

03081
12 1ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE INGENIERIA
GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZACION FISICA Y FUNCIONAL DEL GEN *pac* Y DE SU
PRODUCTO POLIPEPTIDICO: LA ENZIMA PENICILINO AMIDOHIDROLASA

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctor en Investigación Biomédica Básica

Colegio de Ciencias y Humanidades
Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y Posgrado. UNAM.

presenta

Fernando Valle Baheza

Cuernavaca, Morelos

1989

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

- I. PROLOGO Y JUSTIFICACION.
- II. LA ENZIMA PENICILINO AMIDOHIDROLASA. ANTECEDENTES Y GENERALIDADES.
- III. ORGANIZACION FISICA DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA ENZIMA PENICILINO AMIDOHIDROLASA. EL GEN pac.
- IV. ESTUDIOS COMPARATIVOS A NIVEL DE SECUENCIA DE AMINOACIDOS.
- V. PROCESAMIENTO DE LA ENZIMA PENICILINO AMIDOHIDROLASA.
- VI. TERMOREGULACION.
- VII. REGULACION POR ACIDO FENILACETICO, POSIBLE PAPEL FISIOLÓGICO DE LA PENICILINO AMIDOHIDROLASA.
- VIII. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.
- IX. ARTICULOS PUBLICADOS.
- X. BIBLIOGRAFIA.

NOMENCLATURA.

6-APA	Acido seis aminopenicilánico
ATCC	American Type Culture Collection
CM	Carboxi metil
CRP	Proteína de represión catabólica
DEAE	Dietil amino etil
DNA	ácido desoxiribonucleico
<u>E. coli</u>	<u>Escherichia coli</u>
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
kD	kilo Daltons
pb	pares de bases
PMFS	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
RNA	Acido ribonucleico
SPAsa	Proteasa del péptido señal

I. PROLOGO Y JUSTIFICACION.

Las penicilinas semisintéticas son hoy en día los antibióticos más utilizados en el mundo, principalmente en países en vías de desarrollo con altos índices de infecciones bacterianas. La producción industrial de estos antibióticos se basa en la utilización del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA). Este se produce a nivel industrial principalmente por la acción de la enzima penicilino amidohidrolasa (PAC) sobre la molécula de la penicilina G. Al considerar que en 1984 se produjeron alrededor de 2,500 toneladas de 6-APA (38), es evidente que la enzima penicilino amidohidrolasa es de gran importancia para la industria.

Lo anterior ha conducido a la realización de diversos trabajos de investigación. Los estudios realizados en una primera etapa, fueron destinados a entender y resolver algunos de los problemas encontrados al tratar de producir y purificar grandes cantidades de la enzima. Inevitablemente estas primeras investigaciones condujeron a los aspectos puramente básicos, los cuales demostraron que esta enzima es hasta el momento un modelo especial en varios sentidos; Por ejemplo:

- a) Es el primer caso en procariontes en que las dos subunidades que conforman a una enzima activa se originan a partir de un mismo precursor.
- b) La presencia de esta actividad enzimática no confiere ninguna resistencia a penicilinas al microorganismo portador.

Al tratar de obtener una visión general del campo, uno de los primeros elementos que se hace evidente es que la información sobre esta enzima, se haya diseminada en diferentes tipos de revistas y las revisiones que existen se abocan en su mayoría a los aspectos de interés industrial. Esta es una de las razones por las cuales el presente trabajo, que se presenta como tesis para optar por el grado de Doctor en Investigación Biomédica Básica, tuvo como parte de sus objetivos el conjuntar la información publicada que fuera necesaria para intentar comprender a esta enzima desde los puntos de vista enzimático, genético y fisiológico.

Además de la realización de una revisión bibliográfica, el presente trabajo se abocó a tratar de contestar una serie de preguntas relevantes para el mejor entendimiento de la enzima a diferentes niveles. Para lograr lo anterior se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Clonar y determinar la secuencia nucleotídica del gene estructural de la enzima penicilino amidohidrolasa y de las regiones adyacentes 5' y 3'.
- 2) Conocer la organización del gen, al definir regiones estructurales y regiones reguladoras.
- 3) Proponer y definir posibles elementos y mecanismos reguladores.
- 4) Buscar similitudes a nivel de secuencia de aminoácidos, de la enzima penicilino amidohidrolasa con otras proteínas, en particular otras acilasas y enzimas que unen penicilinas.

- 5) Con base en lo anterior, proponer residuos de aminoácidos claves para la actividad enzimática.
- 6) Correlacionar la actividad de la penicilino amidohidrolasa con el metabolismo general bacteriano.

La manera en que se presenta la información en este trabajo es un poco distinta a la usual, ya que se ha estructurado en capítulos independientes. El primer capítulo trata exclusivamente de una revisión bibliográfica sobre distintos aspectos de la enzima como son: producción, purificación, mecanismos de reacción, etc. Los demás capítulos presentan primordialmente los resultados obtenidos en el transcurso de las investigaciones realizadas durante el doctorado. Un aspecto que no se incluyó en este escrito es la descripción de los métodos seguidos para la clonación y secuenciación del DNA, para la medición de actividad enzimática y otros métodos particulares. Esto se debe a que esta metodología se ha descrito en los dos artículos publicados que se incluyen como parte de esta tesis (ver capítulo IX).

II. LA ENZIMA PENICILINO AMIDOHIDROLASA.
ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

a. Introducción

b. Clasificación

c. Métodos de ensayo

d. Producción

e. Purificación

f. Propiedades

g. Conclusiones

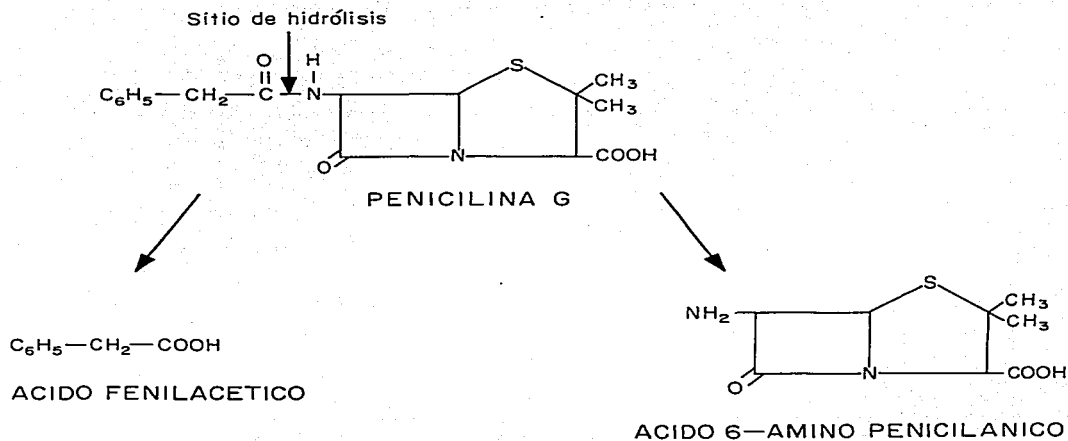
a. Introducción.

