células, son muy **tóxicos** (debido a su capacidad para reaccionar con proteínas, ácidos nucleicos... y desajustar los gradientes de protones) y, finalmente, porque son **muy efectivos** y tienen un **espectro de acción** muy amplio, siendo tóxicos para todos los seres vivos.

Debido a este uso masivo y a su elevada recalcitrancia se han convertido en uno de los contaminantes más importantes de cualquier ecosistema (Cserjesi y Johnson, 1972; Rigaud *et al.*, 1984; Nystrom *et al.*, 1992;).

2. Los clorofenoles también se emplean como intermediarios de procesos industriales, por ejemplo, de la síntesis de 2,3-diclorofenoxiacetato (Kent y James, 1983) o durante el blanqueado de la pulpa en el proceso de fabricación de papel (Kringstad y Lindström, 1984).

3. Otro posible origen de los clorofenoles pueden ser como productos de la degradación de herbicidas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético o el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético. Recientemente se ha demostrado que el 2,4,6-TCP puede ser producido por degradación acuática del pesticida triclosan [2-(2,4-diclorofenoxi)-5-clorofenol] en presencia de bajas concentraciones de cloruros (Canosa *et al.*, 2005).

4. Aunque en mucha menor medida también hay una cierta producción natural de clorofenoles. Así, Hodin *et al.* (1991) detectaron la producción de 2,4,6-TCP por la cepa fúngica *Culduromyces fumugo* en una reacción realizada por un enzima cloroperoxidasa capaz de realizar la cloración de estructuras aromáticas como el fenol.

1-4.1.2 Bromofenoles.

A diferencia de los clorofenoles cuyo origen es mayoritariamente humano, algunos bromofenoles son producidos de manera natural en cantidades enormes. Esta es la razón por la que se pueden encontrar bromofenoles en ambientes marinos. Existe una amplia literatura científica que describe los efectos y compuestos de este tipo que confieren a microalgas, cianobacterias (Patterson *et al.*, 1994) y, sobre todo, a macroalgas marinas (y a sus extractos) actividades biocidas o repelentes frente a infecciones fúngicas, bacterianas o víricas; ácaros, insectos, nemátodos y poliquetos (Hoppe y Levring, 1982; Fenical, 1982; Muñoz Crego y López Cruz, 1992). Muchos compuestos biotóxicos son únicos de los vegetales marinos, debido a la exclusividad, abundancia y halogenación de moléculas bioactivas en el medio marino (Ortega *et al.*, 1996). La gran proliferación de productos con actividad antibiótica de amplio espectro en las macroalgas marinas se debe a la gran ventaja selectiva que le confieren en el medio marino bentónico (ambiente de enorme competitividad por parasitismo, por epifitismo y endofitismo, micro y macroherbivoría, etc). Tal es la capacidad de ciertas especies de macroalgas de producir compuestos biotóxicos halogenados, que llegan a ser autotóxicos para la propia macroalga.

Por otra parte, de entre los bromofenoles de origen antropogénico, cabe destacar la gran cantidad presente en los residuos de las industrias químicas. Su mayor aplicación es la producción de agentes antifúngicos y de retardantes de llama utilizados para tratar maderas, plásticos o pinturas (Chatonnet *et al.*, 2004). De hecho en Europa estos compuestos son los que están sustituyendo a los clorofenoles prohibidos por la legislación vigente.

También se ha descrito que el tribromofenol (TBP) puede formarse en aguas residuales tratadas con cloruros y en presencia de iones bromuro y trazas de fenoles orgánicos (Patnaik *et al.*, 2002).

I-4.2. La biometilación de clorofenoles y bromofenoles como origen de cloroanisoles y bromoanisoles.

I-4.2.1 Mecanismos de formación de bromoanisoles y cloroanisoles.

Se han propuesto diferentes teorías para tratar de explicar el posible origen de los cloroanisoles. En esta revisión nos centraremos en la producción de 2,4,6-TCA ya que como hemos explicado en apartados anteriores es el compuesto más importante relacionado con el *cork taint* del vino.

1. Algunos autores sostienen que podrían ser un producto intermediario del **catabolismo de compuestos altamente clorados**. Por ejemplo el PCP y el 2,3,4,6-TeCP son compuestos altamente tóxicos y su biometilación a anisoles podría ser un método de detoxificación (Nicholson *et al.*, 1992; Mohn *et al.*, 1992). Los anisoles resultantes serían después deshalogenados, puesto que los fenoles menos clorados tienen una menor toxicidad y además son más fácilmente biodegradables para dar lugar al 2,4,6-TCA (Tanner *et al.*, 1981). Un mecanismo similar es el propuesto por Neidleman y Geigert (1986) partiendo de hexaclorociclohexano.

2. Deshalogenación. En este caso el 2,4,6-TCA se sintetizaría a partir de otros anisoles altamente clorados como el pentacloroanisol o el 2,3,4,6-tetracloroanisol por un proceso de **eliminación de residuos de cloro** (Tanner *et al.*, 1981).

Es difícil que los mecanismos 1 y 2 ocurran en un ecosistema aerobio como es el corcho si tenemos en cuenta que para su funcionamiento debe haber un paso de deshalogenación reductora, proceso que ocurre casi exclusivamente en anaerobiosis (Dennie *et al.*, 1998). Así pues, la degradación aerobia de estos precursores altamente clorados ocurriría mediada por un mecanismo de deshalogenación oxidativa, catalizada por enzimas de tipo monooxigenasas dando lugar a diferentes quinonas como intermediarios (Xun 1996; Xun y Orser 1991) que no pueden dar lugar a 2,4,6-TCA, por lo que en principio son las dos hipótesis menos probables de las que citaremos en este apartado.

3. Otros autores apuntan la posibilidad de la biohalogenación (Neidleman y Geigert, 1986). Parece que los cloroanisoles podrían formarse a partir de anisol (metoxibenceno) durante la etapa de lavado con hipoclorito que en ocasiones se realiza en el proceso de fabricación del tapón. Algunos estudios han encontrado que el 18% del corcho lavado con hipoclorito contenían de 6 a 13 ng de 2,4,6-TCA por gramo de corcho y todos contenían 2,4,6-TCP en el rango 19-301 ng por gramo de corcho (Sponholz y Munoz, 1994). Por ello, el baño clorado ha sido reemplazado por un tratamiento con peróxido de hidrógeno al 10% que contiene un 5% de amonio. Este proceso de cloración podría ser un mecanismo de detoxificación que algunos microorganismos poseerían para eliminar átomos de cloro presentes en el ambiente en el que crecen.

4. Maujean *et al.*, (1985) sostienen que **el núcleo fenólico** del 2,4,6-TCA se **podría formar a partir de glucosa**, la cual a través de la ruta de las pentosas fosfato podría dar lugar a ácido siquímico. Este sería el precursor del fenol, el cual sería clorado por exposición a cloro para dar lugar a 2,4,6-TCP. Finalmente, este compuesto sería metilado como un mecanismo de detoxificación mediante una actividad metiltransferasa, en presencia de ácido fólico como cofactor y S-adenosilmetionina (SAM) como donador de grupos metilo. Desafortunadamente, no existen estudios que confirmen esta hipótesis.

5. Finalmente, se ha propuesto también que los anisoles podrían formarse directamente por **biometilación a partir del precursor clorofenólico correspondiente** (Silva Pereira *et al.*, 2000b).

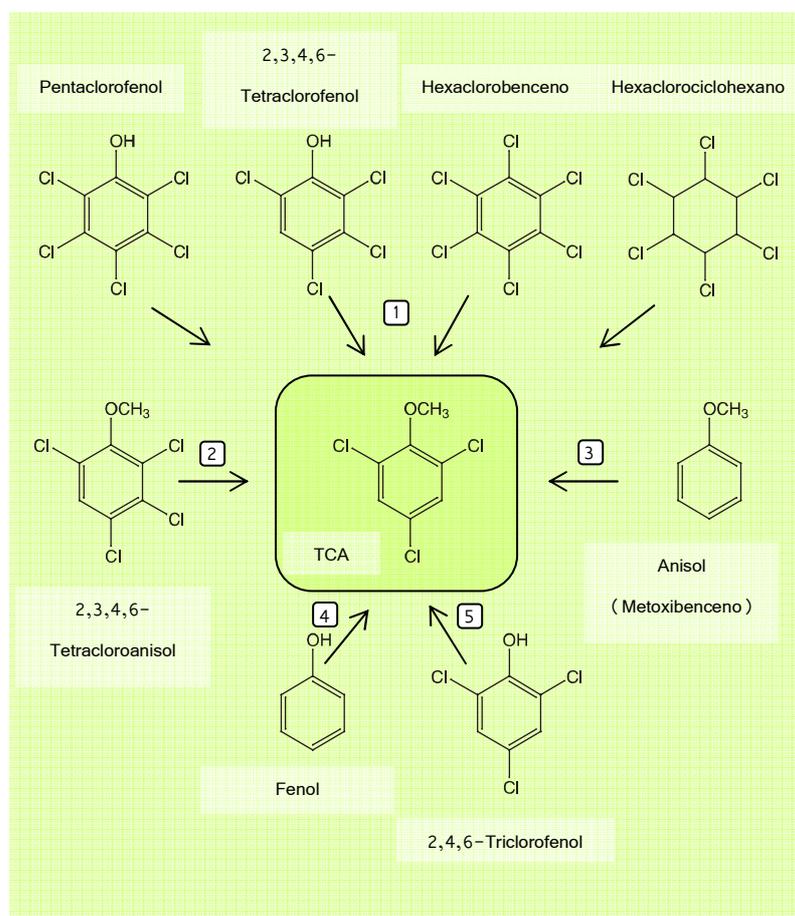


Figura I-3: Posibles mecanismos propuestos para explicar el origen del 2,4,6-TCA en corcho: 1. Catabolismo de compuestos altamente clorados; 2. Deshalogenación de anisoles altamente clorados; 3. Síntesis por halogenación de anisol; 4. Cloración en presencia de hipoclorito sódico y posterior biometilación; 5. Síntesis directa por biometilación del 2,4,6-TCP.

Los clorofenoles, sobre todo PCP, 2,3,4,6-TeCP y 2,4,6-TCP, podrían tener su origen en la contaminación ambiental debido al uso de pesticidas, herbicidas y preservadores de la madera utilizados durante décadas y que se han convertido en contaminantes ubicuos en cualquier ecosistema (Chaudhry y Chapalatomagudu, 1991; McLelan *et al.*, 2007). Este hecho se agrava por la elevada recalcitrancia de estos

compuestos a la degradación, lo que determina que su persistencia en los ecosistemas se prolongue durante muy largos periodos de tiempo.

1-4.2.2 La biometilación de bromoanisoles y cloroanisoles como origen del *cork taint*.

Los trabajos realizados por el grupo del Dr. Rubio Coque (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002a; Álvarez-Rodríguez, 2003; Coque *et al.*, 2003) conducen a las siguientes conclusiones sobre el mecanismo molecular involucrado en la formación de cloroanisoles:

1. Aunque se han propuesto varias hipótesis para explicar **el origen del 2,4,6-TCA** en corcho, actualmente, **la única teoría científicamente probada es la biometilación del 2,4,6-TCP**.

Estudios realizados utilizando *Trichoderma longibrachiatum* mostraron que la bioconversión en corcho a 2,4,6-TCA sólo es eficiente cuando se utiliza 2,4,6-TCP como precursor, llegándose a alcanzar una tasa media de bioconversión del 34,72%. Por el contrario, partiendo de cualquier otro de los demás posibles precursores citados en el apartado anterior no se obtienen cantidades significativas de 2,4,6-TCA (ver **Tabla 1-2**). Así, varios diclorofenoles fueron ensayados como posibles precursores en presencia y ausencia de hipoclorito sódico, pero ninguno fue un precursor válido para producir TCA. También se probaron compuestos altamente clorados con resultados negativos. Finalmente, también se analizó la posible transformación de fenol y anisol a TCA y tampoco se detectó una producción de 2,4,6-TCA significativa.

2. La biometilación es realizada mayoritariamente por **hongos filamentosos** capaces de **crecer en corcho** y en madera (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2003) aunque también se ha observado en actinomicetos aislados del agua potable (Nystrom *et al.*, 1992) y en cepas marinas de *Rhodococcus*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Allard *et al.*, 1987; Neilson *et al.*, 1988), aunque estos organismos no tienen relación con el corcho o el vino.

3. Esta reacción es llevada a cabo por un enzima **clorofenol O-metiltransferasa** (CPOMT) que metila un amplio rango de halofenoles incluyendo clorofenoles, bromofenoles y iodofenoles (Coque *et al.*, 2003), produciendo los haloanisoles correspondientes.

1-4.2.3 Significado de la biometilación de clorofenoles: los cloroanisoles como productos resultantes de la detoxificación de clorofenoles.

Los clorofenoles son algunos de los compuestos xenobióticos más recalcitrantes que podemos encontrar en la naturaleza. Debido a su gran toxicidad (razón por la cual se han utilizado ampliamente como pesticidas y fungicidas) cuando los microorganismos detectan la presencia de clorofenoles en el ambiente **proceden a su desactivación** (proceso denominado detoxificación o descontaminación) ya que de lo contrario, pueden sufrir daños severos que afecten a su fisiología. La alta reactividad de los clorofenoles, y por tanto su toxicidad, es

debida al débil carácter ácido del grupo hidroxilo, capaz de reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos produciendo daños graves y en ocasiones irreversibles para la célula (Cserjesi y Johnson, 1972; Terada, 1990).

Precursor	Hipoclorito sódico	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	2,4,6-TCA (ng/g de corcho)	Bioconversión del precursor en 2,4,6-TCA (%).
-	-	-	8.6	-
-	-	+	9.6	-
-	+	+	13.2	-
2,3-DCP	-	+	8.0	0
2,3-DCP	+	+	9.6	0.1
2,3-DCP	+	-	8.0	0
2,4-DCP	-	+	4.5	0
2,4-DCP	+	+	8.9	0.03
2,4-DCP	+	-	4.7	0
2,5-DCP	-	+	7.2	0
2,5-DCP	+	+	9.7	0.11
2,5-DCP	+	-	15.5	0.83
2,6-DCP	-	+	6.2	0
2,6-DCP	+	+	3.1	0
2,6-DCP	+	-	3.2	0
3,4-DCP	-	+	8.3	0
3,4-DCP	+	+	9.1	0.05
3,4-DCP	+	-	6.8	0
Hexaclorociclohexano	-	+	7.0	0
Hexaclorobenceno	-	+	7.0	0
Pentaclorofenol	-	+	9.7	0.11
Pentacloroanisol	-	+	7.3	0
2,3,4,6-TeCP	-	+	9.9	0.13
2,3,4,6-TeCA	-	+	4.6	0
2,3,6-TCP	-	+	1.5	0
2,4,5-TCP	-	+	7.5	0
2,4,6-TCP	-	+	355.8	34.72
Anisol	-	+	8.8	0
Anisol	+	+	18.8	1.02
Anisol	+	-	15.5	0.69
Fenol	-	+	17.4	0.88
Fenol	+	+	25.2	1.66
Fenol	+	-	13.6	0.5

Tabla I-2: Análisis de la formación de 2,4,6-TCA por *T. longibrachiatum* a partir de diferentes precursores (Álvarez-Rodríguez, 2003).

Estudios sobre la toxicidad relativa del PCP y el PCA demostraron que el PCA es menos tóxico que el PCP para 17 especies bacterianas, a excepción de *Streptomyces sp.* (Ruckdeschel *et al.*, 1987), para 16 especies de hongos del azulado de la madera y de la podredumbre blanca (Ruckdeschel y Rennel, 1986) y para *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.* y *Cephalosporium sp.* (Cserjesi y Johnson, 1972). Estos datos apuntan a la gran importancia ambiental de la *O*-metilación de clorofenoles como un método de detoxificación natural (Cserjesi y Johnson, 1972; Allard *et al.*, 1987; y Neilson *et al.*, 1988).

Algunos estudios han demostrado que diversos anisoles y tioanisoles se pueden formar por *O*-metilación a partir de clorofenoles y clorotiofenoles por **bacterias** de los géneros *Rhodococcus*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* aisladas de agua del Mar Báltico y de sedimentos de lagos de Suecia (Neilson *et al.*, 1988). Estos mismos autores demuestran que dos especies del género *Arthrobacter* (aisladas de muestras de suelo) son capaces de llevar a cabo la *O*-metilación de mono, di, tri y tetracloroguaiacoles y pentaclorofenol para dar lugar a los correspondientes anisoles derivados (Neilson *et al.*, 1983).

Esta reacción de *O*-metilación no está limitada a microorganismos procariotas. Varios autores han demostrado la *O*-metilación de varios compuestos fenólicos por el **alga** *Euglena gracilis* (Drotar y Fall, 1985a y 1985b), el **protozoo** *Tetrahymena thermophila* (Drotar y Fall, 1986) y la **levadura** *Saccharomycopsis lipolytica* (Drotar *et al.*, 1987).

Los **hongos filamentosos** también poseen mecanismos de este tipo. Cserjesi y Jonson (1972) aislaron a partir de material vegetal de un bosque canadiense una cepa del hongo *Trichoderma virgatum* capaz de biometilar pentaclorofenol para producir PCA. Por otro lado en el basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, un hongo de gran capacidad ligninolítica que causa la podredumbre blanca de raíces, se han detectado varias *O*-metiltransferasas (Jeffers *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que para realizar esta detoxificación los hongos han desarrollado, al menos, dos estrategias de resistencia diferentes (Coque *et al.*, 2006):

1. Cuando la célula fúngica se pone en contacto con el 2,4,6-TCP se produciría un tipo de **enzimas oxidativas** (como por ejemplo lacasas y peroxidases) que podrían ser secretados activamente para atacar y degradar los clorofenoles fuera de la célula. Así, la mayor parte del 2,4,6-TCP sería degradado sin dañar al hongo.

2. Sin embargo, debido a la naturaleza liposoluble de los clorofenoles siempre hay un pequeño porcentaje que puede atravesar la pared celular y la membrana citoplasmática alcanzando el interior celular. Para evitar los posibles daños celulares el sistema defensivo fúngico comienza la producción del enzima **clorofenol *O*-metiltransferasa** (CPOMT) capaz de transformar el 2,4,6-TCP en un compuesto inocuo, el 2,4,6-TCA. Posteriormente, este compuesto es excretado de la célula y, debido a su carácter lipófilo,

rápidamente absorbido por el corcho, madera o cualquier otro material en el que el hongo esté creciendo.

Esta estrategia defensiva es muy común entre los hongos filamentosos, por lo que la mayoría de los hongos presentes en el corcho o en las bodegas pueden sintetizar anisoles. Se ha demostrado también que el enzima responsable de la segunda estrategia es capaz de actuar sobre varios clorofenoles y bromofenoles por lo que podemos afirmar que éste enzima es la responsable de la formación de la mayor parte de los anisoles que contaminan el vino en el proceso de *cork taint* (Coque *et al.*, 2003).

I-5. Biodegradación y biorremediación: una solución biotecnológica al problema del *cork taint*.

I-5.1 Introducción.

La biotecnología es una de las tecnologías actuales en las que más se confía a la hora de solventar problemas de gran magnitud relacionados con la industria y el medio ambiente. De hecho las aplicaciones de la biotecnología, a día de hoy, parecen no tener límite. En este contexto, la **biorremediación** es el proceso en el que se emplean organismos para resolver problemas medioambientales específicos y ha experimentado un desarrollo espectacular en los últimos 20 años, sobre todo en lo referente a la biodegradación de compuestos naturales, xenobióticos, residuos urbanos o industriales, así como en uso de plantas genéticamente modificadas para su uso en fitorremediación.

Históricamente el compostaje fue una primitiva forma de biorremediación en donde los residuos derivados de la recolección domiciliaria (restos orgánicos, inorgánicos, residuos industriales...) eran incluidos en contenedores permitiendo que pudieran ser biodegradados por microorganismos (Senior y Balba, 1990). Posteriormente se comenzaron a utilizar rutinariamente microorganismos en los procesos de depuración de aguas residuales tanto industriales como urbanas. En la actualidad los estudios en torno a la biorremediación se centran en dilucidar los mecanismos de acción microbiana, ya que se ha demostrado que la mineralización o la completa biodegradación de los contaminantes orgánicos presentes en el agua o en el suelo es casi siempre consecuencia de la actividad microbiológica, y que, de entre de los microorganismos existentes en la naturaleza, los hongos y las bacterias se presentan como alternativa para lograr la degradación de ciertos compuestos orgánicos xenobióticos (Alexander, 1999).

En general existen dos estrategias en la biorremediación de ecosistemas: la primera consiste en agregar nutrientes de forma que se estimulen las poblaciones naturales y así aumente su actividad, mientras que la segunda se basa en la introducción de microorganismos exógenos dentro del ecosistema como forma de remediación. Se estima que los mejores microorganismos para la eliminación de tóxicos presentes en un medio son

en principio aislados del propio ambiente de donde han sido seleccionados naturalmente. Ello está sustentado en la observación de que los microorganismos capaces de habitar en un medio contaminado, (y por ende realizar las funciones vitales), poseen en su metabolismo celular dispositivos sumamente efectivos para realizar descontaminación. En este último caso con las nuevas técnicas de ingeniería genética se pueden emplear microorganismos ya presentes en el ecosistema, pero genéticamente modificados haciéndolos más eficientes en la biorremediación.

I-5.2 Biodegradación de clorofenoles.

La degradación de clorofenoles en condiciones aerobias es un fenómeno ampliamente analizado. La degradación de 2,4,6-TCP y PCP (los compuestos más estudiados) consiste en unos pasos iniciales de deshalogenación oxidativa (en bacterias y hongos) o deshalogenación reductora (detectada en *Phanerochaete chrysosporium*) que produce una serie de quinonas que normalmente son hidroxiladas. Sin embargo, los enzimas que llevan a cabo este paso inicial son diferentes en bacterias y hongos:

1. En bacterias la deshalogenación inicial es catalizada por monooxigenasas intracelulares como la clorofenol-4-monooxigenasa de *Burkholderia cepacia* (Xun, 1996) o la 2,4,6-TCP-4-monooxigenasa de *Azotobacter sp.* cepa G1 (Wieser *et al.*, 1997) que convierten el TCP en 2,4-diclorobenzoquinona, o la pentaclorofenol hidroxilasa de *Flavobacterium sp.* ATCC 39723 (Xun y Roser, 1991) que transforma PCP en tetraclorodihidroxibenceno.

2. En hongos basidiomicetos la deshalogenación inicial es llevada a cabo por enzimas extracelulares del sistema ligninolítico. Estos enzimas son principalmente:

- la **lignina peroxidasa** (LiP): puede oxidar una amplia variedad de compuestos. Por ejemplo la LiP de *Phanerochaete chrysosporium* es capaz de oxidar PCP a tetrahidroxibenceno (Bhasker Reddy y Gold, 2000) o 2,4,6-TCP a 2,6-dicloro-1,4-dihidroxibenceno (Bhasker Reddy *et al.*, 1998).

- la **manganeso peroxidasa** (MnP) que oxida componentes fenólicos de la lignina utilizando la reacción de oxidación Mn^{2+} a Mn^{3+} dependiente de H_2O_2 , (Wesenberg *et al.*, 2003).

- la **lacasa**: es una fenol oxidasa que puede oxidar anillos de la lignina (Bollag *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2002).

Además existen otros enzimas que están indirectamente asociados con la mineralización de lignina como la glioxal oxidasa y la superóxido dismutasa que sintetiza H_2O_2 necesario, para la actividad de la lignina peroxidasa y la manganeso peroxidasa mientras otros enzimas fúngicos funcionan como enlace entre las rutas de mineralización de la lignocelulosa, como la glucosa oxidasa, la aril alcohol oxidasa, la celobiosa quinona oxidoreductasa y la celobiosa deshidrogenasa (Leonowicz *et al.*, 1999; Pointing, 2001).

No existen en la literatura muchas evidencias sobre la degradación de clorofenoles por parte de hongos filamentosos a pesar de que, como indican Gee y Peel (1974) un total de 99 de 116 aislados fúngicos de pollo podían metabolizar 2,3,4,6-TeCP. También Cserjesi y Johnson (1972) detectaron que *Trichoderma virgatum* podía metabolizar PCP. Más recientemente (Szewczyk y Długónski, 2009) han descrito la degradación de PCP por una cepa del *Mucor ramosissimus* detectando la formación de tetrahydroquinona.

I-5.3 Biodegradación de cloroanisoles.

Los cloroanisoles, al igual que los clorofenoles, son contaminantes frecuentemente detectados en muchos ecosistemas, incluyendo sedimentos (Barakat *et al.*, 2002), agua de lagos y ríos (Nystrom *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 2000), suelos (Palm *et al.*, 1991; D'Angelo y Reddy, 2000) y material vegetal como la corteza del alcornoque de bosques Mediterráneos (McLellan *et al.*, 2007). Aunque los cloroanisoles son considerados como productos no tóxicos, debido a su carácter lipofílico tienen un gran potencial para acumularse en tejidos biológicos y materiales húmicos (Neilson *et al.*, 1984) y debido a su recalcitrancia pueden permanecer formando parte de los ecosistemas durante años (Allard *et al.*, 1987).

A pesar de la gran importancia de los cloroanisoles como contaminantes y del papel de la *O*-metilación de clorofenoles como alternativa a la biodegradación de clorofenoles, es poca la atención que se ha prestado a la biodegradación de cloroanisoles. Recientemente se han aislado 3 cepas bacterianas procedentes de muestras de suelos capaces de biodegradar eficientemente 2,4,6-TCA (Goswami *et al.*, 2007), estando implicados en este fenómeno diferentes mecanismos de desmetilación del 2,4,6-TCP para generar 2,4,6-TCA. Por otro lado, los hongos de la podredumbre blanca de la madera son los únicos microorganismos que poseen un complejo oxidativo enzimático (o complejo ligninolítico) gracias al cual los compuestos recalcitrantes de la lignina pueden ser mineralizados. Este sistema los hace capaces de degradar un amplio rango de contaminantes (Anke y Weber, 2006), incluyendo gran variedad de clorofenoles (Valli y Gold, 1991; Joshi y Gold, 1993; Bhasker Reddy *et al.*, 1998; Bhasker Reddy y Gold, 2000), tal como se indicó en el apartado anterior. Esto, unido al hecho de que se ha demostrado la capacidad de basidiomicetos como de *Phanerochaete chrysosporium* de oxidar varios anisoles y metoxibenceno (Kersten *et al.*, 1985, 1990; Popp y Kirk, 1991) permite pensar que probablemente este tipo de hongos podrían ser capaces de biodegradar cloroanisoles. Así, Lamar y colaboradores (1990) en el que se describe como, tras un breve periodo de formación de PCA en suelos inoculados con *Ph. chrysosporium*, hay una segunda etapa en la que se detecta una lenta disminución de la concentración de PCA. Más recientemente, Campoy y colaboradores (2009) han descrito la biodegradación de 2,4,6-TCA por varias especies de basidiomicetos ligninolíticos. En concreto, una cepa de *Phlebia radiata* puede desmetilar 2,4,6-TCA a 2,4,6-TCP en una reacción catalizada por

una citocromo P450 monooxigenasa microsomal. El 2,4,6-TCP formado es luego detoxificado por la conjugación con D-glucosa.

I-5.4 Características generales del género *Trichoderma*.

Los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* son ascomicetos que se desarrollan principalmente sobre el suelo, plantas, material vegetal en descomposición y madera. El género *Trichoderma* (cuyos teleomorfos son denominados *Hypocrea* sp.) pertenece a la clase Eufungi (familia Hypocreaceae) y está formado por al menos cinco especies: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma pseudokoningii* y *Trichoderma viride*, aunque se han propuesto también *Trichoderma asperelum* y *Trichoderma citrinoviride* (Kuhls *et al.*, 1999). Son microorganismos con una conocida capacidad de producción de antibióticos (Sivasithamparan *et al.*, 1998), así como de parasitar otros hongos. Se caracterizan por su gran capacidad de competencia por recursos como nutrientes (por ejemplo los exudados de las semillas produciendo una estimulación de la germinación) o el espacio, colonizando rápidamente grandes extensiones. Se han dado muy pocos casos de patogenicidad en humanos. Las infecciones suelen ser oportunistas (Groll *et al.*, 2001) y se desarrollan en pacientes inmunodeprimidos causando peritonitis o infecciones pulmonares y hepáticas (Richter *et al.*, 1999).

Presentan hifas septadas hialinas, conidióforos, filídidas y conidios. *T. longibrachiatum* en concreto puede producir clamidosporas y sus conidióforos adoptan una disposición piramidal. Los conidios son tienen unos 3 µm de diámetro son elipsoidales y de superficie lisa (St-Germain *et al.*, 1996).

I-5.5 *T. longibrachiatum*: organismo idóneo para su utilización como agente de control biológico frente al *cork taint*.

Los hongos del género *Trichoderma* son de un gran interés biotecnológico. No en vano han sido ampliamente utilizados tanto como agentes de control biológico contra una gran variedad de hongos fitopatógenos (Chet *et al.*, 1987; Elad, 2003), así como potenciales fuentes de producción de enzimas de interés industrial debido a su gran capacidad de síntesis y secreción de varios tipos de enzimas extracelulares (Montenecourt *et al.*, 1983; Mandels 1985), principalmente celulasas (Knowles *et al.*, 1987; Kubicek *et al.*, 1990).

En el caso concreto de *T. longibrachiatum* además de las características propias de su género, podemos destacar rasgos específicos que lo hacen especialmente indicado para su uso como agente de control biológico frente al *cork taint*:

1. Buena capacidad de **crecimiento** sobre el corcho. La cepa *Trichoderma longibrachiatum* CECT 20431 fue aislada de muestras de corcho por Álvarez-Rodríguez *et al.*, (2002). De hecho esta cepa muestra un crecimiento invasivo cuando crece sobre el corcho.

2. Capaces de **inhibir**, al menos parcialmente, el **crecimiento de otras especies** fúngicas potenciales productoras de cloroanisoles en el corcho.

3. Capacidad de **degradar clorofenoles**. Esta cepa puede eliminar el 2,4,6-TCP creciendo en cultivos líquidos y sobre granulado de corcho (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002).

4. **Capacidad de producir cloroanisoles**. Se ha demostrado que esta cepa puede realizar la bioconversión de 2,4,6-TCP en 2,4,6-TCA lo cual es una característica indeseable. Para utilizar esta cepa como agente de biocontrol habría que eliminar esta capacidad del hongo mediante técnicas de ingeniería genética.

5. **Muy baja probabilidad de producción de micotoxinas**. El género *Trichoderma* es actualmente reconocido como microorganismo seguro o **GRAS** (*Generally Recognized As Safe*) ya que su producción de micotoxinas es prácticamente nula (Nevalainen *et al.*, 1994).

1-5.6 Objetivos de este trabajo.

El *cork taint* supone una enorme pérdida económica tanto para empresas que manufacturan tapones de corcho como para las bodegas. En este trabajo se pretende abordar una posible solución biotecnológica al problema, para lo que nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Optimizar la purificación del enzima clorofenol *O*-metiltransferasa (CPOMT) para obtener una cantidad suficiente del enzima con la que obtener información para la clonación del gen *cpomt*.

2.- Análisis de la proteína purificada por huella peptídica y doble espectrometría de masas (MS-MS) para la determinación de la secuencia de péptidos internos.

3.- Clonación del gen codificante del enzima CPOMT.

4.- Optimización de un sistema para la transformación de *Trichoderma longibrachiatum* CECT 20431 que nos permita se manipulación genética.

5. Interrupción/atenuación del gen *cpomt* y análisis de la producción de 2,4,6-TCA en los transformantes obtenidos.

6. Expresión heteróloga de genes codificantes de basidiomicetos en *7. longibrachiatum* y análisis de la degradación de 2,4,6-TCP en los transformantes obtenidos.

II-1. Microorganismos utilizados.

II-1.1 Cepas bacterianas.

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

***Escherichia coli* LE392** (Maniatis *et al.*, 1982). Cepa susceptible de ser infectada por el bacteriófago lambda y sus derivados, provocando lisis celular. Se utilizó en infecciones en medio líquido para el aislamiento de ADN de bacteriófagos de interés. Genotipo: *e14-(McrA-)* *hsdR514 supE44 supF58 lacY1 galk2 galT22 metB1 trp55*.

***Escherichia coli* XL-1 Blue MRA P2**. Cepa susceptible de ser infectada por el bacteriófago lambda y sus derivados, provocando lisis celular. Se trata de una cepa lisogénica para el fago P2 y, por tanto, capaz de inhibir la capacidad infectiva de los bacteriófagos lambda con genes *red* y *gam* activos. Se utilizó para la selección específica de fagos recombinantes en la construcción de una genoteca de ADN genómico en el vector λ -DASH II y para infecciones en medio sólido. Genotipo: Δ (*mcrA*) *183* Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) *173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac*.

II-1.2 Cepas fúngicas.

***Trichoderma longibrachiatum* CECT 20431**. Cepa silvestre aislada de muestras de corcho procedentes de la Comunidad de Extremadura (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002). Destaca por su elevada capacidad de producción de cloroanisoles a partir de pesticidas clorofenólicos.

Polyporus hydroides. Cepa silvestre con capacidad lignolítica. Fue utilizada por Coll *et al.*, (1993) para la purificación y caracterización de la lacasa *lac1* utilizada en el desarrollo de esta tesis. En este trabajo se ha utilizado como control positivo en los ensayos de actividad lacasa.

II-2. Vectores fágicos y plasmídicos.

II-2.1 pGEM-T Easy[®] (3015 pb).

Vector comercializado por Promega utilizado para clonar fragmentos amplificados por PCR. Se utiliza linearizado con *EcoRV* y con una timidina protuberante en los extremos 3' que impiden su recircularización y favorecen la ligación de los productos de PCR producidos por ciertas polimerasas termoestables que dejan adeninas en extremos (Mezei *et al.*, 1994; Robles *et al.*, 1994). Contiene los promotores T7 y SP6 de la ARN polimerasa flanqueando una región múltiple de clonación dentro de la región codificante para el α -péptido del enzima β -galactosidasa, lo que permite seleccionar los clones recombinantes por su color blanco. Además tiene incorporado un gen de resistencia al antibiótico β -lactámico ampicilina. También posee el origen de replicación del fago filamentoso f1 para la preparación de ADN de cadena sencilla.

II-2.2 pBLUESCRIPT[®] (KS/SK) (+/-).

Plásmidos derivados del pUC19 y comercializados por Stratagene[®]. Su tamaño es de 2.958 pb (I) y 2.961 pb (II) e incluyen un fragmento del gen *lacZ* (subunidad α de la β -galactosidasa) capaz de complementar la mutación presente en la β -galactosidasa de algunas cepas de *Escherichia coli* portadoras de la delección *lacZ* Δ 15 (proceso denominado α -complementación), permitiendo la aparición de color azul en presencia de IPTG (inductor del gen *lacZ*) y de X-gal (análogo estructural de la galactosa y responsable de la aparición del color azul).

La presencia de un sitio de clonación múltiple con cortes de restricción únicos para 21 enzimas en esta zona facilita la incorporación de insertos. La inserción de un fragmento de ADN foráneo dentro del policonector provoca la interrupción del gen *lacZ*. Además poseen un gen de resistencia al antibiótico β -lactámico ampicilina (β -lactamasa codificada por el gen *bla*) que permite la selección de transformantes que se desarrollen en presencia del antibiótico y también poseen el origen de replicación *colE1* para *Escherichia coli* del plásmido pBR322.

La designación KS indica la orientación del sitio múltiple de clonaje en dirección 5'-*KpnI*....*SacI*-3', respecto al extremo 5' del gen *lacZ*, mientras que SK denota la orientación contraria (5'-*SacI*....*KpnI*-3'). Para conseguir la obtención de este ADN de cadena sencilla, estos vectores poseen el origen de replicación monocatenario del fago f1. Dicha cadena sencilla necesita la participación en su obtención de un fago ayudante como el fago M13K07 (Vieira y Messing, 1987). El símbolo (+) indica que la cadena rescatada al obtener ADN monocatenario es la codificante para el fragmento del gen *lacZ* y el (-) denota que la cadena de ADN monocatenario rescatada será la complementaria.

II-2.3 pALGEN3.

Plásmido de 5.859 pb (Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2004). Contiene la región codificante del gen *np11* de *E. coli* (que le confiere resistencia a la geneticina) bajo el control del promotor del gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdhA*) y el terminador del triptófano (*trpC*) de *Aspergillus awamori*. Fue utilizado en los experimentos de puesta a punto de la transformación de *T. longibrachiatum*.

II-2.4 pJL43gdh (pIBR43).

Plásmido de 4.349 pb (Cardoza *et al.*, 1998) derivado del plásmido pJL43 y que posee el gen *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (Austin *et al.*, 1990) bajo el control de una extensa zona promotora del gen *gdhA* de *Aspergillus awamori*. La región terminadora es la de la citocromo oxidasa-1 (*cyc1*) de *Saccharomyces cerevisiae*. Fue utilizado en experimentos de puesta a punto de la transformación de *T. longibrachiatum*, así como en la construcción del plásmido de interrupción génica pBMT-PHint.

II-2.5 pRLMex30.

Vector de 5500 pb (aprox) diseñado por Mach *et al.* (1993). Derivado del pUC19, es portador del gen de selección *hph* (higromicina B fosfotransferasa) de *Escherichia coli* bajo el control del promotor de la piruvato quinasa y del terminador de la celobiohidrolasa II, ambos de *Trichoderma reesei*. Fue utilizado en experimentos de puesta a punto de la transformación de *T. longibrachiatum*, así como en la construcción del plásmido pEXLAC.

II-2.6 pPEL3G.

Vector de 7275 pb diseñado por Rodríguez *et al.*, (2008) y derivado del pAN52-4. Contiene el ADNc completo del gen *pel3* al que se le han cambiado su péptido señal por los 24 aminoácidos iniciales de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*. La expresión de la lacasa queda controlada por el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpdA*) y el terminador *trpC* de *A. nidulans*. Fue utilizado para la expresión de dicho gen en la cepa silvestre de *T. longibrachiatum*.

II-2.7 λ -DASH II.

Vector comercial de la firma Stratagene[®]. Se trata de un vector fágico de reemplazamiento que se usa para clonar fragmentos grandes de ADN (de entre 15 y 23 Kb). El sistema aprovecha el sistema de selección *spi*. Los bacteriófagos lambda intactos presentan en su región central los genes activos *red* y *gam* y no son capaces de infectar cepas bacterianas lisógenizadas por del fago P2 (como por ejemplo XL-1 Blue MRA P2). En cambio, los fagos en los que ha habido un reemplazamiento de la zona central por el inserto que queremos clonar pueden propagarse utilizando estas cepas hospedadoras.

II-2.8 Vectores plasmídicos contruidos para el desarrollo de esta tesis.

II-2.8.1 pEXLAC.

Plásmido de 6100 pb aprox. Es un derivado del plásmido pRLMex30 (Mach *et al.* 1993) anteriormente citado, al que se le ha intercambiado el gen de resistencia a higromicina por el ADNc del gen *lacI* de *Polyporus hydnoides* (Coll *et al.*, 1993). Se utilizó para la expresión de dicho gen en la cepa silvestre de *T. longibrachiatum*.

II-2.8.2 pARNiMT265.

Para realizar estas construcciones se utilizó el plásmido pJL43RNAi construido por Ullán *et al.*, (2008). Este vector fue diseñado para ser una herramienta de atenuación génica en hongos filamentosos. Es un plásmido derivado del pJL43 (Gutiérrez *et al.*, 1991) y del pJL43b1 (Gutiérrez *et al.*, 1997) y aprovecha sus regiones promotoras quedando estas enfrentadas una a la otra. Justo en la zona entre ambos promotores existe un sitio de corte único *NcoI* en el cual se clonó una región de ADN codificante de 265 pb para abordar el silenciamiento génico del gen codificante de la *O*-metiltransferasa (*cpomt*). El plásmido posee el casete de resistencia a fleomicina para posibilitar la selección de transformantes.

II-2.8.3 pBMT-PHint.

Con el fin de realizar la interrupción del gen *cpomt* se llevó a cabo la construcción de interrupción pBMT-PHint, en la que una región de 2,6 Kb del genoma de *T. longibrachiatum* que contenía el gen de interés así, como sus regiones promotora y terminadora, fue clonada en un vector pBluescript. Más tarde se digirió esta construcción en la región codificante del gen y se le introdujo el casete de resistencia a la fleomicina amplificado a partir del plásmido pJL43gdh. Una descripción más detallada de esta construcción puede verse en el apartado III-5 de Resultados y discusión.

II-3. Productos y Reactivos.

II-3.1 Proveedores.

Los reactivos empleados para la realización de los experimentos presentados en esta memoria han sido adquiridos a las siguientes casas comerciales: Beecham S.A. (Toledo, España), Bethesda Research Laboratories (California, USA), BioRad (California, USA), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania), Canon Inc. (Japón), Difco (Detroit, Michigan, USA), Fluka Chemical & Biochemical Co. (Buchs, Suiza), General Electric Biosciences [(Amersham Biosciences) (Buckinghamshire, Reino Unido)], Gibco BRL (Eggenstein, Alemania), ICN Biomedicals Inc. (Irvine, California, USA), Invitrogen (NV Leek, Holanda), InvivoGen (San Diego, California, USA), Merck (Darmstadt,

Alemania), New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, E.U.A.), Panreac (Barcelona, España), Probus, Promega Co. (Madison, Wisconsin, USA), Pronadisa (Madrid, España), Quiagen (Crawley, Reino Unido), Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA), USB (Cleveland, Ohio, USA), Stratagene[®] (La Jolla, California, USA), Takara Bio Inc. (Shiga, Japón).

II-3.2 Reactivos específicos para biología molecular.

II-3.2.1 Marcadores de peso molecular.

- De manera rutinaria se empleó como marcador en los genes de electroforesis de ADN en agarosa el ADN del bacteriófago lambda (MBI Fermentas) digerido con las endonucleasas *Hind*III, *Pst*I o *Xho*I.

- El marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[®]) (ver **Figura II-1**).

- El marcador *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled* (Roche), marcado con digoxigenina presenta bandas desde 23 kb a 125 pb. Fue utilizado en experimentos de hibridación de ADN. Se utilizan 5 µl por gel. [®]) (ver **Figura II-1**).

- Marcador RNA Millenium (Ambion) (ver **Figura II-1**).

II-3.2.2 Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos empleados como cebadores o primers en los experimentos de análisis de secuencias de ADN, así como los demás oligonucleótidos utilizados fueron adquiridos a Sigma.

II-3.2.3 Antibióticos.

- La ampicilina se adquirió en forma de preparado farmacéutico Britapen (Beecham S.A.).

- La geneticina y la higromicina B fueron adquiridas a la compañía Sigma Chemical Co.

- La fleomicina se adquirió a la compañía InvivoGen.

II-3.2.4 Enzimas de restricción y modificadoras.

- Los enzimas de restricción fueron suministrados por las casas comerciales New England Biolabs Inc., Promega, MBI Fermentas y Takara.

- Los enzimas desoxirribonucleasa I (ADNasa I) y ribonucleasa A (ARNasa A) de páncreas bovino fueron adquiridos a Sigma Chemical Co.

- La fosfatasa alcalina de intestino de ternera, ADN ligasa del fago T4 y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa fueron adquiridas a MBI Fermentas.

- El enzima GoTaq[®] *ADN polimerase* fue adquirido a Promega, mientras que los enzimas Pfu *polimerase* y Pfx[®] *polimerase* a Invitrogen.

- Los enzimas líticos de *Trichoderma harzianum* y la β -glucuronidasa utilizados para la obtención de protoplastos se adquirieron a la compañía Sigma Chemical Co.
- La lisozima de clara de huevo fue suministrada por Fluka Chemical & Biochemical Co.

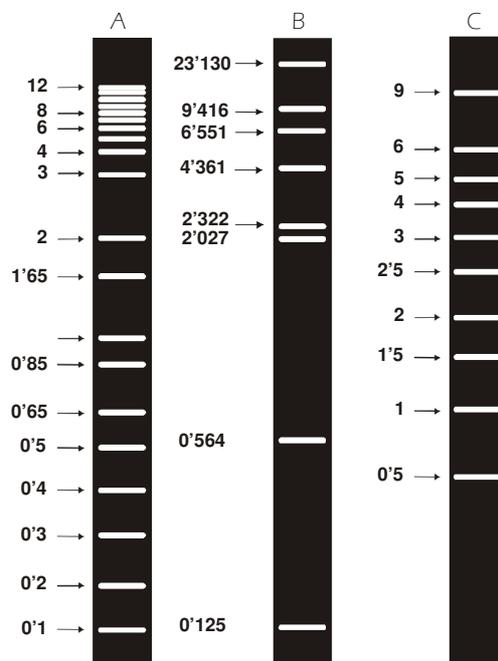


Figura II-1: Esquema de los patrones de peso molecular de ADN en gels de agarosa al 1 % separados por electroforesis. Se indica el tamaño de los fragmentos en kilobases. A) *1kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); B) *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled* (Roche); C) *RNA Millenium* (Ambion)

II-3.3 Marcadores de peso molecular para electroforesis de proteínas.

Se utilizó el marcador de peso molecular preteñido de Bio-Rad Laboratories Precision Plus Protein[®] Standars que está constituido por 10 bandas de proteínas de los siguientes tamaños: 10 KDa, 15 KDa, 20 KDa, 25 KDa, 37 KDa, 50 KDa, 75 KDa, 100 KDa, 150KDa y 250 KDa. Las bandas de 25 KDa, 50 KDa y 75 KDa que muestran una intensidad tres veces mayor que el resto y son consideradas como bandas de referencia. Una representación gráfica de este marcador se muestra en la **Figura II-2**.



Figura II.2: Esquema del marcador de para proteínas peso molecular de proteínas Precision Plus Protein[®] Standars resuelto en un gel de acrilamida al 12,5 %. Se indica el tamaño de los fragmentos en KDa.

II-3.4 Otros sistemas empleados (kits comerciales).

Varios de los procesos descritos en esta Memoria se realizaron mediante el uso de sistemas comerciales (*kits*) que incluyen los componentes necesarios para el proceso correspondiente. Los sistemas comerciales utilizados fueron los siguientes:

- *DIG labelling and detection kit*[®] (Boehringer Mannheim) para marcaje de ADN con digoxigenina y detección.
- *GFX™ Micro Plasmid Prep Kit* (General Electric-Amersham). Utilizado para la purificación de ADN plasmídico destinado reacciones de secuenciación. El kit permite la extracción de ADN plasmídico a partir de 1-3 ml de cultivos de *Escherichia coli*.
- *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (General Electric-Amersham). Utilizado para la recuperación del ADN a partir de geles de agarosa y para la purificación, aislamiento y concentración de productos de PCR.
- *Lambda Mini Kit*[®] (Qiagen) para la extracción de ADN fágico a partir de cultivos tanto en medio líquido como en sólido.
- *Protein Assay*[®] (Bio-Rad Laboratorios) para la cuantificación de las muestras proteicas.
- *RNAeasy minikit*[®] (Qiagen) para la extracción de ARN a partir de micelio de *T. longibrachiatum*.

II-4. Instrumental.

Para llevar a cabo la investigación detallada en esta memoria se utilizó fundamentalmente el instrumental suministrado por las siguientes casas comerciales:

- Afora (Madrid, España): tubos de vidrio Corex.
- American National Can (Greenwich, CT, EEUU): Parafilm[®].
- Beckman Instruments (Palo Alto CA, EEUU): espectrofotómetro DU-64.
- BioRad Laboratories (Richmond, CA, EEUU): Cubetas de electroforesis para proteínas (modelo Mini-Protean II) y para ADN (equipos SubCell), y equipos de electrotransferencia de proteínas MiniTransblot. Columna Bio-Scale CHT-1.
- Canon Inc. (Japón) Cámara digital EOS 10D Reflex.
- Eppendorf (Alemania): Microcentrifugas del modelo 4515 y agitador Thermomixer modelo 5432.
- Gallenkamp (Leicester, Reino Unido): Incubadores orbitales modelo IMR 250.
- Gilson Medical Electronics Inc. (Middletown EUA): pipetas automáticas de los tipos P2, P20, P200, P1000 y P5000.
- General Electric [Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, Reino Unido)]: Filtros de nylon Hybond-N, películas de autorradiografía del tipo Hyperfilm-MP, estuches para la exposición de filmes autorradiográficos con pantallas amplificadoras, transiluminador de luz ultravioleta, equipo FPLC ÄKTA Design System, columnas PD-10,

columnas HiTrap DEAE Fast Flow, columnas Superdex 75 y Superdex 200 , columna HiTrap Phenyl Sepharose Fast Flow, columna Resource Phe.

- Hitachi (Tokio, Japón): Espectrofotómetro del modelo U-2001.
- MAISSA (Barcelona, España): Filtros de Nylon Nyal.
- Millipore Corp. (Bedford, MA, EEUU): Membranas de filtración y equipo de filtración de agua MilliRo, Helix y MilliQ, membranas de PVDF electrotransferencia (Immobilon-P), concentradores Microcon.
- Moulinex: Microondas M41.
- MSE ultrasonic (Fisons, Loughborough, GB): sonicador.
- New Brunswick Scientific (Edison, NJ, EEUU): Incubador orbital modelo Innova 4230.
- Olympus Optical Co, LTD (Tokio, Japón): Microscopio Olympus Cx40RF200.
- Perkin Elmer (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, EEUU): termociclador GeneAmp 2400 y secuenciador de ADN ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.
- Sartorius GmbH (Weinheim, Alemania): Balanzas de precisión, modelos 2442 y 1216MP.
- Savant Instruments Inc. (Hicksville, NY, EEUU): Centrífuga de vacío modelo SVC-100H, Speed-vac SC-110.
- Selecta (Barcelona, España): Autoclave del modelo Austester-E, baños con termostato del modelo 320 OR, estufas de incubación de los modelos 207, 207A y 237 y 372A.
- Sorvall (Newtown, CO, EEUU): Centrífugas refrigeradas, modelo RC-5B.
- Stratagene (La Jolla, CA, EEUU): Fijador de ADN y ARN UV Stratalinker® 2400.
- Teknokroma (Barcelona, España): columna cromatográfica LiCrospher 100 RP18 5 µm, 25 x 0,4 cm.
- Waters (Milford, Massachussets, EEUU). Equipo HPLC: Autosample 717; Controller 600; Detector 996.
- Whatman Laboratory Products Inc. (Clifton, NJ, EEUU): Papel 3MM.
- WTW (Alemania) phmetro del modelo Sentix 41.

II-5. Medios de cultivo.

II-5.1 Medios de cultivo para *Escherichia coli*.

Medio de Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972). Medio de mantenimiento y propagación de *Escherichia coli*.

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

El pH se ajustó a un valor de 7,5 con NaOH y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Para su utilización como medio sólido se añadieron 20 g de agar por litro de medio. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Medio NZY (Miller, 1972): medio de cultivo utilizado para realizar las infecciones de *Escherichia coli* con bacteriófagos derivados de lambda.

NZ amina tipo A	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
MgCl ₂ · 7H ₂ O	2 g

Se ajustó a pH 7,5 con NaOH 1N y se añadió agua destilada hasta 1 litro.

Se añadieron 20 g de agar por litro, salvo cuando se utilizó como cobertera, en cuyo caso se añadieron 7 g de agar por litro. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Medio SOC (Hanahan, 1983): medio de cultivo utilizado para la preparación de células competentes de *Escherichia coli*.

Bacto-triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,5 g

Se ajustó a pH 7,5 con KOH 1N y se añadió agua destilada hasta 1 litro. En caso de utilizarse como medio sólido se añadieron 20 g de agar por litro. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Previamente a su utilización se añadieron 20 ml de una solución estéril de MgSO₄ 1M.

Medio Terrific-Broth (TB). (Tartof y Hobbs, 1987) Medio de mantenimiento y propagación de *Escherichia coli*. Formulado especialmente para incrementar el rendimiento de ADN plasmídico obtenido a partir de clones transformantes.

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

Se añadió agua destilada hasta 900 ml. Esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos Después de esterilizar se añaden 100 ml de la siguiente solución de sales:

KH_2PO_4 170 mM
K_2HPO_4 720 mM

II-5.2 Medios de cultivo para hongos.

Medio Rosa de Bengala-cloranfenicol-agar (RB). Medio rutinario para el crecimiento y esporulación de hongos.

Peptona	3 g
Glucosa	10 g
Rosa de Bengala	0,05 g
Cloranfenicol	4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
KH_2PO_4	1 g
Agar	20 g

Se ajustó a pH 7,2 con KOH 1N y se añadió agua destilada hasta 1 litro. En caso de utilizarse como medio sólido se añadieron 20 g de agar por litro. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos

Medio Potato Dextrose Agar (PDA) Difco™. Medio sólido rico para crecimiento y recuperación de micelio en hongos filamentosos.

Dextrosa	20 g
Extracto de patata	4 g
Agar	15 g

Se resuspendieron 39 g del preparado en 1 litro de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El pH final está en torno a 5,6.

Medio Caldo Extracto de Malta (MEB). Medio formulado por Raper y Thom (1949). Utilizado para el crecimiento rutinario de las diferentes especies fúngicas utilizadas.

Glucosa	20 g
Peptona bacteriológica	1 g
Extracto de malta	20 g

Se completa con agua destilada hasta un litro. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. El pH final está en torno a 5,6

Medio Completo (CM) (Pontecorvo *et al.*, 1953). Medio utilizado para el cultivo de micelio joven de *T. longibrachiatum* para su posterior uso en la obtención de protoplastos.

Glucosa	25 g
Extracto de malta	5 g
Agar	15 g

Completar con agua destilada hasta un litro. Se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Cuando se utilizó como medio para regeneración de protoplastos se añadió sorbitol 1M como estabilizador osmótico.

Medio selectivo lacasa (ML) (Rodríguez *et al.*, 2008). Medio utilizado para seleccionar los transformantes pPEL3G y pEXLAC de *T. longibrachiatum* que presentaban actividad lacasa. Este medio tiene la siguiente composición por litro:

Glucosa	10 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,052 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g
Elementos traza 1000x	1 ml
Agar	15 g

La solución de elementos traza 1000x contiene: 22 g/l ZnSO₄·7H₂O, 5 g/l MnCl₂·4 H₂O, 5 g/l FeSO₄·7H₂O, 1,6 g/l CoCl₂·6H₂O, 1,6 g/l CuSO₄·5H₂O, 7,5 g/l Na₂MoO₄·2H₂O y 50 g/l de EDTA. Una vez fundido, el medio fue suplementado con ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) a una concentración de 1 mM. Dicho compuesto es oxidado por las lacasas, cambiando su coloración de transparente a azul-verde oscuro.

Medio de producción de lacasa (MLPVP) (Rodríguez *et al.*, 2008). Medio utilizado para la cuantificación de la producción de lacasas en los transformantes pPEL3G y pEXLAC de *T. longibrachiatum*. Este medio tiene la siguiente composición por litro:

Glucosa	100 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,052 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g
Elementos traza 1000x	1 ml
Polivinilpirrolidona	20 g
Casaminoácidos	1 g
Extracto de levadura	0,5 g

Una vez resuspendidos los ingredientes se ajustó el pH a 2,5.

II-5.3 Soluciones de antibióticos.

- Ampicilina: se preparó a una concentración de 200 mg/ml en agua. Para la selección de clones de *Escherichia coli* se empleó una concentración de 100 µg/ml.

- Higromicina: se preparó a una concentración de 30 mg/ml en agua. Para la selección de protoplastos transformantes se empleó una concentración de 200 µg/ml y para posteriores resebrados de los transformantes 50 µg/ml.

- Geneticina: se preparó a una concentración de 200 mg/ml en agua. Para la selección de protoplastos transformantes se empleó una concentración de 200 µg/ml y para posteriores resiembras o subcultivos de los transformantes una concentración de 100 µg/ml.

