

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA.

"CLONACION Y SECUENCIADO DEL  
GEN CODIFICANTE PARA LA DD-  
TRANSPEPTIDASA DE Streptomyces  
-K15 Y SU EXPRESION EN Streptomyces  
Lividans TK24."

Pilar PALOMEQUE MESSIA

TESIS DOCTORAL

1990



Biblioteca Universitaria de Granada



01533700

T  
12  
48

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA.

"CLONACION Y SECUENCIADO DEL  
GEN CODIFICANTE PARA LA DD-  
TRANSPEPTIDASA DE Streptomyces  
-K15 Y SU EXPRESION EN Streptomyces  
Lividans TK24."

Pilar PALOMEQUE MESSIA

BIBLIOTECA	UNIVERSITARIA
GRANADA	
Nº Documento	49654832
Nº Copia	21200804

TESIS DOCTORAL

1990

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA.

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 130 AGO. 1990  
ENTRADA NUM. 1275

"CLONACION Y SECUENCIADO DEL  
GEN CODIFICANTE PARA LA DD-  
TRANSPEPTIDASA DE Streptomyces  
-K15 Y SU EXPRESION EN  
Streptomyces Lividans TK24."

Pilar PALOMEQUE MESSIA

TESIS DOCTORAL

1990

" CLONACION Y SECUENCIADO DEL GEN  
CODIFICANTE PARA LA DD-TRANSPEPTIDASA  
DE Streptomyces K15 Y SU EXPRESION EN  
Streptomyces lividans TK24"

---

Memoria que presenta Dña. Pilar Palomeque Messía  
para aspirar al grado de DOCTOR EN CIENCIAS

Fdo. : Pilar Palomeque Messía,  
Lda.en Ciencias Biológicas

Pilar Palomeque Messía

Vº Bº Los Directores

Fdo. Eva Valdivia Martinez

Profesor Titular del Dpto.  
de Microbiología de la  
Facultad de Ciencias de  
Granada

Eva Valdivia

Fdo. Mercedes Maqueda Abreu

Profesor Titular del Dpto.  
de Microbiología de la  
Facultad de Ciencias de  
Granada

M. Maqueda

Granada, Septiembre de 1990

Este trabajo ha sido realizado en el Servicio de Microbiología Aplicada a las Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Lieja ( Bélgica ), durante los años 1987 a 1990.

**INDICE**

## CAPITULO I INTRODUCCION.-

### SECCION I PROTEINAS CAPACES DE UNIR LA PENICILINA : PBPs Y $\beta$ -LACTAMASAS.-

1.1	Estructura del peptidoglucano	2
1.2	Biosíntesis del peptidoglucano	2
1.3	Dianas de los antibióticos $\beta$ -lactámicos	3
1.4	Mecanismos de resistencia a los antibióticos $\beta$ -lactámicos	6
1.5	Estudios cinéticos	
1.5.1	Interacción de las DD-peptidasas con sus sustratos peptídicos	8
1.5.2	Interacción de las DD-peptidasas con los antibióticos $\beta$ -lactámicos	8
1.5.3	Interacción de las $\beta$ -lactamasas con los antibióticos $\beta$ -lactámicos	9
1.6	Comparación entre los serin PBPs y serin- $\beta$ -lactamasas	9

### SECCION II LA DD-TRANSPEPTIDASA DE MEMBRANA DE *Streptomyces* K15.RESUMEN DE LOS CONOCIMIENTOS ACTUALES

2.1	Reacción de la DD-peptidasa K15 con los sustratos peptídicos	12
2.2	Reacción de la DD-peptidasa con los antibióticos $\beta$ -lactámicos	14
2.3	Secuencia N-terminal y composición en aminoácidos	14

### SECCION III OBJETO DEL TRABAJO

3.1	Clonación del gen codificante para la DD-transpeptidasa de <i>Streptomyces</i> K15	16
3.2	Secuenciado del gen clonado	18
3.3	Superproducción del enzima clonado en <i>Streptomyces</i>	19
3.4	Obtención de una forma hidrosoluble y catalíticamente activa de la DD-peptidasa K15	20

## CAPITULO II MATERIAL Y METODOS

1.	RAZAS BACTERIANAS	21
1.1	<u>Streptomyces</u>	21
1.2	<u>Escherichia coli</u>	22
2.	PLÁSMIDOS	23
2.1	Características de los plásmidos de <u>Streptomyces</u>	23
2.2	Características de los plásmidos de <u>E.coli</u>	24
3.	MEDIOS DE CONSERVACION Y CRECIMIENTO.TAMPONES	24
3.1	Medios empleados con <u>Streptomyces</u>	24

3.1.1	Medios líquidos y tampones	24
3.1.2	Medios sólidos	26
3.2	Medios empleados con <u>E.coli</u>	28
3.2	Medios líquidos	28
3.2.2	Medios sólidos	29
4.	ANTIBIOTICOS	30
4.1.	Antibióticos empleados con <u>Streptomyces</u>	30
4.2.	Antibióticos empleados con <u>E.coli</u>	30
5.	NUCLEOTIDOS	30
6.	SUSTRATOS	31
7.	ENZIMAS	31
8.	OLIGONUCLEOTIDOS DE SINTESIS	31
9.	LIQUIDOS DE CENTELLEO	31
10.	PROTEINAS DE REFERENCIA	32
11.	DETERGENTES	32

#### TECNICAS RELACIONADAS CON EL ADN

12.	TECNICAS EMPLEADAS CON <u>E.coli</u>	
12.1	Preparación de células competentes	32
12.2	Transformación	33
12.3	Preparación del ADN plasmídico	33
12.3.1	Mini-preparación del plásmido por lisis alcalina	33
12.3.2	Preparación del ADN plasmídico tras la amplificación con cloranfenicol	34
13.	TECNICAS EMPLEADAS CON <u>Streptomyces</u>	
13.1.	Preparación de protoplastos	35
13.2	Transformación y selección de los transformantes	36
13.3	Conservación de los clones	37
13.4	Preparación del ADN cromosómico	37
13.5	Preparación del ADN plasmídico	
13.5.1	Mini-preparación de plásmidos por lisis alcalina	38
13.5.2	Preparación a gran escala	39
14.	<u>TECNICAS GENERALES</u>	
14.1	Extracción con fenol-cloroformo	40
14.2	Precipitación del ADN con etanol	40
14.3	Utilización de los enzimas de restricción	41
14.4	Utilización de la ADN ligasa del bacteriófago T4	41
14.5	Utilización de la fosfatasa alcalina bacteriana	42
14.6	Marcaje radioactivo de los extremos 5' del ADN con la ayuda de la polinucleótido Kinasa del fago T4( T4 PNK)	
14.6.1	Marcaje radioactivo del ADN	
14.6.2	Purificación por cromatografía en columna intercambiadora de iones	43



14.7	Análisis del ADN mediante electroforesis	
14.7.1	Electroforesis en gel de agarosa	44
14.7.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida	44
14.7.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	45
14.7.4	Determinación del tamaño de la molécula de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa	46
14.8	Estimación de la concentración de ADN de una solución	46
14.9	Recuperación de fragmentos de ADN tras una electroforesis preparativa	
14.9.1	Mediante electroelución	47
14.9.2	Mediante difusión	48
14.10	Transferencia del ADN de un gel de agarosa a un filtro de nitrocelulosa	48
14.11	Técnicas de hibridación	
14.11.1	Hibridación a partir de colonias	49
14.11.2	Hibridación de los fragmentos de restricción transferidos a filtros de nitrocelulosa	50
14.12	Autorradiografía	51
14.13	Amplificación del ADN mediante la reacción de polimerización en cadena ( PCR )	52
14.14	Clonación en el bacteriófago M13 y determinación de la secuencia por el método de Sanger	53
14.14.1	Inserción de un fragmento de ADN foráneo en M13	54
14.14.2	Transformación de bacterias por el bacteriófago M13 recombinante	55
14.14.3	Preparación del ADN monocatenario del bacteriófago M13 recombinante	56
14.14.4	Análisis del ADN monocatenario mediante electroforesis en gel	57
14.14.5	Reacción de secuenciación	57
14.15	Programas de ordenador utilizados	
14.15.1	Análisis de la secuencia nucleotídica	58
14.15.2	Análisis de la secuencia de aminoácidos	60
14.15.3	Comparación de la secuencia	61
15	TECNICAS RELATIVAS A LAS PROTEINAS	
15.1	Detección inmunológica de los clones productores de DD-transpeptidasa	62
15.2	Localización de la DD-peptidasa hiperproducida	
15.2.1	Preparación de membranas citoplasmáticas y las fracciones solubles	64
15.2.2	Extracción de la DD-peptidasa mediante bromuro de cetiltrimetilamonio (BCTA)	65

15.3	Valoración de la concentración en proteínas de una solución	
15.3.1	Método de Folin	66
15.3.2	Método de Bradford	66
15.3.3	Medida de la absorbancia a 280 y 260 nm	66
15.4	Valoración de la actividad transpeptidasa	67
15.4.1	Valoración de la D-Ala liberada por el método de la DAAO	67
15.4.2	Valoración del producto transpeptidado	68
15.5	Valoración de la actividad carboxipeptidásica	69
15.6	Electroforesis en placa de gel de poliacrilamida en presencia de SDS y revelado de las proteínas	69
15.6.1	Tinción del gel con azul de Coomassie	70
15.6.2	Fluorografía	70
15.6.4	Densitometría	71
15.7	Precipitación con acetona	72
15.8	Cromatografía de exclusión molecular	72

### CAPITULO III : RESULTADOS

#### Primera parte :CLONACION Y SECUENCIADO DEL GEN CODIFICANTE PARA LA DD-PEPTIDASA DE *Streptomyces* K15

1.	CLONACION DEL GEN CODIFICANTE PARA LA DD-TRANS-PEPTIDASA de <u><i>Streptomyces</i> K15.</u>	
1.1	Preparación de una sonda no degenerada	74
1.1.1	Amplificación del ADN (PCR)	74
1.1.2	Determinación de la secuencia del fragmento amplificado y elección de la sonda	75
1.2	Preparación de bancos de genes	
1.2.1	Digestión del ADN genómico de <u>S.</u> K15	76
1.2.2	Digestión del vector	76
1.2.3	Ligación	76
1.2.4	Transformación	76
1.3	Selección de los clones portadores de plásmidos recombinantes	77
1.4	Hibridación de los transformantes con la sonda radioactiva y preparación de los plásmidos recombinantes pDML 220 y pDML 221	77
2.	LOCALIZACIÓN DEL GEN EN LOS INSERTOS DE pDML 220 y pDML 221	
2.1.	Digestión de los plásmidos pDML 220 y pDML 221 e hibridación de los fragmentos de restricción (Southern Blot)	79
2.2.	Sub-clonación de los fragmentos <u>Sph</u> I hibridables con la sonda y preparación de los plásmidos correspondientes	79
2.3.	Establecimiento del mapa de restricción del fragmento <u>Sph</u> I	80
2.4.	Localización del gen en el fragmento <u>Sph</u> I	80

3. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DEL GEN CODIFICANTE PARA LA DD-TRANSPEPTIDASA DE <u>Streptomyces</u> K15	81
3.1 Elaboración de una estrategia de determinación de la secuencia y subclonación de los diferentes fragmentos en el fago M13	82
3.2. Secuencia nucleotídica del gen	83
3.3. Búsqueda de las señales de transcripción y traducción del gen	
3.3.1. Búsqueda de las señales de traducción	85
3.3.2. Búsqueda de las señales de transcripción	
3.3.2.1. Localización de secuencias promotoras	85
3.3.2.2. Búsqueda de señales de fin de la transcripción	85
3.4. Determinación del mapa de restricción del gen de la DD-peptidasa K15	86
4. ESTUDIO DE LA DD-PEPTIDASA DE <u>Streptomyces</u> K15	
4.1. Determinación del punto isoeléctrico teórico de la proteína	86
4.2. Estudio de la hidrofobicidad de la proteína	87
4.3. Comparación de la secuencia aminoacídica de la DD-transpeptidasa de <u>S.</u> K15 con la de otros PBPs y $\beta$ -lactamasas	87
4.4. Predicción de estructuras secundarias	89

Segunda parte : EXPRESION DE LA DD-TRANSPEPTIDASA K15 EN Streptomyces.

A. EXPRESION DE LA DD-TRANSPEPTIDASA K15 EN <u>Streptomyces</u>	
A.1. Puesta a punto de una técnica inmunológica de detección de clones	91
A.2. Selección de la cepa hospedadora	92
A.3. Clonación del gen DD-transpeptidasa K15 en los vectores pIJ702 y pIJ699	92
A.3.1 Preparación de los fragmentos <u>Sph</u> I y <u>Bam</u> HI	93
A.3.2 Preparación de los vectores de <u>Streptomyces</u>	93
A.3.3 Ligación	93
A.3.4 Transformación de <u>S.pristinaespiralis</u>	94
A.3.5 Selección de los clones productores de DD-peptidasa K15 por una técnica inmunológica	94
A.3.6 Localización de la DD-transpeptidasa K15 producida por los clones de <u>S.pristinaespiralis</u>	95
A.3.7 Inestabilidad de los clones PM1 y PM2	96

A.4 Superproducción de la DD-transpeptidasa K15 en <u>Streptomyces lividans</u> y <u>S.pristinaespiralis</u>	97
A.4.1 Transformación	97
A.4.2 Detección inmunológica de los clones productores de DD-transpeptidasa K15	97
A.4.3 Localización de la DD-transpeptidasa K15 producida por los clones de <u>S.lividans</u> y <u>S.pristinaespiralis</u>	
A.4.3.1 Preparación de las diferentes fracciones celulares a partir de los clones productores	98
A.4.3.2 Detección de la DD-peptidasa K15 en las cuatro fracciones obtenidas	99
A.4.4 Producción de DD-transpeptidasa K15 en el caldo de cultivo en función del tiempo	100
 B. ESTUDIO DE LA DD-PEPTIDASA PRODUCIDA EN EL MEDIO DE CULTIVO POR <u>S.lividans</u> TK24	101
 B.1 Cromatografía de exclusión molecular de la DD-peptidasa obtenida por precipitación a la acetona	102
B.1.1 Precipitación a la acetona	102
B.1.2 Filtración por Superdex	103
B.2 Propiedades de la DD-peptidasa producida por <u>S.lividans</u> PM3	103
B.2.1 Termoestabilidad	104
B.2.2 Reacción con la bencilpenicilina	
B.2.2.1 Estequiometría de la reacción	104
B.2.2.1 Determinación de la ID <sub>50</sub>	
105	
B.2.3 Reacción con los sustratos	105

#### CAPITULO IV : DISCUSION Y CONCLUSIONES

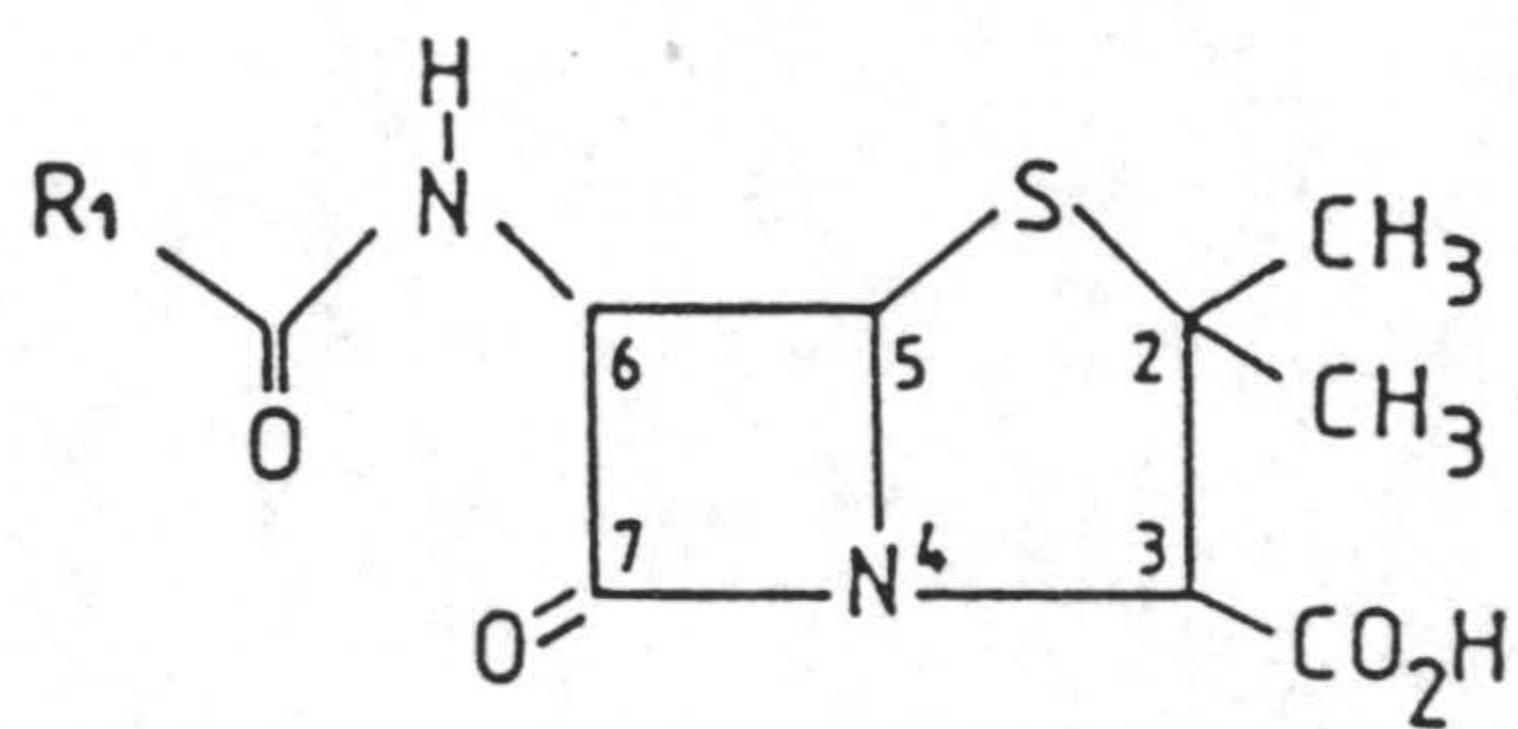
##### I DISCUSION

1.1 Clonación y determinación de la secuencia	107
1.2 Estructura primaria de la DD-peptidasa K15	110
1.3 Expresión en <u>Streptomyces</u>	114

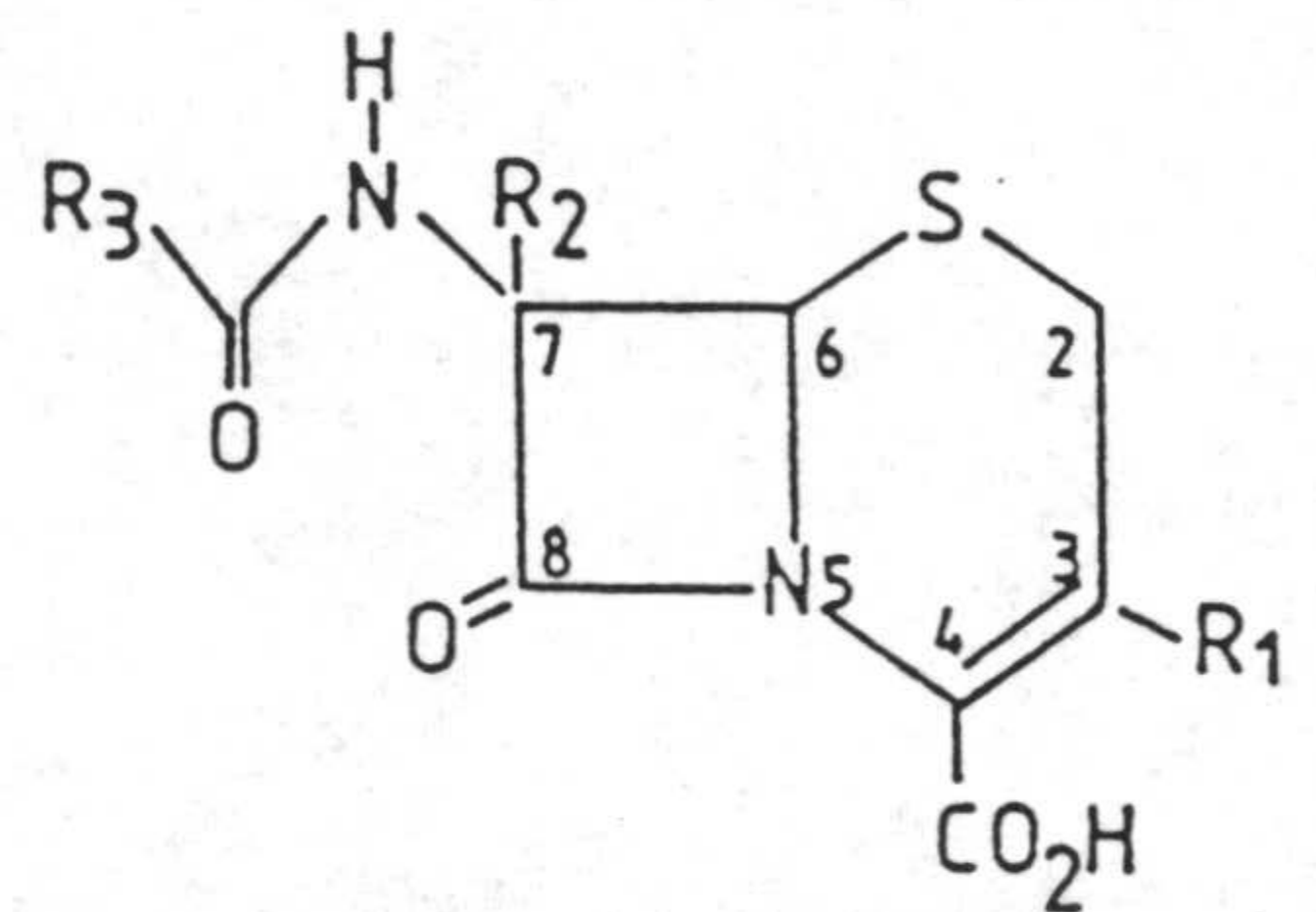
##### II CONCLUSIONES

117

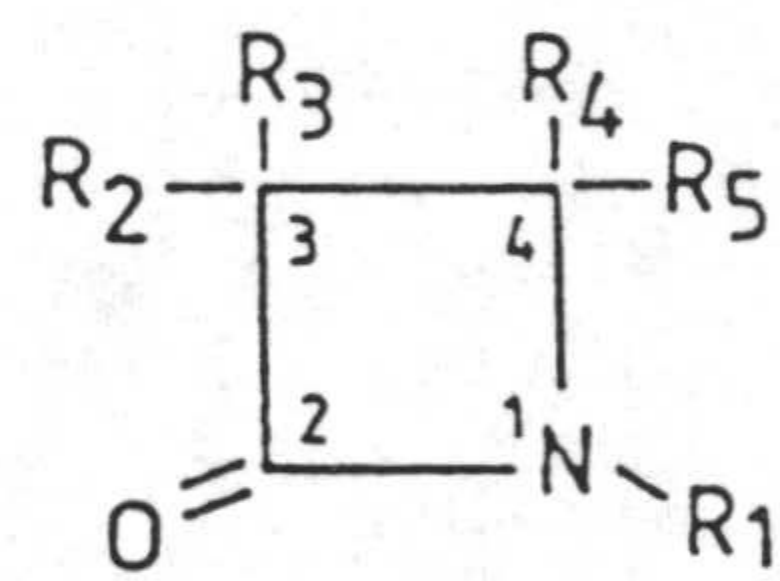
## **Capítulo I : INTRODUCCION**



Penicilline



Céphalosporine



Monobactame

Figura 1.-Estructura de los tres tipos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos .

## CAPITULO I INTRODUCCION .-

### SECCION I PROTEINAS CAPACES DE UNIR LA BENCILPENICILINA: PBPs Y $\beta$ -LACTAMASAS .-

En 1.928 Fleming [1] descubrió la penicilina en los filtrados de cultivo de un hongo: Penicillium notatum. Algunos años más tarde (1.941), Florey y Chain purificaron parcialmente la penicilina y demostraron su valor terapéutico sobre humanos. El descubrimiento de la penicilina fue seguido por la identificación de numerosos análogos (ampicilina, amoxicilina, cloxacilina...) y el descubrimiento de otras moléculas de estructura diferente: las cefalosporinas y más recientemente, los monobactames. Estos tres tipos de antibióticos constituyen la familia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (figura 1), caracterizados por poseer en su molécula un ciclo de 4 piezas que les confiere una gran reactividad química.

Estos antibióticos se distinguen entre los agentes antibacterianos por su gran espectro de acción y su escasa toxicidad frente a las células eucariotas, ya que su acción se dirige específicamente contra las bacterias en fase de crecimiento; en efecto, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos interfieren con la biosíntesis del peptidoglucano, molécula esencial para la supervivencia de las bacterias y característica de éstas [ 2,3,4,5 ].

Todas las bacterias están rodeadas de una membrana citoplasmática y de una pared rígida responsable de su forma, su rigidez y que les confiere la resistencia mecánica necesaria para sobrevivir en un medio hipotónico.

Existen dos grandes grupos de bacterias: Gram-positivas y Gram-negativas, que se diferencian por la estructura y la composición química de la pared celular. No obstante, los dos grupos poseen en su pared una estructura rígida característica: el peptidoglucano [5,6].

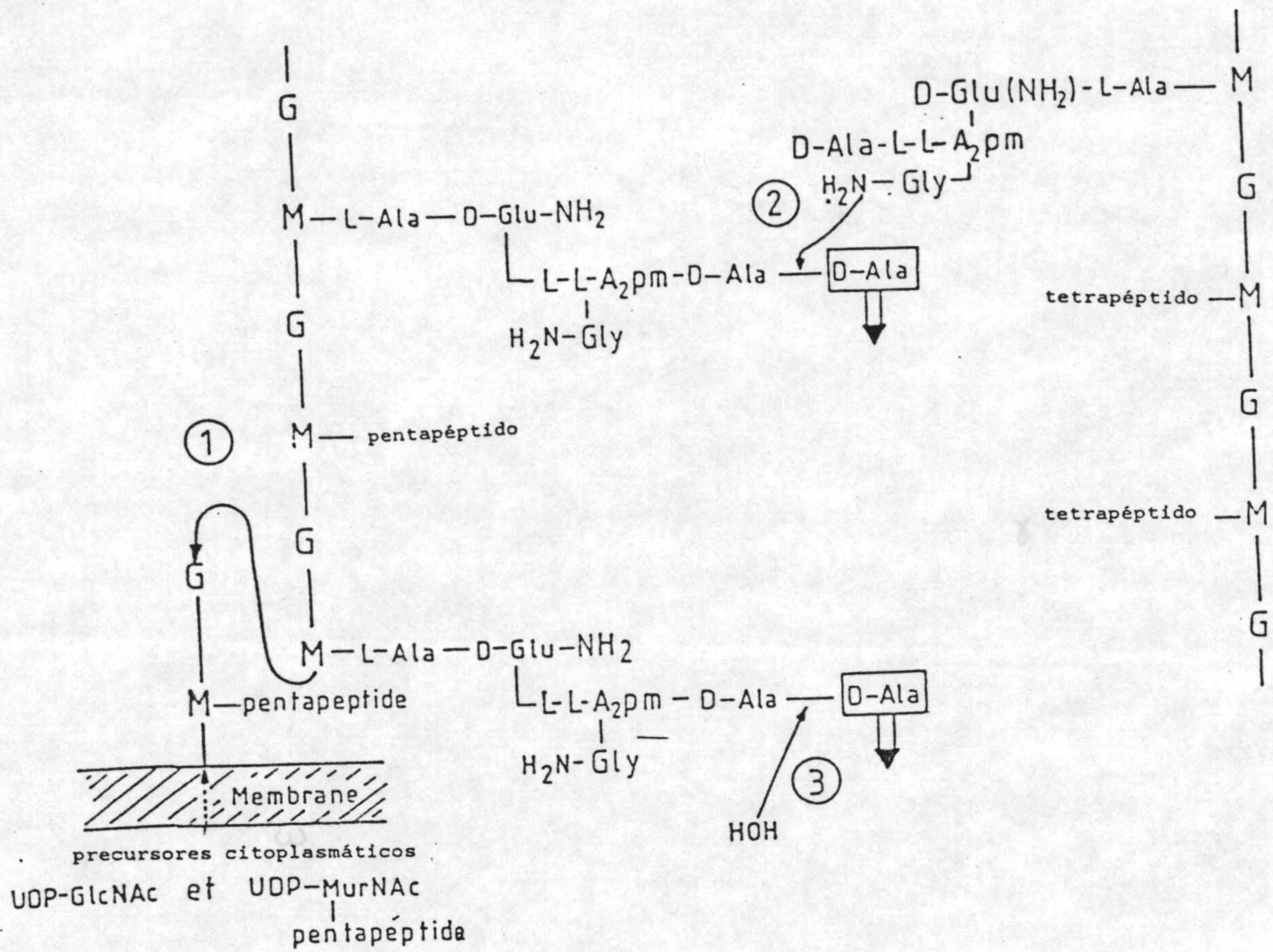


Figura 2.-Estructura del peptidoglucano de *Streptomyces* K15 y actividades enzimáticas implicadas en su biosíntesis.  
 1 : Actividad transglicosilásica.  
 2 : Actividad transpeptidásica.  
 3 : Actividad carboxipeptidásica.



### 1.1. Estructura del peptidoglucano .-

El peptidoglucano (mureina, mucopéptido o glucosaminopéptido) está constituido por cadenas lineales de glucano unidas entre ellas mediante cortos péptidos. Las cadenas de glucano están formadas por una alternancia de residuos de N-acetilglucosamina (G) y N-acetilmurámico (M), unidos entre ellos por medio de uniones glucosílicas de tipo  $\beta$ -1-4. Los grupos carboxilos de los residuos de N-acetilmurámico están sustituidos por cortos tetrapéptidos L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-R<sub>3</sub>-D-Ala en los cuales el residuo L-R<sub>3</sub> es generalmente un ácido diaminado. Los tetrapéptidos pertenecientes a cadenas de glucano adyacentes se unen entre ellas mediante la formación de "puentes interpeptídicos". Estos puentes interpeptídicos se extienden entre el grupo carboxilo libre de la D-Ala terminal de un tetrapéptido y el grupo  $\omega$  amino libre del residuo L-R<sub>3</sub> de un segundo tetrapéptido; a veces, uno o varios aminoácidos se intercalan entre estos dos grupos, alargando así el puente interpeptídico. Este mecanismo de unión es común al mucopéptido de todas las bacterias, pero las unidades peptídicas presentan una gran variabilidad según las especies. La figura 2 ( M.Leyh-Bouille, resultados no publicados ) muestra la estructura del peptidoglucano de Streptomyces K15. En esta bacteria el residuo L-R<sub>3</sub> es un residuo de LL-diaminopimélico y un residuo de Glicocola interviene en la formación de los puentes interpeptídicos.

### 1.2. Biosíntesis del peptidoglucano

En la biosíntesis del peptidoglucano se distinguen tres etapas principales:

- 1) Síntesis de los precursores UDP- N-acetilglucosamina y UDP-N-acetilmuramil-pentapéptido en el citoplasma.
- 2) Ensamblaje de las unidades disacarido-péptido a partir de los precursores citoplasmáticos sobre un transportador lipídico y transporte de estas unidades a través de la membrana citoplasmática y

3) Incorporación de las unidades disacarido-péptido que acaban de ser sintetizadas en el mucopéptido preexistente. Esta etapa tiene lugar en la cara externa de la membrana citoplasmática.

Al menos dos actividades enzimáticas están implicadas en esta biosíntesis: una actividad transglucosilásica que cataliza la elongación de las cadenas de glucano (insensible a la penicilina) y una actividad transpeptidásica que cataliza la formación de puentes interpeptídicos (sensible a la penicilina).

Durante la reacción de transpeptidación el grupo carboxilo del penúltimo residuo D-Ala de un pentapéptido donador L-Ala- -D-Glu-L-R<sub>3</sub>-D-Ala-D-Ala es transferido sobre el grupo amino libre de un péptido aceptor (figura 2). La formación del puente interpeptídico, realizado así sin aporte externo de energía se acompaña de la liberación del último residuo D-Ala del péptido donador.

En la mayoría de las bacterias, existe otro enzima, una DD-carboxipeptidasa que hidroliza la unión D-Ala-D-Ala-OH sin transpeptidación simultánea. Su función fisiológica no está clara; no obstante, se piensa que este enzima podría realizar una función reguladora, controlando el grado de entrecruzamiento del peptidoglucano.

Finalmente, una tercera actividad enzimática: una actividad DD-endopeptidásica, también sensible a la penicilina, suele encontrarse en las membranas citoplasmáticas. Este enzima hidroliza algunas uniones formadas por transpeptidación. Su papel fisiológico no está establecido; probablemente, las endopeptidasas intervienen, junto con otros enzimas, en la división celular.

### 1.3 Dianas de los antibióticos $\beta$ - lactámicos .-

Estos tres enzimas, DD-transpeptidasa, DD-carboxipeptidasa y DD-endopeptidasa, responsables de la formación y control de las uniones interpeptídicas son las dianas de los antibióticos  $\beta$  -lactámicos: PSEs ("penicillin sensitive enzymes") [7,8,,9,10]; estos enzimas se localizan

generalmente a nivel de la membrana citoplasmática.

En la mayoría de las bacterias existen varias proteínas capaces de fijar la penicilina :PBPs ("penicillin binding proteins"), de masa molecular comprendida entre 25.000 y más de 100.000 daltons. El número y la masa molecular de estos PBPs es característico de cada especie bacteriana; estas proteínas no presentan todas el mismo grado de esencialidad y su sensibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos varía ampliamente.

Generalmente la membrana de cada especie bacteriana contiene de 6 a 8 proteínas capaces de unir la penicilina. Los PBPs forman con la penicilina complejos lo suficientemente estables o estos complejos pueden ser estabilizados por desnaturalización. Así, la utilización de antibióticos radioactivos permite detectar los diferentes PBPs mediante la realización de una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS), seguida de una fluorografía. Los diferentes PBPs presentes en las membranas se separan en función de sus masas moleculares y son numerados por orden de masa molecular decreciente.

En E.coli (tabla 1) los PBPs de elevada masa molecular (1A, 1B, 2 y 3) son los enzimas fisiológicamente importantes que catalizan las etapas finales de la síntesis del glucopéptido. Su inactivación por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos es letal para la bacteria. Estudios genéticos han demostrado que las proteínas 1A y 1B son responsables de la elongación, la proteína 2 del mantenimiento de la forma y la proteína 3 de la septación.

Los PBPs 1A, 1B, 2 y 3 son bifuncionales; estas proteínas poseen un dominio N-terminal que cataliza una reacción de transglucosilación, insensible a la penicilina y un dominio C-terminal que cataliza una reacción de transpeptidación sensible a la penicilina. In vitro sus actividades transglicosilásica y transpeptidásica han sido puestas en evidencia utilizando sistemas muy complejos. Hasta el momento, ninguna actividad enzimática de estos PBPs ha

podido ser demostrada en presencia de sustratos simples y bien definidos .

Las proteínas 4 y 5 (tabla 1) no son esenciales, pero se piensa que intervienen en la remodelación de la pared a lo largo del ciclo celular.

Los PBPs 4,5 y 6 poseen una actividad DD- carboxipeptidásica y una ligera actividad transpeptidásica; el PBP 4 funciona también como DD-endopeptidasa [11].

Además, existen otros PBPs identificados como PSEs que son excretados al medio de cultivo durante el crecimiento de la bacteria. Esta propiedad parece ser exclusiva de los Actinomycetes.

Así, Streptomyces albus G, S.R61, S.K15 y Actinomadura R39 excretan espontáneamente durante su crecimiento una DD-peptidasa que presenta una sensibilidad más o menos grande a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos según la cepa bacteriana.

Actinomadura R39 [12,13,14,15] y Streptomyces K15 [16] excretan una serin-DD-carboxipeptidasa-transpeptidasa (Mr 54.000 y 50.000) respectivamente muy sensible a la penicilina.

S. R61 [17 a 20] excreta una DD-carboxipeptidasa-transpeptidasa (Mr 38.000) moderadamente sensible a la penicilina como la DD-peptidasa de Mr 40.000 de S. K15 [16].

S.albus G [21 a 25] excreta una  $Zn^{++}$ -DD-carboxipeptidasa (Mr 18.000), prácticamente insensible a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

In vitro, las DD-peptidasas de S. R61, S. K15 y Actinomadura R39 funcionan sea como DD-carboxipeptidasa, sea como DD-transpeptidasa, según la disponibilidad de un aceptor nucleofílico ( $H_2O$  o  $NH_2-R$ ).

La DD-carboxipeptidasa de S.albus G funciona exclusivamente como un enzima hidrolítico.

Las DD-peptidasas de S. R61 y A. R39 han sido particularmente estudiadas y han resultado ser buenos modelos para el estudio de la interacción enzima-sustrato y enzima-penicilina.

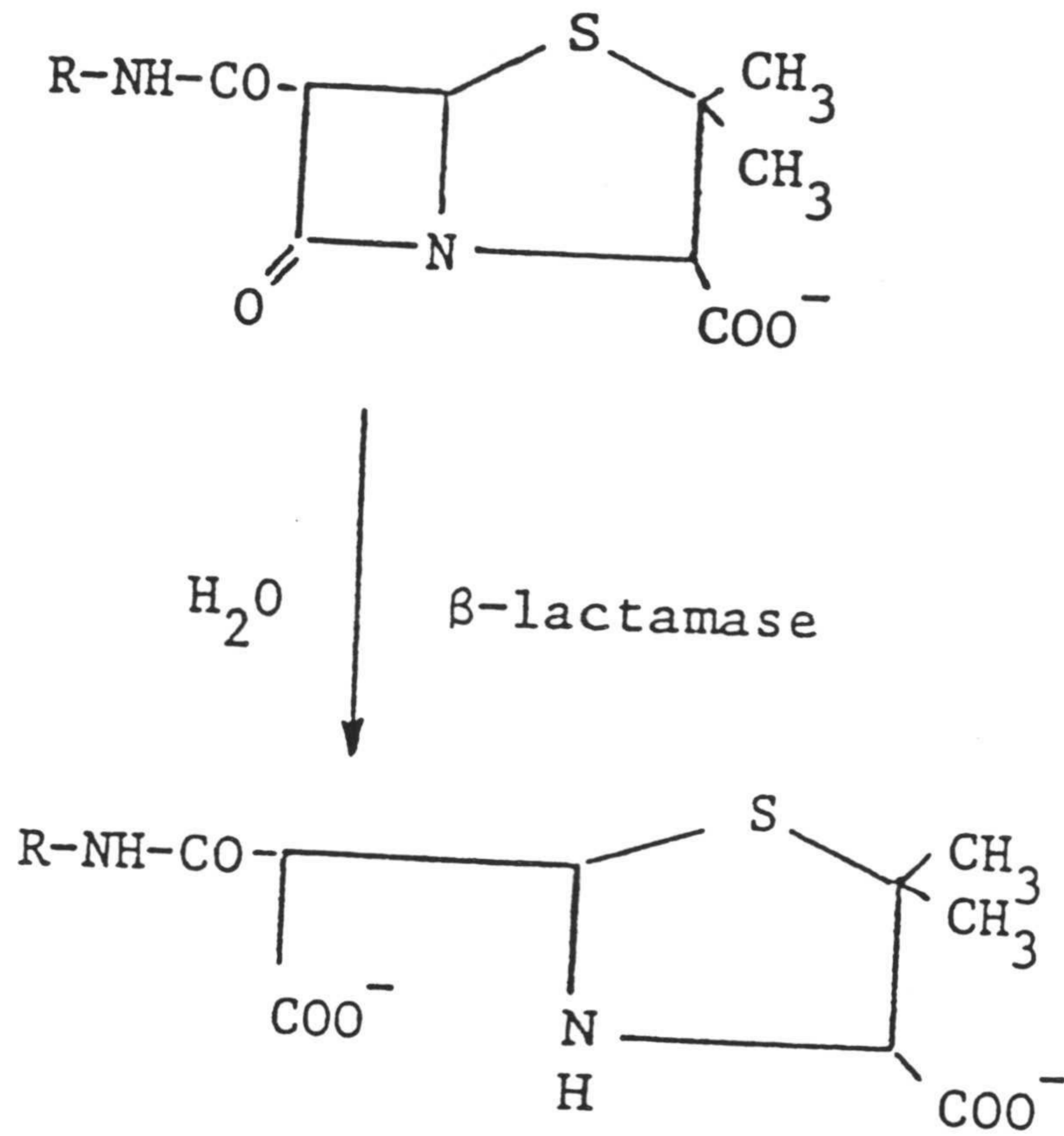


Figura 3.-Inactivación de una penicilina por una  $\beta$ -lactamasa.

podido ser demostrada en presencia de sustratos simples y bien definidos .

Las proteínas 4 y 5 (tabla 1) no son esenciales, pero se piensa que intervienen en la remodelación de la pared a lo largo del ciclo celular.

Los PBPs 4,5 y 6 poseen una actividad DD- carboxipeptidásica y una ligera actividad transpeptidásica; el PBP 4 funciona también como DD-endopeptidasa [11].

Además, existen otros PBPs identificados como PSEs que son excretados al medio de cultivo durante el crecimiento de la bacteria. Esta propiedad parece ser exclusiva de los Actinomycetes.

Así, Streptomyces albus G, S.R61, S.K15 y Actinomadura R39 excretan espontáneamente durante su crecimiento una DD-peptidasa que presenta una sensibilidad más o menos grande a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos según la cepa bacteriana.

Actinomadura R39 [12,13,14,15] y Streptomyces K15 [16] excretan una serin-DD-carboxipeptidasa-transpeptidasa (Mr 54.000 y 50.000) respectivamente muy sensible a la penicilina.

S. R61 [17 a 20] excreta una DD-carboxipeptidasa-transpeptidasa (Mr 38.000) moderadamente sensible a la penicilina como la DD-peptidasa de Mr 40.000 de S. K15 [16].

S.albus G [21 a 25] excreta una  $Zn^{++}$ -DD-carboxipeptidasa (Mr 18.000), prácticamente insensible a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

In vitro, las DD-peptidasas de S. R61, S. K15 y Actinomadura R39 funcionan sea como DD-carboxipeptidasa, sea como DD-transpeptidasa, según la disponibilidad de un aceptor nucleofílico ( $H_2O$  o  $NH_2-R$ ).

La DD-carboxipeptidasa de S.albus G funciona exclusivamente como un enzima hidrolítico.

Las DD-peptidasas de S. R61 y A. R39 han sido particularmente estudiadas y han resultado ser buenos modelos para el estudio de la interacción enzima-sustrato y enzima-penicilina.

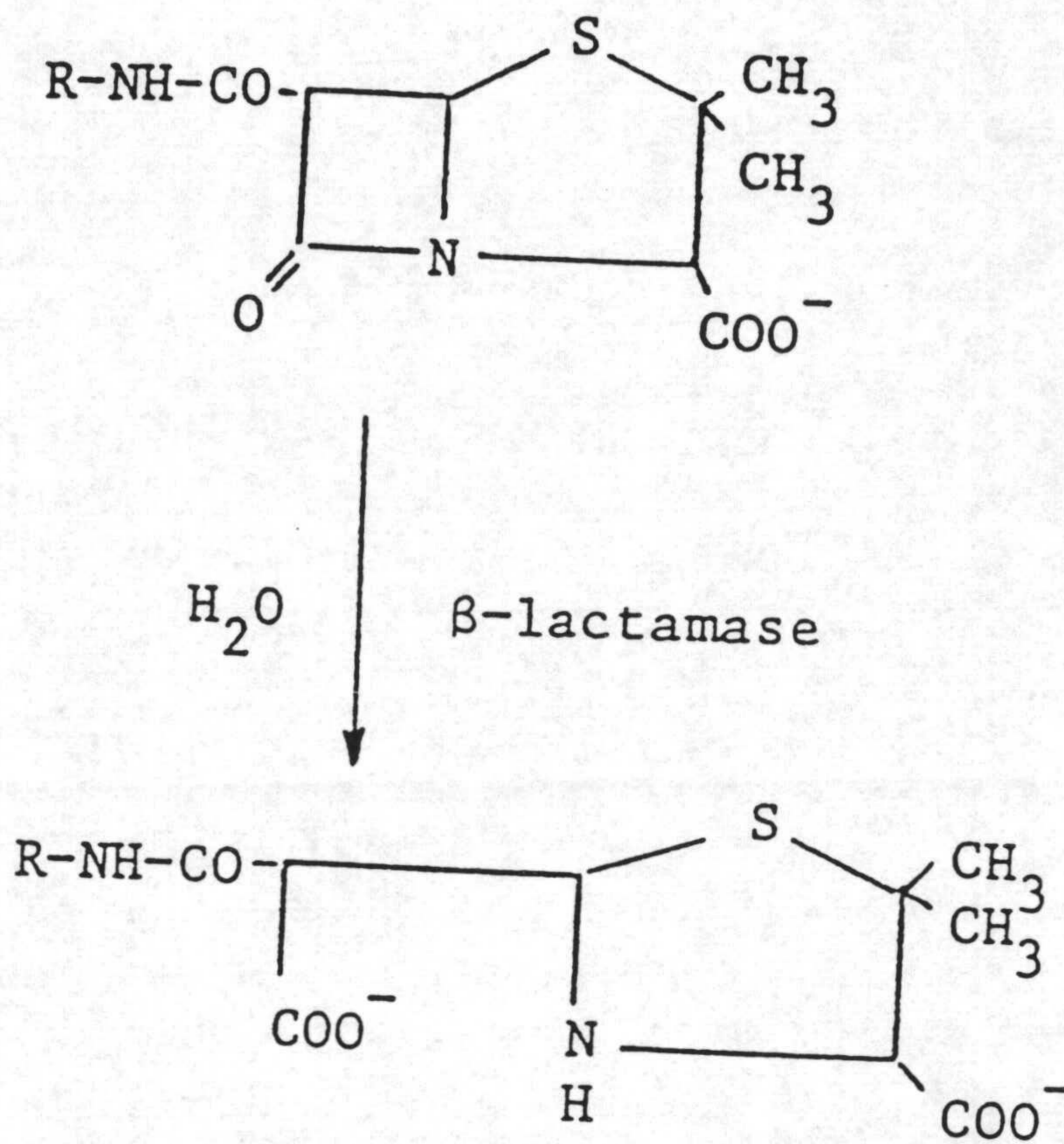


Figura 3.-Inactivación de una penicilina por una  $\beta$ -lactamasa.

#### 1.4. Mecanismos de resistencia a los antibióticos $\beta$ -lactámicos:

A partir del momento en que se generalizó la utilización terapéutica de las penicilinas, numerosas bacterias se han hecho resistentes a estos antibióticos. Existen tres mecanismos de resistencia:

1) Producción de enzimas defensivos ( $\beta$  -lactamasas) capaces de hidrolizar la unión amida del ciclo  $\beta$ -lactámico, inactivando así el antibiótico (figura 3), [26 a 29]. Los genes codificantes para estas proteínas pueden ser cromosómicos o estar localizados en plásmidos. Estos enzimas pueden ser constitutivos o inducibles. Las bacterias Gram-positivas excretan las  $\beta$ -lactamasas en el medio de cultivo; se trata entonces de una protección colectiva. En las bacterias Gram-negativas, las  $\beta$ -lactamasas son retenidas en el espacio periplasmático.

Las  $\beta$ -lactamasas se clasifican en 4 grandes grupos según su secuencia aminoacídica y sus propiedades catalíticas:

- La clase A [30,31] agrupa las serin- $\beta$ -lactamasas de masa molecular próxima a 29. 000 daltons, con una estructura secundaria análoga a la de la DD-peptidasa R61, pero muy variables a nivel de su estructura primaria. Las  $\beta$ -lactamasas de Staphylococcus aureus PC1, Streptomyces albus G, Bacillus licheniformis 749/C, Bacillus cereus 569/H ( $\beta$ -lactamasa I) y RTEM de E.coli (gen plasmídico), son algunos representantes de esta clase.

- La clase B comprende las  $Zn^{++}$ - $\beta$ -lactamasas [10], como la  $\beta$ -lactamasa de Bacillus cereus 569/H ( $\beta$ -lactamasa II) y la  $\beta$ -lactamasa de Pseudomonas maltophilia.

- La clase C [32] engloba una serie de Serin- $\beta$ -lactamasas de masa molecular próxima a 35.000 daltons, generalmente más activas frente a las cefalosporinas que las  $\beta$ -lactamasas de clase A.

Todas las  $\beta$ -lactamasas de clase C conocidas son producidas por bacterias Gram-negativas y los genes



responsables de su síntesis son cromosómicos. Existe una gran homología entre las secuencias aminoacídicas de todas las proteínas representantes de esta clase. Algunos ejemplos : las  $\beta$ -lactamasas de Citrobacter freundii, de Enterobacter cloacae, de Pseudomonas aeruginosa y ampc de E.coli.

- La clase D está constituida por las serin- $\beta$ -lactamasas de masa molecular  $\pm$  25.000 daltons, como la  $\beta$ -lactamasa Oxa 2 de Salmonella typhimurium [33].

2) Existencia de una barrera de permeabilidad: las bacterias Gram-negativas poseen una estructura llamada membrana externa, constituida de lipoproteínas , lipopolisacáridos y proteínas que se sitúa al exterior de la capa de peptidoglucano.

La presencia de esta membrana externa representa un obstáculo para la difusión de los antibióticos hasta sus dianas específicas situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática.

3) Resistencia intrínseca debida a la modificación de los enzimas diana[34]:

- Modificación de un solo PBP esencial (PBP2 de Neisseria gonorrhoeae[35].

- Superproducción de un PBP más resistente al antibiótico (PBP 5 de Streptococcus faecium [36]).

- Aparición de un nuevo PBP de débil afinidad por el antibiótico y capaz de sustituir a los PBPs "normales" [37].

- Alteración profunda del patrón de PBPs de la membrana citoplasmática [38].

#### 1.5. Estudios cinéticos .-

La gran mayoría de las DD-peptidasas y PBPs conocidos son serin-enzimas. Estos enzimas reaccionan con los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y con los sustratos donadores

mediante la formación de un complejo acil-enzima en el que la serina del sitio activo del enzima está implicada. Los complejos acil-enzima formados con la penicilina (EI\*) han sido aislados y analizados. Se ha demostrado que el grupo -CH<sub>2</sub>OH de un residuo de serina es acilado por la penicilina [41] (figura 4).

El enzima forma un complejo del mismo tipo con su sustrato [40 a 47], pero la disociación del complejo acil-enzima formado es mucho mas rápida.

El enzima confunde pues la penicilina y su sustrato habitual. La penicilina se comporta como un "sustrato suicida".

#### 1.5.1. Interacción de las DD-peptidasas con sus sustratos peptídicos [11] .-

La reacción general catalizada durante la interacción de las DD-peptidasas con los sustratos donadores de carbonilos R-D-Ala-D-Ala o R-D-Ala-D-Lac viene dada por la ecuación mostrada en la figura 5A.

La reacción se realiza en tres etapas y comporta la transferencia secuencial de la porción R-D-Ala-CO- a la serina activa del enzima y posteriormente a un aceptor nucleofílico, sea el agua (reacción de carboxipeptidación), sea un aceptor aminado (reacción de transpeptidación).

El estudio de las constantes cinéticas de la interacción de las DD-peptidasas con sus sustratos ha mostrado que la velocidad de desacilación del complejo ED\* es muy elevada.

#### 1.5.2. Interacción de las DD-peptidasas con los antibióticos β-lactámicos .-

El modelo de interacción de las DD-peptidasas con los antibióticos β-lactámicos es análogo al propuesto para los sustratos peptídicos [48], (figura 5 B).

En presencia de un inactivador eficaz, el enzima queda

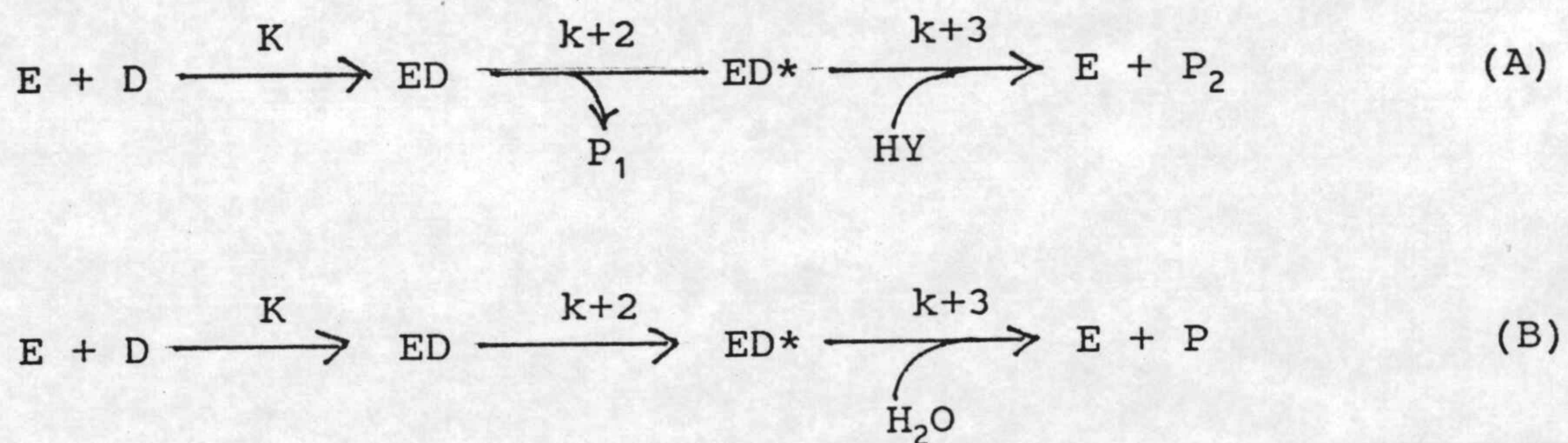


Figura 5.- A : Interacción de las DD-peptidasas con sus subtratos peptídicos.

B : Interacción de las DD-peptidasas y  $\beta$ -lactamasas con los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

E =enzima; D = substrato donador R-D-Ala-D-Ala (A) o antibiótico (B); ED = complejo de Michaelis; ED\* = acil-enzima; K = constante de Michaelis (M);  $k_{+2}$  ,  $k_{+3}$  = ctes. de velocidad de primer orden ( $s^{-1}$ ); P1 = D-Ala; P2 = R-D-Ala-Y; HY =aceptor; P = antibiótico degradado inactivo.

inmovilizado bajo la forma de un complejo EI\* inactivo. Un antibiótico será pues tanto más eficaz cuanto los valores de K y  $k_{+3}$  sean pequeños y el valor de  $k_{+2}$  elevado.

Experimentalmente, los valores determinados para  $k_{+3}$  son muy pequeños ( $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  s<sup>-1</sup>) y bastante elevados para  $k_{+2}$  (0,1 a 200 s<sup>-1</sup>), pero el valor de K es alto, lo que sugiere que la unión inicial entre el enzima y el antibiótico es relativamente poco eficaz.

### 1.5.3. Interacción de las $\beta$ -lactamasas con los antibióticos $\beta$ -lactámicos .

Las  $\beta$ -lactamasas y las DD-peptidasas reconocen las mismas moléculas (los antibióticos  $\beta$ -lactámicos) e interaccionan con los mismos utilizando mecanismos de reacción análogos, pero el acil-enzima formado entre el antibiótico y las  $\beta$ -lactamasas es rápidamente hidrolizado ( $k_{+3}$  elevada), mientras que los complejos equivalentes formados entre las DD-peptidasas y los mismos antibióticos  $\beta$ -lactámicos muestran una estabilidad mucho mayor ( $k_{+3}$  pequeña). La figura 5B muestra la interacción de las DD-peptidasas y  $\beta$ -lactamasas con los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

### 1.6. Comparación entre los serin-PBPs y serin- $\beta$ -lactamasas .-

Datos recientes sugieren que estas proteínas pertenecen a una superfamilia de proteínas que han evolucionado a partir de un ancestro común [49,50].