Las penicilinas semisintéticas continúan siendo en la actualidad los antibióticos más baratos y efectivos para el tratamiento de numerosos tipos de infecciones bacterianas que afectan a la población humana. Este escenario se ha mantenido aún a pesar del surgimiento de nuevos antibióticos como las cefalosporinas. Este dominio de las penicilinas se debe principalmente a dos factores. El primero es el costo elevado de las cefalosporinas. El otro factor es que se ha introducido en el mercado un nuevo tipo de medicamentos, que combina a las penicilinas semisintéticas con el ácido clavulónico, el cual es un potente inhibidor de las β -lactamasas, enzimas que confieren a las bacterias resistencia a las penicilinas. De esta manera aquellas cepas bacterianas resistentes a penicilinas, son nuevamente susceptibles.

Todas las penicilinas semisintéticas se derivan del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), el cual se obtiene en la industria principalmente por la hidrólisis de la penicilina G. Existen dos métodos para generar el 6-APA a partir de penicilina G; el químico y el enzimático. En la actualidad, y debido al elevado costo de los derivados del petróleo que se utilizan para el proceso químico, la mayoría de las industrias utilizan la vía enzimática.

El proceso enzimático para la obtención de 6-APA a partir de penicilina G, se basa en la utilización de la enzima amidasa penicilánica o penicilino amidohidrolasa, para hidrolizar la molécula de penicilina (Fig.II.1).

Figura II.1. Esquema de la acción de la enzima penicilino amidohidrolasa sobre la molécula de penicilina G.



Si bien esta actividad enzimática se encuentra ampliamente distribuida entre los microorganismos, es evidente que la enzima aislada de E. coli ATCC 11105 o ATCC 9637 es la más ampliamente estudiada y utilizada (17,22). En esta sección se pretende dar una visión general las propiedades de esta enzima en particular.

b. Clasificación.

Las primeras clasificaciones de las penicilinoamido hidrolasas se realizaron con base en los organismos de donde se aislaron. (17). Sin embargo, recientemente se ha sugerido una clasificación más precisa y que se basa en la acción preferencial de la enzima sobre determinado sustrato (38), por ejemplo: benzilpenicilino (penicilina G) amidohidrolasa, Tipo I ; fenoximetil (penicilina V) amidohidrolasa, Tipo II; y Tipo III las D(-)- α -aminobenzil penicilino (ampicilina) amidohidrolasa. En la tabla II.1 se presenta una lista de algunas de las enzimas descritas en la literatura, incluyendo las patentes. Como se puede observar en dicha tabla, esta actividad enzimática se encuentra ampliamente distribuida entre diversos microorganismos.

c. Métodos de ensayo.

El método más específico para medir la actividad enzimática es el de la determinación de la velocidad de formación del 6-APA a partir de un sustrato como penicilina G o penicilina V. Con este fin se han diseñado diversos métodos tanto cromatográficos, espectrofotométricos o que se basan en el uso de radioactividad (10). En la actualidad el método más utilizado es el que se basa

TABLA II.1 Microorganismos productores de penicilino amidohidrolasas descritos en patentes (2).

Compañía	Organismo	tipo de enzima
Bayer	<u>Escherichia coli</u> ATCC 11105 y 9637	I
Beecham	<u>Streptomyces lavendulae</u>	II
Beecham	<u>Achromobacter sp.</u>	III
Squibb	<u>Bacillus megaterium</u>	I
Pfizer	<u>Proteus rettgeri</u>	I
Eli Lilly	<u>Actinoplanes sp.</u>	II
Biochemie	<u>Fusarium sp.</u>	II
Biochemie	<u>Bovista plumbea</u>	II
Kyowa Hakko	<u>Kluyvera citrophila</u>	I
Kyowa Hakko	<u>Pseudomonas melanogenum</u>	III
Takeda	Especies de <u>Mycoplana</u> , <u>Proaminobacter</u> , <u>Aeromonas</u> , <u>Xanthomonas</u> y <u>Acetobacter</u>	III
Novo	Bacilos Gramm negativos	II

en la reacción del grupo amino libre del 6-APA con el reactivo p-dimetilaminobenzaldehído (PABA), para formar una base de Schiff coloreada, la cual se cuantifica por su absorbencia a 415 nm. Este ensayo puede hacerse en la presencia del sustrato siempre y cuando este no contenga grupos amino libres (2).

Recientemente se ha reportado el uso de HPLC para separar el ácido fenilacético que se libera de la hidrólisis de la penicilina G por la enzima (12,40). Este último método permite utilizar como sustrato fenilacetamida o derivados de aminoácidos fenilacetilados.

d. Producción.

A nivel industrial la enzima más utilizada es la que se obtiene de Escherichia coli (cepa ATCC 11105 o 9637). Antes de la obtención de cepas sobreproductoras de la enzima por DNA recombinante, el proceso más utilizado para fermentar E.coli y producir la enzima era el reportado por Savidge y Cole (39). Una descripción breve de este método es la siguiente:

Se prepara una suspensión de células por inoculación con células provenientes de cultivos en tubo inclinado (slants), en matraces con medio de licor de maíz estéril pH 7.0. Los matraces se incuban a 24 C con agitación durante 24 horas. Este cultivo se utiliza para inocular el fermentador. Para obtener una buena producción de la enzima a este nivel es necesario considerar los siguientes aspectos (9,10):

- a) El componente más importante del medio de cultivo es el ácido fenilacético, el cual sirve como fuente de carbono e inductor de la expresión del gen estructural.
- b) La temperatura del cultivo debe ser entre 29 y 32° C ya que a 37° no se detecta actividad enzimática. Este fenómeno no es debido a que la enzima sea inactiva a 37° C, más bien parece tratarse de un fenómeno de termoregulación en la expresión del gen (16).
- c) Las condiciones de aereación del cultivo deben de ser bajas, pues a niveles elevados de oxígeno disuelto la actividad enzimática medible disminuye.
- d) El medio de cultivo no debe de contener ninguna otra fuente de carbono aparte del ácido fenilacético, de otra manera se presenta represión catabólica del sistema (15).