- Fleomicina: Se preparó a una concentración de 100 mg/ml en agua. Para la selección de protoplastos transformantes se empleó una concentración de 150 µg/ml.

II-6. Mantenimiento y cultivo de microorganismos.

II-6.1 Crecimiento de microorganismos.

II-6.1.1 Crecimiento de cepas bacterianas.

El cultivo de *Escherichia coli* en medio líquido se llevó a cabo inoculando con una colonia 100 ml de medio LB o TB en un matraz de 500 ml. Para el crecimiento en medio sólido, estos medios se suplementaron con agar al 2%. En algunos casos, cuando el experimento o el microorganismo lo requería, los medios de cultivo descritos se suplementaron con diversas soluciones que se detallan a continuación:

- Ampicilina (Ap): ver sección II-5.3 de Materiales y Métodos.
- IPTG (isopropil-β-D-tio-galactósido): solución acuosa a una concentración 100 mM. La concentración final utilizada fue de 0.05 mM.

- X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopiranosido): solución en dimetilformamida a una concentración de 20 mg/ml. La concentración final utilizada fue de 40 μ g/ml.

II-6.1.2 Cultivos de bacteriófagos.

La propagación del bacteriófago lambda y de sus derivados depende de cepas hospedadoras como *Escherichia coli* LE392 o *Escherichia coli* XL-1 Blue MRA P2, a las que infecta provocando su posterior lisis celular, la cual se manifiesta en medio sólido mediante la aparición de halos de lisis que contrastan con el crecimiento bacteriano. La obtención de suspensiones concentradas de fagos se llevó a cabo mediante infecciones en medio líquido en las que, al cabo de unas horas de crecimiento del cultivo, el crecimiento exponencial bacteriano es sobrepasado por la multiplicación del fago en progresivas rondas de infección. Todos los bacteriófagos se mantuvieron a 4°C en tampón SM ⁽¹⁾ con un 0,1 % (v/v) de cloroformo o bien a -70°C en tampón SM con un 7% de dimetilsulfóxido (DMSO).

⁽¹⁾ Tampón SM: Gelatina al 0,01% (p/v); NaCl 100 mM; MgSO₄·7H₂O 10 mM, Tris HCl 50 mM, pH 7,5.

II-6.1.3. Crecimiento de cepas fúngicas.

- Las cepas de *T. longibrachiatum* y *P. hydnooides* utilizadas se incubaron a 28°C durante 4-5 días, para su crecimiento sobre medio sólido, utilizando medio PDA para el crecimiento y RB para la esporulación.

- Para el crecimiento de micelio de *T. longibrachiatum* destinado a la obtención de protoplastos se utilizó medio CM incubando a 30°C 16-18 horas.

- Para la obtención de esporas de *T. longibrachiatum* se dejó crecer el micelio en medio RB a 28°C durante 4-5 días.

- Para el crecimiento en medio líquido se utilizaron matraces de 500 ml sin indentaciones, con 100 ml de medio MEB, incubados a 28°C y 250 rpm en agitadores orbitales.

II-6.2 Mantenimiento de microorganismos.

La conservación de las cepas bacterianas y fúngicas se realizó de distintas formas, según el periodo de tiempo de almacenamiento requerido:

- Siembra en placas petri, selladas con Parafilm[®] y a 4°C. Este sistema se usa para mantener las cepas de 2 a 4 meses. Las cepas fúngicas se conservan de igual forma.

- Para la conservación durante periodos de tiempo más prolongados se realizaron suspensiones en glicerol al 50% para cepas bacterianas y conservadas a -20° C. En el

caso de cepas fúngicas se realizan suspensiones de esporas en glicerol al 40% conservándose igualmente a -20° C.

II-7. Métodos de extracción y análisis de ADN.

II-7.1 Extracción de ADN

II-7.1.1 Limpieza y purificación del ADN.

La eliminación de proteínas en muestras de ADN se realizó mediante un proceso de limpieza o extracción con fenol y cloroformo denominado comúnmente fenolización. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Añadir un volumen (1:1) de fenol neutro⁽¹⁾ a la muestra y agitar suavemente de 20 a 30 segundos. Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos y a temperatura ambiente.
- Recoger cuidadosamente la fase acuosa con una micropipeta y pasar a un tubo limpio.
- Añadir 0,5 volúmenes de fenol neutro y 0,5 volúmenes de CIA⁽²⁾. Agitar durante 20-30 segundos. Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos y a temperatura ambiente. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y repetir el proceso hasta que la solución de ADN presente una interfase libre de impurezas
- Añadir un volumen de CIA, agitar durante 20-30 segundos y volver a centrifugar del modo descrito.
- Recuperar la fase acuosa.

⁽¹⁾ Fenol neutro: se mezclan por agitación fuerte 3 volúmenes de fenol ácido con 1 volumen de Tris-HCl 1M pH 8,0. Se deja reposar hasta que se separan las fases. Se retira la fase acuosa (superior) y se conserva en un recipiente opaco a 4°C.

⁽²⁾ CIA: mezclar 24 partes de cloroformo y 1 de alcohol isoamílico.

Para recuperar el ADN así purificado inducimos una pérdida de su solubilidad en agua mediante la adición de sales y un alcohol.

- Añadir a la suspensión acuosa 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -20° C y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,2. Mezclar e incubar a -20° C durante un mínimo de 2 horas. (Alternativamente al etanol se pueden usar 0,6 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente).
- Centrifugar a 13.200 rpm y 4°C durante 30 minutos. Desechar el sobrenadante y limpiar el precipitado con etanol al 70% en agua. Centrifugar nuevamente a 13.200 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente. Retirar el sobrenadante y dejar secar los restos de etanol al aire.
- Resuspender en agua milliO o TE⁽³⁾

⁽³⁾TE: Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0.

II-7.1.2 Aislamiento de DNA plasmídico de *Escherichia coli* a pequeña escala (Minipreps).

Este método es una modificación del descrito por Holmes y Quigley (1981). Se trata de un protocolo sencillo y rápido que permite el análisis simultáneo de gran número de muestras.

- Picar una colonia de *Escherichia coli* con un palillo estéril e inocular en tubos eppendorf® conteniendo 800 µl de medio TB suplementado con sus correspondientes sales y el antibiótico apropiado. Incubar durante 10 a 12 horas a 37°C y en agitación a 250 rpm.
- Centrifugar el cultivo a 13.200 rpm durante 4 minutos y a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante y resuspender en 200 µl de STET⁽¹⁾, mediante agitación fuerte utilizando un vórtex.
- Añadir 10 µl de una solución 10mg/ml de lisozima en agua, y mezclar bien aplicando vórtex. Hervir en un baño de agua durante 45 segundos.
- Centrifugar a 13.200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Eliminar el precipitado que se forma de la coagulación de los componentes celulares (ADN cromosómico, proteínas...) con un palillo estéril.
- El sobrenadante obtenido se mezcla con 200 µl de isopropanol y 20 µl de acetato sódico 3M pH 5,2, dejando precipitar el ADN plasmídico durante 5 minutos.
- Centrifugar a 13.200 rpm durante 10 minutos y a temperatura ambiente.
- Eliminar el sobrenadante. El precipitado obtenido se limpia con etanol 70% en agua.
- Centrifugar durante 4 minutos a 13.200 rpm, descartar el sobrenadante y dejar secar al aire el ADN.
- El precipitado obtenido se resuspende en 30 ó 40 µl de TE o agua mili-Q, pudiendose almacenar a 4°C o a -20°C.

⁽¹⁾ STET. Sacarosa 8%, Tritón X-100 0,5%, Tris- HCl 10 mM, EDTA 50mM, pH8.

II-7.1.3 Aislamiento de ADN plasmídico a gran escala (Lisis Alcalina).

Este procedimiento se utiliza para la obtención de ADN plasmídico a gran escala (Maniatis *et al*, 1982). Consiste en someter a los ácidos nucleicos a un tratamiento a pH básico con hidróxido sódico, produciéndose una drástica desnaturalización del ADN cromosómico que no afecta a las moléculas de ADN plasmídico superenrollado. La posterior adición de acetato potásico neutraliza el pH del medio pero el ADN cromosómico no puede renaturalizarse y es eliminado por precipitación.

- Sembrar una colonia de *Escherichia coli*, portadora del plásmido que se pretende aislar, en un matraz de 500 ml con 100 ml de medio TB suplementado con las correspondientes sales y el antibiótico marcador de selección apropiado. Incubar durante 10- 14 horas a 37°C y 250 rpm en un agitador orbital.
- Recoger las células por centrifugación a 4.500 rpm en un rotor Sorvall GSA, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Retirar el sobrenadante.
- Resuspender el precipitado celular en 2 ml de solución TEG⁽¹⁾ con ayuda de un vórtex. A continuación añadir 2 ml de una solución de lisozima preparada en TEG⁽¹⁾ y a una concentración final de 10 mg/ml. Pasar a un tubo de centrifuga tipo SS34 y mantener durante 10 minutos a temperatura ambiente.



- Añadir 8 ml de solución II de lisis⁽²⁾ preparada en el momento y agitar suavemente hasta obtener una mezcla homogénea. Mantener 10 minutos en hielo, agitando cada 2 minutos. La mezcla debe ir adquiriendo un aspecto cada vez más viscoso.
- Añadir 6 ml de solución III de lisis⁽³⁾ y mezclar lentamente el contenido de los tubos hasta que se forme un precipitado blanco. Mantener 15 minutos en hielo.
- Eliminar los restos celulares y ADN cromosómico, centrifugando a 13.200 rpm a 4°C, durante 20 minutos en un rotor Sorvall SS34. Recuperar el sobrenadante en tubos Corex[®] limpios.
- Precipitar el ADN plasmídico con 0,6 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Recuperar el ADN plasmídico por centrifugación a 6.000 rpm en un rotor Sorvall SS34 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Lavar el precipitado con etanol al 70% en agua y resuspender en 0,5-1 ml de tampón TE.
- Eliminar el ARN tratando con ARNasa A a una concentración final de 40 µg/ml durante 30 minutos a 37°C.
- Repetir el proceso de limpieza y precipitación descrito en el apartado 7.1.1.
- Resuspender finalmente en 100 µl de tampón TE.

⁽¹⁾TEG. Tris-HCl 25mM (pH8,0), glucosa 50mM, EDTA 10mM (pH 8,0).

⁽²⁾Solución II de lisis: NaOH 0,2N y SDS 1% en agua

⁽³⁾Solución III de lisis: 60% acetato potásico 5M pH 4,8; 11,5% ácido acético glacial y 28,5% de agua destilada. Conservar a -20°C. pH 4.

II-7.1.4 Aislamiento de ADN total a partir de micelio y esporas de hongos.

El método utilizado para el aislamiento de ADN fúngico fue el descrito por Lee y Taylor (1990) con ligeras modificaciones. Este DNA sería utilizado en posteriores experimentos de PCR, hibridación de ácidos nucleicos, etc.

- Inocular un matraz de 500 ml conteniendo 100 ml de medio MEB con 1×10^6 esporas y dejar crecer durante 30 horas a 28 °C y 250 rpm de agitación.
- Recoger el micelio producido con un filtro de nylon de 30 mm de diámetro de poro. Lavar el micelio con 100 ml de NaCl al 0,9%. Prensar el micelio entre dos hojas de papel secante para retirar el exceso de medio y NaCl. Pasar a hielo.
- Con ayuda de un mortero, triturar 3-4 g de micelio congelado con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Transferir el polvo a un vaso de precipitados de 100 ml.
- Añadir 50 ml de tampón de extracción⁽¹⁾ previamente calentado a 65°C y mezclar hasta homogeneidad agitando suavemente durante 20 minutos.
- Pasar a tubos de centrifuga SS34 y centrifugar 10 minutos a 4 °C y 10.000 rpm.
- Recoger el sobrenadante y añadir 0,5 volúmenes (v/v) de fenol neutro y 0,5 volúmenes (v/v) de CIA. Mezclar bien y centrifugar 8 minutos a 10.000 rpm.
- Transferir la fase acuosa a tubos Corex[®] limpios. Añadir 0,6 volúmenes (v/v) de isopropanol y 0,1 volúmenes (v/v) de acetato sódico 3M pH 5,2. Mezclar por inversión del tubo y dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Transcurrido este tiempo centrifugar a 4.800 rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado al aire. Lavar el precipitado con 1 ml de etanol al 70% en agua y centrifugar de nuevo en las mismas condiciones.
- Resuspender el precipitado en 1,5 ml de tampón TE. Dividir en alícuotas de 750 µl en microtubos de 1,5 ml. Añadir ARNasa A a una concentración final de 50 µg/ml e incubar a 37 °C durante 30 minutos.



- Realizar a continuación los procesos de limpieza y precipitación descritos en el apartado II-7.1.1.
- Por último resuspender el precipitado en 200 μ l de tampón TE o agua milli-Q.

⁽¹⁾Tampón de extracción: Tris-HCl 0,1M, pH 7,5; EDTA 50mM, SDS 1% (p/v).

Nota: este protocolo es fácilmente escalable y se puede adaptar a la cantidad de material de partida.

II-7.2 Análisis y modificación del ADN.

II-7.2.1 Cuantificación y análisis de la pureza de ácidos nucleicos.

Las preparaciones de ADN se cuantificaron mediante una medida espectrofotométrica. La relación absorbancia/cantidad de ácidos nucleicos viene establecida por las siguientes concentraciones equivalentes a una unidad de absorbancia medida a una longitud de onda de 260 nm:

<p>50 μg/ml ADN bicatenario 40 μg/ml ARN total 33 μg/ml ADN monocatenario</p>
--

Además la relación A_{260}/A_{280} es indicador de la pureza de la muestra. Una muestra pura de ADN presenta un relación $A_{260}/A_{280} = 1,8$. Este valor debe ser de 1,9-2,1 para muestras de ARN (Sambrook y Rusell, 2001).

II-7.2.2 Eliminación selectiva de ácidos nucleicos.

Los procesos de purificación de ADN o ARN conllevan habitualmente la contaminación de las muestras con ARN y ADN respectivamente. Para eliminar selectivamente alguno de los dos tipos de ácidos nucleicos se emplearon los enzimas desoxirribonucleasa I (ADNasa I)⁽¹⁾ y ribonucleasa A (ARNasa A)⁽²⁾ de páncreas bovino libres de ARNasas y ADNasas respectivamente. Normalmente, éste se utiliza a una concentración final de 10 μ g/ml, incubando la reacción durante 30 minutos a 37 °C.

⁽¹⁾ADNasa I: Solución 10 mg/ml en agua.

⁽²⁾ARNasa A: Stock preparado a 10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM pH7,5; NaCl 15 mM. Las ADNasas presentes se eliminaron por ebullición de la solución durante 15 minutos.

II-7.2.3 Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Los enzimas de restricción necesarios para la realización de este trabajo fueron utilizados según las indicaciones de los proveedores (New England Biolabs, Fermentas, Takara). El tampón utilizado fue el suministrado por la casa comercial. Algunas consideraciones a tener en cuenta son:

- Añadir menos de 1/10 de volumen de enzima con respecto al volumen final de la reacción, con objeto de diluir el glicerol presente en las soluciones de conservación del enzima, evitando la inhibición de la actividad enzimática.
- Si el ADN está resuspendido en TE, la reacción debe realizarse en un volumen 10 veces mayor al volumen de ADN que se va a digerir para evitar la inhibición.



- Incubar las reacciones a la temperatura especificada por el proveedor y durante un periodo de tiempo que no exceda el de la actividad descrita para el enzima.

II-7.2.4 Reacciones de modificación de ADN.

II-7.2.4.1 Desfosforilación de los extremos 5' de fragmentos de ADN.

La fosfatasa alcalina hidroliza los extremos 5' fosfato del ADN, lo que impide la formación de enlaces fosfodiéster entre los dos extremos de la misma molécula. Este tipo de tratamiento se aplica a los vectores de clonación que han sido linearizados para prevenir su religación. Este procedimiento se utiliza cuando se pretenden realizar ligaciones que por algún motivo resulten problemáticas, cuando la cantidad de ADN a ser insertado en el vector sea inferior a la óptima o en vectores con alto riesgo de religación, como por ejemplo aquellos digeridos con un único enzima de restricción. El procedimiento es el siguiente:

- Se parte de al menos 1 µg de ADN disuelto en agua.
- Añadir 1/10 parte del volumen total de la reacción de tampón de la fosfatasa alcalina 10x (Promega)
- Añadir 1 µl de fosfatasa alcalina (Promega) e incubar a 37 °C durante 15 minutos.
- Inactivar el enzima incubando a 65 °C durante 5 minutos.

II-7.2.4.2 Ligación de fragmentos de ADN.

Para la ligación de extremos de moléculas lineales de ADN mediante la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato se utilizó el enzima ADN ligasa del bacteriófago T4. Las ligaciones se llevan a cabo en un volumen máximo de 15 µl. Para la realización de una ligación se mezclan en un microtubo:

- 50 ng de ADN del vector
- ADN del inserto. Para efectuar ligaciones de fragmentos de ADN con vectores de clonación se emplean concentraciones molares aproximadas de inserto ocho veces superiores a las de vector.
- 1/10 del volumen final de tampón de la ligasa 10X⁽¹⁾
- Mezclar bien y añadir de 2 a 7 unidades de enzima.
- Completar el volumen de reacción con agua destilada
- La reacción se incuba de 6 a 12 horas a 14°C.

⁽¹⁾Tris-HCl 0.5M (pH 7,4), MgCl₂ 0,1M; DTT 0,2M; dATP 10mM; seroalbumina bovina 500 µg/ml pH 7,8.

II-7.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa es un método de amplificación *in vitro* de ADN en el que se reproducen las condiciones de replicación del ADN en la célula (Saiki *et al.*, 1985; Mullis y Faloa, 1987). Así, partiendo de una molécula de ADN diana, se puede amplificar 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 ellos 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 en la región a amplificar. La distancia entre ellos determinará la longitud de la secuencia de ADN que se pretende amplificar.

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 del enzima.

En el mercado existen diversas ADN polimerasas que se pueden usar para PCR y cada una de ellas con unas características y condiciones específicas para llevar a cabo la reacción. En este caso, dos han sido los enzimas utilizados:

- **Taq DNA polymerase[®] (Promega)**. Se utilizó cuando la introducción de un pequeño número de errores no resultaba crucial para el experimento (p.ej.: sondas), o bien cuando se pretendía determinar la temperatura óptima de anillamiento de unos nuevos oligonucleótidos. Este enzima deja una desoxiadenosina en cada extremo 3', lo que permite clonar directamente los fragmentos amplificados por PCR en vectores del tipo *pGEM-T Easy* (Promega).

- **Pfx50 DNA polymerase[®] (Invitrogen)**, se utilizó cuando una alta fidelidad en la copia era imprescindible.

En la **Tabla II-1** se especifican, de acuerdo al catálogo *PCR applications manual* (Roche), los valores normales de los distintos componentes para la realización de una típica reacción de amplificación por PCR. Estos valores son orientativos y han de ser ajustados en función de la ADN polimerasa, el tipo de región a amplificar, etc. De igual forma, en algunas reacciones se hace necesario el uso de aditivos que potencian la eficiencia o especificidad de la reacción (DMSO, betaina, seroalbúmina bovina, detergentes, etc).

ADN Molde	1-10 ng ADN bacteriano 0,1-1 ng ADN plasmídico
Cebadores (18-24 pb)	0,1-0,6 μM
ADN polimerasa	0,5-2,5 unidades
MgCl ₂	1-5 mM (normalmente 1,2 mM)
dNTP	50-500 μM (normalmente 200 μM)
Tampón 10x	1x
Agua	completar volumen de reacción

Tabla II-1: Componentes necesarios para realizar una reacción de PCR y concentraciones finales para 50 μl de reacción.

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 II-2**.

Desnaturalización inicial		5 min a 94-96 °C	1 ciclo
	Desnaturalización	30 s a 94-96 °C	
Amplificación	Anillamiento	30-45 s. T ^a según cebadores	25-35 ciclos
	Extensión	30-60 s/kb a 72 °C	
Extensión final		10 min. a 72 °C	1 ciclo

Tabla II-2: Tiempos y temperaturas de reacción típicos para una reacción de PCR.

Al finalizar cualquier reacción de PCR, es recomendable analizar el resultado de la misma en un gel de agarosa, comprobando la cantidad de amplificación, no existencia de bandas inespecíficas, etc...

II-7.3 Electroforesis de ácidos nucleicos.

La electroforesis es un fenómeno que consiste en la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico. Estas partículas migran hacia el cátodo o el ánodo (electrodos negativo o positivo respectivamente) en función de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. A escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas.

II-7.3.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Las condiciones de electroforesis utilizadas para separar moléculas de ADN en geles de agarosa fueron las descritas por Maniatis *et al.* (1982). Se utilizó agarosa (Pronadisa) a diferentes porcentajes desde 0,3% hasta de 2,5% (p/v), dependiendo del

tamaño de los fragmentos a separar (ver **Tabla II-3**) utilizando TAE⁽¹⁾ como tampón. El gel se prepara disolviendo en TAE la cantidad deseada de agarosa mediante el calentamiento en un microondas. Se vierte la mezcla en un molde y se deja solidificar.

Las muestras de ADN se mezclaron con 0,1 volúmenes de tampón de carga 6x⁽²⁾, se calentaron durante 5 minutos a 65 °C, enfriándose posteriormente en hielo, y cargándose en el gel. Generalmente se han utilizado geles del 0,8% (14x11 cm) aplicando una diferencia de potencial entre 80 y 100 V durante 3 horas. Al final de la electroforesis, se tiñeron los geles con bromuro de etidio⁽³⁾ durante 20 a 30 minutos. Los geles se observaron sobre un transiluminador de luz UV (Spectroline TR-302, $\lambda = 302$ nm) y se fotografiaron mediante una video impresora (Video Graphic Printer UP- 890 CE, Sony). El tamaño de las muestras se estimó por comparación con marcadores de peso molecular conocido cargado también en los geles.

⁽¹⁾TAE: 242 g de Tris base, ácido acético glacial 57,1 ml [5,7%(v/v)], EDTA 0,5M pH 8 100ml, agua destilada hasta 1L.

⁽²⁾Tampón de carga 6X: Azul de bromofenol 0,25%, sacarosa 40%, xilencianol 0,25% en solución acuosa.

⁽³⁾Bromuro de etidio: Se prepara una solución concentrada a 10 mg/ml y se conserva a 4°C en oscuridad. Para tinción de geles se utiliza una solución diluida en agua milliQ (para un litro de agua destilada se añaden 50 μ l de la solución concentrada)

Concentración de agarosa (%)	Tamaños de los fragmentos de ADN separados
0,6	1-30 kb
0,8	0,8-12 kb
1,0	0,5-10 kb
1,2	0,4-7 kb
1,5	0,2-3 kb
2,0	0,05-2 kb

Tabla II-3: Concentración de agarosa utilizada en los geles para resolver fragmentos de ADN de diferentes tamaños.

II-7.3.2 Extracción de ADN de geles de agarosa.

Con la electroforesis conseguimos una separación de fragmentos de ADN que pueden ser recuperados del gel para posteriores usos. Para realizar la extracción de ADN de geles de agarosa se utilizaron dos métodos, con un rendimiento similar en ambos casos. El primero de ellos es una técnica tradicional basada en la congelación rápida de la banda de agarosa con el ADN en su interior y la centrifugación posterior a través de lana de vidrio o algodón hidrófilo. El segundo método es comercial: *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*[®], y fue utilizado siguiendo las recomendaciones del fabricante.

II-7.3.2.1 Método de congelación rápido.

Esta técnica es conocida como *freeze-squeeze* (Tautz y Renz, 1983). Es un método rápido y sencillo, con un porcentaje de recuperación de ADN de aproximadamente el 70 %. En este protocolo ha sido sustituido el uso de lana de vidrio (nociva por inhalación) por algodón hidrófobo.

- Una vez separado el ADN mediante electroforesis convencional, cortar la banda de del gel procurando escindir la menor cantidad de agarosa posible. Introducir el fragmento de agarosa en un microtubo de 1'5 ml y congelar la banda a -20 °C durante 30 minutos.
- Colocar un microtubo, al que se ha practicado un orificio en el fondo y se ha obturado con algodón hidrófobo, sobre un microtubo intacto. Situar la banda en el microtubo agujereado y centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos.
- Limpiar y precipitar el ADN tal como se describe en el apartado 7.1.1 de Materiales y Métodos.
- Resuspender el precipitado en un volumen de agua de 10– 20 μ l.

II-7.3.2.2 Sistema “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit”.

Este *kit* usa un agente caotrópico que desnaturaliza proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión de ADN de doble cadena a la matriz (*glass fiber matrix*). De esta manera los contaminantes son eliminados mediante lavados y el ADN se eluye en un tampón de baja fuerza iónica (TE, Tris-HCl o agua milli-Q). En el presente trabajo se utilizó este *kit* tanto para purificar ADN desde solución (productos de PCR, fragmentos de restricción), como desde bandas de geles de agarosa. El proceso de extracción es rápido y permite un porcentaje de recuperación en torno al 80 % del ADN contenido en el gel.

Este *kit* se empleó para recuperar fragmentos de entre 500 y 10.000 pares de bases (permitiendo recuperar desde 100 hasta 48.000 pb). El protocolo seguido es el siguiente:

- Una vez realizada la electroforesis y teñido el gel se corta el fragmento de agarosa que contiene la banda de ADN de interés y se deposita en un tubo de peso conocido, pesándose a continuación el conjunto tubo-agarosa.
- A continuación se añade el tampón de solubilización (capture buffer), a razón de 10 μ l de tampón por cada 10 mg de agarosa cortada. La capacidad máxima de la columna GFX (con matriz de fibra de vidrio) es de 300 μ l de tampón de captura añadidos a 300 mg de agarosa.
- Se mezcla bien por agitación con vórtex y el tubo se incuba a 60°C en un baño de agua hasta que la agarosa se disuelve completamente.
- La muestra se transfiere a una columna GFX previamente colocada en un tubo colector proporcionado por el propio sistema y se mantiene a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Se centrifuga la muestra a 14.000 rpm durante 30 segundos. El ADN va a quedar retenido en la matriz de lana de vidrio mientras que las proteínas y las sales contaminantes de la muestra recogidas en el tubo colector son desechadas.
- Se añaden a la columna 500 μ l de tampón de lavado y seguidamente se centrifuga a 14.000 rpm durante 30 segundos.
- La columna se transfiere a un tubo *ependorf* de 1,5 ml estéril y se deja secar al aire unos minutos. A continuación se añaden 30 – 50 μ l agua estéril.
- Una vez añadida el agua estéril la muestra se mantiene a temperatura ambiente durante 1 minuto y, a continuación, se centrifuga a 14.000 rpm durante 1 min.



El sobrenadante recogido en el microtubo de 1,5 ml contiene al ADN purificado listo para su uso.

NOTA: se desconoce la composición exacta de las soluciones aportadas en el *kit* de extracción ya que no es aportada por los proveedores. El tampón de solubilización contiene acetato y altas concentraciones de sales caotrópicas que permiten la solubilización de la agarosa, el tampón de lavado contiene etanol y elimina las sales contaminante

II-7.4 Transferencia de ADN a soportes sólidos.

La transferencia a un soporte sólido de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción y sometidos a migración electroforética en geles de agarosa se denomina *Southern blotting* o transferencia de *Southern* (Southern, 1975). Esta técnica se basa en la fragmentación *in situ* del ADN, separación de las cadenas de ADN y transferencia de las mismas en forma monocatenaria a la membrana, para su posterior fijación a la misma mediante luz UV. Tradicionalmente, los fragmentos de ADN se transferían a filtros de nylon (Hybond-NTM de Amersham Biosciences) por capilaridad utilizando una torre de papel. Actualmente se tiende a sustituir este método por la transferencia mediante un sistema de vacío (*VacuGene XL*, Amersham Biosciences), que es el que a continuación se describe:

- Separar los fragmentos de ADN mediante electroforesis, teñir el gel y fotografiarlo.
- Cortar un filtro de nylon de un tamaño 1 cm mayor por cada lado que el tamaño del gel. Depositarlo en la unidad de transferencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Humedecer el filtro con SSC 2x.
- Para colocar el gel sobre el filtro, comenzar por el extremo con pocillos e ir dejándolo caer suavemente. Conectar la bomba de vacío.
- Cubrir toda la superficie del gel con Solución despurinizante⁽¹⁾ e incubar 20-30 minutos (en este tiempo la banda más adelantada del tampón de carga debe cambiar su color de azul a amarillo). Transcurrido este tiempo se retira la solución.
- Cubrir la superficie del gel con Solución desnaturalizante⁽²⁾ durante 20-30 minutos (el tampón de carga recupera su color azul original).
- Retirar la solución y cubrir la superficie del gel con la Solución neutralizante⁽³⁾ durante 30 minutos.
- Por último, retirar la solución neutralizante y cubrir la superficie del gel con SSC 20x⁽⁴⁾ durante 90 minutos.
- Retirar todo el líquido y marcar la posición de los pocillos del gel sobre el filtro con bolígrafo antes de retirarlo.
- Colocar el filtro sobre papel Whatman 3MM y fijar el ADN mediante luz ultravioleta al filtro (UV Stratalinker 2400, Stratagene®). Lavarlo con SSC (2x) o agua mili O y dejarlo secar, o bien iniciar inmediatamente el proceso de hibridación.
- Estos filtros se pueden conservar a 4 °C protegidos con papel Whatman 3MM y papel de aluminio durante varios meses.

⁽¹⁾Solución despurinizante: 0,25 M HCl.

⁽²⁾Solución desnaturalizante: 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH.

⁽³⁾Solución neutralizante: 1,5 M NaCl; 0,05 M Tris-HCl, pH 7,2; 1 mM EDTA.

⁽⁴⁾SSC 20x: 3 M NaCl; 0,3 M citrato sódico, pH 7,0.

II-7.5 Procedimientos para la hibridación de ADN.

II-7.5.1 Marcaje de sondas de ADN.

Existen diferentes métodos mediante los cuales se puede marcar un fragmento de ácido nucleico para ser utilizarlo como sonda en procesos de hibridación, aunque la principal diferencia radica en la molécula que permite detectar la banda de hibridación positiva. Ésta puede ser radiactiva ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (3000 Ci/mol; 10 mCi/ml)) o no radiactiva (digoxigenina-11-dUTP). El marcaje radiactivo se presenta, cada vez más, como un método de marcaje a extinguir, debido a la peligrosidad del mismo y a la producción de residuos radiactivos, por lo que en este trabajo todos los marcajes de sondas se han realizado de forma no radiactiva.

II-7.5.1.1 Marcaje mediante “High Prime DNA labeling random kit”.

El sistema de marcaje no radiactivo comercializado por la compañía Roche emplea un hapteno esteroide (digoxigenina) para marcar fragmentos de ADN. La digoxigenina está unida al nucleótido trifosfato dUTP por un enlace éster susceptible de ser eliminado en condiciones alcalinas, lo que facilita la posterior reutilización. Las sondas marcadas con digoxigenina son generadas enzimáticamente por el método de cebado al azar (*random priming*) descrito por Feinberg y Vogelstein (1983).

El método se basa en la incorporación al azar en el ADN de un análogo de nucleótidos (digoxigenina-11-dUTP) gracias a la extensión de hexanucleótidos iniciadores por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli*. El protocolo está ajustado (proporción de DIG-11-dUTP frente a dTTP) para que cada 20-25 nucleótidos incorporados se introduzca una molécula de digoxigenina. Esta densidad de haptenos en el ADN proporciona una gran sensibilidad en la inmunodetección posterior por anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con el enzima fosfatasa alcalina. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Obtener 0,1 μg de ADN en forma lineal del fragmento a marcar en un volumen máximo de 16 μl .
- Desnaturalizar el ADN hirviéndolo durante 10 minutos y transferirlo rápidamente a hielo. Mezclar los 16 μl de ADN con 4 μl de DIG High Prime (Roche). Centrifugar para recoger la muestra en el fondo del microtubo.
- Incubar la mezcla a 37 °C al menos durante 60 minutos. Incubar preferiblemente entre 16 y 24 horas.
- Parar la reacción congelando directamente o añadiendo 2 μl de EDTA 0,25 mM, pH 8,0 y congelarla hasta su utilización.

Nota: Según el fabricante con este método de marcaje, partiendo de 1 μg de ADN se obtienen 2,3 μg de sonda marcada tras 24 horas. Los componentes de kit DIG-High se pueden adquirir de forma separada para realizar el marcaje, aunque de esta forma el rendimiento de la reacción es casi 3 veces menor.

II-7.5.1.2 Cuantificación de marcaje.

Un paso importante antes de utilizar las sondas marcadas es comprobar su marcaje. Para ello se realizan diluciones seriadas (1:5) (ver **Tabla II-4**) de las mismas asumiendo que de 1 µg de ADN se obtienen 2,3 µg de sonda marcada y que se tiene un volumen final de 22 µl de producto.

Dilución	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625	1:78125
Cantidad de ADN (pg/µl)	20.909	4181,8	836,4	167,3	33,5	6,7	1,3

Tabla II-4: Para poder utilizar una sonda marcada con digoxigenina, es suficiente que se aprecie marcaje con claridad entre los puntos de 167,3 pg-33,5 pg. Cuanto mayor sea la dilución en la que se detecte marcaje, más veces se podrá reutilizar la sonda.

Desarrollo del protocolo:

- Aplicar 1 µl de cada dilución sobre una membrana *Hybond-NTM* (Amersham Biosciences).
- Fijar la sonda mediante luz ultravioleta (UV Stratalinker 2400, Stratagene®).
- Equilibrar la membrana con Tampón I⁽¹⁾ durante 1 minuto, en agitación.
- Bloquear la membrana con Tampón II⁽²⁾ durante 30 minutos, en agitación.
- Sustituir el Tampón II por la Solución de anticuerpos⁽³⁾ e incubar al menos 30 minutos en agitación. Realizar este paso en bolsa de hibridación.
- Eliminar la Solución de anticuerpos, lavar la membrana 2 veces con Tampón de lavado⁽⁴⁾ durante 15 minutos (cada vez) en agitación.
- Eliminar el Tampón de lavado y sustituirlo por Tampón III⁽⁵⁾ durante 2 minutos en agitación.
- Tratar la membrana con la solución *CDP-Star*⁽⁶⁾ durante 5 minutos en oscuridad y con el lado de la membrana que lleva unido el ADN hacia arriba.
- Secar bien la membrana y exponerla 5 minutos frente a un film *Hyperfilm-MP* (Amersham Biosciences) en un estuche para tal efecto.
- Revelar el film.

⁽¹⁾Tampón I: 100 mM ácido maléico; 150 mM NaCl pH 7,5.

⁽²⁾Tampón II: Tampón I más 0,5-1 % de agente bloqueante (*Blocking Reagent* de Roche).

⁽³⁾Solución de anticuerpos: diluir en una proporción 1:15.000 anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) en Tampón II.

⁽⁴⁾Tampón de lavado: Tampón I al que se le añade Tween-20 al 0,3% (v/v).

⁽⁵⁾Tampón III: Tris-HCl 0,1 M pH 9,5; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 50 mM. Se prepara por una parte 1 M Tris-HCl, pH 9,5; y por otro lado 1 M NaCl; 500 mM MgCl₂•6H₂O. En esta forma las soluciones están 10x, mezclándose antes de usar como 1x.

⁽⁶⁾Solución CDP-Star: Se prepara diluyendo 100 veces en el tampón III la solución del compuesto disodio-2-cloro-5-(4-metoxiespiro[1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)triclo[3,3,1,,1^{3,7}]decan]-4-il)-1-fenilfosfato, quedando a una concentración final de 0,25 mM. Se almacena a 4 °C en oscuridad.

II-7.5.2 Hibridación de ADN.

El proceso de hibridación se lleva a cabo una vez que se ha realizado la transferencia del ADN 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 con digoxigenina al ADN 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, 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 ADN. La disminución de la unión inespecífica durante los lavados se consigue disminuyendo la concentración de sales del tampón de lavado, aumentando la concentración de detergentes en el tampón de lavado o 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 en caso de hibridaciones realizadas utilizando CDP-Star.

Las hibridaciones tipo *Southern* siempre se realizaron con sondas de ADN bicatenario marcadas con digoxigenina. La temperatura óptima de hibridación para cada sonda se dedujo de forma experimental; en el caso de las sondas 100 % homologas, la temperatura utilizada fue de 70 °C, siendo reducida sólo en casos de sondas con baja homología.

- **Prehibridación:** colocar la membrana en un tubo de hibridación y añadir 10-20 ml de Solución de hibridación⁽¹⁾ e incubar a la temperatura adecuada durante 1 – 4 horas.

- Hervir la sonda previamente marcada en un baño de agua durante 10 minutos para desnaturalizar el ADN y pasar rápidamente a hielo. Añadir a la sonda así desnaturalizada 25 ml de solución de hibridación para obtener una concentración final de 5 – 25 ng/ml. Esta solución de hibridación puede ser reutilizada varias veces.

- **Hibridación:** Eliminar la solución utilizada en la prehibridación y añadir la solución de hibridación con la sonda e incubar un mínimo de 8 horas en agitación y a la temperatura adecuada. Tras la hibridación recoger la solución de hibridación y conservar a -20°C.

- **Lavados:** Adicionar al tubo de hibridación 20-25 ml de Solución de lavado⁽²⁾ y tratar la membrana en agitación durante 15 minutos a la temperatura de hibridación.



- Decantar la Solución de lavado I y añadir al tubo 20 – 25 ml de Solución de lavado II⁽³⁾. Tratar 15 minutos en agitación y a la temperatura de hibridación.
- Decantar la solución II y repetir el lavado con solución II fresca.
- Colocar la membrana en una bandeja limpia y tratarla con Tampón de lavado⁽⁴⁾ durante 5 minutos en agitación y a temperatura ambiente.
- Decantar el tampón de lavado. Bloquear la membrana con Tampón II⁽⁵⁾ durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente.
- **Detección:** Sustituir el tampón II por la Solución de anticuerpos⁽⁶⁾ y dejar al menos una hora en agitación a temperatura ambiente.
- Eliminar la solución de anticuerpos y lavar la membrana dos veces con tampón de lavado durante 15 minutos (cada vez) en agitación.
- Eliminar el tampón de lavado y sustituirlo por Tampón III⁽⁷⁾ durante 5 minutos en agitación.
- Tratar la membrana con la solución CDP-Star⁽⁸⁾ durante 5 minutos en oscuridad. Una vez concluida el tratamiento guardar la solución (varios usos)
- Secar y envolver la membrana en plástico de hibridación. Exponer bajo una película de autorradiografía (Hyper Film, Amersham Pharmacia Biotech) en un estuche con pantallas intensificadoras de calcio-tungsteno-fósforo durante 10 – 15 minutos.
- Revelar la película sometiendo a la siguiente tratamiento: 1-2 minutos en Solución reveladora de rayos X Kodak⁽⁹⁾; 1 minuto en solución de paro⁽¹⁰⁾ y 1-2 minutos en solución fijadora Kodak⁽¹¹⁾. Lavar con agua y dejar secar la película.

⁽¹⁾ Solución de hibridación: 5x SSC; 2% agente bloqueador (*Blocking Reagent* de Roche); 0,1% laurilsarcosina; 0,02% SDS; formamida 40%.

⁽²⁾ Solución de lavado I: 2x SSC; 0,1% SDS.

⁽³⁾ Solución de lavado II: 0,1x SSC; 0,1% SDS.

⁽⁴⁾ Tampón de lavado: Tampón I (100 mM ácido maleico; 150 mM NaCl, pH 7,5) más Tween-20 al 0,3% (v/v).

⁽⁵⁾ Tampón II: Tampón I más 1% de agente bloqueador .

⁽⁶⁾ Solución de anticuerpos: diluir en una proporción 1:10000 los anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) en tampón II.

⁽⁷⁾ Tampón III: Tris-HCl, pH 9,5 0,1 M; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 50 mM. Se prepara por una parte 1 M Tris-HCl, pH 9,5; y por otro lado 1 M NaCl; 500 mM MgCl₂ • 6H₂O. En esta forma las soluciones están 10x, mezclándose antes de usar como 1x

⁽⁸⁾ Solución CDP-Star: Se prepara diluyendo 100 veces en el tampón III la solución del compuesto disodio-2-cloro-5-(4-metoxiespiro[1,2-dioxietano-3,2'-[5'-cloro]tricyclo[3,3,1,1,3,7]decan]-4-il)-1-fenilfosfato, quedando a una concentración final de 0,25 mM. Se almacena a 4 °C en oscuridad

⁽⁹⁾ Solución reveladora: Diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1:31 en agua mili-O.

⁽¹⁰⁾ Solución de paro: 2,5% (v/v) ácido acético.

⁽¹¹⁾ Solución fijadora: Diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1:9 en agua mili-O.

II-7.6 Secuenciación de ADN.

La secuenciación por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) requiere como molde ADN de cadena sencilla para que la ADN polimerasa actúe. Este molde puede conseguirse bien a partir de vectores del tipo fagémido, o bien por desnaturalización de ADN bicatenario en una reacción de PCR.

II-7.6.1 Sistema de secuenciación *ABI Prism*.

El proceso de secuenciación se realizó por el método de los didesoxinucleótidos descrito por Sanger *et al.* (1977). Para ello se ha empleado el sistema de secuenciación automática no radiactiva *ABI Prism*® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y el *ABI Prism*® BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

La síntesis de ADN complementario a un ADN de cadena sencilla a partir de un iniciador o cebador la realiza la ADN polimerasa del fago T7. La síntesis se puede detener de forma aleatoria por la introducción de pequeñas cantidades de didesoxinucleótidos (ddNTP), análogos a los desoxinucleótidos (dNTP) que carecen del grupo 3' hidroxilo necesario para la formación del siguiente enlace fosfodiéster. Estos didesoxinucleótidos están conjugados con un fluoróforo específico para cada uno de los mismos.

En la fase de elongación la ADN polimerasa incorpora los ddNTPs al azar en distintos tiempos, dando lugar a una población de moléculas fluorescentes de distintos tamaños. Las reacciones son sometidas a electroforesis en capilar y los fragmentos de ADN en su migración a lo largo del mismo atraviesan un haz fijo de luz láser, lo que genera señales fluorescentes que son detectadas y almacenadas por el sistema.

Cada reacción de secuencia se realiza en un volumen de 20 µl, manteniendo las proporciones que se reflejan en la **Tabla II.5**:

<i>Premix sequencing buffer</i> (P)	2 µl
<i>5x Sequencing buffer</i> (B)	2 µl
Cebador (20 µM)	1 µl
ADN molde	200-500 ng
DMSO (dimetilsulfóxido)	0,7-1,4 µl
Agua mili-Q	c.s.p. 20 µl

Tabla II-5: El *Premix sequencing buffer* (P) contiene los ddNTPs, dNTPs y la ADN polimerasa. El *5x Sequencing buffer* (B) es el tampón de la reacción. En ninguno de los dos se conoce la composición exacta. La cantidad de ADN molde indicada es para el caso de ADN plasmídico, siendo entre 5 y 80 ng para productos de PCR, entre 25-50 ng para ADN de cadena sencilla y de 0,5 a 1 ng para cósmidos.

El desarrollo del protocolo de secuenciación se encuentra detallado a continuación:

- Realizar una reacción de PCR para cada muestra con los siguientes valores:

1 ciclo	98 °C – 3 minutos
25 ciclos	96 °C – 10 segundos
	50 °C – 5 segundos
	60 °C – 4 minutos
1 ciclo	4 °C – ∞

- Pasar la reacción a un microtubo de 1,5 ml. Añadir 5 µl de EDTA (125 mM) y 60 µl de etanol absoluto. Mezclar e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.

- Centrifugar a 4 °C durante 20 minutos a 14.000 rpm. Retirar el sobrenadante.

- Lavar el precipitado (casi invisible) con 60-70 µl de etanol al 70 %.

- Centrifugar 15 minutos a 14.000 rpm y temperatura ambiente. Retirar el etanol y dejar evaporar los posibles restos.

- Conservar a 20°C hasta el momento de su análisis.

- Descongelar la muestra a temperatura ambiente durante unos minutos.

- Añadir 30 µl de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) y mezclar con vórtex durante 1 minuto.

- Desnaturalizar la reacción calentando a 95°C durante 3-5 minutos.

- Mezclar nuevamente con vórtex y centrifugar para recoger la reacción en el fondo del microtubo.

- Pasar la reacción a un tubo específico para el secuenciador ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

II-7.7 Análisis informático.

El análisis y comparación de secuencias nucleotídicas y proteicas, se han realizado gracias a los siguientes programas y bases de datos:

- Chromas. Versión 2.3 (Technelysium).

- ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) Versión 1.81 (www.igbmc-ustrasbourg.fr/BioInfo/).

- CYPRED PredictProtein-PHDsec (<http://www.predictprotein.org/>)

- DNASTAR (DNASTAR Inc. Madison, Wisconsin, USA).

- ExpASY. ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/>);

- MatInspector Release Professional V7.4.2 (Quandt *et al.*, 1995)

- GelProAnalyzer 3.1 Analysis Software.

- NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)

- Pfam <http://www.sanger.ac.uk/Pfam/> (Finn *et al.*, 2008)

- PredictProtein-PHDsec (The PredictProtein server, Columbia, USA; <http://www.predictprotein.org/>)

- Psi-Pred (Protein structure prediction server, secondary structure & transmembrane topology, Brunel, UK; <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)

- SWISS-MODEL, DeepView-Swiss PdbViewer (Schwede *et al.*, 2003)

- VECTOR NTI Advance® 9 (Invitrogene).

- YinOYang 1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>)

II-8. Métodos de extracción y análisis de ARN.

La mayor dificultad que presenta la obtención de ARN se debe a la existencia de ARNasas, enzimas muy activos y que no necesitan cofactores en el desarrollo de su actividad. La extracción de ARN debe cumplir una serie de requisitos:

- Debe realizarse en una solución que contenga algún agente inactivador de la actividad de las ARNasas como 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, esterilizando (preferiblemente dos veces) en autoclave el material de plástico y cuidando la limpieza del lugar de trabajo.

II-8.1 Obtención de ARN total de *T. longibrachiatum*.

Para la purificación de ARN total de *T. longibrachiatum* utilizada en esta tesis, se usó el sistema RNeasy de la casa comercial Qiagen, el cual utiliza minicolumnas que contienen una matriz basada en sílica gel que posee la propiedad de unir selectivamente el ARN.

- Recolectar el micelio proveniente de medio líquido por filtración a través de filtros estériles de poliamida (Nytal) de 30 μm de diámetro de poro y lavar con 2 volúmenes de NaCl 0,9% tratado con DEPC. Eliminar el exceso de humedad con papel de filtro.

- Recolectar el micelio así obtenido, en una placa de Petri (50 mm de diámetro) y congelar inmediatamente en N_2 líquido.

- Triturar el micelio en mortero con N_2 líquido hasta convertirlo en un fino polvo. Distribuir el polvo en microtubos de 2 ml hasta un volumen de 0,7 ml. Procesar inmediatamente los tubos o congelar en N_2 líquido y almacenar a -80°C.

- Adicionar 700 μl del *buffer* de lisis RLT ^(1,2) y mezclar fuertemente mediante un vórtex durante 1 minuto. Incubar durante 1-2 minutos a 56°C, agitar de nuevo con vórtex y centrifugar a 13.200 rpm durante 3 minutos.

- Recolectar cuidadosamente el sobrenadante, depositarlo directamente sobre la columna lila (QIAshredder) y centrifugar a 13.200 rpm durante 2 minutos.

- Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo y adicionar en proporción 1:1 etanol 70%-DEPC ⁽³⁾ mezclando suavemente.

- Adicionar la mitad del volumen de la mezcla (aprox. 700 μl) a la columna rosa (RNeasy) y centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm. Desechar el efluente y repetir



el procedimiento con el volumen restante de la mezcla. Descartar nuevamente el efluente.

- Lavar, primero con 700 μl de buffer RW1 ⁽²⁾ y luego con 500 μl de buffer RPE ⁽²⁾, centrifugando cada vez durante 15 segundos a 10.000 rpm.

- Añadir otros 500 μl de buffer RPE ⁽²⁾ y centrifugar a 10.000 rpm durante 2-3 minutos para secar la columna.

- Eluir con 30 μl de agua-DEPC ⁽³⁾ centrifugando a 10.000 rpm durante 1 minuto. Agregar otros 30 μl de agua-DEPC y eluir nuevamente a 10.000 rpm durante 1 minuto. Sumar los dos volúmenes ⁽⁴⁾. Almacenar a -80°C.

⁽¹⁾El kit dispone además de otro buffer (RLC) que puede emplearse dependiendo de las recomendaciones del fabricante.

⁽²⁾Todos los tampones mencionados los proporciona el fabricante.

⁽³⁾Todas las soluciones utilizadas para trabajar con ARN (excepto aquellas que llevan Tris-HCl o MOPS) fueron tratadas con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1% (v/v).

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

II-8.2 Electroforesis de ARN.

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).

II-8.2.1 Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes.

En los geles para electroforesis de ARN se añade 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 *Millenium* (Ambion).

- Lavar todo el material de electroforesis de forma secuencial con 0,1 % de SDS (dodecilsulfato sódico) en agua, agua mili-Q, H₂O₂ y etanol absoluto.

- Por cada 100 ml de volumen de gel mezclar: 0,9 g de agarosa, 20 ml de MOPS (5x) ⁽¹⁾ y 63 ml de agua destilada. Calentar la mezcla hasta que la agarosa esté completamente disuelta.

- Dejar enfriar hasta 50-55°C y añadir 17 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 este y los siguientes pasos en campana de extracción.

- Colocar el gel dentro de la cubeta de electroforesis con tampón MOPS (1x) sin que llegue a cubrir completamente el gel.

- Añadir 10 μl de MOPS (1x) a cada pocillo y dispensar las muestras en los pocillos.

- 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. Cambiar el tampón de migración a mitad de la carrera.



- Una vez que las muestras han migrado lo suficiente, se puede observar el gel directamente en un transiluminador con luz UV.

⁽¹⁾ MOPS (5x): 0,2 M ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS); 0,05 M acetato sódico; 0,01 M EDTA; ajustar pH a 7 con NaOH 1 N; completar con agua tratada con DEPC hasta 1 litro o bien añadir DEPC, al 0,1 % agitar vigorosamente varias veces y esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Las muestras antes de ser cargadas se calientan a 65°C durante 15 minutos para desnaturalizarlas e inmediatamente se enfrían en hielo durante 5 minutos. Dichas muestras se preparan como se describe a continuación:

10–20 µg de ARN ó 3–6 µl de marcador de ARN
 5 µl de formamida
 2 µl de formaldehído al 37 %
 1 µl de MOPS (10x)
 1 µl de colorante DYE 10x⁽¹⁾
 1 µl de una dilución 1/10 de BrEt (10 mg/ml)
 H₂O–DEPC hasta 20 µl.

⁽¹⁾Colorante DYE (10x): 50 % Glicerol; 0,25 % (p/v) azul de bromofenol; 0,25 % (p/v) xilen-cianol; 1 mM EDTA; en agua tratada con DEPC.

II-8.3 Retrotranscripción de ARN.

II-8.3.1 Retrotranscripción de ARN y amplificación por PCR (RT-PCR).

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

- Se mezclan en un microtubo libre de ARNasas los componentes descritos en la **Tabla II-6**:

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

Tabla II-6: componentes de la reacción de RT-PCR.

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

II-8.3.2 Retrotranscripción de ARN.

Cuando solo nos interesa retrotranscribir el ARN y no nos interesa, al menos momentáneamente, realizar la PCR (por ejemplo en los ensayos de RT-PCR semicuantitativa, en los que en un primer paso obtenemos el cDNA para después realizar la PCR sobre el gen diana y el gel control) se puede llevar a cabo la retrotranscripción del ARN solamente, utilizando para ello el enzima retrotranscriptasa SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen).

- Se mezclan en un microtubo libre de ARNasas:

dNTPs Mix (10mM c/u)	1 µl
Oligo A (10 µM)	1 µl
10 pg-5 µg ARN molde	x µl
Agua DEPC	c.s.p. 12 µl

Tabla II.7a: componentes de la reacción de RT.

- Calentar a 65°C 5 minutos y enfriar en hielo rápidamente.

-Agregar a cada microtubo los componentes indicados en la **Tabla II.7b:**

5X <i>First-Strand Buffer</i>	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
Inhibidor ARNasas ⁽¹⁾	1 µl
SuperScript™ II TR	200 U

Tabla II.7b: componentes de la reacción de RT.

- Colocar las muestras y programar el termociclador a 42-50°C durante 60 minutos. Para detener la reacción calentar a 70°C durante 15 minutos. Posteriormente se puede amplificar el producto de esta reacción, mediante PCR.

(1) En nuestro caso hemos utilizado el inhibidor de ARNasas RNasin® Plus (Promega).

II-9. Manipulación de genotecas en vectores fágicos.

Los procedimientos que a continuación se detallan fueron empleados en la construcción y el rastreo de bibliotecas genómicas de ADN. En concreto de una genoteca genómica construida en un vector fágico comercial, el vector λ -DASH II *Bam*HI de la marca comercial Stratagene en el que clonamos el ADN de *T. longibrachiatum*.

II-9.1 Construcción de genotecas.

La elección de λ -DASH como vector para la construcción de una librería genómica se basó entre otras razones en las siguientes características: (I). Su capacidad para aceptar fragmentos de ADN exógeno de gran tamaño (20–22 Kb); (II). La posibilidad de ligar digestiones parciales de ADN exógeno *Sau*3AI en el sitio *Bam*HI y (III). La facilidad con que se almacenan los fagos recombinantes funcionales durante años a 4°C en tampón SM-cloroformo sin necesidad de amplificar la genoteca. A continuación se describe el proceso para construir dicha librería genómica.

Paso 1: Obtención de ADN genómico de *T. longibrachiatum* y preparación de los fragmentos de dicho ADN (15–22 Kb).

- Obtener ADN genómico de *T. longibrachiatum* mediante el método descrito en el apartado II-7.1.4 de Materiales y Métodos.

- Verificar su integridad y calidad en un gel de agarosa al 0,5%.

- Preparar una digestión parcial con la endonucleasa *Sau*3AI utilizando los siguientes componentes:

ADN	10 μ g
Tampón de digestión	15 μ l
Seroalbúmina bovina (10 mg/ml)	15 μ l
<i>Sau</i> 3AI	1,5 μ l
Agua mili-Q	a 150 μ l

- Calentar la mezcla a 37°C antes de añadir el enzima. Una vez añadido recoger alícuotas de 20 μ l cada 15 segundos hasta llegar a los 2 minutos. Frenar la reacción en cada alícuota mediante la adición de EDTA frío (concentración final 20mM)

- Analizar las alícuotas en un gel de agarosa al 0,5 %.

- Elegir los tiempos de digestión que produzcan tamaños de fragmentos de entre 15 – 22 Kb.

- Escalar a un mayor volumen la digestión parcial para el tiempo de digestión elegido.

Paso 2: Separación de los fragmentos obtenidos a partir de la digestión parcial *Sau3AI* mediante un gradiente de sacarosa.

- Preparar dos tubos de ultracentrifuga de 5 ml (Beckman) y añadir 2,5 ml de una solución de sacarosa al 40% (p/v) y 2,5 ml de sacarosa al 10% (p/v).
- Tapar con Parafilm® y dejar reposar los tubos en horizontal durante al menos 5 horas para que se establezca un gradiente de sacarosa dentro de los tubos.
- Añadir suavemente con micropipeta el ADN con cuidado de no alterar el gradiente (como máximo en 200 µl).
- Pesar y equilibrar los tubos. Centrifugar durante 18 horas a 4°C y 30.000 rpm.
- Con ayuda de un capilar (que introducimos hasta el fondo del tubo) y una bomba peristáltica recoger fracciones del gradiente de 200 µl cada una utilizando un flujo de 0,25 ml/min (el más bajo posible).
- Correr una alícuota de cada fracción en un gel de agarosa al 0,5%.
- Precipitar el ADN de las fracciones de interés según el protocolo descrito en el apartado II-7.1.1.
- Resuspender el ADN en 15 µl TE o agua milliQ.