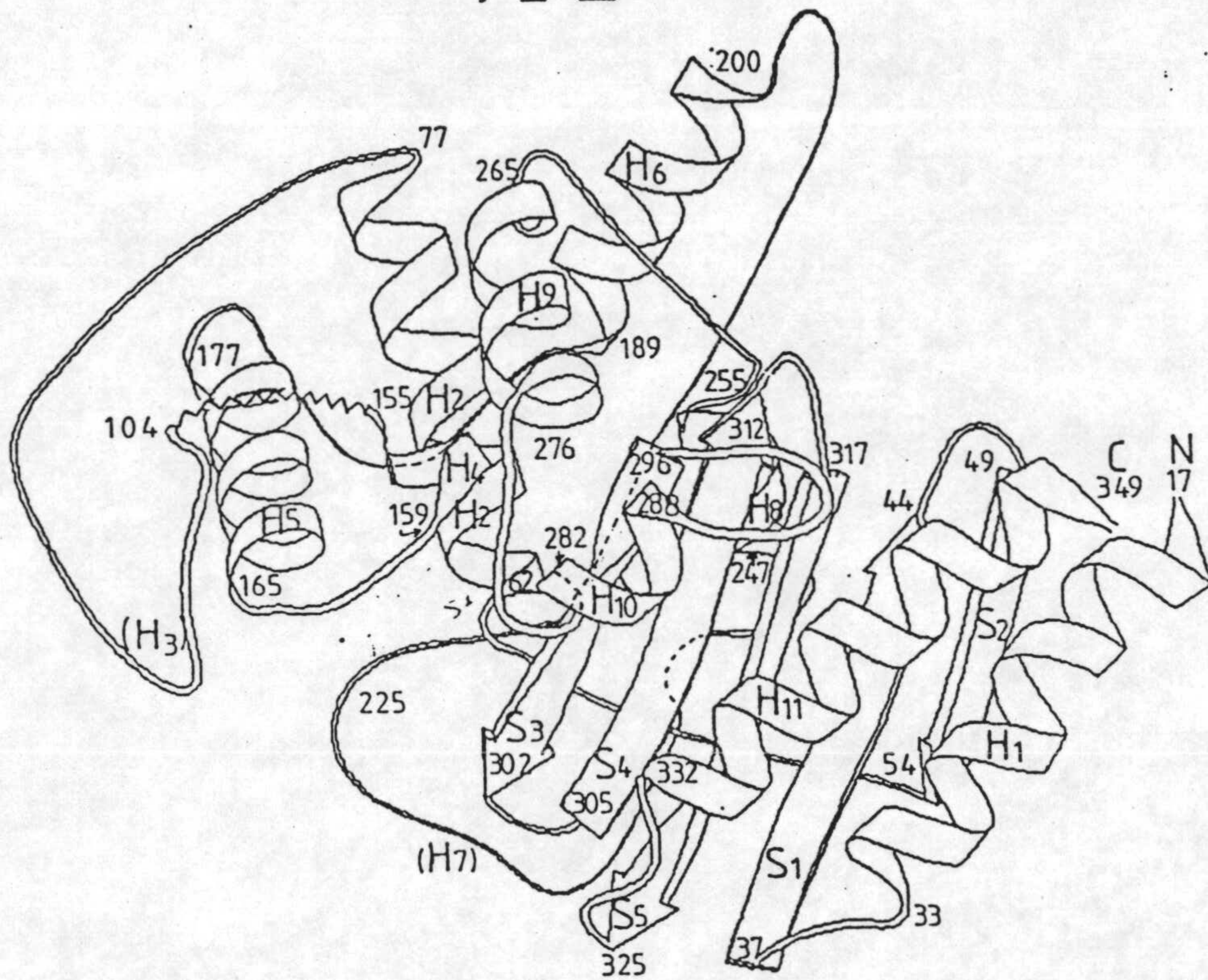
Podemos distinguir 3 grupos dentro de esta familia: los PBPs de elevada masa molecular, los PBPs de pequeña masa molecular y las  $\beta$ -lactamasas. La tabla 1 da las características más importantes de algunos representantes de cada grupo.

La secuencia aminoacídica de muchas de estas proteínas ha sido determinada y algunas de entre ellas han sido

GRUPO	PROTEINAS	PESO MOLECULARE (daltons)	LOCALIZACION CELULAR	ACTIVIDAD ENZYMATICA	FUNCION
I	<p><u>PBPs de pequeña Mr :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PBPs 4,5,6 de <u>E. coli</u></li> <li>- PBP 5 de <u>Bacillus subtilis</u></li> <li>- DD-peptidasas de <u>Spreptomyces R61</u> y <u>Actinomadura R39</u></li> </ul>	<p>25.000</p> <p>à</p> <p>53.000</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Unidos a la membrana citoplasmática por su extremo C-terminal : PBP 5 et 6 (<u>E. coli</u>) Pbp 5 (<u>Bacillus subtilis</u>)</li> <li>- Solubles : DD-peptidasas de <u>S. R61</u> y <u>A. R39</u></li> </ul>	<p>DD-carboxipeptidásica</p> <p>y/o</p> <p>DD-transpeptidásica</p> <p>y/o</p> <p>DD-endopeptidásica</p>	<p>Remodelación de la pared durante el ciclo celular</p>
II	<p><u>PBPs de Mr elevada :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PBPs bifuncionales de <u>E. coli</u> (PBPs 1A, 2B, 2 y 3)</li> <li>- PBP 2 de <u>Neisseria gonorrhoeæ</u></li> </ul>	<p>60.000</p> <p>à</p> <p>90.000</p>	<p>Unidos a la membrana citoplasmática por su extremo N-terminal</p>	<p>PBPs 1a, 1b, 2 et 3 (<u>E. coli</u>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Dominio N-terminal:</u> Actividad transglicosylásica</li> <li>- <u>Dominio C-terminal:</u> Actividad transpeptidásica</li> </ul>	<p>1A, 1B: elongacion</p> <p>2: mantenimiento de la forma</p> <p>3: septación</p>
III	<p><math>\beta</math>-lactamasas</p>	<p>clase A: 25.000</p> <p>clase B: 35.000</p> <p>clase C: 38.000</p>	<p>Solubles:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Medio de cultivo (Gram+)</li> <li>- Espacio periplasmático (Gram-)</li> </ul>	<p>Hydrólisis de los anti-bióticos <math>\beta</math>-lactámicos</p>	<p>Resistencia a los anti-bióticos <math>\beta</math>-lactámicos</p>

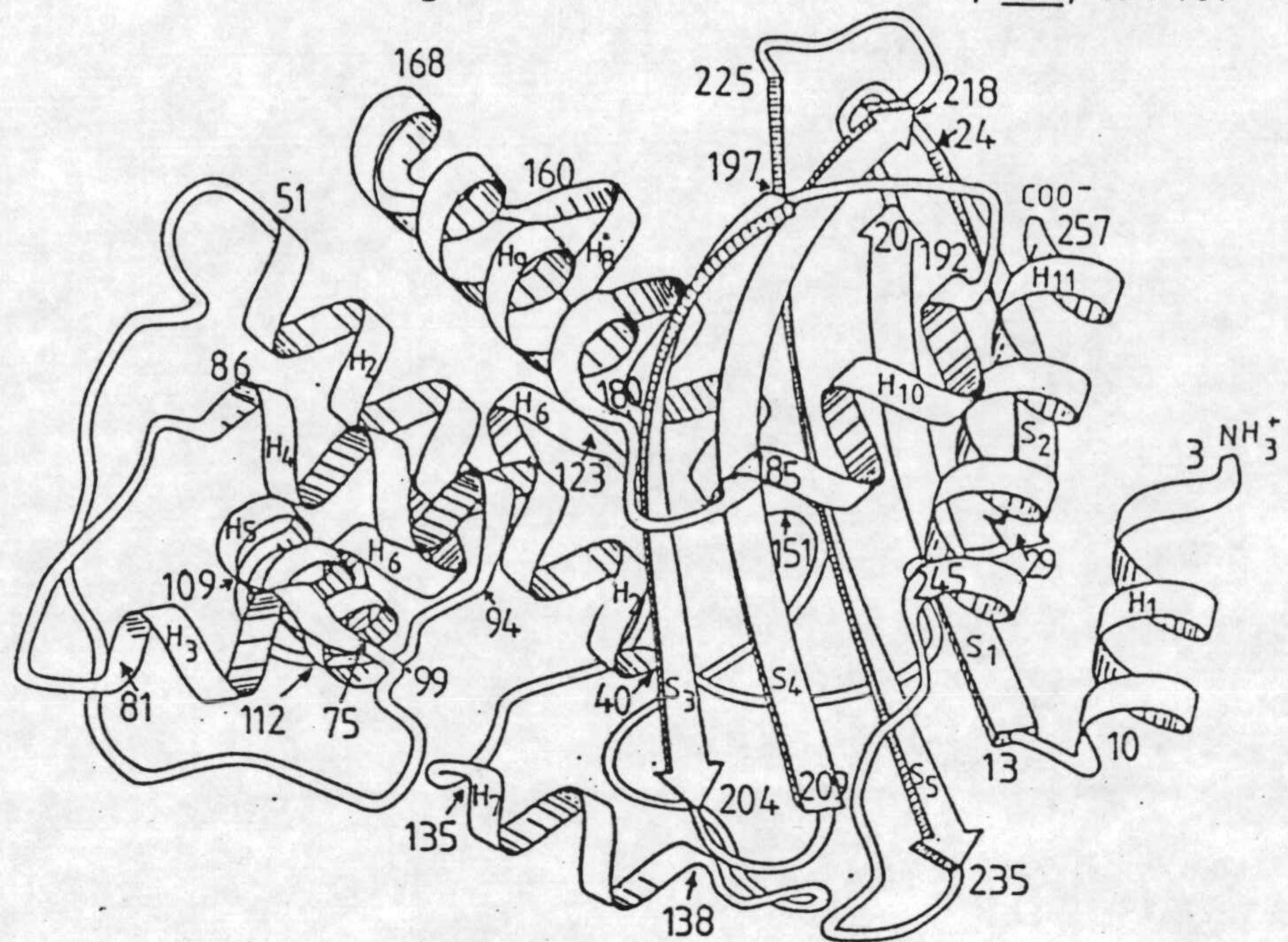
**Tabla 1.-Proteínas bacterianas con serina en el centro activo capaces de unir la penicilina:una superfamilia de enzimas procedentes de una DD-peptidasa ancestral.**

Streptomyces R61 DD-peptidase/penicillin-binding protein  
Kelly et al. J. Mol. Biol. 1989



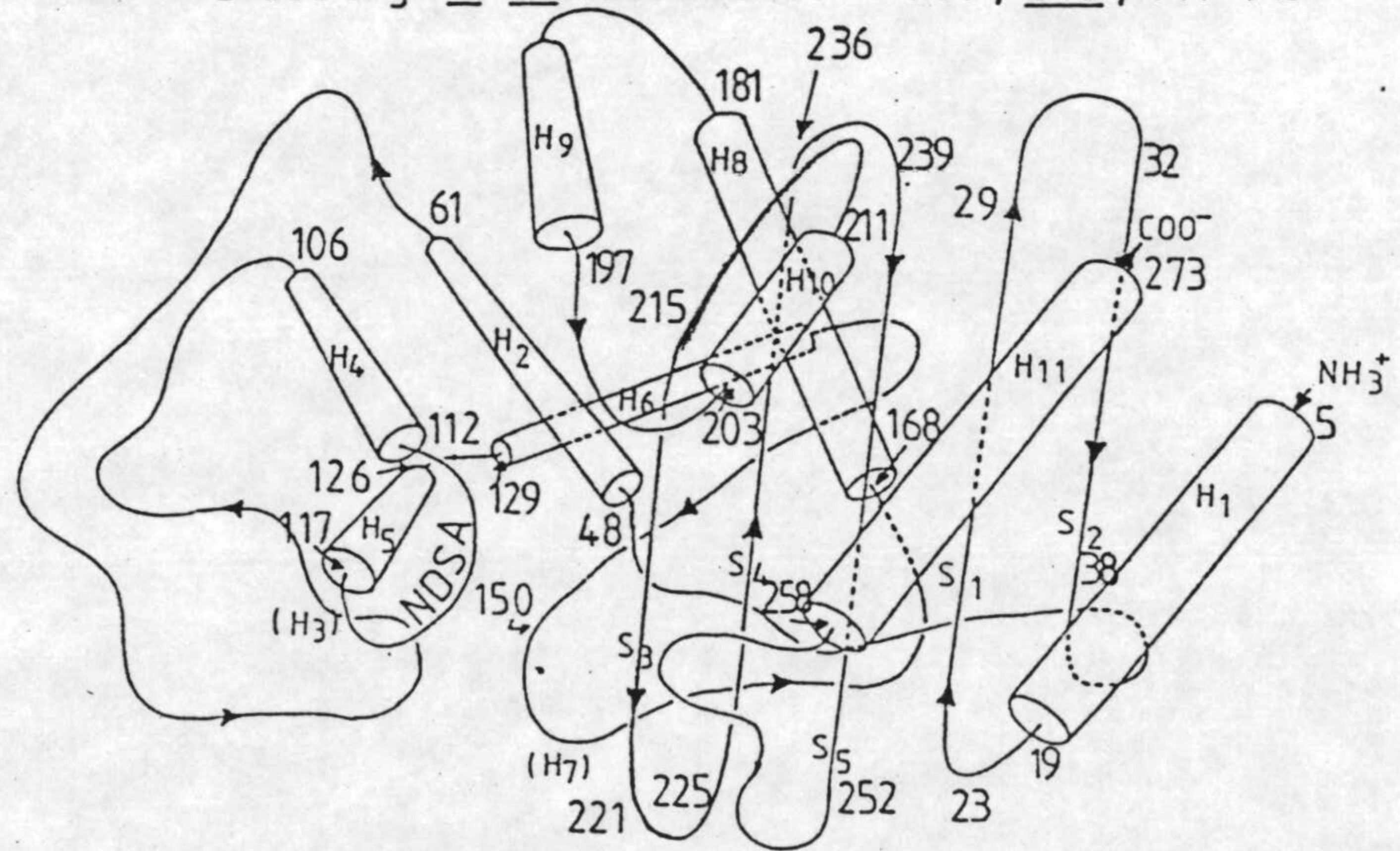
# Staphylococcus aureus $\beta$ -lactamase

Herzberg and Moulton. Science 1987, 236, 694-701



# Streptomyces albus G $\beta$ -lactamase

Dideberg et al. Biochem. J. 1987, 245, 911-913



**Figura 6.- Estructuras cristalinas de la DD-peptidasa de *Streptomyces* R61 y las  $\beta$ -lactamasas de *Staphylococcus aureus* y *Streptomyces albus* G .**

Las hélices  $\alpha$  son representadas en forma de cintas. Las flechas indican las láminas plegadas  $\beta$ .

cristalizadas: la DD-peptidasa de Streptomyces R61[19], y las  $\beta$ -lactamasas de Citrobacter freundii[51], de Bacillus cereus[52], de Bacillus licheniformis[53], de Staphylococcus aureus[54] y de Streptomyces albus G[55].

La masa molecular de las proteínas cristalizadas es variable (entre 273 a 349 aminoácidos) y a primera vista sus estructuras primarias no presentan una gran homología.

Sin embargo, la disposición espacial de sus estructuras secundarias es similar. Cada proteína posee 2 regiones: un dominio "todo  $\alpha$ " , y otro dominio " $\alpha/\beta$ " formado por cinco láminas plegadas  $\beta$  con sus caras externa e interna protegidas por hélices  $\alpha$  .Este dominio  $\alpha/\beta$  está constituido por las regiones N- y C- terminales de la proteína.

La comparación de las estructuras cristalinas de la DD-peptidasa de Streptomyces R61 y de dos  $\beta$  -lactamasas de clase A (las  $\beta$  -lactamasas de Staphylococcus aureus y de Streptomyces albus G) (figura 6) ha mostrado que además de la homología existente a nivel de la disposición espacial de sus estructuras secundarias, estas proteínas poseen 3 zonas conservadas que contienen residuos idénticos u homólogos y que ocupan siempre la misma posición crítica en las tres estructuras tridimensionales. La tetra Ser\*-Xaa-Xaa-Lys (donde Ser\* es la serina activa) que ocupa la posición 60-70 en la estructura primaria, está localizada en el extremo N- terminal de una de las hélices de la región "todo  $\alpha$ " y la lisina ,que también forma parte del sitio activo, se encuentra siempre dos residuos después de la serina activa.

Por otra parte, la triada His- Thr-Gly (HTG) (PBP R61) o Lys-His-Gly (KTG) (en las dos  $\beta$  -lactamasas), que en la estructura primaria se encuentra aproximadamente 60 a 70 residuos antes del extremo C-terminal de la proteína, se localiza siempre en la más interna de las 5 láminas plegadas  $\beta$  y forma el otro lado de la cavidad enzimática. Finalmente, en una posición central en la proteína (pero más bien desplazado hacia el extremo C- terminal) existe en las



ENZIMAS	REGIONES CONSERVADAS							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
a	G <sub>42</sub> D <sub>45</sub>	R <sub>57</sub> F R V G S* V T K	Y <sub>90</sub>	T <sub>101</sub> V R	D <sub>225</sub>	W <sub>271</sub>	G <sub>297</sub> H T G	STREPTOMYCES R 61 DD-PEPTIDASA
b	G <sub>44</sub> D <sub>47</sub>	L <sub>59</sub> F E L G S* V S K	Y <sub>92</sub>	T <sub>97</sub> A K G	D <sub>217</sub>	W <sub>260</sub>	H <sub>314</sub> K T G	β-LACTAMASAS
c	G <sub>45</sub> D <sub>50</sub>	R <sub>65</sub> F A F A S* T S K P Y M I M Y	Y <sub>105</sub>	T <sub>109</sub> E K	E <sub>166</sub>	W <sub>210</sub> L	D <sub>233</sub> K S G T	
d	G <sub>24</sub> D <sub>29</sub>	L <sub>43</sub> F P M C S* V F K	Y <sub>74</sub> (?)	T <sub>90</sub> G K	E <sub>152</sub>	W <sub>194</sub>	D <sub>217</sub> K T G	
e	G <sub>23</sub> D <sub>28</sub>	R <sub>42</sub> F A Y G S* T F K	Y <sub>83</sub> (?)	T <sub>95</sub> G K	E <sub>260</sub>	W <sub>200</sub>	D <sub>223</sub> K S G	
f	G <sub>42</sub> D <sub>48</sub>	R <sub>67</sub> Y S P A S* T F K	H <sub>107</sub>	D <sub>112</sub> L R	D <sub>157</sub>	L <sub>196</sub>	A <sub>209</sub> K T G	
g	G <sub>20</sub> D <sub>29</sub>	R <sub>31</sub> L P I A S* M T K	Y <sub>61068</sub>	L <sub>81</sub> R K	D <sub>178</sub>	W <sub>207</sub>	L <sub>226</sub> K T G	PBPs de bajo MR
h	G <sub>28</sub> D <sub>37</sub>	R <sub>39</sub> R D P A S* L T K	Q <sub>96</sub>	I <sub>103</sub> R G	D <sub>175</sub>	W <sub>203</sub>	I <sub>212</sub> K T G H	
i	D <sub>444</sub> D <sub>447</sub>	L <sub>460</sub> R Q V G S* N I K	Y <sub>511</sub>	Q <sub>523</sub> S K	D <sub>588</sub>	W <sub>697</sub> 702	G <sub>715</sub> K T G	PBPs de elevado Mr *
j	G <sub>489</sub> E <sub>492</sub>	R <sub>505</sub> R S I G S* L A K	Y <sub>557</sub>	L <sub>569</sub> T R	D <sub>647</sub>	W <sub>672</sub>	G <sub>697</sub> K T G	
k	G <sub>300</sub> D <sub>305</sub>	V <sub>325</sub> Y P P A S* T V K	Y <sub>367</sub>	M <sub>375</sub> G R	D <sub>490</sub>	W <sub>512</sub>	A <sub>543</sub> K S G	
l	G <sub>288</sub> E <sub>292</sub>	V <sub>302</sub> F E P G S* I V K	Y <sub>334</sub>	V <sub>344</sub> A R	E <sub>456</sub>	L <sub>476</sub>	I <sub>493</sub> K T G T	

Figura 7.- Regiones conservadas en la estructura primaria de todos los enzimas capaces de unir la penicilina.

a) DD-peptidasa Streptomyces R61; b) β-lactamasas de Enterobacterias; c) β-lactamasas de B.cereus, B.licheniformis, pBR322 y Staphylococcus aureus; d) β-lactamasa de Streptomyces albus G; e) β-lactamasa de Streptomyces cacaoi; f) β-lactamasa Oxa-2 de Salmonella typhimurium; g) PBP 5 de B.subtilis; h) PBP 5 de E.coli; i) PBP 1A de E.coli; j) PBP 1B de E.coli; k) PBP 2 de E.coli; l) PBP 3 de E.coli.

Las secuencias comparadas en los apartados i a l se refieren exclusivamente a los dominios transpeptidásicos de los PBPs de elevada masa molecular de E.coli.

tres proteínas un aminoácido cargado negativamente (Asp en el caso del PBP R61 o Glu en el de las dos  $\beta$ -lactamasas). Este residuo se sitúa en un bucle que conecta dos hélices  $\alpha$  a la entrada del sitio activo. Estas tres zonas conservadas aportan en el sitio activo del enzima, junto con la serina activa, las cadenas laterales cargadas positiva y negativamente imprescindibles para la catálisis y/o la unión del sustrato donador.

El alineamiento de las estructuras primarias (después de realizar las inserciones y deleciones necesarias) de 15 proteínas capaces de unir la penicilina (proteínas y dominios PBPs y  $\beta$ -lactamasas) ha puesto en evidencia la existencia de 7 regiones conservadas (zonas que contienen aminoácidos idénticos u homólogos) que ocupan una posición similar a largo de la secuencia (figura 7 [66]); para más detalles, véase [50]). Tres de estas regiones conservadas son las anteriormente citadas y que ocupan una posición crítica en la estructuras terciarias de la DD-peptidasa de S.R61 y las  $\beta$ -lactamasas de S.albus G y S.aureus. La sustitución de determinados aminoácidos pertenecientes a 5 de estas regiones conservadas modifica o suprime la actividad de ciertas  $\beta$ -lactamasas [56 a 59], del PBP 3 [60,61] y del PBP 5 [62,63] de E.coli.

Todos estos resultados refuerzan la hipótesis emitida por varios autores [8,64 a 67] de que todas las  $\beta$ -lactamasas, DD-peptidasas y dominios transpeptidásicos de los PBPs bifuncionales provienen de un mismo gen ancestral y han seguido una evolución divergente.

En el transcurso de la evolución, la homología a nivel de la estructura primaria ha ido disminuyendo progresivamente y el sitio activo ha sido modificado para originar varias proteínas con funciones y especificidades diferentes.

SECCION II LA DD-TRANSPEPTIDASA DE MEMBRANA DE  
Streptomyces K15: RESUMEN DE LOS CONOCIMIENTOS  
ACTUALES .-

Nguyen-Distèche et.al(1982) [68], demostraron que Streptomyces K15 posee al menos 9 proteínas capaces de unir la penicilina (PBPs) que muestran diferentes grados de sensibilidad a dicho antibiótico.

- Dos PBPs de masas moleculares de 54.000 y 40.000 daltons son excretados al medio de cultivo.

- Dos PBPs (Mr 40.000 y 38.000) son liberados del micelio por acción de la lisozima.

Estas cuatro proteínas son DD-carboxipeptidasas transpeptidasas [16].

- Cinco PBPs ( Mr 60.000, 54.000, 50.000, 39.000 y 27.000 ) están unidos a la membrana citoplasmática.

La proteína de membrana de 27.000 daltons funciona como transpeptidasa[69] y constituye la diana letal de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos[70]. Esta proteína ha sido solubilizada por la acción del detergente catiónico cetavlon o bromuro de N-cetil-NNN-trimetilamonio (BCTA) y purificada al 95% mediante dos filtraciones sucesivas sobre Sephadex G-100 seguidas de una cromatografía de afinidad sobre una columna de Sepharosa-ampicilina[68].

2.1. Reacción de la DD-peptidasa K15 con los  
sustratos peptídicos .-

Este enzima se comporta como una DD-transpeptidasa estricta. Cuando el agua es el único aceptor nucleofílico presente, el enzima es capaz de hidrolizar los donadores de carbonilos de tipo amida (  $Ac_2-L-Lys-D-Ala-D-Ala$  ) o éster (  $Ac_2-L-Lys-D-Ala-D-Lac$  ) con acumulación detectable de acil-enzima y liberación de D-Ala o D-Lactato, respectiva-

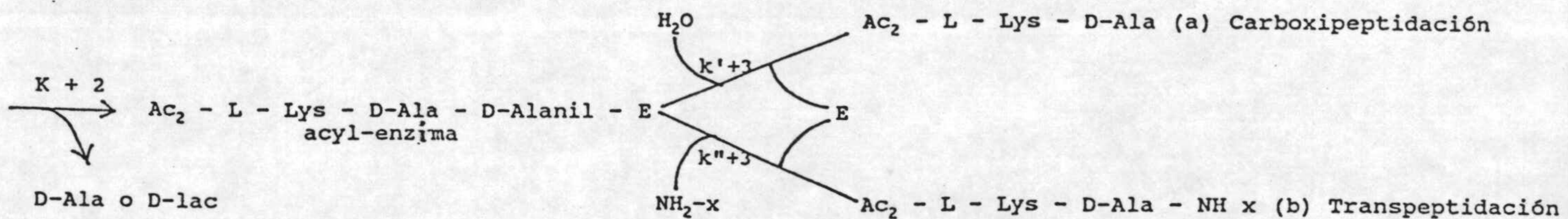
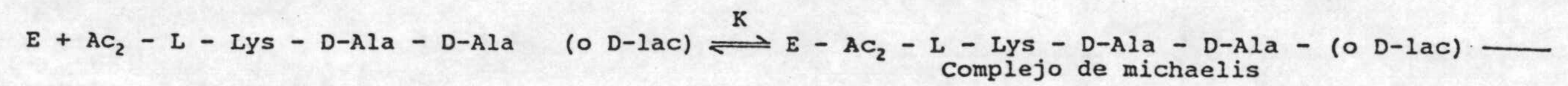


Figura 8.- Hidrólisis y transpeptidación simultánea de los donadores de carbonilos de tipo amida (éster).

mente[69]. Sin embargo, la reacción es diferente según el tipo de sustrato donador utilizado: el sustrato de tipo éster es completamente hidrolizado, mientras que la hidrólisis del donador  $\text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala}$  es despreciable puesto que la D-Ala liberada es utilizada en una reacción de transpeptidación interna que mantiene prácticamente constante la concentración de sustrato donador.

Las constantes cinéticas de la interacción de la DD-peptidasa K15 con los dos tipos de sustratos han sido determinadas por medida de la concentración de acil-enzima o de la actividad (hidrólisis) [69]. En el caso del depsi péptido, la velocidad de desacilación es del mismo orden que la velocidad de acilación ( $k_{+3}/k_{+2} = 1$ ), mientras que en el caso del tripéptido  $\text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala}$  la velocidad de desacilación es superior a la velocidad de acilación ( $k_{+3}/k_{+2} = 10$ ).

En presencia de un aceptor aminado  $\text{R-NH}_2$  (Gly-Gly o Gly-Ala) semejante al aceptor natural, los dos sustratos donadores intervienen simultáneamente en una reacción de hidrólisis y de transpeptidación (figura 8) y el acil-enzima no se acumula.

La presencia de un aminoceptor altera el valor de las constantes  $K$  y  $k_{+2}$ , lo que sugiere que éste no actúa simplemente como un nucleófilo alternativo, sino que su presencia modifica tanto la unión inicial entre el enzima y el donador de carbonilos como la formación del acil-enzima. Estos datos parecen indicar que la transpeptidación no utiliza el mismo mecanismo reaccional que la hidrólisis [69]. Además, en ciertas condiciones (concentración de aceptor Gly-Gly o Gly-Ala lo suficientemente elevada como para saturar el enzima y mantener una relación molecular  $[\text{Gly-Gly}]_{\text{libre}}/[\text{D-Ala}_{\text{liberada}}] \geq 5/1$ ), la presencia de un aminoceptor suprime completamente la actividad nucleofílica del agua o de la D-Ala liberada (sustrato de tipo amida) y los dos sustratos son completamente transformados en el producto transpeptidado. En este caso, la DD-peptidasa

ANTIBIOTICOS	ID <sub>50</sub> (M)
Monobactam SQ 3608/AB	actividad no modificada a $5 \cdot 10^{-3} M$
Azthreonam	$> 5 \cdot 10^{-3}$
Céfalexina	$> 10^{-3}$
Céfaloglicina	$6,0 \cdot 10^{-4}$
Monobactam SQ 26.324	$4,5 \cdot 10^{-4}$
Cefalotina	$4,3 \cdot 10^{-4}$
Monobactam SQ 81.387	$2,7 \cdot 10^{-4}$
Monobactam SQ 81.427	$2,6 \cdot 10^{-4}$
Oxacilina	$1,6 \cdot 10^{-4}$
Ticarcilina	$8,0 \cdot 10^{-5}$
Carbenicilina	$3,5 \cdot 10^{-5}$
Monobactam SQ 26.180	$2,7 \cdot 10^{-5}$
Temocilina	$2,0 \cdot 10^{-5}$
Ampicilina	$1,8 \cdot 10^{-5}$
Benzilpenicilina	$1,1 \cdot 10^{-5}$
Piperacilina	$9,0 \cdot 10^{-6}$
Cefoxitina	$2,7 \cdot 10^{-6}$
Monobactam SQ 26.630	$1,5 \cdot 10^{-6}$
Sulfazecina	$1,4 \cdot 10^{-6}$
Moxalactam	$1,3 \cdot 10^{-6}$
Monobactam SQ 26.559	$2,5 \cdot 10^{-7}$

**Tabla 2.-Sensibilidad de la DD-peptidasa K15 a diferentes antibióticos  $\beta$ -lactámicos .**

Temocilina, cefoxitina, monobactame SQ 26.630, sulfazecina, moxalactame y monobactame SQ 26.559 poseen un grupo metoxi en posición 3,6 o 7  $\alpha$ .

K15 funciona como una DD-transpeptidasa estricta.

## 2.2 Reacción de la DD-peptidasa K15 con los antibióticos $\beta$ -lactámicos .-

La interacción de la Dd-peptidasa K15 con varios antibióticos  $\beta$ -lactámicos ha sido estudiada [72].

La DD-peptidasa K15 une la bencilpenicilina y la cefoxitina con una relación molecular 1:1.

La tabla 2 muestra la sensibilidad de la DD-peptidasa K15 a los diferentes antibióticos utilizados, expresada como  $ID_{50}$  (concentración de antibiótico necesaria para inhibir el 50% de la actividad transpeptidásica). La comparación de la acción inhibidora de los distintos antibióticos sobre la actividad transpeptidásica de K15 indica que este enzima es más sensible a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que poseen un grupo metoxi ( $-OCH_3$ ) en posición 7- $\alpha$  (cefoxitina o moxalactame) o 3- $\alpha$  (sulfazecina). Esta propiedad distingue la DD-peptidasa K15 de las DD-peptidasas extracelulares R61 y R39, para las cuales la bencilpenicilina es uno de los mejores inactivadores [71].

La DD-peptidasa K15 es un enzima moderadamente sensible a la penicilina ( $k_{+2}/K = 150 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  e  $ID_{50} = 1,1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) y la vida media del complejo enzima-penicilina es de 115 minutos.

La degradación del complejo formado entre la DD-peptidasa K15 y la [ $^{14}\text{C}$ ] bencilpenicilina se acompaña de la liberación de dos productos radioactivos: ácido benzilpenicilinoico (80%) y fenil-acetilglicina (20%).

## 2.3. Secuencia N-terminal y composición en aminoácidos

La DD-peptidasa K15 es un serin-enzima. Un pequeño péptido que contiene la serina activa ha sido aislado y secuenciado [73].

<i>Streptomyces</i> K15 26000- <i>M</i> , PBP	1	11	21	31	41	51	VTKPTIAAVG GYAMNNGTGT TLYTKAADTR RSTGSTTKIM (Q)AKVXLAQSN LN(L)SAK
High- <i>M</i> , PBPs							
<i>Escherichia coli</i> PBP1A [9]	431						SINPQNGAVM ALVGGFDNQ S <sup>o</sup> KFN <sup>o</sup> RA <sup>o</sup> TQAL R <sup>o</sup> QVC <sup>o</sup> SNIK <sup>o</sup> PF LYTAAMDKGL TLA <sup>o</sup> SML
<i>Escherichia coli</i> PBP1B [9]	476						V <sup>o</sup> VDRFSGE <sup>o</sup> V <sup>o</sup> RAMVGGSEPF AGY <sup>o</sup> NR <sup>o</sup> AMQAR <sup>o</sup> RS <sup>o</sup> IG <sup>o</sup> SLAK <sup>o</sup> PA TYLTA <sup>o</sup> LS <sup>o</sup> QPK IYRLNT
<i>Escherichia coli</i> PBP2 [10]	295						L <sup>o</sup> FVDG <sup>o</sup> ISSKD YS <sup>o</sup> ALL <sup>o</sup> NDPNT <sup>o</sup> PLVNR <sup>o</sup> ATQGV YPPA <sup>o</sup> STVK <sup>o</sup> PY VAVSA <sup>o</sup> LSAGV ITRNTT
<i>Escherichia coli</i> PBP3 [11]	273						L <sup>o</sup> AMANS <sup>o</sup> PSYN PNNLSGTPKE AMRN <sup>o</sup> RTITDV FEPG <sup>o</sup> STVK <sup>o</sup> PM <sup>o</sup> VVMTAL <sup>o</sup> QRCV VRENSV
<i>Staphylococcus aureus</i> PBP2 [12]	371						Y <sup>o</sup> PFMYGMSNE EYNK <sup>o</sup> LTEDKK EPLL <sup>o</sup> NKFQIT TSPG <sup>o</sup> STQK <sup>o</sup> IL TAMIG <sup>o</sup> LNNKT LDDKTS
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PBP2 [13]	276						LALANTPA <sup>o</sup> YD PNR <sup>o</sup> PGRADSE QRRNR <sup>o</sup> AVTDM IEPG <sup>o</sup> SAIK <sup>o</sup> PF V <sup>o</sup> IAKALDAGK TDLDNR
Low- <i>M</i> , PBPs							
<i>Escherichia coli</i> PBP5 [14]	10						PGVPQ <sup>o</sup> IDA <sup>o</sup> ES YILIDYN <sup>o</sup> S <sup>o</sup> GK V <sup>o</sup> LAEQN <sup>o</sup> ADVR <sup>o</sup> RDPA <sup>o</sup> SLTK <sup>o</sup> MM <sup>o</sup> TSYVIGQAMK AGKFKE
<i>Bacillus subtilis</i> PBP5 [15]	2						SDPIDINASA AIMIEASS <sup>o</sup> GK ILYS <sup>o</sup> KN <sup>o</sup> ADKR <sup>o</sup> LPIA <sup>o</sup> SMTK <sup>o</sup> MM <sup>o</sup> TEYLLLEAID QGKVKW
<i>Streptomyces</i> R61 DD-peptidase [16]	28						V <sup>o</sup> RVD <sup>o</sup> DNGTI <sup>o</sup> H QLSEGVADRA TGRAITTTDR <sup>o</sup> FRVGS <sup>o</sup> VTK <sup>o</sup> SE SAV <sup>o</sup> VL <sup>o</sup> LQLV <sup>o</sup> LDLD <sup>o</sup> AS EGK
$\beta$ -Lactamases							
<i>Escherichia coli</i> RTEM [17]	33						AEDQLGAR <sup>o</sup> V <sup>o</sup> C <sup>o</sup> YIELDLNS <sup>o</sup> GK ILES <sup>o</sup> FRPEER <sup>o</sup> FPMMS <sup>o</sup> TFK <sup>o</sup> VL LCGAVLSRDA GQEQLG
<i>Salmonella typhimurium</i> OXA-2 [18]	38						FQAKGTIV <sup>o</sup> V <sup>o</sup> A DERQADRAML VFDVRSKKR <sup>o</sup> YSPA <sup>o</sup> STFK <sup>o</sup> IP H <sup>o</sup> TLFA <sup>o</sup> LDAGA VRDEFQ
<i>Escherichia coli</i> AmpC [19]	55						VAVIYQ <sup>o</sup> GKPY YFTWGYADIA KKQPVTQQ <sup>o</sup> TL FELG <sup>o</sup> SV <sup>o</sup> SK <sup>o</sup> TF TGV <sup>o</sup> LGGDAIA RGEIKL

**Figura 9.- Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la región N-terminal de la DD-peptidasa de *Streptomyces* K15 y otras proteínas capaces de unir la penicilina (PBPs, dominios y  $\beta$ -lactamasas).**

\* - Identidad; ° - Similaridad; los paréntesis indican residuos ambiguos; La serina activa ocupa la posición 35. VD LD :inserción. Léase VDEGKLD.

EGK



Además, la secuencia N-terminal de la proteína (figura 9) ha sido determinada por vía química. Esta secuencia contiene la zona conservada Ser\*-Xaa-Xaa-Lys y la serina activa (Ser\*) ocupa la posición 35. La ausencia de un péptido señal o de una secuencia hidrófoba sugiere que la proteína no está unida a la membrana citoplasmática por su extremo N-terminal, como los PBPs bifuncionales de E.coli [74,75,76].

La región N-terminal de la DD-peptidasa K15 ha sido comparada a las regiones correspondientes de otras proteínas y dominios capaces de unir la penicilina (figura 9). La región conservada II(Ser\*-Xaa-Xaa-Lys), que contiene la serina activa, ha sido alineada para todas las proteínas comparadas.

Se observa una homología especialmente elevada entre la región que comprende los 20 aminoácidos situados alrededor de la serina activa (desde la Thr<sub>21</sub> hasta la Met<sub>40</sub>) de la DD-peptidasa K15 y las regiones correspondientes del dominio transpeptidásico del PBP 1B de E.coli (40% de identidad), los PBPs 5 de E.coli (45% de identidad) y de Bacillus subtilis (50% de identidad) (PBPs de pequeña masa molecular) y la  $\beta$ -lactamasa RTEM de E.coli (25% de identidad, 40% de homología).

La composición en aminoácidos de la proteína (tabla 3) (Leyh-Bouille, M. y Van Beeumen, J., resultados no publicados) muestra la existencia de dos residuos de cisteína en la molécula. Uno de estos residuos debe intervenir en el mecanismo catalítico de la DD-transpeptidasa K15. En efecto, el enzima une el para-cloromercuribenzoato (pCMB) u otros reactivos de grupos sulfhidrilos -SH con una relación molecular 1:1 y el bloqueo específico de un residuo de cisteína por el pCMB se acompaña de una disminución importante de la actividad enzimática, pero la inhibición no es jamás completa, incluso en presencia de concentraciones elevadas de pCMB [76].

El bloqueo de la DD-peptidasa por el pCMB disminuye la eficacia de la unión inicial del donador Ac<sub>2</sub>-L-Lys-D-Ala-

AMINOACIDO	N° DE RESIDUOS / MOLECULA
Lys	20
His	4
Arg	10
Cys	2
Asp + Asn	28
Met	8
Thr	34
Ser	21
Glu + Gln	8
Pro	7
Gly	28
Ala	34
Val	17
Ile	12
Leu	19
Pyr	10
Phe	6
Trp	-
Mr	28 197

Tabla 3.-Composición en aminoácidos de la DD-peptidasa K1 determinada por vía química.

D-Ala al enzima (K), la velocidad de acilación ( $k_{+2}$ ) y la velocidad de desacilación ( $k_{+3}$ ) del enzima, pero en condiciones saturantes la proporción de enzima total que aparece bajo la forma de acil-enzima en el estado estacionario permanece constante ( $k_{+2}/k_{+3}$  no modificada).

El enzima unido al pCMB es aún capaz de unir la bencilpenicilina lo que quiere decir que los sitios de fijación del pCMB y la bencilpenicilina son diferentes. De todos modos, en presencia de pCMB, la velocidad de formación de acil-enzima ( $k_{+2}$ ) disminuye y la estabilidad del acil-enzima formado aumenta.

### SECCION III OBJETO DEL TRABAJO .-

En el cuadro general de las investigaciones concernientes al estudio del modo de acción de los antibióticos  $\beta$  - lactámicos, nuestro trabajo ha consistido en el estudio de la DD-transpeptidasa de membrana de Streptomyces K15.

Este enzima presenta un gran interés puesto que:

- Es un enzima de membrana, diana letal de los antibióticos  $\beta$  -lactámicos.
- Contrariamente a los PBPs esenciales de E.coli que son bifuncionales y poseen una masa molecular elevada, la DD-peptidasa K15 es una proteína pequeña ( $M_r = 27.000$ ) y contiene un solo sitio activo .
- Es una serin-proteína capaz de comportarse como una transpeptidasa estricta in vitro en presencia de sustratos simples y bien definidos mientras que la actividad transpeptidásica de los PBPs esenciales de E.coli solo puede ser puesta en evidencia en presencia de sistemas muy complejos.

Por estas razones, la DD-transpeptidasa K15 constituye un modelo ideal para estudiar las transpeptidasas estrictas e intentar comprender lo que diferencia estas enzimas de las carboxipeptidasas como la DD-peptidasa extracelular de Streptomyces R61, enzima principalmente hidrolítico. Su estudio cristalográfico y la mutagénesis dirigida podrán

permitir el estudio de los grupos reactivos de los aminoácidos específicamente implicados en la reacción de transpeptidación, ya que hasta el momento, sólo son conocidas las estructuras tridimensionales de una DD-carboxipeptidasa (DD-peptidasa de Streptomyces R61) [19] que es una proteína no esencial para el desarrollo de la bacteria y de cinco  $\beta$ -lactamasas ( $\beta$ -lactamasas de Citrobacter freundii [51], de Bacillus cereus [52], de Bacillus licheniformis [53], de Staphylococcus aureus [54] y de Streptomyces albus G [55]), enzimas defensivos, necesarios a la supervivencia de las bacterias en presencia de antibióticos, pero que no constituyen las dianas letales de los antibióticos.

Actualmente, este programa es difícilmente realizable por 2 razones:

- La DD-peptidasa K15 está presente en la membrana citoplasmática en cantidades mínimas: a partir de 100 litros de cultivo el rendimiento en enzima puro es de 1,5 mg.
- El detergente catiónico (BCTA) presente en la preparación final del enzima purificado, indispensable para su extracción y su mantenimiento bajo una forma soluble y activa [69], imposibilita la cristalización.

La clonación del gen codificante para la DD-transpeptidasa K15 es por tanto imprescindible a fin de deducir su estructura primaria a partir de la secuencia nucleotídica del gen y superproducir el enzima: este ha sido, pues, el objetivo principal de nuestro trabajo.

Para alcanzar este objetivo varias etapas debían ser superadas.

### 3.1. Clonación del gen codificante para la DD-transpeptidasa de *Streptomyces* K15 .-

El gen será clonado en E.coli, mediante la utilización del plásmido multicopias pBR322 y los clones serán detectados por hibridación del ADN con una sonda radioactiva [<sup>32</sup> P]. Esta técnica fue escogida por dos razones:

-La clonación del gen en E.coli, cuya velocidad de crecimiento es muy superior a la de Streptomyces, permite obtener los resultados mucho mas rápidamente.

-La utilización de una sonda radioactiva para detectar los clones positivos permite la identificación de clones en los cuales el gen no se expresaría (debido a la ausencia de un promotor, por ejemplo).

A partir de la secuencia N-terminal de la proteína, determinada por vía química [75] y mediante la utilización de la nueva técnica de amplificación de ADN (PCR : polymerisation chain reaction), un oligonucleótido será sintetizado in vitro y una sonda no degenerada será seleccionada a partir de la secuencia obtenida.

### 3.2. Secuenciado del gen clonado .-

La determinación de la secuencia nucleotídica del gen clonado nos permitirá deducir la estructura primaria de la proteína. Esta estructura primaria podrá ser comparada a las secuencias aminoacídicas conocidas de otras DD-peptidasas y  $\beta$ -lactamasas.

El conocimiento de la estructura primaria de la proteína nos dará indicaciones sobre el modo de unión de la proteína a la membrana citoplasmática, de manera que el gen podrá ser modificado a fin de obtener una forma hidrosoluble y catalíticamente activa de la proteína.

### 3.3 Superproducción del enzima clonado en Streptomyces.-

Dado que la mayor parte de los promotores de Streptomyces no son reconocidos por la ARN polimerasa de E.coli [77] el gen de la Dd-transpeptidasa K15 clonado en E.coli deberá ser reintroducido en una cepa hospedadora apropiada de Streptomyces a fin de amplificar la producción de la proteína.

La clonación en Streptomyces necesita 2 experiencias

preliminares:

Puesta a punto de una técnica de inmunodetección de clones productores de DD-transpeptidasa K15 :

Los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15 han sido preparados en conejo. El complejo antígeno-anticuerpo podrá ser detectado gracias al sistema "Immun Blot" de Biorad, utilizando la fosfatasa alcalina acoplada a los anticuerpos de cabra dirigidos contra los anticuerpos de conejo. Esta técnica deberá ser adaptada para identificar las colonias productoras de DD-peptidasa membranosa de S.K15 sobre placa de Petri.

Selección de la estirpe hospedadora :

Diferentes estirpes bacterianas deberán ser analizadas con objeto de seleccionar aquella que presente la mínima reacción cruzada frente a los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15.

Además, los protoplastos de la estirpe seleccionada deberán ser eficazmente transformados por los plásmidos de Streptomyces .

Elección del vector de clonación :

Los plásmidos multicopias pIJ 702, pIJ 385 o pIJ 699 podrán ser utilizados . El plásmido pIJ 702 ha sido utilizado con éxito para la superproducción de la DD-carboxipeptidasa extracelular de Streptomyces R61 y de las  $\beta$ -lactamasas de Streptomyces cacaoi y Streptomyces albus G.

### 3.4. Obtención de una forma hidrosoluble y catalíticamente activa de la DD-transpeptidasa K15

El interés primordial de este estudio consiste en la determinación de la estructura tridimensional del enzima y en particular de su cavidad enzimática. La proteína hiperproducida deberá pues ser cristalizada.

La presencia de detergente(BCTA) en la preparación final del enzima imposibilita la cristalización. Por este

motivo, nosotros pensamos modificar el gen de la DD-transpeptidasa K15, a fin de producir una DD-peptidasa hidrosoluble y catalíticamente activa basándonos en las indicaciones obtenidas por el conocimiento de la estructura primaria de la proteína, deducida de la secuencia nucleotídica del gen.

## **Capítulo II : MATERIAL Y METODOS**



## CAPITULO II MATERIAL Y METODOS .-

### 1. RAZAS BACTERIANAS

#### 1.1 Streptomyces .-

Streptomyces K15 :pertenece a la colección local del Servicio de Microbiología de la Universidad de Lieja; aislada de suelo africano por Welsch.

Es crecida cada 6 meses en tubos de agar inclinado A-Gly y conservada a -70°C en una mezcla al 50% de medio TSB-glicerol.

Los cultivos líquidos de esta estirpe se realizan en medio Peptona Merck 7213 o TSB (Oxoid).

Streptomyces lividans TK 24 :es una de las razas hospedadoras utilizadas habitualmente en las experiencias de clonación de Streptomyces. Procede de la colección del John Innes Instituto (Norwich, U.K.) y ha sido obtenida a partir de Streptomyces lividans 66 mediante curación de sus plásmidos [78].

Streptomyces pristinaespiralis ATCC 25486 (NRRL 2985) es conservada a 4°C en medio sólido YVD o a -70°C en una mezcla al 50% de medio TSB-glicerol o bien de YVD-glicerol.

Streptomyces griseofuscus ATCC 29916: conservada a 4°C en tubos de agar inclinado A-Gly.

Streptomyces fradiae ATCC 10745: conservada a 4°C en tubos de agar inclinado YVD.

Streptomyces fradiae PM 76:mutante de S.fradiae deficiente en el sistema de restricción [79]. Se han empleado idénticas condiciones culturales que con la estirpe silvestre.

Streptomyces vinaceus NCIB 8852:conservada a 4°C en tubos de agar inclinado A-Gly.

Streptomyces albus G R2:mutante deficiente en el sistema de restricción y modificación [80].Es conservado a 4°C en tubos de agar inclinado GCY.

Streptomyces ambofaciens ATCC 15154:relativamente poco restrictiva vis-a-vis el ADN extraño [81].Es conservada a -70°C en una mezcla al 50% de TSB/glicerol.

Streptomyces venezuelae DSM 40755:conservada a 4°C en tubos inclinados de agar S.

Streptomyces coelicolor A(3)N<sub>2</sub>:es,junto a Streptomyces lividans TK24,una de las razas hospedadoras más empleadas en las experiencias de clonación en Streptomyces [82]. Es conservada a 4°C en tubos inclinados de agar Emerson.

## 1.2. Escherichia coli .-

Escherichia coli HB 101 :ha sido utilizada para la construcción de bancos de genes. Estirpe cedida por el Laboratorio Central de Ingeniería Genética de la Universidad de Lieja. Es conservada a -70°C en una mezcla de LB/glicerol 50/50 (V/V).

Escherichia coli JM 103 y E.coli JM 105:ambas proceden de E.coli K12[83].

Las dos estirpes han sido utilizadas para la clonación del fago M13. Son comercializadas por PL. Biochemical (Piscataway U.S.A).Son conservadas a 4°C en tubos inclinados de agar M-9 más casaminoácidos o a -70°C en una mezcla al 50% de medio LB/glicerol.

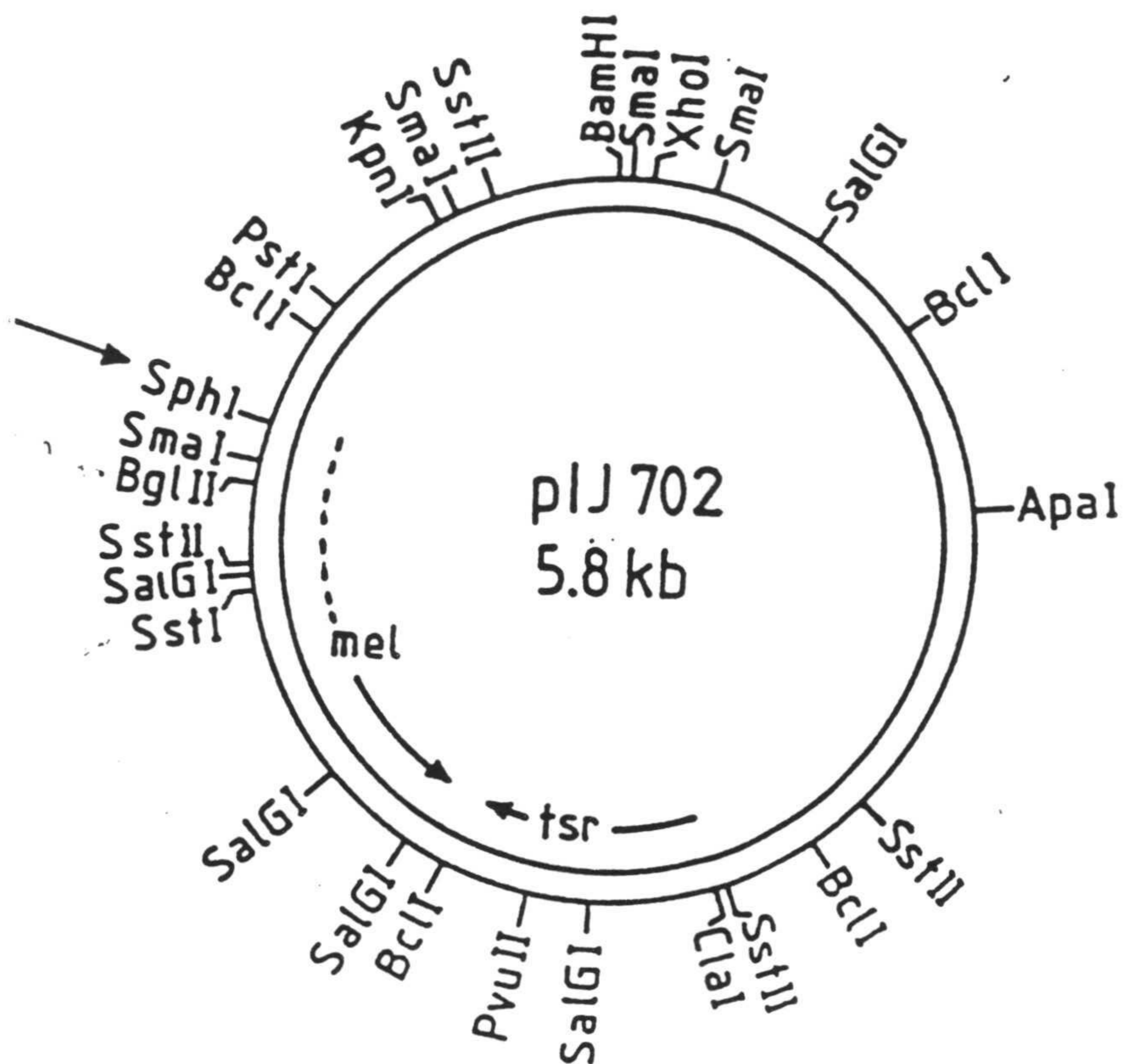


Figura 10.- Mapa genético-físico del plásmido pIJ702.  
tsr : gen de resistencia a la thiostreptona.  
mel : gen codificante para la tirosinasa.  
 La flecha representa el sitio único de clonación utilizado en nuestro trabajo.

## 2.- Plásmidos .-

### 2.1 Características de los plásmidos de Streptomyces.

**pIJ 702** :procedente del Instituto John Innes (Norwich,, U.K.)(figura 10). Es un plásmido multicopia (40 a 300 copias por célula) de 5,8 kb. Deriva del plásmido pIJ 101 de S.lividans [84] y contiene el gen de la resistencia a la thiostreptona (trs) de S.azureus y el gen mel que codifica la síntesis de la tirosinasa procedente de S.antibioticus.

**pIJ699** :de igual procedencia que el anterior. (Figura 11).es también un plásmido multicopia de 9,6 kb derivado del plásmido pIJ101. Es un plásmido bifuncional que puede ser utilizado tanto en Streptomyces como en E.coli. Contiene las funciones replicativas del pIJ101,el gen de la resistencia a la thiostreptona (tsr) y dos terminadores del fago f2 de 331 pb orientados inversamente y separados por un segmento que contiene el origen de replicación p15A del plásmido pACYC/84 [85] de E.coli. Posee además el gen de resistencia a la viomicina de Streptomyces vinaceus(vph) y el de resistencia a la neomicina y a la vanamicina (neo) del trasposón Tn5.

Para la clonación en Streptomyces se pueden utilizar los sitios Bgl II,Xba I y Hind III. La digestión del plásmido por una de estas enzimas produce un fragmento de 5 kb que posee un terminador en cada extremo. La circularización del vector genera un palíndromo(secuencias repetitivas inversas) que es letal para la bacteria.

Así,solo aquellos plásmidos que contengan un inserto o los raros mutantes deleccionados a nivel del terminador serán viables y originarán,en S.lividans ,recombinantes resistentes a la thiostreptona [86,87].

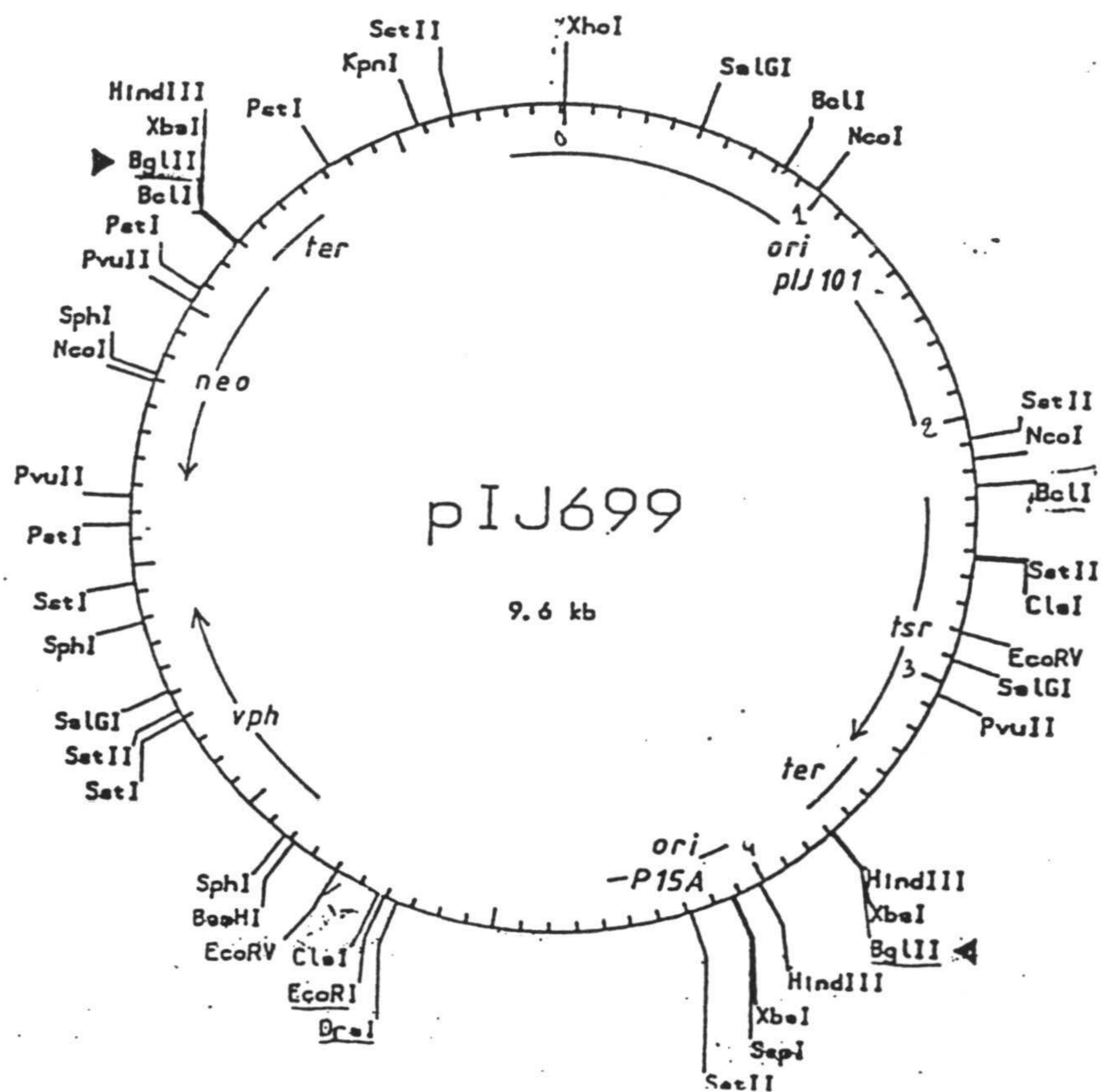


Figura 11.- Mapa genético-físico del plásmido pIJ699.  
tsr : gen de resistencia a la thiostreptona.  
vph : gen de resistencia a la viomicina.  
neo : gen de resistencia a la neomicina y a la vanamicina.  
 ter : terminadores del fago f2.