Al Tomar en cuenta los factores mencionados, el rendimiento típico es de 0.3 unidades por mililitro (39). Aquí es importante resaltar que en la literatura analizada se ve una gran variedad en los rendimientos, ya que no hay un criterio unificado para reportar la actividad enzimática. Quizás la forma más extendida de reportar la actividad sea la utilizada por Mayer y colaboradores (28) que usan el dato de micromolas de 6-APA por

gramo de células en peso húmedo. Como se puede ver, los datos así reportados son de difícil comparación ya que depende de cómo se prepare el paquete celular y cuanta agua le quede a éste.

En el proceso de desarrollo de un sistema de células inmovilizadas para la producción del 6-APA, se han seguido dos rutas:

1- Aumento de la actividad específica de las células y:

2- Selección de mutantes más permeables al sustrato.

En este sentido los datos reportados por el grupo de Mayer et al(28), demuestran que la clonación del gen estructural de la enzima en un plásmido multicopia y la selección de mutantes permite incrementar en 8 veces la producción de la enzima.

Por otra parte Morita e Iwata (29) , a través de la selección de mutantes hipersensibles a penicilina G, han demostrado que con dichas mutantes es posible obtener los mismos rendimientos en bioconversión de penicilina G a 6-APA , que las cepas portadoras del gen clonado (28).

e. Purificación.

La penicilino amidohidrolasa es utilizada a nivel industrial como enzima inmovilizada ya sea purificada o como parte de células completas. Debido a que aún las células sobreproductoras presentan una baja actividad específica, la tendencia general es la de inmovilizar a la enzima purificada o semipurificada. Para realizar esta purificación existen dos métodos recomendados (25); de ellos el reportado por Kutzbach y Rauenbusch (21), permite la obtención de cristales homogéneos de la enzima. Brevemente, este método consiste en lo siguiente:

-) Realizar la lisis celular y ajustar el pH del lisado a 5.0 con ácido sulfúrico. Se centrifuga y se desecha el precipitado.
- b) Separación de la fracción de proteínas que precipita entre 40 y 60 % de saturación con sulfato de amonio.
- c) Purificación por columna de intercambio iónico SE-Sephadex C-50 y luego por DEAE-Sephadex A-50
- d) Cristalización en solución de sulfato de amonio 45% pH 5.0

Este método permite obtener una preparación de enzima con una actividad específica de 11.9 unidades por miligramo de proteína, actividad que no se puede aumentar aún después de varias recristalizaciones. El rendimiento que se obtiene por este método es del 25% de la actividad inicial.

Recientemente, Veronese et al (46), han descrito un nuevo método en el cual la enzima es aislada no de un lisado de células sino que, se aprovecha que la enzima en E.coli se localiza en el espacio periplásmico, las células se someten a un choque osmótico y del sobrenadante sin células se aísla la enzima a través de su adsorción en DEAE-celulosa. Posteriormente se utiliza una columna CM-celulosa y una precipitación diferencial con sulfato de amonio. A lo anterior sigue una purificación por columna de hidroxilapatita y una columna de afinidad que emplea 6-APA como ligando y Sepharosa como soporte. Como se puede apreciar, este método es más laborioso que el reportado por Kutzbach y Rauenbusch (21).

f. Propiedades.

Como ya se mencionó anteriormente, la actividad de penicilino amidohidrolasa esta ampliamente distribuida entre los microorganismos (Tabla II.I). Esto a su vez correlaciona con gran variabilidad en las propiedades fisicoquímicas de las enzimas que de ellos se aislan.

Por otra parte está claro que la enzima más estudiada es la proveniente de E.coli y también es la más utilizada en la industria. Por estas razones se hará a continuación una descripción más detallada de las propiedades principales de esta enzima, se procurará en los casos en que sea posible, realizar una comparación con las enzimas provenientes de otros microorganismos (24).

La penicilino amidohidrolasa de E.coli ATCC 11105 es una enzima que se localiza en el espacio periplasmico de las células. Está compuesta por dos subunidades, una de 69 kD y otra de 21 kD. Cuando la enzima se purifica y se separan las dos subunidades en geles de poliacrilamida-SDS, es posible observar cierta heterogeneidad en el tamaño de la subunidad pequeña. El análisis de la secuencia carboxilo terminal, ha mostrado que es posible encontrar dos especies de dicha subunidad, las cuales difieren entre sí en que una de ellas tiene 8 aminoácidos más (16).

Un aspecto novedoso de esta proteína es el hecho de que las dos subunidades que componen a la enzima madura, se producen a partir de un precursor común de aproximadamente 90 kD (17). En la figura II.2 se presenta un esquema de los diferentes procesamientos proteolíticos que experimenta este precursor. Como se puede observar para que se produzca la enzima

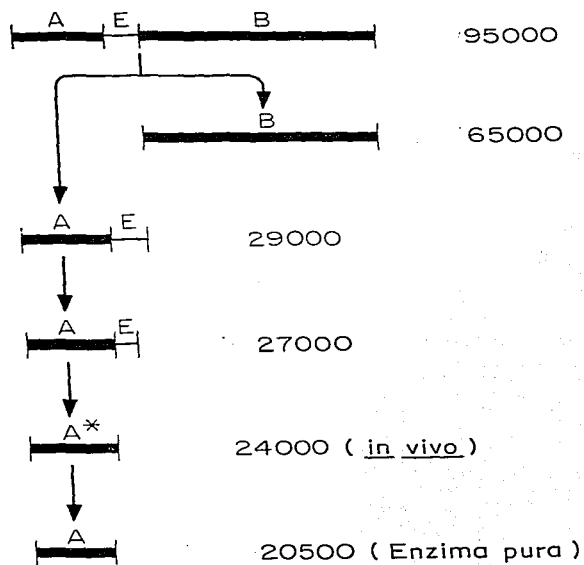


Figura II.2. Ruta de procesamiento del precursor de la penicilino amidohidrolasa según Årums et al (7). A y B representan la subunidad pequeña de la enzima madura respectivamente. E, representa al péptido conector. A* indica la forma de la subunidad pequeña que se encuentra in vivo. Se indica el peso molecular en Daltons de los polipéptidos producidos en cada paso.

madura se necesitan al menos tres cortes proteolíticos específicos. Es importante resaltar que ninguno de los intermediarios de procesamiento del precursor presentan actividad de amidohidrolasa (5).

Por lo que respecta a las funciones de cada subunidad se sabe que en la subunidad pequeña se localiza el dominio que le imparte especificidad por la cadena lateral. La subunidad grande posee un residuo (serina) PMFS sensible, que es necesario para la actividad catalítica de la enzima (12). Además de lo anterior, se sabe que la subunidad grande posee una actividad proteolítica endógena (4, 5).