Paso 3: Ligación de los fragmentos de ADN genómico digeridos con *Sau3AI* a los brazos del vector λ-DASH digeridos con *BamHI*.

Se realiza la ligación siguiendo el protocolo descrito en el apartado II-7.2.4.2.

Paso 4: Encapsidación de los ADNs recombinantes.

La encapsidación del ADN fágico recombinante originado tras la ligación se realizó con los extractos de empaquetamiento *in vitro* (Gigapack® III Gold, Stratagene®) siguiendo el protocolo de empaquetamiento recomendado por el fabricante. En este protocolo se indica que la eficiencia de la reacción de empaquetamiento depende de factores como la cantidad de ADN recombinante (la eficiencia más alta se obtiene con alrededor de 0,5 µg de ADN), el volumen y tipo de tampón en el que se añade el ADN (no superior a 10 µl y en tampón TE son las condiciones óptimas), el tiempo de reacción (nunca debe ser inferior a las 2 horas) y el tamaño del ADN a empaquetar, siendo el óptimo entre 45-48 Kb (desviaciones de hasta el 20% de tamaño son toleradas pero a costa de un descenso de la eficiencia).

Paso 5: Infección en medio sólido de *Escherichia coli* XL-1 Blue MRA P2.

Los procedimientos que a continuación se detallan fueron empleados en la construcción de la genoteca genómica de *T. longibrachiatum* y en el rastreo de la misma. El protocolo seguido fue el siguiente:

- A) Preparación de las células de *Escherichia coli* XL-1 Blue MRA P2.**
- Sembrar la cepa de *Escherichia coli* XL-1 Blue MRA P2 en medio NZY sólido e incubar 12-18 horas a 37°C



- Picar una colonia aislada e inocular 100 ml de medio NZY con maltosa ⁽¹⁾ (al 0,2%) y MgSO₄ (a una concentración final de 10 mM). Incubar a 37°C con agitación orbital hasta obtener una densidad óptica a 600nm de 0,5 – 0,8.
- Centrifugar los cultivos divididos en alícuotas de 10 ml por tubo a 3500 rpm, 5 minutos y a 4°C. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado de células de cada tubo en 1 ml de MgSO₄ 10 mM.
- Almacenar a 4°C hasta su uso (se pueden utilizar durante 10 días)

⁽¹⁾ La maltosa es necesaria debido a que la proteína que actúa como receptora del bacteriófago está codificada por el gen *lamB*, que se encuentra integrado en el operón que contiene los genes para el metabolismo de la maltosa.

- B) Infección en medio sólido**
- Mezclar en un tubo de 10 ml, 200 μ l de la suspensión de células con 10 – 100 μ l de la solución de bacteriófagos ya encapsidados.
 - Incubar a 37°C durante 30 minutos agitando suavemente cada 10 minutos.
 - Preparar placas con una base de 25 ml de NZY al 2% (p/v) de agar.
 - Añadir al tubo 3 ml de NZY 0,7% (p/v) de agar fundido y mantenido a 48°C. Mezclar suavemente y verter sobre la superficie de la placa base anteriormente preparada tratando de extender una película de medio por toda la superficie.
 - Incubar a 37°C hasta la aparición de los halos de lisis (8-10 horas). Almacenar las placas a 4°C.

Paso 6: Titulación de la genoteca.

Para titular la genoteca basta con contar los halos de lisis aparecidos en las infecciones realizadas y aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{Título} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ halos} \times \text{factor dilución}}{\text{Volumen plaqueado (ml)}}$$

(Ufp/ml)

Para calcular el número de fagos recombinantes necesarios para construir una genoteca esté completa se aplicó la ecuación descrita por Clarke y Carbon (1976):

$$N = \ln(1-p) / \ln(1-f)$$

Donde “p” es la probabilidad de que un gen determinado se encuentre representado en algún clon; “f” es el cociente entre el tamaño medio de los insertos y el tamaño real del genoma del organismo y “N” es el número de fagos recombinantes necesarios. Asumiendo que el tamaño del genoma de *T. longibrachiatum* es de 33 Mb (Mäntylä *et al.*, 1992) y que el promedio de tamaño de los fragmentos encapsidados fuera de alrededor de 15 Kb (a pesar de que se seleccionaron fragmentos de ADN de entre 15 y 23 Kb), con el número de fagos obtenidos se consiguió una genoteca completa de *T. longibrachiatum* con una probabilidad mayor del 99%.

II-9.2 Amplificación de bacteriófagos.

II-9.2.1 Amplificación de genotecas.

El protocolo seguido para la amplificación de la genoteca de *T. longibrachiatum* fue el recomendado por el fabricante del *kit*. Como breve resumen:

- Realizar una infección en medio sólido (ver apartado 9.1 Paso 5) con una cantidad de bacteriófagos equivalente a 5 veces "N" utilizando placas de 15 cm de diámetro.
- Tras la incubación de la placa toda la noche, adicionar 8 ml de tampón SM y mantener en agitación suave durante 6-8 horas a 4°C
- Recolectar el tampón SM y titular la preparación de fagos.

II-9.2.2 Amplificación de un bacteriófago recombinante.

El protocolo seguido para la amplificación de un bacteriófago recombinante fue el siguiente:

- Recoger con una punta de pipeta Pasteur estéril la placa de lisis seleccionada e introducirla en un microtubo de 1,5 ml con 100 μ l de tampón SM y 2 μ l de cloroformo.
- Agitar en un Thermomixer (eppendorf) a temperatura ambiente durante 10-15 min.
- Seguidamente incubar a 4°C durante 2-4 horas para facilitar la difusión de los bacteriófagos.
- Infectar en medio sólido (ver apartado 9.1 Paso 5) con 10 μ l de la suspensión en placas de Petri de 15 cm de diámetro.
- En las placas con halos de lisis confluyentes añadir 5 ml de tampón SM y dejar difundir los bacteriófagos durante toda la noche en agitación suave a 4°C.
- Recoger el tampón SM y añadir un 2% (v/v) de cloroformo. Titular y conservar a 4°C hasta su utilización.

II-9.3 Rastreo de genotecas construidas en vectores fágicos.

Generalmente el procedimiento para rastrear una genoteca construida en vectores fágicos consiste en realizar hibridaciones con una sonda específica con la finalidad de aislar un determinado clon del cual se conoce parte de su secuencia. A pesar de ser el procedimiento utilizado habitualmente esto no implica que sea la metodología más simple o efectiva. En nuestro caso decidimos utilizar el método descrito por Vaiman (2002) con algunas modificaciones. El protocolo seguido fue el siguiente:

- Realizar una infección en medio sólido (ver apartado II-9.1 Paso 5) con una cantidad de bacteriófagos equivalente a 1×10^6 ufp (se realiza en aproximadamente unas 30 placas de Petri de 90 mm de diámetro).
- Añadir a cada placa 2 ml de $MgSO_4$ 10 mM y agitar suavemente 10 minutos.
- Pasar el $MgSO_4$ con los bacteriófagos a un microtubo de 2 ml y guardar las placas a 4 °C.
- Recoger 100 μ l de cada tubo y pasarlos a un microtubo limpio al que añadimos una disolución de proteinasa K en agua (concentración final de 1 mg/ml) incubando a 65°C durante 1 hora.
- Detener el tratamiento calentando 10 minutos a 100°C.
- Recoger alícuotas de 1-5 μ l para ser utilizadas en reacciones de amplificación por PCR (en un volumen final de 20 μ l) según el protocolo de PCR descrito en el apartado II-7.2.5 de Materiales y Métodos. Utilizar dos oligonucleótidos que amplifiquen un único fragmento de ADN de un tamaño conocido y específico correspondiente al gen que estamos rastreando.
- Cargar las reacciones de PCR en un gel e identificar aquellas placas en las que hubo una amplificación positiva.
- Una vez identificadas las placas positivas, se divide el agar de las mismas e tacos que quepan en microtubos de 2 ml (aproximadamente 50 tacos).
- Colocar los tacos en tubos y añadir 1 ml de $MgSO_4$ 10 mM.
- Incubar a 37°C durante 30 minutos con agitación moderada.
- Recoger 100 μ l de cada tubo y pasarlos a un microtubo limpio al que añadimos una disolución de proteinasa K en agua (concentración final de 1 mg/ml) incubando a 65°C durante 1 hora.
- Detener el tratamiento calentando 10 minutos a 100°C.
- Recoger alícuotas de 1-5 μ l para ser utilizadas en reacciones de amplificación por PCR (en un volumen final de 20 μ l) según el protocolo de PCR descrito en el apartado II-7.2.5. de Materiales y Métodos.
- Cargar las reacciones de PCR en un gel e identificar los tacos en los que hubo una amplificación positiva.
- Una vez identificados los tacos positivos, se recogen 10 μ l del sobrenadante presente en los tubos con los tacos y se realizan 6 diluciones seriadas 1:10 con $MgSO_4$ 10 mM en un volumen final de 100 μ l.
- Mezclar cada dilución con un volumen de células de *Escherichia coli* XL-1 Blue MRA P2 (preparadas según se indica en el apartado II-9.1 Paso 5) e incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Añadir 3 ml de medio LB al 0,7% (p/v) de agar fundido y mantenido a 48°C, mezclar y plaquar sobre placas base de NZY con maltosa (0,2%) y $MgSO_4$ (10 mM).
- Incubar toda la noche a 37°C.
- Añadir a cada placa 2 ml de $MgSO_4$ 10 mM y agitar suavemente 10 minutos.
- Pasar el $MgSO_4$ con los bacteriófagos a un microtubo de 2 ml y guardar las placas a 4°C.
- Recoger 100 μ l de cada tubo y pasarlos a un microtubo limpio al que añadimos una disolución de proteinasa K en agua (concentración final de 1 mg/ml) incubando a 65°C durante 1 hora.
- Detener el tratamiento calentando 10 minutos a 100°C.
- Recoger alícuotas de 1-5 μ l para ser utilizadas en reacciones de amplificación por PCR (en un volumen final de 20 μ l) según el protocolo de PCR descrito en el apartado 7.2.5. de Materiales y Métodos.
- Cargar las reacciones de PCR en un gel e identificar aquellas placas en las que hubo una amplificación positiva.
- Una vez identificadas las placas positivas de la mayor dilución, se divide el agar de las mismas en tacos y se repite el procedimiento descrito anteriormente.
- Después de tres rondas de diluciones, la menor dilución positiva contiene aproximadamente 50 – 100 clones.



- Recoger con una punta de pipeta Pasteur estéril placas de lisis individuales e introducirlas en microtubos (una placa por tubo) con 100 μ l de $MgSO_4$
- Agitar en un Thermomixer a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.
- Incubar a 4°C durante 2-4 horas para facilitar la difusión de los bacteriófagos.
- Realizar infecciones en medio sólido en placas de Petri de 9 cm de diámetro (ver apartado 9.1 Paso 5) con 10 μ l de la suspensión.
- Añadir a cada placa 2 ml de $MgSO_4$ 10 mM y agitar suavemente 10 minutos.
- Transferir la solución de $MgSO_4$ con los bacteriófagos a un microtubo de 2 ml y guardar las placas a 4 °C.
- Recoger 100 μ l de cada tubo y transferir a un microtubo limpio al que añadimos una disolución de proteinasa K en agua (concentración final de 1 mg/ml) incubando a 65°C durante 1 hora.
- Detener el tratamiento calentando 10 minutos a 100°C.
- Recoger alícuotas de 1-5 μ l para ser utilizadas en reacciones de amplificación por PCR (en un volumen final de 20 μ l) según el protocolo de PCR descrito en el apartado II-7.2.5 de Materiales y Métodos.
- Identificar las placas positivas y amplificar los clones seleccionados realizando infecciones en medio líquido según se explica en el siguiente apartado.

II-9.4 Infección en medio líquido y extracción de ADN de fagos recombinantes.

Este tipo de infección se emplea fundamentalmente para la amplificación de clones positivos identificados en un rastreo y extracción de ADN de los mismos. El procedimiento seguido fue el descrito por Malik *et al.* (1990).

- Infectar 1×10^9 células de *Escherichia coli*/LE392 con 1×10^7 ufp e incubar en dos etapas, una a temperatura ambiente durante 10 minutos y la siguiente a 37°C durante 30 minutos (agitando suavemente cada 10 minutos).
- Inocular la infección en un matraz de 500 ml con 100 ml de medio NZY con maltosa (0,2%) y $MgSO_4$ 10 mM. Incubar a 37°C y 250 rpm en un agitador orbital durante 4 – 6 horas hasta observar un aclaramiento de la turbidez del medio y la formación de unos hilillos indicativos de que la lisis celular se ha producido. Añadir 500 μ l de cloroformo y dejar agitando 15 minutos más.
- Transferir el cultivo a un tubo de centrifuga tipo GSA y cetrifugar a 5.000 rpm durante 20 minutos para sedimentar los restos celulares.
- Recolectar el sobrenadante en un nuevo GSA (con cuidado de no arrastrar nada del precipitado) y añadir 100 μ l de ADNasa I⁽¹⁾ y de ARNasa A⁽¹⁾. Incubar durante 1 hora a 37°C.
- Adicionar 10 g de polietilenglicol (PEG) 8000 y 4 g de NaCl, calentar a 65°C hasta que se disuelva en PEG e incubar a 4°C toda la noche.
- Centrifugar a 8.000 rpm y 4°C durante 40 minutos para precipitar los bacteriófagos. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 5,4 ml de solución L3⁽²⁾.
- Añadir 100 μ l de SDS 20% (p/v) y 100 μ l de EDTA (pH 8) e incubar a 68°C durante 20 minutos.
- Limpiar y precipitar la solución mediante el proceso descrito en el apartado 7.1.1 de Materiales y Métodos.
- Resuspender en 50 μ l de TE y cargar un gel de agarosa al 0,5% para comprobar la integridad del ADN extraído.

⁽¹⁾ Solución preparada en agua destilada a una concentración de 10 mg/ml.

⁽²⁾ Solución L3: 25mM EDTA; 0,1 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl pH 7,5.

II-10. Transformación genética de microorganismos.

II-10.1 Transformación de *Escherichia coli*.

II-10.1.1 Inducción del estado de competencia de células de *Escherichia coli*.

Para introducir ADN en *Escherichia coli* por medio del método de transformación genética, se requiere una “disponibilidad” de la bacteria que facilite el paso de las moléculas de ADN a través de las barreras externas de la célula. A este estado se le denomina competencia y las células que lo presentan se denominan células competentes. La obtención de este estado de competencia para células de *Escherichia coli* fue realizada basándose en el método descrito por Inoue y colaboradores (1990). Dicho protocolo está basado en el método de cloruro de rubidio (Hanahan, 1983) con el que se consigue una alta eficiencia de transformación (hasta 5×10^8 transformantes/ μg de ADN), aunque el descrito por Inoue (Inoue *et al.*, 1990) es más reproducible en cuanto a la alta eficiencia conseguida. Con ambos se consigue mayor eficiencia de transformación que con el método tradicional que emplea TSS (Chung *et al.*, 1989).

En este protocolo son importantes: la temperatura de crecimiento del cultivo (18°C), trabajar durante todo el proceso de lavados e inducción de la competencia a 4°C y agitar las células de forma suave, no utilizando el vórtex.

- Sembrar *Escherichia coli* en medio LB sólido (LA) para obtener un cultivo fresco.
- Inocular una colonia en 1 ml de medio SOC e incubarlo toda la noche a 37°C para ser usado como preinóculo.
- Inocular 50 ml de medio SOC con un 1 % de preinóculo en un matraz de 500 ml. Incubar en agitación (250 rpm) a 18°C .
- Cuando el cultivo alcance una D.O.600 de 0,6 (50-55 h), colocar el matraz en hielo 10 minutos. A partir de este paso trabajar en cámara fría ($\pm 4^\circ\text{C}$)
- Transferir el cultivo a un tubo de centrifuga tipo GSA y centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos y a 4°C .
- Retirar los restos de medio y resuspender en 80 ml de tampón TB⁽¹⁾ frío. No usar vórtex. Dejar en hielo 10 minutos.
- Centrifugar a 3.000 rpm en tubos de tipo GSA durante 10 minutos.
- Retirar el sobrenadante y resuspender en 20 ml de tampón TB frío agitando manualmente. Añadir 1,4 ml de DMSO (dimetilsulfóxido) (concentración final 7 %). Agitar suavemente y dejar en hielo 10 minutos.
- En cabina de flujo laminar, distribuir 100 μl de células en microtubos de 1,5 ml. Inmediatamente congelar en nitrógeno líquido. Almacenar a -80°C .
- Con 10-20 pg de un plásmido previamente cuantificado, comprobar la eficiencia de transformación expresándola en transformantes/ μg de ADN.

⁽¹⁾ Tampón TB: Para 1 litro: 10 mM PIPES (3,025 g), 15 mM CaCl_2 (1,65 g), 250 mM KCl (18,65 g). Ir añadiendo KOH 1 M para que se disuelvan los componentes y a la par ajustar el pH a 6,7. Después, añadir 10,9 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Esterilizar por filtración y conservar a 4°C .

II-10.1.2 Proceso de transformación de *Escherichia coli*.

El método de transformación de *E. coli* que utilizamos es el descrito por Hanahan (1983). El protocolo de transformación se detalla a continuación.

- Descongelar las células competentes en un baño de hielo.
- Mezclar 100 μl de células con 1 - 10 μl de ADN. Incubar 30 minutos en hielo.
- Someter a un choque térmico la mezcla incubando a 42°C durante 90 segundos e incubar 2 minutos en hielo.
- Añadir 400 μl de medio de expresión (LB) e incubar a 37°C durante 60 minutos y en agitación a 250 rpm.
- Sembrar en medio sólido selectivo para clones transformados.

II-10.2 Transformación de *T. longibrachiatum*.

Las aplicaciones de las técnicas de transformación de hongos son numerosas ya que son imprescindibles para la introducción de genes de interés, para la interrupción de genes y posterior análisis de su función o para obtener cepas biotecnológicamente más relevantes (por ejemplo cepas auxotróficas).

II-10.2.1 Obtención de protoplastos de *T. longibrachiatum*.

El método más comúnmente utilizado en la transformación de hongos filamentosos está basado en el desarrollado previamente para levaduras, que requiere la formación de protoplastos mediante tratamiento con mezclas de enzimas hidrolíticas y donde la entrada de ADN se consigue con un tratamiento con polietilenglicol en presencia de iones Ca^{2+} , aunque también se han utilizado sales de litio (Fincham, 1989).

- Sembrar 5 placas de medio CM cubiertas por un celofán estéril con 5×10^6 esporas.
- Incubar a 30°C durante 18 horas.
- Retirar los discos de celofán y sumergirlos en una placa de Petri que contenga 3 ml de solución A⁽¹⁾ con 5 mg / ml de enzimas líticas (Sigma) por disco.
- Incubar a 30°C durante 90 minutos. Añadir 200 μl de β -glucuronidasa (Sigma) e incubar 30 minutos más. Agitar suavemente cada 10 minutos durante ambas incubaciones.
- Pasado este tiempo comprobar la formación de protoplastos al microscopio.
- Lavar cada disco de celofán con 2 ml de solución A.
- Filtrar los protoplastos formados a través de un filtro estéril de nylon de 30 μm de poro. Centrifugar la solución resultante (25 ml aprox.) durante 10 min. a 300 x g, 4°C.
- Resuspender el precipitado en 4 ml de solución B⁽²⁾ y centrifugar como en el paso anterior.
- Resuspender finalmente en solución B a una concentración de 5×10^8 protoplastos / ml.

⁽¹⁾ Solución A: 0,1 M KH_2PO_4 ; sorbitol 1,2 M; ajustar el pH a 5,6

⁽²⁾ Solución B: TrisHCl 10 mM; CaCl_2 50 mM; sorbitol 1M; ajustar el pH a 7,5

II-10.2.2 Transformación de protoplastos.

Cuando la transformación ocurre con una muy baja frecuencia se puede recurrir a la co-transformación (cuando el marcador de selección está en un plásmido distinto al del gen de interés). Tiene lugar con una alta frecuencia en muchos hongos y a menudo es el método elegido. Cuando es utilizada una alta relación de plásmido sin selección frente a plásmido seleccionable, la frecuencia de co-transformación es a menudo del 50% e incluso de hasta el 95% en algunos casos (Goosen *et al.*, 1987)

La introducción de DNA en *T. longibrachiatum* se realizó mediante una co-transformación según el método utilizado por Sánchez-Torres *et al.* (1994), basado a su vez en el descrito por Penttillä *et al.* (1987), aunque también se probaron y se tuvieron en cuenta los descritos por Cantoral *et al.* (1987) y Díez *et al.* (1987).

- Para cada transformación a realizar utilizamos alícuotas de 200 μ l de protoplastos preparados como se ha descrito en el apartado anterior.
- Añadir 50 μ l de solución PEG¹⁴ y un volumen nunca superior a 10 μ l (10 μ g) de ADN transformante.
- Incubar 20 minutos en hielo. Añadir 2 ml de solución PEG⁽¹⁾ e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Finalmente, diluir la suspensión con 4 ml de solución B y plaquear alícuotas de 1 ml mezcladas con 4 ml de OSCM a 48°C y plaquear.
- Incubar a 30°C 3 ó 4 días.

⁽¹⁾Solución PEG: 25% PEG 8000 (p/v); TrisHCl 10 mM; CaCl₂ 50 mM, ajustar el pH a 7,5

La selección de transformantes se realiza comprobando su capacidad para crecer en medio sólido conteniendo éste un agente de selección. Se realizó en medio CM al que se le añadió un estabilizador osmótico que evite que los protoplastos se colapsen. Pueden emplearse varios compuestos como sacarosa, NaCl, KCl, glicerol o sorbitol, siendo este último el utilizado finalmente. Los agentes de selección que utilizamos fueron:

- **Higromicina**, a una concentración final de 50 μ g/ml cuando utilizamos el plásmido pRLMex₃₀, que porta el gen *hph* que codifica para la higromicina B fosfotransferasa de *Escherichia coli* (Punt *et al.*, 1987) y que confiere resistencia a dicho antibiótico.

- **Geneticina**, a una concentración final 100 μ g/ml cuando utilizamos el plásmido pALGEN3 que contiene el gen *nptII* de *E. coli* (Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2004) y que confiere resistencia a dicho antibiótico.

- **Fleomicina**, a una concentración final de 150 μ g/ml cuando utilizamos el plásmido p43gdh que contiene la región codificante del gen *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (Cardoza *et al.*, 1998) que le confiere resistencia a este antibiótico.

II-11. Métodos generales de análisis de proteínas y ensayos enzimáticos.

II-11.1 Obtención de extractos proteicos libres de células de *T. longibrachiatum*.

Para obtener extractos proteicos libres de células de utilizamos el siguiente protocolo:

- Inocular 100 ml de medio caldo extracto de malta (ME) con esporas recién aisladas de una placa de medio RB. Incubar en agitación a 28°C hasta obtener un buen crecimiento. El medio se puede suplementar con compuestos químicos para inducir la expresión de genes de interés. En el caso de la purificación de la CPOMT añadimos acetato de amonio 12 mM y el inductor 2,4,6-TCP (10 µg / ml).

- Recoger el micelio a través de un filtro de fibra de vidrio con ayuda de una bomba de vacío. Secar el micelio con papel secante y congelar a -20°C hasta el momento de su utilización.

- Resuspender el micelio en tampón de rotura⁽¹⁾ aproximadamente 0,5 g/ml).

- Romper el micelio con un sonicador MSE ultrasonic sometiéndolo a 7 pulsos de ultrasonidos de 100 vatios de potencia y no superiores a 5 segundos con intervalos de 10 minutos entre los pulsos para evitar el calentamiento de la muestra. La temperatura nunca debe ser superior a los 10° C. Realizar el proceso en un baño de hielo y controlar la ruptura del micelio al microscopio.

- Precipitar los restos celulares centrifugando el lisado en tubos tipo SS34 durante 20 minutos a 12.000 rpm y 4°C.

- Recoger el sobrenadante con pipeta.

⁽¹⁾Tampón de rotura: Tris-HCl 50 mM (pH 8,2), MgCl₂ 5mM, PMSF 1mM, DTT 1mM, NaCl 100mM y glicerol 20% (v/v).

II-11.2 Cuantificación de proteínas.

Se utilizó el kit Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad) basado en el método de Bradford (Bradford *et al.*, 1976). Se trata de un simple ensayo colorimétrico para cuantificar la concentración de proteína total. Se basa en el cambio de absorción de 465 a 595 nm que experimenta el colorante azul Brillante de Coomassie G-250 al reaccionar con proteínas uniéndose a aminoácidos básicos y residuos de aminoácidos aromáticos. Cada ensayo se realiza por duplicado, llevando con agua a un volumen final de 800 µl y añadiendo 200 µl de reactivo. Se mide la absorbancia de la muestra con un espectrofotómetro. La concentración de proteínas se determina por comparación con una recta patrón realizada con diferentes cantidades conocidas de albúmina sérica bovina (Sigma).

II-11.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes.

Esta técnica conocida como SDS-PAGE permite separar mezclas complejas de proteínas sometiéndolas a desnaturización (pérdida de su estructura tridimensional) de tal modo que la migración será mayor o menor en relación con su tamaño. El agente

desnaturalizante utilizado es el dodecilsulfato sódico o SDS, detergente iónico que disocia las proteínas oligoméricas en sus monómeros y rompe los puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre los péptidos.

Los geles de poliacrilamida se elaboraron según la técnica descrita por Laemmli (1970). Los geles constan de dos fases: la superior (o gel **empaquetador**) sirve para concentrar las muestras en el límite de separación de ambas partes, permitiendo la entrada homogénea de las proteínas de la muestra en la siguiente fase; la inferior (o gel **separador**) cumple la función propia de la electroforesis, esto es, la separación de proteínas según su peso molecular.

A)

Componentes	Concentración final de poliacrilamida		
	7,5 %	12 %	15 %
Acrilamida/bis-acrilamida 30 %	2,5 ml	4 ml	5 ml
Tris-HCl 1'5 M, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10 % (p/v)	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Persulfato amónico 10 % (p/v)	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Agua milliQ	4,85 ml	3,35 ml	2,35 ml

B)

Agua milliQ	3,05 ml
Acrilamida:Bisacrilamida (30%:0,8%)	0,65 ml
Tris-HCl 1M (pH8,8)	1,25 ml
SDS 10%	50 μ l
Persulfato amónico (10%)	90 μ l
TEMED	60 μ l

Tabla II-6: Composición de los geles separador (A) y empaquetador (B).

Los geles se realizaron en el sistema *Miniprotean II*[®] (BioRad) del siguiente modo:

- Montar los cristales en el molde suministrado por el fabricante.
- Añadir los componentes del gel en un tubo de 10 ml, procurando añadir en último lugar el persulfato amónico y el TEMED, ya que estos son los catalizadores de la polimerización. Mezclar invirtiendo el tubo.
- Verter el gel separador entre los cristales y cubrir con isopropanol para igualar el frente. Dejar polimerizar a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos.
- Quitar el isopropanol, lavar con agua y verter el gel empaquetador, colocando el peine adecuado para la formación de los pocillos que nos permitirán cargar las muestras.
- Desnaturalizar las muestras hirviéndolas 5 minutos con 2 volúmenes de tampón de muestra desnaturalizante⁽¹⁾.
- Como marcador de peso molecular utilizar 5 μ l de marcador comercial "Precision Protein Standards" (BioRad).
- Colocar los geles en la cámara de electroforesis y llenarla con tampón de electroforesis⁽²⁾. Cargar las muestras en los pocillos.
- Realizar la electroforesis a corriente continua de 100-150 V hasta que la banda del colorante del tampón de muestra desnaturalizante comience a salirse del gel.



- Retirar los geles de la cubeta y teñir en agitación durante unos 30 minutos en solución de teñido⁽³⁾.

- Desteñir los geles en solución de desteñido⁽⁴⁾, agitando entre 1 y 3 horas. Introduciendo un trozo de papel higiénico en el recipiente de desteñido se incrementa la velocidad del proceso.

⁽¹⁾Tampón de muestra desnaturante: 1,2 ml Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 2ml SDS 10%, 1 ml glicerol, 500 μ l de Azul de bromofenol al 0,5%, y 4,85 ml de agua.

⁽²⁾Tampón de electroforesis: 3 g de Tris-base, 14 g de glicina y 10 ml de SDS 10% por litro de agua.

⁽³⁾Solución de teñido: 450 ml de agua milliQ, 450 ml de metanol, 2,5 g de Azul Brillante de Coomassie y 100 ml de ácido acético glacial.

⁽⁴⁾Solución de desteñido: ácido acético glacial 7% (v/v), metanol 20% (v/v) en agua.

II-11.4 Ensayo enzimático de la actividad 2,4,6-TCP metiltransferasa.

El ensayo utilizado para medir la reacción de metilación fue una modificación del método descrito por Álvarez-Rodríguez *et al.*, (2002) que a su vez es una optimización para este organismo del descrito anteriormente por Neilson *et al.* (1988). Las reacciones, se realizan con las cantidades expresadas en la **Tabla II-7** en un volumen total de 500 μ l.

2,4,6-TCP	0,25 mM
SAM	1 mM
MgCl ₂	1 mM
DTT	1mM
PMSF	0,5 mM
Glicerol	10% (p/v)
Tris-HCl (pH 8,2)	50 mM
Muestra a ensayar	Normalmente 50 μ l

Tabla II-7: Componentes de la reacción para el ensayo enzimático para la CPOMT.

Las reacciones se incuban a 28°C durante 12 horas. Para detener la reacción usamos 25 μ l de HCl 6N. A continuación la fase acuosa se extrae dos veces con un volumen de acetato de etilo. Finalmente se evapora la fase orgánica con ayuda de un speed-vac (Savant). El residuo se resuspende en 100 μ l de metanol y se analiza por HPLC.

II-11.5 Análisis por HPLC de la bioconversión de 2,4,6-TCP a 2,4,6-TCA en fracciones proteicas.

La conversión de 2,4,6-TCP a 2,4,6-TCA por O-metilación (catalizada por fracciones proteicas, así como los ensayos in vivo realizados en medio líquido) se analizó por HPLC. Para ello se utilizó una columna LiChrospher 100 RP18 5 μ m (Teknokroma) de 4 x 250 mm. La fase móvil que se usó fue 90% metanol-10% tetrahidrofurano : 99,95% agua-0,05% ácido trifluoroacético (78:22) a un flujo de 1,2 ml / min y la duración de la carrera fue de 28 min. Las sustancias eluidas fueron detectadas a 230 nm. Para

determinar con exactitud los niveles de 2,4,6-TCP y 2,4,6-TCA se empleó como estándar interno 2,3,4,6-TeCA a una concentración conocida. La cromatografía se realizó como se indica a continuación en la **Tabla II-8**.

Tiempo (minutos)	Flujo (ml/min)	Fase móvil A	Fase móvil B
0-17	1,2	22%	78%
18-23	1,2	0%	100%
24-28	1,2	22%	78%

Tabla II-8: Desarrollo de la cromatografía. La fase móvil A es agua milliQ con TFA al 0,05% mientras que la fase móvil B es metanol con un 10% de THF.

La separación de los productos se produce en régimen isocrático en los primeros 17 minutos de la primera etapa. Los tiempos de retención aproximados son de 5,3 minutos para el 2,4,6-TCP, 9,2 minutos para el 2,4,6-TCA y 12,8 minutos para el 2,3,4,5-TeCA. En la segunda etapa se realiza un lavado de la columna durante 5 minutos con 100% de fase móvil B y, finalmente la última etapa consiste en un equilibrado de la columna de 4 minutos para la siguiente carrera.

II-11.6 Detección del enzima 2,4,6-TCP metiltransferasa por marcaje radioactivo.

Esta técnica se utilizó para tratar de identificar la metiltransferasa en mezclas complejas de proteínas. Asimismo también se utilizó para, una vez purificada la proteína, verificar que la misma tenía actividad metiltransferasa. El marcaje consiste en la unión covalente de un sustrato marcado radiactivamente al enzima mediante tratamiento con luz ultravioleta. El sustrato elegido fue la S-adenosil-L-[metil³H]metionina (63 Ci/mmol) de Amersham Pharmacia Biotech.

- Añadir a 25 μ l de fracción proteica (aproximadamente 20-100 μ g de proteína total, dependiendo de la etapa del proceso de purificación) 3,5 μ l de tampón Tris-HCl 1M pH 8.0 y 10 μ l de SAM tritiada (concentración final de 0,04 μ g/ μ l).
- Incubar la reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Irradiar la muestra con luz ultravioleta (254 nm) durante 20 minutos en un baño de hielo.
- Procesar las muestras normalmente por SDS-PAGE.
- Tras la electroforesis, sumergir el gel durante 20 minutos en solución Amplify® (Amersham) para amplificar la señal.
- Secar el gel con un secador de geles por vacío (BioRad).
- Exponer el gel sobre un film de autorradiografía Hyperfilm® MP (Amersham) en un estuche Hypercassette® con pantallas intensificadoras de calcio-tungsteno-fósforo (Amersham) a -80°C un mínimo de 8 días.
- Revelar el film.

II-11.7 Ensayo enzimático de la actividad lacasa.

El ensayo utilizado para medir la actividad lacasa está basado en una reacción colorimétrica. El ensayo en medio sólido fue realizado según los métodos descritos por Sundman y Näse (1971) (utilizando guayacol) y Rodríguez *et al.*, (2008) [utilizando 2,2'-azinobis(3-etil-benzotiazolin)-6-sulfonato o ABTS]. Se trata de un sistema rápido para la detección de microorganismos capaces de degradar compuestos fenólicos. Para ello se cultivan los microorganismos en placas con el medio de cultivo adecuado, en nuestro caso ML, a las que se le añade guayacol 0,02% o ABTS 1mM que es oxidado por los microorganismos que sean capaces de producir lacasas, dando lugar a halos de color azul oscuro.

Por otra parte, el ensayo en medio líquido fue realizado según el método descrito por Coll *et al.* (1993). Este método también se basa en una reacción colorimétrica en la que los extractos crudos o los sobrenadantes de los cultivos se valoran utilizando tampón acetato 100 mM y ABTS 5mM. Esta solución se prepara al doble de concentración y se mezcla 1:1 con el extracto a ensayar y se lee el incremento de la absorbancia a 436 nm. Se define 1 unidad (U) de actividad enzimática como la cantidad de enzima que produce un incremento en la absorbancia a 436 nm de una unidad por minuto.

II-11.8 Inmunodetección de proteínas.

Para poder llevar a cabo los ensayos de inmunodetección de proteínas, las muestras fueron previamente sometidas a electroforesis en un gel desnaturante (SDS-PAGE), como se describe en el apartado II-11.3.

II-11.8.1 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.

La técnica de transferencia de proteínas a un soporte sólido se denomina *Western blotting* y fue descrita por Towbin y colaboradores (1979). El soporte sólido utilizado fue una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF; Immobilon, Millipore) y el equipo para la transferencia fue un *Mini Trans Blot* (Bio-Rad), o un *Trans-blot SD Semi-dry Transfer Cell* (Bio-Rad) cuando se realizó la transferencia en semiseco. El protocolo seguido se desarrolla a continuación:

- Cortar una membrana de PVDF de dimensiones idénticas a las del gel y activarla humedeciéndola en metanol 1 minuto (suprimiendo así su elevada hidrofobicidad).

- Equilibrar el gel de poliacrilamida con las proteínas y la membrana en Tampón de transferencia⁽¹⁾ durante 15 minutos (por separado). Humedecer con este mismo tampón 6 láminas de papel Whatman 3MM de idéntico tamaño a la membrana y al gel.



- Situados desde el ánodo al cátodo colocar: 3 laminas de papel Whatman 3MM, la membrana de PVDF, el gel de poliacrilamida y por último otras 3 láminas de papel Whatman 3MM. Colocar las diferentes capas evitando la formación de burbujas.

- Ensamblar la unidad de transferencia en el equipo Mini Trans Blot y realizar la electrotransferencia entre 1 y 2 horas a 50 V (entre 100 y 170 mA). Seguidamente desmontar la unidad y teñir el gel con Azul de Coomassie para verificar la calidad de la transferencia. En caso de realizar la transferencia en semiseco, aplicar 5'5 mA/cm² durante 45 minutos.

⁽¹⁾Tampón de transferencia: 48 mM Tris pH 8,3; 39 mM glicina; 0,037 % SDS; 20 % metanol; en solución acuosa.

II-11.8.2 Inmunoadsorción

En el proceso de inmunoadsorción las proteínas inmovilizadas en una membrana de PVDF se detectan mediante la unión específica de anticuerpos a una determinada secuencia de aminoácidos (epítopos antigénicos).

- Bloquear los sitios activos de la membrana que no han sido ocupados por proteínas incubando la membrana en Solución de bloqueo⁽¹⁾ durante 12 horas a 4 °C.

- Incubar la membrana en una dilución (entre 1:1.000 y 1:5.000) del anticuerpo primario (contra las proteínas de estudio) en Tampón ⁽²⁾ durante 2 horas.

- Lavar la membrana 1 vez en Tampón I y 2 veces en Tampón II⁽³⁾ durante 10 minutos cada vez.

- Preparar el segundo anticuerpo [anti-globulina G de conejo acoplada a una molécula de fosfatasa alcalina (*Anti-rabbit IgG*, Sigma)] en un dilución 1:5.000 en *Tampón I* e incubar la membrana 2 horas.

- Lavar la membrana 1 vez en Tampón I y 2 veces en Tampón II durante 10 minutos cada vez.

- Equilibrar la membrana 5 minutos en Tampón III⁽⁴⁾ y añadir 30 ml del Tampón III suplementado con 50 µl de NBT y 50 µl de BCIP.

- Mantener en oscuridad hasta que aparezca señal de hibridación. Retirar la solución de color y detener la reacción por adición de TE o agua destilada.

⁽¹⁾Solución de bloqueo: Leche desnatada en polvo (Nestlé) 2 % (p/v) en tampón I.

⁽²⁾Tampón I: NaCl 0,3 M; Tris-HCl 25 mM, pH 7,5.

⁽³⁾Tampón II: NaCl 1 M; Tris-HCl 25 mM, pH 7,5.

⁽⁴⁾Tampón III: Tris-HCl, pH 9,5 0,1 M; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 50 mM. Se prepara por una parte 1 M Tris-HCl, pH 9,5; y por otro lado 1 M NaCl; 500 mM MgCl₂•6H₂O. En esta forma las soluciones están 10x, mezclándose antes de usar como 1x.

II-12. Técnicas generales para la purificación de proteínas.

La mayoría de los esquemas de purificación de proteínas implican algún tipo de cromatografía. La disponibilidad de distintas técnicas cromatográficas con distinta selectividad proporciona una buena estrategia para la purificación de cualquier proteína.

El método cromatográfico utilizado en esta purificación fue el de FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*) con el que se ensayaron distintos tipos de columnas. Para ello se empleó un equipo ÄKTA Design System® (Amersham).

II-12.1 Desalado y cambio de tampones de muestras proteicas.

Los cambios de tampón requeridos entre cada paso cromatográfico se realizaron usando columnas PD-10® (Amersham). Estas columnas permiten procesar un volumen de 2,5 ml de muestra y poseen una matriz de Sephadex G-25® con un límite de exclusión de 5.000 Da, por lo que permiten eliminar impurezas y moléculas de bajo peso molecular (incluidos sales y tampones). El protocolo de utilización es el siguiente:

- Lavar la columna con 25 ml de agua milliQ.
- Equilibrar la columna con 25 ml de tampón en el cual queremos recoger la proteína.
- Aplicar la muestra en un volumen de 2,5 ml.
- Aplicar a la columna 3,5 ml de tampón para eluir la proteína.
- Lavar la columna con 25 ml de agua milliQ y conservar a 4°C en una solución de etanol al 20% hasta posteriores usos.

II-12.2 Concentración de muestras proteicas.

Las muestras proteicas se concentraron en tubos concentradores *Microcon*® (Millipore). Éstos están equipados con membranas de celulosa hidrofílica, anisotrópica y de baja afinidad. Permiten procesar un volumen máximo de 1,5 ml. Utilizamos 2 tamaños de exclusión diferente: 10 KDa y 50 KDa.

Cuando los tamaños de muestra eran mayores usamos dispositivos de la misma casa comercial que permiten procesar hasta 20 ml. El proceso de concentración se produce al centrifugar los tubos en una centrifuga de mesa a 7.500 rpm y 4°C.

II-12.3 Cromatografía de interacción hidrofóbica.

En este tipo de cromatografía las proteínas son separadas en función de las interacciones hidrofóbicas que se establecen con los ligandos hidrofóbicos inmovilizados en una matriz sin carga.

Esta técnica se lleva a cabo en presencia de altas concentraciones de sales para acaparar la mayor parte de las moléculas de agua presentes en la muestra, intensificando

así las interacciones hidrofóbicas entre proteínas, o entre éstas y la matriz de la columna. La elución de las proteínas unidas a la matriz se consigue con un decrecimiento en la concentración de sales. Las matrices utilizadas en este trabajo fueron: columna *HiTrap Phenyl Sepharose Fast Flow*[®] (Amersham Pharmacia) de 1 ml y la columna *Resource Phe*[®] (Amersham Pharmacia) de 1 ml.

II-12.4 Cromatografía de intercambio iónico.

El distinto comportamiento iónico que presentan las proteínas expuestas a diferentes pH permite su separación diferencial cromatográficamente. La carga neta de las proteínas varía con el pH en que se encuentran, siendo ésta nula en el denominado punto isoeléctrico.

Si las proteínas son estables por encima de su punto isoeléctrico, al estar cargadas negativamente, se conseguirá su separación utilizando un intercambiador aniónico.

De igual manera, si por debajo de dicho punto son estables, se puede emplear un intercambiador catiónico para su separación.

La cromatografía de intercambio iónico se basa en la interacción electrostática y reversible entre la carga de la proteína y la de la matriz de la columna de carga opuesta. Las proteínas son retenidas en función de su carga eléctrica al atravesar la columna y posteriormente se eluyen diferencialmente al modificar su carga mediante un incremento en la concentración de sales del tampón o por un cambio en el pH del mismo.

Como previamente se había descrito (Álvarez-Rodríguez, 2003), a un pH de 8,0 el enzima 2,4,6-TCP metiltransferasa queda retenida en columnas de intercambio aniónico, por lo que probamos las columnas *HiTrap DEAE Fast Flow*[®] (Amersham) de 1 y de 5 ml (que es un intercambiador débil) y *Resource Q* (Amersham) de 1 ml (que es una columna de intercambio aniónico fuerte).

II-12.5 Cromatografía en columnas de hidroxapatito.

El mecanismo por el cual las proteínas interaccionan con el hidroxapatito es complejo. La adsorción y elución de proteínas no pueden ser consideradas como la inversión de un proceso simple. Además, los grupos amino y carboxilo actúan de distinta manera en el proceso de adsorción de proteínas al hidroxapatito. Además, la elución de proteínas ácidas y básicas mediante diferentes sales sigue diferentes mecanismos.

Los grupos amino de la proteína actúan como resultado de interacciones electrostáticas no específicas entre su carga positiva y la carga negativa general de la columna de hidroxapatito, cuando la columna se equilibra con un tampón fosfato. La retención de proteínas básicas está controlada por el estado iónico de la columna y, por tanto, por su carga neta. Cuanto menor sea el pH del tampón fosfato, mayor ha de ser la molaridad requerida para la elución; además, bloqueando los grupos carboxilo se consigue una mayor fuerza de unión de proteínas básicas y ácidas al hidroxapatito. Esta interacción electrostática es crucial en la unión de proteínas básicas.

Los grupos carboxilo actúan de dos maneras. Primero, son repelidos electrostáticamente por la carga negativa de la columna. Segundo, se acomplejan con el calcio de la columna formando agregados. De esta manera, las proteínas ácidas deben unirse casi exclusivamente debido a la formación de agregados (Kadoya *et al.*, 1988).

Por tanto la elusión de proteínas unidas a la matriz se produce de manera diferente si son ácidas o básicas. Las proteínas básicas se eluyen por desplazamiento específico con Ca^{2+} o Mg^{2+} , que forman uniones con el hidroxapatito. Las proteínas ácidas se eluyen mediante desplazamiento de sus grupos carboxilos de la matriz de hidroxapatito (desplazamiento de los *clusters* proteína- Ca^{2+}) mediante la adición de iones que forman complejos más fuertes con el calcio que los grupos carboxilos: fluoruros o fosfatos.

Es este trabajo utilizamos una columna *Bio-Scale CHT-1*[®] (BioRad) de 5 ml de volumen.

II-12.6 Cromatografía de gel-filtración.

La cromatografía de gel-filtración o tamizado molecular, es un método útil para determinar el tamaño y peso molecular de las proteínas. El fraccionamiento se basa en la difusión diferencial de las moléculas en los poros del gel. Las proteínas con masas moleculares altas no pueden entrar en los poros del gel, por lo que son eluidas a través del volumen de exclusión de la columna, y lo hacen más rápido que las moléculas de masa molecular menor. De esta manera, las moléculas eluyen preferentemente de la columna en orden decreciente de peso molecular. Sin embargo, las moléculas se eluirán de la columna no solo según su peso molecular, sino también según su radio de Stokes (que da idea de la esfericidad de la molécula). La aproximación es válida si se tiene en cuenta que los enzimas son aproximadamente esferoides.

Existen multitud de matrices para realizar este tipo de cromatografía. Su elección dependerá de la resolución requerida y del peso molecular de las moléculas a fraccionar. El *Sephadex*[®] fue una de las primeras matrices en utilizarse. Se trata de perlas de un polímero polisacárido preparado con diferentes tamaños de poro. La resolución posible con este tipo de matriz es pobre. Para mayor resolución se emplean matrices con mejores propiedades de flujo y resistencia a la presión. Esto se ha conseguido sacando al mercado matrices de diversa composición, y mejorando la estructura de las perlas de dichos geles. Nosotros hemos probado columnas *Superdex 75*[®] y *Superdex 200*[®] (Amersham) que difieren en el rango de tamaño de proteínas que pueden resolver.

II-13. Purificación de la actividad 2,4,6-TCP-O-metiltransferasa de *T. longibrachiatum*.

II-13.1 Paso 1: Obtención de extractos libres de células.

Como material de partida utilizamos micelio procedente de cultivos inducidos tal como se explica en el apartado II-11.1. Posteriormente realizamos la extracción de proteínas y, a continuación, realizamos un cambio de tampón en columnas PD-10[®] para recoger el extracto en el tampón elegido para el siguiente paso de purificación, en este caso, el tampón DEAE A (ver apartado II-12.2).

II-13.2 Paso 2: Cromatografía de intercambio aniónico en una columna HiTrap DEAE Fast Flow de 5ml.

El siguiente paso en el proceso consistió en una primera cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna *HiTrap DEAE Fast Flow*[®] de 5 ml de lecho. Esta columna contiene el intercambiador aniónico débil DEAE (dietilaminoetil).

Tampón DEAE A	Tampón DEAE B
TrisHCl 10 mM (pH 8,0)	TrisHCl 10 mM (pH 8,0)
MgCl ₂ 5 mM	MgCl ₂ 5 mM
DTT 0,2 mM	DTT 0,2 mM
Glicerol 10% (v/v)	Glicerol 10% (v/v)
	NaCl 0,3 M

Tabla II-8: Composición de los tampones utilizados en ésta columna.

El desarrollo de la cromatografía es el siguiente:

- Lavar la columna con 10 volúmenes de columna de agua milliQ.
- Equilibrar la columna con 5 volúmenes de columna de tampón DEAE A.
- Cargar la muestra en la columna. Lavar las proteínas no unidas a la matriz con 100 ml de DEAE A.
- Eluir las proteínas pegadas a la matriz con un gradiente constante de DEAE B que irá incrementando la concentración de NaCl hasta 0,3 M en 100ml. Se recogen fracciones de 2 ml.
- Lavar la columna de todas las proteínas retenidas manteniendo constante una concentración de NaCl 0,3 M durante 100 ml.

Todos los pasos se realizaron a un flujo de 5 ml / min y 4 °C.

Una vez realizada esta cromatografía realizamos ensayos enzimáticos tal y como se explicó en la sección 9.4 y posteriormente se analizó el resultado por HPLC.

A continuación mezclamos las 15 fracciones con más actividad y las pasamos por una columna PD-10[®] para cambiar al tampón de la siguiente columna.

II-13.3 Paso 3: Cromatografía en columna de hidroxapatito *Bio-Scale CHT-I*.

El siguiente paso en el proceso consistió en una cromatografía en columna de hidroxapatito. Una vez mezcladas las fracciones con mayor actividad eluidas de la columna anterior realizamos un cambio de tampón en columnas PD-10[®], eluyéndolas en tampón HA A. Al encontrarnos en un paso temprano del proceso de purificación optamos por no desechar fracciones con poca actividad, aún a costa de una mayor complejidad proteica de la muestra, puesto que muchas de estas proteínas serán eliminadas en alguno de los pasos posteriores.

Tampón HA A	Tampón HA B
Fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0)	Fosfato de sodio 500 mM (pH 6,5)

Tabla II-9: Composición de los tampones utilizados en esta columna.

El protocolo de la cromatografía se detalla a continuación:

Todos los pasos de la cromatografía se realizaron con un flujo 2,5 ml / min y 4 °C.

- Lavar la columna con 5 volúmenes de columna de agua milliQ.
- Equilibrar la columna con: 5 volúmenes de tampón HA A, 5 volúmenes de columna de tampón HA B y finalmente, 5 volúmenes de HA A.
- Cargar la muestra en la columna. Lavar las proteínas no unidas a la matriz con 15 ml de tampón HA A.
- Eluir las proteínas pegadas con un gradiente constante de Tampón HA B que incrementa la concentración de fosfato hasta 500mM en 100 ml. Se recogen fracciones de 2,5 ml.
- Lavar la columna de todas las proteínas retenidas con 15 ml de tampón HA B.
- Reequilibrar la columna con 25 ml de tampón HA A.

Se ensayan las fracciones de igual manera que en el paso anterior, reservando y mezclando las fracciones con mayor actividad. Pasamos estas fracciones por columnas PD-10[®] cambiando al tampón de la siguiente columna.

II-13.4 Paso 4: Cromatografía de intercambio aniónico en columna *ResourceQ*.

El siguiente paso en el proceso consistió en una segunda cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna *Resource Q* de 1 ml de matriz. Ésta es una columna de intercambio aniónico fuerte debido a que su matriz posee amonio cuaternario que permite una selección diferente a la matriz DEAE.

Tampón QA	Tampón QB
TrisHCl 50 mM (pH 8,2)	TrisHCl 50 mM (pH 8,2)
MgCl ₂ 5 mM	MgCl ₂ 5 mM
DTT 0,2 mM	DTT 0,2 mM
Glicerol 10% (v/v)	Glicerol 10% (v/v)
	NaCl 1 M

Tabla II-10: composición de los tampones utilizados en esta columna.

En protocolo de la cromatografía se detalla a continuación:

- Lavar la columna con 10 volúmenes de columna de agua milliQ.
- Equilibrar la columna con 5 volúmenes de columna de tampón QA.
- Cargar la muestra en la columna. Lavar las proteínas no unidas a la matriz con 10 ml de QA.
- Eluir las proteínas pegadas a la matriz con un gradiente discontinuo de tampón QB que irá incrementando la concentración de NaCl. Se recogen fracciones e 0,5 ml.
 - De 0 a 25 mM de NaCl en 2 ml.
 - Mantener esta concentración 6 ml.
 - De 25 a 65 mM de NaCl en 6 ml.
 - Mantener esta concentración 6 ml.
 - De 65 a 100 mM de NaCl en 5 ml.
 - De 100 a 150 mM de NaCl en 3 ml.
 - De 150 a 1000 mM de NaCl en 2ml.
- Lavar la columna de todas las proteínas retenidas manteniendo una concentración de 1 M de NaCl durante 10 ml.

Todos los pasos de la cromatografía se efectuaron a un flujo de 1 ml / min. Realizamos ensayos enzimáticos de las fracciones y juntamos las de mayor actividad para seguir con el proceso. Pasamos estas fracciones por columnas PD-10[®] cambiando al tampón de la siguiente columna.

II-13.5 Paso 5: Ultrafiltración.

La muestra proteica se concentra hasta un volumen cercano a los 150 µl con ayuda de concentradores *Microcon*[®] (Millipore) de un tamaño de poro de 10 KDa en una centrifuga refrigerada de mesa a 4°C y 7.500 rpm.

II-13.6 Paso 6: Cromatografía de gel filtración en una columna *Superdex 200*[®].

Tras el paso cromatográfico anterior se obtiene una fracción proteica semipura con un pequeño número de proteínas diferentes en la misma, y con unas propiedades de carga e hidrofobicidad muy similares, por lo que para separarlas realizamos una cromatografía de gel filtración que nos va a separar las proteínas de la mezcla en función a su tamaño. La

columna *Superdex 200*[®] (Amersham) permite fraccionar proteínas en un rango desde 10.000 a 600.000 daltons.

Tampón Sdx200
TrisHCl 50 mM (pH 7,0)
DTT 0,2 mM
NaCl 150 mM
EDTA 1 mM

Tabla II-10: composición de los tampones utilizados en esta columna.

En protocolo de la cromatografía se detalla a continuación:

- Lavar la columna con 50 ml de agua milliQ.
- Equilibrar la columna con tampón Sdx200 toda la noche a un flujo de 0,1 ml/min.
- Pasar la muestra por la columna con un flujo de 0,12 ml / min, durante un volumen de 50 ml, recogiendo fracciones de 500 μ l.
- Lavar la columna utilizando 2 volúmenes de columna con tampón Sdx200[®].

Finalmente, se ensayó la actividad enzimática de las distintas fracciones.

II-14. Cultivo de cepas seleccionadas de *T. longibrachiatum* en granulado de corcho.

Las cepas transformadas con las construcciones de atenuación (pARNi-MT265) y de expresión del gen *peB* de *P. eringii* (pPEL3G) fueron cultivadas sobre corcho granulado para comprobar el comportamiento de las mismas en condiciones similares a las existentes cuando el hongo crece sobre la corteza del alcornoque o sobre planchas de corcho almacenadas.

II-14.1 Cultivo sobre granulado de corcho.

Para ello se utilizaron matraces de 500 ml a los que se añadieron 10 g de corcho granulado previamente esterilizado. Sobre este corcho se añadieron 2 ml de acetato amónico 1,2 M y 10 ml de agua milliQ estéril en la que se resuspendieron 5×10^5 esporas de cada cepa. Además se adicionó a cada matraz (exceptuando el matraz control) 2,4,6-TCP a una concentración de 1 μ g/g de corcho.

Los cultivos se incubaron en oscuridad a 20–24 °C durante 30 días para permitir el crecimiento del hongo sobre el corcho y su interacción con el 2,4,6-TCP.

II-14.2 Extracción de los clorofenoles y cloroanisoles.

Una vez concluida la incubación, se procedió a la extracción de los cultivos. Para ello se adicionaron 80 ml de etanol a cada matraz y se incubaron en un agitador

orbital a 18 °C y 250 rpm durante 15 horas. Durante esta extracción se sellaron los matraces con Parafilm[®] para tratar de evitar cualquier pérdida por evaporación.

Finalizada la incubación se filtraron los cultivos pasándolos a través de papel de secante para eliminar los residuos sólidos. El filtrado fue inmediatamente congelado a -20 °C hasta su utilización.

Los niveles de 2,4,6-TCP y 2,4,6-TCA se determinaron por cromatografía de gases-masas (GC-MS) recurriendo a la contratación del servicio ofrecido por los laboratorios CEVAQOE España S.L.

Resultados y discusión

III-1. Purificación del enzima clorofenol-*O*-metiltransferasa (CPOMT) de *T. longibrachiatum* implicado en la formación de 2,4,6-tricloroanisol.