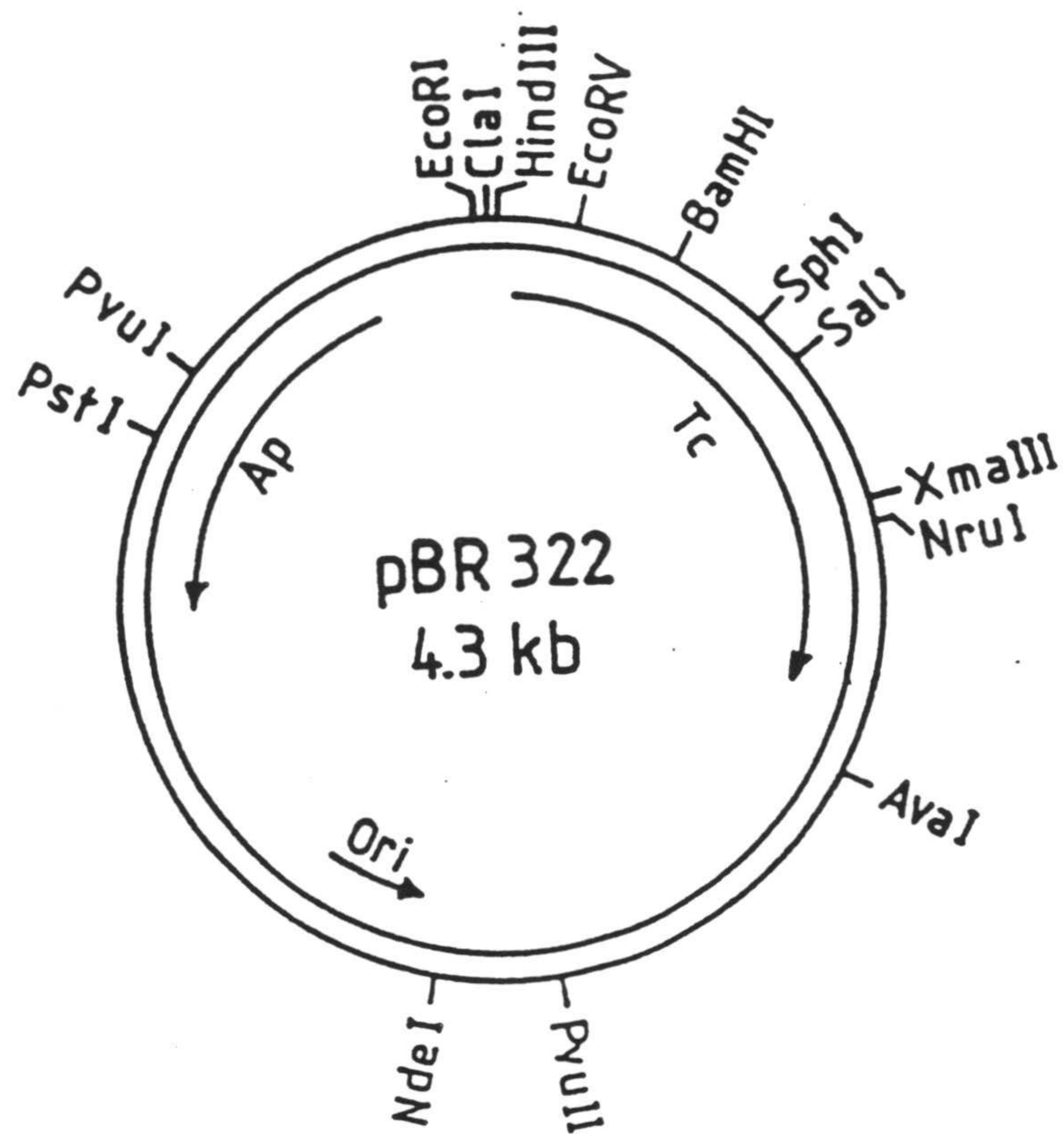


Figura 12.- Mapa genético-físico del plásmido pBR322.  
Tc : gen de resistencia a la tetraciclina.  
Ap : gen de resistencia a la ampicilina.

## 2.2 Características de los plásmidos de *E.coli*

**pBR322:** es un plásmido multicopia de 4,3 kb que posee los genes de resistencia a la tetraciclina y a la ampicilina [88]. (Figura 12). Este plásmido ha sido utilizado en la construcción de bancos de genes de *Streptomyces* K15.

## 3. MEDIOS DE CONSERVACION Y CRECIMIENTO.TAMPONES

### 3.1 Medios empleados con *Streptomyces* .-

Todas las composiciones están expresadas por litro de medio.

#### 3.1.1 Medios líquidos y Tampones .-

<b><u>YEME</u></b> :Extracto de levadura (Difco).....	3 g
Peptona (Difco).....	5 g
Extracto de malta (Oxoid).....	3 g
Glucosa .....	10 g
Sacarosa .....	340 g

Tras esterilizar en autoclave se adicionan 2 ml de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  2,5 M.

<b><u>TSB</u></b> : Triptona Soya Broth (Oxoid).....	30 g
------------------------------------------------------	------

#### Peptona Merck 7213 :

Peptona Merck 7213 .....	10 g
$NaNO_3$ .....	2 g
$K_2HPO_4$ .....	1 g
$MgSO_4$ .....	1 g
KCl .....	0,5 g

YVD :

Extracto de levadura (Difco).....	1	g
Extracto de buey (Difco).....	1	g
Dextrina .....	10	g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O .....	0,02	g

Se ajusta el pH a 7,3 con NaOH.

P completo :

Sucrosa .....	103	g
Solución de K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 2,5%. .....	10	ml
Solución de elementos traza(a)*.....	2	ml
Solución de MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O al 2,03% ...	100	ml
Solución de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> al 0,5% .....	10	ml
Solución de CaCl <sub>2</sub> al 3,68% .....	100	ml
Tampón TES 0,25 M pH 7,2 (b)*.....	100	ml

(a)\*Composición de la solución de elementos traza  
(TE)

Zn Cl <sub>2</sub> .....	0,04	g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	0,20	g
Cu Cl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,01	g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O .....	0,01	g
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O.....	0,01	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,01	g

(b)\*Tampón TES:N-TRIS (Hydroxymethyl)methyl-2-  
aminoethano ajustado a pH 7,2 con

P reducido :

Posee la misma composición que el P completo salvo  
en:

Solución de MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O al 2,03% ...	25	ml
Solución de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O al 3,68% ...	10	ml



3.1.2. Medios sólidos .-

R2YE :

Solución A :

$\text{K}_2\text{SO}_4$ .....	0,5	g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	20,2	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	5,9	g
Glucosa .....	20,0	g
Prolina.....	6,0	g
Casaminoácidos.....	0,2	g
Solución de elementos traza.....	4	ml

Se reparten a razón de 250 ml por enlermeyer (11), se adicionan 11 g de agar y se esterilizan en autoclave a 117°C durante 20 min.

Solución B :

TES.....	11,5 g
Extracto de levadura.....	10,0 g
Sucrosa .....	203,0 g

Se ajusta el pH a 7,5 con NaOH y se reparte a razón de 250 ml en erlermeyer (500 ml). Se esteriliza en autoclave a 117°C durante 20 min.

Antes de su utilización se mezclan 250 ml de la solución B en 250 ml de la solución A, se adicionan 5 ml de una solución estéril de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al 0,5%.

Cuando es necesario se adicionan al medio R2YE 25 a 50  $\mu\text{g/ml}$  de thiostreptona : medio R2YET.

Softh Nutrient Agar(SNA) :

Difco Nutrient Broth .....	8 g
Agar .....	3 g

S :

Glucosa .....	10,0 g
Peptona (Difco).....	4,0 g
Extracto de levadura (Difco) .....	4,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	4,0 g
Agar.....	18,0 g

GCY :

Glicerol.....	30 ml
Extracto de levadura (Difco).....	3 g
Casaminoácidos(Difco).....	3 g
Agar (Difco).....	20 g

Emerson :

Extracto de buey (Difco).....	4,0 g
Peptona (Difco).....	11,0 g
NaCl .....	2,5 g
Extracto de levadura (Difco).....	1,0 g
Glucosa .....	10,0 g
Agar .....	20,0 g

Asparragina-glicerol (A-Gly) :

Asparragina .....	1 g
Glicerol.....	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
Solución salina*.....	1 ml
Agar.....	20 g
Composición de la solución salina*	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,1 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O .....	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,1 g

YVD Agar :

Se adicionan 20 g de agar por litro de medio YVD.

3.2 Medios empleados con E.coli .-

3.2.1. Medios líquidos .-

Luria-Bertani (LB) :

Bacto Tryptona (Difco).....10 g  
Extracto de levadura (Difco).....5 g  
NaCl.....10 g

2XYT :

Bacto Tryptona (Difco).....16 g  
Extracto de levadura (Difco).....10 g  
NaCl .....5 g

M9CA :

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 6,0 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 3,0 g  
NaCl ..... 0,5 g  
NH<sub>4</sub>Cl ..... 1,0 g      0      g  
Casaminoácidos..... 2,0 g

Se ajusta el pH a 7,2 con NaOH y se esteriliza en autoclave. Entonces se adicionan 10 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M, 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 10 mM y 20 ml de una solución de Glucos al 20%. Estas soluciones se esterilizan previamente por separado.

### 3.2.2. Medios sólidos .-

#### LB-Agar :

Se adicionan 18 g de agar por litro de medio LB.

#### 2XYT-Agar :

Se adicionan 18 g de agar por litro de medio 2XYT.

#### Top Agar :

Bacto Tryptona (Difco).....	10 g
NaCl.....	8 g
Agar.....	8 g

#### Medio mínimo M9 :

Se adicionan 15 g de agar en 900 ml de agua destilada y se esteriliza en autoclave. Se adicionan entonces:

Medio concentrado (x 10)*.....	100 ml
MgSO <sub>4</sub> 1 M .....	1 ml
CaCl <sub>2</sub> .....	1 ml
Thiamina-HCl 1 M .....	1 ml
Solución de glucosa (20%).....	10 ml

#### Composición del medio concentrado (x 10)\*:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	60 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	30 g
NH <sub>4</sub> Cl .....	10 g
NaCl.....	5 g

#### 4. ANTIBIOTICOS .-

##### 4.1. Antibióticos empleados con *Streptomyces* .-

Thiostreptona :cedida por el Dr. R.B.Sykes (Squibb and Sons, New Brunswick, N.J., U.S.A.). La concentración utilizada es de 25µg/ml para los medios sólidos o de 50 µg/ml para el agar semisólido y los medios líquidos. La solución stock (50 mg/ml en dimethylsufoside[DMSO]) se conserva durante un mes a 4°C.

Bencilpenicilina :comercializada por Rhône-Poulenc, Paris, France.

[<sup>35</sup>S] Bencilpenicilina: 250 µci/µmol, New England Nuclear (Dupont de Nemours, Belgique).

[<sup>14</sup>C] Bencilpenicilina: 50 µci/µmol, Amersham Radiochemical Center (Amersham, U.K ).

##### 4.2. Antibióticos empleados con *Escherichia coli* .-

Comercializados por Sigma (St Louis MO, U.S.A.). Han sido utilizados a las siguientes concentraciones :

Tetraciclina :25 µg/ml. La solución stock, 25 mg/ml en etanol al 50% se conserva a -20°C.

Ampicilina :25 µg/ml. La solución stock; 50 mg/ml se conserva a -20°C.

Cloranfenicol :150 µg/ml.

#### 5. NUCLEOTIDOS .-

[ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP 3.000 Ci/mmol.

[ $\alpha$ <sup>35</sup>S] ATP 500 Ci/mmol o 1.000 Ci/mmol.

Amersham, Radiochemical Center (Amersham, U.K.)

o New England Nuclear (Dupont de Nemours, Belgique).

6. Sustratos .-

a) Donador :Ac<sub>2</sub>-L-Lys-D-Ala-D-Ala amablemente  
cedido por Reanal (Budapest, Hungría).

b) Aceptor :b-1) [<sup>14</sup>C] Gly-Gly (23 mCi/mmol):  
Amersham Radiochemical Center (Amersham, U.K.).

b-2) Gly-Gly, Sigma  
(StLouis, MO, U.S.A.).

7. ENZIMAS .-

Las enzimas de restricción utilizadas en la  
manipulación del ADN provienen de una de las firmas  
siguientes:

Boehringer (Mannheim, R.F.A.), Bethesda Research  
Laboratoires (Gaithersburg, U.S.A.), Pharmacia  
(Upsala, Suecia), Amersham Radiochemical Center  
(Amersham, U.K.), New England Biolabs (Beverly, U.S.A.), United  
States Biochemical Corporation (Cleveland, U.S.A.).

La Taq polimerasa proviene de la firma New  
England Biolabs (Beverly, U.S.A.).

8. OLIGONUCLEOTIDOS DE SINTESIS .-

Los oligonucleótidos de síntesis han sido  
preparados por Eurogentec S.A. (Lieja, Bélgica).

9. LIQUIDOS DE CENTELLEO .-

a) Líquido de centelleo en tolueno: 20 g de  
PPO (2,5-diphényloxazole) y 500 mg de POPOP (phényl-bis-  
phényloxazole) por litro de tolueno.

b) Aqua-luma (Sociedad Lumac).

10. PROTEINAS DE REFERENCIA .-

- Albúmina de suero bovina (BSA), Mr 68.000 (Sigma, St Louis, U.S.A.)

- Anhidrasa carbónica (ANC), Mr 29.000 (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, R.F.A.).

- DD-carboxipeptidasa de Streptomyces R61, Mr 38.000.

- DD-Peptidasa de Actinomadura R39, Mr 53.000.

Estos dos enzimas han sido purificados en el laboratorio de Enzimología de la Universidad de Lieja (Bélgica).

11. DETERGENTES .-

SDS : Sodio-dodecil-sulfato ;detergente aniónico (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, R.F.A.).

BCTA o cetavión :Bromuro de cetil-trimetil-amonio (Merck-Darmchadt, R.F.A.).

TECNICAS RELACIONADAS CON EL ADN .-

12. TECNICAS EMPLEADAS CON *E.coli* .-

12.1 Preparación de células competentes .-

A partir de un precultivo de una noche a 37°C de *E.coli* HB101, realizado en 5ml de medio LB se inocula un matraz con 60 ml del mismo medio y se mantiene en agitación hasta alcanzar una D.O<sub>590</sub> de 0,7 aproximadamente. El cultivo se deja sobre hielo durante 10 minutos y entonces se centrifuga a 1.500 xg (10 min). Las células son a continuación resuspendidas en 20 ml de una solución fresca

de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M y mantenidas 25 min sobre hielo. Tras una nueva centrifugación en idénticas condiciones, las células son de nuevo resuspendidas en 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M y mantenidas una noche a 4°C.

## 12.2. Transformación .-

A la suspensión de células competentes (100µl) se adicionan 175 µl de tampón de transformación ( $\text{MgCl}_2$  10 mM, Tris-ClH 10 mM pH 7,4) y 25 µl de TE (Tris-ClH 10 mM, EDTA 1mM pH 8) que contiene la mezcla de ligación (apdo 14.4). La mezcla se homogeneiza, se deja 10 min en hielo y se incuba 3 min a 42°C. Tras la adición de 1,5 ml de medio fresco se incuba de nuevo durante 1 h a 37°C y entonces se disemina (180µl por placa) sobre medio LB sólido adicionado del antibiótico apropiado en cada caso. Las placas de Petri se incuban a 37°C durante 16 h y la selección de los recombinantes se realiza tras repicar las colonias simultáneamente sobre placas con ampicilina y placas con tetraciclina. Las células que albergan el plásmido pBR322 deben crecer en ambas placas mientras que los recombinantes lo harán solo en una de ellas.

## 12.3. Preparación del ADN plasmídico .-

### 12.3.1. Mini-preparación del plásmido por lisis alcalina [89].-

Se inoculan 5 ml de medio LB + Antibiótico con una sola colonia bacteriana y se incuban durante una noche en agitación. Las células de este cultivo son recuperadas mediante centrifugación a 12.700 xg durante 5 minutos. El sedimento se resuspende en 100µl de una solución fría de glucosa 50mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 25 mM pH 8 y 4 mg/ml de lisozima y se deja 5 minutos a temperatura ambiente. Entonces se adicionan 200 µl de una solución reciente de



NaOH 0,2 N y SDS 1% que son mezclados por inversión del tubo 2 o 3 veces,dejándolo entonces reposar en hielo durante 5 min.

Al lisado se añaden 150 µl de una solución fría de Acetato potásico 5M pH 4,8 y se agita durante 10 segundos (tubo invertido),dejándole entonces 5 min sobre hielo.Enseguida es centrifugado durante 5 min a 12.700 xg para eliminar los restos celulares,quedando el plásmido en el sobrenadante. Tras una extracción con fenol-cloroformo(apdo 14.1) el ADN es precipitado con alcohol (apdo.14.2) y centrifugado.El sedimento es redisuelto en 50 µl de TE que contenían 20 µg/µl de RNasa e incubado 10 minutos a 37°C.El plásmido así obtenido puede ser digerido y analizado mediante electroforesis en gel de agarosa (apdo. 14.7.1)

### 12.3.2. Preparación del ADN plasmídico tras la amplificación con cloranfenicol .-

La bacteria que contiene el plásmido se inocular en un precultivo (una noche a 37°C) en 50 ml de medio LB adicionado del antibiótico que se ha utilizado para la selección y con el se inocular (4%) un litro de medio M9CA que se incubaba a 37°C hasta que la  $DO_{590}$  alcance un valor entre 0,6 y 0,8.

Se adiciona entonces 170 mg de cloranfenicol disuelto en 1,7ml de etanol,con el fin de amplificar el número de copias del plásmido[90].Tras una noche de cultivo a 37°C en presencia de cloranfenicol las células son recogidas por centrifugación (el sedimento puede congelarse en esta etapa si no es posible hacer la extracción inmediatamente).Las células se resuspenden en 12 ml de TS (Tris-HCl 50 mM pH 8,sucrosa 25%) y se adicionan 4 ml de una solución que contiene 10 mg de lisozima por ml de TE.Tras 10 minutos sobre hielo,se adicionan a la mezcla 4 ml de EDTA 0,5 M pH 8 manteniéndola de nuevo 5 min sobre hielo y entonces se

añaden gota a gota 20 ml de una solución que contiene EDTA 62,5 mM y Tritón X-100 (0,1%).

Tras ser homogeneizada la mezcla se deja 10 minutos sobre hielo y después se centrifuga a 43.000 xg durante 30 min a 4°C. Al sobrenadante se adiciona 1/7 de su volumen de NaCl 5 M y 2/7 de PEG 6.000 50% y se deja reposar 1 h a 4°C, siendo a continuación centrifugada a 2.800 xg durante 10 min.

El sedimento se redisuelve en 12 ml de TE y se trata con ARNasa (30 mg de ARNasa 10 µg/ml) durante 15 min a temperatura ambiente. Tras una extracción con fenol, una o varias con fenol-cloroformo (apdo 14.1) el ADN se precipita con alcohol (apdo 14.2), se centrifuga y se resuspende en 7,22 ml de TES (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, Sarkosil 0,5%).

A la solución de ADN se le adicionan 0,86 ml de una solución de bromuro de etidio (2mg/ml) y 8,573 g de cloruro de cesio y se somete a ultracentrifugación (17 h a 45.000 t/min) en un rotor Beckman VTi 65 a 20°C para separar el ADN cromosómico del plasmídico en gradiente de densidad. La banda inferior de ADN plasmídico es recuperada con ayuda de una jeringa. Para eliminar el bromuro de etidio se realizan tres lavados con alcohol n-butílico. El cloruro de cesio es eliminado por tres diálisis sucesivas frente a TE a 4°C.

### 13. TECNICAS EMPLEADAS CON *Streptomyces*.-

#### 13.1. Preparación de protoplastos .-

Se ha utilizado el método descrito por Hopwood [91]. Una suspensión de esporas se inoculan en 25 ml de medio YEME adicionado de glicocola (0,5% para *S.lividans* y 0,8% para *S.pristinaespiralis*) y se incuba en agitación a 28°C durante 30 a 36 h (la edad del cultivo influye en la regeneración de protoplastos y la tasa de transformación).

El micelio se recolecta por centrifugación (10 min a 20.000 xg) y se lava 2 veces con 15 ml de una solución de sacarosa (10,3%). El sedimento se resuspende enseguida en 4 ml de tampón P adicionado de lisozima (1 mg/ml) y se incuba a 30°C (el período de incubación varía de unas razas a otras, en función de su sensibilidad a la lisozima: 30 -45 min para S.lividans TK24 y 15 min para S.pristinaespiralis ). La formación de protoplastos es seguida en el microscopio de contraste de fase y cuando la mayoría de las células se han transformado en protoplastos, se adicionan a la preparación 5 ml de medio P completo y se filtra sobre algodón. El filtrado se centrifuga a 750 xg durante 8 a 10 min y el sedimento se lava con 4 ml del mismo medio. Los protoplastos se resuspenden finalmente en 1 ml del medio P completo y se reparten en fracciones de 100 µl que se congelan a -70°C.

Para valorar el número de protoplastos que se regeneran se inoculan sobre placas con medio R2YE diferentes diluciones, bien en agua (para estimar el número de células no transformadas en protoplastos) o en medio P completo.

### 13.2. Transformación y selección de los transformantes

En un tubo Eppendorf se mezclan 100 µl de la suspensión de protoplastos (del orden de  $10^7$ - $10^8$  protoplastos ) y 10 µl de la mezcla de ligación que contiene 50 ng del vector (apdo 14.4). Sobre la pared del tubo se depositan 10 µl de una solución de TE con el ADN y se mezclan rápidamente por agitación breve en el vortex. Enseguida se adicionan 320 µl de una solución de PEG 1500 (2 g en 5 ml de medio P completo) y pasado un minuto se reparte sobre placas de Petri con medio R2YE con la superficie bien seca (a razón de 80 µl/placa). Después de una incubación de 24 h a 28 °C, necesaria para la

regeneración de protoplastos y la expresión fenotípica de los genes del plásmido, los transformantes se seleccionan recubriendo las colonias con una capa de agar blando de medio SNA (3,5 ml /placa) que contiene 50 µg/ml de thioestreptona.

### 13.3. Conservación de los clones .-

A partir de una suspensión densa de esporas se inocula un matraz de 100 ml con 10 ml de medio TSB y se incuba en agitación durante 48-72 h a 30°C.

El cultivo es recogido por centrifugación a 12.000 xg durante 15 min (4°C) y el micelio se resuspende en 1 ml de medio TSB/glicerol (50:50 V:V). Alícuotas de 200 µl se conservan a -70°C .

### 13.4. Preparación del ADN cromosómico .-

Se prepara el ADN cromosómico siguiendo la técnica de Hopwood (procedimiento 1 [91]). Las bacterias se cultivan durante 48 h en 250 ml de TSB (30 °C con agitación) y el micelio se recupera mediante centrifugación a 11.600 xg durante 15 min (4°C).

2 g de micelio se resuspenden en 4,3 ml de TE , se adicionan 2 ml de EDTA 0,5 M pH 8 y 4,3 ml de una solución de lisozima (4 mg/ml) y se incuba a 30°C durante 30 min, antes de añadir 0,25 ml de una solución de pronasa (10 mg/ml predigerida durante 10 min a 30°C).

Tras una incubación de 5 min a 30°C se adicionan 1,2 ml de SDS (10%) y la mezcla se incuba durante 90 min a 37 °C.

Finalmente se hacen dos extracciones con fenol-cloroformo y un tratamiento con ARNasa a 37°C durante 1 h (40 µg/ml concentración final) y se añaden 0,25 volúmenes de Na Cl 0,5 M y de PEG 6000 (30%) hasta una concentración final del 10%. La mezcla se deja una noche a 4°C y el ADN precipitado

se recupera por enrollamiento sobre una pipeta Pasteur y se resuspende en 6 ml de TE durante una noche en agitación a 4°C. Cuando el ADN está completamente resuspendido se adicionan 0,72 ml de acetato sódico 3 M y 14,4 ml de etanol frío. De nuevo el ADN precipitado se enrolla sobre una pipeta Pasteur y se lava 2 veces con etanol antes de ser disuelto en 1 ml de TE y mantenido en agitación varios días a 4°C. Una vez disuelto el ADN, la solución se fracciona y se conserva a -20°C. Con esta técnica se obtienen de 0,5 a 2 mg de ADN/g de micelio.

### 13.5. Preparación del ADN plasmídico .-

#### 13.5.1. Minipreparación de plásmidos por lisis alcalina

La técnica utilizada es una modificación de la empleada para E.coli[89].

Dos placas con medio R2YE + thiostreptona se siembran con los clones portadores de plásmidos recombinantes y se incuban a 28°C durante 3-4 días.

Las colonias de la cuarta parte de la placa se recogen con una espátula y se depositan en un tubo Eppendorf y se adicionan enseguida 300 µl de una solución : Tris 25 mM pH 8, EDTA 25 mM pH 8, sacarosa 10,3% que contiene la lisozima (2 mg/ml).

La mezcla se incuba 1 h a 37°C agitándola de vez en cuando. Enseguida se adicionan 400 µl de una solución de NaOH 0,2 M y de SDS 1%, se homogeneiza por inversión y se deposita 5 min en hielo.

El ADN cromosómico y los restos celulares se eliminan por centrifugación a 12.700 xg durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se trata con ARNasa y las proteínas se extraen con el fenol-cloroformo (apdo.14.1) y el cloroformo, siendo los ácidos nucleicos precipitados con

el etanol (apdo.14.2).Una vez seco,el ADN plasmídico se suspende en 20-30  $\mu$ l de TE,quedando así preparado para ser analizado mediante electroforesis en gel de agarosa y digestión por enzimas de restricción.

### 13.5.2. Preparación a gran escala .-

El micelio que se obtiene de un cultivo de 48-60 h en 250 ml de medio YEME + 0,5% glicina +  $MgCl_2$  5 mM +thiostreptona (25  $\mu$ g/ml) es recogido por centrifugación (11.600 xg durante 30 min) y resuspendido en 25 ml de TE + sacarosa (34%) y congelado para favorecer la lisis (Hopwood [91]).Entonces se descongela y se incuba a 37°C durante 10 min antes de adicionar 5 ml de una solución de lisozima (50 mg/ml)en TE y 5ml de una solución de EDTA 25 mM pH 8.Se reincuba 1 h a 37°C y después se adicionan 10 ml de una mezcla recién preparada de NaOH 0,3 M,SDS (2%) y 25 ml de EDTA 25 mM pH 8,se agita y se incuba a 75°C durante 15 min.Se deja enfriar a temperatura ambiente y se adicionan 12,5 ml de SDS (10%) y 25 ml de 25 ml de NaCl 5M,se mezcla bien y se deja reposar 2 h a 4°C.

El ADN cromosómico y los restos celulares se precipitan y se separan del resto por una centrifugación de 40 min a 39.000xg (4°C) y al sobrenadante con el ADN plasmídico se le adiciona 1/2 de su volumen de PEG 6.000 (30%) y se deja una noche a 4°C. Tras una centrifugación a 2.800 xg durante 15 min,el sedimento que contiene el ADN plasmídico se resuspende en 10 ml de TE y se trata con ARNasa (60  $\mu$ l de ARNasa de 10 mg/ml)durante 30 min a 37°C.Tras varias extracciones con fenol-cloroformo y precipitación con etanol (apdo. 14.2) el plásmido se resuspende en 3,6 ml de TES (0,6 ml de sarkosil 5% y 5,5 ml de TE) a los cuales se adiciona 0,43 ml de una solución de bromuro de etidio (2mg/ml) y 4,394 g de cloruro de cesio.

Finalmente, el ADN plasmídico se separa del cromosómico, las proteínas y el ARN residual por ultracentrifugación en gradiente de densidad a 45.000 rpm (rotor Beckman VTi 65) durante 17 h a 20 °C.

La banda del ADN plasmídico se extrae con la ayuda de una jeringa y se elimina el bromuro de etidio mediante 3 lavados con alcohol n-butílico. El cloruro de cesio se elimina mediante 3 diálisis sucesivas frente a TE (4°C).

#### 14. TECNICAS GENERALES .-

##### 14.1 Extracción con fenol cloroformo .-

Se utiliza para separar las proteínas contaminantes de la solución de ácidos nucleicos.

A un volumen de la solución se adiciona la mitad de fenol destilado y equilibrado frente a una solución de Tris-HCl 100 mM pH 8. Enseguida se añade 1/2 de su volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24/1, V/V), se agita bien y se centrifuga a 12.700 xg durante 5 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se recupera y extrae de nuevo con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico para eliminar las trazas de fenol. Tras una centrifugación en las mismas condiciones, se recupera la fase acuosa y el ADN libre de proteínas contaminantes se precipita con etanol.

En los casos en que la muestra contenga muchas proteínas se puede hacer una extracción con fenol-cloroformo, precedida de una primera extracción con fenol solo.

##### 14.2 Precipitación del ADN con etanol .-

Este paso permite concentrar el ADN y resuspenderlo en el tampón deseado (habitualmente en TE). La solución de ADN se adiciona de 1/10 de su volumen de

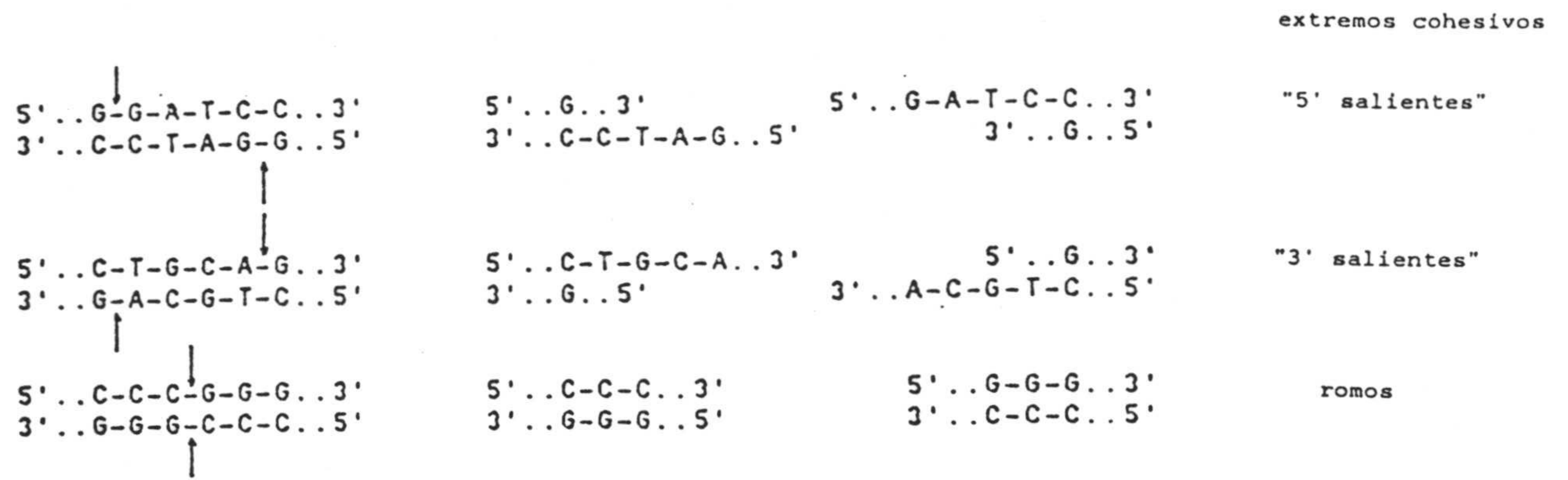


Figura 13.-Modelos de rotura del ADN por los enzimas de restricción.



acetato sódico 3M (para proveer de cierta fuerza iónica necesaria para la precipitación) y de 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se completa la precipitación con una hora a  $-70^{\circ}\text{C}$  o una noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Cuando la concentración de ADN es inferior a  $50\ \mu\text{g/ml}$  es necesario adicionar un "conductor" de la precipitación (por ejemplo, ácido poli-riboadenílico, Biochemical) para realizar esta concentración límite. El ADN se recupera mediante centrifugación a  $12.700\ \text{xg}$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 min, se seca a vacío y después se resuspende en el tampón adecuado.

#### **14.2                    Utilización de los enzimas de restricción .-**

Los enzimas de restricción son endonucleasas que rompen el ADN bicatenario a nivel de secuencias específicas, originando fragmentos con extremos bien definidos, bien cohesivos o romos (figura 13).

Una unidad se define como la cantidad de enzima necesario para digerir completamente  $1\ \mu\text{g}$  de ADN del fago en una hora. Las condiciones óptimas de funcionamiento - pH,  $\text{Mg}^{++}$ , temperatura, fuerza iónica - varían según el enzima utilizado.

En este trabajo se han seguido las recomendaciones de la casa proveedora. (Apdo. 7).

#### **14.4                    Utilización de la ADN ligasa del bacteriófago T4 .-**

Este enzima se extrae de bacterias infectadas por el fago T4. Cataliza la formación del enlace fosfodiéster entre dos extremidades 3'-hidroxil y 5'-fosfato complementarias. La formación de este enlace covalente es posible igualmente entre dos extremos romos. La presencia de iones  $\text{Mg}^{++}$  es indispensable para la actividad del enzima, así como la presencia de ATP que actúa como cofactor.

El tampón de ligación se compone de: Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; MgCl<sub>2</sub> 10 mM ;dithiotreitol 10 mM; espermidina 1 mM; ATP 1 mM; albúmina de suero bovina (BSA) 0,1 mg/ml.La mezcla de reacción se deja una noche a 4°C y después 3 h a 16°C.

La ADN ligasa es suministrada por Boehringer (Mannheim,R.F.A.).Se define una unidad como la cantidad de enzima que transforma 1 nmol de pirofosfato radioactivo en material adsorbible sobre Norit en 20 min a 37°C.

#### 14.5 Utilización de la fosfatasa alcalina bacteriana(BAP)

Para impedir que un plásmido linearizado no se cierre sobre si mismo durante la ligación ,el grupo fosfato terminal puede ser eliminado del ADN por la acción de la fosfatasa alcalina (BAP) de E.coli.

El plásmido digerido se precipita por alcohol (apdo.14.2) y se resuspende en Tris-ClH 50 mM pH 8.Se adiciona la BAP (Boehringer,Mannheim,R.F.A.) a razón de 0,1 unidades por picomol de extremos 5'-fosfato a defosforilar.

En el caso de extremos 5' salientes,la mezcla se incuba 30 min a 37°C se adiciona la misma cantidad de enzima y se reincuba en las mismas condiciones,mientras que para los extremos 3' salientes las incubaciones se realizan a 56°C.Para detener la reacción se adiciona EDTA 1 mM pH 8 (concentración final).

Tras dos extracciones con fenol-cloroformo y dos con cloroformo,la fase acuosa se precipita con etanol.

#### 14.6 Marcaje radioactivo de los extremos 5' del ADN con la ayuda de la polinucleótido kinasa del bacteriófago T4 ( T4 PNK) .-

#### 14.6.1 Marcaje radioactivo del ADN .-

La PNK cataliza la transferencia de un grupo fosfato situado en posición  $\gamma$  de la molécula de ATP sobre el grupo 5'-OH de una molécula de ADN, permitiendo así marcar con fósforo radioactivo el ADN en posición 5'.

En este trabajo se ha utilizado para marcar una sonda oligonucleotídica.

La muestra que se desea marcar (cuya extremidad 5' no está fosforilada o ha sido previamente desfosforilada) se suspende en 20  $\mu$ l de [ $^{32}\gamma$ P] ATP (250  $\mu$ Ci) y se adiciona sucesivamente de BSA (50  $\mu$ g/ml, concentración final), 3  $\mu$ l de tampón kinasa 10 x

(Tris-HCl 0,5 M pH 8, Mg Cl<sub>2</sub> 0,1 M, DTT 50 mM, espermidina 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 1mM), 5 unidades del enzima y agua hasta el volumen deseado (30  $\mu$ l). Se incuba entonces 30 min a 37°C y después se adiciona de nuevo enzima y la mezcla se reincuba en las mismas condiciones.

#### 14.6.2 Purificación por cromatografía en columna intercambiadora de iones .-

Para eliminar el exceso de  $\gamma$  [ $^{32}$  P] ATP, se purifica el ADN mediante cromatografía en una pequeña columna NACS-52 (NACS PREPAC, BRL).

NACS-52 es una resina intercambiadora de iones que fija los ácidos nucleicos monocatenarios en presencia de fuerza iónica débil (0,2 M NaCl).

La columna se lava 3 veces con 1 ml de TE + NaCl 1 M (solución B) y después se equilibra mediante 4 lavados con TE + NaCl 0,2 M (solución A).

La muestra, diluida 20 veces en la solución A, se dispone sobre la columna. Tras la adsorción, la columna se lava 4 veces con 1 ml de la solución A y se eluye entonces con 3

AGAROSE (%)	TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE DNA A SEPARAR (kb)
0.3	60-5.0
0.6	20-1.0
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.2	6-0.4
1.5	4-0.2
2.0	3-0.1

Tabla 4.-Composición del gel de agarosa (% de agarosa) en función del tamaño de los fragmentos de ADN a separar.

x 1 ml de solución B.

La radioactividad de las diferentes fracciones se mide en un contador Beckman L-S 2.800.

El ADN marcado se encuentra en las dos primeras fracciones eluidas, mientras que el exceso de  $\gamma$ [<sup>32</sup>P] ATP no adsorbido estará en las dos primeras fracciones del lavado.

#### 14.7 Análisis del ADN mediante electroforesis .-

##### 14.7.1 Electroforesis en gel de agarosa .-

La electroforesis en gel de agarosa permite separar fragmentos de ADN entre 100 y 25.000 pares de bases. El porcentaje de agarosa (agarosa ultrapura, BRL) varía según la dimensión de los fragmentos que se desea separar ( tabla 4).

La agarosa (1%) se disuelve en el tampón de electroforesis TEA (Tris-HCl 40 mM, acetato sódico 40 mM, EDTA 2 mM, ajustado a pH 8,15 por HAC).

Las muestras, antes de depositarlas en el gel, se adicionan ( 1/10 de su volumen) de la solución de mezcla colorante : Ficol 15%, azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%.

Tras la electroforesis el gel se colorea , mediante inmersión , en una solución de bromuro de etidio, reactivo que se intercala entre las bases del ADN y fluoresce bajo irradiación ultravioleta a 590 nm, lo que permite la visualización de las bandas.

Los marcadores de peso molecular utilizados se exponen en la tabla 5.

##### 14.7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida .-

Esta técnica permite separar fragmentos de ADN de 10 a 1.000 pb. El porcentaje de acrilamida utilizado varía según el tamaño de los fragmentos (tabla 6).

$\lambda$ / Hind III	pBR322 / Hinf I	1Kb "DNA ladder" (BRL)
23.130	1.631	12.216
9.416	517	11.198
6.557	506	10.180
4.361	396	9.162
2.322	344	8.144
2.027	298	7.126
564	220	6.108
125	154	5.090
	75	4.072
		3.084
		2.036
		1.635
		1.018
		516
		506
		394
		344
		298
		220
		200
		154
		142
		75

Tabla 5.- Tamaño (pb) de los marcadores de pesos moleculares.

% D'ACRILAMIDA	TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE ADN A SEPARAR
4	100 à 1 000 pb
5	80 à 500 pb
8	60 à 400 pb
12	40 à 200 pb
20	10 à 100 pb

Tabla 6.-Composición del gel (% de acrilamida) en función del tamaño de los fragmentos de ADN a separar.

Para preparar el gel se mezcla un volumen adecuado de la solución de acrilamida BRL (38% acrilamida, 2% bisacrilamida) a 5 ml de tampón TBE 10 x (composición por litro: Tris 108 g,  $\text{HBO}_3$  55 g, EDTA 10 mM pH 8).

Se completa la mezcla hasta un volumen de 50 ml con agua destilada y se le adicionan 45  $\mu\text{l}$  de TEMED (N-N-N-N-Tetrametiletlen diamina) y 350  $\mu\text{l}$  de una solución fresca de persulfato amónico (APS) 10%. Una vez bien mezclado, se vierte en un aparato Miniprotean II (Biorad).

Tras una pre-electroforesis de 15 min a 100 V ( para eliminar el APS, se depositan la muestras adicionadas de 1/10 de su volumen de la solución de mezcla colorante (apdo. 14.7.1). La electroforesis se realiza bajo una tensión constante de 150 V y se emplean como marcadores de peso molecular el pBR322/Hind III o el " ADN - ladder" de 1kb BRL (tabla 5).

### 14.7.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes .-

Se utilizan estos geles para la determinación de la secuencia nucleotídica. Contienen una fuerte concentración de urea (43-44%) con el fin de mantener separadas las dos hebras de los fragmentos de ADN.

La composición del gel utilizado es la siguiente: 35 g de urea disueltos en 10 ml de la solución de acrilamida (concentración final 5%) ( Acrilamida:Bis, 38%:2%), 8 ml de TBE 10 x , 50  $\mu\text{l}$  de TEMED, 500  $\mu\text{l}$  de APS 10%. Se completa con agua destilada hasta un volumen de 80 ml.

Si se utiliza al sistema BRL, la electroforesis se desarrolla a una potencia de 60 w durante 1,30 h precedida de una pre-electroforesis de 30 minutos a la misma potencia (para eliminar las trazas de APS). El sistema BIORAD permite obtener una temperatura determinada en función del voltaje utilizado. Todas las experiencias se han realizado a un



voltaje constante (2.100 V) y 55°C de temperatura durante 1 h y 45 min, tras una pre-electroforesis de 1h (tiempo necesario para alcanzar la temperatura deseada).

Tras la electroforesis el gel se fija con una solución de ácido acético (10%) :metanol (10%) (V/V) durante 30 minutos para eliminar el exceso de urea y facilitar el secado del gel. El gel es entonces transferido a una hoja de papel Wattman 1MM, cubierto con plástico empleado en alimentación y secado a vacío a 80°C durante 1 h antes de ser autorradiografiado.

#### **14.7.4 Determinación del tamaño de la molécula de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa .-**

Schaffer y Sederof [92] han establecido las ecuaciones que permiten calcular el tamaño de una molécula de ADN en función de su distancia de migración en gel de agarosa. Tomando como base esta ecuación Müller (Laboratorio Central de Ingeniería Genética ULG) ha puesto a punto un programa de ordenador ,que hemos utilizado, en el cual basta introducir los datos (distancia de migración y tamaño) de las moléculas de referencia y las distancias de migración de las moléculas problemas para conocer su tamaño.

#### **14.8 Estimación de la concentración de ADN de una solución .-**

La estimación de la concentración de ADN de una muestra se hace mediante determinación de su absorbancia a 260 nm. Una unidad de absorbancia a esta longitud de onda corresponde con una concentración de alrededor de 50 µg/ml (ADN de doble cadena) o de 30 µg/ml (ADN de cadena sencilla).

Se puede igualmente tener una idea de la pureza de la solución de ADN midiendo su absorbancia a 280 nm. Se estima

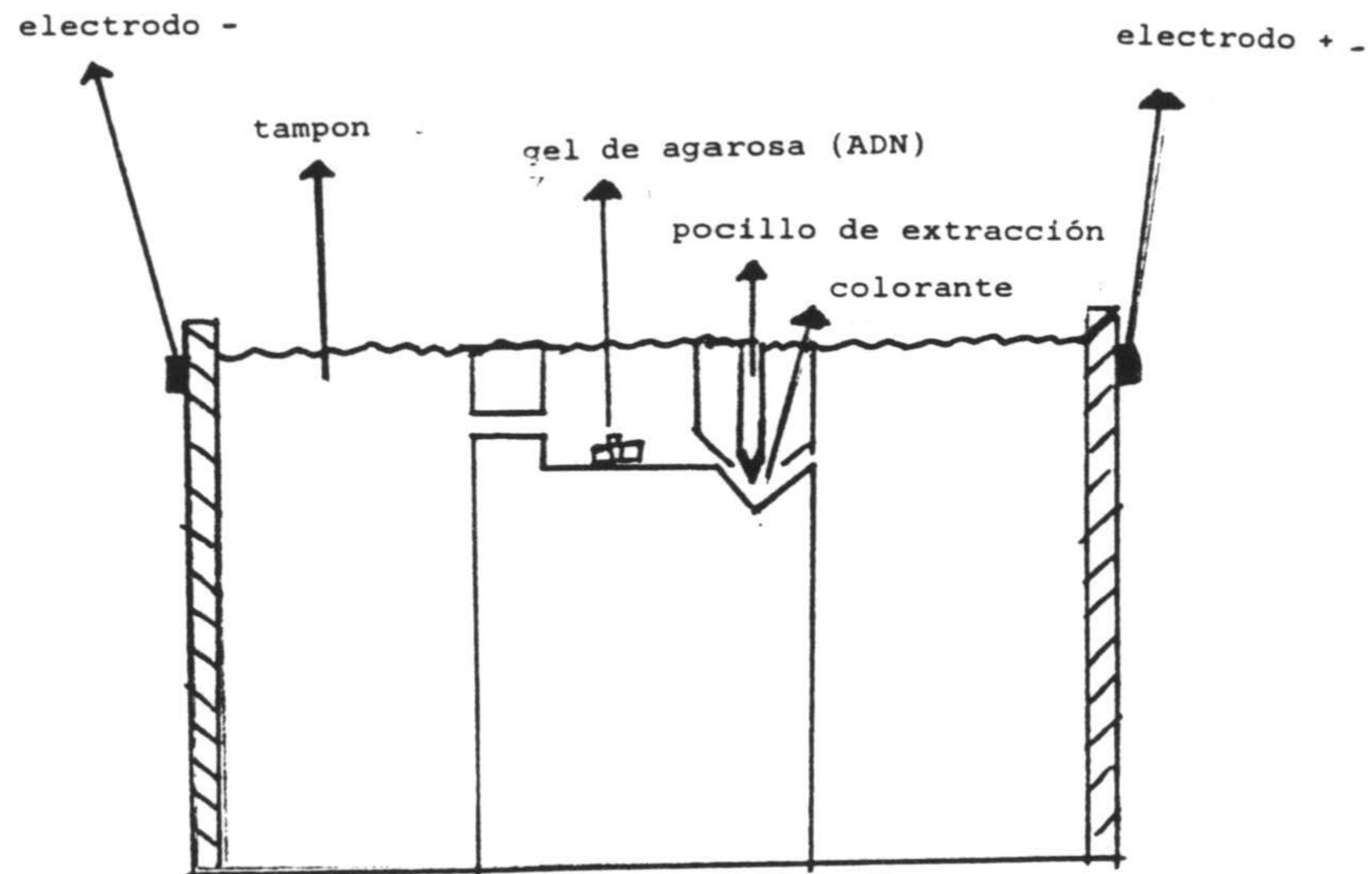


Figura 14.- Representación esquemática del aparato utilizado para la electroelución.

que la pureza es adecuada si la relación de absorbancias medidas a 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) es igual a 2.

Si se dispone de pequeñas cantidades de ADN (pe, preparaciones fragmentos para una ligación) se hace una estimación aproximada, comparando la intensidad de coloración con bromuro de etidio de la muestra problema con la que presenta una muestra de referencia del mismo tamaño.

#### **14.9 Recuperación de fragmentos de ADN tras una electroforesis preparativa .-**

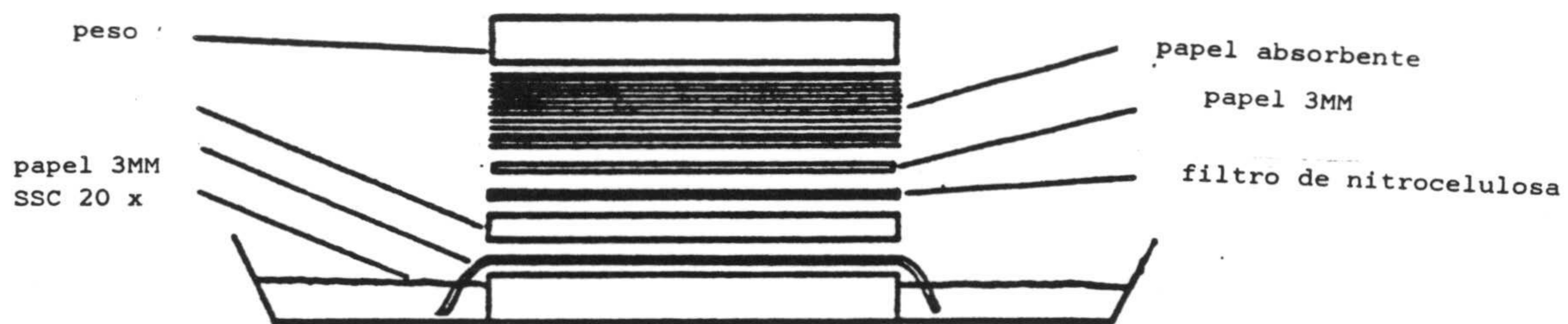
##### **14.9.1 Mediante electroelución .-**

Tras una electroforesis en gel de agarosa, la porción de gel que contiene el ADN que se desea recuperar se corta con la ayuda de un escalpelo, se fragmenta en pequeños trozos y se deposita en uno de los pocillos del aparato de electroelución (figura 14), lleno de tampón (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 5 mM).

Entonces se depositan en el pocillo de extracción 60  $\mu$ l de una mezcla que contiene acetato de sodio 3 M y 0,25% de azul de bromofenol. Al aplicar la corriente eléctrica, el ADN cargado negativamente migrará al pocillo de extracción en donde es detenido por la concentración salina elevada y allí será recuperado retirando 400  $\mu$ l de este pocillo. Para eluir fragmentos de tamaño comprendido entre 200 y 1.000 pb, se aplica un voltaje de 150 V durante 45 min y si poseen una dimensión superior a 1.000 pb es aconsejable hacer dos extracciones consecutivas (2 x 30 min).

Tras la electroforesis el colorante se elimina mediante dos extracciones con fenol, seguidas de otras dos con cloroformo y cloroformo y finalmente se precipita el ADN con etanol.

El ADN recuperado es utilizable directamente para



**Figura 15.- Representación esquemática del sistema utilizado para la transferencia del ADN de un gel de agarosa a un filtro de nitrocelulosa.**

experimentos de clonación.

#### 14.9.2 Mediante difusión .-

Se emplea esta técnica para purificar fragmentos de ADN de tamaño inferior a 1.000 pb separados en geles de poliacrilamida.

La porción de gel que contiene la banda de ADN se corta con ayuda de un escalpelo, se fragmenta y se sumerge en 1 ml de tampón de difusión (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 500 mM) adicionado de 10 µg/ml de ácido poli-ribo adenílico para mejorar la precipitación, incubando entonces durante una noche a 37°C en agitación.

La suspensión es filtrada por membrana de Millipore (0,22 µm) y los trozos de acrilamida lavados con 500 µl del mismo tampón e igualmente filtrados. El tampón de lavado es asimismo filtrado y añadido al primer filtrado.

El ADN de estos filtrados se precipita con etanol (apdo. 14.2) y se recupera por centrifugación a 40.000 rpm durante 20 min (4°C) en un rotor Beckman SW55Ti.

#### 14.10 Transferencia del ADN de un gel de agarosa a un filtro de nitrocelulosa (Southern Blot) .-

Se ha utilizado la técnica descrita por Maniatis [89]. Tras la electroforesis, el gel es tratado con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz ultravioleta; el bromuro de etidio se elimina después mediante dos lavados de 15 min con agua destilada.

Para mejorar la transferencia el ADN es parcialmente depurinado sumergiendo el gel en 250 ml de una solución de HCl 0,25 M durante 15 min y agitando suavemente. Tras un breve lavado en agua destilada el gel se sumerge 2 veces en 250 ml de una solución de NaOH 0,5 M, NaCl 1M durante 15 min para desnaturalizar el ADN. Enseguida se enjuaga el gel

con agua destilada y finalmente se neutraliza por 2 lavados consecutivos en una solución de Tris-HCl 0,5 M pH 7,4, NaCl 3 M.

La transferencia se efectúa siguiendo el procedimiento de Southern modificado por Flavell (figura 15) durante una noche a temperatura ambiente.

La nitrocelulosa (Millipore, HATF) se embebe durante 30 min en una solución 20 x de SSC (NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M , pH 7,2). Al día siguiente, la membrana de nitrocelulosa se lava dos veces con una solución 3 x SSC y una vez secada al aire es cocida a vacío a 80°C durante dos horas.

#### 14.11 Técnicas de hibridación .-

##### 14.11.1 Hibridación a partir de colonias .-

Para cribar los transformantes obtenidos durante la clonación en el plásmido pBR322 de los fragmentos provenientes de 3 bancos de genes: BamH I, Bcl I y Bgl II, hemos seguido la técnica general descrita en Focus [93]. Las colonias transformantes se repican sobre un filtro de nitrocelulosa dispuesto sobre una placa que contiene el medio LB y el factor de selección (tetraciclina o ampicilina). Las placas se incuban a 37°C durante 4-5 h (colonias con un diámetro entre 0,5 y 1 mm) y entonces el filtro se sitúa sobre otra placa que contenga el medio LB + cloranfenicol (150 µg/ml) y se incuba durante una noche a 37°C para permitir la amplificación de los plásmidos. Los filtros se colocan entonces sobre una hoja de papel Wattman 3MM previamente embebida en una solución de NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M durante 10-15 min a temperatura ambiente para lisar las bacterias y desnaturalizar el ADN. A continuación las membranas son neutralizadas depositándolas sobre una hoja de papel Wattman 3MM embebida en una solución de Tris-

HCl 0,5 M pH 7, NaCl 0,5 M.

Los filtros se dejan secar a temperatura ambiente (1 h) y después se calientan (80°C) a vacío durante 2 h. Los restos celulares se eliminan mediante lavado de los filtros en una solución 3 x SSC (\*), SDS 0,1% a 65°C durante 16-20 h, y después se dejan secar y se meten en una bolsa de plástico impermeable. En ella se pone la mezcla de hibridación (100 ml/40 filtros) y se suelda, cuidando de que no queden burbujas de aire y se incuba a 37°C durante 2 h.

La composición de la mezcla de prehibridación es la siguiente: 6 x SSC, 1 x Denhardtts (\*\*), 0,5% SDS, 100 µl de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, 0,05% pirofosfato sódico. Cuando la incubación ha finalizado se corta una esquina de la bolsa y se reemplaza la mezcla de prehibridación por la de hibridación (30-50 ml/40 filtros). Finalmente la sonda radioactiva (26 b) se introduce en cantidad suficiente para tener 500.000 cpm/filtro.

Tras la homogeneización, la bolsa sellada se incuba durante una noche a 50°C (la temperatura varía entre 20°C y 50°C según la longitud de la sonda).

La composición de la mezcla de hibridación es la siguiente: 6 x SSC, 1 x Denhardtts, 20 µg/ml de ARNt, 0,05% pirofosfato sódico.

Tras la hibridación los filtros se lavan 4 veces durante 15 min en un exceso de 6 x SSC más pirofosfato sódico 0,05% a temperatura ambiente y después 1 h a 42°C. Finalmente se realiza el último lavado durante 10 min a una temperatura próxima a la de hibridación (55°C) antes de secar los filtros y autorradiografiarlos (apdo. 14.12). Tras el revelado de los films, para reconfirmar los clones positivos detectados por este método, se pueden lavar los filtros una última vez durante 10 min a 74°C (temperatura muy próxima a la  $T_m = 84^\circ\text{C}$ , aproximadamente, en estas

condiciones experimentales).

(\*) SSC se prepara 20 veces concentrado. Su composición es la siguiente: NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M pH 7,2.

(\*\*) 100 x solución de Denhardts : Ficoll 2%, BSA 2%, polivinilpirolidona 2% .

#### **14.11.2 Hibridación de los fragmentos de restricción transferidos a filtros de nitrocelulosa.-**

El filtro de nitrocelulosa utilizado para la transferencia (apdo.14.10) fue previamente lavado 2 veces durante 30 segundos en 3 x SCC a temperatura ambiente, y después introducido en una bolsa de plástico de tamaño adecuado, llevándose a cabo a continuación la hibridación según el procedimiento ya descrito en el apartado 14.11.1. Los volúmenes de las mezclas de prehibridación e hibridación fueron respectivamente de 50 ml y 20 ml por cada dos filtros hibridados. La radioactividad empleada fue de 5 a 6 x 10<sup>6</sup> cpm/filtro.

#### **14.12 Autorradiografía .-**

Los geles para el secuenciado, que contenían muestras marcadas con <sup>35</sup>S, fueron puestas en contacto con una película Kodak (XAr-5) en un chasis sin pantalla amplificadora durante 48 h a temperatura ambiente.