La clonación del gen estructural de la enzima nos ha facilitado y a otros grupos, realizar diversos estudios (ver capítulo III). Ha permitido empezar el análisis de la expresión del gen así como también la determinación de su secuencia nucleotídica y de ésta se ha deducido la secuencia de aminoácidos (7,34,42). El análisis de la secuencia ha permitido sugerir que una región de la subunidad pequeña está directamente involucrada en la especificidad por la penicilina G (34). Esto se ha hecho al comparar las secuencias de proteínas que unen penicilina como son las β -lactamasas y D-alanina carboxipeptidasas (ver capítulo IV).

La predicción de que una región de la subunidad pequeña está directamente involucrada en el reconocimiento del sustrato, se ve apoyada por los experimentos de mutagénesis dirigida reportados por Williams y Zusel (48). En dichos experimentos el codón que codifica para la metionina que se localiza en la posición 142 de la subunidad pequeña, se modificó a fin de que codificara para

los siguientes aminoácidos: Phe, leu, val, ala, thr, gly, his, lys, glu y ala-val. Con estos cambios se obtuvieron mutantes que tienen alterada la especificidad y/o las constantes cinéticas.

Por lo que respecta a la especificidad del sustrato de la enzima aislada de *E. coli*, esta enzima se clasifica como del tipo I, es decir que el sustrato por el cual presenta mayor afinidad y es hidrolizado es la benzil-penicilina. Margolin et al (26), han hecho un estudio detallado de los valores de Km de esta enzima con diferentes sustratos. En la tabla II.2 se presenta una lista de algunos de estos valores.

Como se puede apreciar en los datos de la tabla II.2, la enzima presenta actividad sobre una gran variedad de sustratos y no se limita solamente a la acción amido hidrolítica, sino que tiene actividad sobre ésteres y ácidos. Konecny (20) ha discutido ampliamente que los nombres de: amidasa penicilánica, penicilino acilasa o penicilino amidohidrolasa, sólo reflejan el interés del investigador en la aplicación, más que las características de la proteína, la cual seguramente se ha seleccionado en la naturaleza para propósitos diferentes a la síntesis o degradación de los antibióticos B-lactámicos. Para fundamentar este último punto, este autor indica que las cepas bacterianas que presentan actividad de penicilino amidohidrolasa, no son resistentes a penicilinas y a que el gen estructural de la enzima se induce por ácido fenilacético. En apoyo a esto último están los datos de secuencia de DNA del gen de la enzima que sugieren que la expresión de éste se regula como un gen relacionado con la utilización de una fuente de carbono (43).

TABLA II.2

ESPECIFICIDAD DE LA ENZIMA PENICILINO AMIDOHIDROLASA DE
Escherichia coli ATCC11105.

SUBSTRATO	Km (M)*
Bencilpenicilina	4.8×10^{-6}
7- PADCA	1.0×10^{-5}
Etil- fenil acetato	4.5×10^{-5}
p-Nitrofenil fenilacetato	3.1×10^{-5}
Fenilacetato p-nitroanilida	9.7×10^{-5}
Fenilacetilglicina	8.0×10^{-5}
Acido benzilpeniciloico	2.0×10^{-3}
Cefalotina	4.2×10^{-5}
Cefaloridina	1.0×10^{-4}
Ampicilina	5.2×10^{-3}
Cefalexina	2.1×10^{-3}
acido D-(-)- α -aminofenilacetico	
p-nitroanilida	3.2×10^{-3}

* Estos valores se obtuvieron a pH 7.5 y a 25°C.

El estudio del mecanismo de reacción de la penicilino amidohidrolasa ha aportado datos interesantes acerca de su posible papel en la célula. La característica principal de dicha enzima, es que cataliza la transferencia de grupos acilo a partir de ésteres, amidas o ácidos hasta los aceptores como el agua, aminas o alcoholes. Esta acción recuerda a ciertas proteasas como la quimotripsina, que poseen una propiedad similar. Se sabe que la penicilino amidohidrolasa presenta un mecanismo de reacción muy parecido al de las serina proteasas ya que forma un intermediario acilo-enzima entre la enzima y los donadores del grupo acilo (20). También se ha demostrado que el ácido fenilacético actúa como inhibidor competitivo, mientras que el 6-APA es un inhibidor no competitivo. Esta diferencia en los modos de inhibición es una consecuencia del mecanismo de dos pasos de la enzima; los donadores de grupos acilo compiten por el sitio activo de la enzima, mientras que los aceptores de grupos acilo compiten por el intermediario enzima-acilo. A partir de consideraciones puramente termodinámicas, se sabe que cualquier catalizador que hidrolice una unión amida o ester de un ácido dado, por el mecanismo antes descrito, debe también catalizar la acilación de la amina por el ester (20). Este concepto es muy importante porque abre la posibilidad de usar primero a la enzima para producir 6-APA y después para formar las penicilinas semisintéticas al unirle al 6-APA distintos radicales. Para que esto se lleve a cabo, es necesario considerar el pH de la reacción. Se sabe que la reacción de hidrólisis requiere de pH alcalino, por lo que para la reacción reversa se sugiere un pH ligeramente ácido.

En este sentido se sabe también que la enzima de E.coli presenta baja actividad y estabilidad en pH ácido, por lo que se piensa que para el caso de la síntesis la enzima de E.coli debe ser reemplazada (20). Por otro lado es importante resaltar, que al menos la enzima proveniente de Kluyvera citrophila ha sido utilizada eficientemente para ambas reacciones (24); recientemente su gen estructural ha sido clonado y secuenciado. Es interesante mencionar que la comparación de las secuencias de los genes de K.citrophila y E.coli poseen una similitud del 80%. Esta similitud se eleva a 87% cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de ambas enzimas (3). La formación de penicilinas semisintéticas por vía enzimática quizás a la larga vaya a requerir un nuevo enfoque para optimizar la síntesis, ya que en la reacción de hidrólisis de la penicilina G hay un solo aceptor del grupo acilo (H_2O) y los productos son termodinámicamente estables. En cambio en la reacción de acilación del 6-APA por un ester hay dos aceptores que compiten: el H_2O y el 6-APA y la amida que se produce es termodinámicamente inestable con respecto a sus productos de hidrólisis el 6-APA y el ácido fenilacético. Esta amida al ser también un sustrato compete con el ester por la enzima y en este proceso es hidrolizada (20). Todo esto hace ver que las condiciones necesarias para lograr la reacción de síntesis de manera comercialmente rentable, son difíciles de lograr por medios convencionales. La investigación desarrollada por el grupo de Alexander Klivanov (19), permite vislumbrar nuevas posibilidades en este sentido. Este investigador ha demostrado que si una enzima está rodeada por una capa delgada de agua, puede

funcionar en ciertos solventes orgánicos. En este proceso la enzima en ciertos casos se vuelve más termoestable y puede llegar inclusive a exhibir distintas especificidades. Como un ejemplo de las aplicaciones de este nuevo método resalta el trabajo realizado con una lipasa. Esta enzima, en medios acuosos, puede catalizar solamente la reacción de hidrólisis. En cambio, en medios orgánicos puede catalizar al menos seis distintas reacciones que incluyen transesterificación, amidólisis esterificación, e intercambio de grupos acilo (19). Todo lo anterior sugiere que hay nuevas posibilidades para mejorar los procesos enzimáticos clásicos, que permiten la síntesis de las penicilinas semisintéticas.

g. Conclusiones.