III-1.1 Optimización del ensayo enzimático para la actividad clorofenol-*O*-metiltransferasa (CPOMT).

Los primeros ensayos realizados para detectar la actividad enzimática 2,4,6-TCP *O*-metiltransferasa se realizaron según el procedimiento descrito por Álvarez-Rodríguez *et al.* (2003) que a su vez está basado en el descrito por Neilson *et al.* (1988), pero optimizados para este enzima. Sin embargo, los resultados que obtuvimos no fueron totalmente satisfactorios ya que los niveles detectados con éste método eran bajos, no permitiéndonos ensayar siempre la actividad enzimática en las fracciones purificadas en pasos avanzados del proceso. Por este motivo decidimos introducir ligeras modificaciones en el protocolo.

III-1.1.1 Periodo de incubación de la reacción enzimática.

Las reacciones enzimáticas realizadas con los extractos y fracciones proteicas a lo largo del proceso de purificación fueron incubadas por un periodo nunca inferior a las 12 horas a 28°C, en lugar de las 3 horas de incubación utilizadas en el método anteriormente descrito.

III-1.1.2 Extracción de la fase acuosa.

Una vez concluida la reacción enzimática la fase acuosa se extrajo dos veces con 1 volumen de **acetato de etilo** en lugar del dietil éter, solvente utilizado en el método de Álvarez-Rodríguez *et al.* (2003). Se utilizó acetato de etilo por los siguientes motivos:

1. Según el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo de España (INHST) es un solvente más seguro que el dietil éter, ya que éste puede formar peróxidos explosivos al reaccionar con la luz y el aire. Además tiene unos puntos de inflamación y autoignición mucho mayores.
2. Su toxicidad es ligeramente menor que la del dietil éter.
3. Debido a su mayor tensión superficial es mucho más fácil de manipular tanto con la micropipeta como en la separación de fases, permitiendo un procesamiento más eficaz de las muestras.

III-1.2 Purificación de la actividad 2,4,6-TCP metiltransferasa.

La metodología seguida para la purificación a homogeneidad de la actividad 2,4,6-TCP metiltransferasa ha sido descrita en el apartado II-13 de esta memoria.

III-1.2.1 Obtención de extractos enzimáticos libres de células.

El primer paso del proceso de purificación se realizó a partir de 22,5 gramos de micelio correspondiente a un cultivo inducido con 2,4,6-TCP. A partir de dicho micelio se obtuvo por sonicación un extracto crudo que fue filtrado en columnas PD-10 a fin de eliminar pequeñas moléculas, especialmente trazas de 2,4,6-TCP y 2,4,6-TCA que pudieran interferir en los ensayos de valoración enzimática. Tras dicha filtración se obtuvieron 70 ml de extracto crudo con una concentración proteica media de **20.0 mg/ml**.

III-1.2.2 Cromatografía de intercambio aniónico en columna *HiTrap DEAE FF*.

A continuación la muestra fue sometida a un paso de intercambio aniónico a pH 8.0 en un intercambiador débil (*DEAE FF*). La actividad fue eluída de la columna utilizando un gradiente continuo de NaCl, detectándose actividad en las fracciones que eluían en un intervalo de **50 a 110 mM de NaCl**, tal como vemos en la **Figura III-1**.

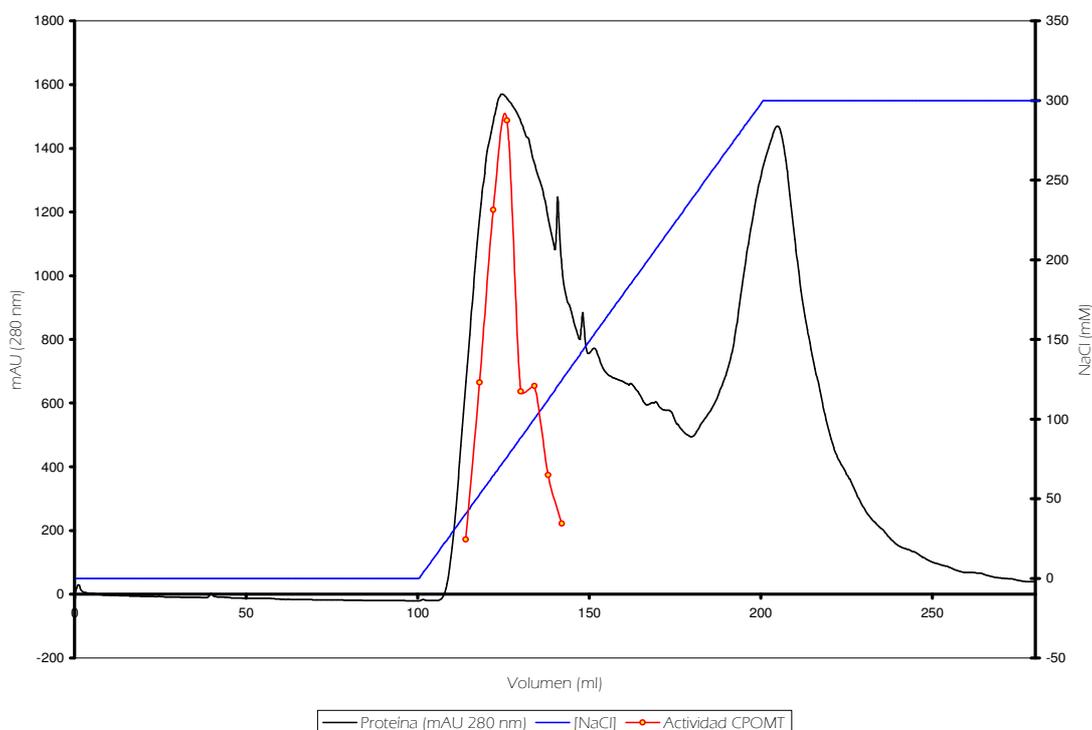


Figura III-1. Perfil cromatográfico y de elución de la actividad CPOMT en una columna de intercambio aniónico HiTrap DEAE FF.

III-1.2.3 Cromatografía en columna de hidroxiapatito *Bio-Scale CHT-I*.

El tercer paso del proceso de purificación fue una cromatografía en columna de hidroxiapatito. La actividad CPOMT eluía en un intervalo comprendido entre **150 y 300 mM de fosfato de sodio**. El perfil cromatográfico obtenido está representado en la **Figura III-2**.

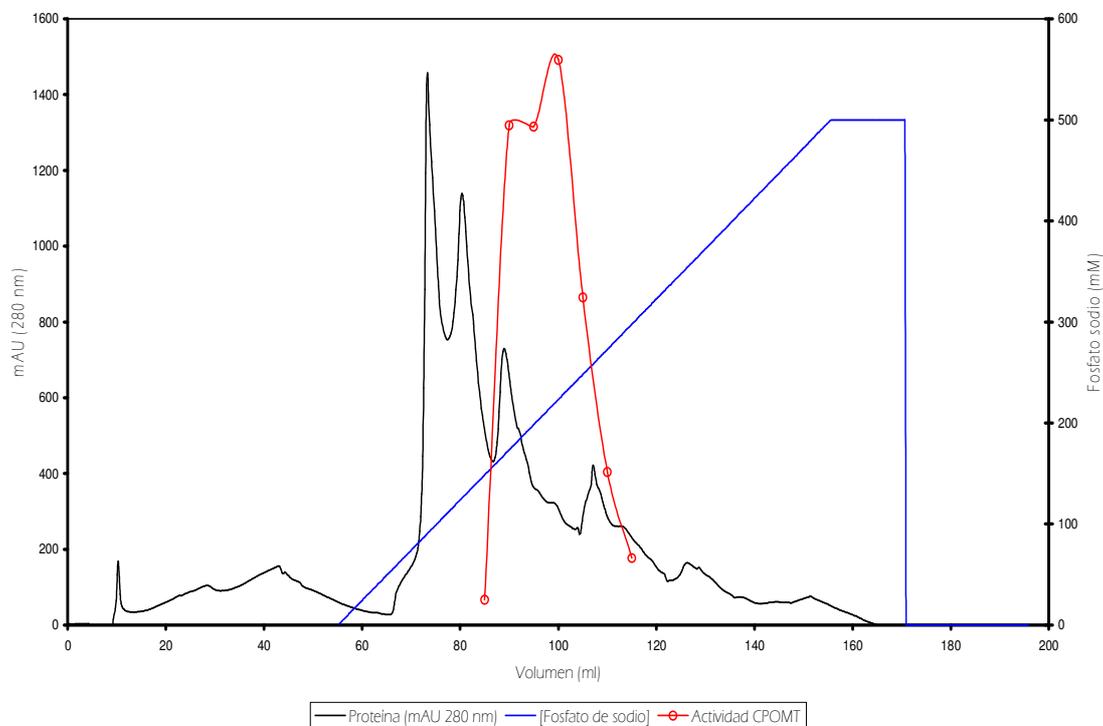


Figura III-2. Comportamiento de la actividad CPOMT en una columna de hidroxiapatito *Bio-Scale CHT-I*.

III-1.2.4 Cromatografía de intercambio aniónico en columna *Resource-Q*.

Seguidamente, las fracciones con actividad clorofenol-*O*-metiltransferasa se sometieron a una segunda cromatografía de intercambio aniónico, esta vez en un intercambiador aniónico fuerte, la columna *Resource-Q*. El cromatograma se representa en la **Figura III-3**. Una vez realizados los ensayos enzimáticos de las fracciones de la cromatografía observamos que la actividad eluía en un rango de concentración de NaCl muy estrecho, que iba desde **35 a 65 mM**.

III-1.2.5 Ultrafiltración.

A continuación realizamos un paso de concentración de la muestra utilizando concentradores Millipore con un filtro de polietersulfona de baja adsorción con un límite de exclusión molecular de 50.000 Da. Realizamos ensayos de actividad de la fracción excluida y de la retenida, observando que sólo la parte retenida mostraba actividad. Este paso se realiza con dos propósitos, eliminar posibles proteínas de un peso molecular sensiblemente diferente a la CPOMT y concentrar la muestra proteica para cargar en la siguiente columna. La muestra inicial de 8 ml se concentró hasta un volumen final de 150-250 μ l.

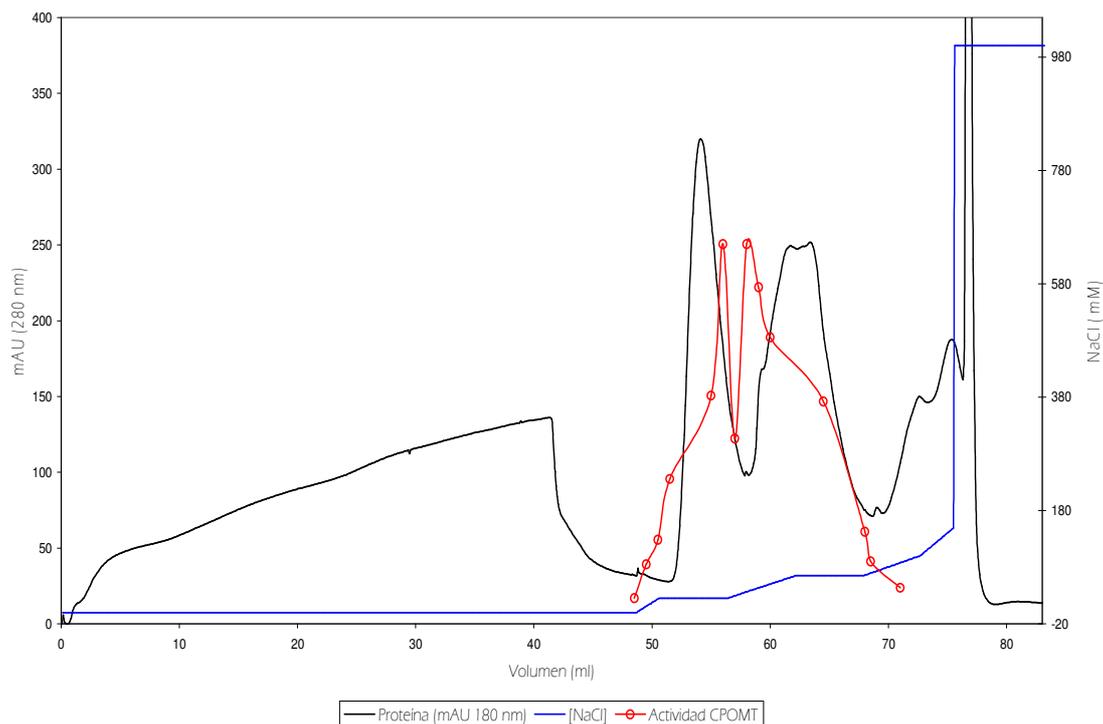


Figura III-3. Comportamiento de la actividad 2,4,6-TCP metiltransferasa en una columna de intercambio aniónico *Resource-Q*.

III-1.2.6 Cromatografía de gel filtración en columna *Superdex 200*.

El último paso del proceso de purificación realizado consistió en una cromatografía de filtración en gel en una columna *Superdex 200* que fracciona proteínas cuyo peso molecular se sitúa entre 10.000 y 600.000 Da. Aunque el rendimiento obtenido en este paso es muy bajo es una técnica efectiva ya que permitió obtener una preparación en la que la actividad *O*-metiltransferasa eluía en un pico bien definido (ver **Figura III-4**).

Posteriormente, se realizaron ensayos de actividad en los que comprobamos que la actividad eluía en únicamente 4 fracciones de 500 μ l, pero mayoritariamente en dos de ellas, c3 y c4. A continuación realizamos un análisis por SDS-PAGE (ver **Figura III-5A**) de las cuatro fracciones. Al analizar el gel observamos que en las fracciones c3 y c4 existían cuatro ó cinco bandas proteicas, de las cuales la mayoría tenía un tamaño molecular aproximado de 48 kDa.

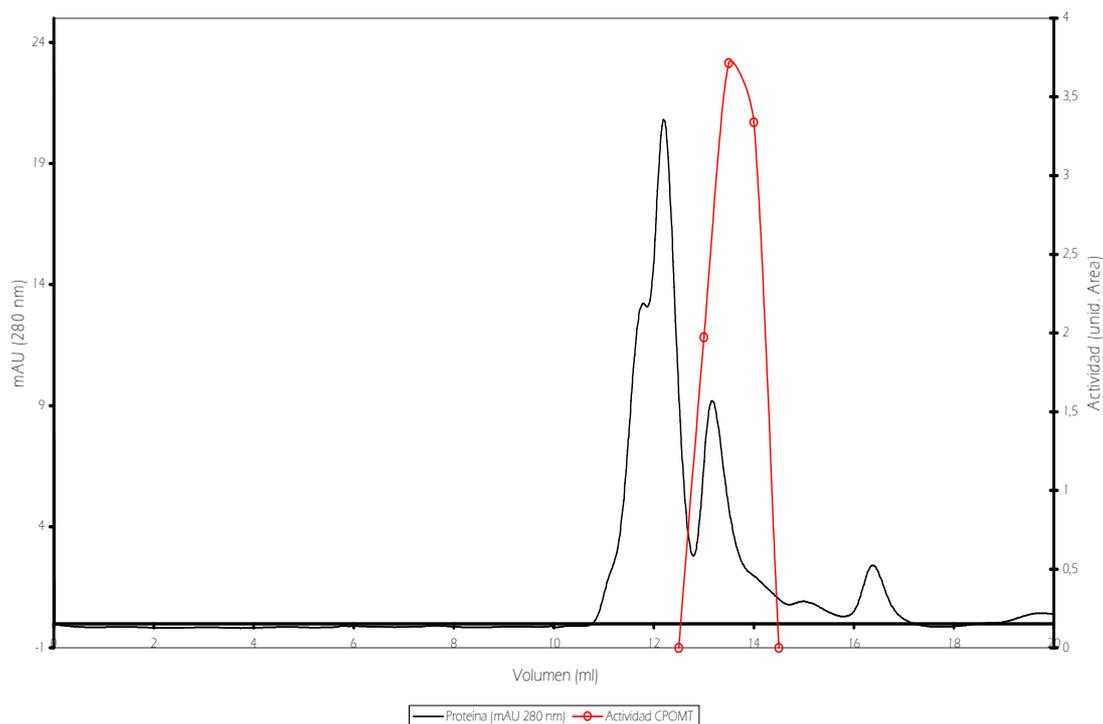


Figura III-4. Comportamiento de la actividad CPOMT en una columna de gel filtración *Superdex 200*.

III-1.2.7 Identificación del enzima CPOMT mediante fotomarcaje con S-adenosil-L-metionina radiactiva.

Algunas metiltransferasas han podido ser identificadas mediante fotomarcaje (o *cross-linking* con de luz ultravioleta) utilizando un sustrato radiactivo (Som *et al.*, 1990; Ruiz *et al.*, 1998), especialmente S-adenosil-L metionina tritiada (SAM [metil-³H]).

Con las condiciones de ensayo indicadas en el apartado II-11.6 de *Materiales y Métodos*, pudimos detectar en los diferentes pasos del proceso de purificación una banda de aproximadamente 48 KDa que coincidía en tamaño con el enzima purificada. Tal como se observa en la **Figura III-5B**, se detectan dos proteínas que se marcan con SAM tritiada lo que corrobora que en el proceso **hemos purificado al menos una metiltransferasa SAM-dependiente y con capacidad de metilar 2,4,6-TCP**. Estas dos bandas podían ser consecuencia de la existencia de productos de degradación de la misma proteína o proteínas diferentes. Para verificarlo cortamos ambas bandas de las calles correspondientes a las fracciones C3 y C4, denominando C3A a la banda de mayor peso molecular y C3B a la de menor peso (de igual modo para las bandas de C4). Agrupamos las bandas "A" bajo la denominación pMT 51 (como referencia a su peso molecular aproximado) y las "B" como pMT 48.

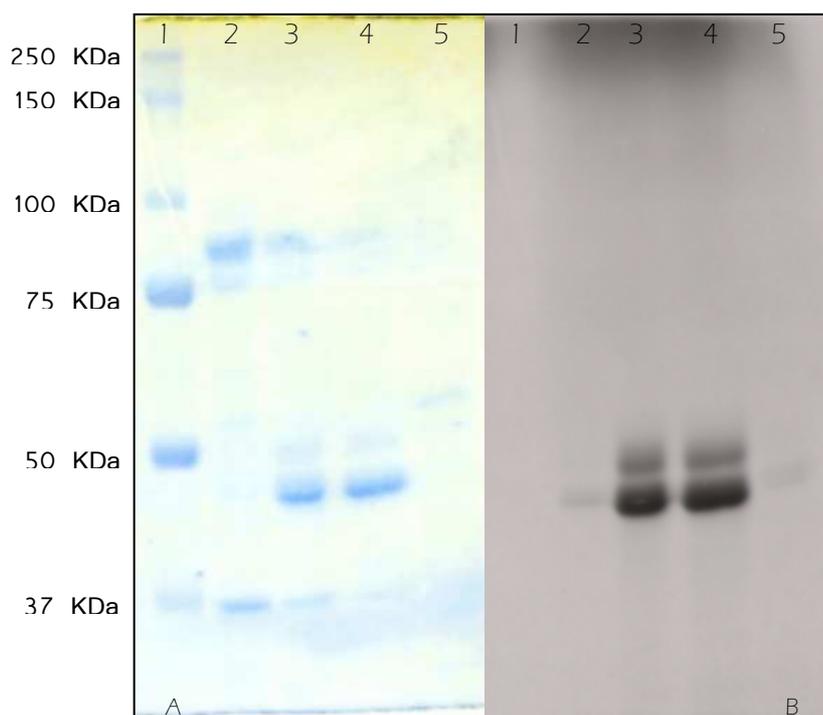


Figura III-5. A) Análisis por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las fracciones con actividad eluidas de la columna Superdex 200: Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Fracción C2; Carril 3: Fracción C3; Carril 4: Fracción C4; Carril 5: Fracción C5. B) Detección de la 2,4,6-TCP metiltransferasa por fotomarcaje con SAM [^3H metil] en las fracciones con actividad de la columna Superdex 200: Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Fracción C2; Carril 3: Fracción C3; Carril 4: Fracción C4; Carril 5: Fracción C5.

III-2. Secuenciación de péptidos internos de la proteína CPOMT.

Una vez purificadas e identificadas las bandas correspondientes a la probable *O*-metiltransferasa se procedió a la secuenciación de péptidos internos a partir de las muestras C3A, C4A, C3B y C4B. Para ello se procedió a contratar los servicios del laboratorio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Tras la digestión de las bandas con tripsina se realizó una espectrometría de masas para determinar el *fingerprint* (o huella peptídica) correspondiente a cada banda aislada del gel. El resultado de éstas huellas peptídicas se muestra en la **Figura III-6**.

De la comparación de ambas huellas peptídicas pudimos deducir que pMT51 y pMT48 eran proteínas diferentes (dada la nula coincidencia de los péptidos obtenidos por digestión) descartándose que la proteína de menor tamaño (pMT48) pudiese ser un producto de degradación de la proteína mayor (pMT51).

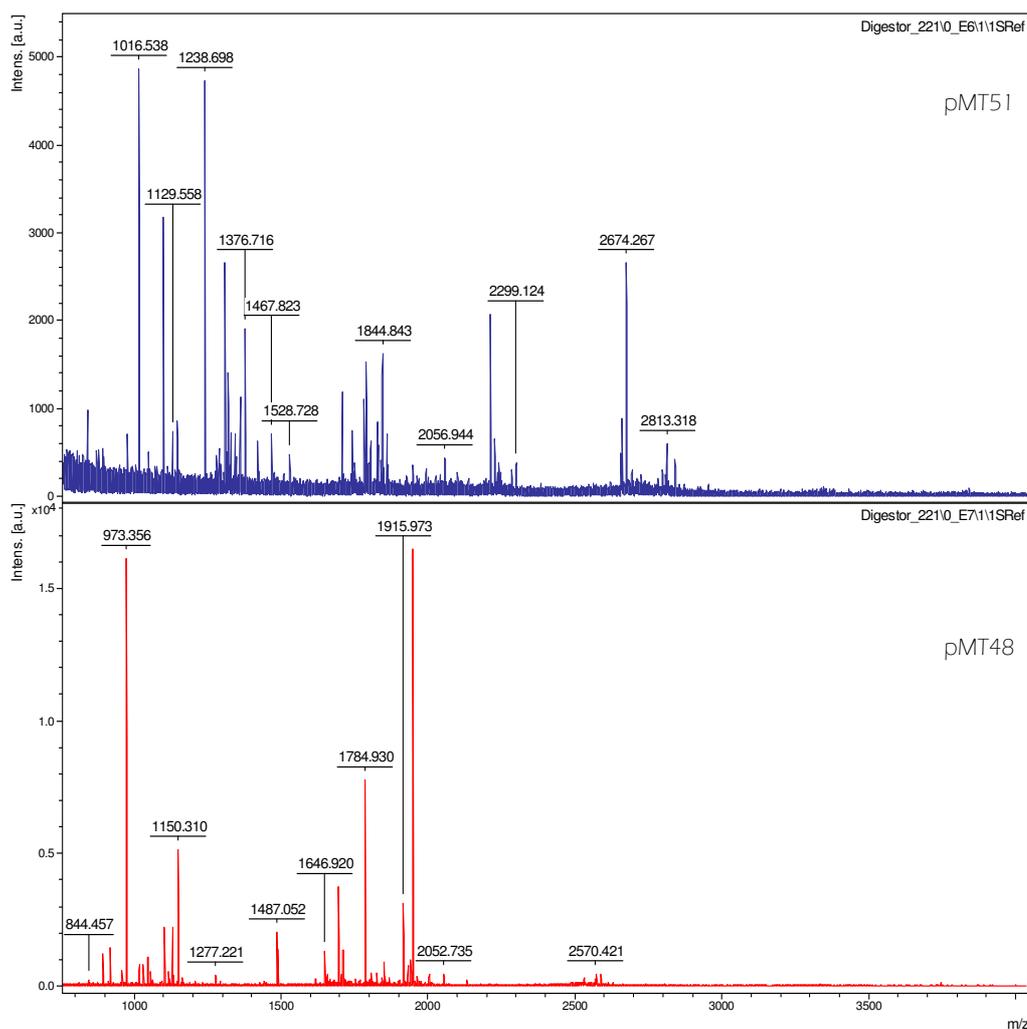


Figura III-6. Huella peptídica obtenida por MALDI-TOF para las dos posibles *O*-metiltransferasas pMT48 y pMT51.

Posteriormente se procedió a determinar la secuencia probable de péptidos internos, tanto mediante análisis de la huella peptídica como por secuenciación *de novo*. El análisis realizado nos permitió obtener la secuencia probable de una serie de péptidos que se muestran en las **Tablas III-1 y III-2**.

Péptido	Secuencia	Homología
m/z 1016,54	VADEEG[L/I] [K/Q]R	No encontrada
m/z 1129,57	VESA[K/Q][L/I][K/Q]GG [L/I]K	No encontrada
m/z 1048,60	ADPR	Péptido demasiado pequeño
m/z 1238,72	TKDLPANLLOAO	6-fosfogluconato deshidrogenasa <i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10 ref XP_001558673.1
m/z 1467,85	DLPANLLOAQR	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Giberella zeae</i> . ref XP_388918.1

Tabla III-1. Probables péptidos determinados por huella peptídica o secuenciación *de novo* a partir de las fracciones C3A y C4A. (pMT51). Los corchetes indican indeterminaciones.

Péptido	Secuencia	Homología
m/z 1149,60	NLIPALKPGAR	<i>O</i> -metiltransferasa de <i>Gibberella zeae</i> PH-1 ref XP_388918.1
m/z 1401,20	[LT/DV]ESAP[O/K]P[L/I]SDDK	No encontrada
m/z 974,43	KDVYFFR	Hipotética <i>O</i> -metiltransferasa de <i>Magnaporthe grisea</i> ref XP_369010.2
m/z 918,50	PYAVS[L/I]	Péptido demasiado pequeño
m/z 1151,55	VV[L/I]NDYC[L/I]R	Hipotética <i>O</i> -metiltransferasa de <i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51 ref XP_001222423.1
m/z 1786,76	VAHDFP[Q/K]EARPK	Hipotética <i>O</i> -metiltransferasa de <i>Coccidioides immitis</i> ref XP_001245242.1

Tabla III-2. Probables péptidos determinados por huella peptídica o secuenciación *de novo* a partir de las fracciones C3B y C4B. (pMT48). Los corchetes indican indeterminaciones.

De los datos representados en la **Tabla III-1** obtenidos para la proteína con masa molecular aproximada de 51 KDa (grupo A) dedujimos que se trata de una 6-fosfogluconato deshidrogenasa y, obviamente podemos concluir que ésta no es la clorofenol-*O*-metiltransferasa que buscamos. Se trata de un enzima relativamente abundante en la célula eucariota que interviene en la ruta de las pentosas fosfato. Desconocemos el motivo de su marcaje con SAM tritiada aunque, obviamente, se trata de un marcaje inespecífico. Por el contrario, de los datos obtenidos para la proteína con masa molecular aproximada de 48 KDa (grupo B) podemos afirmar que se trata de una posible *O*-metiltransferasa, y por tanto, puede tratarse de la CPOMT de *T. longibrachiatum*. De hecho, la mayoría de los péptidos muestran una alta homología con la secuencia de péptidos correspondiente a *O*-metiltransferasas fúngicas de especies relativamente cercanas, como son *Gibberella zeae*, *Magnaporthe grisea* o *Chaetomium globosum*.

III-3. Clonación, secuenciación y caracterización del gen *cpomt* de *T. longibrachiatum*.

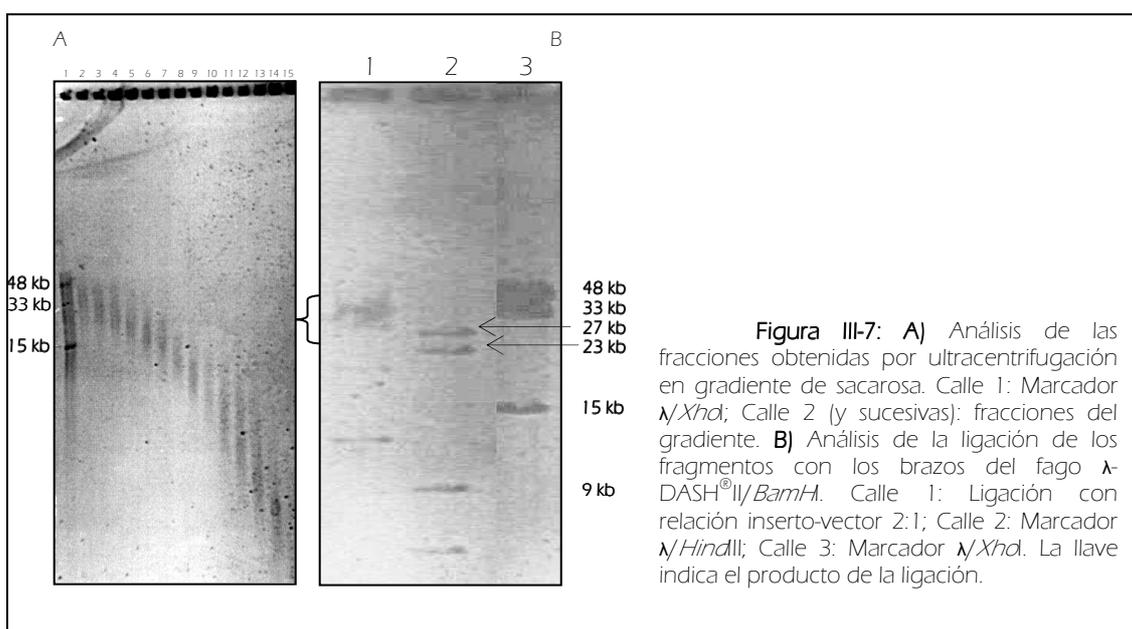
III-3.1 Construcción de una genoteca de ADN genómico de *T. longibrachiatum* en el vector fágico λ -DASH[®] II/*Bam*H.

III-3.1.1 Digestión parcial del ADN total de *T. longibrachiatum* con el enzima de restricción *Sau*3AI y ligación a los brazos *Bam*H del vector λ -DASH[®] II/*Bam*H.

El ADN total se obtuvo según el procedimiento descrito en el apartado II-7.1.4 de esta memoria. Para construir la genoteca necesitábamos fragmentos de ADN de un tamaño comprendido entre 15 y 21 Kb, ya que este es el tamaño que va a ser encapsidado preferentemente con respecto a tamaños inferiores o superiores. Los fragmentos de este tamaño pueden obtenerse mediante digestión parcial en las condiciones adecuadas y con un enzima de gran frecuencia de corte. Se eligió el enzima *Sau*3AI debido a que

genera extremos cohesivos compatibles con los generados por el enzima *Bam*HI, con el que está digerido el vector comercial λ -DASH[®]II/*Bam*HI. El método seguido para establecer las condiciones óptimas de la digestión parcial con el enzima *Sau*3AI se ha indicado en el apartado II-9.1 (Paso 1).

Tras la optimización de las condiciones de digestión parcial se realizó una digestión a gran escala para obtener una buena cantidad de fragmentos de ADN del tamaño deseado. Éstos se separaron mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Se analizaron alícuotas de las fracciones separadas en un gel de agarosa al 0,5%. (**Figura III-7A**). Las fracciones con los tamaños adecuados se ligaron con los brazos del fago λ -DASH[®]II/*Bam*HI. Una alícuota de estas ligaciones fue analizada en un gel de agarosa al 0,5% (**Figura III-7B**).



III-3.1.2 Titulación de la genoteca.

El empaquetamiento de las moléculas recombinantes de ADN obtenidas en la reacción de ligación es una condición indispensable para la obtención de unidades fágicas viables. La reacción de empaquetamiento *in vitro* se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones indicadas por el fabricante (Stratagene). Se realizaron infecciones con la suspensión de fagos empaquetados. Una vez realizado el recuento de las placas de lisis obtenidas se concluyó que el título de la genoteca era de 278.400 ufp/ml. Puesto que el volumen total de la genoteca era aproximadamente de 500 μ l, el número total de fagos recombinantes obtenidos fue de aproximadamente 139.200.

A continuación se realizó el cálculo para decidir si la genoteca era representativa según se indica en el apartado II-9.1 (**Paso 6**) de esta memoria. El valor calculado para N fue 10.129, asumiendo un tamaño medio de inserto de 15 Kb y como tamaño del genoma de *T. longibrachiatum* 33 Mb (Mäntylä *et al.*, 1992). Por lo tanto, la **genoteca construida era un orden de magnitud superior al necesario para ser representativa** del genoma de *T. longibrachiatum*.

III-3.2 Amplificación de un fragmento interno del gen *cpomt* mediante PCR.

Con objeto de clonar el gen que codifica el enzima CPOMT de *T. longibrachiatum* procedimos a rastrear la genoteca construida en el vector fágico λ-DASH[®] II/*Bam*H. En el momento de abordar los experimentos de clonación conocíamos las secuencias de los péptidos secuenciados tras la purificación del enzima. A partir de las secuencias de los 2 péptidos con mayor homología con secuencias de *O*-metiltransferasas fúngicas diseñamos cebadores degenerados (ver **Caja III-1**) para tratar de amplificar por PCR un fragmento interno del gen de la CPOMT que utilizaríamos como sonda para el rastreo de la genoteca.

NLIPALKPGA metDF: 5' AAC CTS ATY CCY GCY CTS AAG CCY GGY GC ³ metER: 5' GCR CCR GGC TTS AGR GCR GGR ATS AGG TT ³
VAHDFFOEA metEF: 5' GTY GCY CAY GAY TTY TTY CAR GAR GC ³ metDR: 5' GCY TCY TGR AAR AAR TCR TGR GCR AC ³

Caja III-1: Cebadores degenerados diseñados en sentido y en antisentido a partir de las secuencias de aminoácidos de los 2 péptidos seleccionados. Y: C+T; S: G+C; R: A+G.

Se realizaron a continuación reacciones de PCR con todas las combinaciones posibles que permitieron la amplificación de varios productos de PCR. Dichos productos se clonaron en el vector pGEM-T Easy[®] (Promega) y se procedió a su secuenciación. Posteriormente se realizaron análisis bioinformáticos de los clones sin encontrar en ningún caso homología entre los productos de PCR clonados y *O*-metiltransferasas fúngicas.

Decidimos entonces realizar un alineamiento de secuencias proteicas para detectar regiones conservadas en *O*-metiltransferasas fúngicas homólogas a aquellas que contenían péptidos similares a los determinados por secuenciación *de novo*.

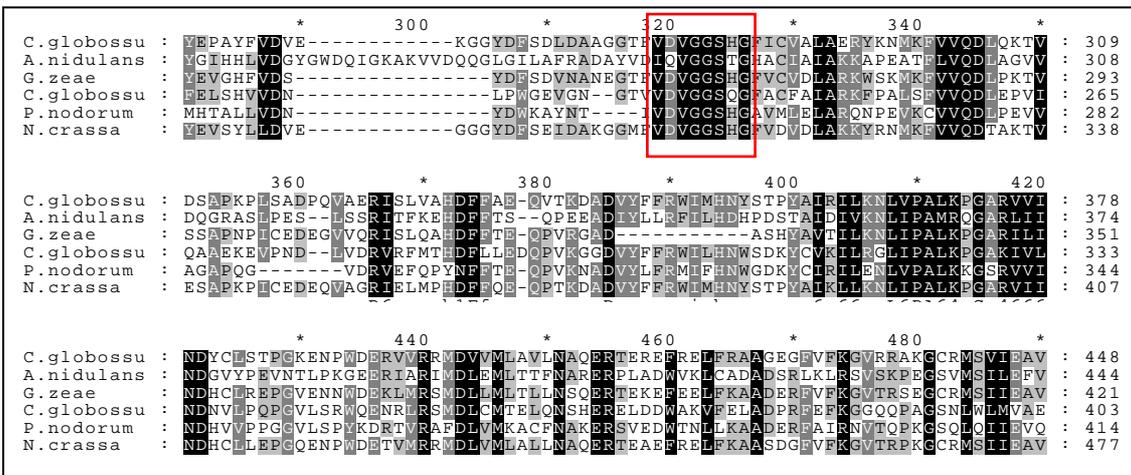


Figura III-8. Fragmento del alineamiento realizado para el diseño del oligonucleótido MTI-F1. En el recuadro rojo se indica la secuencia conservada que se utilizó para el diseño del oligonucleótido correspondiente.

Para ello se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos como se recoge en la **Figura III-8**. Basándonos en dicho alineamiento procedimos a diseñar un oligonucleótido degenerado frente a una de estas regiones conservadas con el que realizar combinaciones con los diseñados anteriormente (ver **Caja III-2**).

VDVGGSHG
MtTl-F1: 5' GTY GAY GTY GGY GGY TCY CAY GG 3'

Caja III-2: Oligonucleótido degenerado diseñado a partir de las secuencias de aminoácidos. Y: C+T

Se realizaron a continuación reacciones de PCR con las distintas combinaciones de cebadores. De esta manera se amplificó (empleando los cebadores MtTl-F1 y metER) un fragmento de PCR de unos 360 pares de bases, cuyo tamaño coincidía con el tamaño esperado. Seguidamente se clonó el fragmento obtenido en el vector pGEM[®]-T Easy, obteniéndose el plásmido pGEM-Mt. La secuenciación del inserto de dicho plásmido reveló la presencia de un marco de lectura abierto que presentaba una alta homología frente a distintas *O*-metiltransferasas fúngicas depositadas en las bases de datos.

III-3.3 Rastreo por PCR de la genoteca genómica de *T. longibrachiatum*.

Una vez amplificado el fragmento de PCR y tras secuenciarlo y comprobar que presentaba alta homología con varias *O*-metiltransferasas, decidimos diseñar cebadores internos a esta secuencia que deberían dar lugar a un único producto de amplificación específico que nos permitiera rastrear la genoteca. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la **Caja III-3**.

CPOMT-F1	5' CCA AAC GGT GGA AGG ACA TGA GGT TCA TCG 3'
CPOMT-R1	5' CCG AAG AAT GGA AAC GGC GTA TGG CTT GGC 3'

Caja III-3: Cebadores diseñados a partir de la región interna secuenciada del gen de la hipotética CPOMT.

Seguidamente realizamos reacciones de PCR utilizando ADN total de *T. longibrachiatum* para comprobar la especificidad de los cebadores, obteniendo una única banda de unos 290 pb que tras ser clonada en el vector pGEM[®]-T Easy fue secuenciada y analizada bioinformáticamente (**Figura III-9**) confirmando que el producto génico codificado correspondía a la región interna de una *O*-metiltransferasa. Este amplicón (CPOMTF1R1) fue utilizado como control positivo en el rastreo de la genoteca de *T. longibrachiatum*.

La genoteca fue entonces rastreada por PCR según la técnica descrita por Vaiman (2002) utilizando los cebadores CPOMTF1 y CPOMTR1.

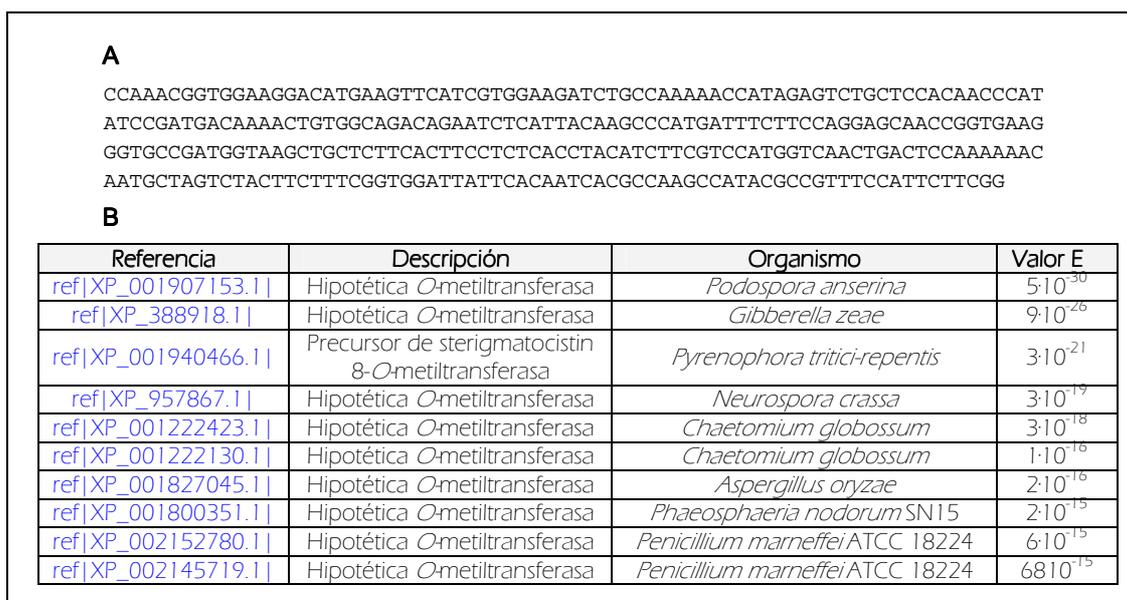
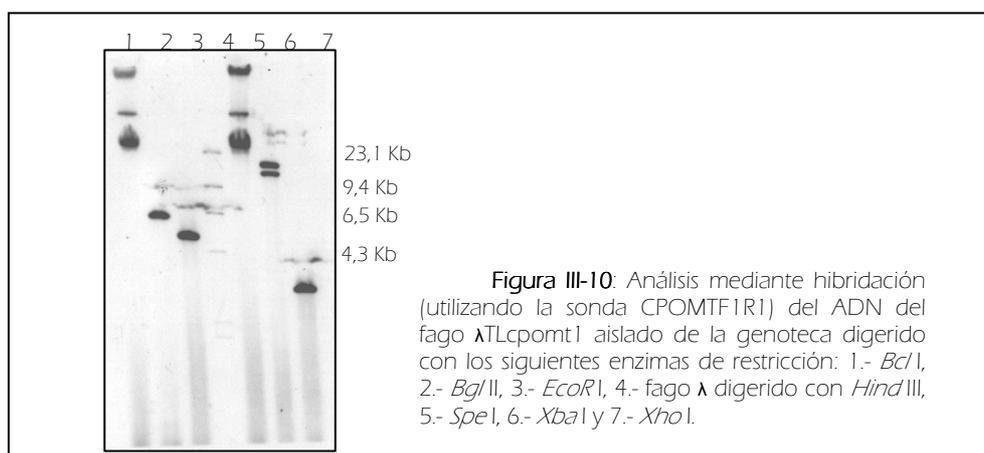


Figura III-9. A: Secuencia nucleotídica del fragmento de 290 pb (amplicón CPOMTF1R1) amplificado con los cebadores CPOMT-F1 y CPOMT-R1. **B:** Resultado obtenido al comparar la secuencia aminoacídica deducida a partir del fragmento amplificado, en el servidor BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) contra la base de datos de proteínas BLASTP (*Basic Local Alignment Search Tool Protein-Protein*). El valor E representa la probabilidad de que la secuencia comparada sea distinta de la obtenida en la base de datos (cuanto menor es el valor E, mayor es la similitud existente entre ambas secuencias), esencialmente, el valor de E describe el "ruido de fondo" (producido al azar) que existe entre las secuencias comparadas.

III-3.4 Determinación y análisis de la secuencia nucleotídica.

A partir de dicho rastreo se identificó un fago recombinante positivo (fago λ TLcpomt1) y se procedió a subclonar un fragmento interno que portaba el hipotético gen *cpomt*. Para ello se realizaron una serie de digestiones del ADN del fago λ TLcpomt1 que posteriormente se analizaron por hibridación para detectar en qué bandas estaba localizado el gen *cpomt*. El resultado de dicha hibridación se muestra en la **Figura III-10**. Como podemos apreciar la hibridación nos permitió detectar una banda, en la digestión con el enzima *EcoRI*, de un tamaño aproximado de 5 Kb que podría contener el gen *cpomt* completo, por lo que decidimos proceder a su subclonación. Para ello se realizaron reacciones de ligación entre dicha banda extraída de un gel de agarosa y el plásmido comercial pBluescript KS(+) (Promega) previamente digerido *EcoRI*, dando lugar al plásmido pBMTE1.



A continuación el inserto presente en el plásmido pBMTE1 (ver **Figura III-11**) fue secuenciado. La secuencia obtenida se analizó empleando el paquete informático del programa DNASTAR permitiendo de esta forma la localización de un marco de lectura abierto completo de 1637 pb, al que denominamos ORF1 y que estaba interrumpido por 4 posibles intrones. La presencia de posibles intrones en ORF1 se determinó bioinformáticamente utilizando para ello los programas informáticos disponibles en diferentes *webs* como por ejemplo Gene Builder (<http://125.itba.mi.cnr.it/~webgene/genebuilder.html>), GeneMark (www.ebi.ac.uk/genemark/) o GlimmerM (<http://www.tigr.org/tdb/glimmerm/glmrform.html>). (Ver **Figura III-12**).

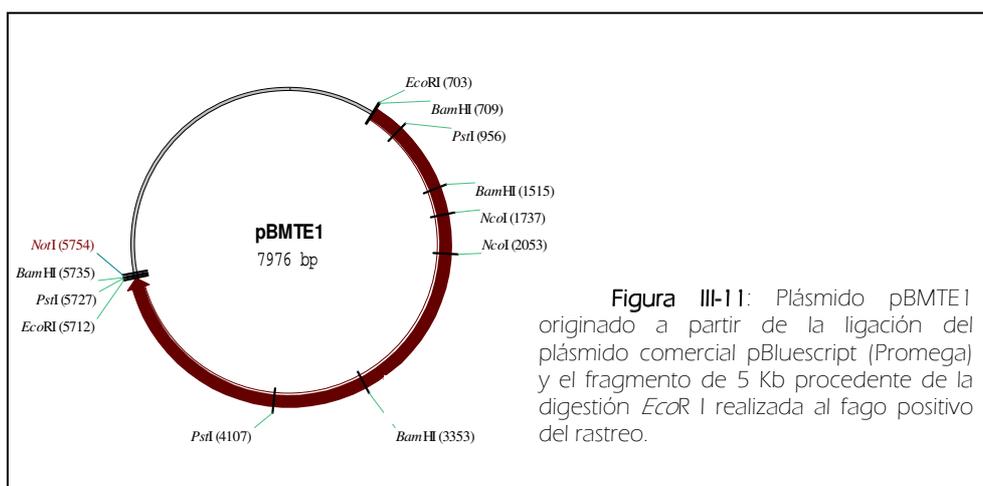


Figura III-11: Plásmido pBMTE1 originado a partir de la ligación del plásmido comercial pBluescript (Promega) y el fragmento de 5 Kb procedente de la digestión *EcoRI* realizada al fago positivo del rastreo.

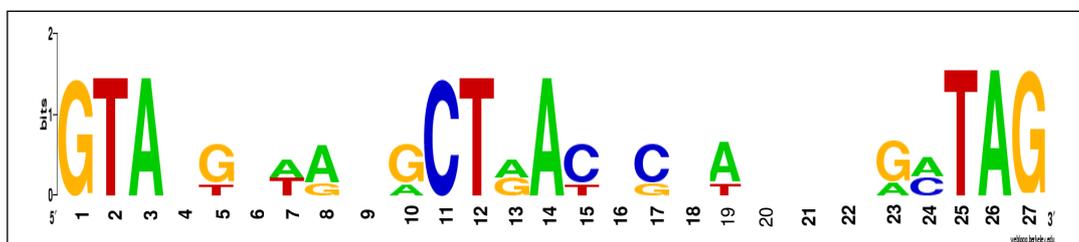


Figura III-12: Representación gráfica de las secuencias consenso presentes en los 4 intrones del hipotético gen *cpomt* de *T. longibrachiatum*. Los 8 primeros nucleótidos corresponden al extremo 5' del intrón. Del 10 al 17 corresponden con la posible secuencia lariat y los 9 nucleótidos finales (19 al 27) corresponden al extremo 3' del intrón. La representación gráfica se obtuvo con el programa Logos (Crooks *et al.*, 2004) (<http://weblogo.berkeley.edu/>).

La existencia de estos hipotéticos intrones fue posteriormente confirmada mediante la técnica de RT-PCR (descrita en el apartado II-8.3.1 de Materiales y Métodos), utilizando como molde ARN extraído de cultivos de *T. longibrachiatum* de 3 días inducidos con 2,4,6-TCP, tal como se indica en el apartado II-11.1. Para ello se diseñaron cebadores que flanqueaban los hipotéticos intrones determinados informáticamente. También se utilizó un oligonucleótido poli-T para amplificar el extremo 3' del gen. Las secuencias de todos ellos se muestran en la **Caja III-4**.

MTRT-F1	⁵ TCG TCG CTG TCG ACC GAA CGC AAC ³
MTRT-R1	⁵ CGC GGA ATA TAT TGT TAG TCA TGG ³
MTRT-R2	⁵ TCG GCT GCT TCA AAC AAC TCG CGA ³
MTRT-R3	⁵ CAT CCC AAA CTG CCT CAA TGA CGC ³

Caja III-4: Cebadores diseñados a partir de la secuencia del gen de la hipotética CPOMT.

Posteriormente estos productos de PCR fueron clonados en el plásmido pBluescript KS (+) (Promega) previamente digerido con *EcoRV* y secuenciados. El número, tamaño y localización de los intrones se determinó mediante el alineamiento de las secuencias de ADN genómico y ADNc. Los resultados mostraron que el ORF1 contenía 4 intrones de 56, 50, 71 y 56 nucleótidos respectivamente, los cuales, eran eliminados en los sitios de procesamiento correspondientes localizados entre los nucleótidos: 360–415, 462–511, 1184–1254 y 1521–1576, enumerados a partir del codón de inicio de la transcripción ATG (Figura III-13). Así pues, el gen correspondiente a la ORF1, presenta un marco de lectura abierto de 1637 pb y, una vez procesados los 4 intrones, codifica para una proteína de 468 aminoácidos con una masa molecular deducida de 52,4 KDa y un punto isoelectrico teórico de 5,93.

La región promotora de este gen se analizó utilizando la base de datos de Genomatix (<http://www.genomatix.de/>) y mediante los programas *MatInspector Release Professional* V7.4.2 (Quandt *et al.*, 1995) y *Alibaba 2*. En un primer análisis de la zona promotora del gen *cpomt*, destaca la presencia de una posible caja TATA (attataa) ubicada en la posición -128 a -120 contando desde el ATG inicial (ver **Tabla III-3**).

tggtggacactactgctcagatgctg
ctatgagaccggtggacatgggacgcatctgatatgcaagtccacggaag
tcgtaagaccatctgcttgacagctgcagctcggggtctcggggtctcgg
ttattggatcagtatattggacatcattgacaccaatgcctcaatggggc
aagtcgaaggtcgccatggacaaatggtcaggctgattccatcaaccgcg
gggatcgcatctgcatggccatgactccttgacggggttcctaacttccg
gctcccggcaggacagaaagacatgactctgatctggcaactttcttgtt
gctgaatgctgttactgcttcgatccctcatggggccgacgggacgctcaa
gtgttgggttacactgagatggacacctgacaaagcgccatgactacaga
ccagttacgattttatacagagcacattataagatcctccatctttgccc
tgactattgctcttgttccatatacccatcgttgttcgctcatctgatatct
tctaactacctttccttacagcactcttcgctccattccacctttgtgta
caATG GCCGAGCTCAGAGCTCCGTCGTCGCTGTCGACCGAACGCAACGGG
M A E L R A P S S L S T E R N G
TCCGCATCAAACACGGACGTGACAAAGCTTAATCATTTGTACCA
S A S N T D V D K Q K L N H L Y Q
GAATGGAAACAAGAAGACAGGGTCTGCAGAGTCTCGGATGCTCGTGTGG
N G N K K T G S A E S R M L V L
CGGAGACGATCCGCGCTGAGACCCAGAAGCTGCACGCCTATCTCGAGTCC
A E T I R A E T Q K L H A Y L E S

AACGGTATAGCTCAACCAGACCTCAGCGTTGATGCACCGGACGATTTCCC
N G I A Q P D L S V D A P D D F P
ACCTTTACCTGATGAGATTCAAGAGAGCAGACAAAAGATCTTTCTCGCTT
P L P D E I Q E S R Q K I F L A
CTCGAGAACTTACCGATATTGTCAGGGGTCCTCGTGAAACTGTGCGATAT
S R E L T D I V R G P R E T V R Y
GCCGTTTGGAGTgtaagaaatattctatcctccagcgggtctcgttttcat
A V W S
gctaatgcaactcgatagTATCTAGATACCTTGAGCCTGCAACTCATCAA
Y L D T L S L Q L I N
CAGCTATGGAATTGgtacttaaggatacaccctacagttagagcatcgc
S Y G I
tgactgtcaaatagCCAAGCTCGTCCCCCTGGATGCTCCCATCAAGCTGA
A K L V P L D A P I K L
CCGAGCTGCAATCCAAGACTCCGCTGGAGCCTGTCCACCTTGCCCGTGCT
T E L Q S K T P L E P V H L A R A
TTACGCCACGCCATGACTAACAATATATTCCGCGAGCCGTCTCCGGGATA
L R H A M T N N I F R E P S P G Y
CATTGCCCATACCTCAAGTTCACGGATACTGGCACAGGATCCCGCTCTTC
I A H T S S S R I L A Q D P A L
AGGCCTGGGTTGGCTTCAATTCGGAAGACGCCTTTCTGCTGCCGGTCAT
Q A W V G F N S E D A F P A A G H
GTGCTGCAAGCCTTGAAGGACCATCCAGAGGCAATCTCCAGTACACATGC
V L Q A L K D H P E A I S S T H A
AGGGTTCAACTATGCTTTCAACACGGTTGGCCAAGAACCATGTTTGGCAA
G F N Y A F N T V G Q E P M F A
CCCTTGGTAAAGATCTGGCCAGAGCTAAGCGATTTCGCCAAGCGATGCAC
T L G K D L A R A K R F A Q A M H
AGCTTTTCCCATGGAGAGGGCTACAAAGTCAGTTACTTTGTGGACAACTA
S F S H G E G Y K V S Y F V D N Y
TGACCTTTCCGAAGTCGACAAGCGCGGGGGCACATTTGTCGATATTGGCG
D L S E V D K R G G T F V D I G
GTAGTCATGGCTTCGTATCCGTGGAGCTGGCCAACCGGTGGAAGGACATG
G S H G F V S V E L A K R W K D M
AAGTTCATCGTGGAAGATCTGCCAAAACCATAGAGTCTGCTCCACAACC
K F I V E D L P K T I E S A P Q P
CATATCCGATGACAAAACCTGTGGCAGACAGAATCTCATTACAAGCCCATG
I S D D K T V A D R I S L Q A H
ATTTCTTCCAGGAGCAACCGGTGAAGGGTGCCGATGgtaagctgctcttc
D F F Q E Q P V K G A D
acttctctcacctacatcttcgtccatggtcaactgactccaaaaaca
atgctagTCTACTTCTTTTCGGTGGATTATTACAAATCACGCCAAGCCATA
V Y F F R W I I H N H A K P Y

CGCCGTTTCCATTCTTCGGAATCTCATCCCCGCACTCAAGCCGGGAGCTC
 A V S I L R N L I P A L K P G A
 GCGTCGTCATCAACGATTACTGTATCCGTGAGGCTGGATCGGAGAATGCA
 R V V I N D Y C I R E A G S E N A
 TGGGATGAGAAGCTCTTGAGGAACATGGACATGATTATGGGTGCGCTCTT
 W D E K L L R N M D M I M G A L L
 GAACGCACAGGAGCGAGAAGAATGGGAGTTTCGCGAGTTGTTTGAAGCAG
 N A Q E R E E W E F R E L F E A
 CCGACCCCAGGTTCAAGTTCAAGgtatgctattacatttcctttcctga
 A D P R F K F K
 cccgtgtgcggttgctaacacttggctagGGAGTCCAGAGAGTTGAAAAT
 G V Q R V E N
 TGTAAGATGAGCGTCATTGAGGCAGTTTGGGATGAGTAAgacgtggagag
 C K M S V I E A V W D E .
 gcaaggtcgacgagagcgagggat

Figura III-13: Secuencia nucleotídica y aminoacídica correspondiente al hipotético gen *cpomt* de *T. longibrachiatum*. Se han señalado sobre la secuencia los 5 exones (en amarillo), los 4 intrones (en rosa y en minúsculas), el ATG inicial y el codón de paro (en rojo), una de las dos posibles cajas asociadas con elementos de respuesta de resistencia pleiotrópica a drogas (en morado), los probables factores de unión a CCAAT (en verde), un elemento de regulación por metales (en gris), un sitio de unión *Xhd* en *S. cerevisiae* (negro) y la posible caja TATA (en celeste). Los elementos de regulación situados en la hebra (-) se indican subrayados con puntos. También se detallan los motivos conservados en las *O*-metiltransferasas fúngicas en marrón sobre la secuencia aminoacídica.