Los filtros de nitrocelulosa en los que se realizaron las hibridaciones con una sonda marcada con <sup>32</sup>P (apdo.14.2) fueron cubiertas con una hoja de plástico alimentario y puestas en contacto con una película Kodak (XAr-5) o Fuji (RX Safety 5) en un chasis con pantalla amplificadora. La exposición en este caso fue más corta (una noche o varias horas) y fue realizada a una temperatura de -70°C para



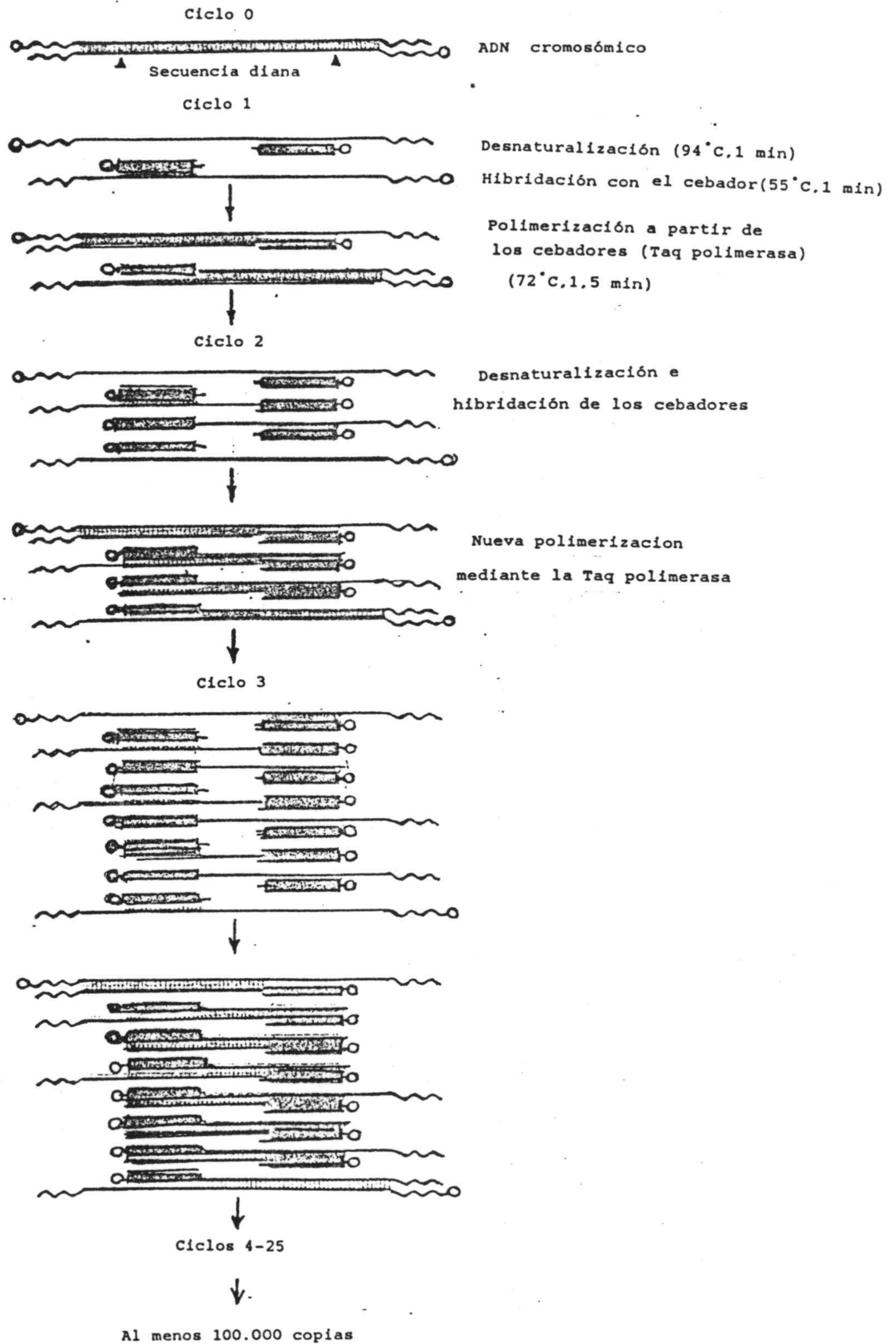


Figura 16.- Esquema de la amplificación de ADN mediante una polimerización en cadena (PCR). (Según Cetus Corporation).

evitar la difusión de las bandas de ADN.

Después de la exposición, la película fue revelada en tres baños sucesivos : 3 min en el revelador( Metinol, Agfa Gevaert), 2 min en ácido acético 4% y 5 min en fijador (Acidofix, Agfa Gevaert). Seguidamente fue lavada con agua desionizada y secada.

#### 14.13 Amplificación del ADN mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR).-

Este método permite amplificar "in vitro" una región específica del ADN, a partir de una pequeña cantidad del material que contiene la secuencia que se quiere amplificar. Esta técnica requiere disponer de los dos oligonucleótidos cebadores complementarios de las dos secuencias situadas cada una sobre una hebra diferente de ADN que encuadran la región a amplificar. La repetición de los ciclos que comprenden una desnaturalización, una hibridación y una síntesis enzimática, proporciona una cantidad apreciable de ADN de doble cadena cuyos extremos se corresponden con los cebadores (figura 16), [94,95,96]. El enzima, la Taq polimerasa (Biolabs) se utilizó a una concentración de 2,5 unidades/100 µl de mezcla. El tampón de reacción fue el siguiente: Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, gelatina 100 µg/ml. La amplificación fue realizada en un volumen de 100 µl de tampón conteniendo el enzima, 2 µg del ADN genómico y los dos oligonucleótidos cebadores a razón de 0,7 µg cada uno (concentración final, 1 mM). Los dNTPs fueron empleados a una concentración final de 200 µl y el número de ciclos fue de 30, comprendiendo cada uno una desnaturalización a 94°C durante 1 min, una hibridación a 55°C durante 1 min y 30 segundos y una polimerización a 72°C durante 2 min.

M13iq130  
 fMet Thr Met Ile Thr Asn Ser Arg Glu Ser Ser Ile Ser His Ala Val Pro Leu Glu Glu Ala Trp Asp Pro Cys Thr Cys Ser Asn Ser Leu  
 ATGACCATGATTACGAATTCCTGGGAGAGCTCGATATCGCATGCGGTACCTCTAGAAGAAGCTTGGGATCCGTCGACCTGCAGCAATTCAGT  
 TACTGGTACTAATGCTTAAGGGCCCTCTCGAGCTATAGCGTACGCCATGGAGATCTTCTCGAACCCCTAGGCAGCTGGACGTCGTTAAGTGAC

EcoRI SmaI SstI EcoRV SphI KpnI XbaI HindIII BamHI Sall PstI  
 AccI HindII

M13iq131  
 fMet Thr Met Ile Thr Gln Ile Cys Arg Ser Thr Asp Pro Lys Leu Leu Leu Glu Val Pro His Ala Ile Ser Ser Ser Pro Gly Asn Ser Leu  
 ATGACCATGATTACGCAGATCTGCAGGTCGACGGATCCCAAGCTTCTTCTAGAGGTACCGCATGCGATATCGAGCTCTCCCGGAATTCAGT  
 TACTGGTACTAATGCGTCTAGACGTCCAGCTGCCTAGGGTTCGAAGAAGATCTCCATGGCGTACGCTATAGCTCGAGAGGGCCCTTAAGTGAC

BglII PstI Sall BamHI HindIII XbaI KpnI SphI EcoRV SstI SmaI EcoRI  
 HindII AccI

M13mp18  
 GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCTCTAGAGTCCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGC

5' \_\_\_\_\_ 3'

EcoRI KpnI BamHI Sall SphI  
 SstI SmaI XbaI AccI PstI HindIII  
 XmaI HincII

M13mp19  
 GCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTAC

5' \_\_\_\_\_ 3'

HindIII PstI XbaI SmaI SstI TGACCGGCAGCAAAATG  
 SphI Sall BamHI KpnI EcoRI 3' 5'  
 AccI XmaI Primer  
 HincII

Figura 17.-Secuencias "multisitios" de los bacteriófagos M13 utilizados.

#### 14.14 Clonación en el bacteriófago M13 y determinación de la secuencia por el método de Sanger .-

M13 es un fago filamentosos no lítico con ADN de cadena simple circular, capaz de infectar las células de E.coli absorbiéndose sobre su pelo F. Su ciclo de vida puede ser utilizado para la preparación del ADN de cadena simple necesario para la determinación de la secuencia por el método de Sanger.

La forma de doble cadena, denominada forma replicativa (RF), se utiliza como vector de clonación, insertándose en ella el fragmento a secuenciar. En una segunda etapa, la forma monocatenaria actúa como molde para la ADN polimerasa (Secuenasa) en las reacciones de secuenciado.

Para ello Messing construyó una serie de fagos M13 modificados, de la siguiente manera: insertó como marcador de selección en una región no esencial del fago una parte del operón lactosa de E.coli que comprendía la región reguladora y una parte del gen lac Z codificante para los 146 primeros residuos de la  $\beta$  -galactosidasa; además este fragmento de lac Z llevaba incorporada una región con numerosos sitios de restricción. En la figura 17 se expone la secuencia de esta región, con los sitios de restricción de los diferentes bacteriófagos M13 empleados.

Las bacterias hospedadoras del fago son JM 105 ( para los M13 mp18 y mp19 del tipo salvaje) o JM 103, cepa supresora de mutaciones ámbar , para los otros dos vectores M13 que poseen dos mutaciones ámbar. JM 103 y JM 105 (derivados de E.coli K12) poseen una delección en el operón lactosa que impide la producción de  $\beta$  -galactosidasa y una delección en la región codificante para la prolina sintetasa. Además estas razas contienen un episoma F', que porta el gen pro; en medio selectivo M9 este gen confiere a las células prototrofia para la prolina y permite el mantenimiento del

episoma en la célula hospedadora. El episoma F' porta también un gen  $\beta$ -galactosidasa alterado que codifica para un polipéptido carente de los aminoácidos 11 a 41. Además estas cepas producen 10 veces más represor de lo normal a causa de que presentan una mutación en el gen lac I (lac I<sup>q</sup>) del episoma F'. Después de que ha tenido lugar la infección de una de estas bacterias por el fago M13 y en presencia de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido, inductor del operón lac) los productos de los dos genes se complementan y las células producen una  $\beta$ -galactosidasa funcional capaz de hidrolizar el sustrato X-Gal (5 bromo-4 cloro-3 indolil- $\beta$ -galactósido) en bromocloroindol que es de color azul. Cuando el gen lac Z en M13 es interrumpido a causa de la introducción de un fragmento de ADN extraño, no ocurre tal complementación y no aparece color azul. Los halos no coloreados son aislados y utilizados para la preparación del ADN monocatenario recombinante que servirá de molde en las reacciones de secuenciado.

#### 14.14.1 Inserción de un fragmento de ADN foráneo en M13

Las formas RF de los diferentes vectores M13 están comercializadas por Amersham. La forma RF del fago M13 fue digerida por el o los enzimas adecuados, y paralelamente se aisló el fragmento de ADN cuya secuencia se quería determinar.

A continuación se procedió a la ligación en presencia del enzima T4 ADN ligasa en las condiciones previamente descritas (apdo. 14.4).

En general hemos utilizado de 50 a 100 ng de vector y una cantidad tal de fragmento adecuada para obtener una relación molecular vector/fragmento = 1/2 o 1/4.

**14.14.2 Transformación de bacterias por el bacteriófago M13recombinante .-**

Antes de efectuar la transformación, las bacterias hospedadoras JM 103 o JM 105 se hicieron competentes de la siguiente manera: se agito a 37°C un cultivo bacteriano en 50 ml de medio 2XYT. Cuando su D.O. a 600 nm alcanzo el valor de 0,6, 35 ml de cultivo fueron centrifugados durante 10 min a 830 xg (a 4°C) y el resto se conservo en hielo. El sedimento de células se resuspendió suavemente en 15 ml de una solución estéril y fría de CaCl<sub>2</sub> 50 Mm y se conservo 20 min en hielo. Tras una nueva centrifugación de 5 min en las mismas condiciones se obtuvo un sedimento que se resuspendió en 1 a 3 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM estéril y frío. Las células así tratadas pueden ser utilizadas directamente para la transformación o conservadas una noche en hielo, lo que aumenta el rendimiento de la transformación. Para llevar a cabo la misma, 200µl de células competentes se mezclaron con 5µl de la mezcla de ligación (apdo.14.4) y la mezcla se incubó durante 40 a 60 minutos en hielo, y después se sumergió en un baño a 42°C durante 3 minutos. Una vez que la mezcla fue enfriada hasta temperatura ambiente, se adicionó de 100 µl de células provenientes del cultivo, 15 µl de IPTG 100 mM, 3 ml de agar semisólido mantenido a 50°C y 50 µl de X-Gal al 2% en dimetilformamida. Después de homogeneización, la mezcla se vertió sobre una caja de Petri conteniendo medio sólido 2XYT y se incubó una noche a 37°C. Las colonias infectadas por un fago M13 no recombinantes dan lugar a halos azules mientras que los halos incoloros corresponden a las colonias infectadas por un fago M13 recombinante.

#### 14.14.3 Preparación del ADN monocatenario del bacteriófago M13 recombinante .-

Se inocularon entre 200 a 300 ml de medio 2XYT con células JM 103 o JM 105 conservadas sobre medio sólido M-9, incubándose a continuación a 37°C hasta que la densidad óptica del cultivo alcanzó el valor de 0,1 a 0,2 y entonces se repartió a razón de 10 ml en matraces erlemmeyer de 100 ml estériles. Cada uno de estos cultivos fue infectado en este momento con los fagos procedentes de un halo incoloro. Estos fueron previamente tratados de la manera siguiente: se recuperó el trozo de agar correspondiente al halo con la ayuda de una pipeta automática (1 ml) provista de una punta cuyo extremo fue cortado antes de esterilizarla en el autoclave y se le depositó en 500 µl de medio 2XYT. A continuación se incubó a 65°C durante 20 min para matar las bacterias hospedadoras y liberar los fagos y se transfirieron los 500 µl de medio que contenía los fagos a un erlemmeyer con 10 ml de cultivo de células hospedadoras. Los cultivos fueron agitados a 37°C durante 5 horas y después centrifugados a 12.700 xg durante 10 min para eliminar las bacterias. Los sobrenadantes (con los fagos) fueron recuperados y adicionados de 2 ml de PEG 6.000 25%, NaCl 2,5 M y mantenidos durante una noche a 4°C para que tuviese lugar la precipitación de los fagos. Se recogieron los precipitados por centrifugación durante 10 min a 12.700 xg, fueron resuspendidos en 1 ml de TE y centrifugados de nuevo en iguales condiciones. El sobrenadante conteniendo los fagos fue precipitado de nuevo por adición de 200 µl de PEG 6.000 25%, NaCl 2,5 M manteniendo la mezcla 30 min a 0°C. Después de centrifugar (10 min a 12.700 xg a 4°C) se resuspendieron los sedimentos (conteniendo los fagos libres de toda traza de sobrenadante) en 100 µl de TE y se trataron con ARNasa (10

µg/ml, concentración final) durante 10 min a 55°C.

Después de varias extracciones con fenol y con fenol-cloroformo (apdo.14.1) el ADN fue precipitado con etanol (apartado 14.2) y redissuelto en 30 µl de TE. Este protocolo permitió obtener una suspensión de fagos cuya concentración de ADN varió entre 1 y 2 µg/µl.

#### **14.14.4 Análisis del ADN monocatenario mediante electroforesis en gel.**

Para verificar de forma rápida que los fagos recombinantes tenían efectivamente el tamaño esperado, bastó con realizar una electroforesis sobre gel de agarosa al 1% de una alícuota del sobrenadante de cultivo de bacterias infectadas por los fagos provenientes de los halos incoloros y compararla con la misma alícuota procedente de un cultivo infectado por fagos no recombinantes obtenidos de un halo azul.

Antes de depositarlo sobre el gel, el sobrenadante fue tratado en la forma siguiente: 40 µl de sobrenadante del cultivo fueron adicionados de 2 µl de SDS 5% y de 6 µl de colorante y calentados a 65°C durante 10 min. Después de la electroforesis, las bandas de ADN fueron visualizadas bajo UV después del tratamiento con bromuro de etidio.

#### **14.14.5 Reacción de secuenciación.**

Se ha utilizado la técnica de Sanger [97,98]. Este método se basa en el hecho de que, al ser sintetizada una nueva cadena de ADN por la polimerasa I (fragmento de Klenow), dicha síntesis puede ser interrumpida prematuramente por la incorporación al azar en la cadena en formación de un didesoxinucleótido (ddNTP) en lugar de un desoxinucleótido (dNTP). En efecto, ya que los didesoxinucleótidos no poseen el grupo 3' hidroxilo impiden



la formación del enlace fosfodiéster siguiente.

Se ha utilizado el Kit Secuenasa (USB) siguiéndose el protocolo del fabricante ( protocolos "step-by-step" para secuenciación con secuenasa,[99]).

El enzima secuenasa es la ADN polimerasa del fago T7 genéticamente modificada[100].

La conveniencia de su uso se debe a que muestra:

- Una gran eficacia para la incorporación de análogos de desoxinucleótidos ( ddNTPs, tiodNTPs, dITP, 7-deaza-dGTP).
- Una reducida actividad exonucleásica 3'-----> 5'.
- Una elevada velocidad de reacción.

Como fragmentos iniciadores se utilizaron el cebador universal comercializado por USB y los oligonucleótidos preparados por Eurongetec S.A. (Lieja).

#### 14.15 Programas de ordenador utilizados .-

##### 14.15.1 Análisis de la secuencia nucleotídica .-

El programa ANALYSEQ elaborado por Staden [101] permite traducir ,buscar regiones complementarias, establecer mapas de restricción y tablas de uso de codones. Esta última opción permite determinar la parte codificadora de una secuencia oligonucleotídica;en efecto,hay un uso preferencial de ciertos codones en las porciones codificantes.Tres son los factores que contribuyen a este uso preferencial:

- 1 ) El número desigual de aminoácidos:ciertos aminoácidos son utilizados más frecuentemente que otros.
- 2 ) El número desigual de codones para los diferentes aminoácidos.
- 3 ) El uso preferencial de uno o varios codones para un aminoácido (codon preferente).

El método compara una distribución de codones esperada (en nuestro caso el uso de codones de la DD-carboxipeptidasa de

S. R61) con la de la secuencia a analizar. Esto implica varias hipótesis:

- El uso de codones del gen estudiado es similar al utilizado como estándar .
- La secuencia es codificante en una sola fase de lectura.
- En la fase codificante, el codon abc tiene una frecuencia definida  $F_{abc}$ . El programa desplaza una ventana de la amplitud seleccionada a lo largo de toda la secuencia, codon por codon y calcula la probabilidad para este fragmento de secuencia de ser codificante según el uso de codones del estándar.

Los resultados se presentan bajo la forma de gráficos que expresan esta probabilidad en función de la posición en la secuencia, para cada fase de lectura.

El programa traza de igual forma una línea continua en el nivel del 50% de probabilidad sobre el gráfico de la fase que presenta de manera constante el mejor porcentaje de similitud.

Los codones de terminación se indican mediante barras verticales en medio de la gráfica y los ATG por una línea vertical sobre el eje de abcisas.

Este método permite no solamente localizar la región codificante y la fase de lectura, sino también detectar en una secuencia que acaba de ser determinada, los errores que provocan un salto de la fase de lectura.

- Para la búsqueda de los sitios de los enzimas de restricción se utilizo el programa MAPLOT incluido en el conjunto de programas y técnicas de programación (Software) GCG

(Genetics Computer Group .Universidad de Wisconsin).

- Para las predicciones de las estructuras secundarias del ADN y del ARNm se utilizaron otros dos algoritmos incluidos

en el Software GCG :

1 ) El programa TERMINATOR permite identificar una secuencia de ADN susceptible de formar una estructura en horquilla capaz de funcionar como un terminador de la transcripción ( método de Brendel et al [102,103].

2) El programa FOLD calcula la estructura más estable de las moléculas de ARN empleando el método de Zuker [104,105].

#### 14.15.2 Análisis de la secuencia de aminoácidos .-

##### 1) Predicción de las estructuras secundarias :

El programa ANALYSEP elaborado por Staden permitió analizar la secuencia aminoacídica de la proteína y en particular predecir las estructuras secundarias presentes en la proteína por el método de Garnier et al [106].

EL programa PEPTIDESTRUCTURE contenido en el Software GCG, permitió igualmente obtener las predicciones de las estructuras secundarias por el método de Garnier et al [106] y por el método de Chou y Fasman[107].

##### 2) Determinación de la hidrofobicidad :

El programa PEPLOT ( GCG ,Universidad de Wisconsin) sirve para determinar la hidrofobicidad de una proteína por el método de Kyte y Doolittle [108] y por el método de Goldman et al [109].

##### 3) Cálculo del punto isoeléctrico teórico :

El programa ISOELECTRIC ( GCG,Universidad de Wisconsin) permite calcular el punto isoeléctrico teórico de la proteína, así como su carga neta en función del pH. Este valor se obtiene calculando la resultante de las curvas de titulación de los residuos ácidos y básicos.

### 14.15.3 Comparación de la secuencia .-

Se ha seguido el método descrito por Joris etal[50]. Las secuencias de aminoácidos son alineadas la una con la otra utilizando el método de Goad y Kanehisa (SEQHP)[110], que es una variante del algoritmo de Needleman-Wunsch[111]. El programa establece una matriz de comparación donde cada eje está compuesto por la secuencia de aminoácidos de cada una de las dos proteínas a comparar. En este método, las comparaciones se hacen a partir de dos aminoácidos, uno de cada proteína. Se atribuye un grado de similitud (distancia, score) a cada par de aminoácidos. El valor de éste es función de las frecuencias relativas de sustitución de aminoácidos entre familias de proteínas análogas; la distancia (score) varía entre 0 y -17. Cuanto más negativa es la distancia, más elevada es la similitud. El programa busca los segmentos que presentan una distancia superior a un valor definido por el investigador (-50 en nuestro caso). La distancia obtenida para un alineamiento determinado, es la suma de las distancias individuales de los pares de aminoácidos alineados. A cada delección que se introduce se le atribuye una penalización de 8. La significación estadística de la comparación global se evalúa utilizando el programa SEQDP. Para cada secuencia, el programa SEQDP genera secuencias aleatorias que tienen la misma composición en aminoácidos (en nuestro caso, el número de secuencias generadas era igual a 20). Compara las 20 secuencias obtenidas a partir de la secuencia 1 con las otras 20 provenientes de la secuencia 2 e intenta alinearlas según Needleman y Wunsch (desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal). La frecuencia de los "scores" se distribuye según una curva de Gauss. El "score" original debe estar al menos a 5 SDU (unidades estándar de desviación) del "score medio"

para ser significativo.

-El programa BESFIT (GCG) utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman [112] para buscar los segmentos más homólogos entre dos proteínas. Este algoritmo construye igualmente una matriz de comparación empleando una variante de la matriz de frecuencias relativas de sustitución de un aminoácido por otro y alinea las secuencias a partir del extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal buscando el mejor camino, y forzando la alineación al introducir deleciones o inserciones para obtener la mejor homología. El "score" general de la comparación de una sub-secuencia con otra representa la suma de los "scores" de sustitución. El "score" disminuye cada vez que el programa lleva a cabo una deleción o una inserción. En cada deleción o inserción introducida la penalización es de -8 para la primera deleción o inserción y - 0,3 para las siguientes. [Así, si el programa hace una deleción de 3 aminoácidos la penalización es igual a  $(-8) + (-3) + (-3)$ ].

## 15. TECNICAS RELATIVAS A LAS PROTEINAS .-

### 15.1 Detección inmunológica de los clones productores de DD-transpeptidasa .-

Para detectar los clones productores de DD-tanspeptidasa, se ha puesto a punto una técnica inmunológica [113]. Se ha utilizado el enzima purificado según la técnica descrita (Nguyen-Distèche et al, 1.982 [68] para la producción de anticuerpos en conejo que han sido suministrados por la casa Gamma S.A. (Tavier, Bélgica). El complejo antígeno-anticuerpo puede ser detectado mediante el sistema "Immun Blot" de Biorad, empleando la fosfatasa alcalina acoplada a anticuerpos de cabra dirigidos contra anticuerpos de conejo.

La técnica adoptada fue la siguiente:

Se dispusieron las membranas de nitrocelulosa (Millipore HATF) sobre la superficie de las cajas que contenían las colonias transformadas, procurando que el contacto colonias y el agar fuera el máximo posible de manera que el enzima eventualmente presente en las colonias y/o el excretado se fijara a la membrana de nitrocelulosa.

Ya que la DD-peptidasa de S. K15 es membranosa, es necesario previamente solubilizarla. Para ello, se depositó sobre el filtro de nitrocelulosa un papel Wattman 3 MM impregnado de una solución de SDS 2% en Tris-HCl 25 mM pH 8, incubándose la placa a 37°C durante 30 minutos. Esta operación se repitió 3 veces. A continuación las membranas de nitrocelulosa se recuperaron y se trataron según el siguiente protocolo de Biorad:

Se sumergieron las membranas en una solución de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500mM (TBS) y seroalbúmina bovina (BSA) 3%, agitándose suavemente durante 1 h. A continuación fueron lavadas dos veces, 5 minutos cada vez, en una solución de TTBS (TBS + 0,05% de Tween 20) y transferidas a la solución de TTBS + 1% BSA que contenía el antisuero específico anti-DD-peptidasa de S. K15, diluido 1.000 veces, incubándose durante una noche a temperatura ambiente en agitación suave. Al día siguiente las membranas fueron lavadas dos veces durante 30 minutos en TTBS, transferidas a una solución que contenía el segundo anticuerpo acoplado a la fosfatasa alcalina (anticuerpos de cabra anti Ig de conejo a una dilución 1:3.000 en TTBS + 1% BSA) e incubados durante una hora. Después de dos rápidos lavados (5 min en TTBS y 5 min en TBS) se practicó el revelado sumergiendo las membranas durante un máximo de 15 minutos en 100 ml de tampón carbonato  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M,  $\text{MgCl}_2$  10 mM pH 9,8 adicionados de 1 ml de una solución de NBT (30 mg de cloruro de p-Nitro Azul Tetrazolio disueltos en 1 ml de dimetilformamida 70%) y de 1 ml de una solución de BCIP (15 mg de 5Bromo-4 Cloro-3 Indolil fosfato de toluidina

disueltos en 1 ml de dimetilformamida). En el lugar donde se habían fijado los anticuerpos tenía lugar la aparición de un precipitado púrpura a consecuencia de la acción de la fosfatasa alcalina sobre su sustrato BCIP, en presencia de NBT.

## 15.2 Localización de la DD-peptidasa hiperproducida

.-

### 15.2.1 Preparación de las membranas citoplasmáticas y de las fracciones solubles .-

Las membranas de los diferentes clones fueron preparadas según el método descrito por Leyh-Bouille et al[114]. Para ello se dispuso de cultivos de 48 h a 30°C en agitación en medio TSB + thiostreptona (50 µg/ml). El micelio fue recogido por centrifugación a 19.000 xg a 4°C durante 25 min. El sobrenadante se recogió y se concentró 10 veces por ultrafiltración en Amicon (membrana YM10) y se conservó a -20°C. Después de un lavado en tampón Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 y una nueva centrifugación (21.000 xg a 4°C, 25 minutos), el micelio se resuspendió en 200 ml de Tris-ClH 0,1 M pH 7,5, sacarosa 25% y se homogeneizó; la suspensión fue adicionada de lisozima a una concentración final de 1mg/ml y a continuación se mantuvo a 4°C durante 2-3 horas agitando suavemente. La acción de la lisozima fue seguida al microscopio de contraste de fase, centrifugándose la mezcla (30.000 xg a 4°C durante 1 h) en el momento en que se consideró suficiente la transformación en protoplastos.

El sobrenadante, que contenía las proteínas liberadas a partir del micelio por la acción de la lisozima ("lisozima-liberables") fue dializado frente a Tris-HCl 25 mM pH 7,5 durante 24 h y después concentrado 10 veces por ultrafiltración sobre Amicón (membrana YM10).

El sedimento fue resuspendido en 20 ml de tampón Tris-HCl

50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM,mas ADNasa (0,1 mg/ml concentración final) e incubado durante 1 h a temperatura ambiente.A continuación se centrifugó a 830 xg durante 10 min,el sobrenadante obtenido se conservó en hielo y el sedimento se resuspendió en 15 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ,centrifugándose de nuevo.De esta forma se obtuvieron dos sobrenadantes que contenían las membranas desprovistas de restos de micelio.Las membranas fueron recogidas por una centrifugación a 30.000 xg a 4°C.El sedimento de membranas fue resuspendido en 20 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 , MgCl<sub>2</sub> 5 mM y vuelto a centrifugar durante 25 min a 30.000 xg a 4°C.

Finalmente las membranas se resuspendieron en 1-2 ml de tampón fosfato 10 mM pH 7,5 conservándose a -20°C.

#### 15.2.2 Extracción de la DD-peptidasa mediante bromuro de cetiltrimetilamonio (BCTA) .-

Se siguió la técnica descrita por Nguyen-Distèche et al(1982)[68].

Los clones fueron cultivados en agitación a 30°C durante 48 h en 200 ml de medio TSB adicionado de thiostreptona (50µg/ml).El micelio fue recogido por centrifugación (11.600 xg ,25 min a 4°C) y lavado en tampón fosfato 30 mM pH 7,5,antes de ser incubado durante 1 h a 37°C en una solución (10 ml/g de micelio húmedo) de BCTA 2% en tampón fosfato 30 mM pH 7,5.El micelio fue separado por filtración y el filtrado se conservó durante una noche en hielo a 4°C antes de ser centrifugado a 30.000 xg durante 45 min para eliminar el BCTA que había precipitado.El sobrenadante se conservó a -20°C.



$E_{280}/E_{260}$	Nucleic acid (%)†	Factor
1.75	0	1.118
1.60	0.30	1.078
1.50	0.56	1.047
1.40	0.87	1.011
1.30	1.26	0.969
1.25	1.49	0.946
1.20	1.75	0.921
1.15	2.05	0.893
1.10	2.4	0.863
1.05	2.8	0.831
1.00	3.3	0.794
0.96	3.7	0.763
0.92	4.3	0.728
0.90	4.6	0.710
0.88	4.9	0.691
0.86	5.2	0.671
0.84	5.6	0.650
0.82	6.1	0.628
0.80	6.6	0.605
0.78	7.1	0.581
0.76	7.8	0.555
0.74	8.5	0.528
0.72	9.3	0.500
0.70	10.3	0.470
0.68	11.4	0.438
0.66	12.8	0.404
0.64	14.5	0.368
0.62	16.6	0.330
0.60	19.2	0.289

Tabla 7.-Tabla utilizada para valorar la concentración de proteínas de una solución por medida de la absorbancia a 280 nm y a 260 nm.

### 15.3 Valoración de la concentración en proteínas de una solución .-

#### 15.3.1 Método de Folin .-

A 50  $\mu$ l de la muestra se le añadieron 500  $\mu$ l del reactivo siguiente recién preparado : 100  $\mu$ l de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  2% + 100  $\mu$ l de KNa tartrato 4,5% + 10 ml de  $\text{NaCO}_3$  4% en NaOH 0,1 N, SDS 1%.

Después de una incubación de 20 min a 37°C se añadieron 50  $\mu$ l de reactivo de Folin diluido 2 veces, incubándose de nuevo 20 min a 37°C y midiéndose finalmente la Absorbancia a 740 nm.

La curva patrón se construyó a partir de una solución de BSA 1 mg/ml.

Este procedimiento fue utilizado para estimar la concentración en proteínas de las fracciones membranosas.

#### 15.3.2 Método de Bradford .-

A 100  $\mu$ l de la muestra se añadió 1 ml de la solución Bradford ( 100 mg de azul Coomassie G/litro de etanol 5%, ácido fosfórico 10%). La absorbancia a 595 nm se midió después de 5 minutos y antes de una hora. La curva patrón se construyó a partir de una solución de BSA 1 mg/ml.

Este método fue empleado para estimar la concentración en proteínas de las fracciones solubles.

#### 15.3.3 Medida de la absorbancia a 280 y 260 nm .-

Método de Kalckar [115].

Se midió la absorbancia (A) a 280 y a 260 nm de una alícuota de la solución y se calculó la relación  $A_{280}/A_{260} \cdot A$

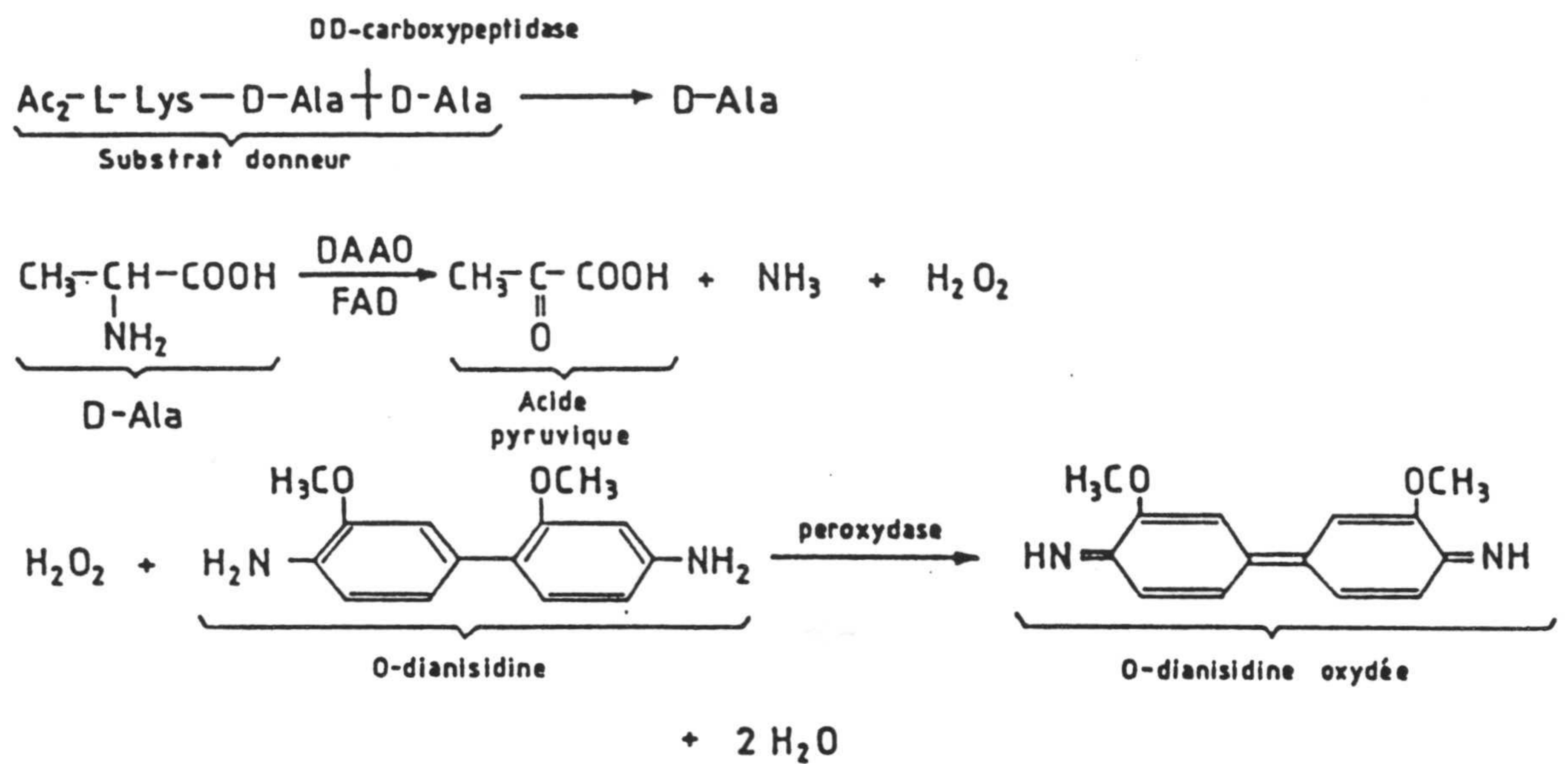


Figura 18.- Esquema representativo del método de dosificación enzimática de la D-Ala.

partir de esta relación , en la tabla 6 se obtuvo un factor que permitió calcular la concentración en proteínas de la solución (en mg/ml) según la siguiente expresión:

$$\text{mg proteína/ml} = A_{280} \times \text{factor} \times 1/d$$

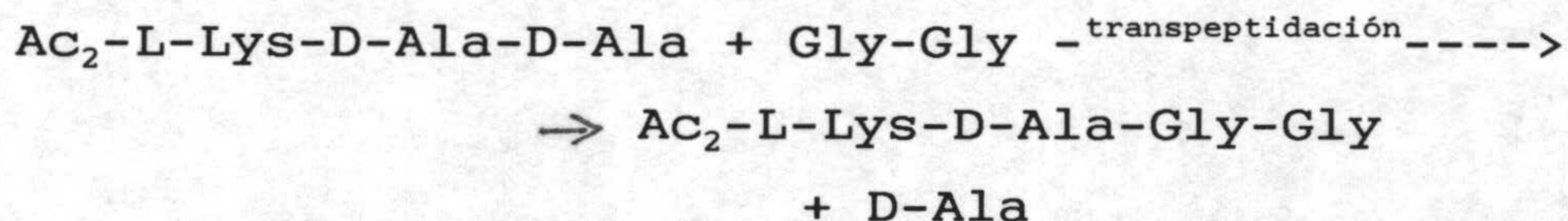
d = longitud del camino óptico en cm (anchura de la cubeta empleada en la medida de la absorbancia).

Esta técnica fue utilizada para estimar la concentración en proteínas del extracto BCTA.

#### 15.4 Valoración de la actividad transpeptidásica .-

La actividad transpeptidásica fue medida incubando a 37°C el enzima en presencia de sustratos sintéticos N-N-diacetil-L-lisil-D-alanil-D-alanina (sustrato donador) y glicil-glicina (sustrato aceptor).

La reacción de transpeptidación es la siguiente:



En nuestro trabajo se incubaron 180 nmoles del sustrato donador y 50 nmoles de Gly-Gly en presencia del enzima en un volumen final de 35 µl de tampón fosfato 7 mM pH 7,5 con o sin BCTA (0,008%), o de tampón Tris-HCL 2 a 4 mM ph 8, NaCl 30 a 70 mM durante un tiempo variable (de 30 minutos a 2 horas).

La actividad transpeptidásica se estimó midiendo la D-Ala liberada o bien la cantidad de transpéptido formado.

##### 15.4.1 Valoración de la D-Ala liberada por el método de la DAAO .-

La cantidad de D-Ala liberada fue estimada mediante una reacción acoplada con la oxidasa de los D-aminoácidos

(DAAO) y con la peroxidasa en presencia de flavin adenin dinucleótido (FAD). La D-Ala es oxidada a ácido pirúvico por la DAAO, con formación simultánea de agua oxigenada. Esta última, en presencia de peroxidasa, oxida la ortodiansidina (figura 8). La cantidad de ortodiansidina oxidada, de color naranja, es valorada midiendo la absorbancia a 535 nm.

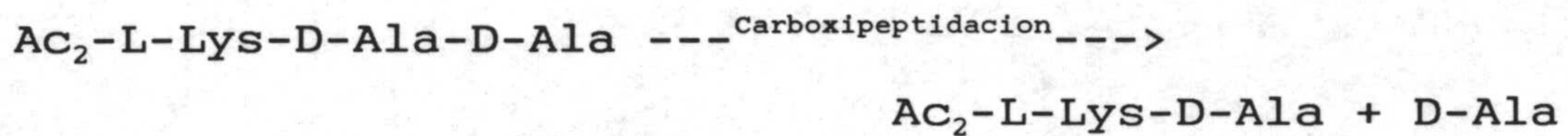
Se procedió de la manera siguiente: después de la incubación del enzima con los sustratos se añadieron 77  $\mu$ l de una mezcla conteniendo 60  $\mu$ l de FAD (50  $\mu$ g/ml en Tris-HCl 0,1 M pH 8), 10  $\mu$ l de peroxidasa (Boehringer, 50  $\mu$ g/ml en agua), 2  $\mu$ l de DAAO (5 mg/ml,Boehringer) y 5  $\mu$ l de cloruro de ortodiansidina (5 mg/ml en agua, se incubó a 37°C durante 10 min y se añadieron 300 $\mu$ l de la mezcla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / Metanol / H<sub>2</sub>O ( 60/50/50 : V/V/V ) antes de medir la absorbancia a 535 nm.

#### 15.4.2 Valoración del producto transpeptidado .-

La actividad transpeptidásica fue estimada de manera más específica dosificando el producto transpeptidado [<sup>14</sup>C] Ac<sub>2</sub>-L-Lys-D-Ala-Gly-Gly formado después de incubar el enzima con 180 nmoles de donador Ac<sub>2</sub>-L-Lys-D-Ala-D-Ala y 50 nmoles de [<sup>14</sup>C] Gly-Gly 10 mM. Tras separar el producto transpeptidado del exceso de aceptor mediante electroforesis en papel a pH 5,6 en el tampón siguiente: piridina, ácido acético, agua (4/1/100 , V/V/V), durante 2 horas a voltaje constante (20 voltios/cm). Los picos radioactivos fueron localizados con la ayuda de un barredor de radiocromatograma que identifica las zonas radioactivas. Dichas zonas fueron seccionadas en tiritas de 1 cm de ancho e introducidas en pequeñas ampollas. Se añadió 0,25 ml de liquido de centelleo en tolueno (20 g de PPO y 500 mg de POPOP por litro de tolueno) (apdo. 9) y se midió la radioactividad de cada fracción en un contador de centelleo líquido.

## 15.5 Valoración de la actividad carboxipeptidásica

La actividad carboxipeptidásica fue medida estimando la D-Ala liberada después de incubar el enzima en presencia de 180 nmoles del sustrato donador exclusivamente. La D-Ala liberada fue dosificada por el método de la DAAO (apdo. 14.14.1).



## 15.6 Electroforesis en placa de gel de poliacrilamida en presencia de SDS y revelado de las proteínas

Preparación del gel: Se siguió la técnica de Laemli y Favre [116]. El gel estaba compuesto de gel concentrador (6% de poliacrilamida) y de gel separador (10% de poliacrilamida). La composición de cada uno era la siguiente:

- Gel concentrador: 1 ml de solución de acrilamida (30% de acrilamida, 0,8% de bisacrilamida) + 1,25 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 + 50  $\mu$ l de SDS 10% + 2,65 ml de H<sub>2</sub>O + 5  $\mu$ l de Temed + 50  $\mu$ l de persulfato amónico 10%.
- Gel separador: 6,66 ml de solución de acrilamida (30% acrilamida, 0,8% bisacrilamida) + 5 ml Tris-HCl 1,5 M ph 8,8 + 200  $\mu$ l de SDS 10% + 8,14 ml de H<sub>2</sub>O + 20  $\mu$ l de Temed + 200  $\mu$ l de persulfato 10%.
- Electroforesis : fue realizada a un voltaje constante de 200 voltios ,durante 45 min a (4°C). El tampón utilizado tenía la composición siguiente: Tris 50 mM, Glicocola 384 mM, SDS 0,1%, pH 8,3.
- Preparación de las muestras : A 15  $\mu$ l de la muestra, se le añadieron 15  $\mu$ l de la solución desnaturalizante con la

siguiente composición: Tris-HCl 19 mM pH 6,8, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,003%, mercaptoetanol 10%, SDS 3%. Las mezclas fueron hervidas durante 1 min y depositadas sobre el gel.

El glicerol sirve para espesar la muestra. El azul de bromofenol migra más aprisa que las proteínas y marca el frente del disolvente. El mercaptoetanol rompe los puentes disulfuros. El SDS desnaturaliza las proteínas solubles, solubiliza las proteínas de membrana y las carga negativamente de manera uniforme; las proteínas se encontraran en forma de bastoncillos cuya longitud y velocidad de migración dependerá exclusivamente de la masa molecular.

Las proteínas fueron puestas de manifiesto por tres técnicas diferentes:

#### 15.6.1 Tinción del gel con azul Coomassie .-

Después de la electroforesis, las proteínas fueron coloreadas situando el gel en una solución de azul Coomassie G-250 0,07% (P/V) en metanol 45% (V/V), ácido acético 9,2% (V/V) durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave.

Seguidamente, el gel fue decolorado durante varias horas en una mezcla de metanol 5% (V/V) y ácido acético 7,5% (V/V).

#### 15.6.2 Fluorografía .-

Esta técnica permite detectar la presencia de radioactividad en el gel de poliacrilamida con la ayuda de salicilato sódico.

Las partículas  $\beta$  emitidas por el [ $^{35}\text{S}$ ] o el [ $^{14}\text{C}$ ] interaccionan con esta sustancia fluorescente, que emite entonces una luz capaz de impresionar una película

fotográfica. La técnica ha sido puesta a punto por J.P. Chamberlain[118].

Se utilizó esta técnica para revelar las proteínas a las que se había unido la bencilpenicilina radioactiva.

Las muestras fueron incubadas durante 15 minutos a 37 °C en presencia de penicilina radioactiva [<sup>35</sup>S] o [<sup>14</sup>C] antes de añadir la solución desnaturizante (apartado 15.6) que contenía la bencilpenicilina no radioactiva (0,1 M, concentración final). Las muestras fueron hervidas a continuación durante 1 minuto y sometidas a electroforesis en las condiciones ya descritas.

Tras la electroforesis, el gel fue sumergido durante 2 x 5 min en un baño de ácido acético 7% para fijar las proteínas y eliminar la radioactividad libre, y enseguida fue teñido con azul Coomassie (apdo. 15.6.1).

Después de la decoloración, el gel fue sumergido durante 30 min en agua destilada para eliminar toda traza de ácido antes de ser inmerso en una solución de salicilato sódico 16% (P/V), etanol 40% (V/V° durante 30 minutos.

Finalmente, el gel fue secado a vacío a 60°C durante 2 h y puesto en contacto con una película fotográfica (X-AR 5 Kodak) preimpresionada, a -70°C durante varios días ( 2 a 10 días).

Después de la exposición, la película fue revelada en tres baños sucesivos : 3 minutos en el revelador (Metinol, Agfa Gevaert), 2 minutos en el ácido acético 4% y 5 minutos en el fijador (Acidofix, Agfa Gevaert). Inmediatamente fue lavado en agua destilada y secado.

#### 15.6.4 Densitometría .-

Para efectuar las medidas de densitometría se utilizó el densitómetro modelo 620 de Biorad conectado a un ordenador (IBM).

El aparato valora la D.O. de cada banda de proteína



revelada mediante tinción con azul de Coomassie o mediante fluorografía y envía los datos al ordenador que los transforma y los sintetiza, dando una superficie correspondiente a cada pico de proteína. Se utilizaron como referencias la DD-peptidasa de S. R61 y su derivado [<sup>14</sup>C] bencilpenicilina.

#### 15.7 Precipitación con acetona .-

A un volumen de la muestra se le añadieron 2 volúmenes de acetona a -20°C. Después de agitar la mezcla, ésta fue colocada a -20°C (durante 30 minutos) y a continuación centrifugada a 28.000 xg durante 30 min a (-10°C). El sedimento fue disuelto en tampón Tris-HCl 25 mM pH 8, NaCl 0,5 M, DTT 0,2 mM y conservado a -20°C.

#### 15.8 Cromatografía de exclusión molecular .-

Se utilizó la columna Superdex 200, de grado preparativo 16/60 ( LKB, Pharmacia, Upsala, Suecia), que es un tamiz molecular a base de agarosa.

La columna fue conectada a un sistema de F.P.L.C. Las proteínas de pequeño tamaño difunden a través de la matriz y son eluidas por orden de tamaño decreciente. Por el contrario, las proteínas más grandes salen con el "volumen de exclusión" o "volumen vacío".

La columna Superdex permite separar con buena resolución proteínas globulares de masas moleculares comprendidas entre 10.000 y 600.000 daltons.

La utilización de un tampón con una concentración de sales al menos de 0,15 M suprime toda interacción no específica de la matriz con las proteínas ácidas o básicas. Se utilizó el siguiente tampón:

Tris-HCl 25 mM pH 8, NaCl 0,5 M, DTT 0,2 mM, (el tampón fue preparado con agua milli Q y filtrado por filtro Millipore

0,22  $\mu\text{m}$  antes de su utilización. Las proteínas de referencia y las muestras fueron también filtradas por filtros Millipore antes de ser depositadas en la columna. Para calibrar la columna se utilizó el azul dextrano ( $V_0 = 40$  ml), la urea ( $V_e = 120$  ml), la DD-peptidasa de Actinomadura R39 (Mr 53.000,  $V_e = 70$  ml) y la anhidrasa carbónica (Mr 29.000,  $V_e = 82$  ml).

La cromatografía fue llevada a cabo a temperatura ambiente, con un flujo de 1 ml/min. Se recogieron fracciones de 1 ml que fueron conservadas a 4°C.

El perfil cromatográfico de las proteínas fue determinado midiendo la absorbancia a 280 nm.

### **Capítulo III : RESULTADOS**

Primera parte : CLONACION Y SECUENCIADO DEL GEN CODIFICANTE PARA LA DD-TRANSPEPTIDASA DE *Streptomyces* K15.

Segunda parte : EXPRESION DE LA DD-PEPTIDASA K15 EN *Streptomyces* Y ESTUDIO DE LA DD-PEPTIDASA PRODUCIDA EN EL MEDIO DE CULTIVO POR *Streptomyces lividans* PM4.

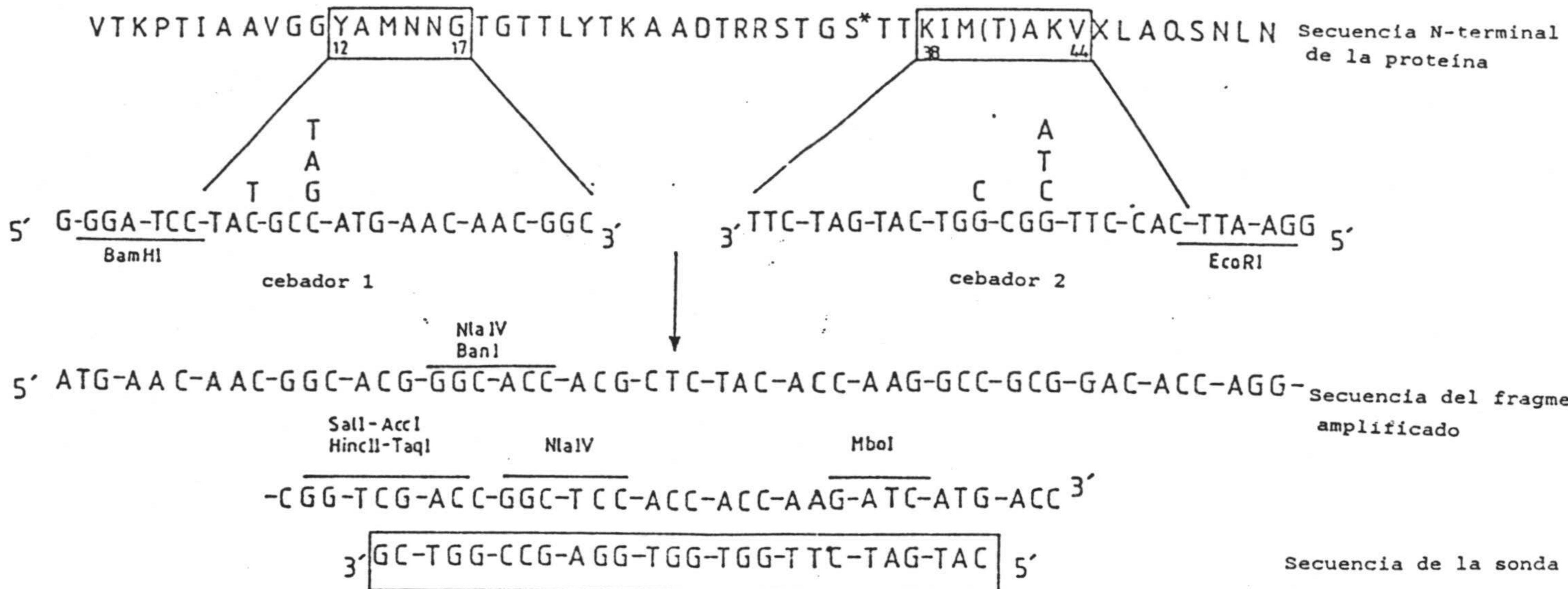


Figura 19.-Construcción de una sonda no degenerada a partir de la secuencia aminoacídica N-terminal de la DD-peptidasa de *Streptomyces* K15.

## **CAPITULO III: RESULTADOS**

### **Primera parte: CLONACION Y SECUENCIADO DEL GEN CODIFICANTE PARA LA DD-TRANSPEPTIDASA DE *Streptomyces* K15 .-**

#### **1. CLONACION DEL GEN CODIFICANTE PARA LA DD-TRANSPEPTIDASA *Streptomyces* K15 .**

##### **1.1. Preparación de una sonda no degenerada (Figura 19).**

A partir de la secuencia N-terminal de la proteína, determinada por vía química (Leyh-Bouille et al [75]), un oligonucleótido de 110 pares de bases fue sintetizado in vitro a partir del ADN genómico utilizando la PCR (M&M 14.13), técnica que permite amplificar una región específica del ADN a partir de una pequeña cantidad de ADN que contiene dicha región .

Este fragmento fue subclonado en el bacteriófago M13 y secuenciado. La secuencia determinada correspondió exactamente a la esperada.

Una sonda no degenerada de 26 pb fue entonces seleccionada a partir de ese fragmento y sintetizada.

##### **1.1.1 Amplificación del ADN (PCR) .**

A partir de la secuencia aminoacídica conocida, una secuencia oligonucleotídica fue deducida tomando como modelo la utilización de codones de la DD-peptidasa de *Streptomyces* R61 [20]; dos oligonucleótidos , complementarios de las dos secuencias situadas cada una sobre una hebra diferente de ADN que encuadran la región a amplificar, fueron seleccionados afín de obtener dos

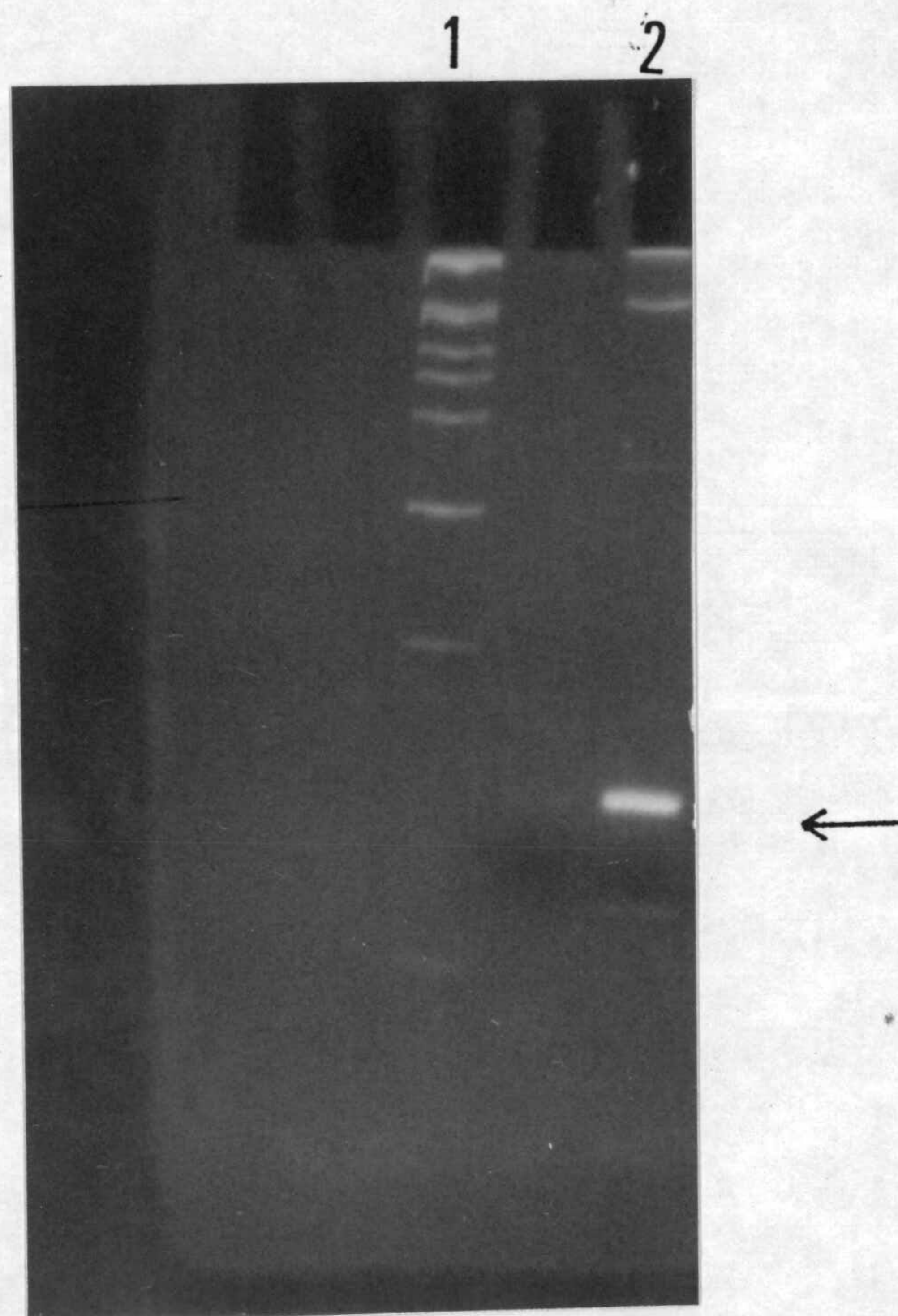


Figura 20.-Electroforesis en gel de poliacrilamida (7%) del oligonucleótido procedente del ADN de S.K15 y amplificado mediante la PCR.

Pocillo 1 : pBR322 / Hinf I.  
Pocillo 2 : ADN amplificado.

oligonucleótidos cebadores lo menos degenerados posible.(Figura 19).

Como cebador para la hebra codificadora utilizamos la secuencia oligonucleotídica correspondiente a los aminoácidos 12 a 17 y como cebador para la hebra complementaria la secuencia oligonucleotídica correspondiente a los aminoácidos 38 a 44.A fin de facilitar la posterior clonación del fragmento amplificado en el bacteriófago M13,un sitio de restricción fue añadido al extremo 5' de cada cebador (Bam HI para el primero y Eco RI para el segundo).