En 1966 Hamilton-Miller (17) escribió lo siguiente: "El descubrimiento de las penicilinoacilasas abrió la puerta para la producción de las penicilinas semisintéticas. Raramente una sola enzima es responsable de una revolución tan grande en la práctica terapéutica. Quizás no sea exagerado decir que la introducción de la metilcilina, la primera penicilina semisintética comercial y prácticamente insensible a la acción de la penicilinasas de estafilococos, cambió el estatus del estafilococo benzilpenicilina resistente, de enemigo número uno, a algo sin importancia. Las compañías farmacéuticas que invirtieron grandes sumas de dinero en investigación básica de la molécula de la penicilina, han sido ampliamente retribuidas. Se puede decir que desde el punto de vista del médico y el

industrial la historia de la penicilinoamidasa ha llegado a un final feliz, pero desde el punto de vista académico aun quedan muchas interrogantes fascinantes."

Ahora, 20 años después podemos ver que el mencionado "Final feliz" aún no llega, ya que numerosas compañías aún trabajan en esta enzima, y tratan de modificarla para que sirva mejor a los propósitos industriales que se tienen y a las situaciones tan cambiantes de las estrategias de producción rentable.

Con todos los nuevos métodos con que cuenta ahora el investigador, es posible entrever que se producirán nuevas enzimas y procesos que hagan más eficaz y costeable la producción de penicilinas semisintéticas.

III. ORGANIZACION FISICA DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA ENZIMA
PENICILINO AMIDOHIDROLASA. EL GEN pac .

- 1) Introducción
- 2) Resultados
- 3) Conclusiones

1) Introducción:

El gen pac codifica para la formación del precursor proteico de la enzima penicilino amidohidrolasa.

Como se mencionó en el capítulo I, este precursor experimenta varios procesamientos a través de los cuales se generan las dos subunidades que componen a la enzima madura.

A pesar de que la actividad de penicilino amidohidrolasa se haya distribuida ampliamente entre los microorganismos (capítulo I), a nivel industrial la enzima más utilizada es la de E.coli ATCC 11105 (38). Esta cepa y sus derivados han sido utilizados por más de 20 años. Sin embargo, los procesos industriales que se emplean para obtener dicha enzima, están lejos de ser los ideales ya que se requieren condiciones especiales para la fermentación y pasos laboriosos de purificación (capítulo I). La manera tradicional para tratar de resolver estos problemas, es la obtención por medio de agentes químicos y/o físicos de cepas mutantes con nuevas características. El hecho de que 20 años después, la misma cepa de E.coli sea aún utilizada y se tengan los mismos problemas para obtener grandes cantidades de la enzima, muestran que las técnicas tradicionales de mutagénesis han sido inefectivas (38).

Con el advenimiento de las técnicas de DNA recombinante que permiten aislar genes, caracterizarlos a nivel de secuencia nucleotídica y mutagenizarlos en sitios específicos, es posible modificar la regulación de la expresión del gen y/o la secuencia de aminoácidos de la enzima para la que codifica. Todo esto abrió las puertas para crear cepas que produzcan más de la

enzima deseada. También es posible alterar los mecanismos que controlan la expresión de los genes de tal manera que la(s) enzima(s) de interés se produzca(n) bajo condiciones de fermentación más sencillas. Otra aplicación de la mutagénesis es la de modificar a los genes en forma tal que produzcan enzimas más resistentes a la oxidación, temperatura, pH etc, creando así nuevas enzimas más adecuadas para nuestros propósitos.

Debido a todo lo anterior, la primera etapa del presente trabajo consistió en la clonación y determinación de la secuencia nucleotídica del gen pac. A continuación se resumirán algunos de los resultados que en este sentido se obtuvieron y que han sido publicados de una manera más extensa (34,43).

2) Resultados.

a) Aislamiento del gen.

El gen pac se aisló del DNA cromosomal de la cepa ATCC 11105. Se determinó que toda la información necesaria para producir la actividad de penicilino amidohidrolasa se encontraba contenida en un fragmento de DNA flanqueado por 2 sitios de EcoRI que contenía aproximadamente 7.5 kb (figura III.1). La construcción de diversas deleciones e inserciones permitió definir que se requerían aproximadamente 4 kb para producir la enzima. Los datos publicados por Bock et al (4), sugirieron que la enzima estaba compuesta por dos subunidades, una de 20 kD y otra de 69 kD, las cuales se generan a partir de un mismo precursor, a través de un procesamiento complejo en el cual se remueve un péptido conector (5). Estos datos se

corroboraron con la secuencia nucleotídica de los primeros 1,100 pb del gen pac, obtenida por nuestro grupo (37) y la secuencia completa del gen estructural reportada por Schumacher et al (42).

b) Organización del gen pac.

Después de haber localizado al gen pac de una manera gruesa en el fragmento de DNA clonado, se procedió a determinar la secuencia nucleotídica de parte de este fragmento. Así se encontró que en un fragmento HindIII-BglII (figura 1) estaba codificada la información para la síntesis de la subunidad de 20.5 kD. Así como también el péptido conector y los primeros 79 aminoácidos de la subunidad de 69 kD (37).

Con el propósito de identificar las regiones del DNA que permiten la expresión del gen pac, se procedió a delimitar éstas por medio de deleciones y análisis de la expresión del gen (43). Así, se definió que la región del DNA comprendida entre los sitios de AsuII y HindIII (figura III.1), contenía la información para permitir la expresión regulada del gen pac. Basados en este dato, se procedió a determinar la secuencia nucleotídica de dicho fragmento. Simultáneamente se realizaron experimentos de extensión de "primer" para definir el sitio de inicio de la transcripción e identificar al promotor activo bajo esas condiciones metabólicas. Una vez localizado el promotor, se procedió a analizar la secuencia del DNA alrededor de éste para tratar de identificar sitios probables de unión de proteínas reguladoras. Este análisis mostró la presencia de varias secuencias palindrómicas y dos secuencias que presentaban gran

Figura III.1. Mapa de Restricción del plásmido pPA2.