Familia / Matriz	Información	Posición	Core	Matriz	Secuencia	Hebra
PDRE/ PDRE01	Elementos de respuesta de resistencia pleiotrópica a drogas	-504	1.000	0.973	TCCGtg ^{gac}	(-)
PDRE / PDRE01	Elementos de respuesta de resistencia pleiotrópica a drogas	-503	0.787	0.910	TCCAc ^{gga}	(+)
YCAT / HAP234.01	Factores de unión a CCAAT en levaduras	-440	1.000	0.945	ctgatCCA ^A ta ^c	(-)
MREF / CUSE.01	Elemento de regulación por metales (<i>Copper signaling element</i>)	-246	1.000	0.911	ttcttg ^{ttGCT} Gaat	(+)
SXBP / XBP.01	Proteína de unión al sitio <i>Xhd</i> de <i>S. cerevisiae</i>	-227	1.000	0.890	ggaTCGA ^{agca} gt	(-)
YCAT / HAP234.01	Factor de unión a CCAAT en levaduras	-217	1.000	0.894	cggccCCA ^A tga ^g	(-)
TBPF / LTATA.01	Factor de unión a TATA	-118	1.000	0.843	attTATA ^{agatcct} cca	(+)

Tabla III-3: Listado de las secuencias de reconocimiento por diversos factores de transcripción en la región promotora del gen *cpomt*, obtenido con los programas MatInspector y MATCH. Se indican el tipo de factor de transcripción, la matriz de secuencias utilizada en su determinación, el coeficiente de similitud a la secuencia "core", el coeficiente de similitud a la matriz de secuencias y la posición de la secuencia con respecto al codón de inicio.

Entre otras secuencias se halló también una caja CAAT. Este tipo de cajas se encuentran presente en casi el 30% de los genes de eucariotas conocidos, normalmente localizadas en los primeros 200 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Davis y Hynes, 1991).

Resulta interesante el hallazgo de dos sitios Xbp1 (*Xho*I site binding protein 1), una secuencia palindrómica con un sitio de corte *Xho*I en el centro de la caja de reconocimiento. Este tipo de proteínas actúa como un represor transcripcional inducido por condiciones de estrés (Mai y Breeden, 1997). Su posición en la secuencia promotora y el alto coeficiente de similitud nos sugiere que el hipotético gen *cpomt* puede estar regulado tanto positiva como negativamente como respuesta ante una situación de estrés. También cabe recalcar la presencia de dos probables sitios de unión relacionados con drogas (PDRE). LeCrom *et al.*, (2002) describen la presencia de estas regiones regulando genes involucrados en la degradación de compuestos aromáticos provenientes de la lignocelulosa. Por último cabe destacar la presencia de elementos de regulación por metales (MRE), más concretamente elementos regulación por cobre, ya que se ha demostrado que los enzimas relacionados con la degradación de ligninas y compuestos fenólicos (como lignino-peroxidasas, manganeso-peroxidasas y lacasas) también están reguladas por elementos de respuesta a metales (Bollag *et al.*, 1984; Gold *et al.*, 1993; Alic *et al.*, 1997; Palmieri *et al.*, 2000).

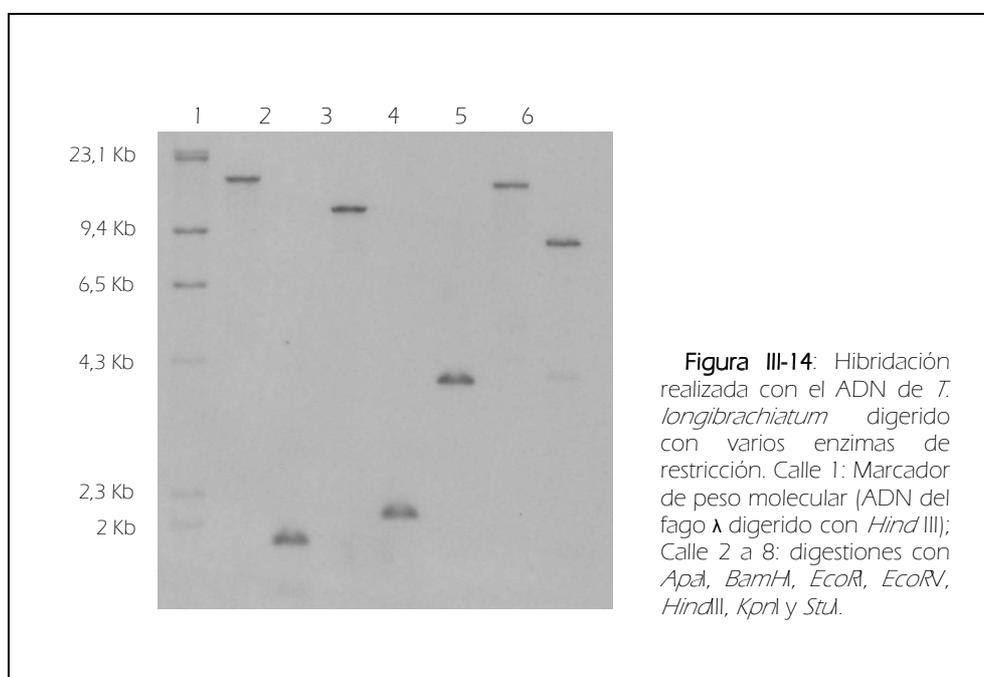
III-3.5 Análisis del número de copias del gen *cpomt* en el genoma de *T. longibrachiatum*.

Una vez conocida la secuencia del gen *cpomt* se procedió a comprobar la posibilidad de que existiesen más copias del mismo gen en otro locus diferente del genoma de *T. longibrachiatum*.

Al conocer la secuencia completa de *cpomt* y de las regiones adyacentes podemos diseñar el experimento escogiendo enzimas de restricción que originen fragmentos de tamaño determinado, o bien seleccionar enzimas que corten fuera de la secuencia conocida originando fragmentos de gran tamaño que nos serán útiles a la hora de visualizar si existe más de una copia del gen. Con este propósito, se digirió el ADN genómico de *T. longibrachiatum* con los enzimas de restricción *Apa*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I y *Stu*I. Tras la transferencia del gel (siguiendo la metodología descrita en el apartado II-7.4 de Materiales y Métodos) se realizó la hibridación utilizando como sonda un fragmento de PCR de aproximadamente 900 pb amplificada utilizando los oligonucleótidos MTATENF2 (ver **Caja III-5**) y MTRT-R2 (ver **Caja III-4**) que abarca la región central de *cpomt*.

Como se muestra en la **Figura III-14** solamente se detecta una única señal de hibridación en la mayoría de las digestiones incluso en aquellas que originan fragmentos de

gran tamaño (más de 18 Kb), con la salvedad de la digestión realizada con *StuI* (ver calle 8) debido a que corta dentro del gen *cpomt*. **Este resultado evidencia la presencia de una única copia del gen *cpomt* en el genoma.** Las variaciones en la intensidad de las bandas son debidas únicamente a leves diferencias en la cantidad de ADN digerido para el experimento.



III-3.6 Análisis de la secuencia de aminoácidos de la *O*-metiltransferasa de *T. longibrachiatum* deducida a partir del gen *cpomt*.

III-3.6.1 Análisis funcional de la secuencia: búsqueda de homólogos.

Dado que las búsquedas en las bases de datos de proteínas son del orden de 5 veces más sensibles que las realizadas en bases de datos de ADN, se utilizaron los programas BLASTP y TFASTA. Utilizando dichos programas, se realizaron búsquedas comparativas de la secuencia de aminoácidos de la hipotética proteína CPOMT de *T. longibrachiatum* con las secuencias depositadas en la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Al realizar dicha comparación (ver la **Tabla III-4**) se obtuvo una alta similitud con numerosas *O*-metiltransferasas fúngicas (algunas de las cuales aparecen como proteínas hipotéticas) pertenecientes a la superfamilia de metiltransferasas del tipo II SAM dependientes. Llama la atención el hecho de que en algunas especies como *Penicillium marneffe* ATCC 18224 (4), *Chaetomium globosum* (3) o *Phaeosphaeria nodorum* (2) existen (solamente entre las 20 primeras secuencias analizadas) varias proteínas homólogas, como podemos apreciar en la **Tabla III-4**.

Referencia	Descripción	Organismo	Valor E
ref XP_957867.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Neurospora crassa</i>	$2 \cdot 10^{-140}$
ref XP_001907153.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Podospora anserina</i>	$9 \cdot 10^{-133}$
ref XP_388918.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Gibberella zeae</i>	$3 \cdot 10^{-130}$
ref XP_001222423.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Chaetomium globosum</i>	$6 \cdot 10^{-119}$
ref XP_002147397.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224	$2 \cdot 10^{-70}$
ref XP_001222130.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Chaetomium globosum</i>	$7 \cdot 10^{-70}$
gb EED16326.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	$9 \cdot 10^{-67}$
ref XP_002148454.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224	$3 \cdot 10^{-65}$
ref XP_001940466.1 	Precursor de sterigmatocistin 8-O-metiltransferasa	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	$6 \cdot 10^{-61}$
ref XP_001800351.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	$1 \cdot 10^{-58}$
ref XP_663019.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Aspergillus nidulans</i>	$6 \cdot 10^{-58}$
ref XP_001905663.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Podospora anserina</i>	$2 \cdot 10^{-56}$
ref XP_002152780.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224	$1 \cdot 10^{-55}$
ref XP_001228816.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Chaetomium globosum</i>	$2 \cdot 10^{-55}$
ref XP_002145719.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224	$4 \cdot 10^{-55}$
ref XP_001395606.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Aspergillus niger</i>	$8 \cdot 10^{-55}$
ref XP_001558281.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10	$2 \cdot 10^{-54}$
gb EED13971.1 	Hidroxiindol O-metiltransferasa	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	$1 \cdot 10^{-51}$
ref XP_001584679.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	$1 \cdot 10^{-51}$
ref XP_001798602.1 	Hipotética O-metiltransferasa	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	$1 \cdot 10^{-51}$

Tabla III-4: Resultado obtenido al comparar la secuencia aminoacídica deducida a partir del gen *cpomt* en el servidor BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) contra la base de datos de proteínas BLASTP (*Basic Local Alignment Search Tool Protein-Protein*). El valor E representa la probabilidad de que la secuencia comparada sea distinta de la obtenida en la base de datos (cuanto menor es el valor E, mayor es la similitud existente entre ambas secuencias). Esencialmente, el valor de E describe el "ruido de fondo" (producido al azar) que existe entre las secuencias comparadas.

La secuencia de aminoácidos deducida del ORF1 se comparó con las de aquellas O-metiltransferasas fúngicas (6) que presentaban una mayor homología. Para ello utilizamos el programa informático *ClustalW* (**Figura III-14**). Los porcentajes de identidad de la proteína codificada por el ORF1 con estas proteínas fúngicas se muestran en la **Tabla III-5**. Todos estos datos confirmaban que el ORF1 codificaba una O-metiltransferasa. Por tanto a partir de ahora denominaremos al ORF1 gen *cpomt* y a la proteína codificada, CPOMT de *T. longibrachiatum*.

	Tl						
Tl	100 0	Pa					
Pa	48 63	100 0	Nc				
Nc	47 62	62 74	100 0	Gz			
Gz	53 69	49 58	49 60	100 0	Cg		
Cg	46 60	58 71	58 71	45 57	100 0	Pm	
Pm	34 54	31 47	31 45	35 55	29 45	100 0	Ts
Ts	32 51	27 44	28 43	30 47	25 42	34 53	100 0

Tabla III-5: Porcentajes de homología a nivel de aminoácidos entre pares de secuencias realizada con el programa GeneDoc. El primer valor de cada celda representa los residuos idénticos entre las dos secuencias; el segundo valor (de cada celda) representa los residuos similares (sustituciones conservativas). En la diagonal valores del emparejamiento de la secuencia consigo misma. En gris se remarcan los valores para la proteína de *T. longibrachiatum*. Todos los valores están expresados como porcentajes. **Tl:** *Trichoderma longibrachiatum*, **Pa:** *Podospora anserina*, **Nc:** *Neurospora crassa*, **Gz:** *Gibberella zeae*, **Cg:** *Chaetomium globosum*, **Pm:** *Penicillium marneffe* ATCC 18224 y **Ts:** *Talaromyces stipitatus*.

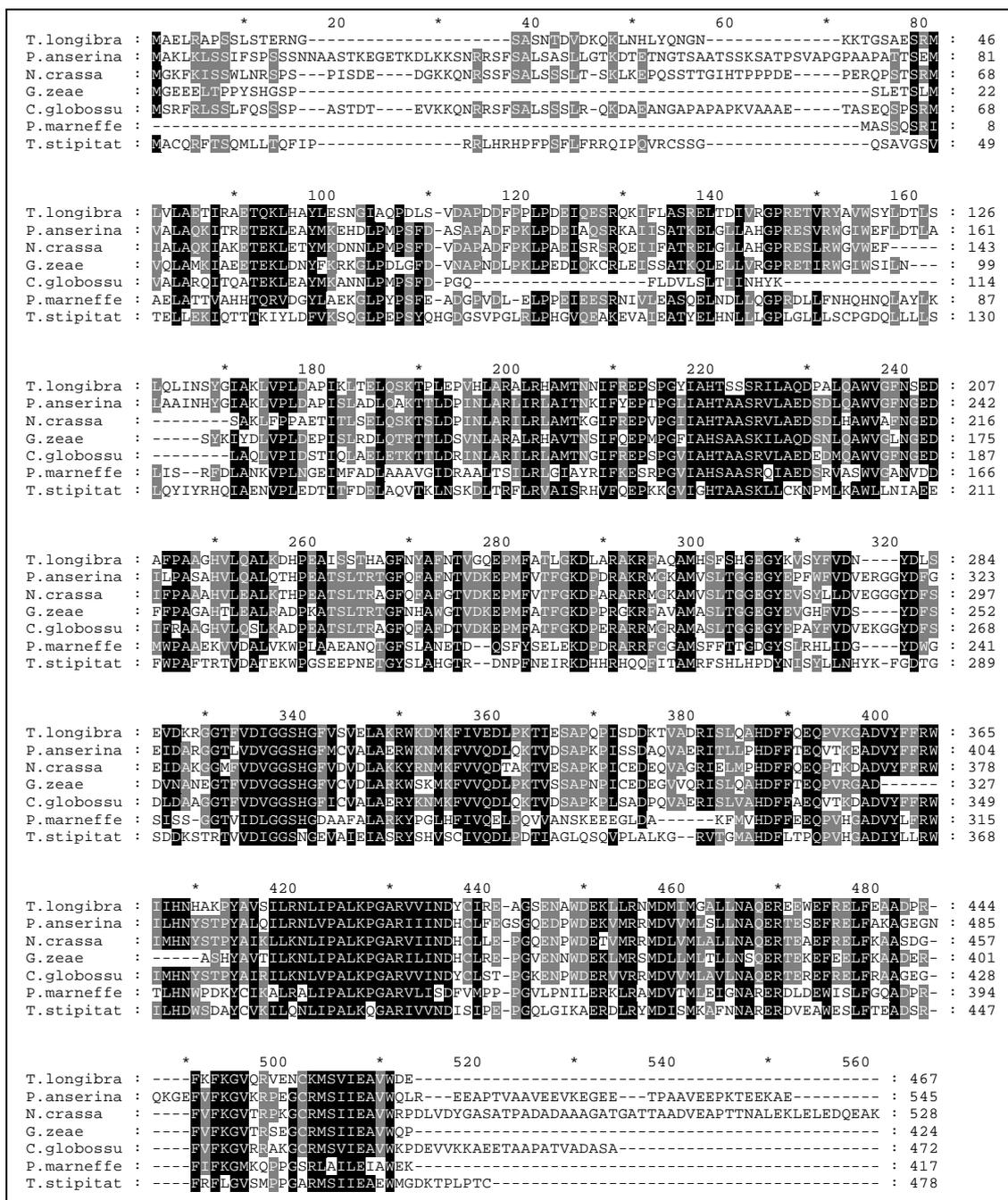


Figura III-14: Alineamiento múltiple, realizado con el programa ClustalW, utilizando las secuencias aminoácidas de las 6 O-metiltransferasas fúngicas que mostraban mayor homología con la O-metiltransferasa codificada por el gen *cpomt* de *T. longibrachiatum*. *T.longibra*: *Trichoderma longibrachiatum*; *P.anserina*: *Podospora anserina*; *N.crassa*: *Neurospora crassa*; *G.zeae*: *Gibberella zeae*; *C.globossu*: *Chaetomium globossum*; *P.marneffe*: *Penicillium marneffe* ATCC 18224; *T.stipitat*: *Talaromyces stipitatus*. Para la edición gráfica del alineamiento se utilizó el programa GeneDoc.

III-3.6.2 Caracterización de la estructura primaria.

III-3.6.2.1 Composición aminoácida, peso molecular y secuencias repetidas.

La composición aminoácida de la proteína deducida se caracteriza por presentar un porcentaje elevado en residuos alanina (10,3%), leucina (8,8%), serina (7,3%), ácido glutámico (7,3%) y valina (6%). Es importante resaltar la presencia de un número relativamente alto de aminoácidos aromáticos (9%). Dichos resultados se obtuvieron a

través del servidor EXPASY, en su apartado de “Proteomics tools” utilizando el programa ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/>).

Mediante el programa SAPS (*Statistical Analysis of Protein Sequences*), el cual evalúa por criterios estadísticos una amplia variedad de propiedades de una secuencia proteica (Brendel *et al.*, 1992), se realizó un estudio de las estructuras repetitivas de la secuencia de la proteína de 468 aminoácidos. Las estructuras repetitivas encontradas en la secuencia aminoacídica se detallan en las **Tablas III-6 y III-7**.

Secuencia Repetida	Ubicación
LARA	161- 164
LARA	253- 256

Tabla III-6: Secuencias repetidas halladas por el programa SAPS (*Statistical Analysis of Protein Sequences*) en la secuencia de la proteína y su ubicación contando a partir del codón de inicio.

Ubicación	Periodo	Elemento	Copias
129- 173	9	L	5
430- 441	3	E	4

Tabla III-7: En la tabla se observan los resultados obtenidos con el programa SAPS (*Statistical Analysis of Protein Sequences*) al realizar un análisis de periodicidad sobre la secuencia proteica. El programa identifica elementos periódicos en periodos variables (entre 1 y 10). La ubicación es a partir del codón de inicio.

III-3.6.2.2 Predicción de dominios.

La predicción de dominios y de la familia de la proteína se realizó utilizando diversas herramientas bioinformáticas, tales como Pfam (*Protein families database of alignments*; <http://www.sanger.ac.uk/Pfam/>). Las metiltransferasas exhiben varios segmentos conservados en sus secuencias lo que sugiere una probable conservación de la función en dichos segmentos. El Motivo A tiene una secuencia consenso (V,I,L)(V,L)(D,K)(V,I)GGXX(G,A), correspondiéndose en la hipotética CPOMT con la secuencia **VDIGGSHG**. Es una zona rica en glicina y está conservado en la mayoría de metiltransferasas SAM dependientes, incluso en plantas (Ibrahim *et al.*, 1998) ya que es parte del sitio de unión de este cofactor. El Motivo B tiene una secuencia consenso (V,I,F)(A,P,E)X(A,P,G)DAXXXK(W,Y,F), que se corresponde con la secuencia **VKGADVFFRW** en la proteína caracterizada. Este motivo también está relacionado con la unión a SAM. Es llamativo el hecho de que la distancia entre los motivos A y B está conservada en diversas metiltransferasas de plantas existiendo 52 aminoácidos de separación entre ambos, así como también en la CPOMT de *T. longibrachiatum* ya que son 53 los aminoácidos entre los dos motivos. Tal como ha sido descrito por Chandrashekhar *et al.* (1998) esta alta conservación, tanto en la secuencia como en su disposición espacial, indican que la relación específica entre estos dos motivos puede ser esencial para la unión de SAM. Según Chandrashekhar *et al.* (1998) existe un tercer motivo, el motivo C, que está menos conservado en las especies estudiadas, tanto en secuencia como en la separación del mismo con respecto al motivo B. Su secuencia

consenso es (A,P,G,S) (L,I,V) (A,P,G,S) XX (A,P,G,S) (K,R) (V,I) (E,I) (L,I,V), aunque solo una de las glicinas suele estar conservada. En la CPOMT de *T. longibrachiatum* la secuencia conservada sería **PALKPGARVVI**. Este motivo se encuentra a una distancia de 22 ± 5 aminoácidos (en nuestro caso a 19). Estos tres motivos están directamente relacionados con la unión de SAM a la proteína, aunque existen metiltransferasas de diversos sustratos que no contienen estos motivos conservados en su secuencia (Kagan y Clarke, 1994). Otros autores postulan la existencia de otros motivos con diferente nomenclatura, entre ellos el Motivo IV (cuya secuencia consenso es PCQ) el cual sería parte del sitio activo, pero que no está conservado en la secuencia de la hipotética O-metiltransferasa de *T. longibrachiatum*.

III-3.6.2.3 Predicción de sitios de glicosilación.

A través del servidor ExPASy, en su apartado de “Proteomics tools” (<http://us.expasy.org/tools/>) se realizó un estudio sobre los posibles puntos de glicosilación de la proteína utilizando el servidor web NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). A pesar de no presentar un péptido señal el programa NetNGlyc identificó un posible sitio de glicosilación (Asparagina-Glicina-Serina-Alanina) correspondiente con los aminoácidos 15-18 (**Figura III-15**).

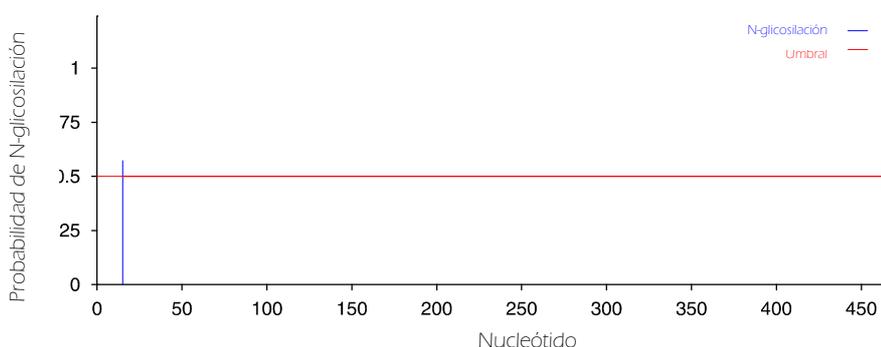


Figura III-15: Representación gráfica de los resultados obtenidos al analizar la secuencia aminoacídica (deducida a partir del hipotético gen *cpomt*) con el programa NetNGlyc. En el eje Y, se representa la probabilidad de que determinado residuo sea glicosilado (líneas azules verticales), en rojo se representa la probabilidad umbral establecida por el programa. De haber algún residuo aminoacídico con una alta probabilidad de ser glicosilado sería señalado con una estrella roja.

Con el programa YinOYang 1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>) se realizó un estudio de los posibles puntos de O-β-glicosilación (**Figura III-16**) que podría presentar la hipotética CPOMT de *T. longibrachiatum* a lo largo de toda su secuencia. Los resultados muestran que a pesar de poseer 52 aminoácidos susceptibles de ser glicosilados a través de O-glicosilación (serina y treonina), y que siete de ellos (Ser⁹, Thr¹⁴⁸, Thr¹⁸⁵, Ser¹⁸⁶, Ser¹⁸⁸, Ser²²⁷ y Ser³³³) superan el límite inferior de potencialidad, ninguno de ellos reúne una puntuación óptima para ser considerado como un sitio factible de ser O-β-glicosilado.

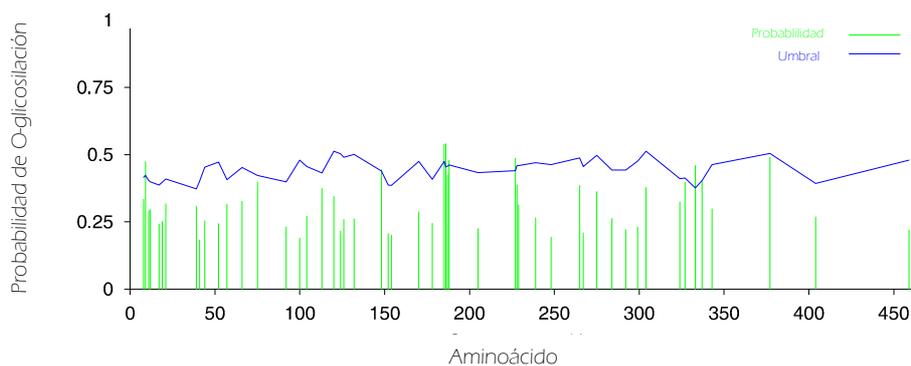


Figura III-16: Representación gráfica de los resultados obtenidos al analizar la secuencia aminoacídica (deducida a partir del hipotético *cpomt* con el programa YinOYang). En el eje Y, se representa la probabilidad de que determinado residuo sea O-glicosilado (líneas verdes verticales), en azul se representa la probabilidad umbral establecida por el programa. De haber algún residuo aminoacídico con una alta probabilidad de ser O-glicosilado sería señalado con una estrella roja.

III-3.6.2.4 Predicción de la formación de puentes disulfuro.

Mediante el programa CYPRED a través del servidor de PredictProtein-PHDsec (<http://www.predictprotein.org/>) se realizó un análisis de los residuos de cisteína presentes en la secuencia con la finalidad de averiguar su intervención en la posible formación de puentes disulfuro en la proteína clonada (Fariselli *et al.*, 1999). En nuestro caso no se detectó ningún residuo de cisteína que pudiera formar un puente disulfuro.

III-3.6.3 Predicción de la estructura secundaria.

Con el propósito de profundizar sobre la caracterización de la proteína deducida del hipotético gen *cpomt* se procedió a estudiar *in silico* su estructura secundaria.

Para ello se utilizaron diversos programas disponibles en servidores tales como: PredictProtein-PHDsec (The PredictProtein server, Columbia, USA; <http://www.predictprotein.org/>) y Psi-Pred (Protein structure prediction server, secondary structure & transmembrane topology, Brunel, UK; <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

Los resultados mostraron que en dicha proteína **un 44,97% de los aminoácidos estarían formando estructuras del tipo α -hélices, el 7,92 % formando láminas β y el 47,11 % restante de aminoácidos, formando horquillas**. Teniendo en cuenta los valores asociados a las estructuras típicas de los polipéptidos que se han encontrado en la hipotética CPOMT de *T. longibrachiatum* se puede predecir que esta proteína pertenece a la clase mixta, dado que los valores obtenidos no corresponden con la clase alfa (% α -hélices > 45; y % láminas β < 5), ni con la clase beta (% α -hélices < 5; y % láminas β > 45) ni con la clase alfa-beta (% α -hélices > 30; y % láminas β > 20). La **Figura III-17** muestra la predicción de la estructura secundaria de la hipotética CPOMT de *T. longibrachiatum* obtenida por Psi-Pred.

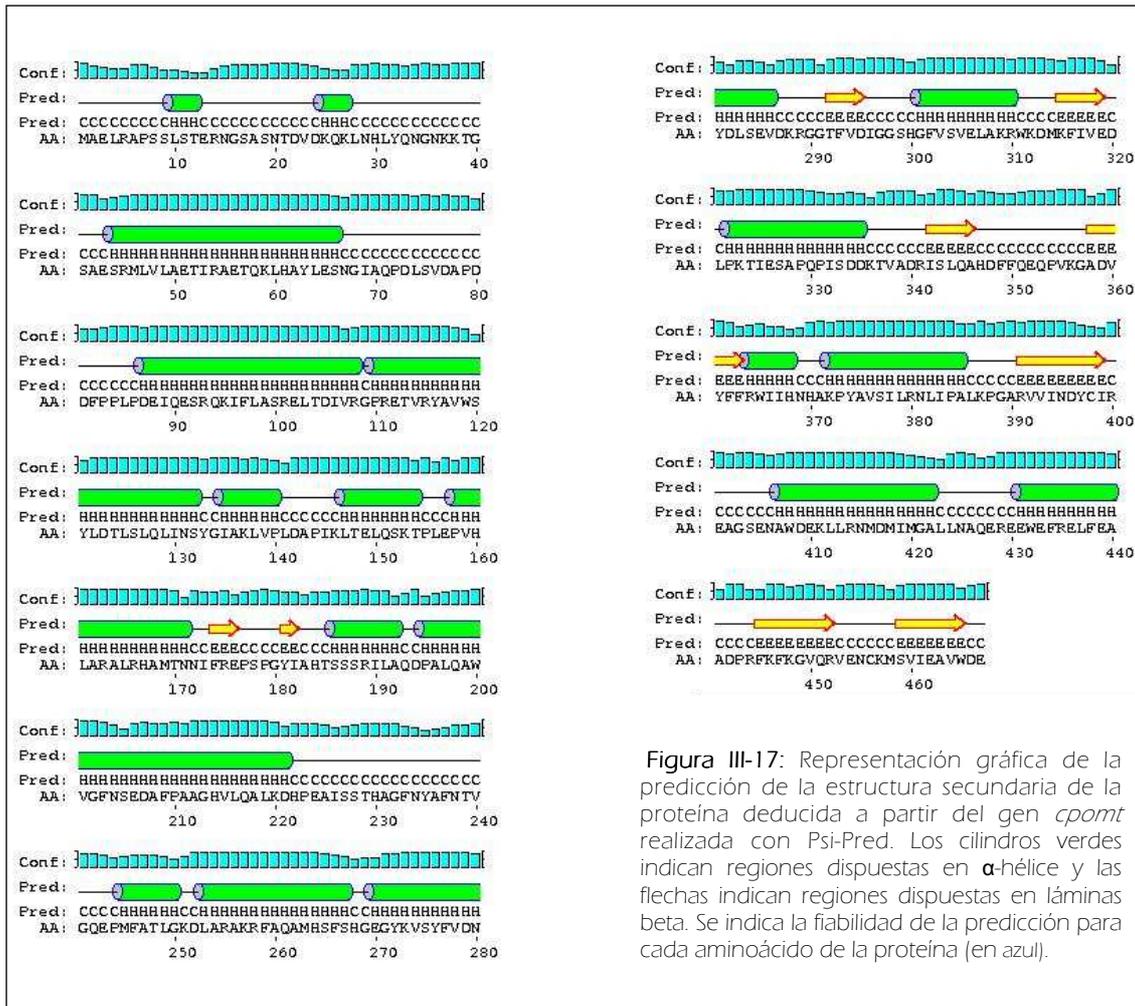


Figura III-17: Representación gráfica de la predicción de la estructura secundaria de la proteína deducida a partir del gen *cpomt* realizada con Psi-Pred. Los cilindros verdes indican regiones dispuestas en α -hélice y las flechas indican regiones dispuestas en láminas beta. Se indica la fiabilidad de la predicción para cada aminoácido de la proteína (en azul).

III-3.6.4 Predicción de la estructura tridimensional.

La estructura tridimensional de la hipotética proteína CPOMT, deducida a partir del gen *cpomt*, fue modelada por homología y visualizada mediante el software de SWISS-MODEL, DeepView-Swiss PdbViewer (Schwede *et al.*, 2003). El servidor ExPASy recibe la secuencia aminoacídica y por medio de un alineamiento con la base de datos de proteínas que han sido cristalizadas selecciona las secuencias y estructuras con mayor identidad con la secuencia problema. Posteriormente genera el modelo y lo optimiza, basándose en el hecho, demostrado por Blundell *et al.* (1987), de que las proteínas con una identidad superior al 30% poseen una estructura tridimensional similar. A partir de este modelo generado, se obtiene una representación tridimensional de la estructura proteica (Figura III-18). En muchos casos, zonas poco conservadas del extremo amino suelen ser eliminadas por el programa. El modelo generado para la hipotética proteína CPOMT nos muestra una posible cavidad central en la cual podría tener lugar la reacción. En la Figura III-18, se observa dentro de esta cavidad el dominio VDIGGSHG (en color amarillo) entre los aminoácidos 294 y 301 que forma parte del sitio de unión a la SAM. En las Figuras III-17 y III-18 se puede apreciar que la estructura secundaria predicha para la proteína en

el apartado anterior, coincide con el modelado tridimensional. En color verde se aprecian las estructuras en lámina y en color rojo se observan las hélices, generando una estructura globular.

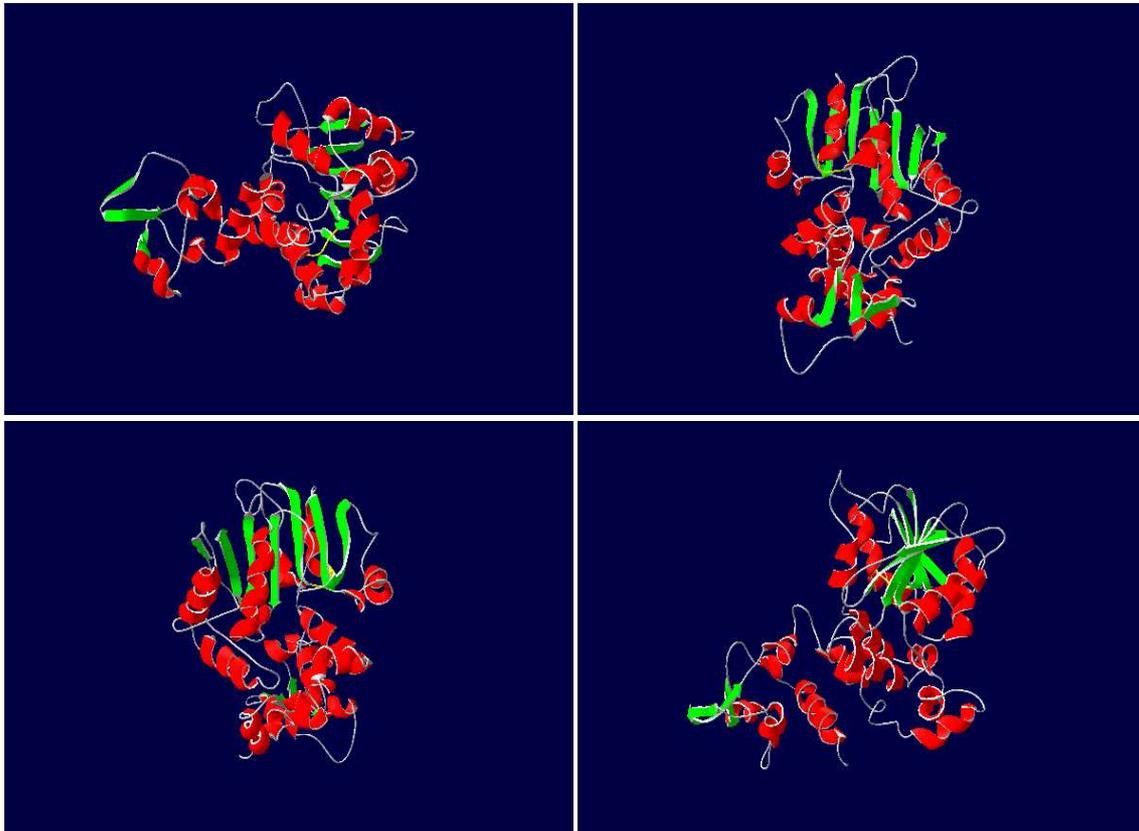


Figura III-18: Representación tridimensional de la hipotética proteína CPOMT de *T. longibrachiatum* obtenida mediante el modelado por homología (SWISS-MODEL), utilizando el programa de visualización DeepView–Swiss PdbViewer. En rojo se representan las alfa hélices, en verde las láminas β , y en amarillo el dominio VDIGSHG correspondiente a la zona de unión del cofactor SAM.

III-3.7 Análisis de las regiones adyacentes al gen *cpomt*.

La secuenciación del fragmento digerido con *EcoRI* de 5015 pb proveniente del plásmido pBMTE1 nos permitió conocer la secuencia de la CPOMT, así como de sus regiones promotora y terminadora. Pero además pudimos localizar un marco de lectura incompleto que presentaba un alto grado de similitud con policétido sintasas del tipo I de entre la que cabe destacar la de *Gibberella moniliformis* y sobre todo una policétido sintasa para la síntesis de alternopirona de *Microsporium canis*.

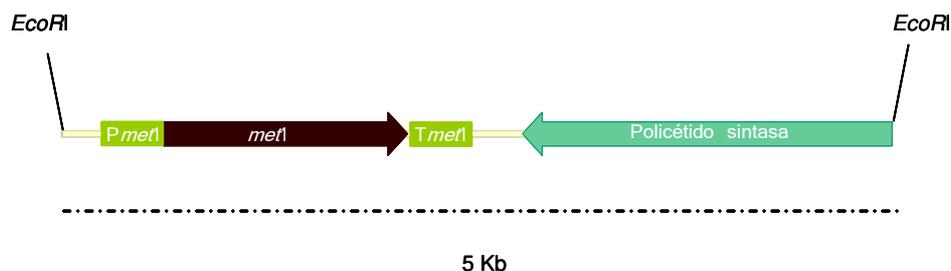


Figura III-19: Esquema del fragmento *EcoRI* de 5 Kb de ADN genómico de *T. longibrachiatum* presente en el fago λ TLcpomt1. En dicho fago se encuentra la secuencia completa del gen *cpomt*; su secuencia promotora y terminadora. Se destaca la secuencia correspondiente al gen incompleto localizado al secuenciar el fragmento *EcoRI* subclonado y que parece codificar una policétido sintasa del tipo I.

III-3.8 Análisis de la inducción por 2,4,6-TCP del promotor del hipotético gen *cpomt*.

Un aspecto muy importante del enzima CPOMT es que su expresión es fuertemente inducida por exposición a clorofenoles, especialmente 2,4,6-TCP (Álvarez-Rodríguez, 2003; Coque *et al.*, 2003). Con la finalidad de comprobar si el promotor del hipotético gen *cpomt* era inducible por triclorofenoles, en nuestro caso 2,4,6-TCP, realizamos fermentaciones con la cepa silvestre de *T. longibrachiatum*. Los cultivos fueron crecidos durante 30 horas, momento en el cual se realizó la inducción de los mismos añadiendo al medio 2,4,6-TCP a una concentración final de 10 µg/ml. Como control se recogió el micelio de un matraz no inducido (tiempo 0). Las muestras inducidas se recogieron a los 30, 60 y 120 minutos y fueron analizadas por RT-PCR semicuantitativa (Figura III-20). Para ello, 1 µg de ARN total fue tratado con ADNasa (Promega) y posteriormente, 100 ng de este ARN fueron utilizados como molde para realizar la retrotranscripción utilizando los cebadores MTATENF2 y MTRTR3 que permiten amplificar un producto de 937 pares de bases. Como control endógeno se amplificó un fragmento de 600 pares de bases correspondientes a la β-actina con los cebadores BACTF y BACTR. Las secuencias de todos los cebadores utilizados se muestran en la Caja III-5.

MTATEN-F2	5' TCC GCT GGA GCC TGT CCA CCT TGC 3'
MTRT-R3	5' CAT CCC AAA CTG CCT CAA TGA CGC 3'
BACT-F	5' GAG CTG CGT GTT GCC CCC GAG 3'
BACT-R	5' TCG CAC TTC ATG ATG GAG TTG 3'

Caja III-5: Cebadores diseñados para realizar la RT-PCR semicuantitativa de la hipotética CPOMT y del gen control β-actina.

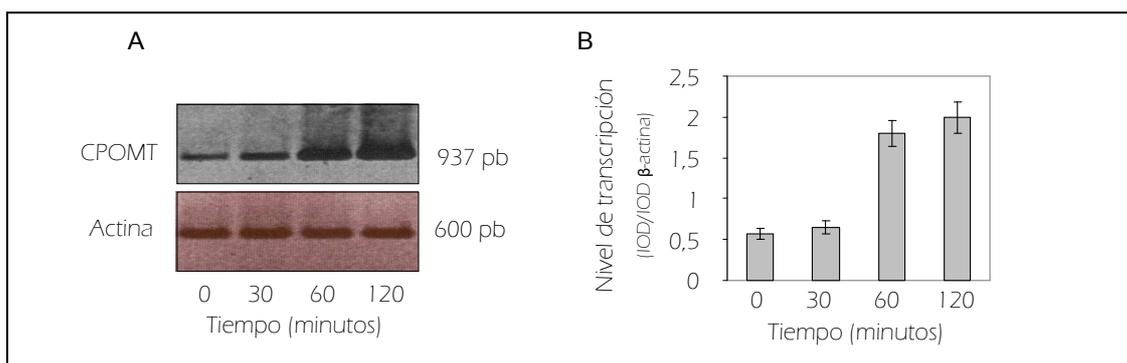


Figura III-20: A.- Análisis por RT-PCR semicuantitativa realizado con las muestras de micelio recogidas tras la inducción con 2,4,6-TCP. B.- Representación gráfica de los valores densitométricos obtenidos en los diferentes experimentos de RT-PCR (para el transcrito del gen *cpomt*) para los distintos tiempos de cultivo inducido. Los valores obtenidos han sido representados relativizados a la expresión del gen de la β-actina. Los datos fueron obtenidos mediante tres lecturas densitométricas utilizando el programa GelProAnalyzer 3.1.

De los datos obtenidos al analizar los geles con el software GelProAnalyzer 3.1 se observa que la expresión (relativizada a la expresión del gen constitutivo de la β-actina, por lo que un valor de 1 significa que la expresión tiene un nivel similar al del gen control) del gen *cpomt* a los 30 minutos de la inducción es levemente superior a la

expresión en el micelio sin inducir (valor de 0,569 del cultivo no inducido frente a un valor de 0,648 del inducido). Sin embargo, a medida que aumenta el tiempo de interacción entre el micelio y el 2,4,6-TCP aumenta drásticamente el nivel de expresión del gen (1,798 a los 60 minutos y 1,995 a los 120 minutos). Es llamativo el hecho de que la expresión no aumente sustancialmente hasta pasados los 30 minutos de inducción. Este retraso puede ser debido al tiempo que tardan en penetrar al interior celular las moléculas de 2,4,6-TCP. Es sabido que el mecanismo de toxicidad de los clorofenoles tiene lugar a nivel de la membrana mitocondrial, desregulando la cadena transportadora de electrones y, por tanto, la fosforilación oxidativa (Terada, 1990; Okey y Stensel, 1993). Además se desconoce la existencia de transportadores activos de clorofenoles al interior de la célula por lo que el transporte podría ser pasivo (favorecido por la estructura y propiedades de los clorofenoles que son liposolubles, pudiendo atravesar fácilmente las membranas de los microorganismos) lo que puede explicar que hasta pasados los treinta minutos las señales producidas por la entrada de clorofenoles [incremento de la tasa metabólica y del consumo de oxígeno, estrés oxidativo y proteólisis (Penttinen, 1995)] no sean detectados por la célula y, por tanto, no se active la transcripción del gen.

El hecho de que **el gen clonado incrementa su expresión en respuesta a la presencia de 2,4,6-TCP** en el medio de cultivo es otro dato que apoya la hipótesis de que el gen clonado y caracterizado sea el gen *cpomt*, codificante del enzima CPOMT responsable de la formación de cloroanisoles por O-metilación de los clorofenoles correspondientes.

III-4. Transformación génica de *T. longibrachiatum*.

III-4.1 Obtención de protoplastos.

Como primera aproximación al desarrollo de una técnica de transformación en *T. longibrachiatum*, se emplearon distintas metodologías para la obtención de protoplastos de otros hongos filamentosos, algunas de ellas ampliamente utilizadas en nuestro laboratorio (Cantoral *et al.*, 1987; Díez *et al.*, 1987; Punt *et al.*, 1987).

Se intentó también, la electroporación directa sobre esporas y micelio, no obteniéndose transformantes positivos en ninguno de los casos ensayados, a pesar de utilizar diferentes condiciones utilizadas en diversos trabajos (Brown *et al.*, 1998; Weidner *et al.*, 1998).

Incluso se realizaron pruebas con la metodología de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* descrita para varias especies fúngicas (deGroot *et al.*, 1998) sin obtener resultados satisfactorios.

A pesar de las diferentes metodologías empleadas, todos los intentos resultaron en general poco efectivos y trabajosos debido a la pobre formación de protoplastos y a

una baja capacidad de regeneración. Para mejorar la producción de protoplastos en *T. longibrachiatum* se recurrió a la técnica de producción de protoplastos con polietilenglicol descrita por Sánchez-Torres *et al.* (1994) con ciertas modificaciones:

- Recogida del micelio tras la incubación de una preparación de esporas a **28 °C** en lugar de 30 °C y por un periodo de 20 a 22 horas en lugar de 18 horas. El objetivo de esta bajada de temperatura es conseguir un menor crecimiento del micelio de manera que sea lo más joven posible ya que la dificultad para transformar los hongos filamentosos reside en la resistencia de su pared celular y ésta es sensiblemente inferior en esporas recién germinadas, que es el estado que tratamos de favorecer en éstas condiciones.

- Tratamiento con **β -glucuronidasa**. Los tratamientos con β -glucuronidasa actúa sobre los enlaces β de las glucoproteínas de la pared celular favoreciendo su debilitamiento y la disgregación del micelio, haciendo posible que los enzimas líticos tengan un mayor acceso a la superficie de la pared celular lo que favorece su actuación. También favorece que los protoplastos recién formados se suelten del micelio. La adición de β -glucuronidasa a las soluciones de enzimas líticos ha sido descrita por varios autores en la preparación de protoplastos de diversas especies [(Thomas *et al.* (1979); Bej *et al.* (1989)].

III-4.2 Marcadores de selección.

Inicialmente se pensó en el empleo de marcadores de selección que no implicaran el uso de antibióticos. Así, se ensayó el gen *amdS* que codifica una acetamidasa de *A. nidulans* presente en el plásmido p3SR2 (Hynes *et al.*, 1983) que confiere la capacidad de crecer en medio mínimo utilizando acetamida o acrilamida como única fuente de nitrógeno. Se realizaron pruebas en medio mínimo Czapeck suplementado con diferentes concentraciones de acetamida o acrilamida de 10, 30, 50 y 100 mM, obteniéndose crecimiento en la totalidad de la placa (debido a la gran capacidad invasiva de *T. longibrachiatum*) en todas las concentraciones utilizadas. Este crecimiento debió producirse por el aprovechamiento de recursos de la espора o de impurezas del medio de cultivo. Este resultado nos hizo desistir del uso de este marcador trófico ya que resultaría prácticamente imposible la selección de transformantes positivos.

Posteriormente, decidimos utilizar marcadores de resistencia a antibióticos. Para ello, inicialmente realizamos pruebas para determinar el nivel de resistencia de esporas de *T. longibrachiatum* a los antibióticos **higromicina, geneticina y fleomicina** encontrándose la concentración mínima inhibitoria en **80, 100 y 150 $\mu\text{g/ml}$** respectivamente.

III-4.3 Selección de plásmidos transformantes.

Para poder establecer si la transformación era factible, se ensayaron diferentes plásmidos: pRLMex₃₀ (Mach *et al.*, 1993), pALGEN3 (Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2004) y p43gdh (Cardoza *et al.*, 1998).

- El plásmido pRLMex₃₀ contiene el gen de la higromicina fosfotransferasa (*hph*) de *E. coli*, bajo el control del promotor del gen de la piruvato kinasa (*pkil*) y el terminador de la celobiohidrolasa II (*cbh2*) de *Trichoderma reesei*. Éste plásmido ya había sido utilizado para transformar con éxito especies de *Trichoderma* (Sánchez-Torres *et al.*, 1994).

- El plásmido pALGEN3 contiene la región codificante del gen *np11* de *E. coli* (que le confiere resistencia a la geneticina) bajo el control del promotor del gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdhA*) y el terminador del triptófano (*trpC*) de *Aspergillus awamori*.

- El plásmido p43gdh contiene la región codificante del gen *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (que le confiere resistencia a fleomicina) bajo el control del promotor del gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdhA*) de *Aspergillus awamori* y el terminador del gen citocromo oxidasa-1 *cyc1* de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura III-21).

Se realizaron las transformaciones utilizando 10 µg de ADN plasmídico. Las colonias de posibles transformantes fueron sometidas a dos pasos de subcultivo en medio CM con el antibiótico adecuado a fin de desechar falsos transformantes. Posteriormente se cultivaron en medio ME líquido para realizar extracciones de ADN a partir del micelio.

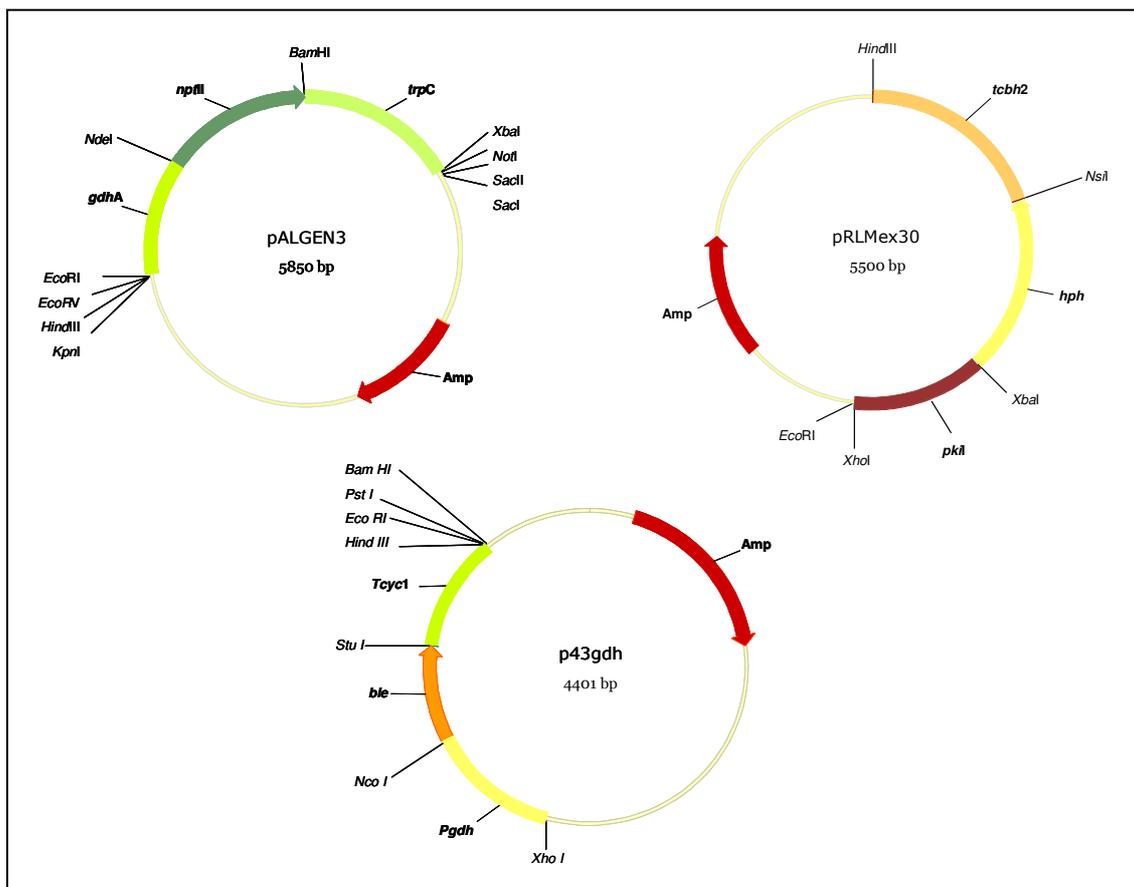
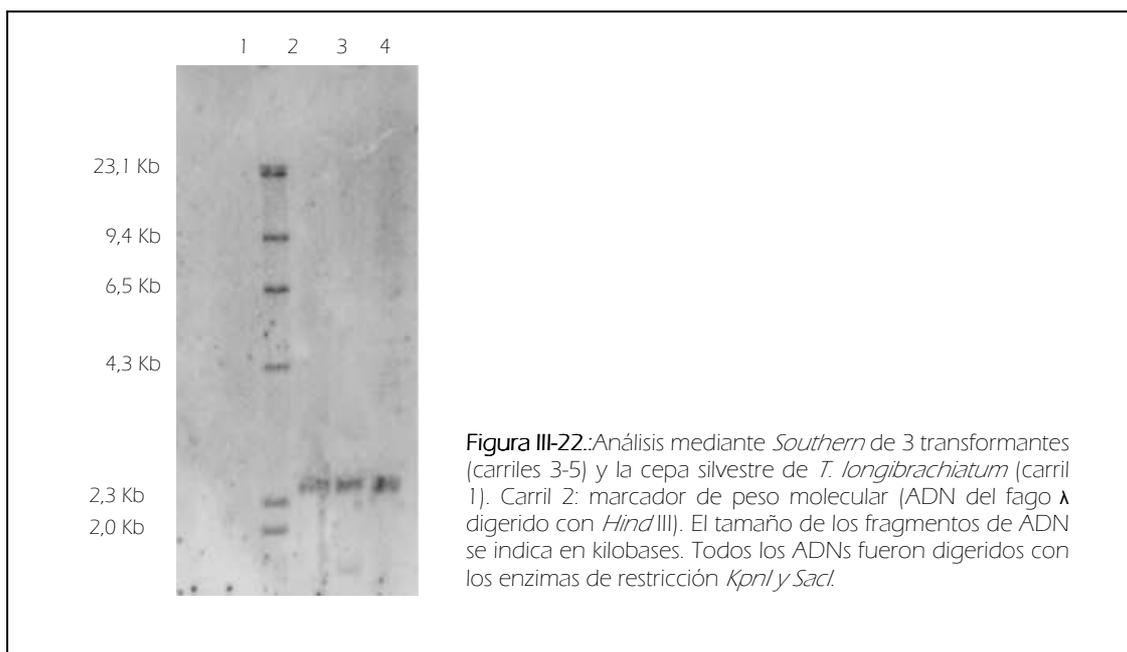


Figura III-21: Esquema de los plásmidos utilizados para optimizar el proceso de transformación en *T. longibrachiatum*. En la figura se detallan los enzimas de restricción utilizados así como los sitios de corte de las enzimas más importantes. Al tratarse de una representación gráfica, las distintas construcciones no están representadas a escala.

Aunque se realizaron los mismos experimentos con los tres plásmidos, sólo se muestran a continuación los resultados referentes a la transformación con el plásmido de resistencia a geneticina (pALGEN3), ya que este marcador **no había sido utilizado hasta el momento para transformar especies de *Trichoderma***, mientras que la transformación con los plásmidos pRLMex₃₀ y p43gdh ya ha sido descrita previamente por otros autores.

El ADN de los transformantes y de la cepa silvestre fue digerido con los enzimas de restricción *KpnI* y *SacI*, que liberan un fragmento que contiene el promotor *gphA*, el gen de resistencia y el terminador *trpC*, cuyos tamaños suman aproximadamente 2,5 Kb.

Posteriormente se realizó una hibridación para comprobar la integración del plásmido en el genoma. Se utilizó como sonda un fragmento digerido con *NdeI/BamHI* de unas 900 pares de bases del plásmido pALGEN3. Los resultados obtenidos nos indican que en los transformantes analizados (seleccionados al azar) ha ocurrido al menos un evento de integración del plásmido pALGEN3 (**Figura III-22**).