Como consecuencia de la degeneración del código genético,para cada cebador existen 8 posibles secuencias nucleotídicas.Por esta razón,en nuestro experimento utilizamos una mezcla de estos oligonucleótidos. Se realizaron 30 ciclos de desnaturalización,hibridación y polimerización,a partir de los cebadores en las condiciones detalladas en el capítulo M&M :14.13.

#### 1.1.2. Determinación de la secuencia del fragmento amplificado y elección de la sonda .-

El ADN amplificado fue depositado sobre un gel de poliacrilamida y sometido a una electroforesis (figura 20). La banda principal,que poseía el tamaño esperado ( $\pm$  112 pb) fue recuperada por difusión (M&M 14.9.2),subclonada en M13 y secuenciada (84 pb).(Figura 21).

La secuencia aminoacídica deducida de la secuencia nucleotídica es idéntica a la obtenida por via química.

A partir de la secuencia nucleotídica determinada,elegimos un oligonucleótido de 26 pares de bases (figura 21).Esta sonda no degenerada fue sintetizada por Eurogentec S.A. (U.Lieja),marcada con [<sup>32</sup>P] ATP y posteriormente utilizada para identificar los clones portadores del gen.

Los sitios de restricción presentes en el fragmento amplificado (figura 19) fueron localizados con ayuda del ordenador.Un sitio Sal I fue localizado en la región

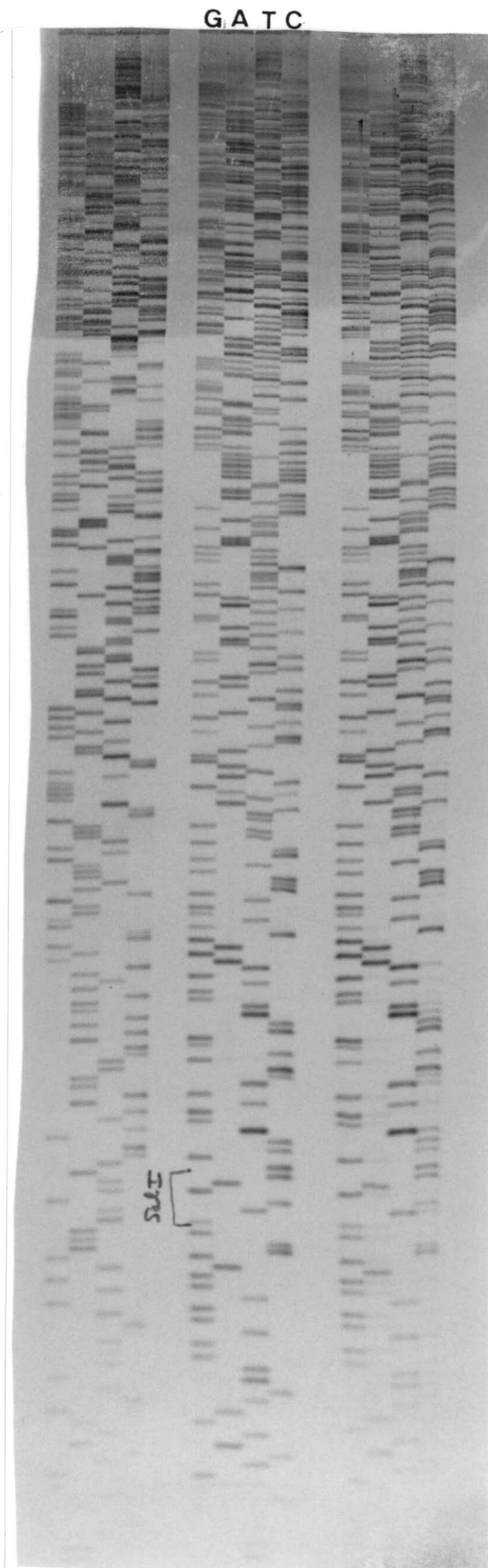


Figura 21.- Autorradiograma del gel de secuenciado del fragmento amplificado clonado entre los sitios Bam HI / Eco RI del fago M13 tg 131.

1) G; 2) A; 3) T; 4) C.



correspondiente al extremo 3'terminal de la sonda.

## 1.2. Preparación de los bancos de genes .-

### 1.2.1 Digestión del ADN genómico de *Streptomyces* K15

El ADN genómico de S. K15 fue parcialmente digerido por los enzimas de restricción Bam HI, Bcl I y Bgl II . Se utilizaron 2 unidades de enzima por µg de ADN y las digestiones se realizaron a 37°C durante 2 h.

### 1.2.2 Digestión del vector.-

El plásmido multicopia pBR322 (E.coli) utilizado como vector de clonación fue digerido por Bam HI (2 unidades de enzima por µg de plásmido, durante 2 h a 37°C).

A continuación, a fin de aumentar el porcentaje de recombinantes, el vector fue desfosforilado por medio de la fosfatasa alcalina bacteriana (BAP).(M&M :14.5).

### 1.2.3. Ligación .-

Esta etapa permite la inserción de los fragmentos de ADN de S.K15 en el vector de clonación.

2 µg de ADN cromosómico de S. K15, parcialmente digeridos por Bam HI, Bcl I o Bgl II y 1 µg de pBR322 linearizado por Bam HI y desfosforilado fueron incubados en presencia del enzima T4 ADN ligasa, llevándose a cabo la reacción de ligación en las condiciones indicadas anteriormente (M&M:14.5).

### 1.2.4. Transformación .-

La transformación fue realizada según la técnica descrita en el capítulo M&M:12.2.

100 µl de células HB101 competentes fueron transformadas por 0,5 µg de vector. Se obtuvo un total de 1.520

transformantes a partir del banco Bam HI,700 a partir del banco Bcl I y 1.070 a partir de la genoteca Bgl II.

### 1.3. Selección de los clones portadores de plásmidos recombinantes .-

Los transformantes fueron seleccionados en base a su resistencia a la ampicilina y su sensibilidad a la tetraciclina. 100 transformantes procedentes de cada genoteca fueron repicados simultáneamente sobre placas conteniendo medio LB adicionado de ampicilina o de tetraciclina.

Los transformantes que contienen un plásmido recombinante son sensibles a la tetraciclina, ya que el inserto de ADN de S. K15 es introducido en el gen que determina la resistencia a dicho antibiótico. El 90% de los transformantes del banco de genes Bam HI, el 65% del banco Bcl I y el 80% de los transformantes del banco Bgl II son sensibles a la tetraciclina.

### 1.4. Hibridación de los transformantes con la sonda radioactiva y preparación de los plásmidos recombinantes pDML 220 y pDML 221.-

Un total de 2.990 transformantes (recombinantes y no recombinantes), 1.420 procedentes del banco de genes Bam HI, 600 del banco Bcl I y 970 de la genoteca Bgl II fueron repicados sobre una membrana de nitrocelulosa (Millipore) dispuesta sobre una placa que contenía medio sólido LB + ampicilina.

Tras una incubación de 4-5 h a 37°C las membranas de nitrocelulosa que contenían las colonias fueron depositadas sobre una nueva placa, conteniendo medio LB + cloranfenicol, e incubadas durante una noche a 37°C con objeto de obtener una amplificación del número de copias de

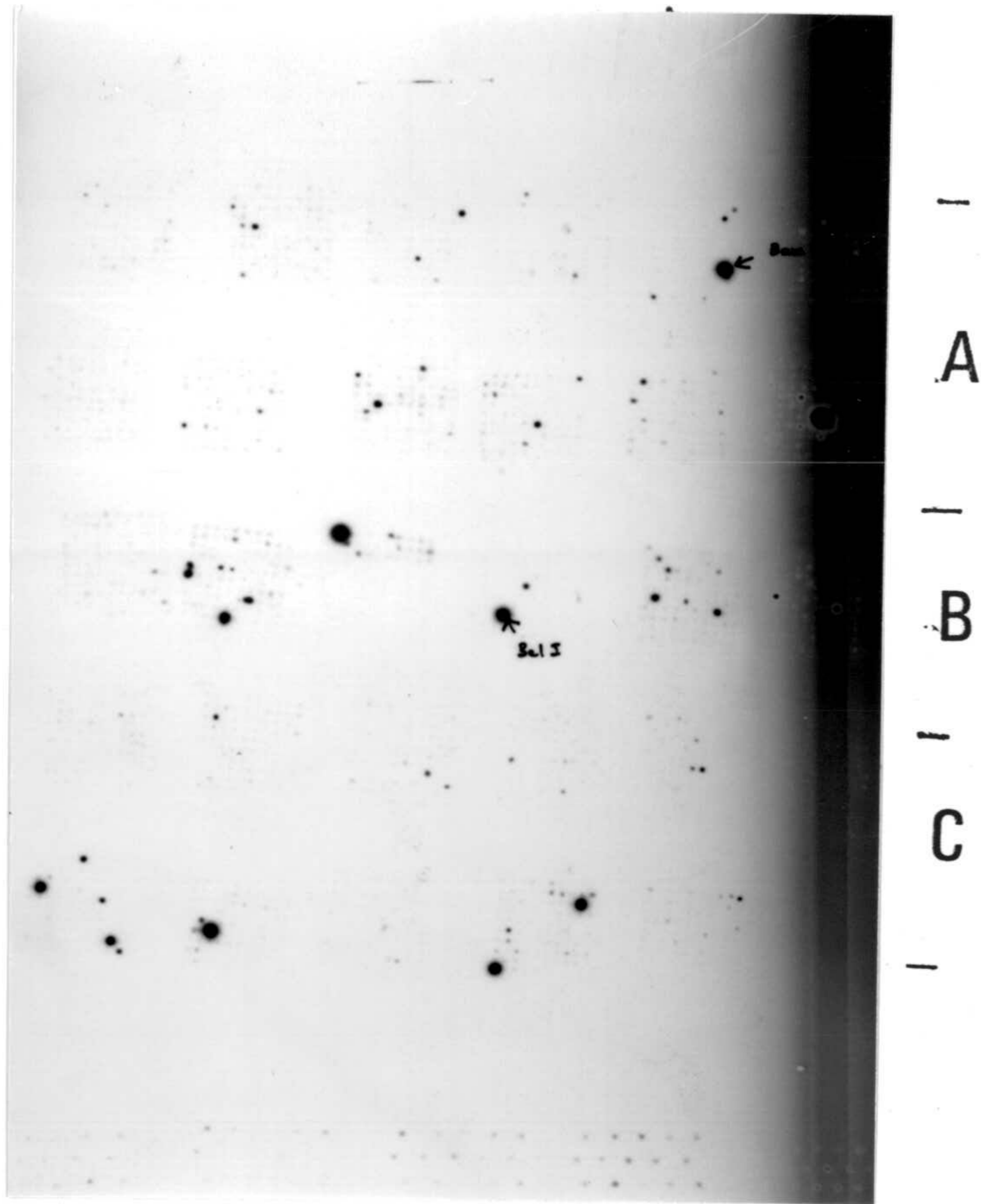


Figure 22.- Cribaje de los transformantes con la sonda radioactiva.

- A : Clones procedentes de la genoteca Bam HI.  
1420 clones repicados, 6 clones positivos.
- B : Clones procedentes de la genoteca Bcl I.  
600 clones repicados, 3 clones positivos.
- C : Clones procedentes de la genoteca Bgl II.  
970 clones repicados, 4 clones positivos.

A

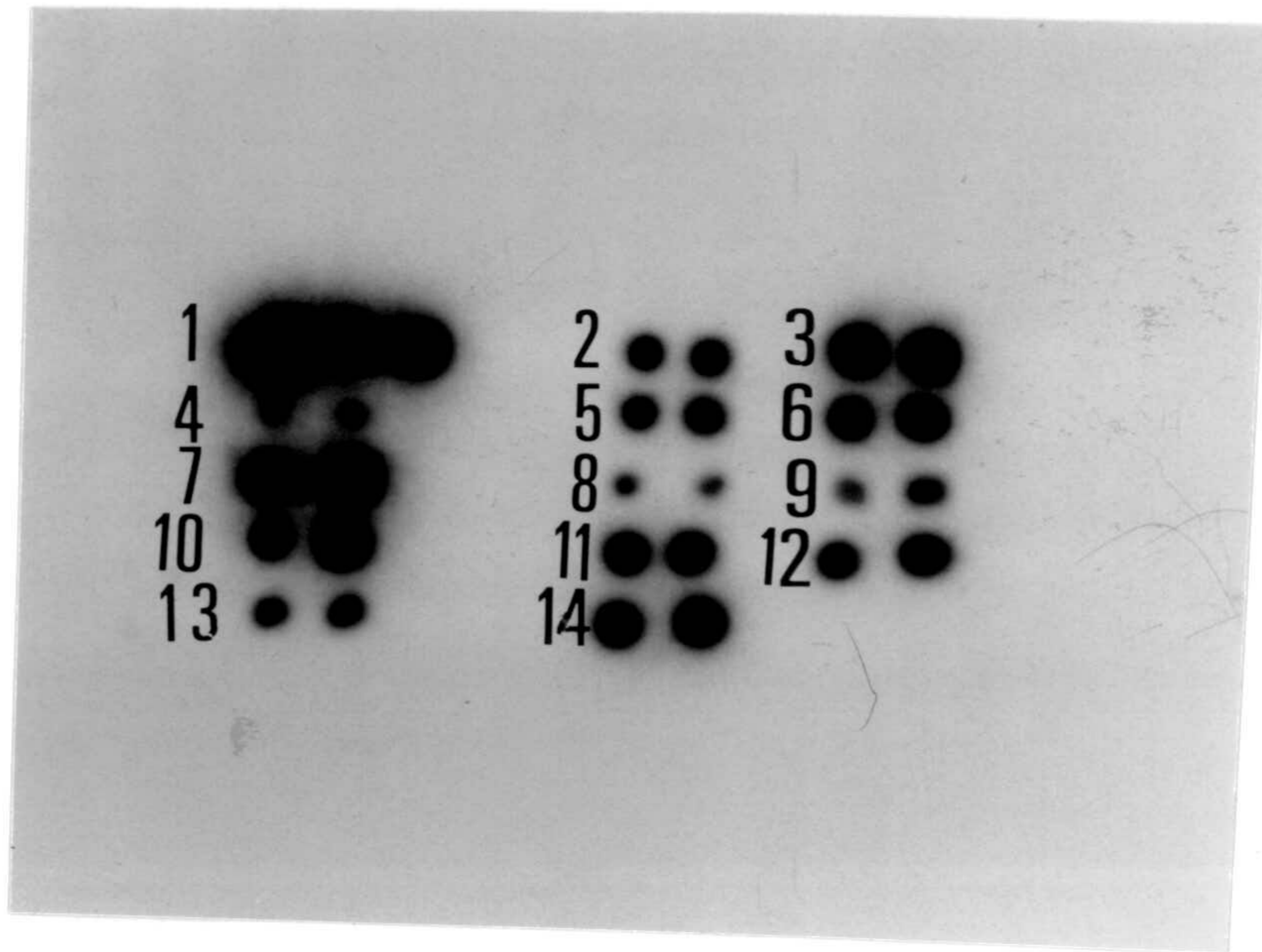


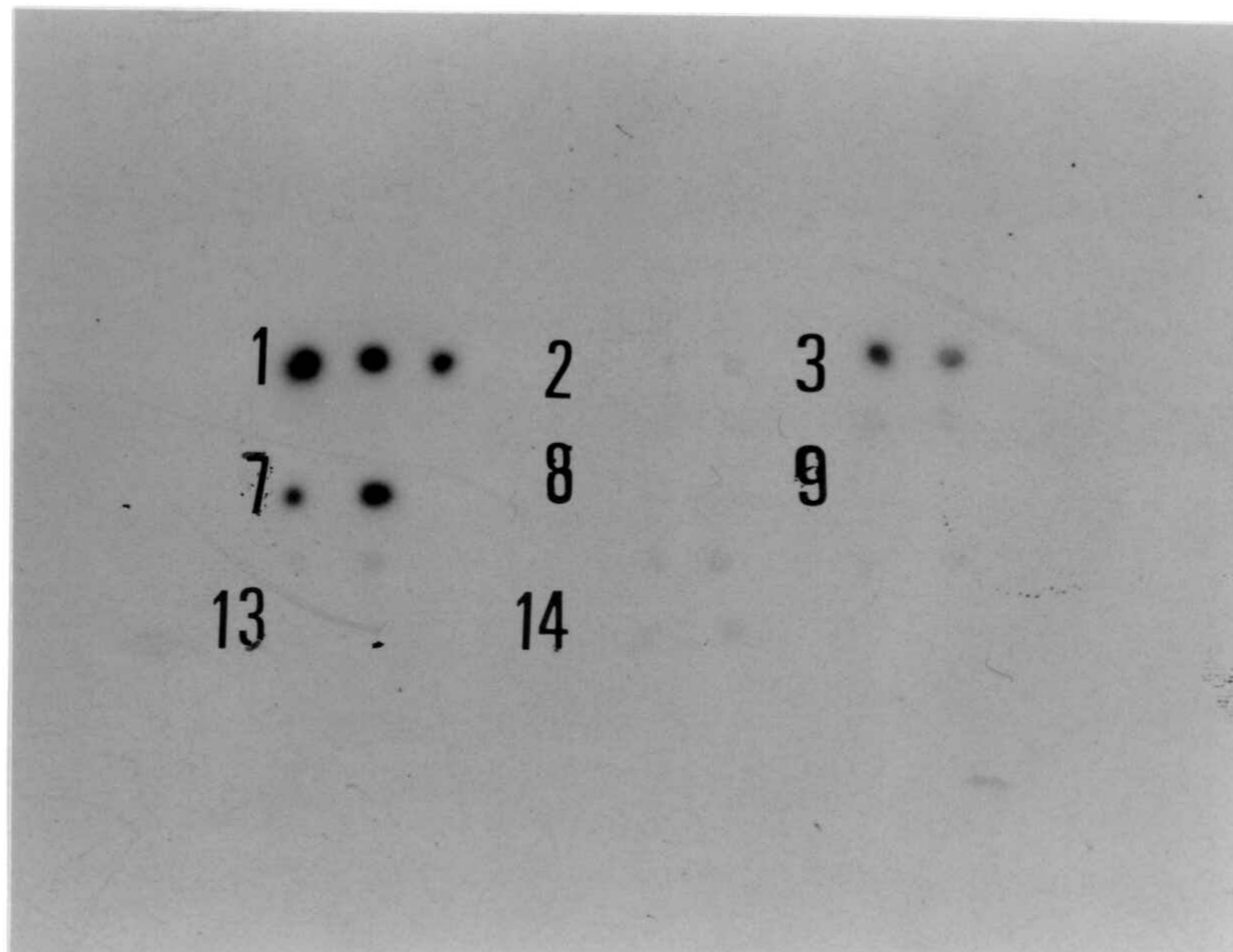
Figura 23.- Control de los clones positivos.

A : Lavado de los filtros a 55°C.

B : Lavado de los filtros a 75°C.

Clones 1 a 6 : genoteca Bam HI; clones 7 a 9, genoteca Bcl I; clones 10 a 14, genoteca Bgl II. Cada clon fue repicado 2 veces, excepto el 1 que aparece por triplicado.

B



los plásmidos; a continuación las membranas fueron tratadas con NaOH a fin de lisar las colonias y desnaturalizar el ADN, y posteriormente calentadas (80 °C, a vacío, durante 2 h) para fijar el ADN a la membrana.

Las membranas de nitrocelulosa así tratadas fueron enseguida incubadas en presencia de la sonda radioactiva (para una explicación más detallada de la técnica utilizada, véase M&M: 14.11.1)

La hibridación se realizó en presencia de una cantidad de sonda correspondiente a  $15 \times 10^6$  cpm.

Después de un último lavado a 55°C los filtros fueron autorradiografiados (tiempo de exposición : 1 noche a -70°C). Tras el revelado de los films 13 clones positivos fueron detectados, 6 provenientes del banco de genes Bam HI, 3 del Bcl I y 4 de la genoteca Bgl II; 8 de entre ellos daban una señal especialmente intensa (figura 22).

Las colonias que habían mostrado una reacción positiva fueron repicadas y sometidas a una nueva hibridación para confirmar los primeros resultados. Los 13 clones dieron una respuesta positiva después de realizar el test en las condiciones indicadas (lavado de los filtros a 55°C). (Figura 23 A).

Los filtros fueron entonces lavados a una temperatura más restrictiva (75 °C =  $T_m - 10$  °C). En estas condiciones, sólo 3 clones permanecen positivos, 2 de los procedentes de la genoteca Bam HI y 1 del banco de genes Bcl I (figura 23 B). Minipreparaciones de plásmidos de los tres clones positivos fueron entonces realizadas para determinar el tamaño de los insertos .

Los plásmidos de dos clones, uno de cada genoteca fueron preparados a continuación y denominados pDML 220 y pDML 221.

El plásmido pDML 220 proviene del banco Bam HI y contiene un inserto de  $\pm 10.700$  pb. El plásmido pDML 221 proviene del banco de genes Bcl I y contiene un inserto de  $\pm 9.800$  pb.

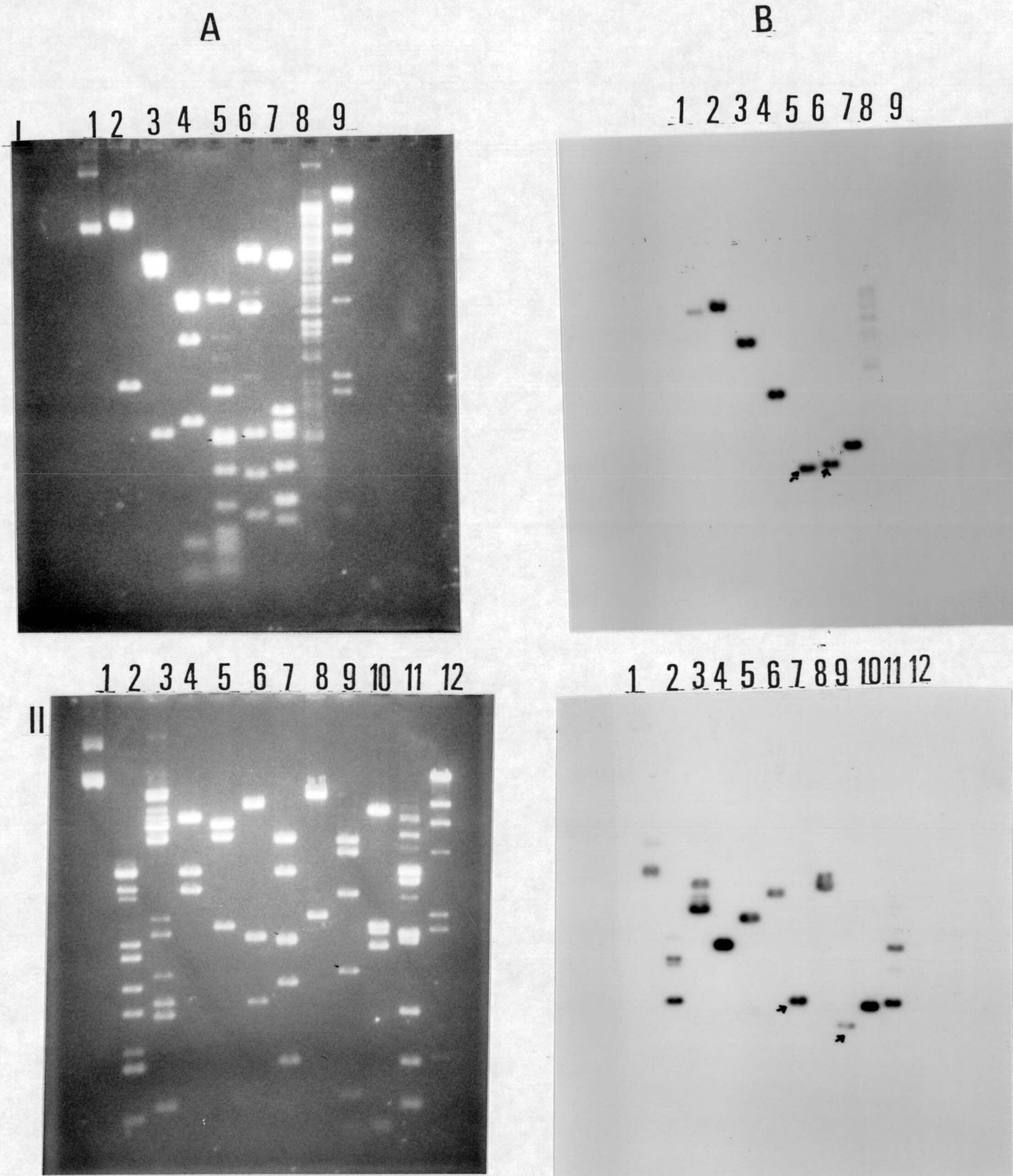


Figura 24.-Electroforesis en gel de agarosa de pDML 220 (I) y pDML 221 (II) digeridos por diferentes enzimas de restricci3n; coloreado con bromuro de etidio (A) y autorradiograma obtenido despu3s de realizar el "Southern Blot" y la hibridaci3n con la sonda radioactiva.

I : 1) pDML 220 no digerido, y digerido por los siguientes enzimas de restricci3n: 2) Bgl II, 3) Pst I 4) Pvu II ,5) Sal I, 6) Sph I, 7) Sma I,8) Hind II; 9) ADN del fago  $\lambda$  /Hind III.

II : 1) pDML 221 no digerido y digerido por las siguientes endonucleasas : 2)Acc I, 3) Bam HI, 4) Eco RI, 5) Pst I, 6) Pvu II, 7) Sal I, 8) Sac I, 9) Sph I, 10) Sma I, 11) Hind II; 12) ADN de  $\lambda$ /Hind III.

2. LOCALIZACION DEL GEN EN LOS INSERTOS DE pDML 220 Y pDML 221 .-

2.1. Digestión de los plásmidos pDML 220 y pDML 221 e hibridación de los fragmentos de restricción (Southern Blot).

Dado que los insertos de los plásmidos pDML 220 y pDML 221 eran muy grandes ( 10.700 pb y 9.800 pb, respectivamente), el gen codificante de la DD-peptidasa K15 tuvo que ser localizado dentro de esos fragmentos.

Con este propósito, los dos plásmidos fueron digeridos por varias endonucleasas y los fragmentos de restricción obtenidos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa ( M&M :14.10). antes de ser sometidos a una hibridación con la sonda radioactiva, marcada con [<sup>32</sup>P]ATP ( 6 x 10<sup>6</sup> cpm). (M&M :14.11.2). La figura 24 expone los resultados obtenidos.

Entre los diferentes fragmentos de pequeño tamaño capaces de hibridarse con la sonda hay un fragmento Sph I de 1,3 kb que aparece en los dos plásmidos.

Este fragmento fue subclonado en pBR322 y su mapa de restricción establecido.

2.2. Sub-clonación de los fragmentos SphI que se hibridan con la sonda y preparación de los plásmidos correspondientes .-

22 µg de pDML 220 y pDML 221 fueron digeridos por Sph I ( 2 u/µg de ADN, 2 h a 37°C).

Tras una electroforesis preparativa en gel de agarosa al 1% los fragmentos Sph I fueron purificados por electroelución. (M&M:14.9.1).

Los fragmentos fueron introducidos en el plásmido pBR 322 previamente digerido por Sph I y desfosforilado (relación

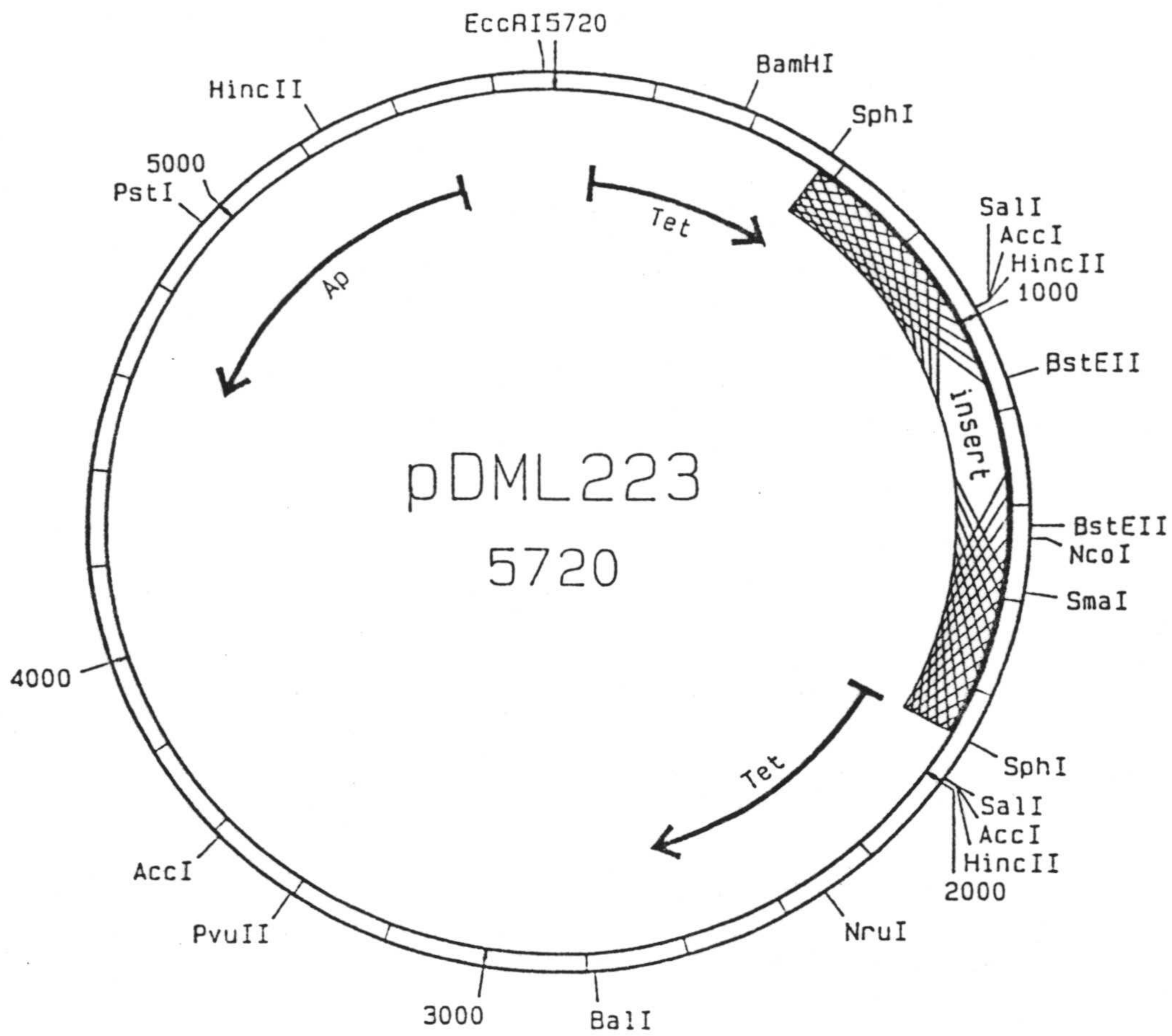


Figura 25.- Mapa genético-físico del plásmido pDML 223.



molecular vector/fragmento = 1/2) y 100  $\mu$ l de células HB 101 competentes fueron transformados por 250 ng de vector. Los transformantes fueron seleccionados en base a su resistencia a la ampicilina y su sensibilidad a la tetraciclina.

Mini-preparaciones de plásmidos revelaron la presencia de plásmidos recombinantes que contenían insertos del tamaño esperado.

Dos plásmidos recombinantes pDML 223 y pDML 224 fueron entonces preparados. El primero contiene un inserto Sph I procedente del plásmido pDML 220 y el segundo un inserto proveniente del pDML 221.

### 2.3. Establecimiento del mapa de restricción del fragmento Sph I .-

Numerosas digestiones, simples y dobles por diferentes endonucleasas fueron realizadas sobre los plásmidos pDML 223 y pDML 224. Los fragmentos de ADN obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y su tamaño determinado. (M&M :14.7.4).

La figura 25 muestra el mapa de restricción del plásmido pDML 223; el plásmido pDML 224 contiene el mismo inserto, inversamente orientado.

### 2.4. Localización del gen en el fragmento Sph I .-

El fragmento Sph I de 1,3 kb posee el tamaño suficiente como para contener el gen de la DD-peptidasa K15, pero esa hipótesis solo será confirmada mediante la localización de la zona que se hibrida con la sonda y que corresponde a la región N-terminal de la proteína.

Con este propósito, los fragmentos obtenidos mediante la digestión del plásmido pDML 223 por diferentes enzimas de restricción fueron separados en gel de agarosa 1% , transferidos a un filtro de nitrocelulosa y a continuación hibridados con la sonda radioactiva ( $6 \times 10^6$  cpm). La figura

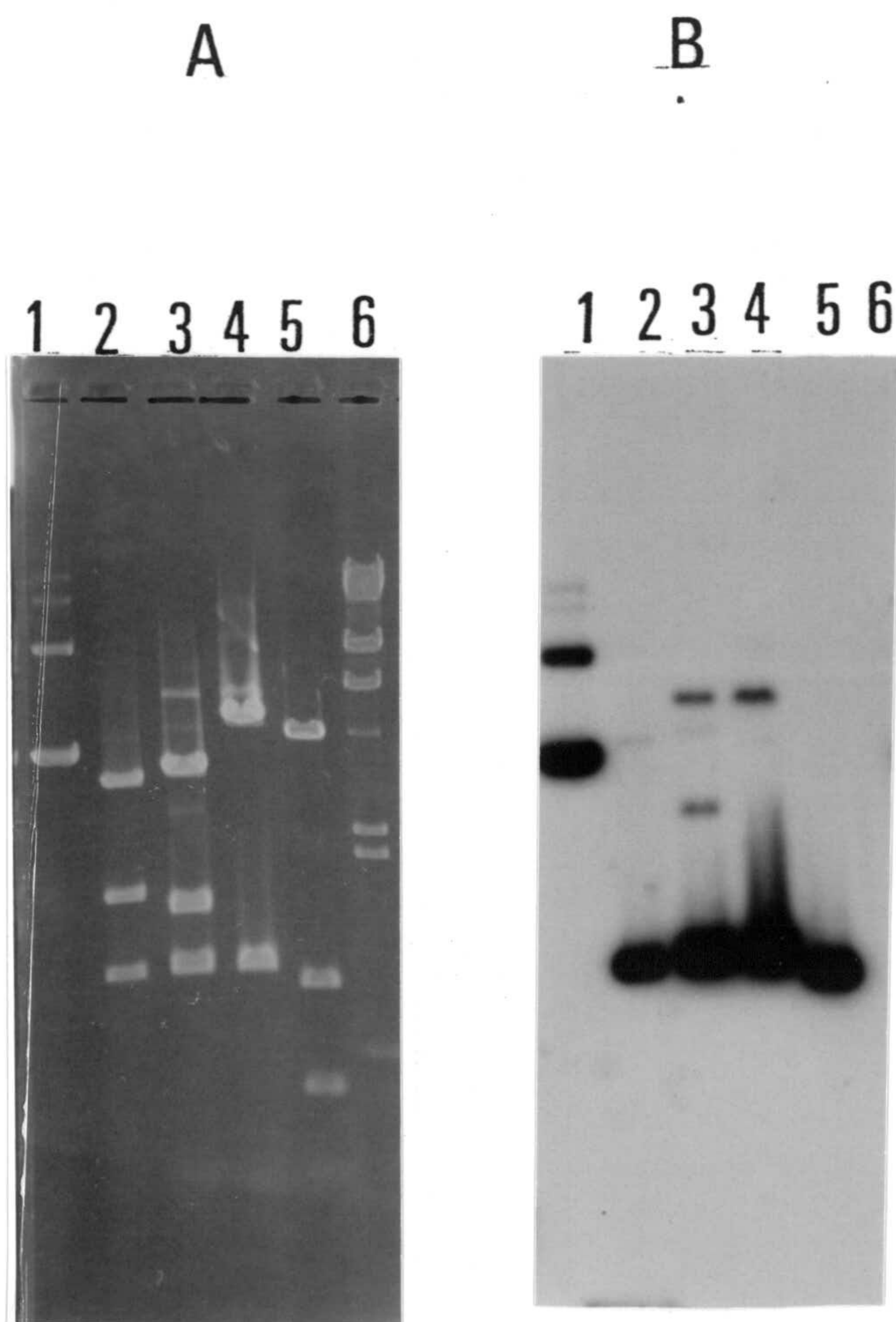


Figura 26.- Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pDML 223 digerido por diferentes endonucleasas.  
(A) coloreado con bromuro de etidio y (B) autorradiografiado después del "Southern Blot" e hibridación con la sonda radioactiva.

1) pDML 223 no digerido y digerido por las endonucleasas : 2) Acc I, 3) Hinc II, 4) Sal I, 5) Sph I + Sal I, 6)  $\lambda$  digerido por Hind III

26 expone los resultados obtenidos.

La doble digestión del plásmido pDML 223 por Sph I/ Sal I origina 3 fragmentos : un fragmento de  $\pm$  4.000 pb (pBR 322), un fragmento de  $\pm$  900 pb y un tercero de  $\pm$  400 pb. La sonda se hibridó con el fragmento de  $\pm$  900 pb.

El mapa de restricción del fragmento amplificado por la PCR mostraba la existencia de un sitio Sal I en la región correspondiente al extremo 3' de la sonda (figura 19). El fragmento hibridado de  $\pm$  900 pb debe pues contener toda la región del gen codificante para la porción C -terminal de la proteína (a partir del residuo 32 hasta el fin de la proteína). Por otra parte, el fragmento de  $\pm$  400 pb contiene la región codificante para el extremo N -terminal de la proteína. El fragmento Sph I contiene pues, probablemente, todo el gen codificante para la DD-peptidasa de S. K15.

Estos resultados nos permitieron establecer una estrategia de secuenciación.

### 3. DETERMINACION DE LA SECUENCIA DEL GEN CODIFICANTE PARA LA DD-TRANSPEPTIDASA DE *Streptomyces* K15 .-

La secuencia nucleotídica fue enteramente determinada por el método de Sanger (M&M :14.14).

Las muestras fueron depositadas sobre un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 5% (M&M :14.7.4).

Las zonas de compresión fueron resueltas mediante la utilización de un análogo del dGTP (dITP) o la realización de la electroforesis a temperaturas elevadas (del orden de 55 a 60°C).

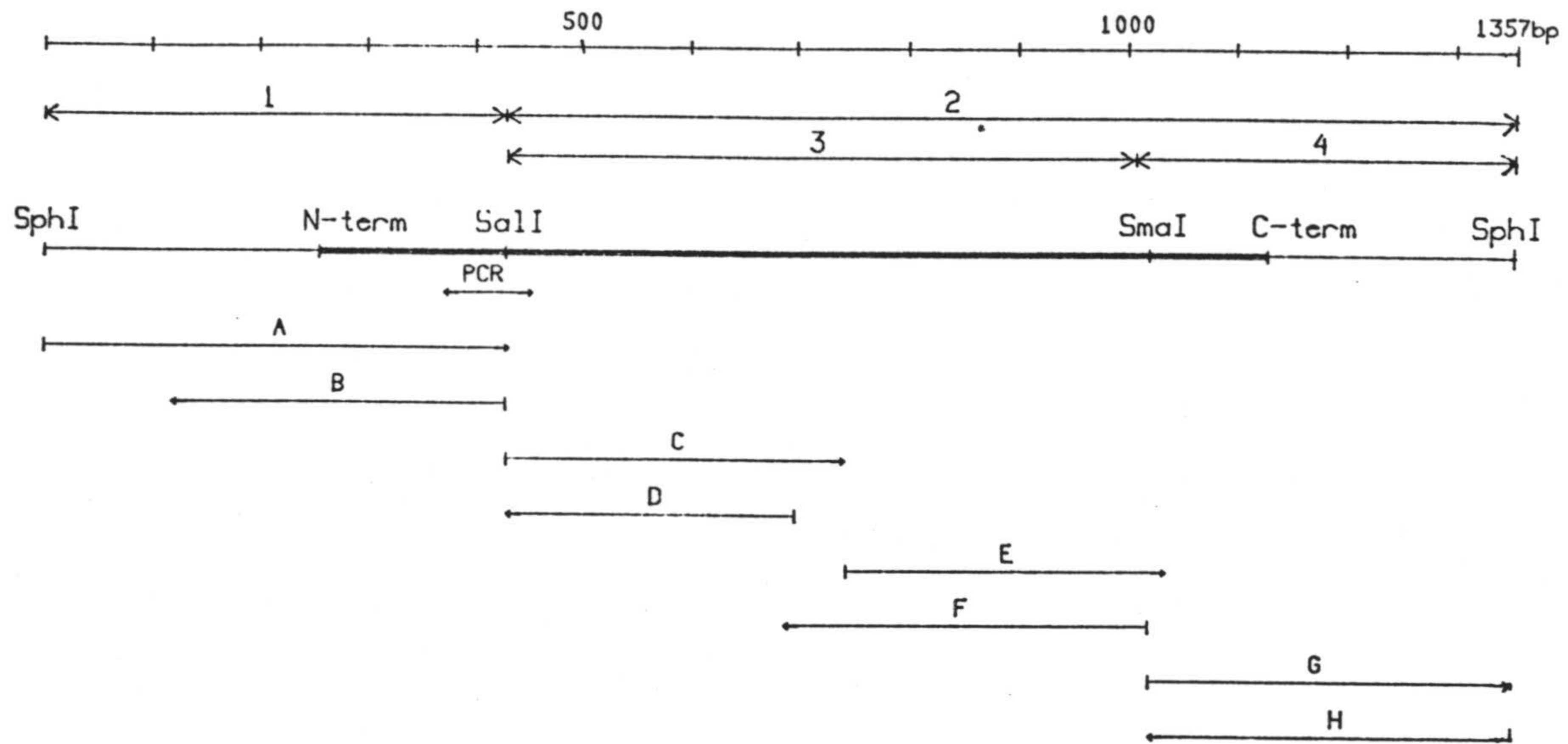


Figura 27.-Estrategia de secuenciación.

La región codificante se indica mediante un trazo grueso. Las sub-secuencias A, B, C, F, G, H fueron obtenidas utilizando el cebador universal y las sub-secuencias D y E se obtuvieron mediante la utilización de dos oligonucleótidos de síntesis como cebadores.

FRAGMENTOS INSERTADOS EN M13	TAMAÑO pb	BACTERIOFAGO M13 UTILIZADO	MATRIZ OBTENIDA	SENTIDO DE LA LECTURA	SUB-SECUENCIA LEIDA
1- <u>Sph I</u> - <u>Sal I</u>	430	M13 mp19 M13 mp18	I Ic	<u>Sal I</u> --> <u>Sph I</u> <u>Sph I</u> --> <u>Sal I</u>	B A
* 2- <u>Sal I</u> - <u>Sph I</u>	927	M13 mp19 M13 mp18 M13 mp19	IIc II IIc	<u>Sal I</u> --> <u>Sph I</u> <u>Sph I</u> --> <u>Sal I</u> <u>Sal I</u> --> <u>Sph I</u>	C H E **
* 3- <u>Sal I</u> - <u>Sma I</u>	590	M13 tg130 M13 tg131 M13 tg131	IIIc III III	<u>Sal I</u> --> <u>Sma I</u> <u>Sma I</u> --> <u>Sal I</u> <u>Sma I</u> --> <u>Sal I</u>	C F D **
4- <u>Sma I</u> - <u>Sph I</u>	337	M13 mp18 M13 tg131	IV IVc	<u>Sph I</u> --> <u>Sma I</u> <u>Sma I</u> --> <u>Sph I</u>	H G

Tabla 8.-Sub-clonación de los diferentes fragmentos procedentes del inserto Sph I (1,3 kb) en el bacteriófago M13.

- Matrices I a IV: hebra codificante
- Matrices Ic a IVc :hebra complementaria
- \* Fragmento que se hibrida con la sonda
- \*\* Secuencias obtenidas mediante la utilización de un oligonucleótido de síntesis como cebador.

### 3.1 Elaboración de una estrategia de determinación de la secuencia (Figura 27) y subclonación de los diferentes fragmentos en el bacteriófago M13.-

La digestión del plásmido pDML 223 por Sph I y Sal I nos permitió obtener (después de realizar una electroforesis y una electroelución (M&M 14.9.1), los subfragmentos Sph I-Sal I de 430 pb (fragmento 1) y Sal I-Sph I de 927 pb (fragmento 2). Los fragmentos Sal I-Sma I de 590 pb (fragmento 3) y Sma I-Sph I de 337 pb (fragmento 4) fueron obtenidos por digestión del fragmento 2 por Sma I seguida de una electroforesis en gel de agarosa y una electroelución. Estos sub-fragmentos fueron clonados en diferentes formas del fago M13 en las dos orientaciones (véase tabla 8).

La clonación del fragmento 1 en el fago M13 mp18 nos permitió obtener la secuencia de la hebra codificadora (secuencia A, figura 27). La secuencia de la hebra complementaria fue parcialmente establecida mediante la clonación del mismo fragmento (fragmento 1) en el vector M13 mp19 (secuencia B, figura 27). La secuencia del fragmento 1 fue así determinada casi por completo en las dos orientaciones. Una pequeña zona de compresión fue resuelta mediante la utilización de dIPTG (análogo del dGTP). La secuencia del fragmento 2 (figura 27) fue íntegramente determinada a partir de los fragmentos 2, 3 y 4. El fragmento 4 fue completamente secuenciado en las dos orientaciones (sub-secuencias G y H, obtenidas a partir de las matrices IVc, IV y II (figura 27 y tabla 8).

Finalmente, la secuencia del fragmento 3 fue determinada en su totalidad y en las dos orientaciones mediante la lectura de 4 sub-secuencias: las sub-secuencias F y C (obtenidas a partir de las matrices III, IIIc y IIc) y las sub-secuencias D y E (matrices III y IIc). Para determinar estas dos últimas sub-secuencias, 2 oligonucleótidos

GCA

TGCGCACAGCATAGATACAACGCGTACGCATAGCAGTTCCCGTCCACCATCCGGACTCCACGGAGGCCGCCGGACCCCA  
CGCGCCCTCCTCCCTCACCTTTCAAAGGGACCCCGCCACGAACGACACACCATTTCGTGCTACTTACGTGTACAGAGG  
AGAAGCGGCATCCCCATGTGGCCGCACTCTTGGGGCATTAAACGTATTTCGGGGTATTTCGACTTGATAACTGGCATGAAG

Val Arg Leu Arg Arg Ala Ala Ala Thr Val Ile Thr Thr Gly Ala Leu Leu Ala Ala  
GGT GTG CGC CTC CGT AGA GCT GCC GCC ACC GTC ATC ACC ACC GGC GCG CTG CTC GCG GCC

Gly Thr Leu Gly Ala Thr Pro Ala Thr Ala Val Thr Lys Pro Thr Ile Ala Ala Val Gly  
GGX ACC CTC GGC GCG ACT CCC GCG ACC GCC GTC ACC AAG CCC ACC ATC GCC GCT GTG GGC

20 30  
Gly Tyr Ala Met Asn Asn Gly Thr Gly Thr Thr Leu Tyr Thr Lys Ala Ala Asp Thr Arg  
GGC TAC GCC ATG AAC AAC GGC ACG GGC ACC ACG CTC TAC ACC AAG GCC GCG GAC ACC AGG

40 50  
Arg Ser Thr Gly Ser Thr Thr Lys Ile Met Thr Ala Lys Val Val Leu Ala Gln Ser Asn  
CGG TCG ACC GGC TCC ACC ACC AAG ATC ATG ACC GCC AAG GTG GTC CTG GCC CAG TCG AAC

60 70  
Leu Asn Leu Asp Ala Lys Val Thr Ile Gln Lys Ala Tyr Ser Asp Tyr Val Val Ala Asn  
CTG AAC CTC GAC GCC AAG GTC ACG ATC CAG AAG GCC TAC AGC GAC TAC GTG GTC GCC AAC

80 90  
Lys Pro Ser Gln Ala His Leu Ile Val Gly Asp Lys Val Thr Val Arg Gln Leu Leu Tyr  
AAG CCC TCG CAG GCG CAC CTG ATC GTC GGC GAC AAG GTC ACC GTC CGC CAG CTC CTG TAC

100 110  
Gly Leu Met Leu Pro Ser Gly Cys Asp Ala Ala Tyr Ala Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Ser  
GGG CTG ATG CTG CCG TCC GGC TGC GAC GCC GCG TAC GCG CTG GCC GAC AAG TAC GGC TCG

120 130  
Gly Ser Gln Ala Ala Ala Arg Val Lys Ser Phe Ile Gly Lys Met Asn Thr Ala Ala Thr  
GGC AGC CAG GCT GCC GCG CGC GTG AAG TCG TTC ATC GGC AAG ATG AAC ACC GCC GCG ACC

140 150  
Asn Leu Gly Leu His Asn Thr His Phe Asp Ser Phe Asp Gly Ile Gly Asn Gly Ala Asn  
AAC CTC GGT CTG CAC AAC ACG CAC TTC GAC TCG TTC GAC GGC ATC GGC AAC GGC GCC AAC

160 170  
Tyr Ser Thr Pro Arg His Leu Thr Lys Ile Ala Ser Ser Ala Met Lys Asn Ser Thr Phe  
TAC TCG ACG CCG CGG CAC CTG ACG AAG ATC GCC AGC AGC GCG ATG AAG AAC TCG ACG TTC

180 190  
Arg Thr Val Val Lys Thr Lys Ala Tyr Thr Ala Lys Thr Val Thr Lys Thr Gly Ser Ile  
CGC ACG GTC GTC AAG ACC AAG GCG TAC ACG GCG AAG ACG GTC ACC AAG ACC GGC AGC ATC

200 210  
Arg Thr Met Asp Thr Trp Lys Asn Thr Asn Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Ile  
CGC ACC ATG GAC ACG TGG AAG AAC ACC AAC GGG CTG CTC AGC AGC TAC AGC GGT GCG ATC

220 230  
Gly Val Lys Thr Gly Ser Gly Pro Glu Ala Lys Tyr Cys Leu Val Phe Ala Ala Thr Arg  
GGC GTG AAG ACC GGC TCC GGC CCC GAG GCC AAG TAC TGC CTC GTC TTC GCC GCC ACC CGG

240 250  
Gly Gly Lys Thr Val Ile Gly Thr Val Leu Ala Ser Thr Ser Ile Pro Ala Arg Glu Ser  
GGC GGC AAG ACG GTC ATC GGC ACC GTC CTC GCC TCC ACG TCC ATC CCG GCC CGC GAG TCG

260  
Asp Ala Thr Lys Ile Met Asn Tyr Gly Phe Ala Leu am  
GAC GCC ACC AAG ATC ATG AAC TAC GGC TTC GCC CTG TAG CCCACGCACACGCAGAAGGGGGCCGACC  
GCITGTGCGGGTCCGCCCTTCTGCCGTTCTGTCGGCCCTGGCGCCGTTCTCAGGCCGGGTTGCCGGTTCGAGACGAAGAG  
CTGGATGTCCGGCATGTTCTTCGGGTCCTCATCGGTTCCGCCGATTGGGCAAGTTGGGCCATGACCGTGCCCTCGCCGTA  
CGTGTCTCGTCTGTTGCTGATCGTCCACGACCAGCCCGCCGCCGCATGC

Figura 28.- Secuencia nucleotídica del gen codificante para la DD-peptidasa de *Streptomyces* K15 y su traducción en aminoácidos.

Val, Leu : Residuos N y C -terminales, respectivamente  
↓ : punto de rotura reconocido por la "peptidasa señal".

Ser\* : serina activa.

----> <---- : secuencias repetitivas inversas, susceptibles de actuar como señal de fin de transcripción.

am : codon stop (ámbar).

sintéticos fueron utilizados como cebadores.

1 : 5' GCGTGTTGTGCAGACCGAGG<sup>3'</sup> (Secuencia D)

(nucleótidos 742 a 723. Figura 28)

2 : 5' CCGCCGCGACCAACCTCGGT<sup>3'</sup> (Secuencia E)

(nucleótidos 710 a 729. Figura 28)

La subsecuencia F recubre la unión entre las sub-secuencias C y D. Por otra parte, la sub-secuencia E recubre el sitio Sma I (figura 27).

La secuencia del fragmento amplificado por PCR, determinada en las dos orientaciones ( véase apdo.1.1.2 y figura 19) recubre el sitio Sal I.

Todas estas sub-secuencias fueron introducidas en un fichero de ordenador y examinadas gracias a los diferentes programas descritos en el capítulo M&M :14.15.1.

La utilización de estos programas nos permitió obtener su traducción en aminoácidos para las 3 fases de lectura. La comparación de estas traducciones con la secuencia N-terminal conocida por una parte, y la búsqueda por ordenador de una fase de lectura abierta, nos permitieron localizar los errores cometidos en la lectura de la secuencia (salto de una fase a otra por omisión de una base o introducción de una o varias bases); estos errores de lectura se sitúan en zonas de compresión, debidas al elevado porcentaje de G + C del ADN de Streptomyces.

Estos errores fueron corregidos reexaminando el gel correspondiente, o realizando las reacciones de secuenciación en presencia de dITP y aumentando la temperatura de electroforesis ( 55 a 60 °C).

De este modo, la secuencia del gen ha sido completamente determinada en las dos orientaciones, siendo asimismo recubiertos los dos sitios de restricción (Sal I y Sma I) utilizados para la clonación.

### 3.2 Secuencia nucleotídica del gen estudiado .-

El alineamiento de las secuencias mencionadas en el apartado precedente nos permitió escribir la secuencia

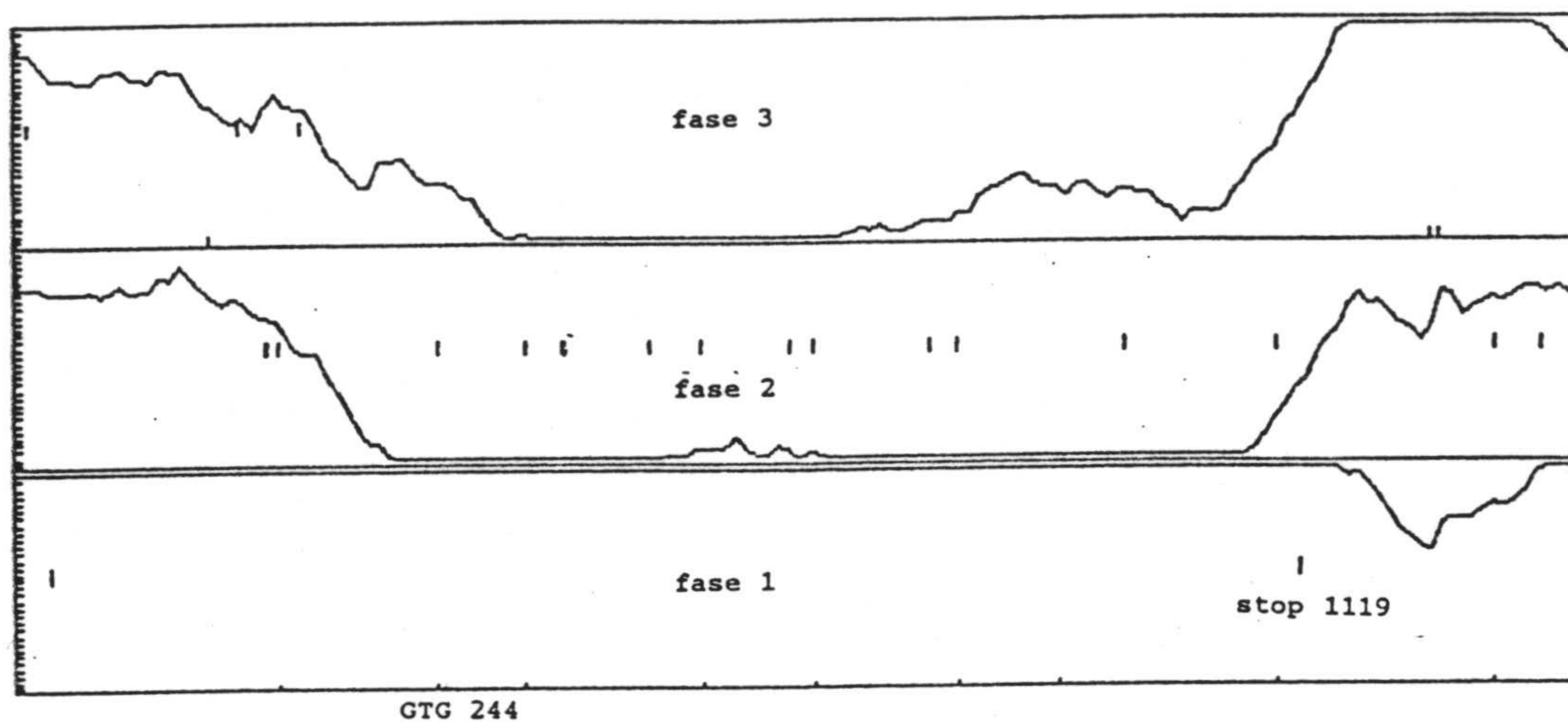


Figura 29.- Representación gráfica del análisis de la secuencia del ADN (1357 pb) de S.K15 mediante el programa Analyseq - Translation and codons de Staden [101] usando como referencia la utilización de codones de la DD-carboxipeptidasa de S.R61.



ininterrumpida representada en la figura 28. Dicha secuencia está constituida por 1.357 pares de bases y ha sido traducida en aminoácidos.

La fase de lectura abierta está comprendida entre los nucleótidos 244 y 1.119 (figura 29). Esta comienza por un codon iniciador GTG codificante para la valina y se termina por un codon stop ámbar TAG. El gen contiene pues 876 nucleótidos entre el punto de comienzo de la traducción y el codon stop y dirige la síntesis de una proteína de 291 aminoácidos. El extremo NH<sub>2</sub> - terminal de la proteína madura no coincide con la extremidad NH<sub>2</sub> - terminal de la proteína codificada por el gen; este hecho sugiere que la proteína es sintetizada bajo la forma de preproteína, la cual es posteriormente transformada en la proteína madura mediante la hidrólisis específica del enlace peptídico situado inmediatamente antes que la valina N -terminal.