Sólo se indican algunos sitios importantes para delimitar al gen pac (43). La línea gruesa indica el fragmento del DNA cromosomal de E.coli ATCC 11105 clonado. Con línea delgada se indica el vector de clonación. Tc es el marcador de resistencia a tetraciclina, codificado por el plásmido. Las dos flechas representan la región que codifica para las dos subunidades de la penicilino amidohidrolasa madura.

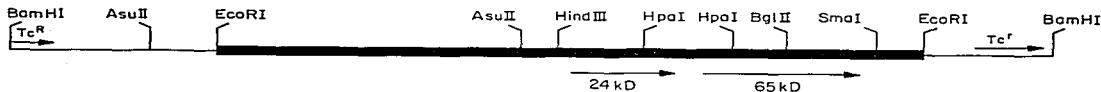
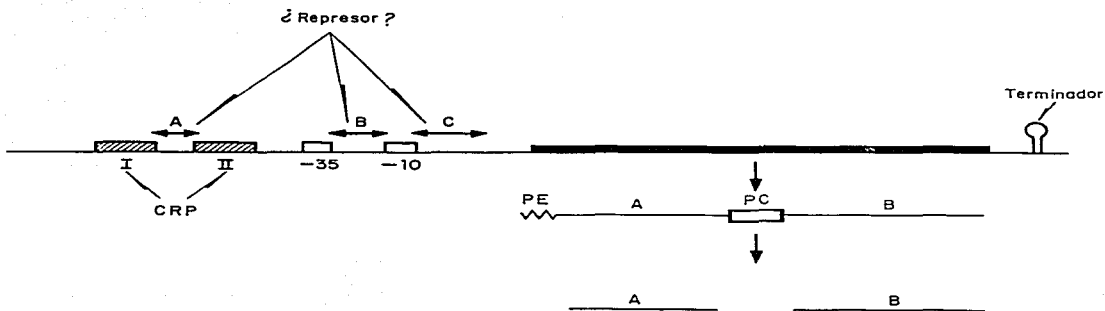


Figura III.2. Organización del Gen pac

Esquema de la organización física del gen pac. A y B representan las 2 subunidades de la enzima madura. PC significa peptido conector. Las líneas con dos cabezas de flecha representan tres secuencias palindrómicas (A,B,C). I y II sitios probables de unión de CRP. -35 y -10 representan al promotor funcional identificado. El dibujo no esta a escala.



similitud con los sitios que reconoce la proteína CRP (43). La distribución de estas secuencias se presenta en la figura III.2.

Como se puede observar, la posición de los palíndromes es la adecuada para que si son reconocidos por una proteína, ésta sirva como represora de la transcripción. Por otra parte, la posición de los probables sitios de unión de CRP es la adecuada para que ésta molécula ejerza un control positivo en la expresión del promotor (43). Todos estos datos concuerdan con los datos publicados de que el gen pac está regulado por control negativo y que la proteína CRP actúa como activador de la transcripción (15).

En este punto es importante resaltar que la obtención de la secuencia nucleotídica de la región de control fue importante ya que en dos publicaciones de otro grupo, la secuencia presentada fue totalmente distinta (6,7). Al obtener nosotros la secuencia de dicha región pudimos constatar que nuestra secuencia coincidía con la reportada en la patente (6). Nuestros datos fueron confirmados posteriormente por otro grupo (33).

Por último, para terminar de caracterizar al gen pac, se decidió realizar la secuencia nucleotídica de la región 3' del gen, para lo cual se determinó la secuencia nucleotídica del fragmento Hpa I- Sma I (figura III.1). La obtención de esta secuencia fue importante porque en el artículo de Schumacher et al (42), sólo se reportó la secuencia nucleotídica que codifica para ambas subunidades de la enzima, con lo cual no era posible saber si el gen pac formaba parte de un operón o era una unidad transcripcional aislada.

Al analizar la secuencia obtenida del fragmento mencionado, se encontró que una parte de ésta, podía codificar para la síntesis de los últimos 20 aminoácidos de la subunidad de 69 kD. Además, a 14 pb del codón de terminación se encontró una secuencia palindrómica similar a los terminadores de la transcripción rho independientes (14). Estos datos se presentan en la figura III. 3.

3) Conclusiones

Los experimentos antes descritos sugieren que el gen pac es una unidad transcripcional que codifica par la formación de un precursor proteico, del cual se generan las dos subunidades que forman a la enzima penicilino amidohidrolasa. Es importante señalar que este ultimo hecho es poco frecuente en procariontes y común en eucariontes. De hecho, hasta el momento en procariontes solo los genes de penicilino amidohidrolasa de E.coli, K.citrophila y algunos genes de cefalosporino amidohidrolasas han mostrado dicha característica (27).

La identificación de un promotor al inicio del gen pac y la similitud con terminadores de la transcripción de la secuencia palindrómica que se encuentra al final de la región codificadora, sugiere que esta unidad transcripcional codifica para la formación de un mensaje monocistrónico.

Al analizar en conjunto la información hasta aquí presentada sobre el gen pac, es razonable proponer que éste gen forma parte de las vias metabólicas para la utilización de fuentes de carbono, especialmente ácido fenilacético (capitulo VII). Es importante resaltar aquí que debido a la forma en que este gen fue encontrado y nombrado, uno puede suponer que su función en E.coli es producir una enzima para

CAG GAA GUG UUG CAC GUU CAG AGA UAA U U A A G C C C O G A A A
 Gln Glu Val Leu His Val Gln Arg Fin

1)

G C C C U C A U A U U C U G G A G G A A U A U G A G G U B A U A

A A G U C U C A G G U A U U G U G A U G U U G G A G G G C U U G

G U U A C U U U U U U G A G U C C C 3'

2)

G A G
 A A G
 C-G
 U-A
 U-A
 A-U
 U-A
 A-U
 C-G
 U-A
 C-G
 C-G

UAA U U A A G C C C C G A A A G C C-G U G A U A A A G U C U C A
 Fin

Figura III. 3. Secuencia Nucleotidica de la región 3' del gen pac.

1) Secuencia nucleotídica de los 113 bases posteriores al triplete de terminación de la traducción UAA. También se muestra la secuencia de los últimos 8 aminoácidos de la subunidad de 65 kD.

2) Probable estructura del RNA mensajero del gen pac en su región 3'OH.

degradar penicilina. Sin embargo debido a la organización física del gen, su regulación y la actividad enzimática del producto, más bien pareciera que este gen estuviera involucrado en la asimilación de fuentes de carbono alternas. Una discusión más amplia sobre el posible papel del gen pac en el metabolismo celular, se presenta en el capítulo VII.