Los resultados obtenidos indican que la cepa *T. longibrachiatum* CECT 20431 utilizada en este trabajo puede ser transformada utilizando protoplastos obtenidos a partir de micelio joven, y que los transformantes pueden ser seleccionados mediante el empleo de los marcadores de resistencia higromicina, geneticina o fleomicina, si bien no existieron diferencias apreciables en cuanto a la eficiencia de transformación conseguida mediante el empleo de estos marcadores.

III-5 Disrupción del gen *cpomt* por doble recombinación homóloga.

Esta técnica de inactivación se basa en el reemplazamiento, total o parcial, del gen endógeno por un gen marcador flanqueado por secuencias homólogas al ADN diana, en cada una de las cuales ocurrirá una recombinación homóloga. De este modo se logra reemplazar el gen endógeno por una copia del gen interrumpido por el gen marcador utilizado (Rothstein, 1991). La inactivación del gen *cpomt* mediante esta técnica se intentó aplicar en la cepa silvestre.

III-5.1 Construcción del vector de interrupción pBMT-PHint.

La inactivación del gen *cpomt* en la cepa silvestre de *T. longibrachiatum* se intentó llevar a cabo por medio de una doble recombinación con un marcador de selección (Figura III-24). Para ello se empleó la cepa silvestre CECT 20431 que no posee resistencia al marcador de selección (en este caso fleomicina), la cual fue transformada con la construcción pBMT-PHint. La construcción pBMT-PHint se realizó a partir de la amplificación por PCR de la totalidad del gen *cpomt* (incluyendo intrones), junto con su región terminadora y una gran parte de la región promotora, utilizando para ello los cebadores 4KMTF2 y 2,4KMTR1 (ver Caja III-6), que incorporan sitios de restricción para el enzima *NotI*. El fragmento amplificado, de 2.600 pb (aprox), fue ligado al vector de clonación pBluescript II SK (+), obteniendo así el plásmido recombinante pBMT2,6.

4KMTF2	⁵ GAC ATG GGA CGC GGC CGC TAT GCA AGT ³
2,4KMTR1	⁵ TAA ATG GAG TGC GGC CGC TCT GCA AAA ³

Caja III-6: Cebadores diseñados para la amplificación de la región de 2,6 Kb correspondientes al gen *cpomt* junto con su región terminadora y parte de su región promotora.

Posteriormente, este plásmido fue digerido con *StuI*, clonándose en este sitio el casete de resistencia a fleomicina, previamente amplificado por PCR utilizando los cebadores PgdhBGF y Tcyc1CR (ver Caja III-7). Como molde para la PCR se utilizó el plásmido p43gdh (ver Figura III-21), obteniéndose como resultado el plásmido de interrupción pBMT-PHint, que se caracteriza por portar el gen *cpomt* interrumpido en una posición relativamente centrada por el casete de resistencia a fleomicina (Figura III-23).

PgdhBGF	⁵ AGA TCT GGA CTC CCT AAT GGA TTC CGA ³
Tcyc1CR	⁵ AGA TCT GCA AAT TAA AGC CTT CGA GCG ³

Caja III-7: Cebadores diseñados para la amplificación del casete de resistencia a fleomicina incluyendo sus regiones promotora y terminadora. Estos cebadores contienen en su secuencia sitios de corte para el enzima *BglI*.

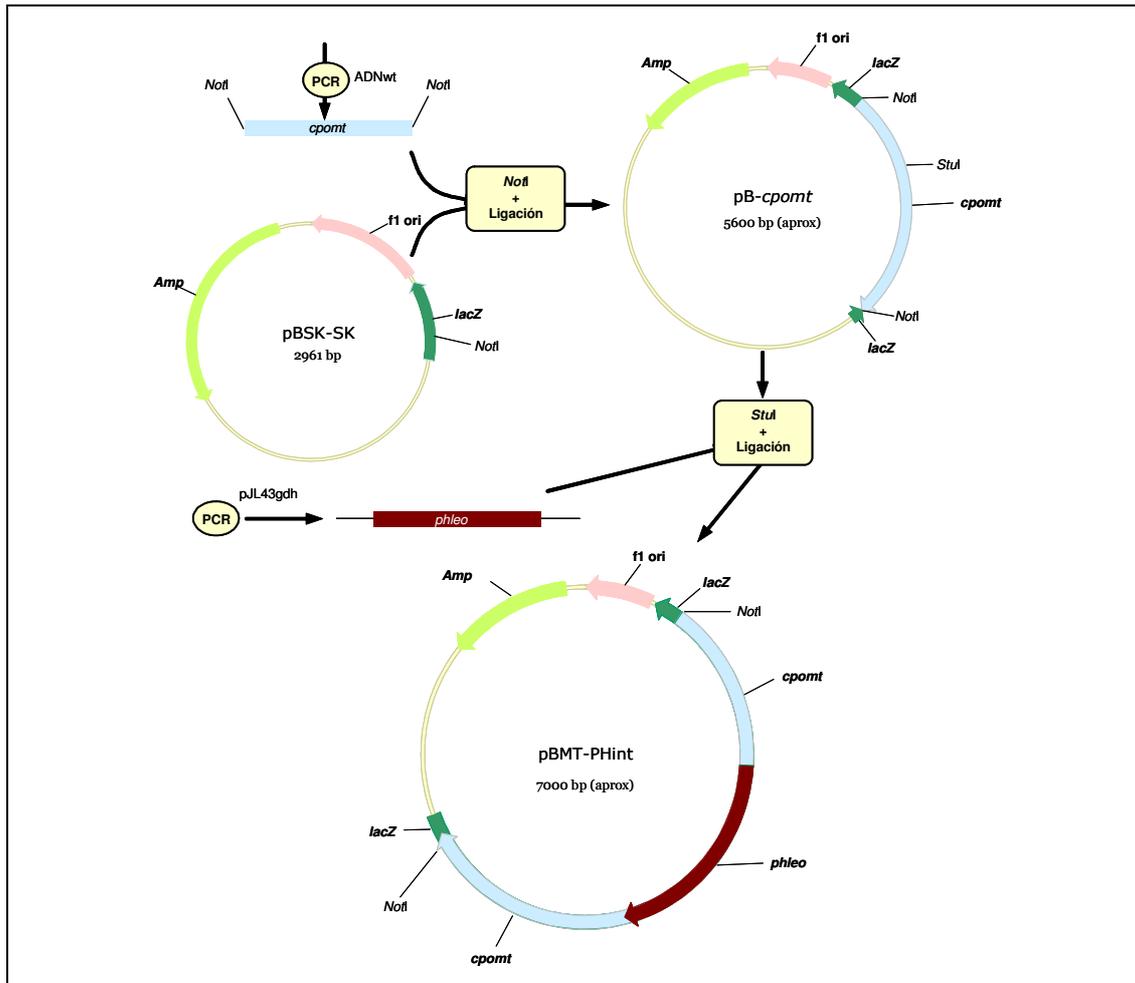


Figura III-23: Esquema de la construcción del vector de interrupción pBMT-PHint que contiene el gen *cpomt* interrumpido por el casete de resistencia a fleomicina (*Phleo* representa al casete entero es decir, (promotor, gen *b/e* y terminador). En la figura se detallan los enzimas de restricción utilizados así como los sitios de corte más representativos.

Este vector fue utilizado para transformar la cepa silvestre *T. longibrachiatum*. Los posibles transformantes fueron mantenidos bajo presión selectiva (presencia del antibiótico fleomicina) durante varios pases sucesivos, observando que su fenotipo era estable. Seguidamente, los posibles transformantes se crecieron en medio líquido y se extrajo ADN total para confirmar mediante amplificación por PCR y por hibridación la integración del plásmido en sus genomas. Aquellos transformantes estables seleccionados para los experimentos de caracterización de los efectos de la interrupción del gen *cpomt*, fueron denominados como MTint.

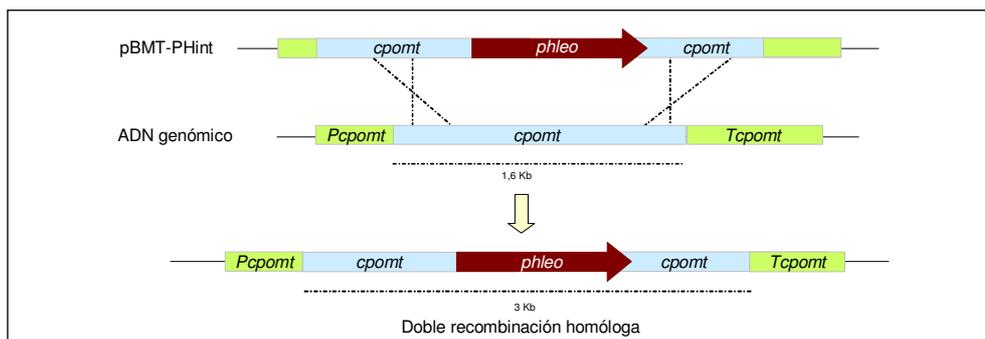
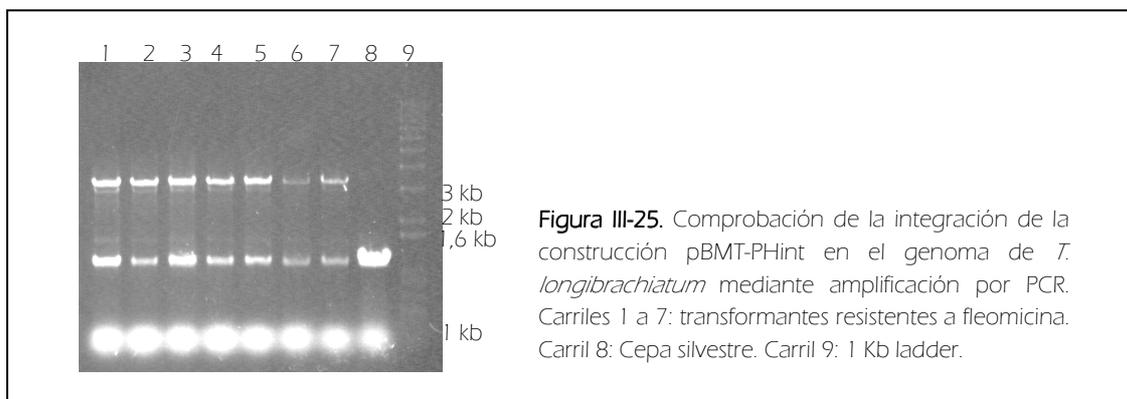


Figura III-24: Esquema de la interrupción del gen *cpomt* mediante el plásmido pBMT-PHint.

III-5.2 Análisis de los transformantes mediante amplificación por PCR.

Para verificar que la integración del gen *cpomt* interrumpido (con el casete de resistencia a fleomicina) había ocurrido en los transformantes MTint seleccionados, se realizó un análisis del ADN mediante PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos MTRT-F1 (ver **Caja III-4**) y MTATENR2 (ver **Caja III-8**). Ambos cebadores corresponden a una secuencia interna del gen *cpomt*. Esta pareja de oligonucleótidos amplifica un fragmento de 1,3 kb en la cepa silvestre y un fragmento de 3,1 kb en la construcción pBMT-PHint, que correspondería al gen *cpomt* interrumpido por el casete que confiere resistencia a la fleomicina. De esta forma, aquellos transformantes en los que haya sucedido el reemplazamiento génico de *cpomt* por la copia interrumpida se amplificará por PCR sólo el fragmento de 3,1 kb. Al analizar por PCR los transformantes seleccionados, se observó que en ninguno de los 45 transformantes MTint analizados se amplificó exclusivamente el fragmento de 3,1 kb. Por otra parte en casi todos los transformantes se amplificaron dos fragmentos de ADN, uno correspondiente con el tamaño del gen *cpomt* silvestre (1,3 Kb) y otro correspondiente con el tamaño del gen *cpomt* interrumpido (3,1 Kb) introducido en la construcción pBMT-PHint (ver **Figura III-25**). De estos resultados podemos deducir que **el gen *cpomt* nativo no ha sido reemplazado y la copia con el gen *cpomt* interrumpido se ha integrado en otra zona del genoma.**



El principal inconveniente a la hora de abordar una interrupción génica por el método de la doble recombinación, en hongos filamentosos, es la necesidad de realizar construcciones génicas con zonas de ADN homólogo de un tamaño muy grande que se posibiliten el apareamiento. El tamaño aconsejado de las regiones flanqueantes es de entre 3 y 8 Kb, siendo el mínimo aconsejable entre 2,5 y 3 Kb (Scherer y Davis, 1979). Ésta es una posible explicación al hecho de no haber obtenido transformantes de *T. longibrachiatum* interrumpidos, ya que la construcción pBMT-PHint contiene unas regiones homólogas (flanqueantes al casete de resistencia) de aproximadamente 1,1 y 1,6 Kb respectivamente, tamaño que puede no ser suficiente para un apareamiento efectivo que permita que se produzca la recombinación. Si las regiones flanqueantes no son lo suficientemente largas, la frecuencia de recombinación homóloga es muy baja, teniendo lugar integraciones al azar del ADN transformante (Casqueiro *et al.*, 1999).

III-6 Atenuación del gen *cpomt* mediante ARN's de interferencia.

Ante la falta de éxito en la inactivación del gen *cpomt* en la cepa silvestre mediante las metodologías habituales, se decidió utilizar la estrategia de atenuación mediante siARN. Los siARNs (del inglés: *short interfering RNA* o ARN corto de interferencia) son componentes de un tipo de respuesta antiviral denominada interferencia del ARN, descubierta en plantas y gusanos. Ciertos virus están compuestos por ARN de doble cadena, y la presencia de este ARN ajeno a la célula hospedadora desencadena, en muchos organismos eucariotas, una respuesta liderada por el enzima "DICER", que corta el ARN "invasor" en pequeños pedazos. Otras proteínas forman el RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*, complejo silenciador inducido por ARN). El RISC separa las piezas de ARN y las usa como guía para buscar y aparearse (o "silenciar") toda secuencia de ARN que coincida con ellas. Al bloquear este ARN, la célula se asegura que no se sintetizen proteínas virales.

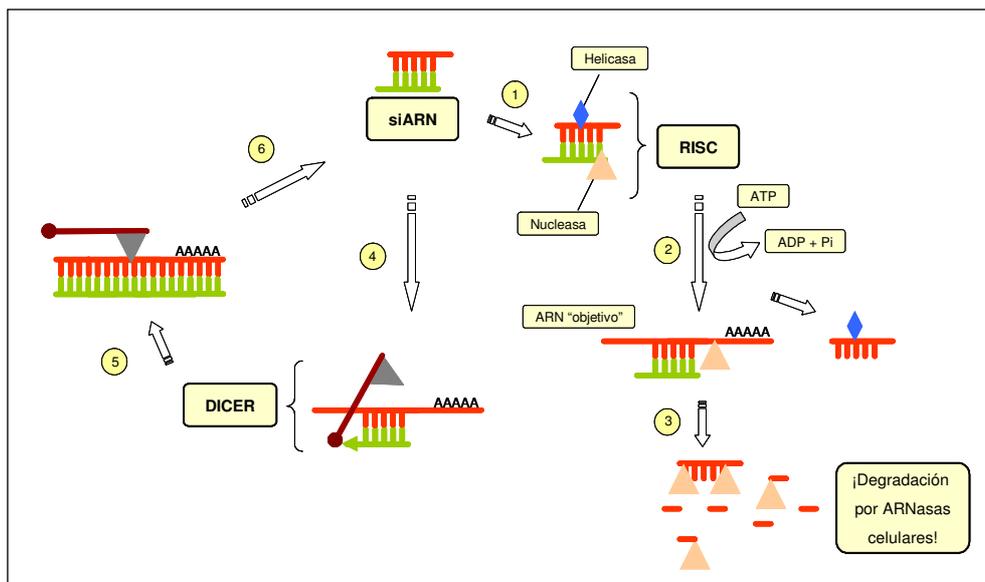


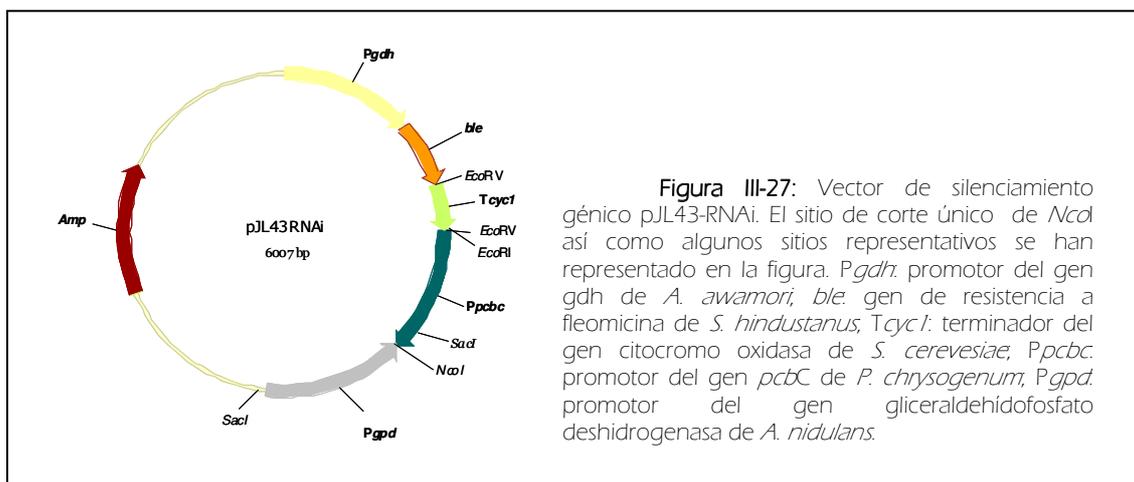
Figura III-26: Atenuación génica mediada por ARNs de interferencia. El siRNA interacciona con la helicasa (rombo azul) y la nucleasa (triángulo rosa) formando un complejo denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*, complejo silenciador inducido por ARN) (1). La helicasa del RISC usa ATP para desdoblarse el siARN, permitiendo que la cadena antisentido (cadena corta en verde) se complemente con su "objetivo" en el ARN mensajero (ARNm, cadena larga en naranja) (2). La nucleasa del RISC corta el ARNm "objetivo", que finalmente es rápidamente degradado por otras ARNasas (3). En plantas y en *Drosophila*, DICER, es un complejo formado por una endonucleasa con actividad helicasa y quinasa (triángulo gris) y una ARN dependiente-ARN polimerasa (esfera marrón). Tras desdoblarse el siARN (actividad helicasa), la cadena antisentido actúa como cebador para la síntesis de ARN de doble cadena (actividad polimerasa) usando como molde el ARN mensajero "objetivo". (4). Finalmente, DICER degrada el ARN de doble cadena (actividad endonucleasa) para generar siARN (5), el cual puede formar RISCs. Las etapas 4, 5, y 6 conforman un lazo de amplificación.

Si bien el mecanismo de los siARN ha sido descubierto recientemente, su utilización como herramienta en biología molecular se ha expandido de manera exponencial. Resulta claro que el siARN es un mecanismo molecular altamente conservado en células eucariotas utilizado para controlar la expresión de los genes durante el desarrollo

embrionario y para defender sus genomas de invasores como los virus de ARN (Figura III-26).

En hongos filamentosos, la maquinaria de silenciamiento de RNA se ha encontrado en la mayoría de sus genomas, aunque no en todos (Nakayashiki *et al.*, 2005) y se ha demostrado su operatividad en muchas especies (van West *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002; Kadotani *et al.*, 2003; Mouyna *et al.*, 2004; Janus *et al.*, 2007). La mayor ventaja de la técnica de la atenuación génica por siARN es que solo necesita de un pequeño fragmento de ADN (cerca de 500 pb, Liu *et al.*, 2002) mientras que la delección génica necesita de una gran zona de secuencia homóloga para que se produzca la recombinación. Además la atenuación génica puede evitar los problemas con mutantes letales por interrupción y permite una posibilidad de control del proceso de atenuación si se usan promotores inducibles (Goldoni *et al.*, 2004; Mouyna *et al.*, 2004).

Existen publicaciones previas sobre procesos de silenciamiento génico en especies de *Trichoderma* (Delgado-Jarana *et al.*, 2006; Cardoza *et al.*, 2006). La metodología utilizada para la atenuación génica en estos trabajos se basa en la técnica del ARN antisentido en la que se enfrentan dos regiones exónicas una en sentido y la otra en antisentido separadas por un fragmento intrónico que posibilitará la formación de un *loop* haciendo posible el plegamiento y la formación del ARN de doble cadena. Sin embargo, en nuestro trabajo, decidimos utilizar la técnica del ARN de interferencia descrita por Ullán *et al.* (2008), basada en la utilización del vector pJL43-RNAi que porta dos promotores fuertes enfrentados a ambos lados de un fragmento exónico del gen a atenuar. De este modo, tiene lugar una co-expresión del ARN en sentido y en antisentido, posibilitándose así la posterior formación del ARN de doble cadena. Un sistema similar ha sido utilizado con éxito en células humanas (Lee *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). En la construcción pJL43-RNAi encontramos un casete de resistencia a fleomicina que permite la selección de transformantes. Como promotores lleva el del gen *gpd* de *A. nidulans* y el del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* en posición enfrentada, flanqueando un sitio de restricción único para el enzima *NcoI* que posibilita la clonación entre estos dos promotores de fragmentos exónicos del gen que se desea atenuar (ver Figura III-27).



La expresión bidireccional de ARN en sentido y en antisentido genera moléculas de ARN de doble cadena que son degradadas a siARN's (de 21 a 26 nucleótidos). Estas moléculas actúan desencadenando la respuesta de RISC y de DICER constituyéndose un lazo de amplificación de la señal como se ha representado en la **Figura III-26**.

III-6.1 Construcción del vector de atenuación pARNi-MT265.

Para la construcción del plásmido de atenuación de la *cpomt*, se diseñó una pareja de oligonucleótidos (ver **Caja III-8**) que amplificaba una región exónica del gen comprendida entre los aminoácidos 155 y 355. La pareja de cebadores incluía en su secuencia sitios de restricción del enzima *NcoI* para facilitar su posterior subclonado en pJL43-RNAi.

MTATEN-F2	⁵ CCA TGG TCC GCT GGA GCC TGT CCA CCT TGC ³
MTATEN-R2	⁵ CCA TGG ACC GGT TGC TCC TGG AAG AAA TCA ³

Caja III-8: Cebadores diseñados para la amplificación de un fragmento interno de la *cpomt*. Estos cebadores contienen en su secuencia sitios de corte para el enzima *NcoI*.

Los fragmentos fueron amplificados con una polimerasa de alta fidelidad (*Pfx50 DNA polymerase*[®] de Invitrogen) y clonados in vitro en el vector pBluescript digerido con *EcoRV* dando lugar al plásmido pBat265. Posteriormente este plásmido fue digerido con el enzima *NcoI* liberando el fragmento clonado con extremos compatibles a los del plásmido pJL43-ARNi digerido con el mismo enzima. A continuación se llevó a cabo la ligación en condiciones estándar, dando lugar al plásmido pARNi-MT265 que lleva el fragmento exónico de 265 pb clonado en el sitio *NcoI*, quedando justo entre los dos promotores enfrentados.

Este vector fue utilizado para transformar la cepa silvestre *T. longibrachiatum*. Los posibles transformantes fueron mantenidos bajo presión selectiva (presencia del antibiótico fleomicina) durante varios pases sucesivos, observando que su fenotipo era estable. Posteriormente estos posibles transformantes se crecieron en medio líquido y se les realizaron extracciones de ADN total para confirmar mediante amplificación por PCR y por hibridación de ácidos nucleicos la integración del plásmido en sus genomas. Aquellos transformantes estables seleccionados para los experimentos de caracterización de los efectos de la atenuación del gen *cpomt*, fueron denominados como MTaten.

III-6.2 Análisis de los transformantes mediante amplificación por PCR.

Para verificar que la integración del plásmido pARNi-MT265 había ocurrido en los transformantes MTaten seleccionados, se realizó un análisis del ADN mediante PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos RPgpd2 y FPpcbc (ver **Caja III-9**). Ambos

cebadores anillan en los promotores enfrentados que flanquean el sitio *NcoI* en la construcción de atenuación.

RPgpd2	5' CCT AGG TAC AGA AGT CCA ATT 3'
FPpcbc	5' GCA TGT TGC ATC GGG AAA TCC 3'

Caja III-9: Cebadores diseñados para la comprobación de los transformantes MTaten por amplificación de un fragmento de la construcción.

Esta pareja de oligonucleótidos amplifica un fragmento de 1,6 kb que corresponde a ambas regiones promotoras más los 265 pb del fragmento del gen *cpomt*. Como se observa en la **Figura III-28** una banda de éste tamaño está presente en los transformantes positivos (que han integrado la construcción), mientras que no hay amplificación en el control negativo realizado con ADN de la cepa silvestre. De este modo se confirmaron hasta **16 transformantes positivos**.

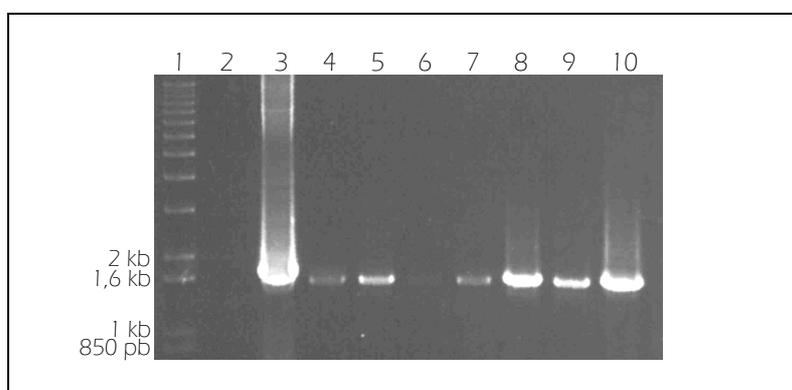
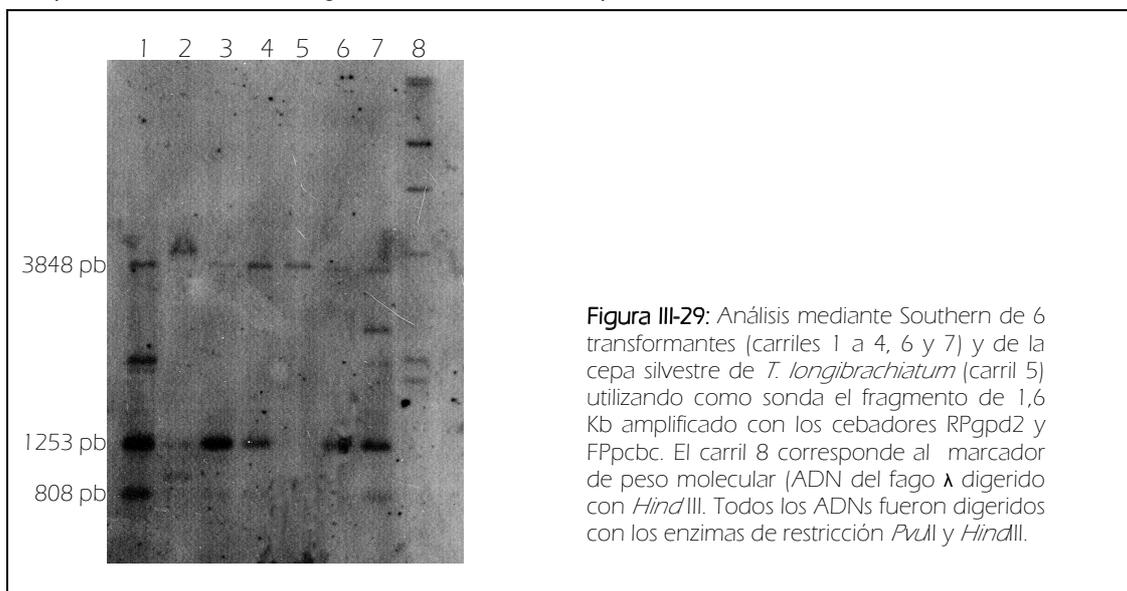


Figura III-28. Comprobación de la integración de la construcción pARNi-MT265 en el genoma de *T. longibrachiatum* mediante la amplificación por PCR de un fragmento de la misma de 1600 pb (aprox) utilizando los cebadores RPgpd2 y FPpcbc. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; Carril 2: control negativo con ADN de la cepa silvestre de *T. longibrachiatum*; Carril 3: control positivo utilizando la construcción pARNi-MT265 como molde; Carriles 4 al 10: amplificación utilizando el ADN genómico de 7 posibles transformantes.

III-6.3 Verificación de los transformantes mediante hibridación de ácidos nucleicos.

Los transformantes examinados por PCR que consideramos positivos fueron seleccionados para un posterior análisis mediante hibridación de ácidos nucleicos a fin de confirmar la integración o no del plásmido pARNi-MT265. El ADN total de cada uno de los transformantes fue digerido con las endonucleasas *PvuII* y *HindIII* y tras ser transferido a un filtro de nailon fue hibridado utilizando como sonda el fragmento de PCR de 1,6 Kb amplificado en el apartado anterior, utilizando como molde la construcción pARNi-MT265. Esta sonda, al portar la región de 265 pares de bases de la región exónica clonada, va a hibridar en la cepa silvestre con un fragmento de 3848 pb resultante de la digestión doble que corresponde con el gen nativo de *T. longibrachiatum*. Por otra parte en los transformantes positivos, habrá dos señales de hibridación, de 1253 y 808 pb respectivamente, que son liberadas de la construcción pARNi-MT265 integrada en el

genoma del hongo. Tal como se puede observar en la **Figura III-29**, aparece la banda de hibridación de 1253 pb en 5 de los transformantes ensayados. La banda de 808 pb puede no aparecer en todos los transformantes debido a que la sonda solo es complementaria a este fragmento en unos 200 pb.



De esta manera se confirmó **la integración de la construcción de atenuación en al menos 6 transformantes** MTaten. Éstos se seleccionaron para realizar ensayos de actividad metiltransferasa a fin de verificar una posible disminución de la actividad CPOMT y en la producción de 2,4,6-TCA.

III-6.4 Producción de 2,4,6-TCA en los transformantes MTaten.

Debido al interés que presenta para nosotros la producción de 2,4,6-TCA y su vía biosintética, se analizó a continuación el efecto de la atenuación del gen *cpomt* cuantificando la producción de 2,4,6-TCA en medio de cultivo líquido. Para llevar a cabo este estudio los transformantes fueron cultivados en caldo extracto de malta y se indujeron a las 36 y a las 60 horas de cultivo con 10 $\mu\text{g/ml}$ de 2,4,6-TCP. Las muestras fueron procesadas y analizadas por HPLC. Para la posibilitar la cuantificación se añadió 2,3,4,5-TeCA como patrón interno a una concentración final de 500 $\mu\text{g/ml}$.

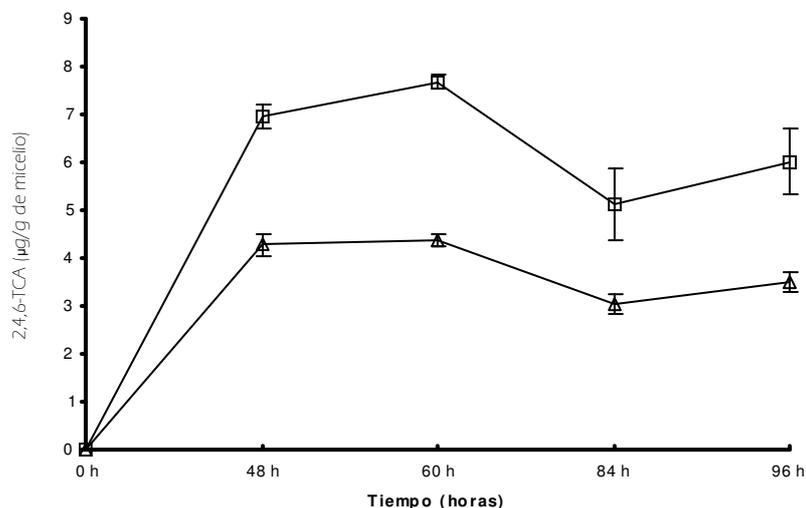


Figura III-30: Representación gráfica de la producción específica de 2,4,6-TCA en medio líquido (en μg de 2,4,6-TCA por mg de peso seco). Los datos correspondientes con la cepa silvestre se representan con cuadrados y los del mutante MTaten-37 atenuado con triángulos.

De los seis transformantes evaluados, solamente uno de ellos denominado MTaten-37 (por tanto un 16,6 %, dato que es similar a los obtenidos anteriormente por Ullán y colaboradores (2008) utilizando esta misma construcción en *Penicillium* y *Acremonium chrysogenum*) mostró una disminución notable en la producción de TCA. En la **Figura III-30** se representa la producción específica de 2,4,6-TCA con respecto al peso seco del micelio. Se realizaron análisis de muestras a diferentes tiempos, siendo en todos los casos la producción de dicho compuesto inferior en el transformante MTaten-37. Los porcentajes de atenuación **alcanzan hasta un 37% de la producción específica**, no siendo en ningún momento inferiores al 25% de la misma. El resto de los transformantes analizados mostraban unas diferencias en la producción de TCA siempre inferiores al 15 % que podrían deberse al error experimental

III-6.5 Expresión diferencial del gen *cpomt* en el transformante MTaten-37.

Con la finalidad de examinar la expresión del gen *cpomt* y su relación con la producción de 2,4,6-TCA en el transformante MTaten-37 de *T. longibrachiatum* (que porta el casete de atenuación) se llevó a cabo un análisis por RT-PCR semicuantitativa con ARN total extraído a partir de micelio crecido en el mismo medio líquido (caldo extracto de malta) utilizado en los ensayos realizados para cuantificar la producción de 2,4,6-TCA. Se realizó el mismo procedimiento con la cepa silvestre a fin de tener un control positivo con el cual comparar la expresión en el mutante atenuado. La inducción se realizó con 10 µg/ml de 2,4,6-TCP. Las muestras inducidas se recogieron a los 60 y 120 minutos, coincidiendo con los tiempos de mayor expresión analizados en la sección III-3.8 de Resultados, y fueron analizadas utilizando la misma metodología. La retrotranscripción se realizó utilizando los cebadores CPOMTF1 (ver **Caja III-3**) y MTRTR2 (ver **Caja III-4**) que permiten amplificar un producto de 405 pares de bases. Como control endógeno se amplificó un fragmento de 600 pares de bases correspondientes a la β -actina con los cebadores BACTF y BACTR (ver **Caja III-5**).

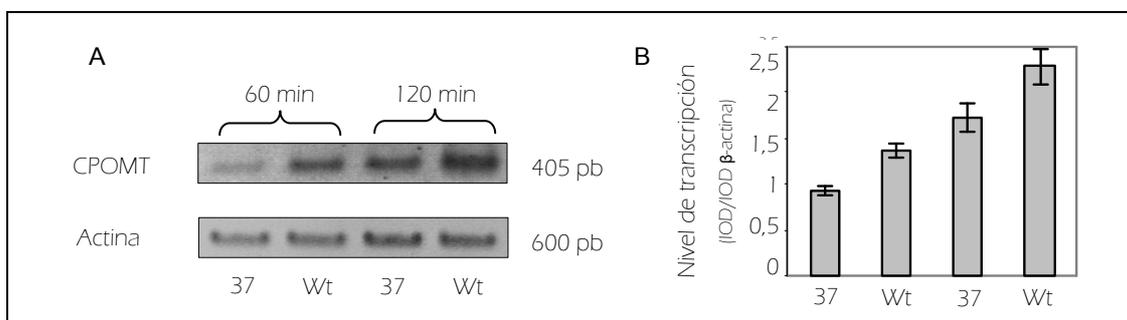


Figura III-31: A) Análisis por RT-PCR semicuantitativa realizado con la cepa silvestre y el transformante MTaten-37. B) Representación gráfica de los valores densitométricos obtenidos en los diferentes experimentos de RT-PCR. Los valores obtenidos han sido representados relativizados a la expresión del gen de la β -actina. Los datos fueron obtenidos mediante tres lecturas densitométricas utilizando el programa GelProAnalyzer 3.1.

El experimento demostró que la transcripción del gen *cpomt* en el transformante MTaten-37 presenta unos niveles menores a los observados para la cepa silvestre en los

dos tiempos observados. Los datos densitométricos obtenidos con el software GelProAnalyzer 3.1 indican que la transcripción en el transformante MTaten-37 es un 32,32% menor a los 60 minutos y un 24,57% a los 120 minutos de la inducción, confirmando la atenuación del gen observada en los experimentos de producción de 2,4,6-TCA en medio líquido.

III-6.6 Ensayos enzimáticos de la actividad CPOMT en el transformante MTaten-37.

A continuación, a fin de confirmar el descenso de la actividad metiltransferasa en el transformante atenuado se realizaron ensayos enzimáticos a partir de extractos proteicos crudos de dicho transformante y de la cepa silvestre de *T. longibrachiatum*. Los cultivos fueron inducidos como se indica en el apartado anterior y el micelio procedente de dichos cultivos recogido a las 3 horas de su inducción y procesado según se indica en el apartado II-11.1 de Materiales y Métodos. Se realizaron reacciones enzimáticas utilizando 100 μ l de estos extractos y siguiendo la metodología anteriormente detallada. Al igual que en los ensayos de producción de 2,4,6-TCA en medio líquido, se utilizó 2,3,4,5-TeCA a una concentración final de 500 μ g/ml como patrón interno. Además, y para poder calcular la producción específica relativizada a la cantidad total de proteína, se realizó la cuantificación de proteínas totales presentes en los extractos por medio del método de Bradford. Los resultados se presentan en la **Figura III-32**:

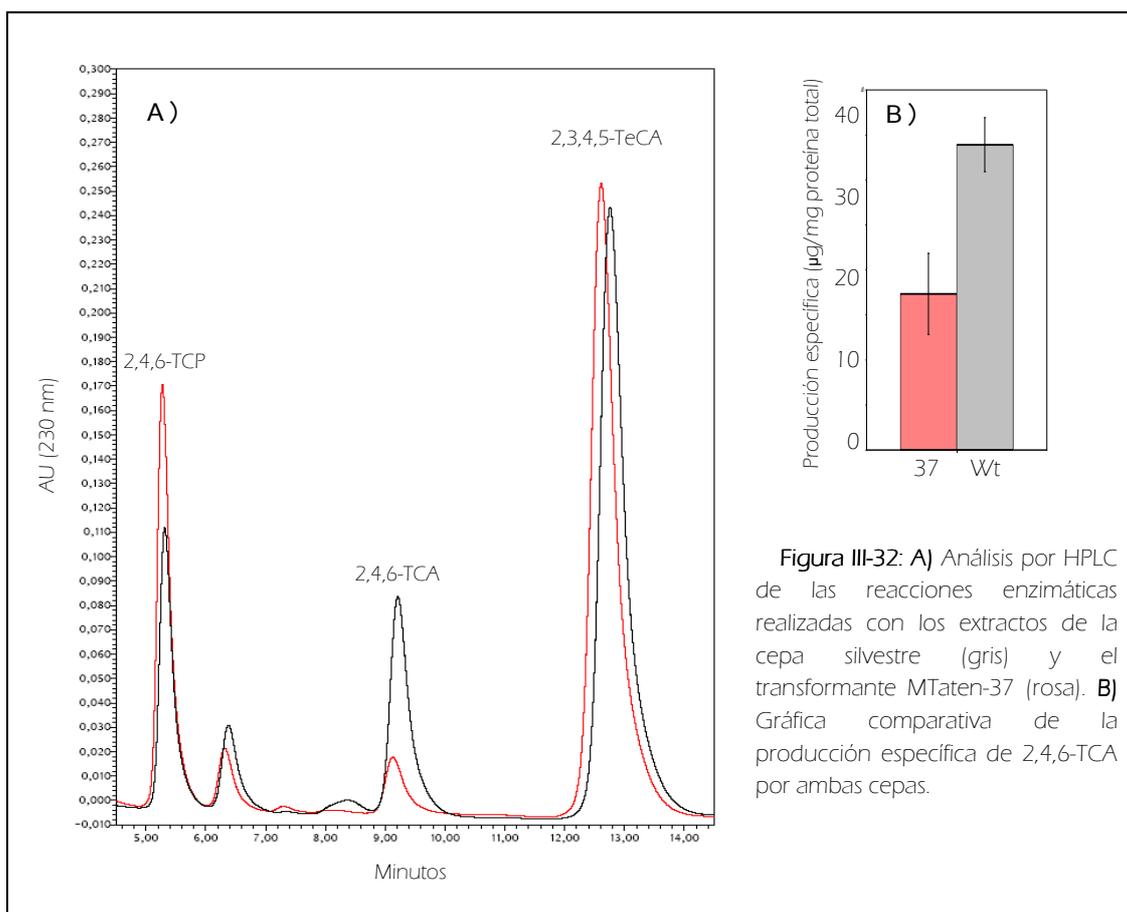


Figura III-32: A) Análisis por HPLC de las reacciones enzimáticas realizadas con los extractos de la cepa silvestre (gris) y el transformante MTaten-37 (rosa). B) Gráfica comparativa de la producción específica de 2,4,6-TCA por ambas cepas.

La producción específica de 2,4,6-TCA del transformante MTaten-37 es de 17,34 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína total mientras que la de la cepa silvestre es 33,91 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína total, por lo que en estas condiciones de ensayo **la atenuación observada en este transformante era del 48,86 %**.

Las diferencias observadas con respecto a los resultados obtenidos en los ensayos en medio líquido pueden ser debidas a que la acumulación de 2,4,6-TCA (al realizarse los ensayos en tiempos de incubación largos) enmascara la atenuación real medida en los ensayos enzimáticos.

III-6.7 Ensayos de resistencia a 2,4,6-TCP.

Una vez confirmada la atenuación del gen *cpomt*, se realizaron ensayos de resistencia al 2,4,6-TCP. Este compuesto, tal como se expuso en la introducción de esta memoria, es tóxico para el microorganismo (no obstante ha sido utilizado extensivamente como plaguicida y antifúngico en cultivos de vegetales) en base a su capacidad de atravesar membranas y desregular los gradientes energéticos de los microorganismos.

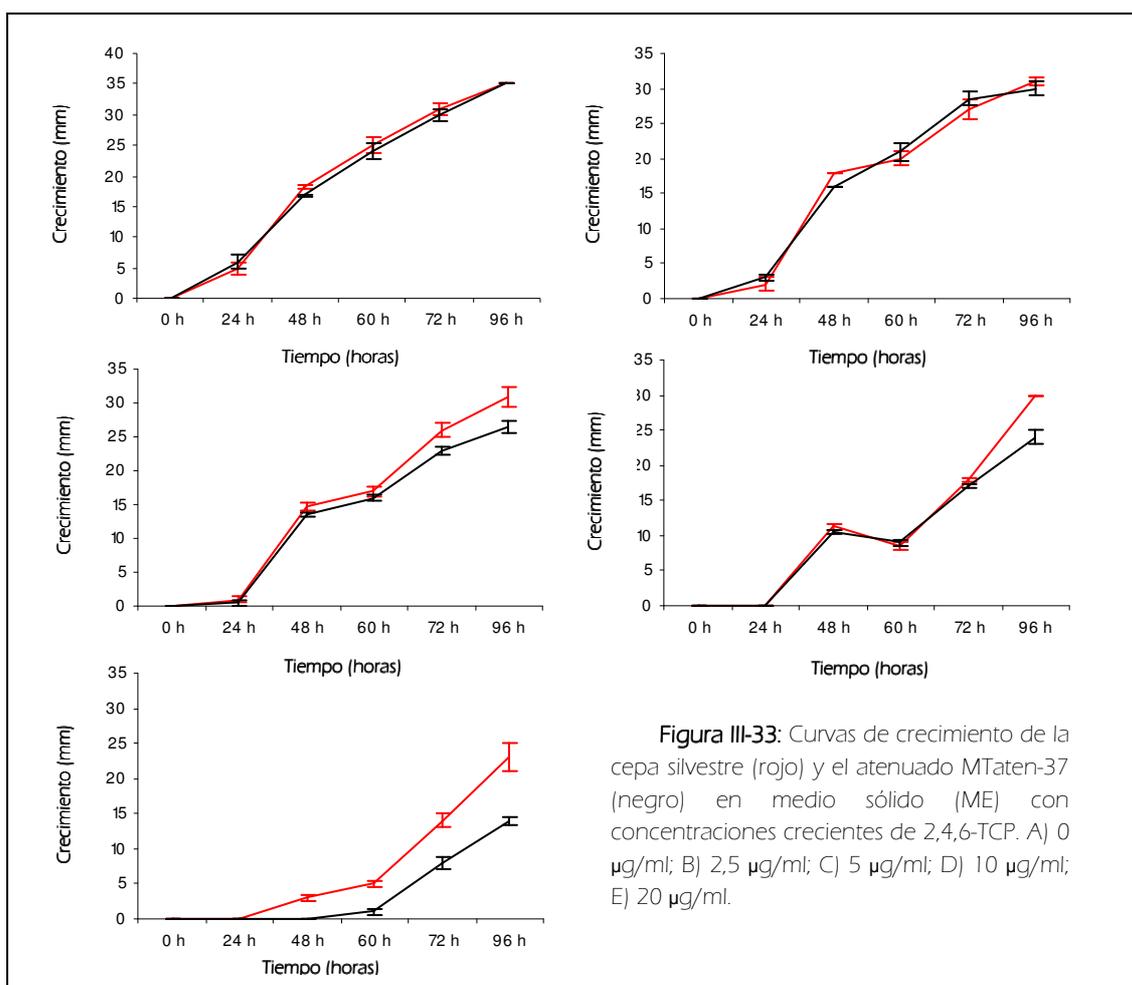


Figura III-33: Curvas de crecimiento de la cepa silvestre (rojo) y el atenuado MTaten-37 (negro) en medio sólido (ME) con concentraciones crecientes de 2,4,6-TCP. A) 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; B) 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; C) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; D) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; E) 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

El hongo responde a esta toxicidad metilando el compuesto, produciendo 2,4,6-TCA inocuo para el microorganismo en comparación con el clorofenol del que procede. Al estar confirmada la atenuación del gen responsable de esta metilación es posible que la toxicidad del 2,4,6-TCP afecte en mayor medida a la cepa atenuada que a la cepa silvestre de *T. longibrachiatum*. Por este motivo realizamos una curva de toxicidad para 2,4,6-TCP comparando la capacidad de crecimiento del transformante atenuado con respecto a la cepa silvestre (**Figura III-33**).

Las curvas se realizaron inoculando $5 \cdot 10^6$ esporas de la cepa silvestre y del transformante MTaten-37 posando una gota de la suspensión de esporas en el centro de cada placa. Las placas se dejaron secar procurando que la gota se extendiera lo menos posible. Los diámetros de cada colonia se midieron en los tiempos señalados.

Tal como se aprecia en las curvas, se obtiene un crecimiento similar en las dos cepas a concentraciones bajas (entre 0 y 10 $\mu\text{g/ml}$) mientras que se aprecian claras diferencias en la concentración más alta utilizada (20 $\mu\text{g/ml}$) sobre todo en tiempos avanzados de cultivo.

Los resultados obtenidos apoyan la posible aplicación de esta cepa como microorganismo de biocontrol ya que su crecimiento y, por tanto, **su capacidad invasiva, es similar a la de la cepa silvestre en condiciones de bajas concentraciones de 2,4,6-TCP** (condiciones que se dan en una situación real donde la corteza del alcornoque o las planchas de corcho se ven expuestas a bajas concentraciones del pesticida durante largos periodos de tiempo). Ésta es otra de las ventajas de utilizar la técnica de atenuación o *knock-down* frente a la interrupción clásica o *knock-out*, ya que si se está trabajando con genes esenciales o, como en este caso de resistencia a tóxicos, si el gen está interrumpido posiblemente el crecimiento del transformante en presencia de 2,4,6-TCP sería nulo o muy bajo, no siendo posible su utilización como agente de biocontrol ya que la superficie del corcho sería colonizada rápidamente por otras especies de hongos filamentosos menos sensibles a dicho tóxico.

III-6.8 Ensayos sobre corcho granulado.

Con el fin de analizar el comportamiento del atenuado MTaten-37 creciendo en condiciones similares a las que encontramos en la corteza de alcornoque o en el corcho almacenado, realizamos cultivos según la metodología descrita en el apartado II-14. Los extractos etanólicos realizados a estos cultivos se enviaron al Centro de Valorización de la Calidad en Enología (CEVAQOE España SL) donde se les realizó un análisis por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (ECD) mediante el que se valoraron los haloanisoles y halofenoles presentes. Los resultados de la cuantificación llevada a cabo se representan en la **Tabla III-8**. Como se puede observar, en los matraces en los que no se ha adicionado 2,4,6-TCP las cantidades de 2,4,6-TCP y 2,4,6-TCA son prácticamente inapreciables (en torno a los 2 ng/g de corcho) tanto en el matraz que ha sido inoculado con la cepa silvestre de *T. longibrachiatum* como en el

matraz control sin inóculo. Sin embargo, en los matraces en los que hemos añadido 2,4,6-TCP para simular una situación de corcho contaminado, podemos observar grandes diferencias entre las cantidades de anisoles producidas por la cepa silvestre y la cepa atenuada. En concreto, **la cantidad de 2,4,6-TCA producida por el transformante MTaten-37 es un 28,96% inferior a la producida por la cepa silvestre.**

Muestra	2,4,6-TCP (ng/g corcho)	2,4,6-TCA (ng/g corcho)
Control	2,13	2,10
<i>T. longibrachiatum</i> wt	2,55	2,02
<i>T. longibrachiatum</i> wt + 2,4,6-TCP	105,30	283,11
MTaten-37 + 2,4,6-TCP	109,61	201,1

Tabla III-8: Cuantificación de 2,4,6-TCP y 2,4,6-TCA presente en las muestras de corcho inoculadas con las cepas silvestre, atenuada y sin inóculo (control). Los valores corresponden a la media de dos experimentos independientes.

Estos resultados indican que los niveles de producción de 2,4,6-TCA de la cepa atenuada creciendo directamente sobre corcho granulado, aunque algo inferiores, son similares a los observados en los experimentos realizados en medio líquido. Estos datos validan los experimentos realizados en condiciones de laboratorio controladas (medio líquido) y son esperanzadores en vistas a una futura aplicación de estas cepas como organismos de biocontrol creciendo directamente en planchas de corcho contaminadas con 2,4,6-TCP.

III-7 Expresión heteróloga de las lacasas de *Polyporus hydnoides* y *Pleurotus eryngii* en *T. longibrachiatum*.

Las lacasas (o bencenodiol oxido-reductasas) son enzimas del tipo fenoloxidasas que son de gran interés para diversas aplicaciones industriales entre las que destacan el procesado textil, la detoxificación de hidrolizados de lignocelulosa en la producción de bioetanol, deslignificación de la pulpa de madera en la fabricación de papel y la detoxificación de vertidos industriales y de contaminantes (Mayer y Staples, 2002). Además son capaces de atacar clorofenoles, ya que realizan la oxidación de gran variedad de compuestos fenólicos y aminas aromáticas usando el oxígeno como aceptor de electrones (Yaropolov *et al.*, 1994).

Estos enzimas son producidos en gran cantidad y excretados al exterior de la célula, fundamentalmente, por los hongos que causan la podredumbre blanca de la madera en su ruta de degradación de la lignina. Son muchas las lacasas que han sido caracterizadas por varios autores en trabajos anteriores. Entre ellas podemos citar la lacasa LAC1 codificada por el gen *lac1* de *Polyporus hydnoides* (Coll *et al.*, 1993) y la lacasa

PEL3 codificada por el gen *pel3* de *Pleurotus eryngii* (Rodríguez *et al.*, 2008). El objetivo de este trabajo era abordar la expresión de estas lacasas en *T. longibrachiatum* y el posterior análisis de su expresión y efecto sobre la concentración de 2,4,6-TCP y la producción de 2,4,6-TCA en el medio de cultivo. La hipótesis de trabajo era corroborar si la producción de niveles apreciables de una actividad lacasa podía contribuir a eliminar eficazmente los clorofenoles presentes en el medio de cultivo, evitándose así la formación de cloroanisoles.

III-7.1 Expresión del gen *lac1* de *P. hydnooides* en *T. longibrachiatum*.

III-7.1.1 Construcción del vector de expresión de la lacasa de *Polyporus hydnooides*: pEXLAC.

Para conseguir expresar el gen *lac1* de *Polyporus hydnooides* en *T. longibrachiatum* se realizó una construcción génica a partir del ADNc del gen *lac1*, que fue amplificado por PCR utilizando como molde el plásmido pCF1 (cedido por el Dr. Ramón Santamaría). Dicho plásmido contiene el cDNA de la región codificante de la lacasa LAC1 amplificada por RT-PCR clonado en el plásmido pUEX1 (Coll *et al.*, 1993). Para ello utilizamos los cebadores cLACA3 y cLACA5 (ver **Caja III-10**). El oligonucleótido cLACA5 se diseñó conteniendo un sitio de restricción para el enzima *Xba*I mientras que el oligonucleótido cLACA3 contiene un sitio de restricción para el enzima *Nsi*I que facilitarán la posterior subclonación direccional del fragmento.

cLACA3	⁵ ATG CAT TGC AGC GCA CAA GAA AAG CG ³
cLACA5	⁵ ATG GCC AAG TTC CAA TCT CTC CTC ACC ³

Caja III-10: Cebadores diseñados para la amplificación del ADNc de la lacasa de *P. hydnooides* y que incorporan los sitios de restricción (*Xba*I + *Nsi*I) para su posterior subclonado.

El fragmento de PCR fue amplificado con la polimerasa Platinum[®] *Pfx* y clonado en el vector pBluescript SK(+) digerido con *Eco*RV. Este subclonado se hizo con un doble objetivo: primero confirmar que el fragmento había sido amplificado sin errores, para lo cual procedimos a su completa secuenciación y, segundo, asegurarnos de que la doble digestión (*Xba*I + *Nsi*I) se produce correctamente, liberando el fragmento completo y produciendo los sitios de corte adecuados. Tras la doble digestión y rescate del fragmento codificante de la lacasa, éste fue subclonado en el vector pRLMex30 digerido con los mismos enzimas de restricción (que liberan el gen *hph*) quedando así el gen de la lacasa bajo el control del promotor del gen de la piruvato kinasa (*pk1*) y el terminador de la celobiohidrolasa II (*tcbh2*) de *Trichoderma reesei* evitando problemas de reconocimiento de las regiones reguladoras (ver **Figura III-34**). Con esta construcción se

procedió a cotransformar la cepa silvestre de *T. longibrachiatum*, utilizando como vector de selección el plásmido pRLMex₃₀.