La secuencia constituida por los 29 aminoácidos que preceden a la Val N -terminal de la proteína madura, posee, efectivamente todas las características de un péptido señal : 3 residuos polares (arginina) que ocupan las posiciones -28, -26, -25, un corazón hidrófobo y una secuencia C -terminal típica precediendo el sitio de rotura Ala-Thr-Ala (secuencia canónica Ala-X-Ala).

La proteína madura contiene pues 262 residuos; la composición en aminoácidos de la proteína deducida de la secuencia nucleotídica

y la masa molecular calculada (27.479) coinciden perfectamente con los resultados obtenidos a partir del enzima de membrana purificado (tabla 9). ( M.Leyh-Bouille y J. Van Beeumen, resultados no publicados).

La utilización de codones del gen de la DD-peptidasa es similar al de otros genes de Streptomyces conocidos [20,77,120 a 129]. Los codones terminados por G o C son mayoritariamente utilizados ( 97%).

AMINOACIDO	RESIDUOS / MOLECULA	
	A	B
Lys	20	22
His	4	4
Arg	10	9
Cys	2	2
Asp + Asn	28	10 + 14
Met	8	7
Thr	34	34
Ser	21	22
Glu + Gln	8	2 + 5
Pro	7	6
Gly	28	25
Ala	34	33
Val	17	18
Ile	12	12
Leu	19	18
Fyr	10	12
Phe	6	6
Trp	-	1

Tabla 9.-Composicion en aminoácidos de la DD-peptidasa K15: obtenida por vía química (A) y deducida de la secuencia nucleotídica (B).

? STRAND (0 FOR +, 1 FOR -)

F	TTT	0.	S	TCT	0.	Y	TAT	0.	C	TGT	0.
F	TTC	6.	S	ICC	5.	Y	TAC	12.	C	TGC	2.
L	TTA	0.	S	ICA	0.	*	TAA	0.	*	TGA	0.
L	TTG	0.	S	ICG	9.	*	TAG	1.	W	TGG	1.
L	CTT	0.	P	CCT	0.	H	CAI	0.	R	CGT	1.
L	CTC	10.	P	CCC	4.	H	CAC	4.	R	CGC	6.
L	CTA	0.	P	CCA	0.	Q	CAA	0.	R	CGA	0.
L	CTG	12.	P	CCG	3.	Q	CAG	5.	R	CGG	3.
I	ATT	0.	T	ACT	1.	N	AAT	0.	S	AGT	0.
I	ATC	13.	T	ACC	26.	N	AAC	14.	S	AGC	8.
I	ATA	0.	T	ACA	0.	K	AAA	0.	R	AGA	1.
M	ATG	7.	T	ACG	13.	K	AAG	22.	R	AGG	1.
V	GTT	0.	A	GCT	3.	D	GAT	0.	G	GGT	2.
V	GTC	14.	A	GCC	25.	D	GAC	10.	G	GGC	23.
V	GTA	0.	A	GCA	0.	E	GAA	0.	G	GGA	1.
V	GTG	6.	A	GCG	14.	E	GAG	2.	G	GGG	2.

Tabla 10.-Utilización de codones para la síntesis de la DD-peptidasa K15.

Secuencia complementaria invertida de la terminación 3'OH del ARN 16 S de *S. lividans* [130]

5' AGAAAG GA GGUGAUC 3'				
SECUENCIA DEL ARNm			GEN	REFERENCIA
AcucgG	GA	GaaGAaucag*	DD-peptidasa <i>S.</i> R61	[20]
cgAgAG	GA	accaccCc*	$\beta$ -lactamasa <i>S. albus</i> G	[120]
cccAcG	GA	aGgccaCggc*	$\beta$ -galactosidasa <i>S. lividans</i>	[131]
gcuuAG	GA	GGUuuUaaagcuu*	RBS sintético	
uGgcAu	GA	aGgGu*	DD-peptidasa K15	

Tabla 11.-Alineamiento de las secuencias "RBS" de diferentes genes de *Streptomyces* con la secuencia "RBS" probable de la DD-peptidasa K15 .

El asterisco representa el codon iniciador de la traducción.

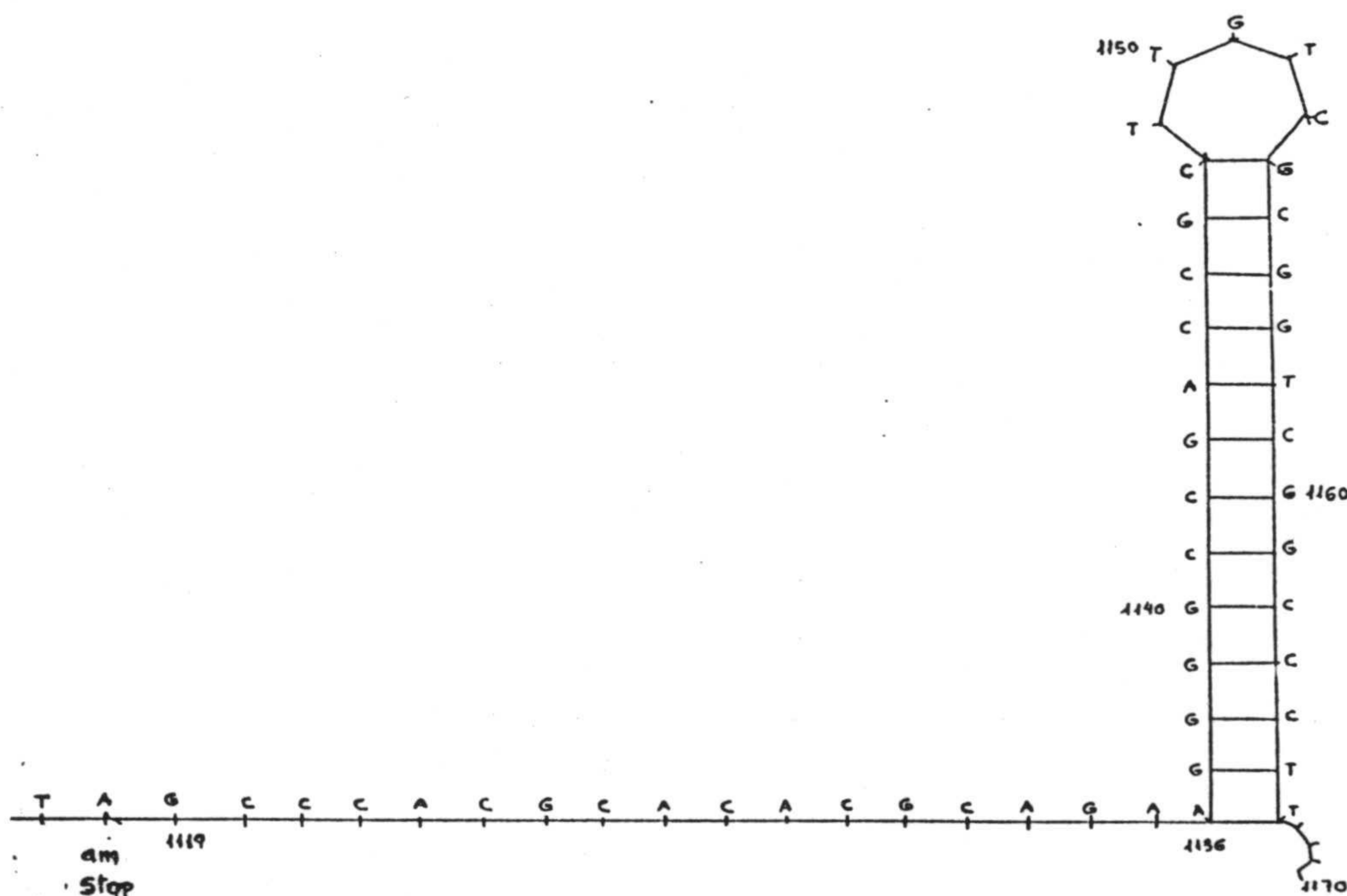


Figura 30.- Estructura en horquilla susceptible de actuar como terminador de la transcripción.

### 3.3. Búsqueda de las señales de transcripción y de traducción del gen.

#### 3.3.1. Búsqueda de las señales de traducción.

En la secuencia de ADN no codificante que precede al codón iniciador GTG, hemos buscado una secuencia susceptible de actuar como sitio de fijación a los ribosomas (RBS).

La zona comprendida entre los nucleótidos -9 y -2 (figura 28) puede realizar esta función, ya que se observa un comple-mentariedad de 5 bases sobre 8 con el extremo 3'OH del ARNr 16S de Streptomyces lividans [130]. La tabla 11 expone la secuencia "RBS" propuesta para la DD-peptidasa de S. K15.

#### 3.3.2. Búsqueda de las señales de transcripción.

##### 3.3.2.1. Localización de secuencias promotoras.

El punto de comienzo de la transcripción no ha sido determinado. Es por tanto imposible localizar las secuencias promotoras -10 y -35, pero el hecho de haber obtenido una superproducción de enzima en Streptomyces por introducción del fragmento Sph I en el plásmido pIJ702 (véase resultados sección II) puede indicar la presencia de un promotor eficaz en dicho fragmento.

Sin embargo, ninguna de las secuencias canónicas para promotores de Streptomyces propuestas por Hopwood et al (77) ha sido localizada en la región de ADN que precede el codón de iniciación de la traducción.

##### 3.3.2.2. Búsqueda de señales de fin de la transcripción.

El examen de la secuencia nucleotídica localizada a continuación del codón stop TAG (Am. figura 28) revela la

(Linear) MAPLOT of: K15dna. ck: 4330. 1 to: 1343 June 1, 1989 16:40.

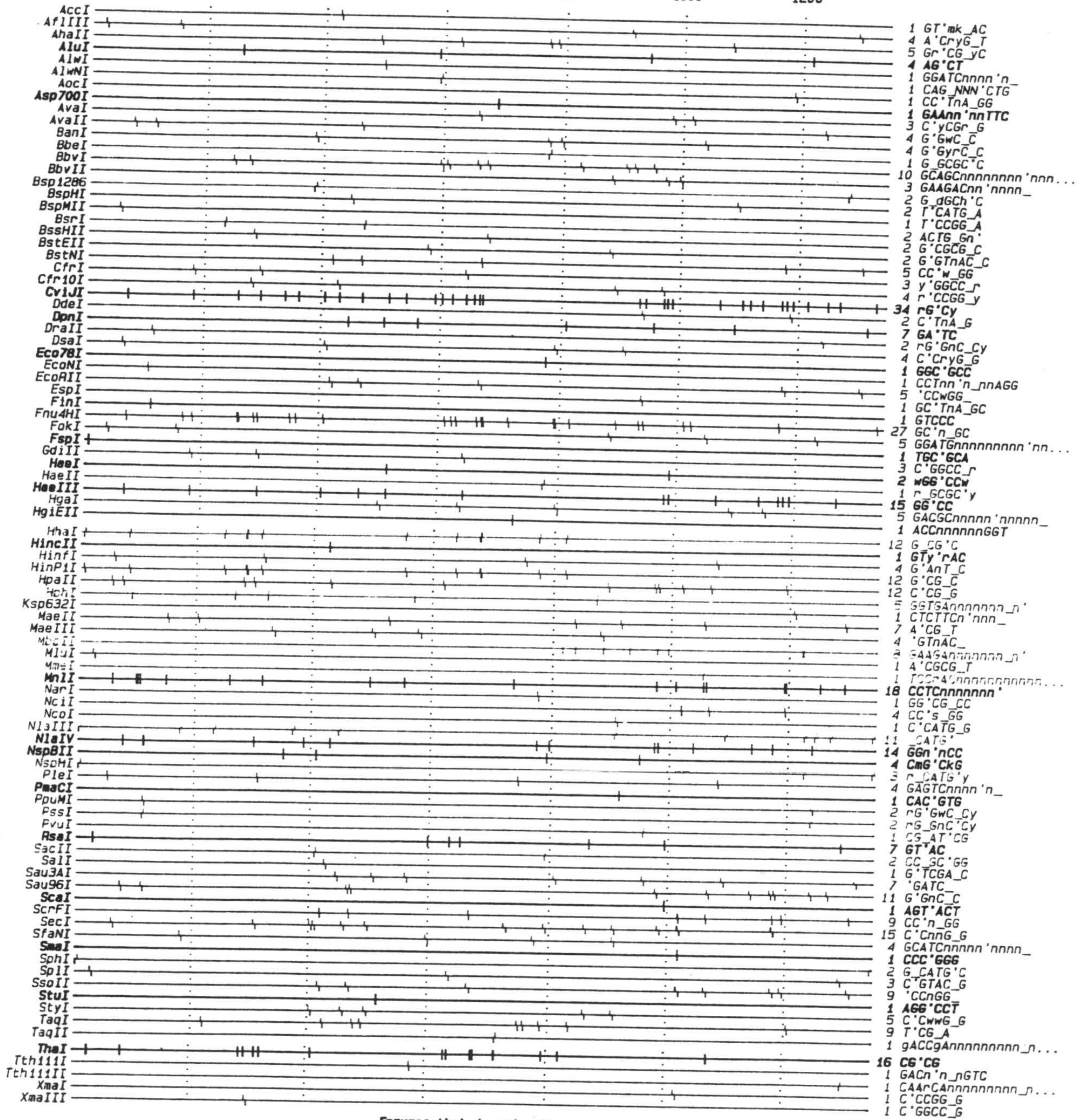


Figura 31.- Mapa de restricción del fragmento de ADN que contiene el gen de la DD-peptidasa de S.K15 y lista de enzimas inactivos.

existencia de secuencias inversamente repetitivas que son delimitadas mediante flechas horizontales en la figura 28.

Esta secuencia podría originar en el mRNA una estructura en "horquilla" (fig. 30), susceptible de actuar como un terminador de la transcripción.

La energía libre teórica de formación ( $\Delta G$ ) de esta estructura, calculada según el método de Zuker et al [104] (Programa FOLD, GCG, Universidad de Wisconsin , M&M 14.15.1) es de -24,4 Kcal/mol.

Esta estructura es la más importante de todas las estructuras secundarias hipotéticas que pueden formarse en el RNA correspondiente a la secuencia determinada (programa TERMINATOR, GCG Wisconsin, método de Brendel et al [102,103]; (M&M 14,15.1).

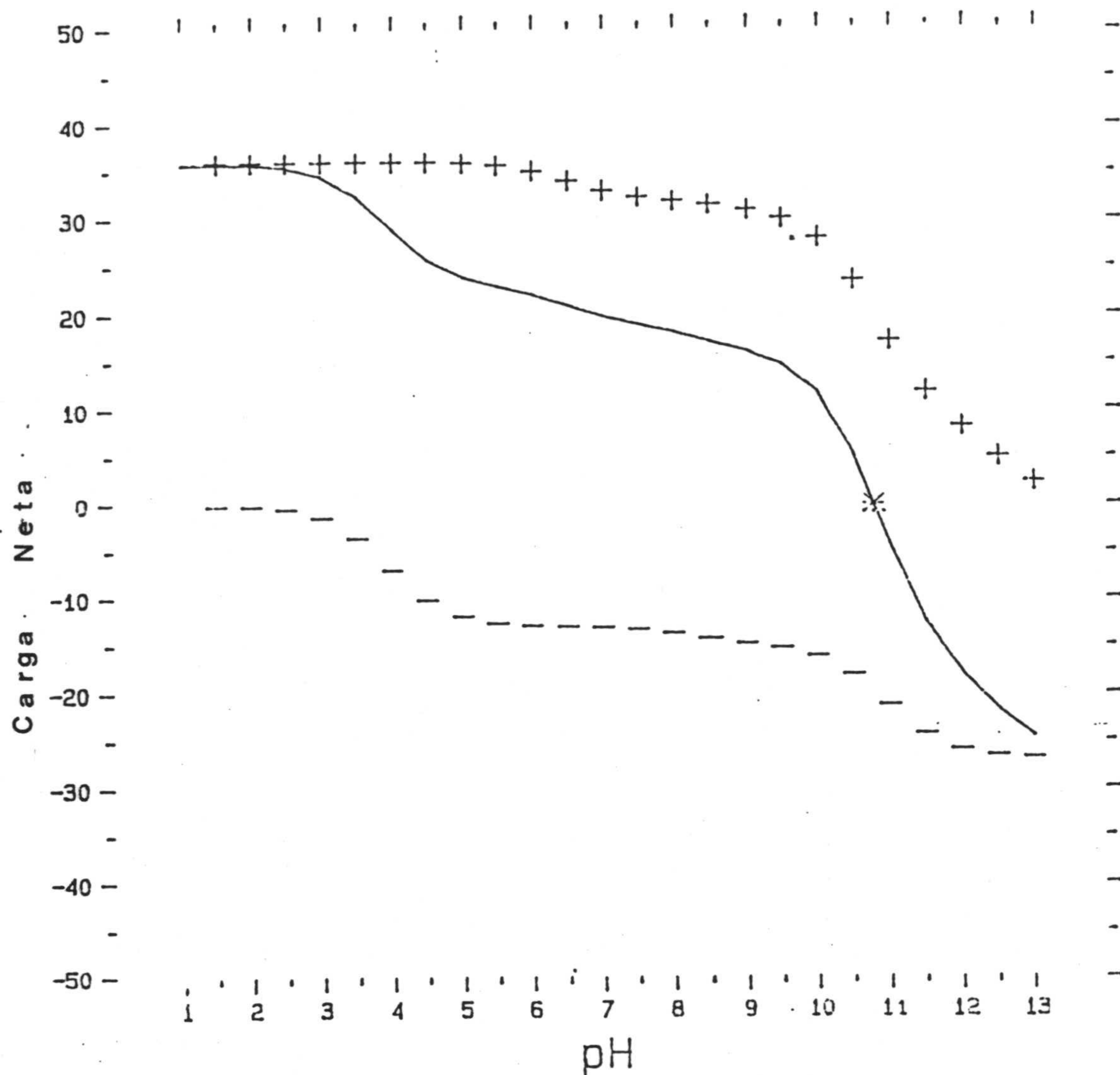
### **3.4. Determinación del mapa de restricción del gen de la DD-peptidasa K15.**

La figura 31 expone la carta de restricción del gen de la DD peptidasa K15, realizado mediante el programa MAPPLOT de la Universidad de Wisconsin (M&M 14,15.1).

## **4. ESTUDIO DE LA DD. PEPTIDASA DE STREPTOMYCES K15.**

### **4.1. Determinación del punto isoeléctrico teórico de la proteína.**

El programa ISOELECTRIC de la Universidad de Wisconsin (M&M 14,15.2) fue utilizado para determinar el punto isoeléctrico teórico de las proteínas así como su carga neta en función del pH.



Residuos cargados

Arg	9
Lys	22
His	4
Tyr	12
Cys	2
Glu	2
Asp	10

Figura 32.- Punto isoeléctrico teórico de la DD-peptidasa K15 y carga neta de la proteína en función del pH.



La figura 32 muestra los resultados obtenidos. La proteína posee un punto isoeléctrico teórico de 10,79 y contiene un 20 % de residuos cargados (fig. 32)

#### 4.2. Estudio de la hidrofobicidad de la proteína.

La hidrofobicidad de la proteína fue determinada por el método de Kyte-Doolittle [108] y por el método de Goldman et al [109] (programa PEPLOT de la Universidad de Wisconsin (GCG): M&M 14,15.2).

La figura 33 muestra el gráfico obtenido. La DD-transpeptidasa K15 no es una proteína muy hidrófoba; contiene 61% de residuos no polares. La proteína no posee regiones especialmente hidrófobas pudiendo servir de anclaje en la membrana citoplasmática. La zona C-terminal es ligeramente hidrofóbica, pero parece difícil que esté implicada en la unión a la membrana citoplasmática ya que la distancia entre la zona conservada KTG (que forma parte del sitio activo de la proteína) y el extremo C-terminal es muy corta (47 residuos).

Estos resultados sugieren que la proteína no está anclada a la membrana citoplasmática por su extremo C-terminal.

#### 4.3. Comparación de la secuencia aminoacídica de la DD -transpeptidasa de S.K15 con otros PBPs y $\beta$ -lactamasas:

Los programas GOAD y BESTFIT (M&M 14.5.3) fueron utilizados para comparar la secuencia aminoacídica de la DD-transpeptidasa de S. K15 con la de otras proteínas capaces de unir la penicilina (PBPs y  $\beta$ -lactamasas).

En el programa GOAD, el grado de homología viene expresado por una distancia: cuanto más negativa es esta distancia, mayor es la homología. El programa BESTFIT da un porcentaje de similaridad, un porcentaje de identidad y un tercer parámetro: la calidad de comparación que tiene en

PEPLOT of: K15prot. ck: 130, 1 to 262 June 27, 1990 17:20

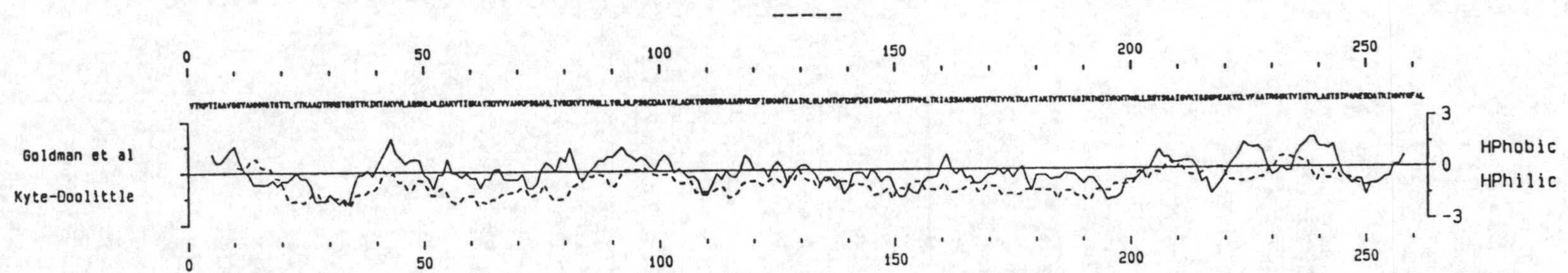


Figura 33.-Estudio de la hidrofobicidad de la DD-transpeptidasa de Streptomyces K15.

Proteína comparada con K15 y referencia	Estructura cristalina Resolución (Å) y referencia	PROGRAMMA UTILIZADO					
		Distancia	Region conservada alineada	BESTFIT			
				% Identidad	% Similaridad	Calidad	Región conervada alineada
<u>Dominios DD-transpeptidasa de los PBPs de elevado Mr de E. coli [50]</u>							
PBP 1A [132]		-55	Ser*	22,619	42,87	94,6	Ser*, W
PBP 1B [132]		-54	Ser*, SDN, KTG	20,31	42,19	97,1	Ser*
PBP 2 [133]		-50	Ser*	20,32	41,176	90,7	Ser*
PBP 3 [134]		-55	Ser*	22	44,98	91,4	Ser*, KTG
<u>PBPs de pequeño Mr</u>							
DD-peptidasa R61 [20]	2,25 Å [19]	-56	Ser*	21,399	45,27	97,4	Ser*
PBP 5 (E. coli) [135]		-225	Ser*, SGN, KTG	34,15	52,44	148,5	Ser*, SGN, KTG
PBP 6 (E. coli) [135]		-230	Ser*, SGN, KTG	34,008	51,417	147,5	Ser*, SAN, KTG
PBP 5 (B. subtilis) [136]		-179	Ser*, SAN, KTG	29,134	46,85	131,9	Ser*, SAN, KTG
<u>β-lactamasas</u>							
clase A: <u>Staphylococcus aureus</u> [137]	2,5 Å [54]	-118	Ser*, SDN	21,399	39,506	98,7	Ser*, SDN
<u>Streptomyces albus</u> 6 [120]	3 Å [55]	-58	Ser*	17,1	44,3	86	SDN, KTG
: <u>RTEM (E. coli)</u> [138]		-71	Ser*, SDN, W	23,26	40	102	Ser*, SDN, KSG
clase C: <u>Ampc (E. coli)</u> [139]		no	alineamiento	no	alineamiento		
clase D: <u>Oxa 2 (Salmonella typhimurium)</u> [140]		no	alineamiento	no	alineamiento		

**Tabla 12.-Resultados de los alineamientos efectuados entre la DD-peptidasa K15 y otros PBPs y β-lactamasas mostrando las zonas conservadas que son alineadas.**

```

      I             II
AEQTVEAPSVDAWILNDYASGKVLAEQNADEKLDPAASLTKIMTSYVVGQALKADK.IKL TDMVTVGKDAWATGN
DDLNIKTMIPGVPQIDAESYILIDYNSGKVLAEQNADVRRDPASLTKMMTSYVIGQAMKAGK.FKETDLVTIGNDAWATGN
ASDPIDINASAAIMTEASSGKILYSKNADKRLPIASMTKMMTEYLLLEAIDQGK.VK.....WDQ..
VTKPTIAAVGGYANNNGTGTTLYTKAADTRRSTGTTKIMTAKVVLAQSNLNLDAK....VTIQK.....

      III             IV
PALRGSSVMFLKPGDQVSVAD.....LNKG.....V I I O S G N D A C I A L A D Y V A . G S Q E .....
PVFKGSSLMFLKPGMVPVVSQ.....LIRG.....INLCSGNDACVAMADFAA.GSQD.....
.....TYTPDDYVYEI..SQDNSLSN..VPLRKGDK.YTVKELYQATAIYSANAAAIAIAEIVA.GSET.....
.....AYS..DYVVANKPSQAHLIVGDKVTVRQ.....LLYGL.MLPSSGCAAYALADKYGSGSQAAARVK

      V
SFIGLMNGYAKKLGLTNTTFQTVHGLDAPGQFS.....TARDMALLGKALIFDVPE.....E
AFVGLMNSYVNALGLKNTHFQTVHGLDADGQYS.....SARDMALIGQALIRDVPN.....E
KFVEKMNAKAKELGLTDYKFVNATGLENKDLHGHPGEGTSVNEESEVSADMAVLADHLITDYPE.....ILET
SFIGKMNTAATNLGLHNTHF.....DSFDGIGNGANYSTPRHLTKIA

      VI             VII
YAIHKEKEFTFNKIRQPNRNR.....LLWSSNLN.....E.DGMKTGTTAGAGYNLVASATQGDMRLISVVL
YSIYKEKEFTFNGIRQLNRNG.....LLWNSLN.....V.DGIKTGHTDKAGYNLVASATEGQMRLISAVM
SSIAKTK.FREGTDDMDMP.....NWFMLKGLVSEYKKA TV.DGLKTGSTD SAGSCFTGTAERNGMRVITVVL
SSAMKNSTFR TVVKAYTAKTVTKGSI RTMDTWKNT.NGLLSSYSGAI...GVKTGSGPEAKYCLVFAATRGGKTVIGTVL

GAKTDR..IRFNESEKLLTWGFRFFETV PBP6
GGRTFK..GREAESKLLTWGFRFFETV PBP5
NAKGNLHTGRFDETKKMFYAFDNFSMK PBP5S
.ASTSIP.ARES DATKIMNYGFAL K15

```

**Figura 34.- Alineamiento propuesto entre las secuencias aminoacídicas de los PBPs 5 y 6 de *E.coli*, el PBP 5 de *B.subtilis* y la DD-peptidasa de *Streptomyces* K15.**

o = Homología, · = Identidad estricta ,  
 .... = Delecciones , I a VII = regiones conservadas.

ENZIMA	SCORE*	S.D.U.**	NUMERO DE RESIDUOS EN LA		COSTE DE LA EDICION (%)
			SEQ. ALINEADA	SEQ. ORIGINAL	
PBP6	-252	20.09	194	259	25%
PBP5	-256	23.76	194	259	25%
PBP5S	-346	29.70	218	281	22%

**Tabla 13.- Scores y significación estadística (expresada como unidades estándar de desviación) de los alineamientos propuestos entre la DD-peptidasa K15 y los PBPs 5 y 6 de *E.coli* y el PBP 5 de *B.subtilis*.**

\* Score obtenido después de eliminar las secuencias no alineadas.  
 \*\* Unidades estándar de desviación [50].  
 \*\*\* Coste de la edición: porcentaje de residuos eliminados de las secuencias originales.

cuenta el número de aminoácidos alineados y no alineados, el número de deleciones introducidas en las secuencias comparadas y el tamaño de estas deleciones. Cuanto mayores son estos tres parámetros, mejor es la homología. Los alineamientos obtenidos con los dos programas no muestran diferencias fundamentales.

La tabla núm. 12 resume los resultados de los alineamientos así como las zonas conservadas que son alineadas.

Se observa una gran homología entre la DD-peptidasa de Strepto-mycetes K15 y los PBPs de pequeña masa molecular y poseedores de una actividad carboxipeptidásica: PBP 5 (distancia: -225, identidad: 34,15 %, similaridad: 52,44 %, calidad: 148,4), PBP 6 (distancia: -230, identidad: 34 %, similaridad: 51,42 %, calidad: 131,9 ) de E.coli y PBP 5 de B.subtilis (distancia: -179, identidad: 29,13 % , similaridad 46,85 %, calidad: 131,9).

Con los demás PBPs (PBPs 1A, 1B, 2 y 3 de E. coli y DD-peptidasas de S.R61) los scores (distancias) obtenidos son claramente inferiores (entre -50 y -70), así como las calidades de comparación (entre 90 y 97) y solamente son alineadas las zonas que contienen la serina activa (S\*XXK).

La homología observada entre la DD-peptidasa K15 y las  $\beta$ -lactamasas de clase A es relativamente elevada:  $\beta$ -lactamasas de Staphylococcus aureus (distancia: -118. identidad: 21,4 %, simi-laridad 39,5 %, calidad: 98,7 )y la  $\beta$ -lactamasa RTEM de E.coli (distancia: -71, identidad: 23,26 %, similaridad: 40% calidad: 102).

Las  $\beta$ -lactamasas de clase C (ampc de E. coli) y de clase D (Oxa 2 de Salmonella typhimurium ) no presentan prácticamente ninguna homología con la DD-peptidasa K15 y las regiones conservadas no son alineadas por ninguno de los dos programas. Los alineamientos obtenidos por la comparación de la secuencia aminoacídica de la DD-peptidasa K15 y de los PBPs 5 y 6 de E.coli. y PBP 5 de B.subtilis muestran que las zonas conservadas II (S\*XXK) y VII (KTG)

son alineadas.

Cuando la secuencia aminoácida de la DD-peptidasa K15 es comparada con la de los PBPs 5 y 6 de E.coli y PBP6 de B.subtilis mediante los dos programas mencionados, éstos alinean las zonas conservadas II (S\*XXK) y VII (KTG).

Además la secuencia SGC de K15 es alineada con las secuencias SGN (PBPs 5 y 6 de E.coli) o SAN (PBP 5 de B.subtilis). A partir de estos resultados, los alineamientos originales han sido modificados, con el objeto de hacer coincidir todas las demás regiones conservadas. La figura 34 muestra los resultados obtenidos. Las distancias (scores) entre las secuencias alineadas, SDU (unidades de desviación estándar) [M&M 14.15.3] y el coste de la edición son ilustrados en la tabla núm. 13.

#### 4.4. Predicción de estructuras secundarias.-

La utilización de los diferentes programas descritos en el capítulo M&M 14.15.2 nos permitió obtener las predicciones de estructuras secundarias por el método de Garnier-Osguthorpe y Robson (GOR) y por el método de Chou y Fasman [106,107].

La figura 35 (A,B,C) exponen los resultados obtenidos. La figura 36 compara las estructuras secundarias predichas para la DD-peptidasa K15 con las de la  $\beta$ -lactamasa de Staphylococcus aureus cuya estructura tridimensional es conocida [54].

Casi todas las estructuras secundarias (hélices  $\alpha$  y láminas plegadas  $\beta$ ) presentes en la  $\beta$ -lactamasa de S. aureus son pronosticadas para la DD-peptidasa de Streptomyces K15.

Como en la  $\beta$ -lactamasa de S.aureus, existen en la región N-terminal de la DD-peptidasa K15 dos láminas plegadas  $\beta$  ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ ) seguidas por una hélice  $\alpha$  ( $\alpha_2$ ), al principio de la cual se encuentra la zona conservada II (S\*XXK) (serina\* no incluida en la hélice), pero la hélice  $\alpha_1$  no es pronosticada en el caso de la DD-peptidasa de S. K15.

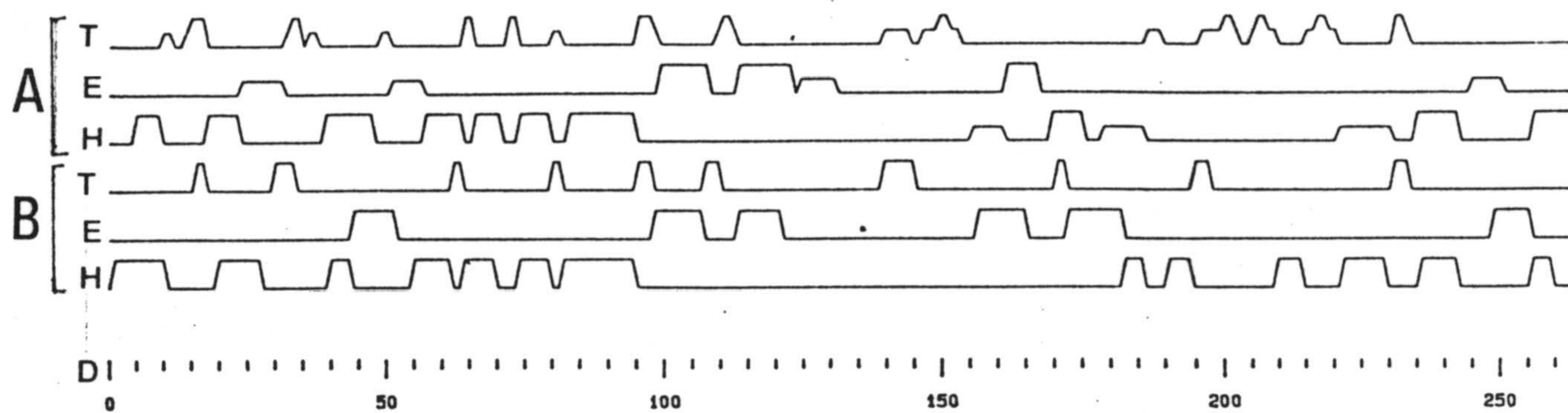


Figura 35.- Predicción de la estructura secundaria de la proteína.

A : Método de Chou y Fasman [107].  
 B : Método de Garnier et al. [106].  
 C : Método de Garnier et al. [106].  
 A y C : Programa Peptidestructure (GCG, Wis).  
 B : Programa Analysep (Staden)

T = bucles; C = regiones sin estructura definida; E = láminas plegadas  $\beta$ ; H = hélices  $\alpha$ ; D = localización de las diferentes estructuras.

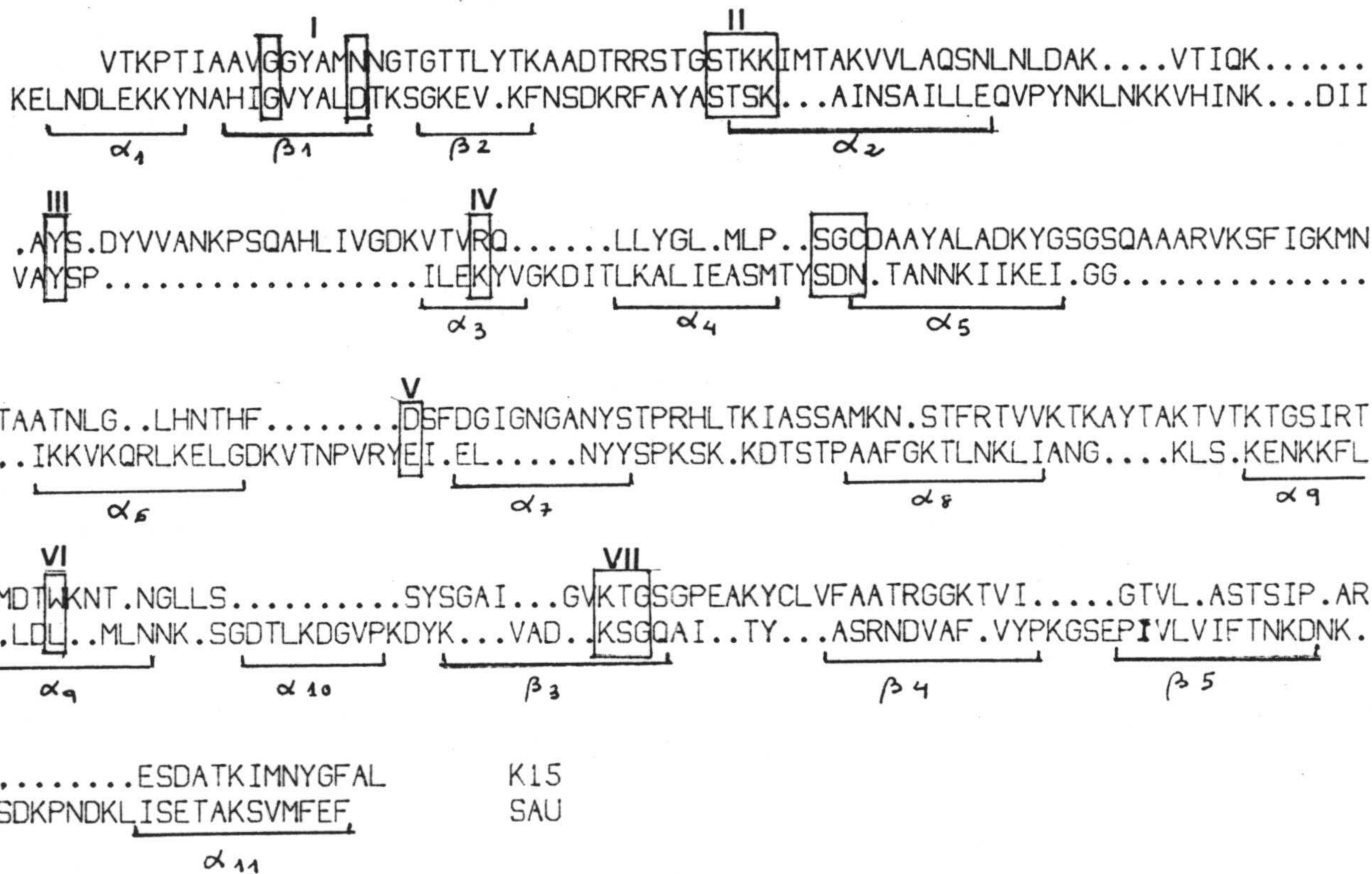
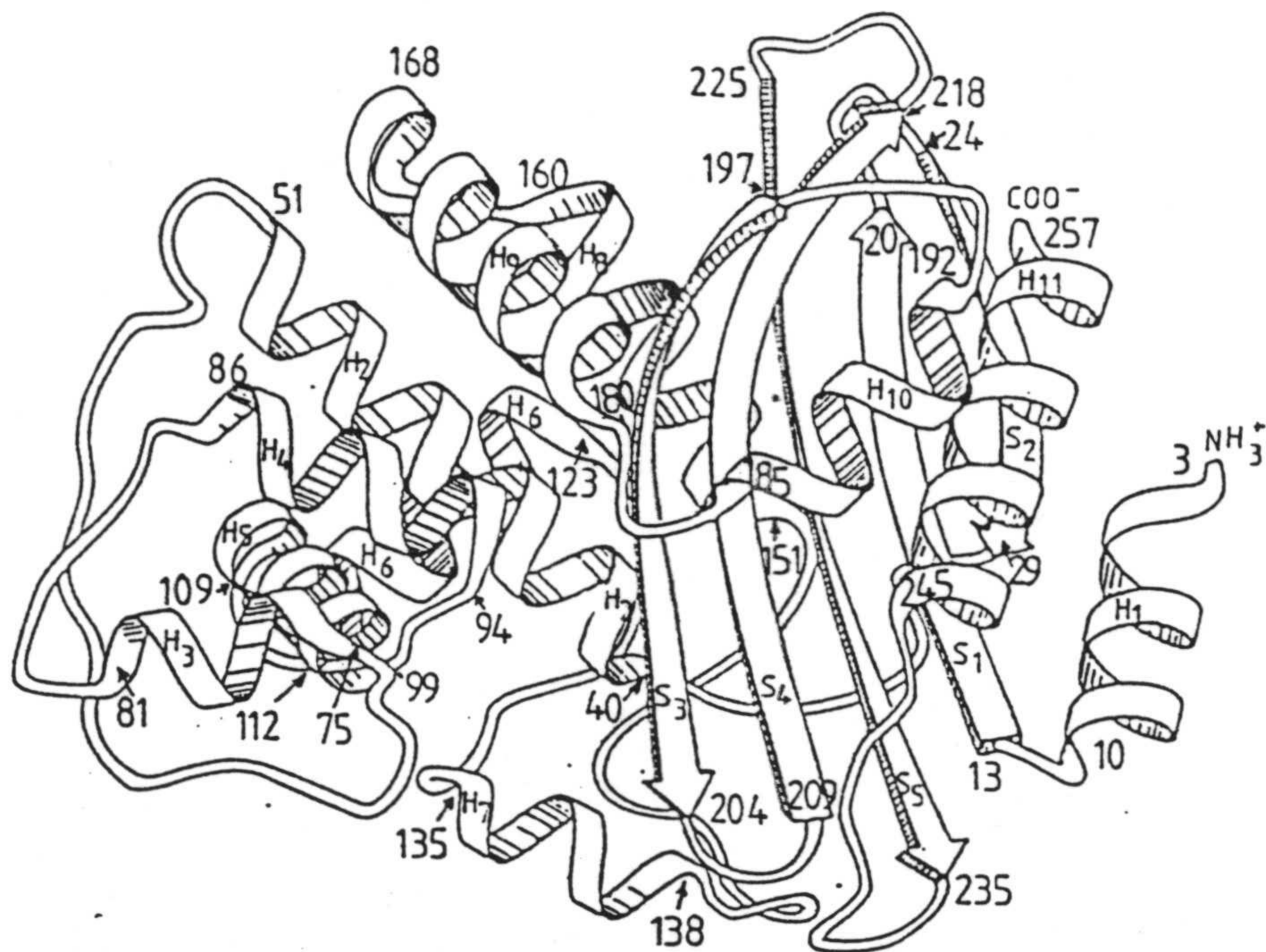


Figura 36.-Comparación de las estructuras secundarias predichas para la DD-peptidasa K15 con las de la  $\beta$ -lactamasa de *Staphylococcus aureus* [53].

A : representación esquemática de la estructura tridimensional de la  $\beta$ -lactamasa de *S.aureus*. Las cintas representan las hélices  $\alpha$  y las flechas las láminas plegadas  $\beta$ .

B : alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la DD-peptidasa K15 y la  $\beta$ -lactamasa de *S.aureus*, indicando la posición de las diferentes estructuras secundarias de la  $\beta$ -lactamasa.



La región C-terminal contiene tres láminas plegadas  $\beta$  ( $\beta_3, \beta_4, \beta_5$ ) seguidas por una hélice  $\alpha$  ( $\alpha_{11}$ ), que es muy corta en el caso de la DD-peptidasa de S. K15.

La lámina plegada  $\beta_3$  contiene la zona conservada KTG. Estas dos zonas N y C terminales constituyen el dominio " $\alpha/\beta$ " encontrado en todas las  $\beta$ -lactamasas cristalizadas [51 a 54] y la DD-peptidasa de Streptomyces R61 [19].

La parte central de la  $\beta$ -lactamasa de S.aureus está constituido por varias hélices  $\alpha$  separadas por bucles de diferentes tamaños y constituye el segundo dominio, el dominio "todo  $\alpha$ " presente en todas las proteínas capaces de unir la penicilina que han sido cristalizadas. Varias de estas hélices  $\alpha$  han sido igualmente pronosticadas en el caso de la DD-peptidasa K15 (figura 36), excepto la hélice correspondiente a  $\alpha_{10}$  (S. aureus).

En las  $\beta$ -lactamasas de S.aureus y Streptomyces albus G, una secuencia SDN se localiza a la entrada del sitio activo, entre las hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$ . Esta secuencia se alinea con la secuencia SGN (PBPs 5 y 6 de E.coli) o SAN (PBP5 de B.subtilis).

En la DD-peptidasa de S.K15, una secuencia SGC ocupa esta posición.

III.- RESULTADOS: Segunda parte.

A . EXPRESION DE LA DD-TRANSPEPTIDASA K15 EN -  
*Streptomyces* .-

Para obtener una cepa superproductora de DD-peptidasa K-15 los fragmentos portadores del gen deben ser clonados en plásmidos multicopias de *Streptomyces* en un sistema bacteria huésped/vector que permita la expresión. Esta clonación necesita dos experiencias preliminares: la puesta a punto de una técnica inmunológica de detección de clones productores y la selección de una cepa hospedadora apropiada.

A1. Puesta a punto de una técnica inmunológica de  
detección de clones productores de DD-peptidasa  
K15.

Dada su localización membranosa, la DD-peptidasa K15 solo puede ser detectada después de haber sido extraída de las colonias por la acción de un detergente (M&M 15.1 ). Con este fin, sobre la membrana de nitrocelulosa depositada sobre las colonias crecidas sobre una placa de Petri, se coloca un papel de filtro impregnado de una solución de SDS al 2%. Después de una incubación a 37°C, la DD-peptidasa solubilizada y fijada sobre la membrana de nitrocelulosa puede ser detectada siguiendo el protocolo descrito en el capítulo M&M 15.1.

Esta técnica ha sido adoptada después de haber modificado una serie de parámetros: el tipo de medio sólido utilizado (R2YE, AGly o S), el tiempo de cultivo (24, 48 o 64 h ), el detergente (SDS o BCTA), tratamiento con lisozima (1mg/ml) previo a la acción del detergente.

La especificidad de la técnica ha sido controlada: las colonias de S.K15 muestran una reacción positiva únicamente

A

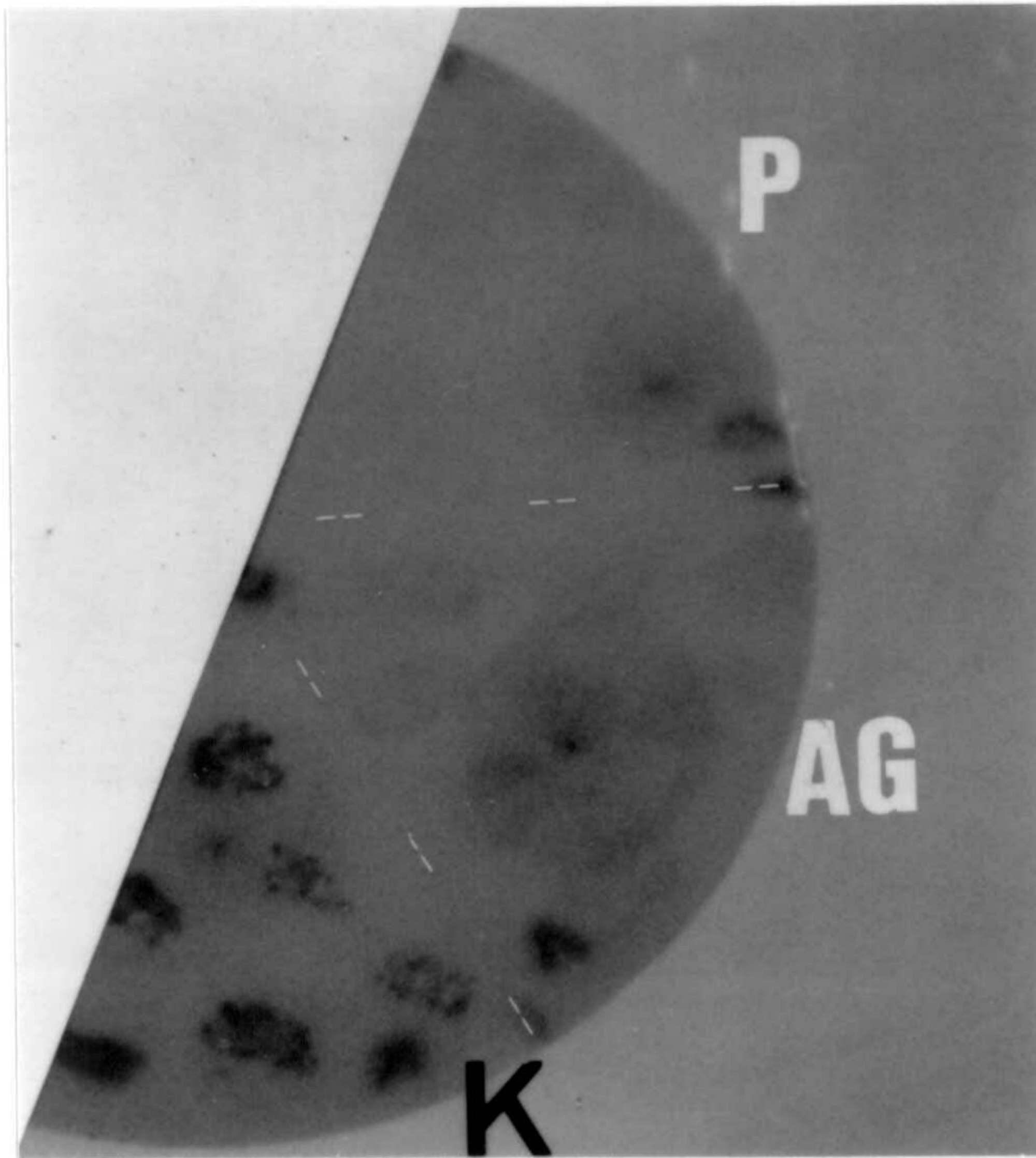


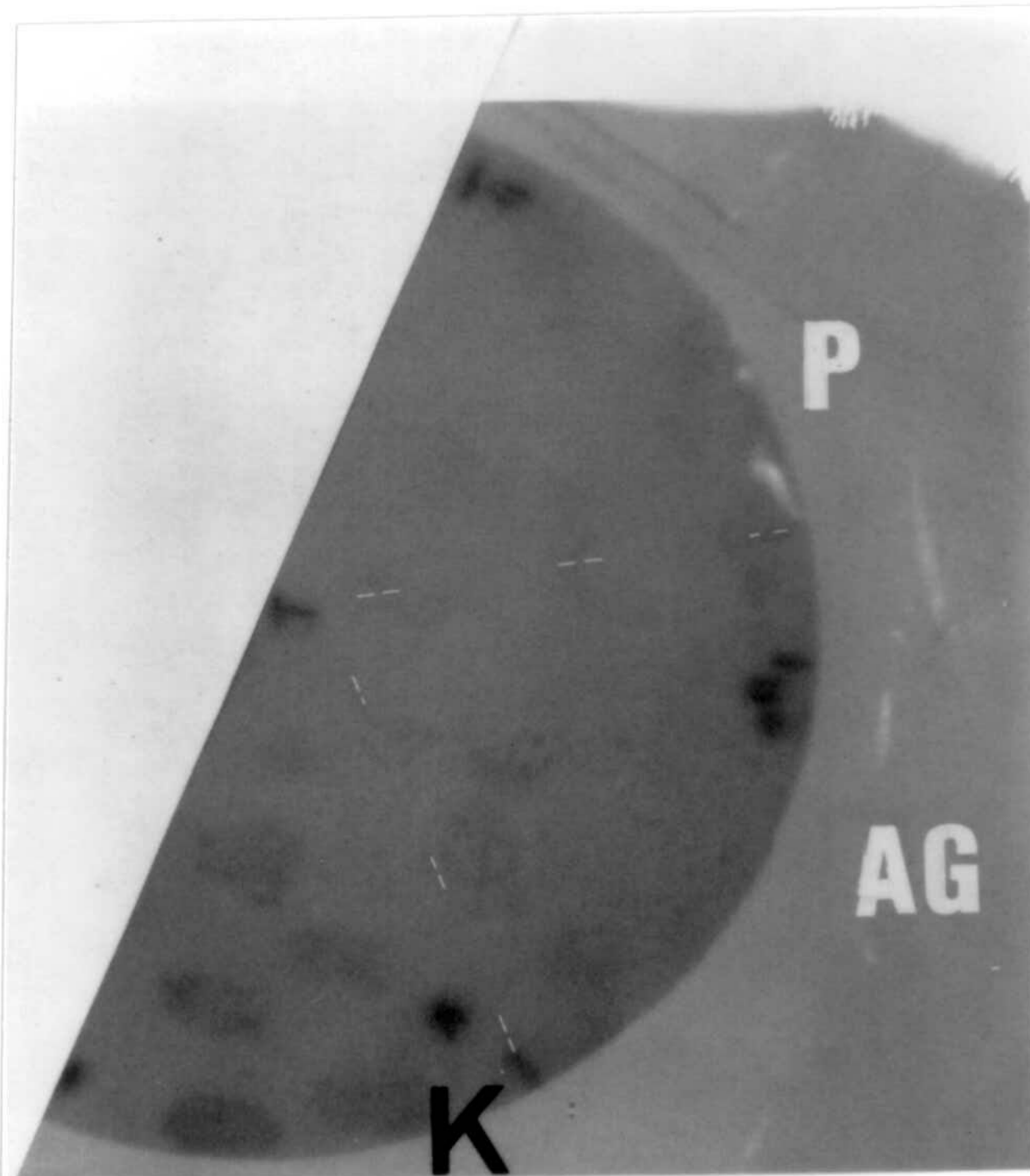
Figura 37.-Puesta a punto de una técnica de inmunodetección de las colonias productoras de DD-transpeptidasa K15.

A : Test inmunológico realizado en presencia de SDS.

B : Test inmunológico realizado sin SDS.

K = S. K15; AG = S.albus G; P = S.pristinaespiralis.

B



después de ser tratadas por el detergente(SDS) y en presencia de los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15 (figura 37).

#### **A2. Selección de la cepa hospedadora :**

La cepa huésped ideal no debe dar reacción cruzada con los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15. Además la tasa de regeneración de los protoplastos de dicha cepa, así que su tasa de transformación deben de ser elevadas.

La tabla 14 muestra las diferentes cepas ensayadas. Solo dos de entre ellas, S.albus G R2 y S.pristinaespiralis no dan una reacción positiva al test inmunológico(figura 37). Esta reacción negativa fue confirmada por la ausencia de una proteína de 27.000 daltons capaz de reaccionar frente a los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15 en las membranas citoplasmáticas y en un extracto BCTA del micelio de las dos cepas. Además, dichas fracciones no presentan ninguna actividad transpeptidásica en las condiciones utilizadas.

La tasa de transformación de ambas cepas ha sido estimada utilizando pIJ702 como vector. Con S.albus G R2 se obtuvieron  $2,5 \times 10^4$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de vector y con S.pristinaespiralis  $10^5$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de vector. S.pristinaespiralis fue seleccionada como cepa hospedadora, ya que no presenta prácticamente ninguna reacción cruzada frente a los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15 y sus protoplastos son transformados por los plásmidos de Streptomyces con una eficacia suficiente.

#### **A.3. Clonación del gen DD-transpeptidasa K15 en los vectores pIJ702 y pIJ699 .-**

El fragmento Sph I de 1,3 kb, aislado del plásmido pDML 223 fue insertado en el plásmido pIJ 702. El fragmento Bam HI de 10,7 kb, preparado a partir del plásmido pDML 220 fue clonado en el plásmido pIJ 699.

CEPA DE <u>STREPTOMYCES</u> sp	REACCION A LOS ANTICORPS ANTI DD-PEPTIDASA K15	ACTIVIDAD TRANS-PEPTIDASICA DE MEMBRANAS p moles/min/mg de proteina
<u>S. K15</u>	Positiva	57
<u>S. lividans</u> TK24	Positiva	57
<u>S. griseofuscus</u> ATCC 29916	Positiva	15
<u>S. fradiae</u> ATCC 10745	Negativa	4
<u>S. fradiae</u> PM76 [79]	Ligeramente Positiva	17,4
<u>S. vinaceus</u> NCJB 8852	Positiva	15
<u>S. albus</u> GR2 [80]	Negativa	0*
<u>S. ambofaciens</u> ATCC 15154	Positiva	60
<u>S. venezuelae</u> DMS 40755	Positiva	22
<u>S. coelicolor</u> A(3)N2	Positiva	11
<u>S. pristinaespiralis</u> ATCC 25486	Negativa	6

\* actividad no detectable en las condiciones utilizadas.

Tabla 14 .-Cepas de *Streptomyces* ensayadas como cepas hospedadoras potenciales para la clonación del gen DD-peptidasa K15.

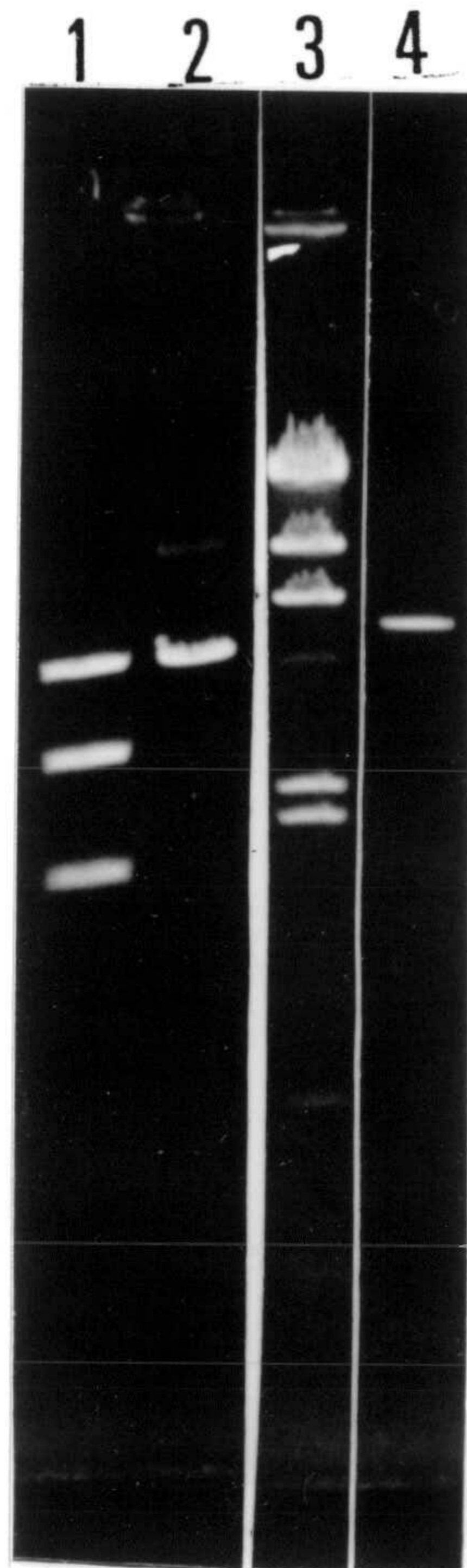


Figura 38.- Preparación de los vectores de *Streptomyces*.

1) pIJ 699 digerido por Dra I + Bgl II; 2) Fragmento Bgl II utilizado para la clonación (5 kb); 3) ADN del fago digerido por Hind III; 4) pIJ702 digerido por Sph I.

### A.3.1. Preparación de los fragmentos Sph I y Bam HI.-

1,5 µg de plásmido pDML 223 fueron digeridos por Sph I ( 2 u/µg de ADN, 2 h a 37°C ) y 20 µg de plásmido pDML 220 por Bam HI (2 u/µg de ADN, 2 h a 37°C ).

Los plásmidos digeridos por los correspondientes enzimas de restricción fueron depositados sobre un gel de agarosa 1% y sometidos a una electroforesis preparativa. A continuación, los fragmentos Sph I de 1,3 kb y Bam HI de 10,7 kb, fueron purificados por electroelución (M&M 14.9.1)

### A.3.2. Preparación de los vectores de Streptomyces.-

1) Preparación del plásmido pIJ 702 (figura 38 ):  
El plásmido pIJ 702 fue linearizado por Sph I y a continuación tratado por la fosfatasa alcalina bacteriana ( BAP ), ( M&M 14.5 ).

2) Preparación del vector pIJ 699 ( figura 38 ), ( M&M 2.1 ). La digestión del plásmido pIJ 699 por Bgl II origina dos fragmentos: un fragmento de 5 kb y un fragmento de 4,6 kb (que contiene el origen de replicación del plásmido pACYC 184 de E.coli )(figura 11 ). Como estos dos fragmentos poseen un tamaño muy próximo, el plásmido pIJ699 fue primeramente hidrolizado por Dra I, que corta en el fragmento de 4,6 kb; el plásmido linearizado fue digerido a continuación por Bgl II y el fragmento de 5 kb purificado por electroelución.

### A.3.3. Ligación .-

100 ng de pIJ 702 y 45 ng de fragmento Sph I procedente del plásmido pDML 223 o 100 ng de plásmido pIJ699 y 180 ng de fragmento Bam HI procedente del plásmido pDML 220 fueron incubados en presencia de la T4 ADN ligasa

y la ligación fué realizada en las condiciones indicadas anteriormente (M&M 14.4).

La mezcla de ligamiento pIJ 702-fragmento Sph I fue llamada: mezcla de ligamiento 1 y la mezcla de ligamiento pIJ699-fragmento Bam HI :mezcla de ligamiento 2.

#### **A.3.4. Transformación de *Streptomyces pristinaespiralis*.**

10 µl de la mezcla de ligamiento 1 o 2, que contenía 50 ng de vector, fue añadida a 100 µl de protoplastos (10<sup>8</sup> protoplastos). Después de la adición de 320 µl de PEG1500 ( 2 g en 5 ml de tampón P) la mezcla fue diseminada sobre medio sólido R2YE.

Los transformantes recombinantes obtenidos con la mezcla de ligamiento 1 son mel -, ya que la inserción de un fragmento en el sitio Sph I, provoca la inactivación del gen mel responsable de la producción de tirosinasa. Con esta mezcla de ligamiento se obtuvieron 405 transformantes, 75% de los cuales eran recombinantes.

Con la mezcla de ligamiento 2, tan solo obtuvimos 9 transformantes, pero todos ellos son teóricamente recombinantes ya que, debido a la presencia de 2 terminadores de transcripción del fago fd localizados en los dos extremos del fragmento de 5 kb procedente de la digestión de pIJ699 por Bam HI, solo son viables los plásmidos en los cuales estas secuencias inversamente repetitivas están separadas por un fragmento de ADN de mas de 50 pares de bases, impidiendo así la formación de un palíndromo perfecto.

#### **A.3.5. Selección de los clones productores de DD-peptidasa K15 por una técnica inmunológica .-**

57 clones fueron repicados sobre medio sólido R2YE + thiostreptona (25µg/ml):

- 48 clones procedentes de la transformación 1 ( vector



A

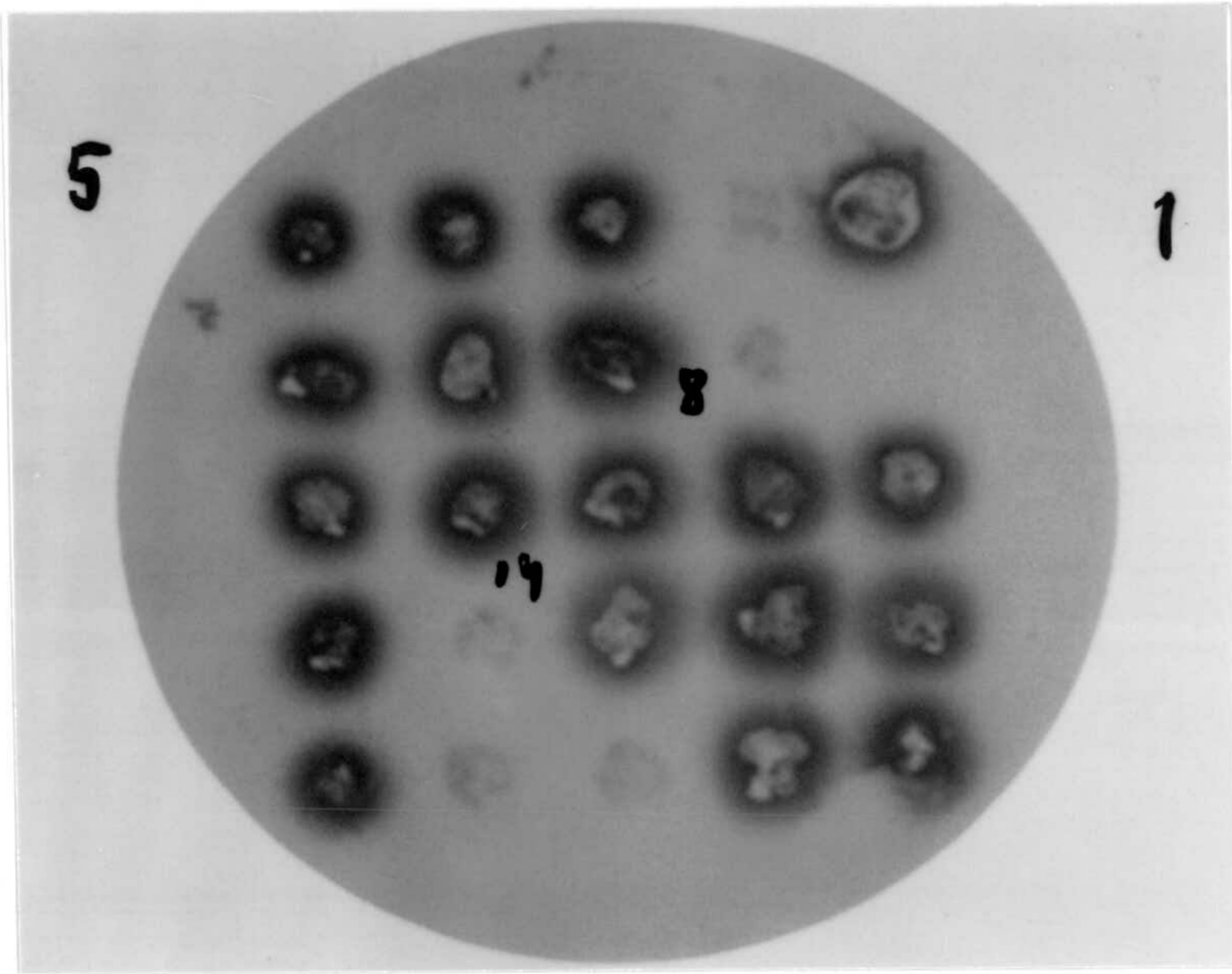
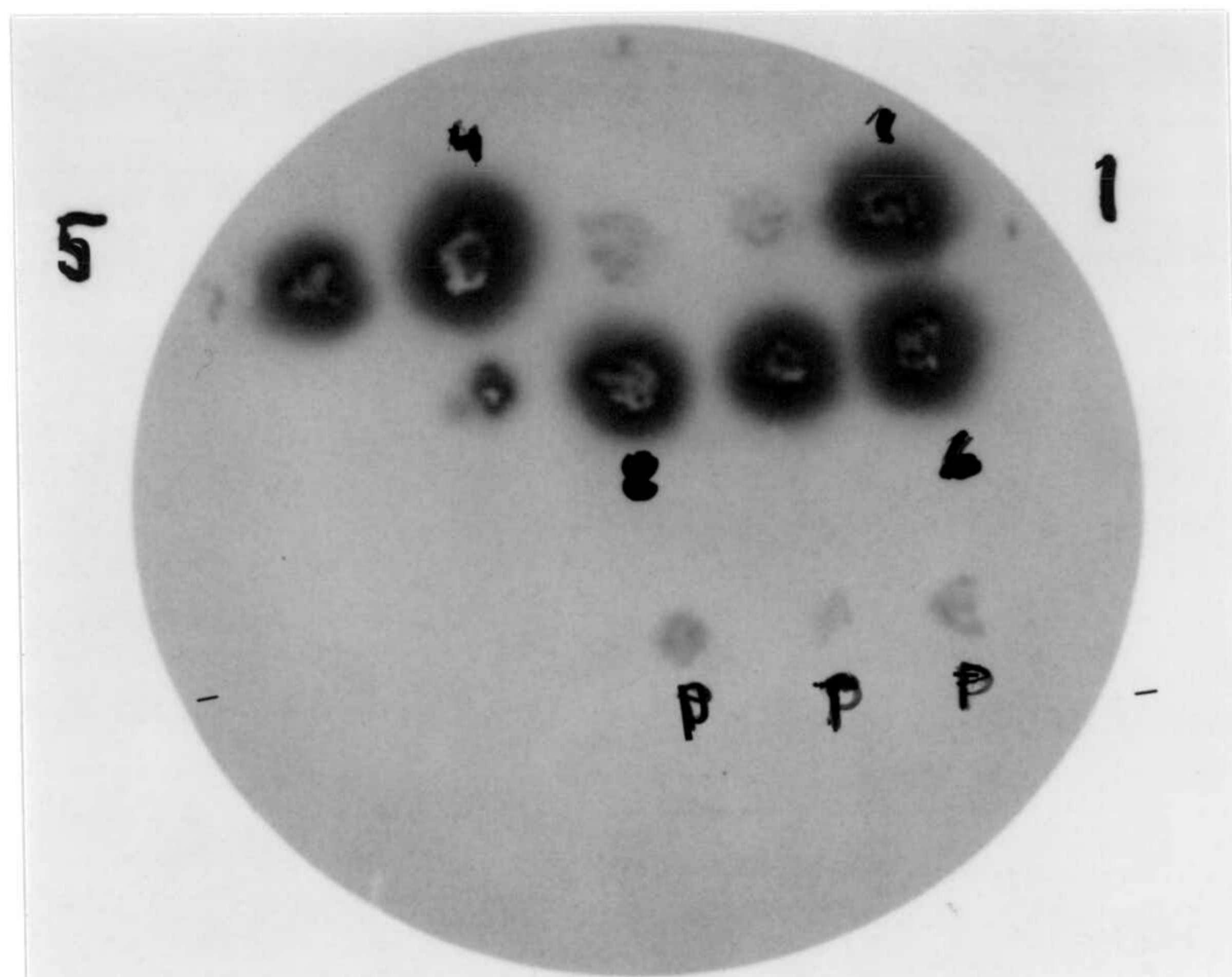


Figura 39.- Detección de los clones productores de DD-peptidasa K15 por una técnica inmunológica.

A: Clones 1 a 25 procedentes de la transformación 1.  
Vector : pIJ702 + fragmento Sph I.  
B: Clones 1 a 9 procedentes de la transformación 2.  
Vector : pIJ699 + fragmento Bam HI.

B



:pIJ 702 + fragmento Sph I ).

- Los 9 clones procedentes de la transformación 2 (vector: pIJ699 + fragmento Bam HI).

- S. pristinaespiralis transformado por el vector pIJ 702 o pIJ699 fue utilizado como testigo.

Los clones productores de DD-peptidasa K15 fueron detectados gracias a la técnica inmunológica descrita en M&M 15.1.

Una membrana de nitrocelulosa fue depositada sobre las colonias y a continuación estas fueron impregnadas de tampón Tris-HCl 25 mM que contenía 2% de SDS, incubadas a 37°C y puestas en presencia de los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15. La figura 39 muestra los resultados obtenidos.

De los 48 clones procedentes de la transformación 1 (figura 39A),

37 dieron una reacción positiva.

6 de los 9 clones procedentes de la transformación 2 (figura 39B),

dan una reacción netamente positiva a los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15, 1 da una reacción mas débil, 2 son negativos y se comportan como los testigos.

La reacción positiva no se limita a las colonias, sino que se extiende a una zona bastante extensa alrededor de las mismas.

Minipreparaciones de plásmidos, realizadas a partir de las colonias productoras ( 4 por cada plásmido recombinante), revelaron la presencia de plásmidos que poseían el tamaño adecuado.

#### **A.3.6. Localización de la DD-transpeptidasa K15 producida por los clones de S. pristinaespiralis**

Dos clones fueron seleccionados: 1 clon obtenido a partir de la mezcla de ligamiento 1, que fue llamado PM1 y 1 clon obtenido a partir de la mezcla de ligamiento 2, que fue llamado PM2.

Cepa	ACTIVIDAD TRANSPEPTIDASICA					
	nmoles/min/l de cultivo	Membranas nmoles/min/g de micelium (*)	Extracto nmoles/min/l de cultivo	BCTA nmoles/min/g de micelium (*)	Sobrenadante de cultivo nmoles/min/l de cultivo nmoles/min/g de micelium (*)	
<u>S. pristinae</u> PM1 ( <u>Sph</u> I)	5,12	0,154	210	6,3	actividad transpeptidasica pequeña o ausente	
<u>S. pristinae</u> PM2 ( <u>Bam</u> HI)	6,2	0,16	420	10,94	actividad transpeptidasica pequeña o ausente	
<u>S.</u> K15	3,8		25			

(\*) peso húmedo

Tabla 15.-Actividad transpeptidàsica de las tres fracciones preparadas a partir de los clones PM1 y PM2 y de las fracciones correspondientes de *Streptomyces* K15.

La actividad viene dada en nmoles /min /litro de cultivo y en nmoles /min /g de micelio húmedo.

1) Preparación de las diferentes fracciones:  
Las membranas y un extracto BCTA de los dos clones fueron preparados según las técnicas descritas en M&M : 15.2.1 y 15.2.2, a partir del micelio procedente de 250 ml de un cultivo de 48 h en caldo TSB adicionado de thiostreptona (25 µg/ml). Los sobrenadantes de los cultivos fueron recuperados y concentrados 10 x por ultrafiltración sobre AMICON ( membranas YM10 ).

2) Determinación de la actividad transpeptidásica en las tres fracciones obtenidas:  
La actividad transpeptidásica de las membranas, extractos BCTA y sobrenadantes de los cultivos de los dos clones PM1 y PM2 fue estimada en las condiciones detalladas en el capítulo M&M :15.4.1 utilizando como aceptor el dipéptido [<sup>14</sup> C ] Gly-Gly (1,5 M) y como donador Ac<sub>2</sub>-L-Lys-D-Ala-D-Ala (5 mM).

La tabla 15 da las actividades transpeptidásicas obtenidas.

La actividad de las membranas obtenidas a partir de los clones productores es solo ligeramente superior a la de las membranas de S.K15. Por el contrario, la actividad de los extractos BCTA es netamente superior: hay respectivamente 8 y 17 veces mas actividad en los extractos BCTA de los clones PM1 y PM2 que en el mismo extracto de Streptomyces K15 [68]. Ninguna actividad transpeptidásica fue detectada en los sobrenadantes de cultivo en las condiciones utilizadas.

#### A.3.7. Inestabilidad de los clones PM1 y PM2.-

Después de algunos subcultivos en caldo TSB mas thiostreptona (25 µg/ml) los extractos BCTA fueron nuevamente preparados a partir del micelio de los clones productores y su actividad transpeptidásica estimada; estos extractos, sobre todo el extracto preparado a partir del micelio del clon PM2, mostraron una actividad mucho menor que los precedentes.

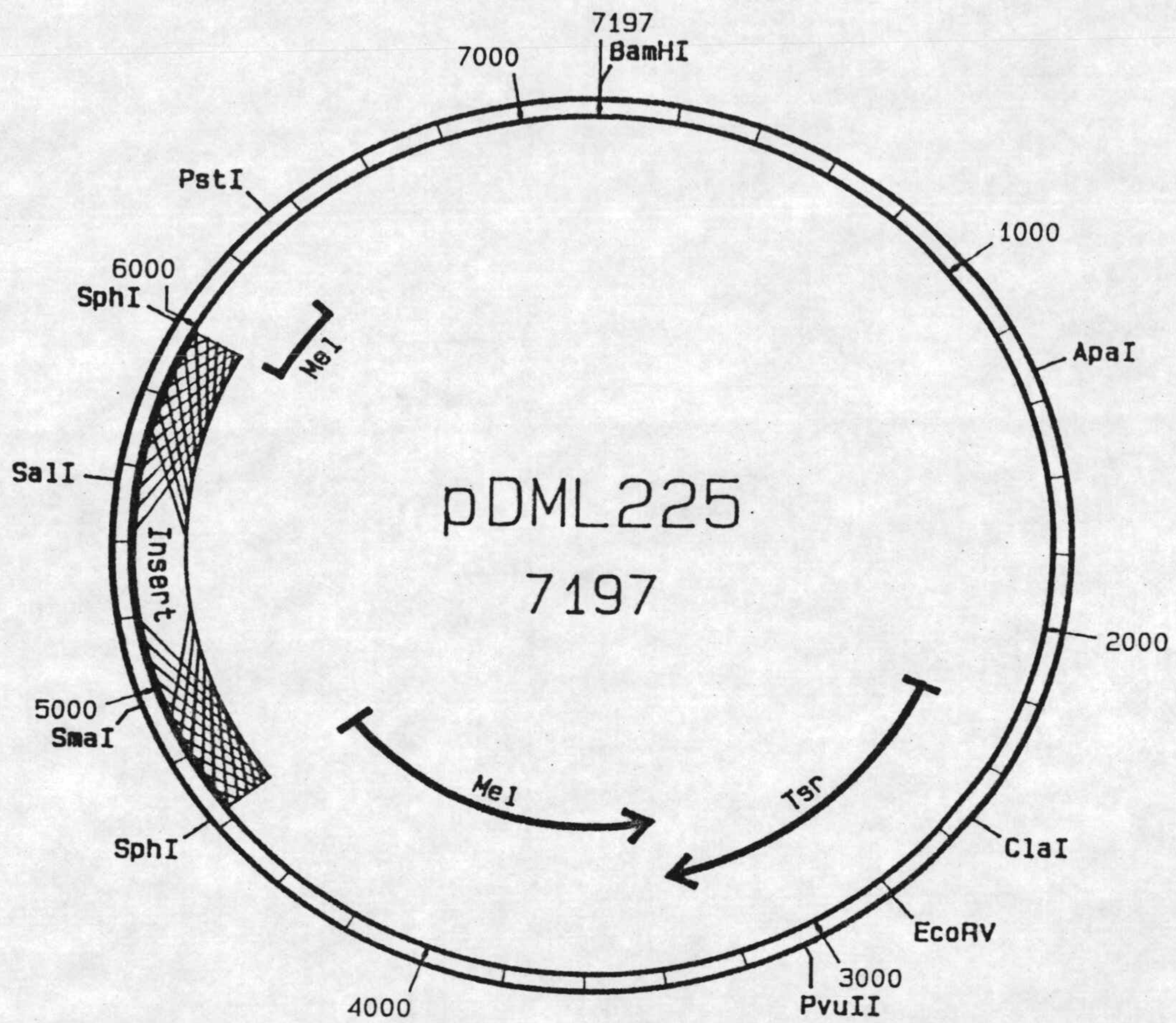


Figura 40.- Mapa genético-físico del plásmido pDML 225.

fue preparado a partir del clon PM1 ;la figura 40 muestra el mapa de restricción de dicho plásmido.

El plásmido pDML 225 fue utilizado para transformar S.lividans TK24, a pesar de que esta cepa muestra una débil reacción cruzada frente a los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15. Este plásmido fue asimismo utilizado para transformar S. pristinaespiralis.

#### A.4. Superproducción de DD-transpeptidasa K15 en Streptomyces lividans y S.pristinaespiralis .-

##### A.4.1. Transformación :

40  $\mu$ l de protoplastos de S.lividans TK24 o S.pristinaespiralis (conteniendo  $10^7$  protoplastos) fueron mezclados con 4 $\mu$ l (50 ng) de plásmido pDML 225. Después de la adición de 160  $\mu$ l de PEG1500 disuelto en el tampón P (concentración final 22%) la mezcla de transformación fue diluida 5 y 20 veces (S.pristinaespiralis) o 100 veces (S.lividans) en el tampón P y 180  $\mu$ l de la dilución fueron diseminados sobre medio sólido R2YE.

Se obtuvieron  $6,5 \times 10^5$  transformantes/ $\mu$ g de plásmido (S. lividans) y  $1,2 \times 10^4$  transformantes/ $\mu$ g de plásmido (S.pristinaespiralis).

##### A.4.2. Detección inmunológica de los clones productores de DD-transpeptidasa K15 .-

25 clones procedentes de cada transformación fueron repicados sobre medio sólido R2YE + thiostreptona (25 $\mu$ g/ml) y las colonias productoras de DD-transpeptidasa fueron detectadas gracias a la técnica inmunológica descrita en el capítulo M&M:15.1.

Los resultados del test inmunológico son mostrados por la figura 41 A y B.

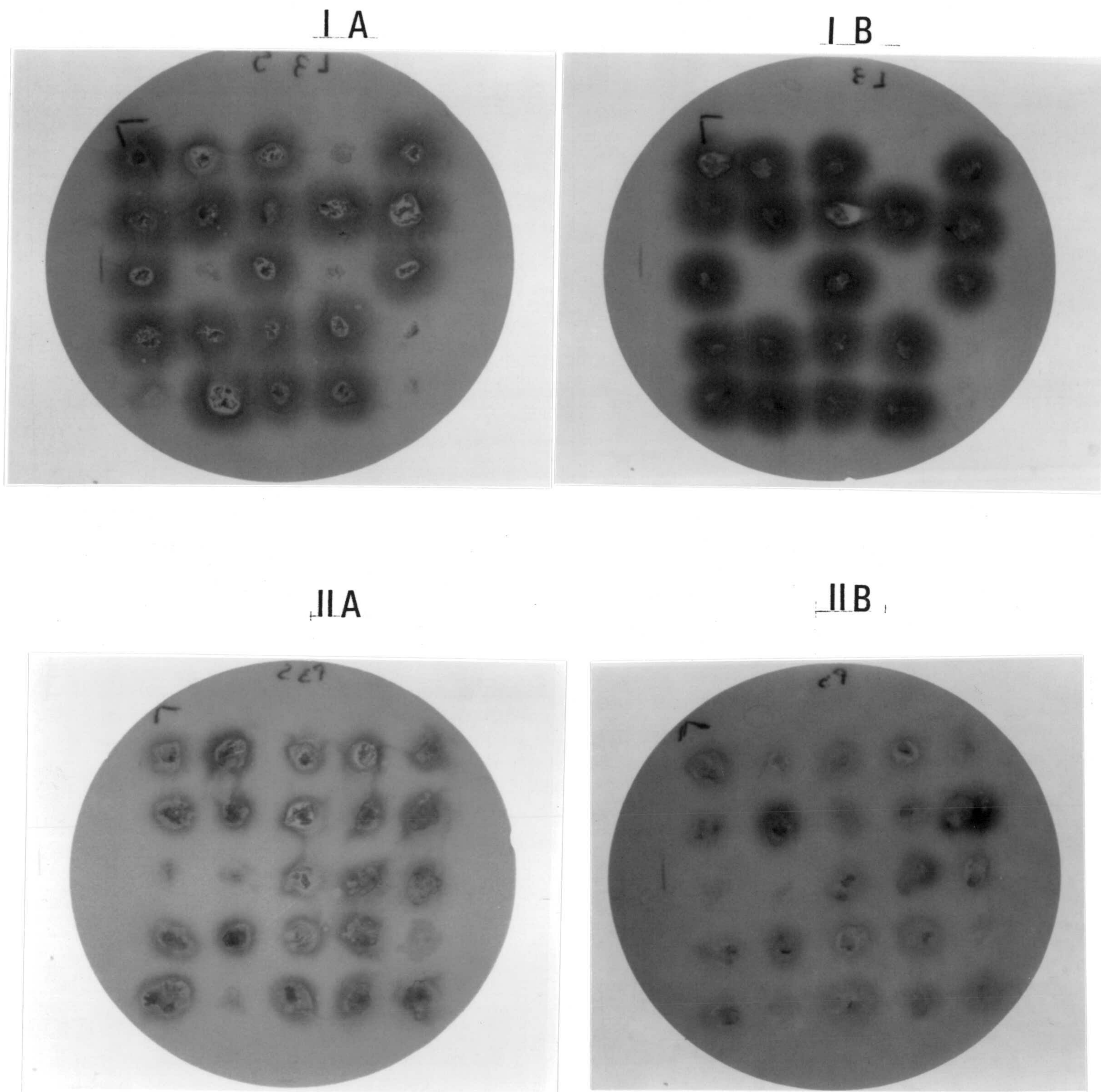


Figura 41.- Detección inmunológica de los clones productores de DD-peptidasa.

- I : Clones procedentes de la transformación de S.lividans TK24 por el plásmido recombinante pDML 225.
- II : Clones procedentes de la transformación de S.pristinaespiralis por pDML 225.
- A : Test inmunológico realizado en presencia de SDS.
- B : Test inmunológico realizado sin SDS.

Los resultados del test inmunológico son mostrados por la figura 41 A y B.

El 80% de los clones de las dos cepas utilizadas que contienen el plásmido pDML 225, muestran una reacción positiva al test inmunológico.

Los clones obtenidos por transformación de S.lividans (figura 41, A y B , I ) muestran una reacción positiva frente a los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15 que no se limita a las colonias, sino que se extiende a una zona relativamente amplia alrededor de las mismas (compárese figura 41 AI y BI), lo que sugiere que una parte importante del enzima es excretado al medio de cultivo como consecuencia de la superproducción.

La reacción a los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15 de los clones procedentes de la transformación de S.pristinaespiralis (figura 41, A y B, II) es mucho menos intensa.

#### **A.4.3. Localización de la DD-transpeptidasa K15 producida por los clones de S.lividans y S. ptistinaespiralis.**

##### **A.4.3.1. Preparacion de las diferentes fracciones celulares a partir de los clones productores .-**

Dos clones, uno de S.lividans y otro de S.pristinaespiralis , denominados respectivamente PM3 y PM4, fueron seleccionados; las distintas fracciones celulares fueron preparadas a partir de los dos clones a fin de localizar la actividad transpeptidásica.

Como testigo utilizamos las mismas fracciones preparadas a partir de la cepa S.lividans TK24.

1)-Preparación de membranas citoplasmáticas y extractos BCTA:

Las membranas y los extractos BCTA fueron preparados como se describe en el capítulo M&M:15.2., a partir del micelio procedente de un cultivo de 48 h en zona de caldo TSB que contenía 50 µg/ml de thiostreptona.



## 2)-Preparación de las fracciones solubles :

El sobrenadante del cultivo utilizado para obtener el extracto BCTA fue concentrado 10 veces por ultrafiltración sobre AMICON ( membrana YM10 ).

La fracción obtenida después del tratamiento del micelio por la lisozima ( M&M:15.2.1 ), llamada sobrenadante lisozima, fue dializada durante 24 h a 4°C contra una solución de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, y a continuación concentrada 10 veces por ultrafiltración por AMICON (membrana YM10).

### A.4.3.2 Detección de la DD-peptidasa K15 en las cuatro fracciones obtenidas .-

La producción de DD-peptidasa en las cuatro fracciones mencionadas en el apartado anterior fue estimada mediante tres técnicas diferentes: la reacción con la [<sup>35</sup>S] bencilpenicilina, la reacción inmunológica frente a los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15 y la determinación de la actividad transpeptidásica.

Las tres técnicas utilizadas confirmaron la presencia de la DD-transpeptidasa K15 en todas las fracciones de S.lividans PM3, mientras que las fracciones preparadas a partir de S.pristinaespiralis mostraron una actividad sensiblemente inferior.

#### 1) - Test inmunológico:

Las proteínas presentes en las diferentes fracciones fueron separadas por electroforesis sobre gel de poliacrilamida en presencia de SDS; a continuación las proteínas fueron transferidas sobre una membrana de nitrocelulosa e incubadas en presencia de los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15. Las proteínas capaces de reconocer estos anticuerpos fueron puestas en evidencia mediante reacción con la fosfatasa alcalina acoplada a los anticuerpos de cabra dirigidos contra los anticuerpos de conejo ( para una explicación más detallada, véase M&M:15.6.3. ).

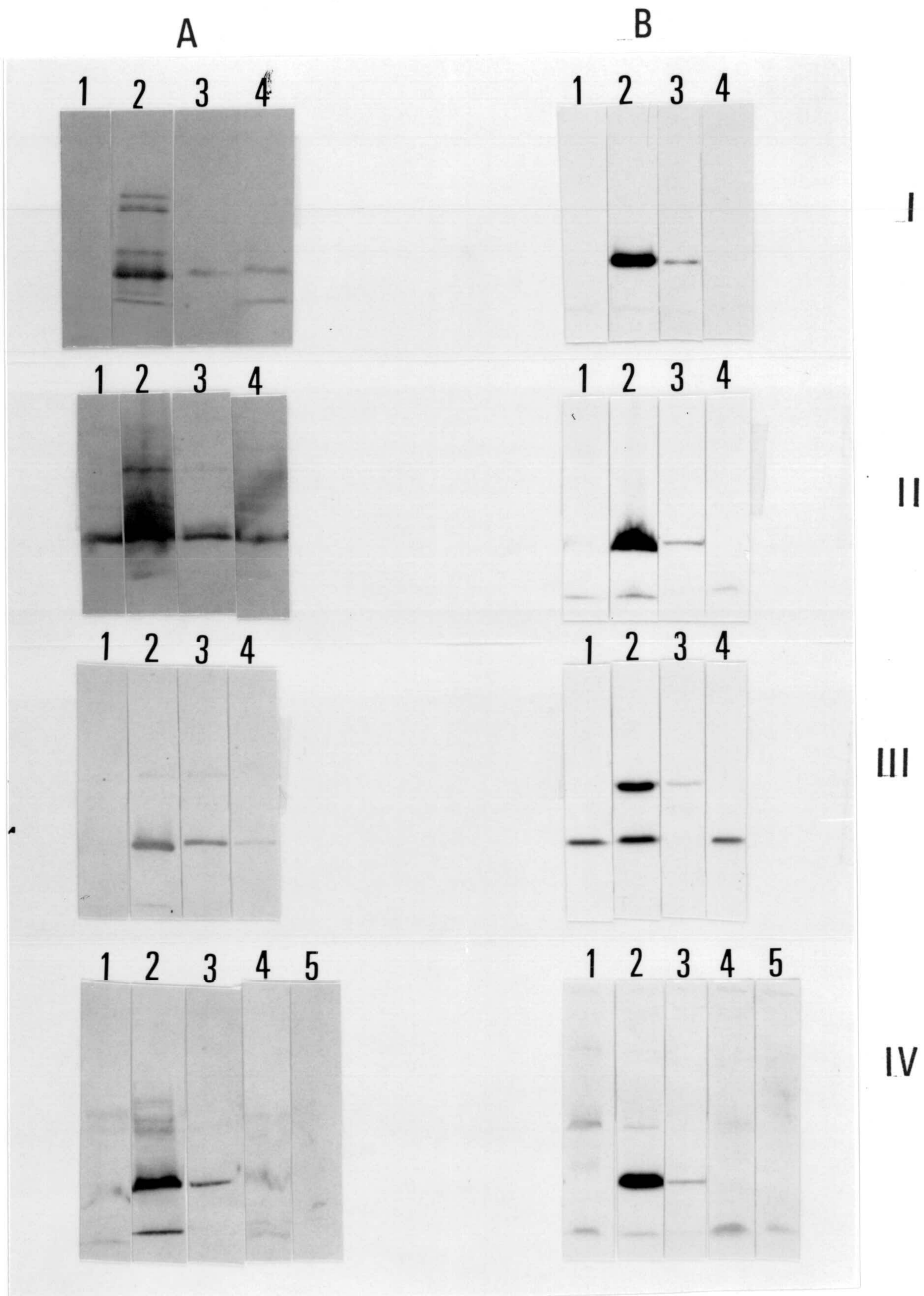


Figura 42.- Detección de la DD-transpeptidasa K15 en las diferentes fracciones preparadas a partir de los clones *S.lividans* PM3 y *S.pristinaespiralis* PM4.

A : Test inmunológico. B : Fluorografía.

I : Sobrenadante del cultivo .1) *S.lividans* TK24(20  $\mu$ g); 2) PM3(13  $\mu$ g); 3) 0,06  $\mu$ g DD-peptidasa K15 pura; 4) PM4(19  $\mu$ g).

II : Sobrenadante lisozima. 1) *S.lividans* TK24( $\pm$  25  $\mu$ g); 2) PM3( $\pm$  70  $\mu$ g); 3) 0,06  $\mu$ g de DD-peptidasa K15 pura; 4) PM4( $\pm$  64  $\mu$ g).

III : Extracto BCTA. 1) *S.lividans* TK24(15  $\mu$ g); 2) PM3 (3,6  $\mu$ g); 3)  $\mu$ g DD-peptidasa K15 pura; 4) PM4 (5 $\mu$ g).

IV : Membranas. 1) *S.lividans* TK24(100  $\mu$ g); 2) PM3 (33 $\mu$ g); 3) 0,06  $\mu$ g de DD-peptidasa K15 pura; 4) PM4 (100  $\mu$ g); 5) *S.pristinaespiralis* (100  $\mu$ g).

Cepa	ACTIVIDAD TRANSPeptIDASICA											
	(c)			(d)			(d)			(c)		
	Membranas		A. específica	Extracto BCTA		A. específica	Sobrenadante de cultivo		A. específica	Sobrenadante liozima		
A. total	A. total	A. total	A. total	A. total	A. total	A. total	A. total	A. total	A. total	A. total		
nmoles/min/ a)l b)g	nmoles/min/ a)l b)g	nmoles/min/mg	nmoles/min/ a) b)g	nmoles/min/ a) b)g	nmoles/min/ a) b)g	nmoles/min/ a)l b)g	nmoles/min/ a)l b)g	nmoles/min/ a)l b)g	nmoles/min/ a)l b)g	nmoles/min/mg		
<i>S. lividans</i> PM3	47	2,1	0,29	3.350	149	7,6	1.340	41	7,1	101	4,5	0,11
<i>S. pristinaespiralis</i> PM4	6,2	0,15	0,08	455	11,2	5,5						
<i>S.</i> K15	3,8		0,05	25		0,89						
<i>S. lividans</i> TK24	7,2	0,15	0,057									

(c) medida del producto transpeptidado; (d) medida de la D-Ala liberada; (e) La DD-peptidasa *S. lividans* es inactiva en presencia de BCTA.

Tabla 16.-Actividad transpeptidásica de las cuatro fracciones preparadas a partir de *Streptomyces lividans* PM3 y *Streptomyces pristinaespiralis* PM4.

La actividad viene dada en nmoles /min /litro de cultivo (a), nmoles /min /g de micelio húmedo (b) y en nmoles /min /mg de proteína.

Una proteína de masa molecular de 27.000 daltons ,capaz de reaccionar frente a los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15 fue detectada en todas las fracciones de S.lividans PM3,incluso en las fracciones solubles: sobrenadante de cultivo y sobrenadante lisozima (figura 42 ).

2) - Reacción con la [<sup>35</sup>S]bencilpenicilina :

Las muestras fueron incubadas durante 15 minutos a 37°C en presencia de [<sup>35</sup>S] bencilpenicilina (0,1 mM, 500

nCi/nmol),antes de añadirles una mezcla desnaturizante que contenía bencilpenicilina no radioactiva (a concentración final 0,1 M).A continuación las muestras fueron depositadas sobre un gel de poliacrilamida en presencia de SDS y sometidas a una fluorografía ( M&M:15.6.2 )

Después de una exposición de 10 días a -70°C, las películas fueron reveladas.La figura 42 muestra los resultados obtenidos.

En todas las fracciones preparadas a partir de S.lividans PM3 encontramos una proteína de masa molecular de 27.000 daltons capaz de fijar la [<sup>35</sup>S] bencilpenicilina.En las fracciones preparadas a partir de S.pristinaespiralis PM4,la presencia de una proteina de 27.000 daltons es apenas detectable.

3) - Determinación de la actividad transpeptidásica de las fracciones obtenidas :

Para estimar la actividad transpeptidásica el tripéptido Ac<sub>2</sub>-L-Lys-D-Ala-D-Ala fue utilizado como donador y como aceptor utilizamos el dipéptido [<sup>14</sup>C] Gly-Gly o el dipéptido GlyGly ( M&M:15.4,1-2 ).

La tabla 16 muestra las actividades transpeptidásicas obtenidas.

Las membranas del clon S.lividans PM3 presentan una actividad 10 veces superior a la de las membranas de S.K15,mientras que la actividad de las membranas de S.pristinaespiralis PM4 es tan solo ligeramente superior a la de las membranas de S.K15.

<b>ACTIVIDAD TRANSPEPTIDASICA</b>		
<b><u>Tiempo de cultivo</u></b>	<b><u>Actividad total nmoles/min/l de cultivo</u></b>	<b><u>Actividad específica. nmoles/min/mg de proteína</u></b>
48 h	1970	7,3
72 h	870	2,3
96 h	830	1,8

**Tabla 17.-Evolución de la actividad transpeptidásica en el sobrenadante de cultivo de *S.lividans* PM3 en función del tiempo de cultivo.**

El extracto BCTA del clon PM3 presenta 130 veces más actividad que el mismo extracto de la cepa madre S.K15. Por otra parte, mientras que en la cepa madre el enzima es exclusivamente membranoso, la DD-peptidasa de la cepa superproductora S.lividans PM3 se encuentra también en las fracciones solubles. El sobrenadante de cultivo contiene una cantidad importante de DD-transpeptidasa, que representa el 30% de la actividad total, como hacía suponer la respuesta obtenida al test inmunológico realizado sobre las colonias. Conociendo la  $k_{cat}$  de la DD-peptidasa purificada ( Nguyen-Distéche et al, 1988 [69]), la superproducción del clon PM3 ha sido calculada : la producción estimada es de 13 mg/l de cultivo, lo que representa un aumento de 190 veces respecto a Streptomyces K15. La DD-peptidasa representa el 2% de las proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo. Este clon permite obtener 4mg de enzima activo por litro de cultivo.

**A.4.4. Producción de DD-transpeptidasa K15 en el caldo de cultivo por *Streptomyces lividans* PM3 en función del tiempo .-**

S.lividans PM3 fue cultivado en caldo TSB + thiostreptona (50 µg/ml) durante 48, 72 o 96 h y la actividad transpeptidásica de los sobrenadantes de estos cultivos fue dosificada a fin de optimalizar la producción de DD-transpeptidasa soluble.

Los resultados obtenidos (tabla 17), muestran que el máximo de producción y la máxima actividad específica se obtienen a las 48 h de cultivo.

**B. ESTUDIO DE LA DD-PEPTIDASA PRODUCIDA EN EL MEDIO DE CULTIVO POR *S.lividans* PM3 .-**

Encontrar en el medio de cultivo de la cepa superproductora y bajo una forma activa, un enzima que en la cepa madre se encuentra exclusivamente en la membrana citoplasmática, es bastante sorprendente.

La cromatografía de exclusión molecular nos permitirá verificar si la proteína se encuentra bajo una forma soluble y si está constituida por una sola cadena polipeptídica de masa molecular de 27.000 daltons.

**B.1. Cromatografía de exclusión molecular de la DD-transpeptidasa obtenida por precipitación a la acetona .-**

Una etapa previa de purificación y concentración de la DD-peptidasa presente en el sobrenadante de cultivo era necesaria antes de proceder a la cromatografía de exclusión molecular. El sobrenadante de cultivo de *S.lividans* PM3 ha sido concentrado por precipitación a la acetona.

**B.1.1. Precipitación a la acetona .-**

El sobrenadante de 500 ml de cultivo fue concentrado por ultrafiltración por AMICON ( membrana YM10 ). La actividad específica de la preparación obtenida fue de 6,16 nmoles/min/mg de proteína. El sobrenadante de cultivo 10 veces concentrado ( 50 ml ) fue precipitado a la acetona en las condiciones detalladas en el capítulo M&M:15.7. El precipitado obtenido fue resuspendido en 5 ml de tampón Tris-HCl 25 mM pH 8, NaCl 0,5 M, DTT 0,2 mM. El rendimiento de la precipitación a la acetona fue superior al 100%, lo

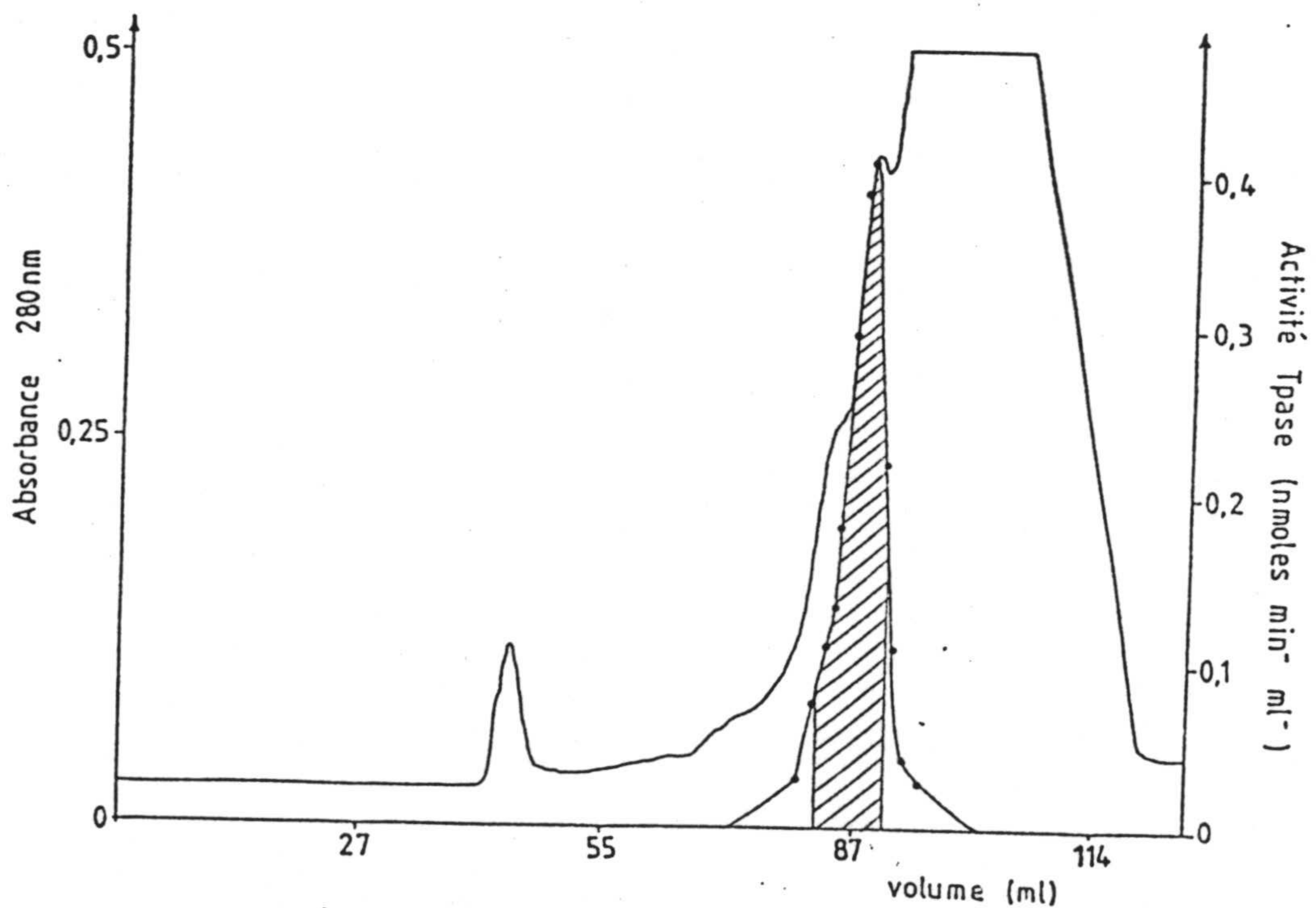
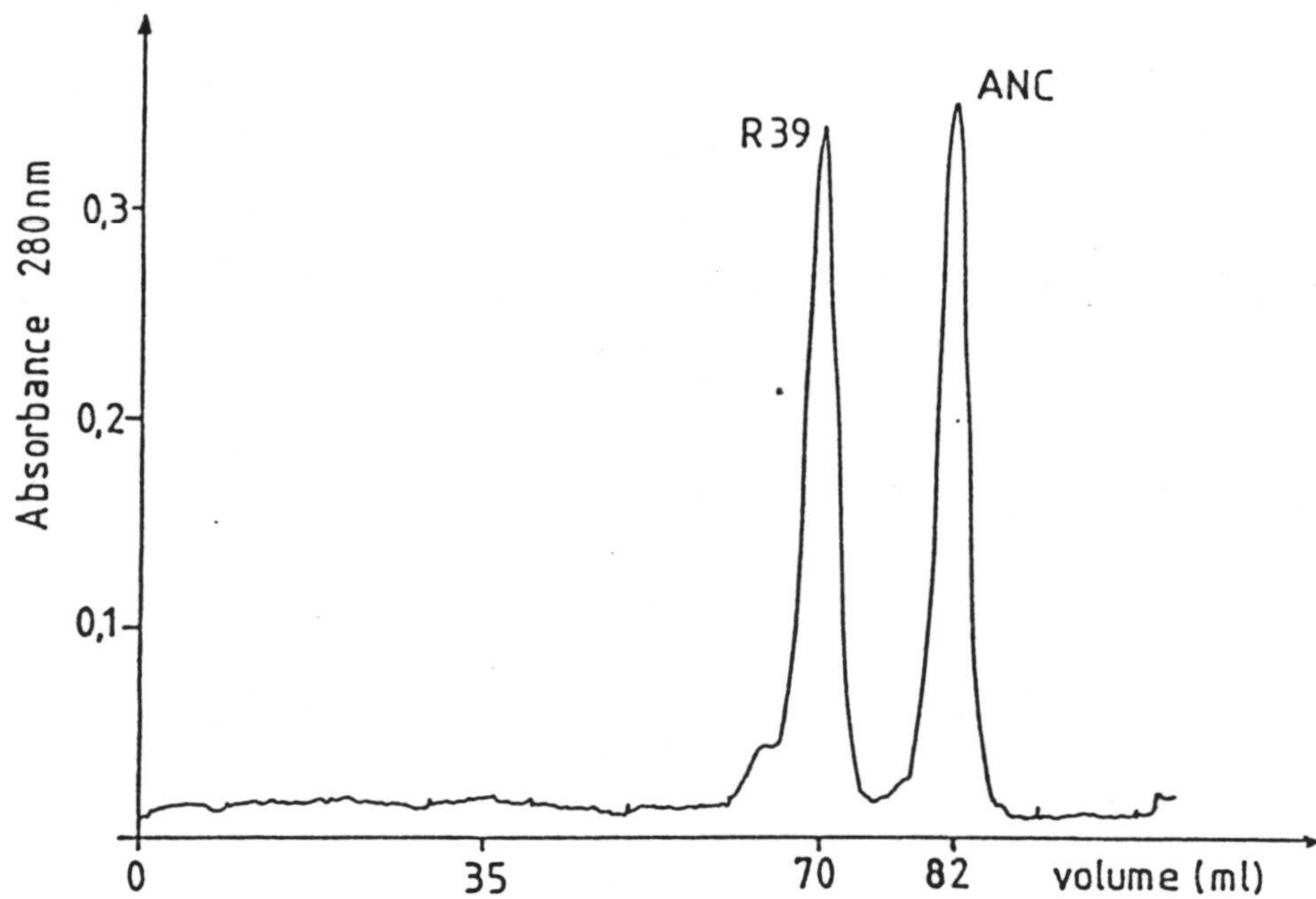


Figura 43.-Cromatografía de exclusión molecular (Superdex).  
 A : Curva de elución de las proteínas de referencia.  
 B : Curva de elución del sobrenadante del cultivo precipitado a la acetona.

R39 : DD-peptidasa de Actinomadura R39 ( $M_r=53.000$ ); ANC : anhidrasa carbónica ( $M_r=29.000$ ); ---- = absorbancia a 280 nm; -.-.- = actividad transpeptidásica; ▨ = fracciones activas recuperadas; flujo de la columna = 1 ml/min.



<b>ACTIVIDAD TRANSPEPTIDASICA</b>		
<b><u>Fraccion</u></b>	<b><u>Actividad total nmoles/min/l de cultivo</u></b>	<b><u>Actividad específica nmoles/min/mg de proteína</u></b>
Sobrenadante de cultivo	943	6,16
Sobrenadante precipitado a la acetona	1.845	61
Superdex	1.208	234

**Tabla 18.-Estimación de la actividad transpeptidásica en cada una de las etapas de purificación de la DD-peptidasa excretada al caldo de cultivo.**

que sugiere que la actividad del sobrenadante de cultivo es subestimada a causa de la presencia de inhibidores, eliminados por la precipitación a la acetona. La actividad específica de la preparación es 10 veces superior después de esta precipitación.

#### **B.1.2 Filtración por Superdex (M&M:15.8) .-**

500  $\mu$ l de sobrenadante precipitado a la acetona fueron depositados sobre una columna Superdex previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 25 mM pH 8, NaCl 0,5 M, DTT 0,2 mM. La filtración fue realizada en el mismo tampón. La actividad transpeptidásica de las diferentes fracciones fue estimada por la técnica de la DAAO ( M&M:15.4.1 ). La figura 43 A,B muestra la curva de elución obtenida. La DD-peptidasa presente en el medio de cultivo es cromatografiada inmediatamente después de la anhidrasa carbónica (Mr 29.000 , coeficiente de distribución [ $K_D$ ] = 0,52 ).

El coeficiente de distribución de la DD-peptidasa K15 es de 0,56, lo que corresponde a la masa molecular esperada de 27.000 daltons. La proteína liberada en el medio de cultivo es pues soluble y monomérica.

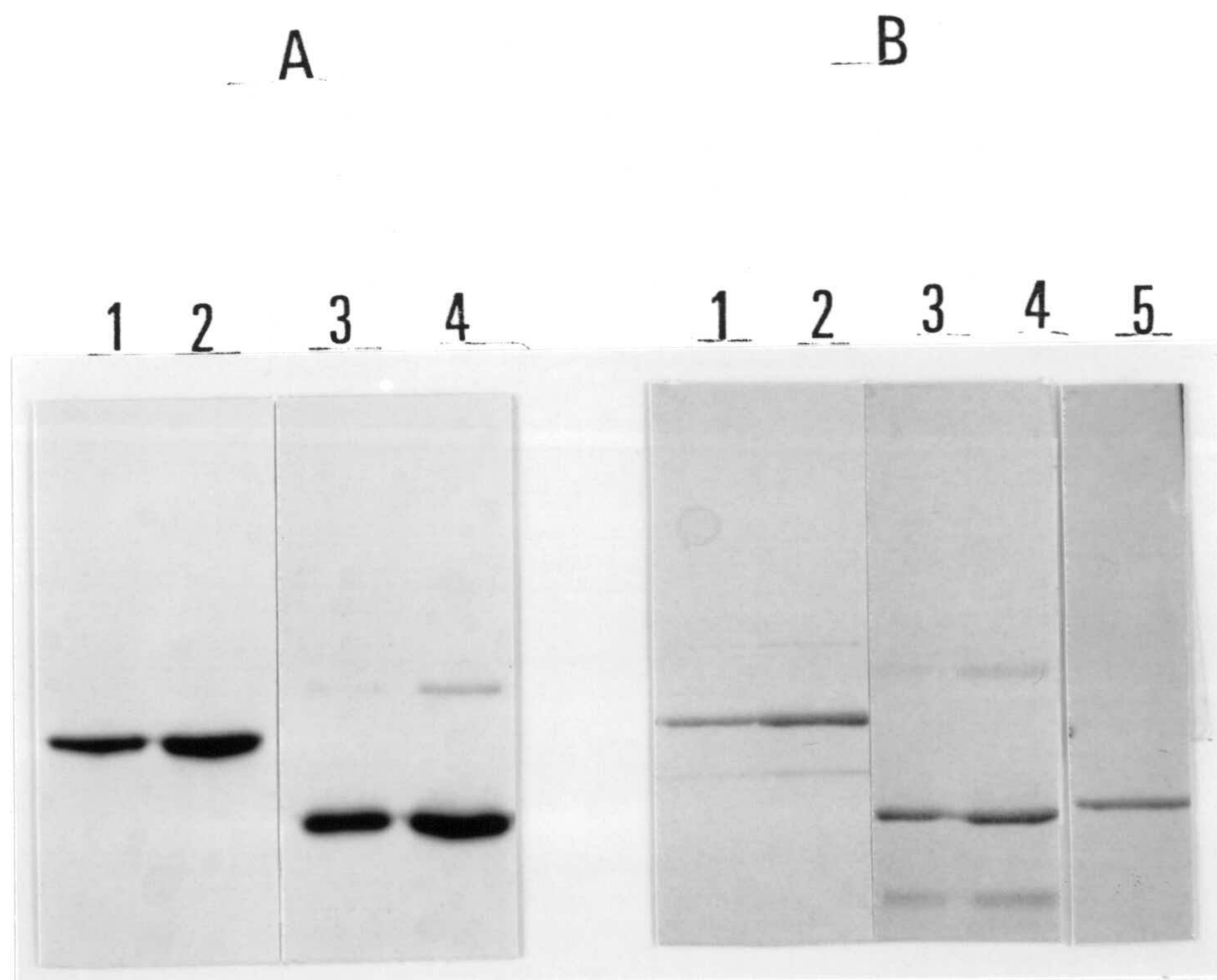
Las fracciones activas fueron reunidas y concentradas hasta 0,5 ml por ultrafiltración por AMICON.

Después de la filtración por Superdex, se obtuvo un 65% de rendimiento con relación a la etapa precedente y la actividad específica de la preparación es 4 veces superior ( 234 nmoles/min/mg ).

La tabla 18 muestra las actividades transpeptidásicas obtenidas después de cada etapa.

#### **B.2. Propiedades de la DD-peptidasa producida por S.lividans PM3 .-**

##### **B.2.1. Termoestabilidad .-**



**Figura 44.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de la DD-peptidasa parcialmente purificada.**

A : Fluorografía.

B : Coloración con azul de Coomassie.

1) DD-peptidasa de S. R61 ,1 $\mu$ g (26 pmoles) y 2) 2  $\mu$ g (52 pmoles);  
 3) DD-peptidasa K15 parcialmente purificada (1,9  $\mu$ g) y 4) 3,8  $\mu$ g;  
 5) Anhidrasa carbónica (2  $\mu$ g).

fue preincubado ( en presencia y en ausencia del detergente BCTA 0,025% final ) en un volumen de 10  $\mu$ l de tampón fosfato 15 mM, NaCl 0,1 M a 4°C, 37°C, 50°C y 60°C ; después de la adición de sustratos donador (5 mM) y aceptor (1,5 mM), las muestras fueron incubadas 30 minutos a 37°C y la actividad transpeptidásica fue estimada por el test DAAO (M&M:15.4.1 ).

Los resultados obtenidos, en presencia o en ausencia de detergente, muestran que el enzima conserva toda su actividad después de 10 minutos a 50°C ( como la DD-transpeptidasa de membrana purificada por Nguyen-Distéche et al, 1982 [68]), y 70% de su actividad después de 10 minutos a 60°C. En presencia de detergente la actividad es 1,3 veces más elevada.

#### B.2.2. Reacción con la bencilpenicilina .-

##### B.2.2.1 Estequiometría de la reacción .-

Dos muestras de DD-peptidasa ( 1,9 y 3,8  $\mu$ g de proteína), fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C en presencia de [<sup>14</sup> C] bencilpenicilina (  $2,4 \times 10^{-4}$  M ) en un volumen de 15  $\mu$ l de tampón Tris-HCl 25 mM pH 8, NaCl 0,5 M, DTT 0,2 mM.