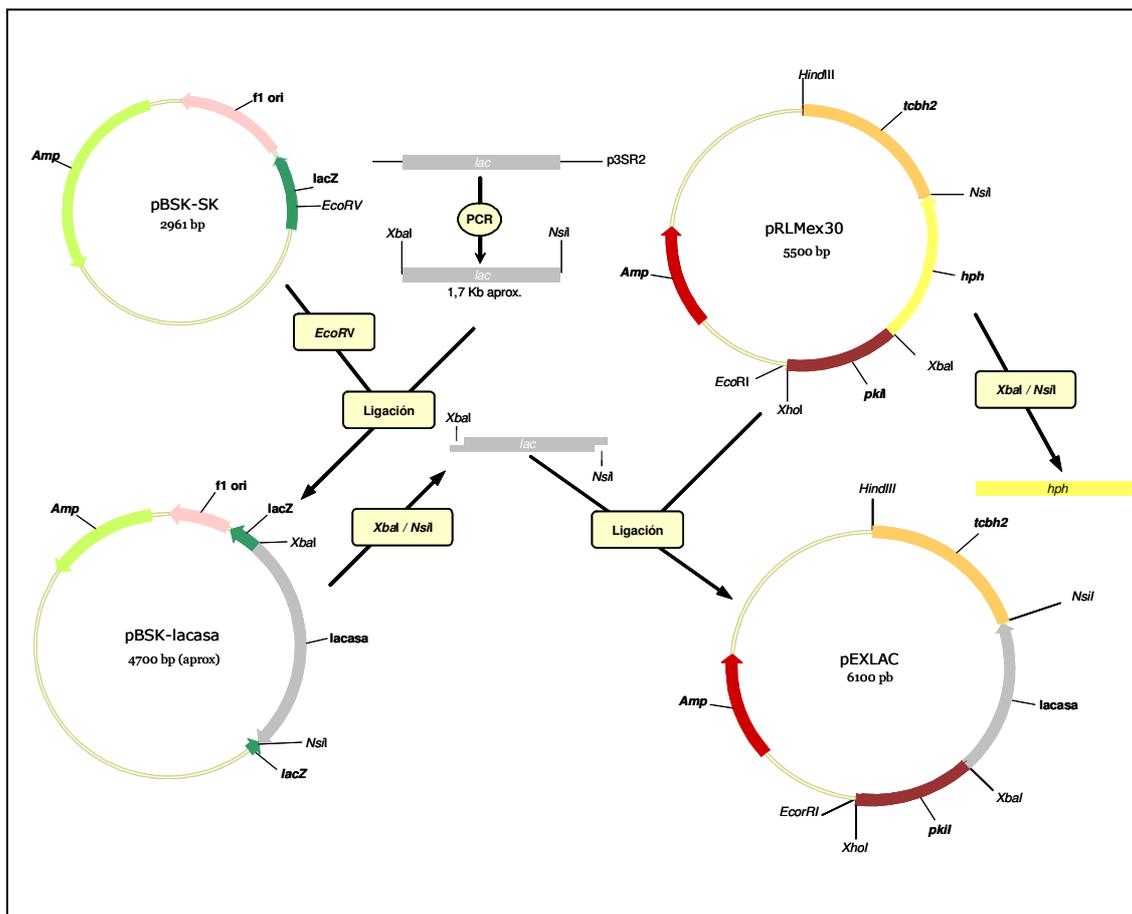


Figura III-34: Esquema de la construcción del plásmido pEXLAC, que contiene el gen *lacI* de *Polyporus hydnooides* bajo el control del promotor *pkiI* y el terminador *tcbh2*, ambos de *T. reesei*. En la figura se detallan los enzimas de restricción utilizados así como los sitios de corte de los enzimas más importantes. Al tratarse de una representación gráfica, las distintas construcciones no están representadas a escala.

La eficiencia de transformación resultó ser muy baja obteniéndose entre 15–25 transformantes por cada experimento de transformación (1,5–2,5 transformantes por μg de ADN). Estos posibles transformantes se mantuvieron bajo presión selectiva (presencia del antibiótico higromicina) durante varios pases sucesivos, observando que su fenotipo era estable. Posteriormente, los transformantes seleccionados fueron crecidos en medio líquido y se extrajo su ADN total para confirmar mediante amplificación por PCR e hibridación, la integración del plásmido en sus genomas.

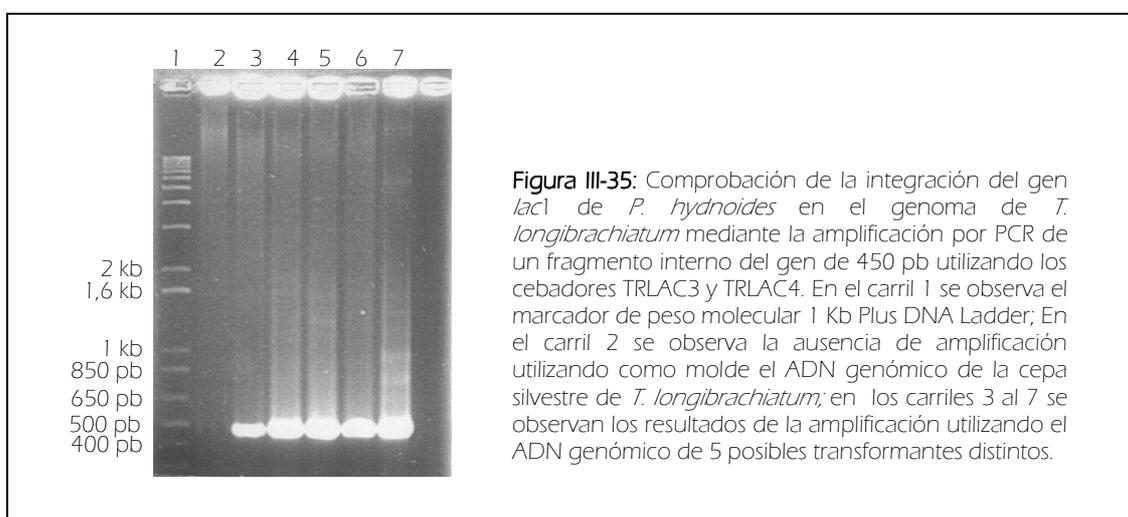
III-7.1.2 Análisis de los transformantes mediante amplificación por PCR.

Con el fin de verificar que la integración del gen codificante de la lacasa había ocurrido en los transformantes seleccionados, se realizó un análisis del ADN mediante PCR utilizando los cebadores TRLAC3 y TRLAC4 (ver Caja III-11). Esta pareja de cebadores amplificaba un fragmento interno de la lacasa de aproximadamente 450 pb y fue empleada para confirmar la presencia o ausencia del gen de la lacasa.

TRLAC3	5' GGC GGT GTC GAC CTG GCT CTC AAC ATG 3'
TRLAC4	5' TTG CGG GAC CGG GTT CGT AGC GGC GAC 3'

Caja III-11: Cebadores diseñados para la amplificación de un fragmento interno de la lacasa de *P. hydroides*.

Tras varias transformaciones realizadas, el análisis por PCR de unos 50 transformantes (ver Figura III-35), nos permitió concluir que solamente en 17 de ellos (en la figura se muestran 5) se había integrado el gen *lacI*, puesto que observamos la amplificación del fragmento interno de 450 pb. En los restantes transformantes no se amplificó dicho fragmento, indicando que la construcción no se había integrado de manera completa en el genoma del hongo, perdiéndose o inactivándose parte de la construcción.

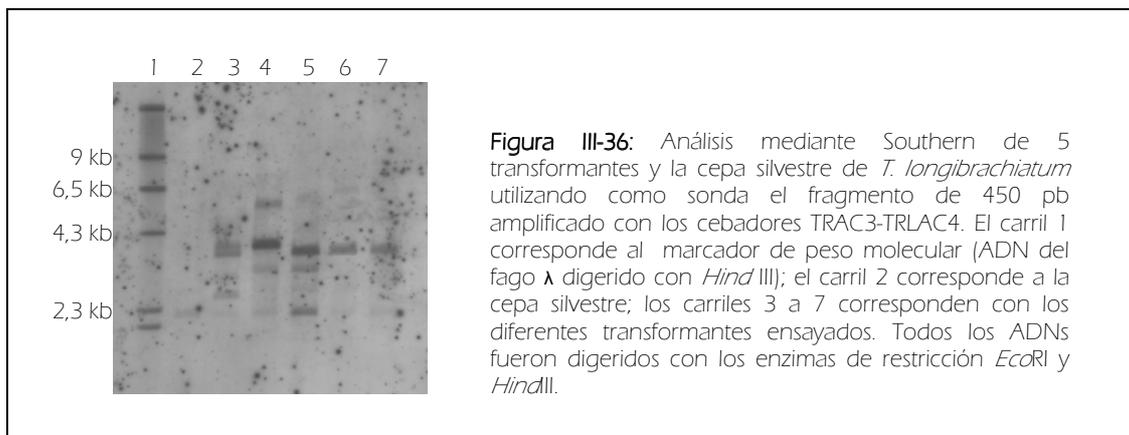


III-7.1.3 Verificación de los transformantes mediante hibridación de ácidos nucleicos.

Los transformantes examinados por PCR que consideramos positivos fueron seleccionados para un posterior análisis mediante hibridación a fin de confirmar la integración o no del gen de la lacasa. El ADN total de cada uno de los transformantes fue digerido con las endonucleasas *EcoRI* y *HindIII* y tras ser transferido a un filtro de nailon fue hibridado con el fragmento interno anteriormente amplificado por PCR (450 pb) (ver Figura III-36).

Si el casete de expresión no se ha integrado no debería haber señal de hibridación, como en el caso de la cepa silvestre (Carril 2). Por el contrario, en los transformantes en los que se haya integrado el casete, debe aparecer una señal de hibridación con un tamaño de aproximadamente 3,7 kb que es el tamaño del casete completo que resulta liberado tras la digestión con los dos enzimas mencionados. Las bandas de otros tamaños que aparecen pueden ser debidas a digestiones parciales del ADN total de los diferentes transformantes (bandas de mayor tamaño) o a hibridaciones inespecíficas. La hibridación realizada confirmaba que **los 5 transformantes analizados eran**

portadores del gen *lacI* de *P. hydonides* mediante su integración en el genoma de *T. longibrachiatum*.



III-7.1.4 Ensayos de la actividad lacasa en los transformantes pEXLAC confirmados.

Dado que nuestro interés era corroborar si una eficiente producción de lacasas podía contribuir a la eliminación de los clorofenoles del medio de cultivo, y por tanto a disminuir la formación de cloroanisoles, se realizaron ensayos para medir la actividad lacasa presente en los transformantes en los que se había verificado la integración del casete de expresión.

Para llevar a cabo este estudio se realizaron ensayos de actividad lacasa tanto en medio líquido como en medio sólido utilizando la metodología descrita en el apartado II-11.7 de *Materiales y Métodos*. Como control positivo se utilizaron sobrenadantes de cultivos de *Polyporus hydnoides*.

Todos los ensayos realizados tanto en medio líquido como en medio sólido dieron resultado negativo, por lo que decidimos tratar de confirmar si la transcripción y expresión del gen *lacI* eran correctas.

III-7.1.5 Análisis de la expresión del gen *lac* de *P. hydnoides*.

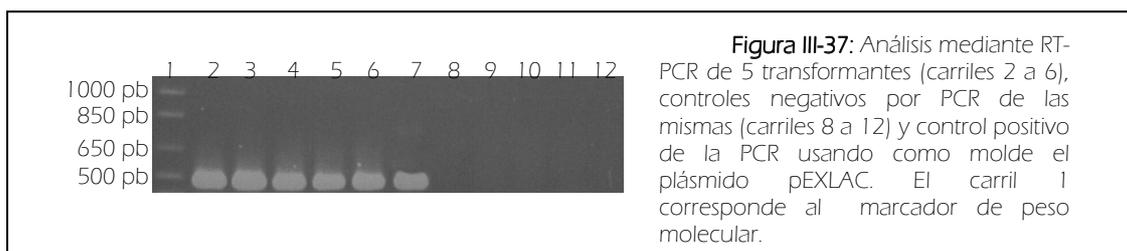
III-7.1.5.1 Análisis transcripcional del gen *lac* de *P. hydnoides*.

Para ello realizamos experimentos de RT-PCR. En primer lugar, el micelio correspondiente a 100 ml de medio de cultivo en caldo extracto de malta (MEB) fue recogido por filtración tras una incubación de 48 horas a 28°C con una agitación de 220 rpm. Se procedió después a la extracción de ARN total según se explica en el apartado II-8.1 de *Materiales y Métodos*. Posteriormente se realizaron las reacciones de RT-PCR utilizando los cebadores cebadores TRLAC1 y TRLAC que se muestran en la **Caja III-12**.

TRLAC1	³ CTG ACC GTC ATC GAG GCG GAC ³
TRLAC2	³ GAA GGT GTG CCC GTG CAA GTG ³

Caja III-12: Cebadores diseñados para la amplificación de un fragmento interno de la lacasa de *P. hydnoides*.

El producto amplificado tiene un tamaño aproximado de 480 pb. Los resultados de estas RT-PCR se representan en la **Figura III-37**. Todos los transformantes positivos verificados por hibridación de ADN transcribían el ARN mensajero correspondiente, como se demuestra en los resultados de la RT-PCR.



Por tanto, estos datos confirmaban que la **transcripción del gen no era el factor limitante responsable de la ausencia de actividad lacasa** en los transformantes analizados. Confirmada la transcripción del gen, pasamos a la comprobación de la traducción del mismo mediante análisis de hibridación (*western blot*).

III-7.1.5.2 Expresión de la proteína LAC1 de *P. hydnoides*.

Una vez confirmada la transcripción del gen *lac1* se procedió a valorar si se estaba produciendo la traducción a proteína del ARNm correspondiente, ya que los resultados de los ensayos enzimáticos habían sido siempre negativos. Para ello, se realizaron cultivos en medio líquido y se analizaron tanto los concentrados (5x) de los caldos de cultivo como preparaciones de proteínas intracelulares (tal como se detalla en el apartado II-11.1 de Materiales y Métodos) a partir del micelio obtenido en dichas fermentaciones. Como control positivo se empleó la cepa de *P. hydnoides* cultivada de igual manera. Los diferentes extractos proteicos fueron separados por SDS-PAGE. Los anticuerpos anti-lacasa, cedidos amablemente por el Dr. Ramón Santamaría, se hibridaron con los extractos proteicos previamente transferidos a una membrana de PVDF, según se describe en el apartado II-11.8.1 de Materiales y Métodos, y dichas membranas reveladas. Como se aprecia en la **Figura III-38**, tanto en los caldos de cultivo como en los extractos crudos del control positivo, se aprecia una señal de hibridación positiva de aproximadamente 64 KDa, tamaño que coincide con el de la proteína LAC1 según Coll *et al.*, (1993). Sin embargo, no obtuvimos ninguna señal de hibridación positiva de un tamaño similar en ninguno de los transformantes analizados. Únicamente obtuvimos una señal común a todos los transformantes de un tamaño aproximado de unos 15 KDa que, a nuestro juicio, podía tratarse de un producto de degradación de la proteína recombinante, debido a un procesamiento de la misma por parte del organismo transformado. Esta

degradación podría ser debida posiblemente, a la falta de reconocimiento de las señales que conduzcan a un plegamiento incorrecto y que desencadenen la respuesta UPR (*Unfolded Protein Response*) a proteínas mal plegadas, presente en todos los eucariotas [descrito también para *Trichoderma* sp. (Saloheimo *et al.*, 2003)]. La ausencia de expresión podría también ser debida a una incorrecta glicosilación de la proteína. De hecho, según Coll *et al.* (1993) en esta proteína existen 4 sitios de glicosilación que podrían no ser reconocidos eficazmente en *T. longibrachiatum*, dando lugar a una proteína más susceptible al ataque proteolítico. Podríamos también pensar en un ineficiente reconocimiento del péptido líder (Gouka *et al.*, 1997) de 21 aminoácidos, localizado en el extremo amino terminal de la proteína. La incapacidad de la proteína para ser secretada y por tanto, su acumulación, la haría más susceptible a una degradación proteolítica intracelular.

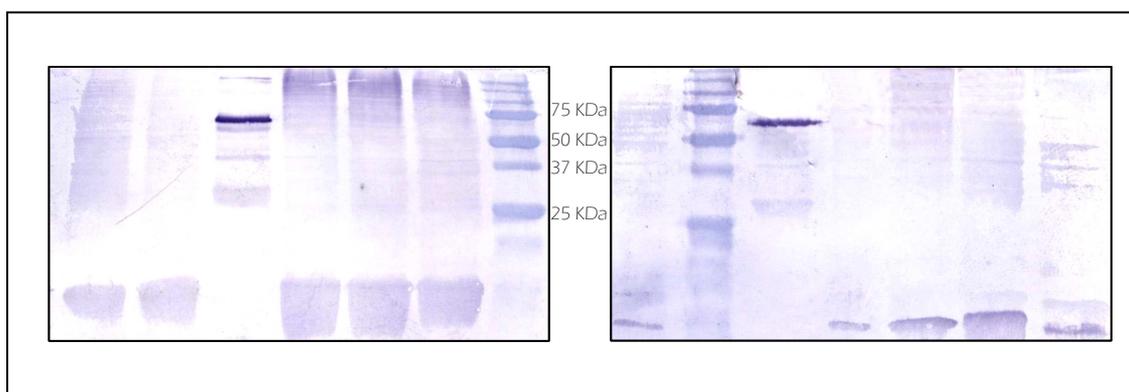


Figura III-38: Inmunohibridación (*western blot*) de los extractos proteicos de los transformantes positivos de la construcción pEXLAC. **A)** Sobrenadante de cultivos. Las calles 1, 2, 4, 5, 6 y 7 corresponden a los sobrenadantes de los transformantes positivos. La calle 3 corresponde al sobrenadante del cultivo de *P. hydroides* (control positivo). La calle 7 corresponde al marcador de peso preteñido. **B)** Extracto crudo del micelio. las calles 1, 4, 5, 6 y 7 corresponden a los transformantes anteriormente descritos. La calle 2 corresponde al marcador de peso molecular preteñido y la calle número 3 corresponde al extracto crudo realizado al control positivo (*P. hydroides* cultivado 7 días en medio líquido).

III-7.2 Expresión del gen *peB* de *P. eryngii* en *T. longibrachiatum*.

Puesto que el experimento de expresión del gen *lac* de *P. hydroides* en *T. longibrachiatum* descrito en el apartado anterior tuvo un resultado negativo, decidimos abordar la posible expresión de otro gen codificante de un enzima lacasa, más concretamente el gen *peB* de *P. eryngii* (Rodríguez *et al.*, 2008).

III-7.2.1 Vector para la de expresión en *T. longibrachiatum* del gen *peB* de *P. eryngii*.

Para analizar la posible expresión del gen *peB* de *P. eryngii* en *T. longibrachiatum* se utilizó una construcción que ya había demostrado su funcionamiento en ascomicetos, concretamente en *Aspergillus niger* (Rodríguez *et al.*, 2008). Esta construcción, denominada pPEL3G (amablemente cedida por la Dra. M^a Jesús Martínez, CIB, CSIC, Madrid) es un derivado del vector pAN52-4 y contiene el ADNc completo del gen *peB* al que se le ha cambiado su péptido señal por los 24 aminoácidos iniciales de

la glucoamilasa de *Aspergillus niger*. Con esta sustitución se trataba de evitar una posible interpretación errónea de la señal de localización de *P. eryngii* por parte del ascomiceto hospedador. La expresión génica tiene lugar bajo el control del promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpdA*) y el terminador *trpC*, ambos de *A. nidulans* (ambas señales han sido ensayadas con éxito en *T. longibrachiatum* en la construcción pALGEN3). Una representación del plásmido pPEL3G puede apreciarse en la **Figura III-39**.

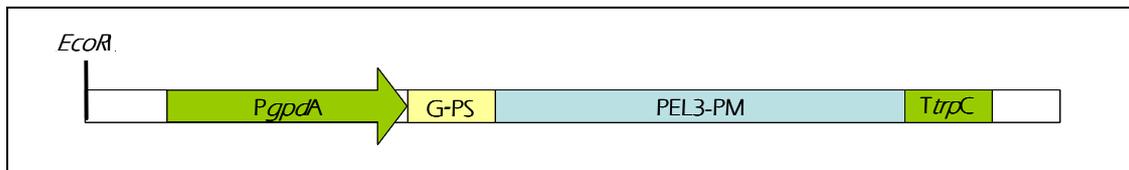


Figura III-39: Construcción pPEL3G (Rodríguez et al., 2008). Representación lineal del casete de expresión de la lacasa *peB*. En verde se indican las regiones promotora y terminadora. En amarillo pálido se indica la región del péptido señal de la glucoamilasa que ha sustituido a la original de *P. eryngii*. En azul se indica la secuencia de la proteína madura de PEL3.

Para ello se realizó una cotransformación, utilizando como plásmido portador del casete de resistencia el vector p43gdh, que confiere resistencia a fleomicina. Los posibles transformantes se mantuvieron bajo presión selectiva durante varios pases sucesivos, observando que su fenotipo era estable. A continuación, los transformantes seleccionados se crecieron en medio selectivo lacasa para tratar de detectar la producción de actividad lacasa.

III-7.2.2 Ensayos en medio sólido de la actividad lacasa en los transformantes pPEL3G.

Al haber realizado una cotransformación en lugar de una transformación, se da la circunstancia de que puede haber transformantes que hayan incorporado el plásmido de resistencia a fleomicina pero no sean transformantes para pPEL3G. Por ello, y para ahorrarnos el esfuerzo de realizar extracciones de ADN de todos los transformantes, decidimos realizar un rastreo previo de actividad lacasa para, posteriormente, realizar la confirmación por PCR o por hibridación de ácidos nucleicos.

A tal efecto, se sembraron los transformantes que habían crecido en los sucesivos pases en medio selectivo con fleomicina, en medio selectivo lacasa. De entre todos los transformantes, **6 mostraban una clara actividad lacasa, ya que el ABTS presente en el medio de cultivo era oxidado, dando lugar a la producción de una característica coloración azul-verdosa** del compuesto oxidado. Para asegurarnos de que esta coloración no era un mero efecto del crecimiento en placa sembramos la cepa silvestre de *T. longibrachiatum* como control negativo y la cepa silvestre *P. hydroides*, productora de lacasas extracelulares, como control positivo. Las placas se incubaron a 30°C durante 6 días. Como se aprecia en la **Figura III-40** el control negativo es incapaz de oxidar el compuesto, quedando el medio con su coloración inicial, mientras que tanto el control

positivo como los transformantes positivos coloreaban la totalidad de la placa con un intenso color azul.

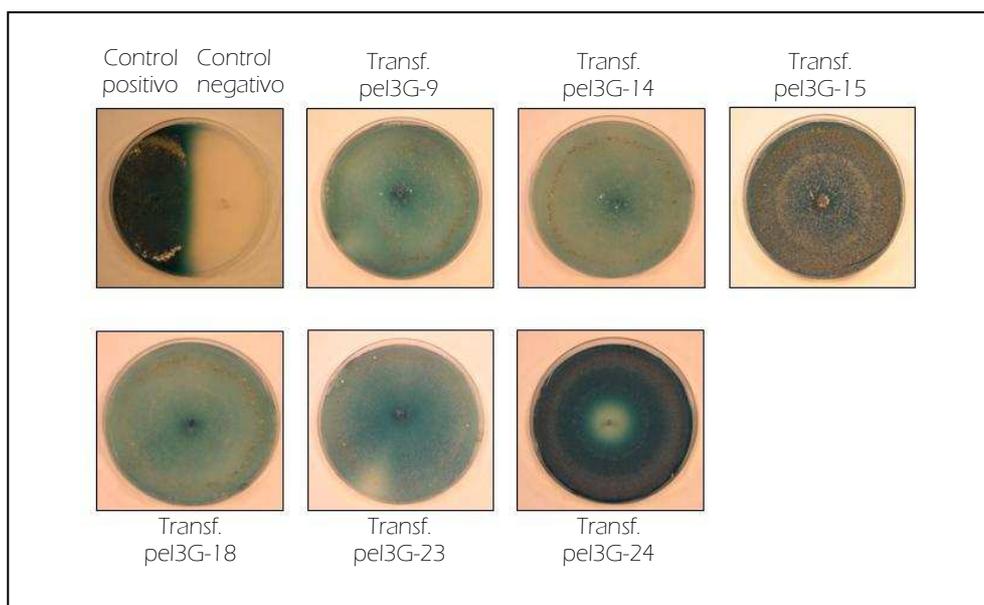


Figura III-40: Fotografías de las placas de medio selectivo lacasa sembradas con los transformantes seleccionados en el primer rastreo e incubadas a 30°C durante 6 días. En la primera foto se observan los controles positivo (cepa silvestre) de *P. hydroides* y negativo (cepa silvestre de *T. longibrachiatum*) sembrados en la misma placa para destacar las diferencias entre producción y no producción de actividad lacasa. En las fotografías sucesivas se aprecian los diferentes transformantes positivos, que expresan con mayor o menor eficacia la lacasa *peB* de *P. eryngii*.

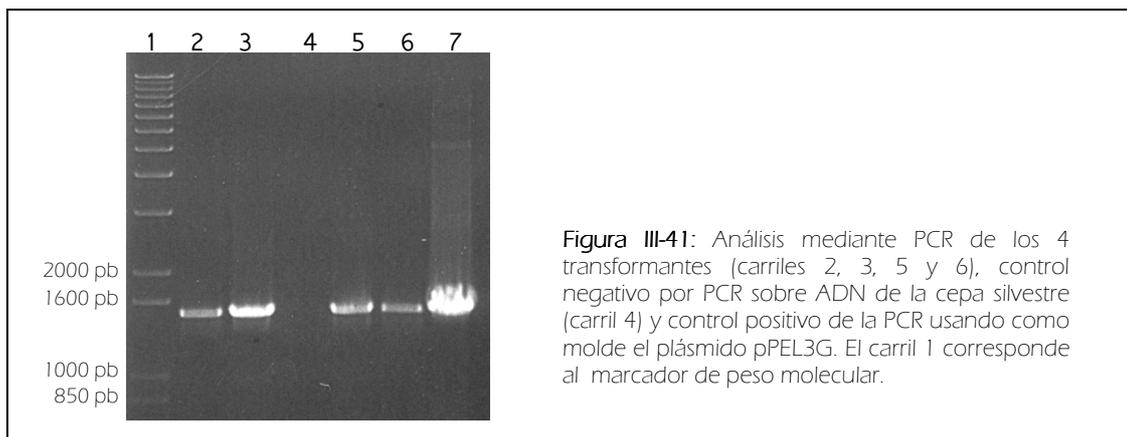
III-7.2.3 Análisis de los transformantes mediante amplificación por PCR.

Con el fin de verificar que la integración de la lacasa había ocurrido en los transformantes seleccionados, se realizó un análisis del ADN mediante PCR utilizando como cebadores los cebadores PEL3G-F y PEL3G-R (ver **Caja III-13**). Esta pareja de cebadores amplifica un fragmento interno del gen *peB* de aproximadamente 1520 pb y fue empleada para confirmar la presencia o ausencia del gen de la lacasa.

PEL3G-F	⁵ CCA TCG GGC CCA TTG CCG ACA TG ³
PEL3G-R	⁵ GCT ATG CCA CCT CTG TCG GAA ACT ³

Caja III-13: Cebadores diseñados para la amplificación de un fragmento interno de la lacasa de *P. eryngii*.

Una vez seleccionados los 4 transformantes que parecían producir más actividad lacasa en medio sólido (a la vista del análisis de las placas de medio selectivo lacasa) se realizaron extracciones de ADN y se analizaron por PCR dichos transformantes (ver **Figura III-41**). Pudimos observar que en los 4 transformantes analizados se amplificó exclusivamente el fragmento de 1520 pb. En el control negativo (realizado con ADN de la cepa silvestre) no se amplificó dicho fragmento, lo que indicaba que **la construcción se había integrado en el genoma de los hongos transformantes.**



III-7.2.4 Verificación de los transformantes mediante hibridación de ácidos nucleicos.

Los transformantes examinados por PCR que consideramos positivos fueron seleccionados para un posterior análisis mediante hibridación a fin de confirmar la integración o no del gen *peβ*. El ADN total de cada uno de los transformantes fue digerido con las endonucleasas *NcoI* y *BamHI* y tras ser transferido a un filtro de nailon fue hibridado con el fragmento interno anteriormente amplificado por PCR (aprox 1520 pb) (ver Figura III-42).



Si el casete de expresión no se ha integrado no debería haber señal de hibridación, como en el caso de la cepa silvestre (Carril 4). Por el contrario, en los transformantes en los que se haya integrado el casete, debe aparecer una señal de hibridación con un tamaño de aproximadamente 1,7 kb que es el tamaño del gen completo que resulta liberado tras la digestión con las dos enzimas mencionadas. Las bandas de otros tamaños que aparecen pueden ser debidas a digestiones parciales del ADN total de los diferentes transformantes (bandas de mayor tamaño) o a hibridaciones inespecíficas. La hibridación realizada confirmaba que **los 9 transformantes analizados eran portadores del gen *peβ* de *P. eryngii* mediante su integración en el genoma de *T. longibrachiatum*.**

III-7.2.5 Ensayos enzimáticos en medio líquido de la actividad lacasa en los transformantes pPEL3G.

Una vez confirmada la integración de la construcción en los 9 transformantes citados en el apartado anterior, realizamos mediciones de la actividad lacasa en medio líquido. Para ello, seleccionamos los 6 transformantes que habían mostrado una mayor actividad lacasa (creciendo en medio sólido selectivo) y los resembramos en medio RB con el fin de obtener una buena cantidad de esporas, con las que inoculamos matraces de medio de producción de lacasa (MLPVP). Muestras de estos cultivos correspondientes a los tiempos de cultivo 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, fueron ensayadas tal como se describe en el apartado II-11.7 de Materiales y Métodos sin apreciar ningún incremento apreciable de la absorbancia de la muestra (realizamos mediciones de absorbancia de las preparaciones a los 1, 10 y 60 minutos). Sin embargo, estas preparaciones iban ganando en coloración azul-verdosa del ABTS oxidado a medida que pasaban los días, mientras que el control negativo permanecía inalterado (descartándose así una posible oxidación natural del compuesto). En los casos de las muestras correspondientes a los transformantes 15, 18 y 24 al cabo de 7-8 días, la coloración había alcanzado un tono verde oscuro similar a la preparación realizada como control positivo (utilizando lacasa purificada de *Trametes versicolor*). Este hecho nos lleva a pensar que:

1.- La cantidad de lacasa producida en medio líquido por los transformantes pPEL3G es demasiado baja como para ser medida con el sistema tradicional de aumento de absorbancia a 436 nm durante 1 minuto.

2.- La actividad de la lacasa producida es resistente en el tiempo y no se degrada con facilidad, ya que las reacciones fueron almacenadas a temperatura ambiente y sin la adición de ningún agente protector (glicerol, inhibidores de proteasas...), siendo activa durante varios días posteriores a su secreción al medio.

III-7.2.6 Ensayos sobre corcho granulado.

A la vista de los resultados anteriores, y apoyados en la certeza de que la actividad obtenida en cultivos en medio sólido es mayor que la obtenida en medio líquido, decidimos analizar el comportamiento de los transformantes pPEL3G 15 y 24 (mayores productores en placa) creciendo en condiciones similares a las que encontramos en la corteza de alcornoque o en el corcho almacenado. Para ello, realizamos cultivos en granulado de corcho, según la metodología descrita en el apartado II-14. Los extractos etanólicos obtenidos de estos cultivos se enviaron al Centro de Valorización de la Calidad en Enología (CEVAQOE España SL) donde se les realizó una análisis por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (ECD) mediante el que se valoraron los haloanisoles y halofenoles presentes. Los resultados de la cuantificación llevada a cabo se representan en la **Tabla III-9**.

Muestra	2,4,6-TCP (ng/g corcho)	2,4,6-TCA (ng/g corcho)
<i>T. longibrachiatum</i> wt + 2,4,6-TCP	105,30	283,11
pPEL3G-15 + 2,4,6-TCP	86,37	231,2
pPEL3G-24 + 2,4,6-TCP	91,72	239,8

Tabla III-9: Cuantificación de 2,4,6-TCP y 2,4,6-TCA presente en las muestras de corcho inoculadas con las cepas silvestre, pPEL3G-15 y pPEL3G-24. Los valores corresponden a la media de dos experimentos independientes.

Como se puede observar, en los matraces en los que hemos inoculado los transformantes 15 y 24 ha habido un descenso en la cantidad de 2,4,6-TCP con respecto a la cepa inoculada con la cepa silvestre. En concreto, en la muestra correspondiente con el transformante **pPEL3G-15 hay un 17,97% menos de 2,4,6-TCP**, mientras que el descenso es menor en la muestra correspondiente al transformante **pPEL3G-24**, situándose en un **12,89%**. Estos descensos, si bien no representan una bajada drástica de las cantidades totales, si que dejan patente el hecho de que **el cultivo de cepas de *T. longibrachiatum* que expresan heterológicamente el gen *pel3* de *P. eringii* produce un descenso en las cantidades de 2,4,6-TCP presentes en el corcho**. Como hemos visto en el apartado anterior, los niveles de actividad lacasa producidos por estos transformantes son realmente pequeños, pero pese a ello podemos ver un descenso en la cantidad de 2,4,6-TCP. Al ser la lacasa un enzima muy estable y activa durante largos períodos de tiempo creemos que mayores tiempos de crecimiento del hongo [como los que tienen lugar en la fase de estabilización del proceso de fabricación del tapón de corcho (ver apartado I-1.4.3.1)], podrían dar como resultado un descenso todavía mayor en la concentración de 2,4,6-TCP al observado en los 30 días ensayados en este experimento.

De manera similar, vemos como los niveles de 2,4,6-TCA producidos por los transformantes pPEL3G-15 y pPEL3G-24 son un 18,3 % y un 15,3 % menores a los producidos por la cepa silvestre. Aunque las diferencias no son cuantitativamente importantes, si que son indicativas de que la expresión de altos niveles de actividad lacasa podrían ser un herramienta eficaz para disminuir los niveles de 2,4,6-TCA en corcho.

Discusión general

IV-1 Identificación, clonación y secuenciación del gen codificante del enzima CPOMT de *T. longibrachiatum*.

IV-1.1 Introducción.

En estudios anteriores a este trabajo (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002a; Coque *et al.*, 2003) se había demostrado que *T. longibrachiatum* tiene la capacidad de transformar 2,4,6-TCP en 2,4,6-TCA como sistema de detoxificación del medio, creciendo tanto en medio líquido como sobre granulado de corcho. Estos autores habían demostrado que el mecanismo por el cual se forma el 2,4,6-TCA es la *O*-metilación de modo que, en un único paso, un posible enzima clorofenol-*O*-metiltransferasa transfiriere un grupo metilo desde el donador universal de grupos metilo (SAM) al grupo hidroxilo del 2,4,6-TCA, dando lugar al 2,4,6-TCA. Uno de los objetivos prioritarios al comenzar este trabajo era la completa caracterización de la proteína CPOMT de *T. longibrachiatum*, para lo cual, abordamos como primer paso la purificación y secuenciación de péptidos internos de la misma.

Tiempo atrás, para secuenciar proteínas se necesitaban grandes cantidades de proteína pura para, posteriormente, ser utilizadas en una técnica denominada *degradación Edman*, en la que se identificaban aminoácidos que eran liberados químicamente desde el extremo amino terminal de la proteína. Esta era una técnica compleja, con limitaciones (proteínas acetiladas en el amino terminal) y que conllevaba gran cantidad de tiempo. Durante los 90, se desarrolló la técnica de la espectrometría de masas (MS) mediante la cual las biomoléculas son ionizadas y su masa puede ser medida en función de su desplazamiento en un sistema de vacío. Esta técnica reemplazó a la degradación Edman, al ser más rápida y potente, y no tener las limitaciones de ésta (Steen y Mann, 2004). Un esquema del desarrollo típico de un experimento de caracterización de péptidos y proteínas por MS se indica en la **Figura IV-1**.

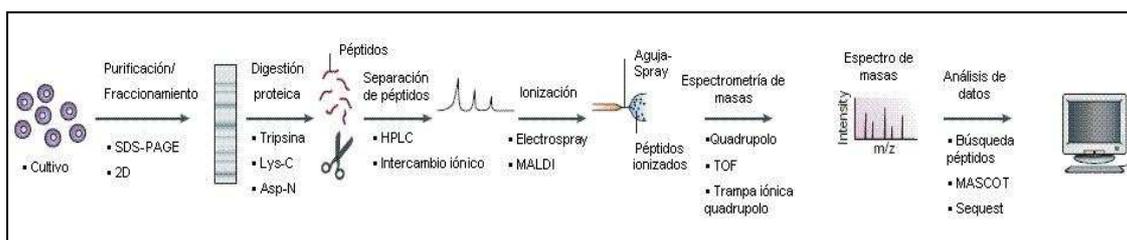


Figura IV-1. Experimento modelo de caracterización de proteínas por MS (Steen y Mann, 2004).

Pese a que los espectrómetros de masas pueden medir la masa de proteínas intactas hay varias razones por las cuales es preferible realizar la secuenciación de péptidos de la misma y no de la proteína entera. Una de ellas es la dificultad de mantener la solubilidad de ciertas proteínas sin recurrir a detergentes (que interfieren con la MS) o la dificultad de predecir la secuencia a partir de la masa de proteínas enteras, pero sobre todo si la finalidad de la secuenciación es la identificación de la proteína, lo

más importante es la información sobre la secuencia y la MS presenta su máxima sensibilidad obteniendo la secuencia de péptidos de hasta 20 aminoácidos (Steen y Mann, 2004). En cualquier caso, el éxito de esta secuenciación *de novo* depende de la calidad de los datos (en términos de precisión de la masa y resolución del instrumental) que a su vez está relacionada con la calidad de la muestra de partida. Es por este motivo por el que decidimos realizar una purificación de la proteína previa a la MS pese a que esta técnica no requiere una purificación a homogeneidad de la proteína a identificar. Una mayor calidad de los datos va a resultar en un menor número de indeterminaciones en la secuenciación de péptidos internos, cuestión que es básica a la hora de identificar una proteína en función de cortos fragmentos de la misma.

IV-1.2 Idoneidad de la técnica de secuenciación *de novo* para la identificación de proteínas.

La metodología clásica a la hora de abordar el clonado de genes se basa en el conocimiento de, al menos, un fragmento de la secuencia de los mismos. Si se conoce un fragmento de la secuencia, gracias a las técnicas bioinformáticas actuales y a la existencia de bases de datos cada vez más extensas y completas se puede comparar esta secuencia con la de genes de otras especies (ortólogos o parálogos) que tengan una función igual o similar, o incluso, con genes homólogos dentro de la misma especie. Estas comparaciones nos van a dar información sobre la secuencia completa de dichos genes de función similar, permitiéndonos diseñar diversas estrategias para clonar en su totalidad el gen de estudio (Kwok *et al.*, 1994).

Una de las estrategias más habituales es realizar un alineamiento de secuencias de genes con la misma función, a fin de identificar secuencias conservadas en los mismos que nos permitan diseñar cebadores con los que amplificar el gen de interés (Wilks *et al.*, 1989), o generar sondas con las cuales rastrear genotecas (Lee *et al.*, 1988). Para realizar esos alineamientos es necesario que las secuencias que lo componen pertenezcan a la misma familia o realicen la misma función en el organismo. Es aquí donde radicaba el problema en nuestro caso particular ya que al realizar la búsqueda “chlorophenol-*O*-methyltransferase” en la base de datos *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) no encontramos ningún resultado de genes previamente descritos que poseyeran dicha función, sino que obtendríamos entradas referidas a genes de la familia de las metiltransferasas SAM dependientes. La superfamilia de las metiltransferasas (EC 2.1.1-) engloba una gran cantidad de grupos (ver **Tabla IV-1**) con diferentes sustratos de actuación y que están relacionadas en funciones completamente dispares, desde la metilación del ADN hasta la modificación de aminoácidos. Al tratarse de una familia tan heterogénea y no haber encontrado ninguna metiltransferasa de clorofenoles en las bases de datos, no nos era posible realizar un alineamiento en el que no estuviéramos cometiendo errores de bulto, al incluir proteínas sólo por el hecho de ser metiltransferasas cuando su función y por tanto su estructura, podía ser completamente diferente.

Llegados a este punto, y ante la falta de información necesaria, decidimos abordar el problema basándonos en los únicos datos fiables de los que disponíamos, los de la actividad enzimática y tratar de recorrer el camino inverso, es decir, partir de la actividad enzimática para llegar al gen. Para ello decidimos realizar una optimización de la purificación de la enzima CPOMT con la finalidad de obtener (mediante la secuenciación *de novo* de péptidos internos) fragmentos de la propia secuencia de la proteína con los cuales poder diseñar una sonda totalmente homóloga que nos permitiera realizar el rastreo de la genoteca genómica de *T. longibrachiatum* construida para este trabajo.

Methyltransferases [D08.811.913.555.500]
- Acetylserotonin O-Methyltransferas [D08.811.913.555.500.100]
- Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.175]
- Catechol O-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.250]
- DNA Modification Methylases [D08.811.913.555.500.350]-DNA(
-Cytosine-5)-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.350.500
- Site-Specific DNA- Methyltransferase (Adenine-Specific)
[D08.811.913.555.500.350.700]
- Site-Specific DNA-Methyltransferase (Cytosine-Specific)
[D08.811.913.555.500.350.850]
- Glycine N-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.387]
- Guanidinoacetate N-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.425]
- Histamine N-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.500]
- Homocysteine S-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.625]
- 5-Methyltetrahydrofolate-Homocysteine S-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.645]
- Nicotinamide N-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.650]
- Phenylethanolamine N-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.700]
- Phosphatidyl-N-Methylethanolamine N-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.710]
- Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.712]
- Protein Methyltransferases [D08.811.913.555.500.800]
- Protein Methyltransferases [D08.811.913.555.500.800]
- Histone-Lysine N-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.800.400]
- O(6)methylguanine-DNA Methyltransferase [D08.811.913.555.500.800.650]
- Protein-Arginine N-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.800.750]
- Protein-O-Methyltransferase [D08.811.913.555.500.800.800]
- Thymidylate Synthase [D08.811.913.555.500.862]
- tRNA Methyltransferases [D08.811.913.555.500.925]

Tabla IV-1. Familia de las metiltransferasas. Fuente: *National Library of Medicine* (www.nlm.nih.gov/)

En la última década, la MS se ha convertido en el método más utilizado para la identificación de proteínas. Extractos celulares, mezclas de proteínas y proteínas aisladas por

inmunoprecipitación o cromatografía se estudian rutinariamente utilizando esta técnica (Chalmers y Gaskell, 2000; Aebersold y Mann, 2003; Dreger, 2003). Su versatilidad es tal que permite analizar todo tipo de muestras desde tejidos hasta material vegetal (Roberts, 2002). Debido a este gran número de aplicaciones y al gran volumen de información que puede generar, el número de publicaciones relacionadas con estas técnicas ha aumentado de manera exponencial en los últimos 20 años (ver **Figura IV-2**).

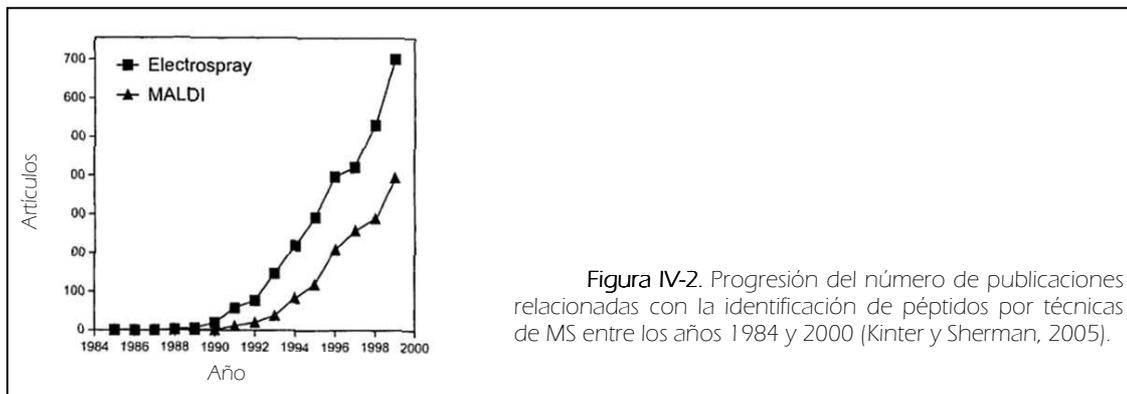


Figura IV-2. Progresión del número de publicaciones relacionadas con la identificación de péptidos por técnicas de MS entre los años 1984 y 2000 (Kinter y Sherman, 2005).

Teniendo en cuenta la amplia utilización de esta técnica y su alta especificidad y rendimiento, decidimos realizar una combinación entre purificación de la proteína por FPLC y posterior identificación de los candidatos más plausibles (bandas proteicas con actividad clorofenol-*O*-metiltransferasa que además eran detectadas por fotomarcaje radiactivo con SAM tritiada) como la opción más fiable y sólida de todas las posibles.

IV-1.3 Identificación de CPOMT como una *O*-metiltransferasa.

Como resultado del análisis por MS del enzima CPOMT obtuvimos una serie de péptidos internos a partir de la proteína purificada que se recogen en la **Figura IV-3**.



Estos péptidos representaban aproximadamente el 14% del total de la secuencia de la proteína. Tal como se aprecia en la **Figura IV-3**, la calidad de los péptidos secuenciados, en referencia a la identidad mostrada con la secuencia real es realmente buena, alcanzando el 100% en tres de ellos, de los cuales dos se predijeron sin indeterminaciones. La obtención de unos péptidos fieles a la secuencia real facilita enormemente la identificación de la proteína. Además en el proceso de identificación nos vimos favorecidos por el hecho de que dos de los péptidos secuenciados coincidían con dos de los dominios conservados de las metiltransferasas SAM dependientes, en concreto el péptido ADVYFFR coincide con el Motivo A (Ibrahim *et al.*, 1998) y el péptido NLIPALKPGAR coincide con el Motivo C (Chandrashekhar *et al.*, 1998) descritos en el apartado III-3.6.2.2 de Resultados y discusión. Además de la buena calidad de los péptidos, es remarcable el hecho de que 4 de ellos tenían un tamaño superior a los 9 aminoácidos, lo que nos permitió diseñar unos cebadores de una longitud adecuada, ya que el tamaño mínimo aconsejado para el diseño de cebadores degenerados oscila entre 4 y 6 aminoácidos (Kwok *et al.*, 1994). Por otra parte estos datos también nos permitieron realizar alineamientos con las proteínas en los que estaban conservados los péptidos secuenciados *de novo* en la CPOMT, asegurándonos por tanto de que todas estas proteínas posiblemente eran homólogas a la CPOMT de *T. longibrachiatum*.

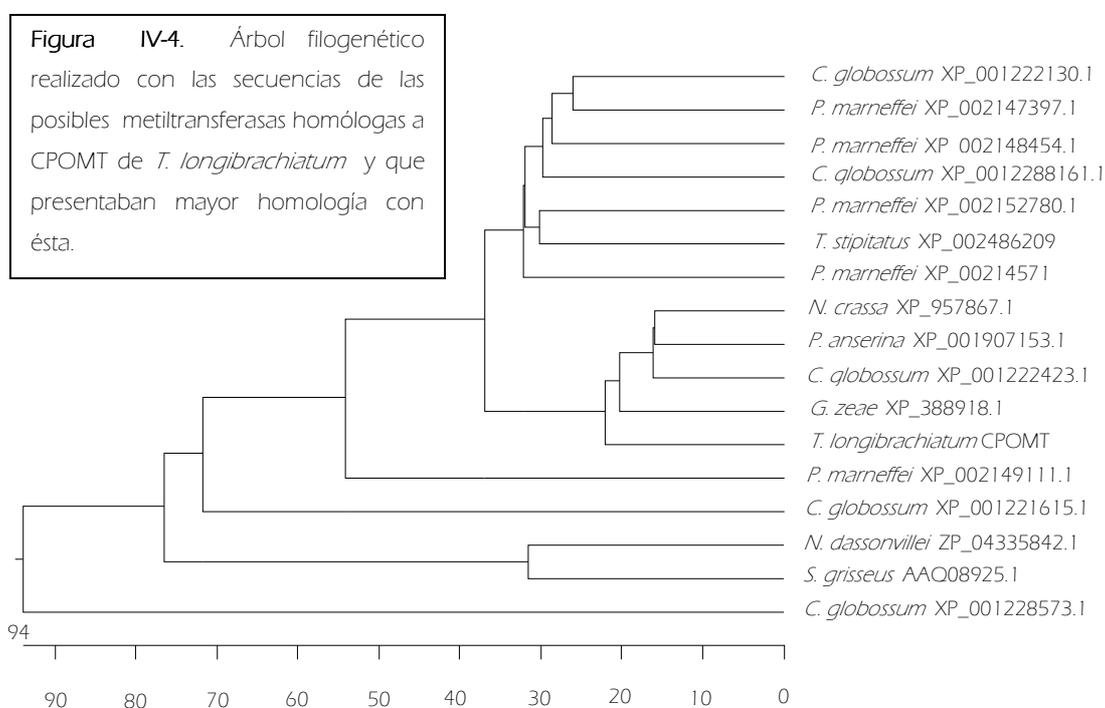
Por lo tanto, **gracias a los datos de huella peptídica y secuenciación *de novo* nos fue posible la identificación del enzima CPOMT de *T. longibrachiatum*** y el posterior rastreo de una genoteca genómica que, finalmente, dio como resultado la secuenciación y clonación del gen *cpomt*.

IV-2 El enzima CPOMT. Función y sentido biológico.

IV-2.1 Análisis filogenético de la actividad metiltransferasa sobre compuestos fenólicos. Búsqueda de homólogos.

Tal como se ha comentado en el primer apartado de esta discusión, la familia de las metiltransferasas engloba un gran número de proteínas con una gran heterogeneidad en cuanto a funciones y estructuras. En nuestro caso particular, nos encontramos ante una enzima capaz de transferir grupos metilo a compuestos de origen fenólico. Pese a que se ha evidenciado la existencia de la metilación de fenoles halogenados tanto en bacterias (Allard *et al.*, 1987; Neilson *et al.*, 1988) como en eucariotas (Cserjesi y Johnson, 1972; Drotar y Fall, 1985; Coulter *et al.*, 1993) al realizar búsquedas en bases de datos nos encontramos con la inexistencia de proteínas de función similar que hayan sido secuenciadas y caracterizadas con anterioridad a este trabajo, lo cual dificultaba el análisis funcional de la misma.

Sin embargo, al comparar la secuencia del enzima CPOMT de *T. longibrachiatum* con las bases de datos (ver **Figura III-14** del apartado de Resultados) pudimos encontrar que se habían depositado secuencias tanto de hongos como de bacterias, que presentaban un altísimo grado de homología con el enzima CPOMT. Las zonas de homología de estas proteínas no se restringían únicamente a los dominios conservados de las metiltransferasas (que son similares en todas las metiltransferasas, independientemente de su función y el sustrato que metilen), sino que están repartidas a lo largo de toda la secuencia de la proteína, lo que puede sugerir un origen común, es decir, que son proteínas con la misma, o al menos parecida función (proteínas homólogas). Además, al realizar estas búsquedas en bases de datos encontramos que existían hongos en los que existía más de una proteína con alta homología con la CPOMT y que eran identificadas como posibles metiltransferasas.



Para tratar de establecer algún tipo de relación entre todas éstas proteínas, realizamos un árbol filogenético (**Figura IV-4**) con ayuda del programa MegAlign (DNASTar). En la elaboración del árbol utilizamos además de la secuencia de la CPOMT, de *T. longibrachiatum* las secuencias de las 5 proteínas con mayor homología con ésta (ver **Tabla III-4**). Utilizamos también las cuatro hipotéticas metiltransferasas que mostraban mayor homología con la CPOMT de *C. globossum* y *P. marneffeii* ya que son los microorganismos en los que se detectaron más probables metiltransferasas homólogas con CPOMT. También añadimos las secuencias de las dos metiltransferasas con mayor homología pertenecientes a organismos procariotas (*Streptomyces* y *Nocardioopsis*), con el fin de comprobar si pudieran tener un origen común con el gen eucariota. Finalmente añadimos la secuencia de una metiltransferasa de *Talaromyces stipitatus*, dado que es la

única de las proteínas homólogas encontradas al realizar una comparación con las bases de datos bioinformáticas (BLAST) de la que se conoce su sustrato presentando éste cierto parecido estructural con los clorofenoles (hidroxiindol).

En una primera observación del árbol filogenético obtenido, centrándonos en la rama que contiene a la CPOMT, vemos que está más próxima a un grupo de cuatro proteínas, que incluye las cuatro proteínas con mayor homología correspondientes a *N. crassa*, *P. anserina*, *C. globossum* (que forman un subgrupo aparte) y *G. zeae* (con la que está más emparentado filogenéticamente *Trichoderma* ya que ambos microorganismos pertenecen al orden de los hipocreales). En este grupo estarían englobadas las proteínas que sin duda tienen un origen común y que, a falta de datos experimentales sobre su función biológica podríamos aventurar que también serían capaces de biometilar clorofenoles.

De las diez proteínas de *Chaetomium* y *Penicillium* incluidas en el árbol 6 de ellas (4 de *Penicillium* y 2 de *Chaetomium*) se agrupan junto con la hidroxiindol O-metiltransferasa de *T. stipitatus* en un brazo independiente al de la CPOMT (indicando que está más relacionada con esta última). Tal como se indicó anteriormente el hidroxiindol tiene una estructura ligeramente parecida a los triclorofenoles, por cuanto que contienen un anillo bencénico. De hecho, los derivados del indol también son tóxicos para los seres vivos y tienen aplicaciones antifúngicas y antibacterianas (William y Thomas, 1992; Phay *et al.*, 1999). Por tanto, atendiendo a esta similitud de sustratos, puede ser que se trate de una familia de proteínas bastante cercanas evolutivamente hablando.

En la parte inferior del árbol filogenético encontraríamos una serie de proteínas que no guardan suficiente parecido con la CPOMT como para estar englobadas en su grupo (*C. globossum* XP_001221615.1 y *P. marneffeii* XP_002149111.1) y otra rama que lógicamente guarda menor parecido ya que engloba a las proteínas procariotas comparadas. Por último, es llamativo el hecho de que exista una proteína de *C. globossum* (XP_001228573.1) que forma una rama bastante distanciada del resto guardando incluso menor similitud que el grupo de las metiltransferasa bacterianas. Esto puede deberse al hecho de que pese a ser una metiltransferasa sea de un origen diferente al resto de proteínas del árbol, posiblemente a causa de a la gran amplitud y complejidad de la familia de las metiltransferasas a que nos venimos refiriendo desde el comienzo de esta Discusión.

Finalmente, cabe destacar la homología mostrada en la zona del genoma adyacente al gen *cpomt*. Tal como se expuso en el apartado III-3.7 de Resultados existe una alta homología con varias policétido sintasas fúngicas del tipo I. Estas proteínas están involucradas en la síntesis de gran variedad de compuestos a partir de la polimerización de ácidos grasos simples. Las policétido sintasas se caracterizan por la existencia de varios dominios cada uno de los cuales tiene una función específica. Es interesante el hecho de que entre estos motivos existen algunos con actividad metiltransferasa, aciltransferasa... De hecho, de las enzimas encontradas llama poderosamente la atención una policétido sintasa

de *Microsporium canis* (secuencia depositada por Cuomo *et al.*) que posee dominios C-metiltransferasa, para la biosíntesis de alternapirona, un decacétido que posee metilaciones en todos sus carbonos en posición 2 (Fujii *et al.*, 2005). Este dato, y el hecho de que estas dos enzimas están posicionadas de manera contigua en el genoma nos permite conjeturar que podríamos encontrarnos ante una agrupación de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos y fenólicos (ligninas, componentes de las membranas y paredes celulares...). Si asumimos este hecho, sería posible la circunstancia de que evolutivamente, a causa de una duplicación génica, el dominio metiltransferasa de la policétido sintasa se haya modificado, dando lugar a una nueva proteína con capacidad de metilar compuestos fenólicos.

En cualquier caso, el principal problema con que nos encontramos al tratar de clasificar la CPOMT es la enorme cantidad y variedad de proteínas anotadas como metiltransferasas fúngicas y la poca información disponible sobre ellas pero, sobre todo, el hecho de que también es probable que la función metiltransferasa de clorofenoles sea una función secundaria (como se discutirá en un apartado posterior) y que hace que establecer relaciones de homología sea prácticamente imposible. En este aspecto, las perspectivas futuras a medio plazo son prometedoras, ya que el volumen de datos de genomas y proteomas de hongos filamentosos está creciendo enormemente, lo que unido a la anotación de los mismos posibilitarán la identificación y ordenación de proteínas con una mayor eficiencia y precisión.

IV-2.2 Inducción del gen *cpomt*.