Después de realizar una electroforesis sobre gel de poliacrilamida en presencia de SDS, una coloración con azul de Coomassie y una fluorografía, la cantidad de proteína de Mr 27.000 fué estimada por medida densitométrica de la banda de Mr 27.000 sobre el gel coloreado y sobre la fluorografía ( figura 44 ).

Como proteínas de referencia fueron utilizadas la DD-peptidasa de Streptomyces R61 marcada con [<sup>14</sup> C] bencilpenicilina y coloreada con azul de Coomassie y la anhidrasa carbónica coloreada con azul de Coomassie.

Los resultados muestran que la DD-peptidasa une la bencilpeni-cilina con una relación molecular 1:1 y que el enzima es puro al 50%.

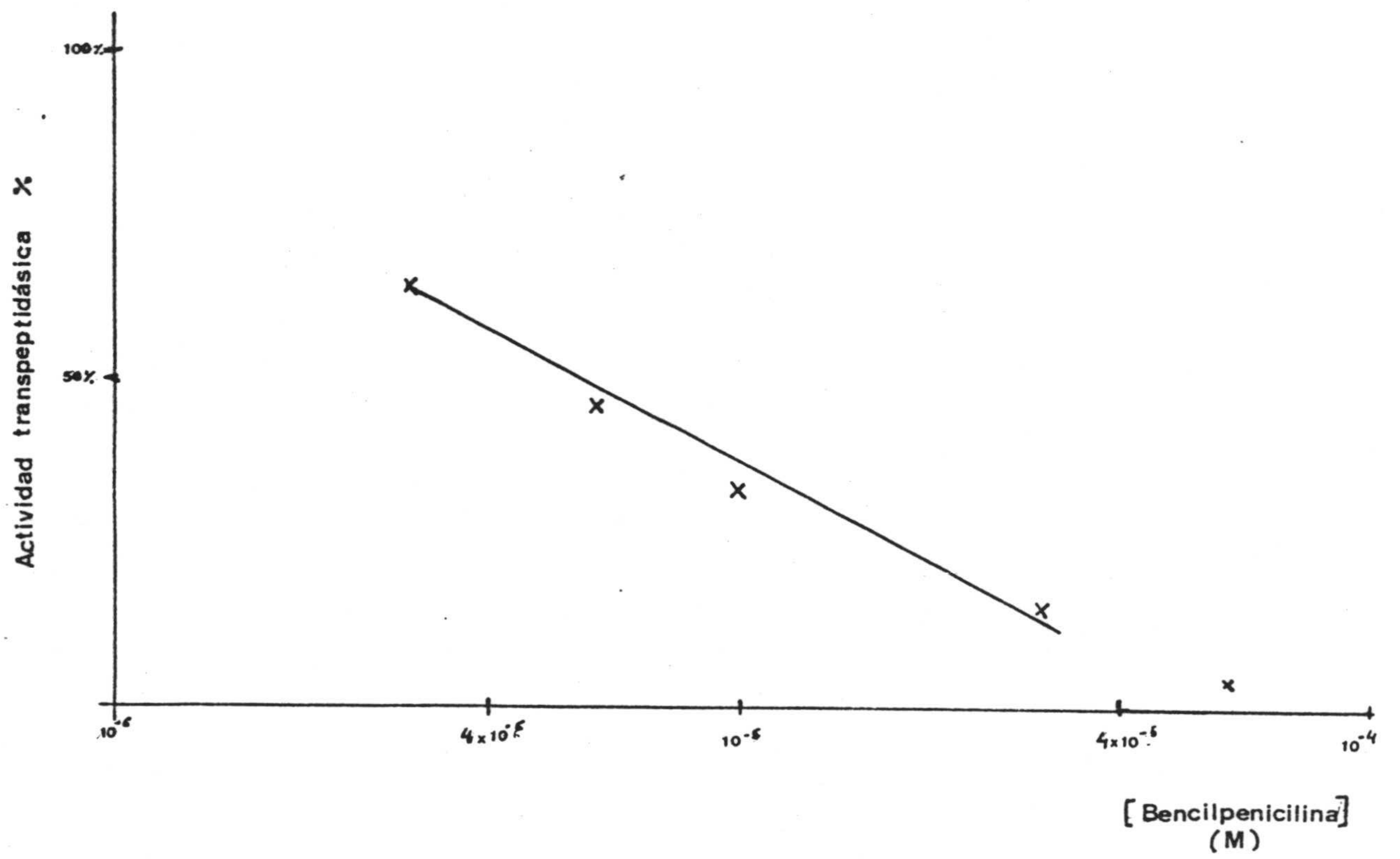


Figura 45.- Curva de inactivación de la DD-peptidasa K15 por la benzilpenicilina

enzima es puro al 50%.

Este valor corresponde al calculado en base a las constantes cinéticas obtenidas con la DD-peptidasa aislada de Streptomyces K15 (Nguyen-Distèche et al., 1988 [69]).

#### B.2.2.2. Determinación de la ID<sub>50</sub> .-

La sensibilidad del enzima superproducido a la bencilpenicilina fué determinada en las mismas condiciones utilizadas en el caso del enzima salvaje, es decir en presencia de BCTA (cetavlon), imprescindible para mantener soluble y activa la DD-transpeptidasa de membrana.

La DD-peptidasa parcialmente purificada (7 pmoles) y los sustratos donador (8mM) y aceptor (10mM) fueron incubados en presencia o en ausencia de diferentes concentraciones de bencilpenicilina (entre  $3 \times 10^{-6}$  M y  $10^{-4}$  M) durante 30 minutos a 37°C en un volumen final de 35µl de tampón fosfato 4mM pH 7,5, NaCl 28 mM, BCTA 0,008%.

La actividad transpeptidásica de las diferentes muestras fue estimada por el método de la DAAO (M&M:14.19.1).

La figura 45 muestra la curva de inactivación de la actividad transpeptidásica por la bencilpenicilina. El valor de la ID<sub>50</sub> (concentración de antibiótico necesaria para inhibir el 50% de la actividad), determinado en este experimento, es de  $5 \times 10^{-6}$  M, muy próximo al obtenido con la DD-transpeptidasa K15 de membrana purificada (Leyh-Bouille et al., 1986, [72]).

#### B.2.3. Reacción con los sustratos .-

La actividad transpeptidásica medida en las condiciones descritas en el apartado B.2.1., pero utilizando el ácido meso-diaminopimélico (meso-A<sub>2</sub>pm) como aceptor, es 1,6 veces menor que cuando el dipéptido Gly-Gly es utilizado como aceptor, como en el caso de la DD-peptidasa salvaje (Nguyen-Distèche et al., 1986, [69]).

Si el tripéptido [<sup>14</sup> C] es utilizado como donador en

presencia de meso-A<sub>2</sub>pm, la transpeptidación y la hidrólisis pueden ser estimadas simultáneamente mediante la separación por electroforesis de los diferentes productos de la reacción. En estas condiciones, la relación Transpeptidación/Hidrólisis es igual a 9. El valor de esta relación es próximo al obtenido con la enzima salvaje (T/H = 12, M.Nguyen-Distèche y M.Leyh-Bouille, resultados no publicados).

## **Capítulo IV : DISCUSION Y CONCLUSIONES**



## CAPITULO IV: DISCUSION Y CONCLUSIONES .-

### I DISCUSION .-

#### 1.1 Clonación y determinación de la secuencia

El gen codificante para la DD-transpeptidasa K15 ha sido clonado y secuenciado. La estrategia escogida para la clonación, es decir, la clonación en el vector pBR322 y la identificación de clones mediante hibridación con una sonda radioactiva no degenerada, ha demostrado ser muy eficaz. Tres clones positivos fueron obtenidos entre los 2.990 clones examinados. Un fragmento de 1.357 pares de bases, hibridable con la sonda y portador del gen de la DD-transpeptidasa K15 ha sido aislado a partir de dos de estos clones positivos.

La secuencia de este fragmento ha sido determinada prácticamente en su totalidad sobre las dos hebras de ADN y todas las intersecciones han sido recubiertas. El gen comporta una fase de lectura abierta de 876 nucleótidos que comienza por un codón de iniciación GTG y se termina por un codón ámbar TAG (figura 28 ). Contrariamente a E.coli donde el codón de iniciación mayoritariamente utilizado es el codón ATG, en las bacterias del género Streptomyces es habitual encontrar el triplete GTG, codificante para el aminoácido valina. Siete de los 16 genes comparados con la DD-peptidasa K15: los genes codificantes para las  $\beta$ -lactamasas de S.albus G [120] y S.cacaoi [124], las proteasas A y B de S.griseus [121], la higromicina fosfotransferasa de S.higroscopicus [122], la agarasa extracelular de S.coelicolor [126] y el gen de la resistencia a la eritromicina de S.erythraeus [145] utilizan igualmente este codon de iniciación.

? STRAND (0 FOR +, 1 FOR -)

**A**

F	TTT	0.	S	TCT	0.	Y	TAT	0.	C	TGT	0.
F	TTC	6.	S	ICC	5.	Y	TAC	12.	C	TGC	2.
L	TTA	0.	S	TCA	0.	*	TAA	0.	*	TGA	0.
L	TTG	0.	S	TCG	9.	*	TAG	1.	W	TGG	1.
L	CTT	0.	P	CCT	0.	H	CAT	0.	R	CGT	0.
L	CTC	7.	P	CCC	3.	H	CAC	4.	R	CGC	5.
L	CTA	0.	P	CCA	0.	Q	CAA	0.	R	CGA	0.
L	CTG	11.	P	CCG	3.	Q	CAG	5.	R	CGG	3.
I	ATT	0.	T	ACT	0.	N	AAT	0.	S	AGT	0.
I	ATC	12.	T	ACC	21.	N	AAC	14.	S	AGC	8.
I	ATA	0.	T	ACA	0.	K	AAA	0.	R	AGA	0.
M	ATG	7.	T	ACG	13.	K	AAG	22.	R	AGG	1.
V	GTT	0.	A	GCT	2.	D	GAT	0.	G	GGT	2.
V	GTC	13.	A	GCC	21.	D	GAC	10.	G	GGC	21.
V	GTA	0.	A	GCA	0.	E	GAA	0.	G	GGA	0.
V	GTG	5.	A	GCG	10.	E	GAG	2.	G	GGG	2.

? STRAND (0 FOR +, 1 FOR -)

**B**

F	TTT	0.	S	TCT	0.	Y	TAT	0.	C	TGT	0.
F	TTC	0.	S	ICC	0.	Y	TAC	0.	C	TGC	0.
L	TTA	0.	S	TCA	0.	*	TAA	0.	*	TGA	0.
L	TTG	0.	S	TCG	0.	*	TAG	0.	W	TGG	0.
L	CTT	0.	P	CCT	0.	H	CAT	0.	R	CGT	1.
L	CTC	3.	P	CCC	1.	H	CAC	0.	R	CGC	1.
L	CTA	0.	P	CCA	0.	Q	CAA	0.	R	CGA	0.
L	CTG	1.	P	CCG	0.	Q	CAG	0.	R	CGG	0.
I	ATT	0.	T	ACT	1.	N	AAT	0.	S	AGT	0.
I	ATC	1.	T	ACC	5.	N	AAC	0.	S	AGC	0.
I	ATA	0.	T	ACA	0.	K	AAA	0.	R	AGA	1.
M	ATG	0.	T	ACG	0.	K	AAG	0.	R	AGG	0.
V	GTT	0.	A	GCT	1.	D	GAT	0.	G	GGT	0.
V	GTC	1.	A	GCC	4.	D	GAC	0.	G	GGC	2.
V	GTA	0.	A	GCA	0.	E	GAA	0.	G	GGA	1.
V	GTG	1.	A	GCG	4.	E	GAG	0.	G	GGG	0.

Tabla 19.-Utilización de codones para la síntesis de la DD-peptidasa K15 .A :proteína madura y B :péptido señal.

GEN	SECUENCIA NUCLEOTIDICA CODIFICANTE PARA	PORCENTAJE EN G O C EN POSICION		
		1	2	3
DD-peptidasa <u>S. R61</u> [20]	precursor	63	48	92
	proteina madura	60.18	46.13	94
	péptido señal	81	61	81
<u>endo-H</u> <u>S. plicatus</u> [123]	precursor	63	48	92
	proteina madura	62	44	94
	péptido señal	70	80	82
$\beta$ -lactamasa <u>S. albus G</u> [120]	precursor	71	57	95
	proteina madura	70	54	96
	péptido señal	70	79	84
DD-peptidasa <u>S. K15</u>	precursor	51.4	52.7	97
	proteina madura	49.5	50.2	98.5
	péptido señal	70	70	82

Tabla 20.-Porcentajes de guaninas o citosinas en las posiciones 1, 2 o 3 de los triplete de varios genes de *Streptomyces* codificantes para precursores proteicos conteniendo un péptido señal.

El mismo codón stop, TAG, ha sido descrito en otros genes de Streptomyces :genes codificantes para la  $\beta$ -lactamasa de Actinomadura R 39[127], la endo- $\beta$ -Nacetilglucosaminidasa H de S.plicatus (endo H) [123], la aminoglicósido fosfotransferasa (aph) de S.fradiae [125] y la agarasa extracelular (dag A) de S.coelicolor[127], pero parece ser menos frecuentemente utilizado que el codon de terminación opal TGA.

El porcentaje de G+C del gen de la DD-peptidasa K15 es elevado (65,8%), como corresponde al ADN de Streptomyces (G+C=73%).

El uso de codones se caracteriza por una utilización muy sesgada de los codones sinónimos (Tabla 19, A y B). En el gen de la DD-peptidasa K15, 27 codones no son jamás utilizados, entre ellos los cuatro tripletes TTA, CTA, AAA y TGT que no son nunca representados en los genes tabulados de Streptomyces[77]. Solo 6 de los 30 codones acabados por A o T (los codones ACT, GCT, GGT, CGT, AGA y GGA) son usados en la síntesis de la proteína madura. Uno de ellos, el triplete ACT (codificante para el aminoácido treonina), es relativamente poco utilizado en los genes conocidos de Streptomyces (de los 16 genes comparados a la DD-peptidasa K15, 10 de entre ellos [20, 121, 122, 125, 127, 128, 129] no se sirven jamás del codon ACT. La proporción de G y C es siempre más importante a nivel de la tercera posición del codón, al menos por lo que concierne al fragmento de ADN codificante para la proteína madura o el precursor (tabla 20). En el caso del fragmento de ADN que codifica para el péptido señal, se observa una disminución significativa de la proporción de guaninas y citosinas en la tercera posición y un aumento de esta proporción en segunda y primera posición

Secuencia complementaria invertida de la terminación 3'OH du ARN 16S de S.lividans [130]

5' AGAAAG GA GGUGAUC 3'

SECUENCIA DEL ARNm			GEN	REFEREN
AcucgG	GA	GaaGAaucag*	DD-peptidasa <u>S.</u> R61	[20
cGAgAG	GA	accaccCc*	β-lactamasa <u>S. albus</u> G	[120
AccUcG	GA	GGaucUC*	proteasa A ( <u>spr</u> A) <u>S. griseus</u>	[121
cccucG	GA	GGaaccCga*	proteasa B ( <u>spr</u> B) <u>S. griseus</u>	[121
uGAAua	GA	GUccgCu*	higromicina fosfotransferasa ( <u>hyg</u> ) <u>S. hygrosopicus</u>	[122
cGuugG	GA	GaccAUCagcc*	endo-β-N-acetilglucosaminidasa ( <u>endo</u> H) <u>S. plicatus</u>	[123
uGccAu	GA	uGccgcCc*	aminoglicósido fosfotransferasa ( <u>aph</u> ) <u>S. fradiae</u>	[125
AagAAG	GA	Gaacgauc*	agarasa extracelular ( <u>dag</u> A) <u>S. coelicolor</u> A3(2)	[126
gaccAc	GA	GGaGacgcac*	β-lactamasa <u>Actinomadura</u> R39	[127
uGuAAG	GA	aaUuucCc*	streptomina-6-fosfotransferasa ( <u>aph</u> D) <u>S. griseus</u>	[142
uGgUAG	GA	uccagcg*	ORF resistencia a la eritromicina ( <u>erm</u> E) <u>S. erythraeus</u> 1ª pos	[143
gcuuAG	GA	GGUuuUaaagcuu*	RBS sintético	
cccAcG	GA	aGgccaCggc*	β-galactosidasa <u>S. lividans</u>	[131
uGgcAu	GA	aGgGu*	DD-peptidasa <u>S.</u> K15	
AaccAG	aA	ccgccc*	ORF <u>erm</u> E 2ª posibilidad	[143

Tabla 21 .- Alineamiento de la secuencia "RBS" probable del gen de la DD-peptidasa K15 con las secuencias "RBS" de otros genes de Streptomyces .

El asterisco indica el codon iniciador de la traducción.

(tabla 20). Las mismas observaciones han sido realizadas en el caso de la DD-peptidasa de Streptomyces R61, la  $\beta$ -lactamasa de Streptomyces albus G y la endo- $\beta$ -N acetil glucosaminidasa H (endo H) de Streptomyces plicatus [144]. Los codones que se terminan por una adenina sólo se encuentran en la fracción codificante para el péptido señal. En la región codificante para la proteína madura, todos los codones utilizados, excepto dos (GGT y GCT), se terminan por G o C. En el péptido señal, el porcentaje de alaninas es elevado (31%), como en el caso de la DD-peptidasa R61 (29%) [20] y de la endo-H de Streptomyces plicatus (31%), lo que ofrece una posible explicación al aumento de G y C en primera y segunda posición de los codones del ADN correspondiente.

La secuencia ATGAAGGG, que precede el codón de iniciación (figura 28) podría constituir el sitio de fijación de los ribosomas al ARN m (RBS) : se observa una complementariedad de 5 bases sobre 8 con la extremidad 3'OH del ARNr 16S de Streptomyces lividans. Entre las catorce secuencias comparadas (tabla 21), la mejor complementariedad se encuentra siempre a nivel de la región AGGAG; el par GA es siempre conservado.

Como el punto de comienzo de la transcripción no ha sido determinado y no han sido halladas ninguna de las secuencias canónicas propuestas por Hopwood et al. [77], las secuencias promotoras -10 y -35 no han podido ser localizadas. Por otra parte, el hecho de obtener una producción de DD-peptidasa en Streptomyces lividans no constituye una prueba de la presencia de un promotor efectivo en este fragmento, ya que la cartografía por análisis de restricción del plásmido recombinante muestra que este ha sido introducido en el plásmido pIJ702 en

Val.<sub>29</sub> - Arg - Len - Arg - Arg - Ala - Ala - Ala - Thr - Val.<sub>20</sub> - Ileu - Thr -  
Thr - Gly - Ala - Leu - Leu - Ala - Ala - Gly.<sub>10</sub> - Thr - Leu - Gly - Ala -  
Thr - Pro - Ala - Thr - Ala - Val - Proteíne "madura" DD-peptidasa K15.

Figura 46.- Péptido señal del gen DD-transpeptidasa de S. K15.

una orientación paralela con respecto al promotor del gen mel que podría, solo o con el promotor de la DD-peptidasa, permitir la expresión de la proteína. Además, la utilización del programa Analyseq, Translation and codons (Staden) muestra que la fase de lectura abierta comienza mucho antes del codon de iniciación, GTG, (véase figura 29). Este hecho podría sugerir que la expresión del gen de la DD-transpeptidasa está sujeta al control de un promotor distal.

La presencia de secuencias inversamente repetitivas en la región no codificante de ADN situada a continuación del gen, podría permitir la formación de una estructura secundaria en horquilla en el ARNm (figura 30). Esta estructura posee un  $\Delta G$  teórico de  $-24,4$  kcal/mol y podría constituir la señal de terminación de la transcripción. Este tipo de estructuras secundarias ha sido igualmente descrito en otros genes de Streptomyces [20,120,121,122,124,125,127].

## 1.2. Estructura primaria de la DD-peptidasa K15

La DD-peptidasa de Streptomyces K15 es sintetizada como una preproteína de 291 aminoácidos. Los primeros 29 residuos muestran una secuencia típica de un péptido señal (figura 46). La región N-terminal contiene tres residuos de arginina en las posiciones 2,4 y 5 y es seguida por una larga secuencia hidrófoba (aminoácidos 6 a 22); el péptido señal se termina por la secuencia característica Ala-X-Ala que precede al sitio de escisión proteolítica. Otros <sup>proteínas</sup> genes conocidos de Streptomyces son asimismo sintetizados en forma de precursores y poseen un péptido señal semejante al de la DD-peptidasa K15 [20, 120, 121,123,126].



La secuencia aminoacídica de la proteína madura, deducida de la secuencia nucleotídica, coincide perfectamente con los resultados obtenidos a partir de la proteína: secuencia N-terminal (Leyh-Bouille et al., 1989 [75]), composición en aminoácidos y masa molecular ( M. Leyh-Bouille y J. Van Beeumen, resultados no publicados).

La ausencia de un péptido señal o de una región particularmente hidrófoba en la secuencia N-terminal determinada por vía química [75], sugiere que la proteína no está anclada en la membrana citoplasmática por su extremo N-terminal, como los PBPs bifuncionales de E.coli. A la vista de estos resultados, nosotros habíamos pensado que la proteína estaría unida a la membrana por la región C-terminal, como los PBPs 5 de E.coli [145] y B.subtilis [146].

El estudio de la hidrofobicidad de la proteína (figura 33) muestra que la DD-transpeptidasa K15 no es una proteína muy hidrofóbica ( 61 % de residuos polares y 39 % de residuos apolares) y que a lo largo de la secuencia no existe ninguna zona particularmente hidrófoba susceptible de servir como zona de inserción en la membrana citoplasmática. La zona C-terminal no es muy hidrofóbica ; además como ya se comentó en el capítulo II (Resultados), la distancia entre la región conservada KTG (que forma parte del sitio activo de la proteína) y el extremo C-terminal de la misma es demasiado pequeña (47 aminoácidos), lo que no parece suficiente como para permitir el anclaje de la DD-peptidasa a la membrana citoplasmática.

No obstante, la proteína es exclusivamente membranosa en la cepa silvestre S. K15 [68] y puede ser liberada del

micelio mediante tratamientos relativamente suaves, como la utilización del detergente catiónico BCTA [68] o una concentración salina no muy elevada ( NaCl 0,5 M. M.Leyh-Bouille, resultados no publicados). Estos datos sugieren que el enzima no está sólidamente anclado en la membrana citoplasmática. La determinación del mecanismo exacto de unión de la proteína a la membrana precisa de otras experiencias. Nosotros pensamos que la DD-peptidasa está simplemente "asociada" de una manera más o menos específica a una proteína membranosa y que el detergente BCTA o el NaCl pueden sustituir a dicha proteína, permitiendo así su solubilización .

Todas las proteínas capaces de unir la penicilina poseen varias zonas conservadas (7), constituidas por aminoácidos idénticos u homólogos. Estas regiones conservadas ("box" I a VII), se presentan igualmente en la DD-peptidasa K15 (figura 34). La secuencia comprendida entre la región conservada SXXK ("box" II), que contiene la serina activa (Ser 35) y la triada KTG ("box" VII) comporta 147 aminoácidos y entre la zona conservada KTG y el extremo C-terminal hay una distancia de 47 residuos, como en las  $\beta$ -lactamasas de clase A, que son las proteínas más pequeñas capaces de reaccionar con la penicilina y presentan masas moleculares próximas a la de la DD-peptidasa K15 ; en efecto, en estas proteínas las correspondientes secuencias comportan respectivamente 140-170 y 50-60 aminoácidos [147].

La DD-peptidasa K15 muestra muy poca homología con la DD-peptidasa extracelular de Streptomyces R61 y los PBPs 1A, 1B, 2 , 3 y 4 de Escherichia coli, pero una gran homología con los PBPs 5 y 6 de E.coli (34% de identidad, 52% de similaridad) y el PBP 5 de Bacillus subtilis (29%

bastante elevada con respecto a la  $\beta$ -lactamasa de Staphylococcus aureus y la  $\beta$ -lactamasa RTEM de E.coli (21-23% de identidad, 40% de similaridad).

Las proteínas capaces de unir la penicilina que han sido cristalizadas (DD-peptidasa extracelular de Streptomyces R61 [19], y  $\beta$ -lactamasas de Staphylococcus aureus [54] y de Streptomyces albus G [55] ( $\beta$ -lactamasas de clase A), presentan una estructura tridimensional semejante, constituida por 2 dominios: un dominio "todo  $\alpha$ " y un dominio " $\alpha/\beta$ ". Entre las diferentes proteínas cristalizadas, es la  $\beta$ -lactamasa de S.aureus la que muestra una mayor homología con respecto a la DD-peptidasa K15. La mayoría de las estructuras secundarias presentes en la  $\beta$ -lactamasa de Staphylococcus aureus [54], han sido pronosticadas para la DD-peptidasa K15 (figura 36). Las cinco láminas plegadas  $\beta$ , que en la  $\beta$ -lactamasa forman parte del dominio " $\alpha/\beta$ " (constituido por las regiones N- y C- terminales de la proteína), son predichas para la DD-peptidasa K15. La secuencia KTG está localizada en la lámina plegada  $\beta_3$ ; esta estructura, en la  $\beta$ -lactamasa forma un lado de la cavidad enzimática. La zona conservada S\*XXK se sitúa al principio de la hélice  $\alpha_2$ ; la hélice  $\alpha_1$  no ha sido pronosticada para la DD-peptidasa K15 y la hélice  $\alpha_{11}$  es muy corta.

En las  $\beta$ -lactamasas de S.aureus y Streptomyces albus G, la secuencia SAN se localiza a la entrada del sitio activo y está situada en un bucle entre las hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$ . En los PBPs 5 y 6 de Escherichia coli, encontramos una secuencia SGN y en el PBP 5 de Bacillus subtilis una secuencia SAN (figura 34). En la DD-peptidasa de S. K15 esta posición es ocupada por una secuencia SGC. Este residuo de cisteína es probablemente el que resulta

esta posición es ocupada por una secuencia SGC. Este residuo de cisteína es probablemente el que resulta accesible al p-cloromercuriobenzoato (pCMB), en la proteína nativa. La fijación de este reactivo al residuo de cisteína debe provocar una obstrucción del sitio activo y perturbar la interacción entre el enzima y el sustrato donador o la bencilpenicilina, lo que explicaría la disminución de las velocidades de acilación y desacilación [76].

El segundo residuo de cisteína (Cys 223) se localiza en una lámina plegada  $\beta$ , 8 residuos después del KTG. El PBP 5 de Bacillus subtilis posee igualmente un residuo de cisteína que ocupa exactamente la misma posición. Este segundo residuo de cisteína es inaccesible a los reactivos de grupos sulfhidrilos y no ha podido ser nunca detectado, ni siquiera desnaturalizando el enzima mediante la urea o el clorhidrato de guanidina [76]; probablemente, las condiciones de desnaturalización utilizadas no son lo suficientemente drásticas como para exponer este residuo (Cys 223) al pCMB.

### 1.3. Expresión en Streptomyces :

Los primeros intentos de sobreproducción del enzima en la cepa seleccionada como hospedadora (Streptomyces pristinaespiralis) mediante la clonación de los fragmentos Bam HI y Sph I en los vectores pIJ699 y pIJ702, respectivamente, no dieron los resultados esperados. Los clones positivos obtenidos por transformación de dicha bacteria con la mezcla de ligación : pIJ699 + fragmento Bam HI de 10,7 kb resultaron ser inestables. Los plásmidos recombinantes preparados fueron digeridos por

SphI y el fragmento de 1,3 kb ,que contiene el gen de la DD-transpeptidasa no pudo ser puesto de manifiesto; seguramente el gran tamaño del inserto (10,7 kb) provoca la inestabilidad de dichos plásmidos y la delección del gen. Los clones positivos obtenidos por transformación de S.pristinaespiralis con la mezcla de ligación que contenía el vector pIJ702 + el fragmento Sph I, de 1.357 pb, parecen ser estables, pero su actividad transpeptidásica no resultó ser lo suficientemente elevada.

La proteína ha sido superproducida en Streptomyces lividans; el fragmento de 1.357 pares de bases que contiene el gen de la DD-peptidasa fue insertado en el plásmido pIJ702 utilizado como vector de clonación. Los clones productores, identificados mediante una reacción inmunológica ,muestran una reacción positiva no solo a nivel de la colonias sino igualmente alrededor de las mismas, incluso en ausencia del detergente BCTA necesario para solubilizar el enzima presente en la membrana citoplasmática.

La DD-peptidasa ha sido detectada mediante la reacción con los anticuerpos anti-DD-peptidasa K15, con la bencil-penicilina radioactiva y con los sustratos. El enzima aparece no solo en las membranas y en un extracto obtenido por la acción del detergente BCTA sobre el micelio, sino igualmente en el caldo de cultivo (30% de la producción total), como era previsible en vista de los resultados obtenidos mediante la realización del test inmunológico sobre las colonias. Este resultado es bastante sorprendente, pues en la cepa madre el enzima se encuentra exclusivamente en la membrana citoplasmática. La débil hidrofobicidad de la DD-peptidasa K15 (61% de residuos polares) y la ausencia de región hidrofóbica

susceptible de servir como zona de unión a la membrana citoplasmática, podrían explicar la presencia de una parte de la proteína superproducida en el medio de cultivo. Cuando el PBP 4 de E.coli es superproducido se obtienen los mismos resultados: un 80% de la proteína se encuentra en el espacio periplasmático bajo una forma soluble y activa [148].

La superproducción de la enzima permite por sí sola la obtención de una fracción importante de la proteína en el medio de cultivo : el clon S.lividans PM3 produce 4 mg de DD-peptidasa por litro de cultivo. El extracto BCTA preparado a partir de dicho clon muestra una actividad DD-transpeptidásica 130 veces superior a la del mismo extracto preparado a partir de la cepa silvestre, lo que corresponde a 9 mg de proteína por litro de cultivo. La proteína se presenta en el medio de cultivo bajo una forma soluble y activa. La DD-peptidasa soluble fija la penicilina con una relación molecular 1:1 y la cromatografía de exclusión molecular muestra que ésta se presenta bajo la forma de una sola cadena polipeptídica de Mr 27.000 daltons.

La proteína soluble muestra las mismas propiedades que el enzima purificado a partir del micelio : es relativamente termoestable ( 10 minutos a 50°C), presenta la misma sensibilidad a la bencilpenicilina ( $ID_{50}$  :5  $\mu$ M) y una relación Transpeptidación/ Hidrólisis elevada (T/H = 9). Como la DD-peptidasa de membrana, el enzima soluble se comporta como una transpeptidasa estricta.

## II .- CONCLUSIONES .-

Los tres objetivos que nos habíamos fijado al principio de este trabajo, a saber : 1) la clonación y el secuenciado del gen de la DD-transpeptidasa K15, 2) la superproducción del enzima y 3) la obtención de una proteína soluble, han sido alcanzados.

El 30% de la proteína superproducida se encuentra en el medio de cultivo, bajo una forma soluble y activa. La DD-peptidasa soluble posee las mismas propiedades que el enzima purificado a partir de la membrana.

Después de dos etapas de purificación en ausencia de detergente, se obtienen 2,5 mg de enzima puro al 50% a partir de un litro de cultivo. Esta preparación, purificada hasta homogeneidad proteica, podrá ser utilizada para realizar estudios cristalográficos. Estos estudios, combinados a la mutagénesis dirigida permitirán el estudio a nivel molecular del mecanismo de acción de esta transpeptidasa estricta.

## **BIBLIOGRAFIA**



## BIBLIOGRAFIA.

- 1- Fleming, A., (1929). Brit. J. Exp. Path., 10, 226.
- 2- Salton, M.R.J. (1964). The Bacterial Cell Wall. Elsevier/North Holland, New York.
- 3- Rogers, H.J. & Perkins, H.R. (1968). Cell Walls and membranes. Spon. London.
- 4- Ghuysen, J.M. (1968). Bacteriol. Rev., 32, 425-464.
- 5- Blumberg, P.M. & Strominger, J.L. (1974). Bacteriol. Rev. 38, 291-335.
- 6- Schleifer, K.H. & Kandler, O. (1972). Bacteriol. Rev. 36, 407-477.
- 7- Tipper, D.J. & Strominger J.L. (1965). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 54, 1113-1141.
- 8- Spratt, B.G. (1983). J. Gen. Microbiol., 129, 1247-1260.
- 9- Waxman, D.J. & Strominger, J.L. (1983). Ann. Rev. Biochem. 52, 825-869.
- 10- Frère, J.M. & Joris, B. (1985). CRC. Critical Reviews in Microbiology, 11, 299-396.
- 11- Spratt, B.G., Bowler, L.D., Edelman, A. & Broome-Smith, J.K. (1988). Membrane topology of penicillin-binding protein 1B and 3 of E. coli and the production of water-soluble forms of high molecular weight penicillin binding protein. In : Antibiotic Inhibition of Bacterial Cell Surface Assembly and Function. Actor, P., Daneo-Moore, L. Higgins, M.L., Salton, M.R.J. and Shockman, G.D. (eds.) Washington DC : ASM Press, pp. 292-300.
- 12- Frère, J.M., Moreno, R., Ghuysen, J.M., Perkins, H.R., Dierickx, L. & Delcambe, L. (1974) Biochem, J., 143, 233-240.
- 13- Ghuysen, J.M., Reynolds, P.E., Perkins, H.R., Frère, J.M. & Moreno, R. (1974). Biochemistry, 13, 2539-2547.
- 14- Leyh-Bouille, M., Nakel, M., Frère, J.M., Johnson, K., Ghuysen, J.M., Nieto, M. & Perkins, H.R. (1972). Biochemistry, 11, 1290-1298.
- 15- Pollock, J.J., Ghuysen, J.M., Linder, R., Salton, M.R.J., Perkins, H.R., Nieto, M., Leyh-Bouille, M., Frère, J.M. & Johnson, K. (1972). Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 69, 662-666.
- 16- Leyh-Bouille, M., Nguyen-Distèche, M. & Ghuysen, J.M., (1981). Eur. J. Biochem., 115, 579-584.

- 17- Frère, J.M., Ghuysen, J.M., Perkins, H.R. & Nieto, M., (1973). *Biochem. J.*, 135, 463-468.
- 18- Knox, J.R., De Lucia, M.L., Murthy, N.S., Kelly, J.A., Moews, P.C., Frère, J.M. & Ghuysen, J.M., (1979). *J. Mol. Biol.*, 127, 217-218.
- 19- Kelly, J.A., Knox, J.R., Zhao, H., Frère, J.M. & Ghuysen, J.M. (1989). *J. Mol. Biol.*, 209, 281-295.
- 20- Duez, C., Piron-Fraipont, C., Joris, B., Dusart, J., Urdea, M.S., Martial, J.M., Frère, J.M. & Ghuysen, J.M. (1987). *Eur. J. Biochem.*, 162, 509-518.
- 21- Ghuysen, J.M., Leyh-Bouille, M., Bonaly, R., Nieto, M., Perkins, H.R., Schleifer, K.H. & Kandler, O. (1970). *Biochemistry*, 9, 2955-2961.
- 22- Joris, B., Van Beeumen, J., Casagrande, F., Gerday, Ch., Frère, J.M. & Ghuysen, J.M. (1983). *Eur. J. Biochem.* 130, 53-69.
- 23- Dideberg, O., Frère, J.M. & Ghuysen, J.M. (1979). *J. Mol. Biol.*, 129, 677-679.
- 24- Dideberg, O., Charlier, P., Dive, G., Joris, B., Frère, J.M. & Ghuysen, J.M. (1982). *Nature (London)* 299, 469-470.
- 25- Charlier, P., Dideberg, D., Jamouille, J.C., Frère, J.M., Ghuysen, J.M., Dive, G. & Lamotte-Brasseur, J. (1984). *Biochem. J.* 219, 763-772.
- 26- Sykes, R.B. & Bush, K. (1983). Physiology, biochemistry and inactivation of  $\beta$ -lactamases. In : The Chemistry and Biology of  $\beta$ -Lactam Antibiotics, Vol. 3. Academic Press., New York., pp. 155-185.
- 27- Pollock, M.R., *Proc. R. Soc. Lond. B.* (1971). 179, 385.
- 28- Meadway, R.J. (1969). *Biochem. J.*, 115, 197.
- 29- Sutcliffe, J.G. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 3737.
- 30- Fisher, J., Charnas, R.L., Bradley, S.M. & Knowles, J.R. (1981). *Biochemistry*, 20, 2726.
- 31- Cartwright, S.J. & Coulson, A.F.W. (1980). *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B 289, 370.
- 32- Frère, J.M., Galleni, M., Joris, B., De Meester, F., Charlier, P. & Dideberg, O. (1988). In : *The Proceedings of the Fourth International Symposium, Organised by the Fine Chemicals and Medicinals Group of the Industrial Division of the Royal Society of Chemistry. Cambridge, England, 3rd-6th. JULY, 1988.* (Ph. Bentley, Smith and Nephew Research Ltd and R. Southgate, Beecham Pharmaceuticals Research Division, eds).

- 33- Dale, J.W., D. Godwin, D. Mossakowska, P. Stephenson & S. Wall (1985). *FEBS Lett.*, 191, 39-44.
- 34- Wiedemann, B. & Ghuysen, J.M. (Eds) (1983). Symposium : Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. In Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, part 12, pp. 12/1-42 Vienna, 28 August-2nd September.
- 35- Dougherty, T.J. (1985 b). *Antimicrob. Agents Chemother.* 28, 90-95.
- 36- Fontana, R., Grossato, A., Rossi, L., Rong Cheng, Y. & Satta, G. (1985). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 28, 678-683.
- 37- Reynolds, P.E. & Brown, D.F.J. (1985). *FEBBS Lett.*, 192, 28-32.
- 38- Hakenbeck, R., Tarpay, M. & Tomasz, A. (1980). *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 17, 364-371.
- 39- Frère, J.M., Duez, C., Ghuysen, J.M. & Vandekerckhove, J. (1976). *FEBBS Lett.*, 70, 257-260.
- 40- Frère, J.M. (1988). *J. Pharm. Belg.*, 43, 107-115.
- 41- Knott-Hunziker, V., Petursson, S., Waley, S.G., Jaurin, B. & Grundström, T., (1982). *Biochem. J.*, 207, 315-322.
- 42- Ghuysen J.M., Frère J.M., Leyh-Bouille, M. & Dideberg, O. (1981). In : Molecular Bases of Drug Action. Developments in Biochemistry. Vol. 19 (Th. P. Sanger and R.N. Ondarza, eds). Elsevier/North-Holland, pp. 3-30.
- 43- Waxman, D.J. & Strominger, J.L. (1983). *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 825-869.
- 44- Dalbadie-Mc Farland, G., Cohen, L.W., Riggs, S.D., Morin, C., Itakura, K. & Richards, J.H. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79, 6409-6413.
- 45- Houba-Herlin, N., Hara, H., Inouye, M. & Hirota, V. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 201, 499-504.
- 46- Hedge, P.J. & Spratt, B.G. (1985). *Eur. J. Biochem.* 151, 111-121.
- 47- Richards, J.H. (1986). *Nature (London)* 323, 187.
- 48- Frère, J.M., Ghuysen, J.M. & Iwatsubo, M. (1975). *Eur. J. Biochem.* 57, 343-351.
- 49- Ghuysen, J.M. (1988). *Rev. of Infect. Dis.*, Vol 10, n<sup>o</sup>4, 726-732.
- 50- Joris, B., Ghuysen, J.M., Dive, G., Renard., A., Dideberg O., Charlier, P., Frère, J.M., Kelly, J.A., Boyington, J.C., Moews, P.C. & Knox, J.R. (1988). *Biochem. J.* 250, 313-324.

- 51- Oefner, C., D'Arcy, A., Daly, J.J., Gubernator, K., Charnas, R.L., Heinzc, J., Hubschwerlen, C. & Winkler, F.K. (1990). *Nature*. 343, 284-288.
- 52- Samraoui, B., Sutton, B.J., Todd, R.J., Artymiuk, P.J., Waley, S.G. & Philips, D.C. (1986). *Nature*, 320, 378-380.
- 53- Kelly, J.A., Dideberg, O., Charlier, P., Wéry, J.P., Libert, M., Moews, P.C., Knox, J.R., Duez, C., Fraipont, C., Joris, B., Dusart, J., Frère, J.M. & Ghuysen, J.M. (1986). *Science*, 231, 1429-1437.
- 54- Herzberg, O. & Moulton, J. (1987). *Science*, 236, 694-701.
- 55- Dideberg, O., Charlier, P., Wéry, J.P., Dehottay, Ph., Dusart, J., Erpicum, Th., Frère, J.M. & Ghuysen, J.M. (1987). *Biochem. J.*, 245, 911-913.
- 56- Dalbadie-Mc Farland, G., Cohen, L.W., Riggs, A.D., Morin, C., Itakura, K. & Richards, J.H. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79, 6409-6413.
- 57- Sigal, I.S., Harwood, B.G. & Arentzen, R. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79, 7157-7160.
- 58- Schultz, S.C. & Richards, J.H. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 1588-1592.
- 59- Bristow, A.F. & Virden, R. (1978). *Biochem J.*, 169, 381-388.
- 60- Houba-Herlin, M., Hara, H., Inouye M. & Hirota, Y. (1983). *Mol. Gen. Genet.*, 201, 499-504.
- 61- Hedge, P.J. & Spratt, B.G. (1985). *Eur. J. Biochem.* 151, 111-121.
- 62- Richards J.H. (1986). *Nature London*.
- 63- Broome-Smith, J.K. & Spratt. B.G. (1984) *FEBS. Lett.*, 165, 185-189.
- 64- Kelly, J.A., Dideberg. O., Charlier, P., Wéry, J.P., Libert, M., Moews, P.C., Knox, J.R., Duez, C., Fraipont, C. Joris, B., Dussart, J., Frère, J.M. & Ghuysen, J.M. (1986) *Science*, 231, 1429-1437.
- 65- Ghuysen, J.M. (1988). *Rev. of Infect. Dis.*, Vol.10, 4, 726-732.
- 66- Ghuysen, J.M. (1987).  $\beta$ -lactam compounds as carbonyl donors of the active-site serine  $\beta$ -lactamases, DD-peptidases and LL-peptidases. de Clercq, E., éd. In : Frontiers in Microbiology. New Perspectives in Clinical Microbiology. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht/ Boston/Lancaster. pp. 7-28.

- 67- Ghuysen, J.M. (1988). Evolution of DD-peptidase and  $\beta$ -lactamases. In : Antibiotic Inhibition of Bacterial Cell Surface Assembly and Function. American Society for Microbiology. Washington, P.C. 20006. pp. 292-300.
- 68- Nguyen-Distèche, M., Leyh-Bouille, M. & Ghuysen, J.M. (1982). *Biochem. J.*, 207, 109-115.
- 69- Nguyen-Distèche, M., Leyh-Bouille, M., Pirlot, S., Frère, J.M. & Ghuysen, J.M. (1986). *Biochem. J.*, 235, 167-176.
- 70- Marquet, A, Dusart, J., Ghuysen, J.M. & Perkins, H.R. (1974). *Eur. J. Biochem.*, 46, 515-523.
- 71- Dusart, J.M., Marquet, A., Ghuysen, J.M., Frère, J.M., Moreno R., Leyh-Bouille, M., Johnson, K., Luccni, Ch., Perkins, H.R. & Nieto, M. (1973). *Antimicrob. Agents Chemother*, 3, 181-187.
- 72- Leyh-Bouille, M., Nguyen-Distèche, M., Pirlot, S., Veithen, A., Bourguignon, C. & Ghuysen J.M. (1986). *Biochem. J.*, 235, 177-182.
- 73- Edelman, A., Bowler, L.D., Broome-Smith, J.K. & Spratt, B.G. (1987). *Mol. Microbiology*, 1, 101-106.
- 74- Bowler, L.D. & Spratt, B.G. (1989). *Mol. Microbiology*, 3 (a), 1277-1286.
- 75- Leyh-Bouille, M., Van Beeumen, J., Renier-Pirlot, S., Joris B., Nguyen-Distèche, M. & Ghuysen, J.M. (1989). *Biochem. J.*, 260, 601-604.
- 76- Leyh-Bouille, M., Nguyen-Distèche M., Bellefroid-Bourguignon, C. & Ghuysen, J.M. (1987). *Biochem. J.*, 241, 893-897.
- 77- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Jansen, G.R., Malpartida, F. & Smith, C. (1986). In : Regulation of Gene Expression (J.R. Booth and C.F. Higin, eds). Cambridge University Press, pp. 250-276.
- 78- Hopwood, D.A., Kieser T., Wright, H.M. & Bibb M.J. (1983) *J. Gen Microbiol.*, 129, 2257-2269.
- 79- Matsushima, P., Cox, K.L. & Baltz, P.H. (1987). *Mol. Gen. Genet.*, 206, 393-400.
- 80- Chater, K.F. & Wilde, L.C. (1980). *J. Gen. Microbiol.*, 116, 323-334.
- 81- Matsushima, P. & Baltz, P.H. (1985). *J. of Bacteriol.*, 163, 180-185.
- 82- Bibb, M. (1980). *Nature*, 284 : 526-530.
- 83- Messing, J, Crea R. & Seeburg, P.H. (1981). *Nucleic Acids Res.* 9, 309.

- 84- Katz, E., Thompson C.J. & Hopwood, D.A. (1983). *J. Gen. Genet. Microbiol.* , 129, 2703-2714.
- 85- Chang, A.C.Y. & Cohen, S.N. (1978) *J. Bacteriol.* 134, 1141-1156.
- 86- Ward, J.M., Janssen, G.R., Kieser, T. & Bibb, M.J.(1986) *Mol. Gen. Genet.* 203, 468-478.
- 87- Kieser, T. & Melton R.E., (1988). *Gene*, 65, 83-91.
- 88- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C. & Heynecker, H.L. (1977). *Gene*, 2, 95-113.
- 89- Maniatis, T., Frisch, E.F. & Sambrook, J. (1982). In : *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A.
- 90- Clewell, D.B. (1972). *J. Bacteriol.*, 110, 667.
- 91- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Burton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, G.P., Ward, J.M. & Schrempf, H. (1985). *Genetic Manipulation of Streptomyces : a Laboratory Manual*. John Innes Foundation Norwich (U.K.A.).
- 92- Schaffer, H.F. & Sederoff, R.P. (1981). *Anal. Biochem.*, 115, 113-122.
- 93- FOCUS, BRL, 6, n° 3. July 1984.
- 94- Scharf, S.J., Horn, G.T. & Erlich, H.A. (1986). *Science*. 223, 1076-1078.
- 95- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987). *Methods in Enzymologie*, 155, 335-350.
- 96- Saiki, R.K. Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Eirlich, H.A. (1988). *Science*, 239, 487-491.
- 97- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 5436-5467.
- 98- Sanger, F., Coulson A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J.H. & Roa, B.A., (1980). *J. Mol. Biol.* 143, 161-178.
- 99- *Step-by-Step Protocols for DNA sequencing with sequenase* 3rd. Edition. U.S.B. (U.S.A.).
- 100- Tabor, S., Richardson, C.C. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, n°14, 4767-4771.
- 101- Staden R., Mc. Lachlan, A.D. (1982). *Nucleic. Acids. Res.*, 10, n°1, 141-156.
- 102- Brendel, V. & Trifonov, E.N.(1984), *Nucleic. Acids. Res*, 12, 4411-4427.

- 103- Brendel, V. & Trifonov, E.N. (1984), CODATA. Conférence Proceedings. Jerusalem.
- 104- Zuker, M. & Stiegler, P. (1981). *Nucleic Acids Res.*, 10, 141-156.
- 105- Freier, S.M., Kierzek, R., Jaeger, J.A., Sugimoto, M., Caruthers, M.H., Neilson, T. & Turner, D.H. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 9373-9377.
- 106- Garnier, J., Osguthorpe, D.J. & Rodson, B. (1978). *J. Mol. Biol.*, 120, 97-120.
- 107- Chou & Fasman (1978). *Adv. Enz.* 47, 45-147.
- 108- Kyte & Doolittle (1982) *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.
- 109- Goldman, Engelman & Steiz (1986). *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 15, 321-353.
- 110- Goad, W.B. & Kanehisa, M.T. (1982). *Nucleic Acids Res.*, 10, 247-263.
- 111- Needleman, S.B. & Wunsch, C.D. (1970). *J. Mol. Biol.*, 48, 443-453.
- 112- Smith & Waterman (1981). *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482-489.
- 113- Vallotto, M. (1988). Mémoire de licence en Sciences Botaniques. U. Liège.
- 114- Leyh-Bouille, M., Dusart, J., Nguyen-Distèche, M., Ghuyssen, J.M., Reynolds P.E. & Perkins, H.R. (1977). *Eur. J. Biochem.*, 81, 19-28.
- 115- Kalckar, H.M. (1947). *J. Biol. Chem.*, 167, 461-466.
- 116- Laemli, U.K. & Favre, M. (1973). *J. Mol. Biol.* 80, 575.
- 117- Weber, K. & Osborn, M. (1969). *The J. Biol. Chem.*, 244, n°16, 4406-4412.
- 118- Chamberlain, J.P. (1979). *Analytical Biochem*, 98, 132-135.
- 119- BIORARD : Mini-Trans-Blot : Electrophoretic Transfer Cell. Catalogue n° 170. 3930 et 170-3935.
- 120- Dehottay, Ph., Dusart, J., De Meester, F., Joris, B., Van Beeumen, J., Erpicum, T., Frère, J.M. & Ghuyssen, J.M. (1987). *Eur. J. Biochem.* 166, 345-350.
- 121- Hendersson, G., Krygsman, P., Lin, C.J., Davey, Ch. C. & Malek, L.T. (1987). *J. of Bacteriol.*, 169, (8), 3778-3784.

- 122- Zalacain, M., González, A., Guerrero, M.C., Mattaliano, R.J., Malpartida, F. & Jiménez, A. (1986). *Nucleic Acids Res.* 14, 1565-1581.
- 123- Robbins, P.W., Trimble, R.B., Wirth, D.F., Hering, C., Maley, F., Maley, G.F., Das, R., Bradford, W.G., Royal, N. & Biemann, K. (1984). *J. Biol. Chem.*, 259, (12), 7577-7583.
- 124- Lenzini, M., Ishihara, H., Dusart, J., Ogawara, H., Joris, B., Van Beeumen, J., Frère, J.M. & Ghuyssen, J.M. (1988). *FEMS Microbiol. Lett.*, 49, 371-376.
- 125- Thompson Ch. J. & Gray, G.S. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80, 5190-5194.
- 126- Buttner, M.J., Fearnley, I.M. & Bibb, M.J. (1987). *Mol. Gen. Genet.*, 209, 101-109.
- 127- Houba, S., Willem, S., Duez, C., Molitor, Ch., Dusart, J., Frère, J.M. & Ghuyssen, J.M. (1989). *FEMS Microbiol. Lett.*, 65, 241-246.
- 128- Horinouchi, S., Furuya, K., Nishiyama, M., Suzuki, H. & Beppu, T. (1987). *J. of Bacteriol.*, 169, n°5, 1929-1937.
- 129- Bernan, V., Filpula, D., Herber, W., Bibb, M. & Katz, E. (1985). *Gene*, 37, 101-110.
- 130- Mc. Laughlin, J.R., Murray, C.L. & Rabinowitz, K.C. (1981). *J. of Biol. Chem.*, 256, 11283-11291.
- 131- Eckardt, T., Strickler, J., Gorniak, L., Burnett, W.V. & Fare, L. (1987). *J. Bacteriol.*, 169 (9), 4249-4256.
- 132- Broome-Smith, J.K., Edelman, A., Youssif, S. & Spratt, B.G. (1985 a). *Eur. J. Biochem.*, 147, 437-446.
- 133- Asoh, S., Matsuzawa, H., Ishino, F., Strominger, J., Matsushashi, M. & Ohta, T. (1986). *Eur. J. Biochem.*, 160, 231-238.
- 134- Nakamura, M., Maruyama, I.N., Soma, M., Kato, J., Suzuki H. & Hirota, Y. (1983). *Mol. Gen. Genet.*, 191, 1-9.
- 135- Broome-Smith, J.K., Edelman, A. & Spratt, B.G. (1983). In : *The Target of Penicillin* (Hakenbeck, R., Höltje, J.V. & Labischinski, H., eds), pp, 403-408, Walder de Gruyter, Berlin.
- 136- Todd, J.A., Roberts, A.N., Johnstone, K., Piggot, P.J., Winter, G. & Ellar, D. (1986). *J. Bacteriol.*, 167, 257-264.
- 137- Wang, P.Z. & Novick, R.P. (1987). *J. Bacteriol.* 169, 1763-1766.
- 138- Sutcliffe, J.G. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 3737-3741.



- 139- Jaurin, B. & Gründström, T. (1981). Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A., 78, 4897-4901.
- 140- Lindberg, F. & Normark, S. (1986). Eur. J. Biochem, 156, 441-445.
- 141- De Belder J. (1983). Mémoire de licence en sciences botaniques. Université de Liège.
- 142- Distler, J., Brann, C., Ebert, A., Piepersberg, W. (1987). Mol. Gen. Genet., 208, 204-210.
- 143- Bibb, M.J., Janssen, G.R., Ward, J.M. (1985). Gene, 38, 215-226.
- 144- Dehottay, P. (1987). Thèse de Doctorat, ULg.
- 145- Ghuysen, J.M. & Joris, B. (1989). The bacterial active-site serine, penicillin - interactive proteins family. In : Biology of Actinomycetes 88 (Y. Okami, T. Beppu & H. Ogawara, eds). Japan Scientific Societies Press, 1988 pp. 452-456.
- 146- Mottl, H. & Keck W. Trends in Microbiological resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. L'Aquila, Roma, Italy. May 12-15. 1990.

DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de  
fecha, constituido por:

- D. ENRIQUE MONTOYA GOMEZ
- D. JEAN MARIE CHUYSEN
- D. MERIM LEYH-BONVILLE
- D. JUAN EVANISTO SUAREZ
- D. JOSE L. OLIVERA SIMON

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Don  
PILAN PARMEANE NESSIA

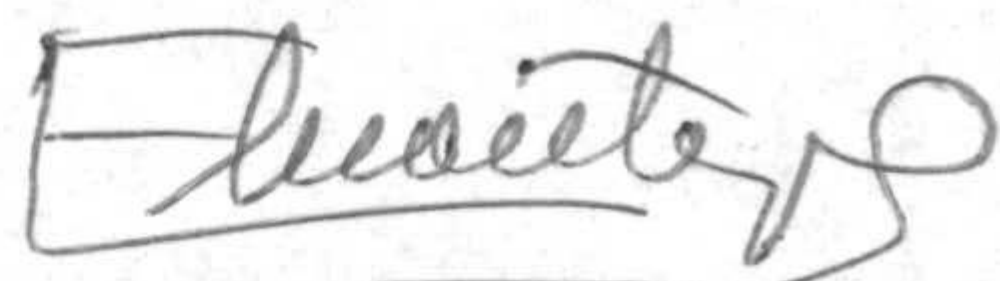
se acordó por UNANIMIDAD otorgar la califica-  
ción de APTO CUM LAUDE UNANIMIDAD

para que conste, se extiende firmada por los  
componentes del Tribunal, la presente diligen-  
cia.

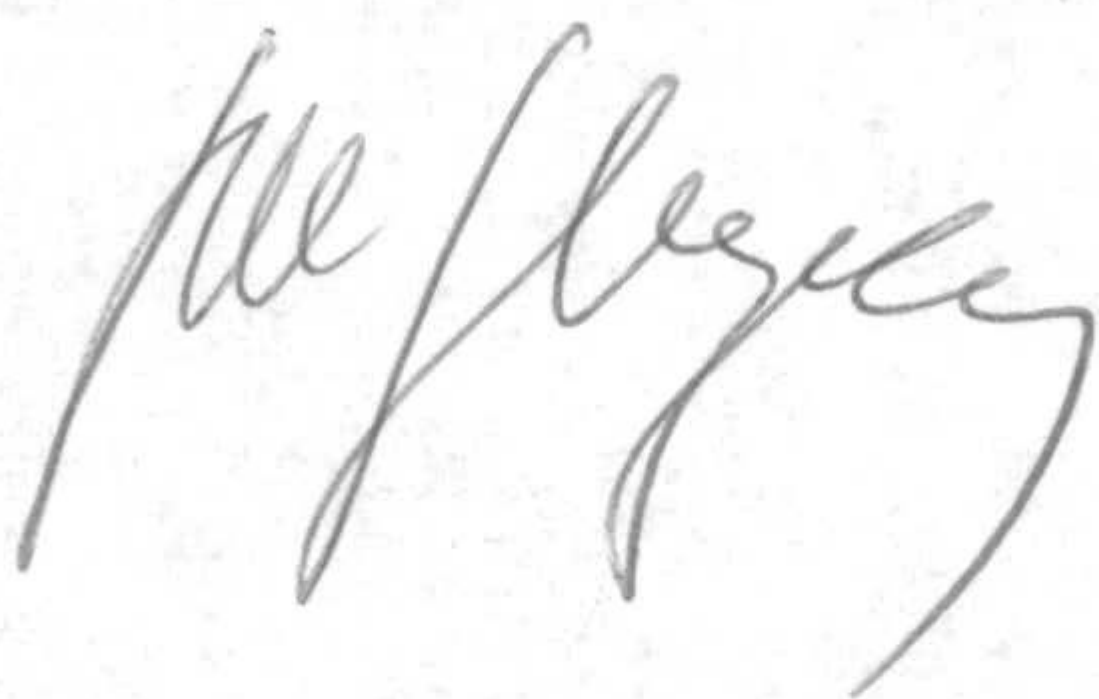
Granada, a 16 de OTUBRE de 1990

El Secretario,

El Presidente,



El Vocal,



El Vocal,

M. Leyh-Bonville

El Vocal,