Tal como se fue descrito previamente por Coque *et al.*, (2003) la enzima CPOMT es inducible por la adición de clorofenoles (con al menos dos átomos de cloro), siendo esta inducción mayor con la adición de 2,4,6-TCP. Estos experimentos fueron realizados a nivel de actividad enzimática dado que el gen todavía no había sido clonado y no podían realizarse otro tipo ensayos. Sin embargo, como resultado de este trabajo se consiguió la clonación del gen *cpomt*, por lo que nos propusimos como siguiente objetivo tratar de demostrar la inducción con 2,4,6-TCP a nivel de transcripción. Para ello, se realizaron experimentos de RT-PCR semicuantitativa (ver apartado III-3.8 de Resultados) que demostraron que **la transcripción del gen se ve incrementada hasta tres veces su nivel normal tras los 60 minutos de una inducción** con 10 µg/ml de 2,4,6-TCP.

A estos datos experimentales hay que añadir el hecho de que en la secuencia del promotor del gen *cpomt* han sido encontrados (ver apartado III-3.4 de Resultados) varios sitios de regulación que pueden estar estrechamente relacionados con esta inducción. En primer lugar se encuentran **dos sitios Xbp1** (*X*hoI site *b*inding protein *1*). Su posición en la secuencia promotora y el alto coeficiente de similitud nos sugiere que el hipotético gen *cpomt* puede estar regulado tanto positiva como negativamente como respuesta ante una situación de estrés (Mai y Breeden, 1997), lo que es lógico debido a que **los clorofenoles actúan desregulando la fosforilación oxidativa** al intercalarse en las membranas

mitocondriales y romper los gradientes de protones (Terada, 1990), conllevando todo ello un considerable **estrés** oxidativo para la célula.

Por otra parte también se encontraron dos probables **sitios de unión relacionados con drogas (PDRE)**. LeCrom *et al.*, (2002) describen la presencia de estas regiones regulando genes involucrados en la degradación de compuestos aromáticos provenientes de la lignocelulosa. Obviamente, los clorofenoles son compuestos aromáticos por lo que es perfectamente plausible que se encuentre este tipo de señales en la región promotora del gen *cpomt*.

Finalmente, es destacable la presencia de **elementos de regulación por metales (MRE)**. En la secuencia encontramos un elemento de regulación por cobre, siendo relevantes los estudios que demuestran que las enzimas relacionadas con la degradación de ligninas y compuestos fenólicos (como lignino-peroxidasas, manganeso-peroxidasas y lacasas) están reguladas por elementos de respuesta a metales (Bollag *et al.*, 1984; Gold *et al.*, 1993; Alic *et al.*, 1997; Palmieri *et al.*, 2000). Estos datos están apoyados por el trabajo realizado por Coque *et al.*, (1993) en el que se demuestra la regulación de la actividad *O*-metiltransferasa (en extractos proteicos de *T. longibrachiatum*) por iones metálicos probando que Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} y Ag^+ inhibían completamente esta actividad, mientras que Ca^{2+} , Cs^+ , Fe^{2+} y NH_4^+ tenían un efecto inhibitorio más moderado.

IV-2.3 Significado biológico de la actividad CPOMT.

La biometilación de clorofenoles es un hecho estudiado y confirmado en numerosos trabajos (Cserjesi y Johnson, 1972; Curtis *et al.*, 1972, 1974; Gee y Peel 1974) siendo tradicionalmente los hongos filamentosos los principales responsables de su producción (Sponholz y Muno, 1994; Jeffers *et al.*, 1997; Silva Pereira *et al.*, 2000). Los clorofenoles son algunos de los compuestos xenobióticos más extendidos que podemos encontrar en la naturaleza ya que han sido utilizados como pesticidas y fungicidas durante largo tiempo por su gran toxicidad, debido a la naturaleza liposoluble de estas moléculas, que les permite atravesar la pared celular y la membrana citoplasmática alcanzando el interior celular. Además, estos compuestos pueden permanecer décadas como contaminantes de los medios naturales debido a que su estructura los convierte en moléculas muy estables y difícilmente degradables.

Como se expone en la Introducción de esta memoria la teoría de la biometilación del 2,4,6-TCP (Silva Pereira *et al.*, 2000b) parece ser la más plausible y aceptada por la comunidad científica. Cuando los microorganismos detectan la presencia de clorofenoles en el ambiente proceden a su desactivación (proceso denominado detoxificación o descontaminación) ya que de lo contrario, pueden sufrir daños severos que afecten a su fisiología.

En este trabajo hemos centrado el problema en la aparición de 2,4,6-tricloroanisol a partir de la metilación directa por parte de los microorganismos existentes en el corcho. En este ámbito, la teoría de la biometilación de Silva Pereira se vio apoyada por los datos experimentales que aportaron Álvarez-Rodríguez *et al.*, (2003) demostrando que de 14 especies de hongos filamentosos aisladas de planchas de corcho, 11 eran capaces de metilar 2,4,6-TCP en mayor o menor medida dando lugar a 2,4,6-TCA.

A pesar de todas estas evidencias, el significado biológico de las reacciones de O-metilación de halofenoles es poco conocido y son pocos los datos sobre metiltransferasas identificadas y caracterizadas implicadas en la formación de anisoles. De hecho, únicamente se ha purificado una metiltransferasa específica para fenoles 2,4-disustituidos de *P. chrysosporium* (Coulter *et al.*, 1993). Coque *et al.*, (2003) tras una primera aproximación a la purificación de la CPOMT observaron que la actividad de la proteína purificada era bastante baja cuando se comparaba con la actividad específica de esta fenol metiltransferasa descrita anteriormente. Este hecho podría explicarse si los clorofenoles no fueran los verdaderos sustratos fisiológicos de la enzima. De hecho, los clorofenoles no son compuestos naturales, aparecieron en la naturaleza de la mano del hombre hace únicamente unas décadas, por lo que es difícil imaginar que los hongos filamentosos hayan desarrollado *de novo* una actividad enzimática específicamente diseñada para su detoxificación. Desde este punto de vista, se podría especular que **la actividad clorofenol O-metiltransferasa es en realidad una actividad secundaria o no específica** de una metiltransferasa relacionada con la biometilación de otros sustratos fisiológicos que todavía no se han identificado.

IV-3 Expresión heteróloga de lacasas en *T. longibrachiatum*.

Tal como se explicó en el apartado III-7, las lacasas son enzimas producidos en gran cantidad y excretados al exterior de la célula, fundamentalmente, por los hongos que causan la podredumbre blanca de la madera en su ruta de degradación de la lignina. Además, son capaces de atacar clorofenoles, ya que pueden oxidar gran variedad de compuestos fenólicos y aminas aromáticas usando el oxígeno como aceptor de electrones (Yaropolov *et al.*, 1994). La hipótesis de trabajo era corroborar si la producción de niveles apreciables de una actividad lacasa podía contribuir a eliminar eficazmente los clorofenoles presentes en el medio de cultivo, evitándose así la formación de cloroanisoles. Tal como se ha detallado en la Introducción de esta memoria, el principal clorofenol causante del *cork taint* es el 2,4,6-TCP. Se ha demostrado en numerosos estudios que este compuesto en concreto, también puede ser oxidado por multitud de lacasas producidas por basidiomicetos tales como *Coriolus versicolor*, *Panus tigrinus*, *Trametes* sp. y *Cerrena unicolor* (Leontievsky *et al.*, 2000, 2004; Lisov *et al.*, 2006).

Con el objetivo de disminuir la concentración de 2,4,6-TCP en el corcho, en este trabajo se ha abordado la expresión heteróloga de lacasas de los basidiomicetos *Polyporus hydroides* y *Pleurotus eryngii* en *T. longibrachiatum*. Como resultado de dichos experimentos se consiguió la expresión de la lacasa PEL3 de *P. eringii*, aunque con niveles bastante bajos, siendo imposible la expresión del gen LAC1 de *P. hydroides*.

De este modo se pudo apreciar claramente **un descenso en la concentración de 2,4,6-TCP en cultivos realizados en granulado de corcho inoculados con la cepa transformante de *T. longibrachiatum*** lo que demuestra **que esta estrategia es válida a la hora de diseñar una solución biotecnológica** al problema de la contaminación por clorofenoles.

IV-4 Perspectivas futuras.

El trabajo que hemos descrito se enmarca dentro de una línea de investigación (iniciada en 1999) que tiene como objeto la búsqueda de posibles soluciones biotecnológicas al problema de la contaminación del corcho por cloroanisoles, especialmente el 2,4,6-TCA que da lugar a la aparición del *cork taint*.

En trabajos anteriores, se ha postulado que el verdadero problema del *cork taint* no es la presencia de microorganismos en el corcho, sino la absorción de pesticidas clorofenólicos por la corteza del alcornoque con la que posteriormente se fabricarán los tapones. Dichos clorofenoles son detoxificados principalmente por hongos filamentosos para producir cloroanisoles no tóxicos. Controlar el contacto de los clorofenoles con el árbol es casi imposible, habida cuenta de que éstos productos son contaminantes ubicuos, por lo que, a nuestro juicio, la estrategia debería centrarse en el paso posterior, es decir, en la bioconversión de 2,4,6-TCP en 2,4,6-TCA.

En este trabajo se ha tratado de abordar una solución biotecnológica al problema del *cork taint* desarrollando una estrategia de control de la aparición de cloroanisoles en el corcho que debía basarse en dos principios:

I.- Impedir la formación de 2,4,6-TCA.

Ésta ha sido una primera aproximación al problema desde un punto de vista de ciencia básica, es decir, tratando de demostrar las bases científicas de las posibles soluciones reales que se podrían aplicar en un futuro: se ha confirmado que **la clave de la producción de cloroanisoles está en el gen *cpomt*** y se han desarrollado diversas herramientas moleculares (sistemas de transformación, marcadores de selección, genoteca, demostración de funcionamiento de atenuación génica...) etc. Todos estos avances facilitarían las siguientes líneas futuras de trabajo que proponemos a continuación:

I-A. Utilización de *Trichoderma longibrachiatum* CECT 21431 como cepa de control biológico, aprovechando las propiedades que hacen de este género un microorganismo modélico para este tipo de usos (Hjelljord y Tronsmo, 1998). Para la

utilización de esta cepa como agente de biocontrol (inoculándola en la corteza del alcornoque o en las planchas de corcho en su etapa de reposo) sería necesario realizar una construcción de atenuación o interrupción del gen *cpomt* basándose en **marcadores de selección no antibióticos**. La selección por auxotrofia es un método ampliamente utilizado para hongos filamentosos (Díez *et al.*, 1987; Weidner *et al.*, 1998) que eliminaría el problema de trabajar con resistencias a antibióticos en el ámbito de la producción de alimentos. Durante este trabajo se ha adelantado este objetivo, aislando un fago recombinante que incluye la secuencia del gen *pyrG* de *T. longibrachiatum* (datos no mostrados), por lo que el paso inmediato sería la obtención del mutante auxótrofo.

I-B. Secuenciación de las zonas adyacentes al gen *cpomt*. La secuenciación de un amplio fragmento de zonas adyacentes al gen puede realizarse rápida y sencillamente mediante un nuevo rastreo de la genoteca genómica realizada para este trabajo. Esta información sería de gran utilidad para confirmar si el gen se encuentra o no en una agrupación génica específica para el metabolismo de derivados de la lignina. Asimismo sería interesante el clonado del gen policétido sintasa adyacente a *cpomt* y su expresión en *E. coli* o *S. cerevisiae* que arrojaría luz sobre su verdadera función.

II.- Eliminar o, al menos reducir, el 2,4,6-TCP presente en el corcho.

Por otra parte, se ha demostrado que **la expresión heteróloga de lacasas en *T. longibrachiatum* puede ser una estrategia eficaz** a la hora de abordar la eliminación del 2,4,6-TCP contaminante de en la corteza del alcornoque. En este apartado, las líneas de trabajo propuesta serían las siguientes:

II-A. Rastreo de nuevos transformantes pPEL3G. Habiendo confirmado que la construcción es operativa en *T. longibrachiatum*, el rastreo de un transformante en el que la expresión sea mayor parece, a priori, la opción más rápida y aconsejable para obtener una cepa que degrade 2,4,6-TCP. En este caso no sería necesario realizar una nueva construcción como en el supuesto I-A, ya que puede ser co-transformada con otra construcción que porte un marcador no antibiótico. Alternativamente se podría abordar la optimización de la construcción de expresión o el intento de expresión de otros genes codificantes de lacasas que rindieran mejores resultados.

II-B. Co-cultivo de mutantes atenuados MTaten de *T. longibrachiatum* con grandes productores de lacasas como *Pleurotus ostreatus*. Recientemente se ha descrito que cultivos de *P. ostreatus* infectados con esporas de *Trichoderma viride* conducen a una mayor producción volumétrica de lacasas, así como a una mayor estabilidad de la actividad (Flores *et al.*, 2009). Mediante esta técnica se conseguiría evitar la producción de 2,4,6-TCA (al usar la cepa con el gen *cpomt* atenuado) y aumentar la producción de lacasas secretadas por *P. ostreatus*, lo que revertiría en un descenso de la concentración de 2,4,6-TCP.

III.- La obtención de un doble mutante *T. longibrachiatum cpomt⁻ / lac⁺*.

Finalmente, la conjunción de ambas estrategias con ña obtención de un doble mutante *T. longibrachiatum cpomt⁻ / lac⁺* (superproductor de lacasas e incapaz de producir el enzima CPOMT) debería ser una herramienta prometedora para controlar la producción de 2,4,6-TCA en el corcho.

Conclusiones

1.- Se ha optimizado el método de purificación del enzima CPOMT de *T. longibrachiatum* lo que nos permitió obtener cantidades de proteína suficientes determinar la secuencia de aminoácidos de varios péptidos internos mediante análisis por huella peptídica y doble espectrometría de masas.

2.- El enzima CPOMT es una proteína de 468 aminoácidos, con una masa molecular deducida de 52,4 KDa. Está codificada por una ORF denominada gen *cpomt*, de copia única en el genoma de *T. longibrachiatum* y de 1637 pb, interrumpida por la presencia de 4 intrones.

3.- La proteína CPOMT de *T. longibrachiatum* muestra alta homología con numerosas metiltransferasas del tipo II de hongos. Además, se han encontrado 3 dominios conservados de metiltransferasas SAM dependientes (Motivos A, B y C) en su secuencia. Estos datos nos permiten concluir que el enzima CPOMT es una *O*-metiltransferasa.

4.- La transcripción del gen *cpomt* es inducida por 2,4,6-TCP cuando este compuesto está presente en medio de cultivo.

5.- La atenuación del gen *cpomt* mediante la utilización de la técnica de ARN de interferencia resultó en un descenso del 32,32% en la transcripción del gen en el mutante analizado con respecto a la cepa silvestre.

6.- La atenuación del gen *cpomt* produjo una disminución de aproximadamente el 37% en la cantidad de 2,4,6-TCA producido por el mutante en comparación con la cepa silvestre, así como un descenso (aproximadamente del 48,86%) en los niveles de actividad CPOMT.

7.- La expresión heteróloga del gen *peB* de *P. eringii* en *T. longibrachiatum*, aunque conseguida de manera poco eficiente, produjo una disminución en los niveles de 2,4,6-TCP y 2,4,6-TCA presentes en granulado de corcho, lo que implica que esta estrategia es válida para reducir los niveles de 2,4,6-TCA en corcho.

Bibliografía

A

- Aebersold R y Mann M.** (2003) "Mass spectrometry-based proteomics". *Nature* **422**: 198–207.
- Aleixandre L y García M.** (1993) "El tapón de corcho". *Vitivinicultura*. **5(6)**: 52–65.
- Alexander M.** (1999) "Biodegradation and bioremediation". *Academic Press*. 452 pp.
- Alic, M, Akileswaran L y Gold MH.** (1997) "Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isozyme 3 from *Phanerochaete chrysosporium*". *Biochim Biophys Acta*. **1338(1)**: 1–7.
- Álvarez-Rodríguez ML, López-Ocaña L, López-Coronado JM, Rodríguez E, Martínez MJ, Larriba G y Coque JJR.** (2002a) "Cork taint of wines: role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by O methylation of 2,4,6-trichlorophenol". *Appl Environ Microbiol*. **68**: 5860–5869.
- Álvarez-Rodríguez ML Larriba G y Coque JJR.** (2002b) "Microbiology of cork: isolation of microorganisms producing 2,4,6-trichloroanisole and suberolytic microorganisms" En: Proceedings of the I World Cork Congress on Cork and Cork Oak. Pág. 831–837. Ed. APCOR, Santa Mª de Lamas, Portugal.
- Álvarez-Rodríguez ML.** (2003) "Análisis de la producción de 2,4,6-tricloroanisol por hongos filamentosos aislados del corcho". Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura.
- Amon JM, Vandeepeer JM y Simpson RF.** (1989) "Compounds responsible for cork taint". *Aust. Ans. New Zeal Wine Ind J*. **4**: 62 – 69.
- Anke H y Weber RWS.** (2006) "White-rots, chlorine and the environment – a tale of many twists". *Mycologist* **20**: 83–89.
- Austin B, Hall RM y Tyler BM.** (1990) "Optimized vectors and selection for transformants of *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* to bleomycin and phleomycin resistance". *Gene*. **93**: 157–162.
- Azcón-Bieto J y Talón M.** (1993) "Fisiología y bioquímica vegetal" Ed *Interamericana McGraw-Hill*. 536 pp.

B

- Barakat AO, Moonkoo K, Yoarong Q, y Wade TL.** (2002) "Organochlorine pesticides and PCB residues in sediments of Alexandria Harbour, Egypt". *Mar Pollut Bull* **44**: 1426–1434.
- Bej AK y Perlin MH.** (1989) "Preparation of protoplasts of *Ustilago violacea* for transformation and pulse-field electrophoresis". *Biotechniques*. **8**: 824, 826, 828.
- Belloch C, Villa-Carvajal M, Álvarez-Rodríguez ML y Coque JJ.** (2007) "*Rhodotorula subericola* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast species isolated from bark of *Quercus suber* (cork oak)". *Int J Syst Evol Microbiol*. **57(7)**:1668–71.
- Bemelmans JM, ten Noever y de Brauw MC.** (1974) "Chloroanisoles as off-flavor components in eggs and broilers". *J Agric Food Chem*. **22(6)**:1137–1138.
- Bernards MA, Lopez ML, Zajicek J y Lewis, NG.** (1995) "Hydroxycinnamic acid-derived polymers constitute the polyaromatic domain of suberin". *J Biol Chem*. **270**: 7382–7386.
- Beuchat LR.** (1983) "Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds". *J Food Prot* **46**: 135–141.

- Bhasker Reddy GV, Sollewijn MD y Gold, MH.** (1998) "Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of reductive dechlorination". *Appl Environ Microbiol.* **180**: 5159-5164.
- Bhasker Reddy GV y Gold MH.** (2000). "Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved". *Microbiology* **146**: 405-413.
- Blundell TL, Sibanda BL, Sternberg MJ y Thornton JM.** (1987) "Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules". *Nature.* **326(6111)**: 347-52.
- Bollag JM y Leonowicz A.** (1984) "Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases". *Appl Environ Microbiol.* **48**: 849-854.
- Bollag JM, Shuttleworth KL y Anderson, DH.** (1988) "Laccase-Mediated detoxification of phenolic compounds". *Appl Environ Microbiol.* **54**: 3086-3091.
- 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 - 252.
- Brendel V, Bucher P, Nourbakhsh IR, Blaisdell BE, Karlin S.** (1992) "Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences". *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2002-2006.
- Brown JS, Aufauvre-Brown A y Holden DW.** (1998) "Insertional mutagenesis of *Aspergillus fumigatus*". *Mol Gen Genet.* **259(3)**: 327-35.
- Bureau G, Charpentier-Massonnat M y Pansu, M.** (1974) "Etude des goûts anormaux par le bouchon sur le vin de Champagne". *Rev Fr Oenol.* **56**: 22-24.
- Butzke CE, Evans TJ y Ebeler SE.** (1999) "Detection of cork taint in wine using automated solid-phase microextraction in combination with GC/MS-SIM". *Chemistry of wine flavor.* Waterhouse, AL and Ebeler, SE. Editores. ACS Symposium Series. American Chemical Society. Washington D.C.
- C**
- Cabral e Gil LMC.** (1988) "Cortiça. tecnologia de procesamiento e constituçao química". LNTI. Portugal.
- Calvo MA, Larrondo J y Agut M** (1993) "Microbiología de los tapones de corcho" *Aecork News.* **12**: 18-19.
- Calvo MA, Agut M, Larrondo J, Esteban C y Codina J.** (1995) "Identification of fungal hyphae and conidia in sampled of altered corks" *Microbios.* **81**: 41-44.
- Campoy S, Álvarez-Rodríguez ML, Recio E, Rumero A y Coque JJ.** (2009) "Biodegradation of 2,4,6-TCA by the white-rot fungus *Phlebia radiata* is initiated by a phase I (O-demethylation)-phase II (O-conjugation) reactions system: implications for the chlorine cycle". *Env Microbiol.* **11(1)**: 99-110.
- Cantoral JM, Díez B, Barredo JL, Alvarez E y Martín JF.** (1987) "High frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*". *BioTechnology.* **5**: 494-497.
- Cardoza RE, Moralejo FJ, Gutiérrez S, Casqueiro J, Fierro F y Martín JF.** (1998) "Characterization and nitrogen-source regulation at the transcriptional level of the *gdhA* gene of *Aspergillus awamori* encoding an NADP-dependent glutamate dehydrogenase". *Curr Genet* **34**: 50-59.
- Cardoza RE, Vizcaino JA, Hermosa MR, Sousa S, González FJ, Lloibell A, Monte E y Gutiérrez S.** (2006) "Cloning and characterization of the *erg1* gene of *Trichoderma harzianum*: effect of the

- erg1* silencing on ergosterol biosynthesis and resistance to terbinafine". *Fung Genet Biol* **43**: 164–178.
- Casqueiro J, Gutiérrez S, Bañuelos O, Hijarrubia MJ y Martín JF.** (1999) "Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction". *J Bacteriol.* **181(4)**: 1181–1188.
- Caritat A, Gutierrez E, Molinas M.** (2000) "Influence of weather on cork-ring width". *Tree Physiol.* **20**: 893–900
- Chalmers MJ y Gaskell SJ.** (2000) "Advances in mass spectrometry for proteome analysis". *Curr. Opin. Biotech.* **11**: 384–390.
- Chatonnet P, Bonnet S, Boutou S y Labadie MD.** (2004) "Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine". *J Agric Food Chem.* **52**: 1255–1262.
- Chaudhry GO y Chapalamadugu S.** (1991) "Biodegradation of halogenated organic compounds". *Microbiol Rev.* **55**: 59–79.
- Chet I y Baker R.** (1981) "Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*". *Phytopatology* **71**: 286–290.
- Chandrashekar JP y Chiang VL.** (1998) "Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine dependent methyltransferases". *Plant Mol Biol.* **37**: 663–674.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH.** (1989) "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution". *Proc Natl Acad Sci USA.* **86(7)**: 2172–5.
- Coll PM, Fernández-Ábalos JM, Villanueva JR, Santamaría R y Pérez P.** (1993) "Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971)". *Appl Environ Microbiol.* **59(8)**: 2607–2613.
- Coll PM, Tabernero C, Santamaría R y Pérez, P.** (1993) "Characterization and structural analysis of the laccase I gene from the newly isolated ligninolytic basidiomycete PM1 (CECT 2971)". *Appl Environ Microbiol.* **59(12)**:4129–4135.
- Conde E, Cadahia E, García-Vallejo MC, Fernández de Simón B y González-Adrados JR.** (1997) "Low molecular weight polyphenols in cork of *Quercus suber*". *J Agric Food Chem.* **45**: 2695–2700.
- Coque JJ, Álvarez-Rodríguez ML y Larriba G.** (2003) "Characterization of an inducible chlorophenol O-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* involved in the formation of chloroanisoles and determination of its role in cork taint of wines." *Appl Environ Microbiol.* **69**: 5089–5095.
- Coque JJ, Recio E, Goswami M, Feltre R, Campoy S, Álvarez-Rodríguez ML, Martín JF.** (2006) "Wine contamination by haloanisoles: Towards the development of biotechnological strategies to remove chloroanisoles from cork stoppers". Ed: INBIOTEC.
- Coulter C, Kennedy JT, McRoberts WC y Ebeler SE.** (1993) "Purification and properties of an S-adenosylmethionine:2,4-disubstituted phenol O-methyltransferase from *Phanerochaete chrysosporium*". *Appl Environ Microbiol.* **59**: 706–711.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM y Brenner SE.** (2004) "WebLogo: a sequence logo generator". *Genome Res.* **14(6)**: 1188–90.
- Cserjesi AJ y Johnson, EL.** (1972) "Methylation of pentachlorophenol by *Trichoderma virgatum*". *Can J Microbiol.* **18**: 45–49.

- Curtis RF, Land DG, Griffiths MN, Gee MG, Robinson D, Peel JL, Dennis C y Gee. JM. (1972) "2,3,4,6-tetrachloroanisole: association with musty taint in chickens and microbiological formation". *Nature*. **235**: 223-224.
- Curtis RF, Dennis C, Gee JM, Gee MG, Griffiths MN, Land DG, Peel JL y Robinson, D. (1974) "Chloroanisoles as a cause of musty taint in chickens and their microbiological formation from chlorophenols in broiler house litter". *J Sci Food Agr*. **25**: 811-828.
- Czaplicka M. (2004) "Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment" *Sci Total Environ*. **322**: 21-39
- Czaplicka M. (2006) "Photo-degradation of chlorophenols in the aqueous solution" *J Hazard Materials*. **134**: 45-59.

D

- Danesh P, Velez-Caldas FM, Figueiredo-Marques JJ y San Romao MV. (1997) "Mycobiota in Portuguese 'normal' and 'green' cork throughout the manufacturing process of stoppers". *J Applied Microbiol*. **82**: 689 - 694.
- D'Angelo EMD y Reddy KR. (2000) "Aerobic and anaerobic transformations of pentachlorophenol in wetland soils". *Soil Sci Soc Am J* **64**: 933-943.
- Davis CR, Fleet GH y Lee TH. (1981) "The microflora of wine corks". *Grapegrower Winemaker* **208**: 42-44.
- Davis MA y Hynes MJ. (1991) "Regulatory circuits in *Aspergillus nidulans*". En: Bennett JW y Lasure LL, Editores, "More Gene Manipulations in Fungi". Academic Press, San Diego, CA, pp. 151-189.
- Delgado-Jarana J, Sousa S, González F, Rey M y Llobell A. (2006) "ThHog controls the hyperosmotic stress response in *Trichoderma harzianum*". *Microbiology*. **152**: 1687-1700.
- de Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJ y Beijersbergen AG (1998) "*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi". *Nat Biotechnol* **16(9)**: 839-842.
- Dennie D, Gladu I, Lépine F, Villemur R, Bisailon JG y Beaudet R. (1998) "Spectrum of the reductive dehalogenation activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1" *Appl Environ Microbiol*. **64**: 4603-4606.
- Díez B, Alvarez E, Cantoral JM, Barredo JL y Martín JF. (1987) "Selection and characterization of *pyrG* mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5-phosphatedecarboxylase and complementation by the *pyr4* gene of *Neurospora crassa*. *Curr Genet*. **12**: 277-282.
- Dreger M. (2003) "Proteome analysis at the level of subcellular structures", *Eur. J. Biochem*. **270**: 589-599.
- Drotar, AM y Fall, R. (1985) "Methylation of xenobiotic thiols by *Euglena gracilis*: characterization of a cytoplasmic thiol methyltransferases" *Plant Cell Physiol*. **26**: 847 - 850.
- Drotar AM y Fall R. (1986) "Characterization of a xenobiotic methyltransferase and its role in detoxification in *Tetrahymena thermophila*". *Pest Biochem Physiol*. **25**: 396-406.

E

- Elad Y. (2003) "Biocontrol of foliar pathogens: mechanisms and application". *Agric Appl Biol Sci.* **68**: 17-24.
- Engel C, de Groot AP y Weurman C. (1966) "Tetrachloroanisole: a source of musty taste in eggs and broilers". *Science* **154**: 20-271.

F

- Fariselli P, Riccobelli P y Casadio R. (1999) "Role of evolutionary information in predicting the disulfide-bonding state of cysteine in proteins". *Proteins.* **36(3)**: 340-346.
- Feinberg AP y Vogelstein B. (1983) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". *Anal Biochem.* **132(1)**: 6-13.
- Fenical, W. (1982) "Investigation of benthic algae as resource for new pharmaceutical and agricultural chemicals". En *Proceedings Joint United States - China phycolgical simposium*, Quindao.
- Fincham J.R.S. (1989) "Transformation in fungi". *Microbiol Rev.* **53**: 147-170.
- Finn RD, Tate J, Mistry J, Coggill PC, Sammut JS, Hotz HS, Ceric G, Forslund K, Eddy SR, Sonnhammer EL y Bateman A. (2008) "The Pfam protein families database". *Nucleic Acids Research. Database* **36**: D281-D288
- Flores C, Casasanero R, Trejo-Hernández MR, Galindo E y Serrano-Carreón L. (2009) "Production of laccases by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation in co-culture with *Trichoderma viride*". *J Appl Microbiol.* Jul 13, Epub pendiente de publicación.
- Fujii I, Yoshida N, Shimomaki S, Oikawa H y Ebizuka Y. (2005) "An iterative type I polyketide synthase catalyzes synthesis of the decaketide alternapyrone with regio-specific octa-methylation". *Chemistry and Biology.* **12**: 1301-1309.

G

- García-Vallejo MC, Conde E, Cadahía E y Fernández de Simón, B. (1997) "Suberin composition of reproduction cork from *Quercus suber*". *Holzforchung* **51**: 219-224.
- Gee JM y Peel, JL. (1974) "Metabolism of 2,3,4,6-tetrachlorophenol by microorganisms from broiler house litter". *J Gen Microbiol.* **85**: 237-243.
- Gold MH y Alic M. (1993) "Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*". *Microbiol Mol Biol Rev.* **57 (3)**: 605-622.
- Goldoni M, Azzalin G, Macino G y Cogoni C. (2004) "Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*". *Fungal Genet Biol* **41(11)**: 1016-1024.
- Goosen T, Bloemheuvel G, Gysler C, Debie DA, van den Broek HWJ y Swart K. (1987) "Transformation of *Aspergillus niger* using the homologous orotide-5'-phosphate-decarboxylase gene". *Curr Genet.* **11**: 499-503.
- Gouka RJ, Punt PJ y van den Hondel CA. (1997) "Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects". *Appl Microbiol Biotechnol.* **47(1)**: 1-11.

- Goswami M, Recio E, Campoy S, Martín JF y Coque JJ. (2007) "Environmental significance of O-demethylation of chloroanisoles by soil bacterial isolates as a mechanism that improves the overall biodegradation of chlorophenols" *Env Microbiol.* **9(10)**: 2512.
- Groll AH y Walsh TJ. (2001) "Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats". *Clin Microbiol Infect.* **7**: 8-24.
- Gruart J. (1989) "Del corcho al tapón" *Viticultura y Enología Profesional* **3**: 72-73.
- Gutierrez S, Diez B, Montenegro E and Martín JF. (1991) "Characterization of the *Cephalosporium acremonium* pcbAB gene encoding alpha-aminoadipyl-cysteiny-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: Linkage to the pcbC gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains". *J Bacteriol.* **173**: 2354-2365

H

- Hanahan D. (1983) "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids". *J Mol Biol.* **166**: 557-580.
- Hjeljord L y Tronsmo A. (1998) "Trichoderma and Gliocladium in biological control: an overview" Págs. 131-151. Eds: Harman GE y Kubicek CK. Taylor y Francis, Ltd London.
- Hodin F, Borén H y Grimvall A. (1991) "Formation of chlorophenols and related compounds in natural and technical chlorination processes". *Water Sci Technol.* **24**: 403-410.
- Holmes DS y Quigley M. (1981) "A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids". *Anal. Biochem.* **114**: 193 - 197.
- Hoppe HA y Levring T. (1982) "Marine algae in pharmaceutical sciences". Walter de Gruyter; Berlin. 302 pp.
- Hynes MJ, Corrick CM y King JA. (1983) "Isolation of genomic clones containing the amdS gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations". *Mol Cell Biol.* **3(8)**: 1430-1439.

I

- Ibrahim RK, Bruneau A y Bantignies B. (1998) "Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification". *Plant Mol Biol.* **36**: 1-10.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. (1990) "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids". *Gene.* **96(1)**: 23-28.

J

- Janus D, Hoff B, Hofmann E y Kück U. (2007) "An efficient fungal RNA-silencing system using the DsRed reporter gene". *Appl Environ Microbiol.* **73(3)**: 962-970.
- Jeffers MR, McRoberts WC y Harper DB. (1997) "Identification of a phenolic 3-O-methyltransferase in the lignin-degrading fungus *Phanaerochaete chrysosporium*". *Microbiology* **143**: 1975 - 1981.
- Jiang X, Martens D, Schramm KW, Kettrup A, Xu SF y Wang LS. (2000) "Polychlorinated organic compounds (PCOC's) in waters, suspended solids and sediments of the Yangtse River". *Chemosphere* **41**: 901-905.

Joshi DK y Gold MH. (1993) "Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*". *Appl Environ Microbiol* **59**: 1779-1785.

K

Kadoya T. (1988) "HPLC of proteins on an Hydroxyapatite Column". *J Liquid Chromatography*. **14**: 2951-2967.

Kagan RM y Clarke S. (1994) "Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes". *Arch Biochem Biophys*. **310(2)**: 417-427.

Kadotani N, Nakayashiki H, Tosa Y y Mayama S. (2003) "RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*". *Mol Plant Microbe Interact*. **16(9)**:769-776.

Kent M y James A. (1983) "Riegel's handbook of industry chemistry" Van Nostrand Reinhold Company; págs. 747-787.

Kersten PJ, Tien M, Kalyanaraman B y Kirk TK. (1985) "The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes". *J Biol Chem* **260**: 2609-2612.

Kinter M y Sherman NE. (2005) "Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry". *Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry*. Editores: Dominic M. Desiderio, Nico M. M. Nibbering

Knowles J, Teeri T, Lehtovaara P, Penttilä M y Saloheimo M. (1987) En: **Aubert JP, Beguin P y Millet J.** (eds.) Biochemistry and genetics of cellulose degradation. *Academic Press*, New York, 153-169.

Kolattukudy PE. (1981) "Structure, biosíntesis and biodegradation of cutin and suberin". *Ann Rev Plant Physiol*. **32**: 539-567.

Kringstad KP y Lindström K. (1984) "Spent liquors from pulp bleaching" *Environ Sci Technol*. **18**: 236-248.

Kubicek CP, Eveleigh DE, Esterbauer H, Steiner W y Kubicek-Pranz EM. (1990) "*Trichoderma reesei* cellulases-Biochemistry, genetics, physiology and applications of cellulose degradation". *Roy Soc Chem Lond*.

Kuhls K, Lieckfeldt E, Borner T y Gueho E. (1999) "Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*". *Med Mycol*. **37**: 25-33.

Kwok S, Chang SY, JJ Sninsky y Wang A. (1994) "A guide to design and use of mismatched and degenerate primers". *Genome Res*. **3**: S39-S47.

L

Laemmli UK. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4". *Nature*. **227**: 680 - 685.

Le Crom S, Devaux F, Marc P, Zhang X, Moye-Rowley WS y Claude Jacq. (2002) "New Insights into the Pleiotropic Drug Resistance Network from Genome-Wide Characterization of the YRR1 Transcription Factor Regulation System". *Mol Cell Biol*. **22(8)**: 2642-2649.

- Lee SL y Taylor, JW.** (1990) "Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores". En: **Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ y White TJ** Eds., *PCR protocols. A guide to methods and applications*. 282 – 286. *Academic Press*, San Diego.
- Lee TH y Simpson RF.** (1993) "Microbiology and chemistry of cork taints in wine". *Wine Microbiology and Biotechnology* Ed. *GH Fleet* (Harwood Academic Publishers: Chur. Switzerland): 353 – 372.
- Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, Salvaterra P, Rossi J.** (2002) "Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells". *Nat Biotechnol.* **20(5)**: 500-505.
- Lefebvre A, Riboulet M, Boidron N y Ribereau-Gayon P.** (1983) "Incidence des microorganismes du liege sur les alterations olfactives du vin". *Science des Aliments.* **3**: 265-278.
- Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtas-Wasilewska M, Cho NS y Hofrichter, M.** (1999) "Biodegradation of lignin by white-rot fungi". *Fungal Genet Biol.* **27**: 175-185.
- Leontievsky AA, Myasoedova NM, Baskunov BP, Evans CS y Golovleva LA.** (2000) "Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white root fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*". *Biodegradation.* **11(5)**: 331-340.
- Leontievsky AA, Myasoedova NM, Baskunov BP, Golovleva LA, Bucke C y Evans CS.** (2001) "Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase" *Appl Microbiol Biotechnol.* **57(1-2)**: 85-91.
- Lisov AV, Pozhidaeva ZA, Stepanova EV, Koroleva OV y Leontievsky AA.** (2006) "Conversion of polychlorophenols by laccases with 1-hydroxybenzotriazole as a mediator". *Appl Biochem Microbiol.* **43(6)**: 616-619.
- Liu H, Cottrell TR, Pierini LM, Goldman WE y Doering TL.** (2002) "RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*". *Genetics.* **160**: 463-470.
- Lopes P, Saucier C, Teissedre PL y Glories Y.** (2006) "Impact of storage position on oxygen ingress through different closures into wine bottles". *J Agric Food Chem.* **54(18)**: 6741-6746.
- ## M
- Mai B y Breeden L.** (1997) "Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi4/Mbp1 family". *Mol Cell Biol.* **17(11)**: 6491-6501.
- Maarse H, Nijssen LM y Angelinas S.** (1989) "Halogenated phenols and chloroanisoles: occurrence, formation and prevention". *Actas del 2º Wartburg Aroma Symposium.*
- Mach RL, Schindler M, y Kubicek CP.** (1994) "Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous signals" *Curr Genet.* **25**: 567-570.
- Maga JA.** (1978) "Simple phenol and phenolic compounds in food flavour". *Cri Rev Food Sci.* **10**: 323-372.
- Malik AN, McLean PM, Roberts A, Barnett PS, Demaine AG, Banga JP y McGregor AM.** (1990) "A simple high yield method for the preparation of lambda gt10 DNA suitable for subcloning, amplification and direct sequencing". *Nucleic Acids Res.* **18(13)**: 4031-4032.
- Mandels M.** (1985) "Application of cellulases". *Biochemical Society Transactions.* **13**: 414-416.

- Maniatis T, Fritsch EF y Sambrook J.** (1982) "Molecular cloning: a laboratory manual". *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. New York.
- Mäntylä AL, Hannele Rossi K, Vanhanen SA, Penttilä M, Suominen P y Helena Nevalainen KM.** (1992) "Electrophoretic karyotyping of wild-type and mutant *Trichoderma longibrachiatum (reesei)* strains" *Curr Genet* **21(6)**: 471-477.
- Mas A, Puig J, Lladó N y Zamora F.** (2002) "Evolución de vinos tranquilos, cava y champagne según diferentes tipos de tapado. Función del tapón de corcho". Ed. Institut Català del Suro y Universitat Rovira i Virgili.
- Maujean A, Millery P y Lemaesquier, H.** (1985) "Explications biochimies et metaboliques de la confusion entre gout de bouchon et gout de moisi" *Rev Franc Oenol.* **24**: 55-62.
- Mayer AM y Staples RC.** (2002) "Laccase: new functions for an old enzyme". *Phytochem* **60**:551-565.
- McLellan I, Carvalho M, Silva Pereira C, Hursthouse A, Morrison C, Tatner P, Martins I, San Romão MV y Leitão M.** (2007) "The environmental behaviour of polychlorinated phenols and its relevance to cork forest ecosystems: a review". *J Environ Monit.* **9(10)**: 1055-1063.
- Mezei, LM y Storts, DR** (1994) "Purification of PCR products" *PCR Technology: Current Innovations*, Griffin HG y Griffin AM Eds. *CRC Press*, Boca Raton, FL, 21.
- Miki A, Isogai A, Utsunomiya H e Iwata H.** (2005) "Identification of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) causing a musty/muddy off-flavor in sake and its production in rice koji and moromi mash". *J Biosci Bioeng.* **100(2)**: 178-83.
- Mohn WW y Kennedy KJ.** (1992) "Reductive dehalogenation of chlorophenols by Desulfomonile tiedjei DCB-1". *Appl Environ Microbiol* **58**: 1367-1370.
- Moire L, Schmutz A, Buchala A, Yan B, Stark RE y Ryser U.** (1999) "Glycerol Is a Suberin Monomer. New Experimental Evidence for an Old Hypothesis". *Plant Physiol.* **119(3)**: 1137-1146.
- Montenecourt ES.** (1983) "*Trichoderma reesei* cellulases". *Trends Biotechnol* **1**: 156-161.
- Mouyna I, Henry C, Doering TL y Latgé JP.** (2004) "Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*". *FEMS Microbiol Lett.* **237(2)**: 317-324.
- Mullis B y Faloona FA.** (1987) "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction". *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.
- Muñoz Crego A y López Cruz A.** (1992) "Drogas del mar. Sustancias biomédicas de algas marinas". *Universidad de Santiago de Compostela*; Santiago de Compostela. 188 pp.

N

- Nakayashiki H, Hanada S, Nguyen BQ, Kadotani N, Tosa Y y Mayama S.** (2005) "RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi". *Fungal Genet Biol.* **42(4)**:275-283.
- Neidemann SL y Geigert J.** (1986) "Biohalogenation: principles, basic roles and applications". *Ellis Harwood*, Chichester chapters.
- Neilson AH, Lindgren C, Hynning P y Remberger, M.** (1988) "Methylation of halogenated phenols and thiophenols by cell extracts of Gram-Positive and Gram-Negative bacteria" *Appl Environ Microbiol.* **54**: 524 - 530.

Nevalainen H, Suominen P y Taimisto, K. (1994) "On the safety of *Trichoderma reesei*". *J Biotechnol.* 37: 193-200.

Nystrom A, Grimvall A, Krantzulcker C, Savenhed R y Akerstrand K. (1992) "Drinking-water off-flavor caused by 2,4,6-trichloroanisole". *Water Sci Technol.* 25: 241-249.

O

Okey RW y Stensel HD. (1993) "Uncouplers and activated sludge - the impact on synthesis and respiration". *Toxicol Environ Chem.* 40: 235-254.

Ortega MC, MT Moreno, Ordovás J y Aguado MT. (1996) "Behaviour of different horticultural species in phytotoxicity bioassays of bark substrates". *Scientia Horticultrae.* 66: 125-132.

P

Palm H, Knuutinen J, Haimi J, Salminen J y Huhta V. (1991) "Methylation products of chlorophenols, catechols and hydroquinones in soil and earthworms of sawmill environments". *Chemosphere* 23: 263-267.

Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B y Sannia G. (2000) "Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Lignolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*" *Appl Environ Microbiol* 66(3): 920-924.

Papavizas GC. (1985) "*Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol". *Annu Rev Phytopatol.* 23: 23-54.

Patnaik P, Powers E y Khoury JN. (2002) "Pathways of phenol-chlorine reactions in the presence of bromide ions in waste waters" *American Laboratory News.* Application Note August. 26-28.

Patterson GM, Larsen L y Moore R. (1994) "Bioactive natural products from blue-green algae". *J Appl Phycol* 6: 151-157.

Penttillä ME, Nevalainen H, Ratto M, Salminen E y Knowles J. (1987) "A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*". *Gene.* 61: 155-164.

Penttinen OP. (1995) "Chlorophenols in aquatic environments: structure-activity correlations" *Ann Zool Fennici.* 32: 287-294.

Peña-Neira A, Fernández de Simón B, García-Vallejo MC, Hernández T, Cadahía E y Suarez JA. (1999) "Low molecular weight phenols in cork stoppers". *Am. J Enol Vitic.* 50: 285-290.

Peña-Neira A, Fernández de Simón B, García-Vallejo MC, Hernández T, Cadahía E y Suarez JA. (2000) "Presence of cork-taint responsible compounds in wines and their cork stoppers". *Eur Food Res Technol.* 211: 257-261.

Pereira H. (2007) "Cork: Biology, Production and Uses". *Ed. Elsevier.* 336 pp.

Pérez F y Pérez MC. (1996) "El alcornoque y el corcho". *Ed. Vicente Rollano.* Badajoz. 149 pp.

Pérez J, Muñoz-Dorado J, De la Rubia T y Martínez J. (2002) "Biodegradation and Biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin; an overview". *Int Microbiol.* 5: 53-63.

Phay N, Higashiyama T, Tsuji M, Matsura H, Fukushi Y, Yokota A y Tomita F. (1999) "An antifungal compound from roots of Welsh onion" *Phytochem.* 52: 271-274.

- Pointing SB.** (2001) "Feasibility of bioremediation by white rot fungi". *Appl Microbiol Biotechnol.* **57:** 20-33.
- Pollnitz AP, Pardon KH, Liacopoulos D, Skouroumounis GK y Sefton MA.** (1996) "The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks". *Aust J Grape Wine Res.* **2:** 184-190.
- Popp JL y Kirk TK.** (1991) "Oxidation of methoxybenzenes by manganese peroxidase and by Mn³⁺". *Arch Biochem Biophys* **288:** 145-148.
- Puerto F.** (1995) "Traitement des bouchons: lavage au peroxide controlé". *Rev des Oenologues.* **18(64):** 21-26.
- Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH y van der Hondel CA.** (1987) "Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*". *Gene.* **56(1):** 117-124.

Q

- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E y Werner T.** (1995) "MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data". *Nucleic Acids Res.* **23:** 4878-4884.

R

- Richey, MG; Marek, ET; Schardl, CL y Smith, DA.** (1989) "Transformation of filamentous fungi with plasmid DNA by electroporation" *Phytopathology.* **79:** 844-847.
- Richter S, Cormican MG, Pfaller MA, Lee CK, Gingrich R, Rinaldi MG y Sutton DA.** (1999) "Fatal disseminated *Trichoderma longibrachiatum* infection in an adult bone marrow transplant patient: Species identification and review of the literature". *J Clin Microbiol.* **37:** 1154-1160.
- Rigaud J, Issanchou S, Sarris J y Langlois D.** (1984) "Incidence des composés volatils issus du liege sur le goût de bouchon des vins". *Science des Aliments* **4:** 81-93.
- Roberts JK.** (2002) "Proteomics and a future generation of plant molecular biologists". *Plant Mol Biol.* **48:** 143-154.
- Robles J y Doers M.** (1994) "pGEM[®]-T Vector Systems troubleshooting guide. *Promega Notes.* **45:** 19.
- Rodríguez E, Ruiz-Dueñas FJ, Kooistra R, Ram A, Martínez AT y Martínez MJ.** (2008) "Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eringii* and heterologous expression of the *peβ* encoded protein". *J Biotechnol.* **134:** 9-19.
- Rothstein, R.** (1991) "Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast". *Methods Enzymol.* **194:** 281-301.
- Ruiz OA y Ugalde RA.** (1998) "Partial characterization and photolabeling of a *Rhizobium meliloti* polysaccharide methyltransferase with S-adenosylmethionine". *Int Microbiol.* **1(3):** 225-30.

S

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB y Erlich HA.** (1988) "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science.* **239:** 487-491.

- Saloheimo M, Valkonen M, Penttilä M.** (2003) "Activation mechanisms of the HAC1-mediated unfolded protein response in filamentous fungi". *Mol Microbiol.* **47(4)**: 1149-1161
- Sambrook J. y Russell D.W.** (2001) "Molecular cloning: a laboratory manual". *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Tercera Edición, *Cold Spring Harbor*, New York.
- Sánchez-Torres P, Gonzalez R, Pérez-González JA, Gonzalez-Candelas L y Ramón, D.** (1994) "Development of a transformation system for *Trichoderma longibrachiatum* and its use for constructing multicopy transformants for the *egl1* gen" *Appl Microbiol Biotechnol.* **41**: 440-446.
- Sanger F, Nicklen S y Coulson AR.** (1977) "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc Natl Acad Sci USA.* **74(12)**: 5463-5467.
- Sarrete M, Nout MJR, Gervais P y Rombouts FM.** (1992) "Effect of water activity on production and activity of *Rhizopus oligosporus* polysaccharidases". *Appl Microbiol and Biotechnol.* **37**: 420-425.
- Scherer s y Davis RW.** (1979) "Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro". *Proc Natl Acad Sci USA.* **76(10)**: 4951-4955.
- Schwede T, Kopp J, Guex N y Peitsch MC.** (2003) "SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server". *Nucleic Acids Res.* **31**:3381-3385.
- Senior E, y Balba MTM.** (1990) "Refuse decomposition". **Senior E.** Ed. *Microbiology of landfill sites*. CRC Press, Boca Raton, FL, 18-57.
- Silva Pereira C, Pires A, Valle MJ, Vilas Boas L, Figueiredo Marques JJ y San Romao MV.** (2000) "Cork taint of *Chrysonilia sitophila* in the quality of cork stoppers for sealing wine bottles" *J Ind Microbiol Biotech.* **24**: 256 - 261.
- Silva Pereira C, Pires A, Valle MJ, Vilas Boas L, Figueiredo Marques JJ y San Romao MV.** (2000b) "Role of *Chrysonilia sitophila* in the quality of cork stoppers for sealing wine bottles". *J Ind Microbiol Biotech.* **24**: 256-261.
- Simpson RF y Lee TH.** (1990) "The microbiology and taints of cork and oak". En: *Proceedings of the 9th International Oenological Symposium*. **Lemperle EE y Figlestahler** Eds. 653-667. *International association for Modern Winery Technology and Management*.
- Sivan A, Harman GE y Stasz TE.** (1990) "Transfer of isolated Nuclei into protoplasts of *Trichoderma harzianum*". *Appl Environ Microbiol.* **56**: 2404 - 2409.
- Sivasithamparam K y Ghisalberti EL.** (1998) "*Trichoderma* and *Gliocladium*" Vol. 1. **Kubicek CP y Harman GE** Eds. 139-191 *Taylor and Francis*, London.
- Som S y Friedman S.** (1990) "Direct photolabelling of the *EcoRII* methyltransferase with S-adenosyl-L-methionine". *J Biol Chem.* **265**: 4278-4283.
- Southern EM.** (1975) "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *J Mol Biol.* **98(3)**: 503-517.
- Spadone JC, Takeoka G y Liadron R.** (1990) "Analytical investigation of Rio off-flavor in green coffee". *J Agr Food Chem.* **38**: 226-232.
- Sponholz WR y Muno H.** (1994) "Corkiness: a microbiological problem?". En: *The cork in oenology*. Proceedings of 5th International Congress of Wine. Chirioti Editori Pinerolo. 100-106.
- St-Germain G y Summerbell R.** (1996) "Identifying Filamentous Fungi - A Clinical Laboratory Handbook". 1^o ed. *Star Publishing Company*, Belmont, California.

Suárez JA. (1992) “El falso gusto del corcho”. *Vitivinicultura*. **3**: 24–26.

Sundman V y Näse L. (1971) “A simple plate test to direct visualization of biological lignin degradation”. *Pap Timber*. **53**: 67–71.

Szewczyk R y Długónski J. (2009) “Pentachlorophenol and spent engine oil degradation by *Mucor ramosissimus*”. *Int Biodeterior Biodegrad*. **63(2)**: 123–129.

T

Tanner H, Zanier C y Würdig G. (1981) “Zur analytischen differenzierung von muffon und korkgeschmack in wein”. *Schweiz Z Obst u Weinbau*. **117**: 752–757.

Tautz D y Renz M. (1983) “An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels”. *Anal Biochem*. **132(1)**: 14–9.

Terada H. (1990) “Uncouplers of oxidative phosphorylation” *Environ. Health Perspect*. **87**: 213–218.

Thomas KR, Davis B y Mills J. (1979) “The effect of beta-glucuronidase and chitinase on the cell wall of *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus*”. *Microbios*. **25(100)**: 111–23.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F y DG Higgins. (1997) “The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools”. *Nuc Ac Res* **24**: 4876–4882.

Tindale CR, Whitfield FB, Levingston SD y Nguyen THL. (1989) “Fungi isolated from packaging materials: their role in the production of 2,4,6-trichloroanisole”. *J Sci Food Agr*. **49**: 437–447.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications”. *Proc Natl Acad Sci USA*. **76(9)**:4350–4354.

U

Ullah MA, Bedford CT y Evans CS. (2000) “Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*”. *Appl Microbiol Biotechnol*. **53**: 230–234.

Ullán RV, Godio RP, Teijeira F, Vaca I, García-Estrada C, Feltre R, Kosalkova K, Martín JF. (2008) “RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using beta-lactam genes expression”. *J Microbiol Methods*. **75(2)**: 209–218.

V

Vaiman D. (2002) “Agar plug/serial dilution approach for rapid PCR screening of phage libraries”. *Biotechniques*. **33(4)**: 764–766.

Valli K y Gold MH. (1991) “Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*”. *J Bacteriol* **173**: 345–352.

Villa-Carvajal M, Coque JJR, Álvarez-Rodríguez ML, Uruburu F y Belloch C. (2004) “Polyphasic identification of yeasts isolated from bark of cork oak during the manufacturing process of cork stoppers”. *FEMS Yeast Research* **4**: 745–750.

Vorkamp K, Riget FF, Glasius M, Pécseli M, Lebeuf M y Muir D. (2004) “Chlorobenzenes, chlorinated pesticides, coplanar chlorobiphenyls and other organochlorine compounds in Greenland biota”. *Sci Total Environ*. **331(1–3)**: 157–175.

W

- Wang J, Tekle E, Oubrahim H, Mieyal JJ, Stadtman ER, Chock PB. (2003) "Stable and controllable RNA interference: Investigating the physiological function of glutathionylated actin". *Proc Natl Acad Sci USA*. **100(9)**: 5103-5106.
- Weidner G, d'Enfert C, Koch A, Mol PC y Brakhage AA. (1998) "Development of a homologous transformation system for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* based on the *pyrG* gene encoding orotidine 5'-monophosphate decarboxylase". *Curr Genet*. **33(5)**: 378-385.
- Wesenberg D, Kyriakides I y Agathos SN. (2003) "White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents". *Biotechnol Adv*. **22**: 161-187.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith CA, Wang M, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Sotutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG y Waterhouse PM. (2001) "Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants". *Plant J*. **27**: 581-590.
- van West P, Kamoun S, van 't Klooster JW y Govers F. (1999) "Internuclear gene silencing in *Phytophthora infestans*". *Mol Cell*. **3(3)**: 339-348.
- Whitfield F, Nguyen L, Shaw KJ, Last JH, Tindale CR y Stanley G. (1985) "Contamination of dried fruits by 2,4,6-trichloroanisole and 2,3,4,6-tetrachloroanisole absorbed from packaging materials". *Chem. Ind*. 661-666.
- Whitfield F, Nguyen L y Tindale CR. (1991) "Effect on relative humidity and incubation time on the O-methylation of chlorophenols in fibreboard by *Paecilomyces varotii*". *J Sci Food Agric*. **55**: 19-26.
- Wieser M, Wagner B, Eberspächer J y Lingens F. (1997) "Purification and characterization of 2,4,6-trichlorophenol-4-monooxygenase, a dehalogenating enzyme from *Azotobacter* sp. Strain GP1" *J Bacteriol*. **179**: 202-208.

X

- Xun L. (1996) "Purification and characterization of chlorophenol 4-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100" *J Bacteriol*. **173**: 4447-4453.
- Xun L y Orser CS. (1991) "Purification and properties of pentachlorophenol hydroxylase, a flavoprotein from *Flavobacterium* sp. Strain ATCC 39723". *J Bacteriol*. **173**: 4447-4453.

Y

- Yaropolov AI, Skorobogat'ko OV, Vartanov SS y Varfolomeyev SD. (1994) "Laccase: Properties, catalytic mechanism, and applicability" *Appl Biochem Biotechnol* **49(3)**: 257-280.