IV. ESTUDIOS COMPARATIVOS A NIVEL DE SECUENCIA DE AMINOACIDOS.

- a) Introducción
- b) Resultados

a) Introducción

La clonación y secuenciación del gen pac ha abierto la posibilidad de realizar diversos estudios comparativos con otros genes, a nivel de secuencia de nucleótidos, aminoácidos, organización física y de regulación.

Para el caso del gen pac, el establecimiento de similitudes es más complejo, ya que el conocimiento existente sobre la enzima penicilino amidohidrolasa se ha obtenido debido a su gran importancia industrial, sin importar el papel de la enzima en el metabolismo de la célula (17).

La realización de estudios comparativos como los mencionados reviste gran importancia ya que permite tener una visión más completa del gen, la enzima y su papel dentro de la economía celular. A continuación se presentarán y discutirán los resultados obtenidos hasta el momento en lo referente a tratar de encontrar similitudes entre los productos del gen pac y de otros genes, a nivel de secuencia de aminoácidos.

b) Resultados

Un aspecto a considerar cuando se está comparando a una enzima con un banco de secuencias, es el de las funciones enzimáticas que posee. Por lo que respecta a lo anterior, se sabe que la amidasa penicilánica presenta varios aspectos interesantes algunos de los cuales son:

- 1) El mecanismo de reacción de la penicilino amidohidrolasa es semejante al de las serina proteasas (20).

2) En la subunidad de 69 kD se localiza un residuo de serina que al reaccionar con PMFS ocasiona la inactivación de la enzima (12).

3) La penicilina que es hidrolizada a mayor velocidad es la Benzilpenicilina o penicilina G. La especificidad por la cadena lateral de la penicilina radica en la subunidad de 24 kD (13).

4) La actividad de amidasa no le confiere a la célula resistencia a la penicilina (17).

5) Ninguna de las formas del precursor de la enzima posee actividad enzimática (42).

6) La enzima presenta inhibición competitiva por el ácido fenilacético e inhibición no competitiva por el 6-APA (2).

7) Algunos sustratos pueden ser hidrolizados más rápidamente que la penicilina G. Tal es el caso de la fenilacetamida (10 % más), N-fenilacetilglicina (82% más) y N-fenilacetil-L-alfa-amino-fenilacético (39% más) (26).

Con base en lo anterior es evidente que esta enzima debe poseer algunas de las características propias de las serina-proteasas. Por lo anterior se decidió analizar si había alguna similitud de la penicilino amidohidrolasa con dichas proteasas.

La función básica de las proteasas es la ruptura de enlaces peptídicos. Existen sólo unas cuantas formas de realizar esta ruptura en condiciones fisiológicas, el mecanismo más común es el de la polarización de la unión peptídica por ataque nucleofílico de la unión carbono-oxígeno; este proceso es asistido además por la donación de un protón al nitrógeno de la unión peptídica. En

las enzimas proteolíticas, varios aminoácidos poseen las características de agentes nucleofílicos y otros de donadores de protones (32).

Las proteasas cuyos sitios activos se han identificado, han sido agrupadas en familias con base en los aminoácidos que conforman dicho sitio. Se supone que los miembros de cada familia se originaron de un ancestro común. Dentro de las serina proteasas existen 2 familias; una que agrupa a las proteasas de mamíferos y otra que está constituida por las serina proteasas de procariontes (32). En la tabla IV.I se presentan algunas de las proteasas representativas de estas dos familias, así como también las características de los residuos que conforman el sitio activo.

Tabla IV.I. Familias de Serina proteasas (32).

Familia	Proteasas representativas	Aminoácidos característicos del sitio activo
I	Quimotripsina, tripsina, elastasa kalikreina	Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵ , His ⁵⁷
II	Subtilisina	Asp ³² , His ²²¹ , Ser ⁶⁴

Se dice que las serina proteasas de estas dos familias son un caso típico de evolución convergente ya que, aunque tienen función similar y sitio activo semejante, presentan secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional distinta (32).

Al comparar la secuencia de aminoácidos de la subunidad de 69 kD de la penicilino amidohidrolasa, con la secuencia de aminoácidos de las proteasas de B.amilolyquefaciens y S.marescences (31,45), se encontró cierto grado de similitud tal y como se puede observar en la figura IV.1.

Es importante mencionar que la similitud encontrada se restringe a las zonas que rodean los aminoácidos que conforman el sitio activo de las proteasas, señalados con un cuadro negro en la figura IV.1.

También se buscó similitud con las serina proteasas de la familia I, pero no se encontró ninguna. Este último resultado era esperado pues las proteasas de esta familia están estructuradas por la acción de puentes disulfuro (32), y para el caso de la penicilino amidohidrolasa se sabe que la enzima madura no posee cisteínas (42).

Otro aspecto importante en la organización de las serina proteasas es el orden y la distancia de los aminoácidos que conforman al sitio activo. En ese sentido y a continuación se presenta una comparación entre las proteasas de la familia I, las de la familia II y los aminoácidos de la penicilino amidohidrolasa que presentan similitud con serina proteasas.

Fam. I His __45aa*__ Asp __93aa__ Ser

Fam. II Asp __32aa__ His __157aa__ Ser

PAC His __64aa__ Asp __278aa__ Ser

*aa. Residuos de aminoácidos.

Como se puede observar, la penicilino amidohidrolasa presenta similitud con las proteasas de la familia II pero presenta el arreglo típico de las proteasas de la familia I. Estos datos nos llevan a suponer que la similitud encontrada entre la penicilino amidohidrolasa con serina proteasas se debe probablemente a una evolución convergente más que a divergencia a partir de un ancestro común.

Por otra parte, el hecho de que la penicilino amidohidrolasa sea inhibida de una manera no competitiva por 6-APA, sugiere que en la molécula de la enzima se debe de estructurar un sitio similar al de otras proteínas que son capaces de unir penicilina. En todas las Eubacteria examinadas se encuentran proteínas capaces de unir penicilina de una manera covalente. El número de estas proteínas puede variar de especie a especie, pero generalmente se haya entre 3 y 8 distintas. Estas proteínas han sido denominadas en conjunto como "Penicillin Binding Proteins" (PBP), aunque no necesariamente todas ellas tengan la misma función en la célula.

Además de las PBP, las enzimas β -lactamasas que confieren la resistencia a antibióticos β -lactámicos, son capaces de reconocer específicamente a las penicilinas pero sin formar enlaces covalentes con ellas. Una revisión muy amplia de todas estas proteínas ha sido publicada por Ambler (1).

El análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas que se unen a las penicilinas ha mostrado que:

- a) Las β -lactamasas se originaron aparentemente de las PBP.
- b) Las PBP son el blanco de la acción de las penicilinas.
- c) No hay una similitud extensa entre las PBP.
- d) El mayor grado de similitud se encuentra en la región de la proteína donde se localiza un residuo de serina, el cual se ha demostrado que es necesario para la unión de la penicilina en las PBP y para conformar el sitio activo en las β -lactamasas (18).

Con base en lo anterior, se decidió comparar la secuencia de aminoácidos de la penicilino amidohidrolasa contra las secuencias conservadas entre PBP y β -lactamasas (1,44). Los resultados obtenidos se presentan en la figura IV.2.

Como se puede observar en dicha figura, la penicilino amidohidrolasa presenta una similitud importante con las PBP y β -lactamasas en las regiones presentadas, por lo que es muy probable que estas regiones de la enzima conformen el sitio de reconocimiento para el anillo β -lactámico. Este probable sitio se haya en la subunidad de 24 kD muy cerca del carboxilo terminal. Los aminoácidos que conforman al sitio propuesto se hayan dispuestos de una manera contigua, al igual que en las β -lactamasas y las PBP 5 y 6 de *E.coli* y 5 de *B.subtilis*, aunque en éstas el sitio de unión se localiza en el extremo amino

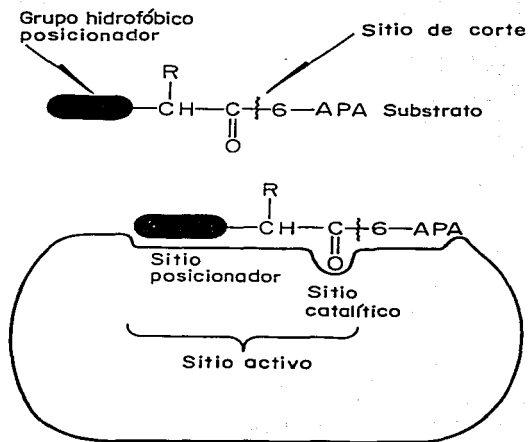
Figura IV.2. Similitud entre proteínas que unen penicilina (PBP), β -lactamasas (TEM, AMPC) y penicilino amidohidrolasa (PAC). Las secuencias y alineamientos de PBP y β -lactamasas se tomaron de Ambler (1). La secuencia de aminoácidos de PAC que se compara corresponde a los aminoácidos 165 a 185 de la subunidad de 20.5 kD.

PBP 1A	N R	A	T	Q	A	L	R	Q	V	G	S	N	I	K	P	F	L	Y	T	A	A	M	
PBP 1B	N R	A	M	Q	A	R	R	S	I	G	S	L	A	K	P	A	T	Y	L	T	A	M	
PBP 3	N R	T	I	T	D	V	F	E	P	G	S	T	V	K	P	M					V	V	M
PBP 5	E	Q	N	A	D	V	R	R	D	P	A	S	L	T	K	M	M	T	S	Y	V	I	G
PBP 6	E	G	N	A	D	E	K	L	D	P	A	S	L	T	K	I	M	T	S	Y	V	V	G
PBP 5	S	K	N	A	D	K	R	L	P	I	A	S	M	T	K	M	M	T	Y	E	L	L	L
TEM	S	F	R	P	E	E	R	F	F	M	M	S	T	F	K	V	L	L	C	G	A	V	L
AMPC	P	V	T	Q	Q	T	L	F	E	L	G	S	V	S	K	T	F	T	G	V	L	G	
PAC	G	S	A	I	L	N	L	V	W	L	T	S	M	L	K	R	T				V	V	A

terminal. Es importante resaltar que en el alineamiento de la figura IV.2, la penicilino amidohidrolasa no presenta un residuo de lisina (K) que se encuentra altamente conservado en todas las proteínas que unen penicilina. Por lo que si bien la región carboxilo terminal de la subunidad pequeña de la penicilino amidohidrolasa presenta similitud con β -lactamasas, no posee uno de los residuos que se suponen esenciales para la actividad de la β -lactamasa (1,18).

Para completar la imagen de la enzima es importante mencionar que se sabe que la penicilino amidohidrolasa tiene preferencia por substratos que poseen radicales fenilo (capítulo II), y además actúa como inhibidor competitivo de la enzima. Con base en esto, es posible suponer que el grupo fenilo actúe como posicionador de la molécula de substrato, al igual que pasa en quimotripsina, de esta manera el sitio activo completo de la penicilino amidohidrolasa debe llevar también el sitio posicionador. En la figura IV.3 se presenta un esquema de la organización probable de la enzima penicilino amidohidrolasa.

Figura IV.3. Probable organización de la penicilino amidohidrolasa de *E.coli*.



V. PROCESAMIENTO DE LA ENZIMA PENICILINO AMIDOHIDROLASA.

- a) Introducción
- b) Procesamiento de la preproenzima
- c) Procesamiento de la proenzima
- d) ¿Porqué la necesidad de un procesamiento complejo?

a) Introducción

Se ha demostrado que para que la enzima pencilino amidohidrolasa se produzca en su forma activa en el espacio periplásmico de *E. coli*, es necesario que experimente varios procesamientos proteolíticos (42). Como se ha indicado, hasta el momento este procesamiento es poco frecuente en procariontes, ya que las dos subunidades (A y B) que conforman a la enzima (24 y 65 kD) provienen de un precursor común (5). En los demás casos reportados en los que una enzima periplásmica o citoplásmica está formada por dos subunidades, cada una de ellas está codificada por un gen diferente y posee sus propias señales de secreción. Un esquema de los diversos cortes proteolíticos que experimenta el precursor de esta enzima se presenta en la figura 1 del capítulo II.

Como se puede observar en dicha figura, para que la enzima obtenga su tamaño final, es necesario que el precursor experimente tres cortes proteolíticos muy precisos (7). El orden en que se efectúan dichos cortes ha sido determinado por experimentos in vitro y se sabe que la subunidad de 69 kD se genera primero que la de 24 kD. También se sabe que para que la enzima sea activa necesita experimentar todos los cortes proteolíticos mencionados (42).

Con base en lo antes mencionado, es posible plantear algunas preguntas: ¿Qué enzimas intervienen en el procesamiento del precursor?. ¿Qué características del precursor confieren la gran especificidad observada en el proceso?. ¿Por qué es necesario que esta enzima experimente dichos procesamientos ?.

Para tratar de contestar estas preguntas se decidió primeramente efectuar un estudio teórico que sirviera como base para plantear los experimentos. A continuación se presentarán los resultados obtenidos de dicho estudio.

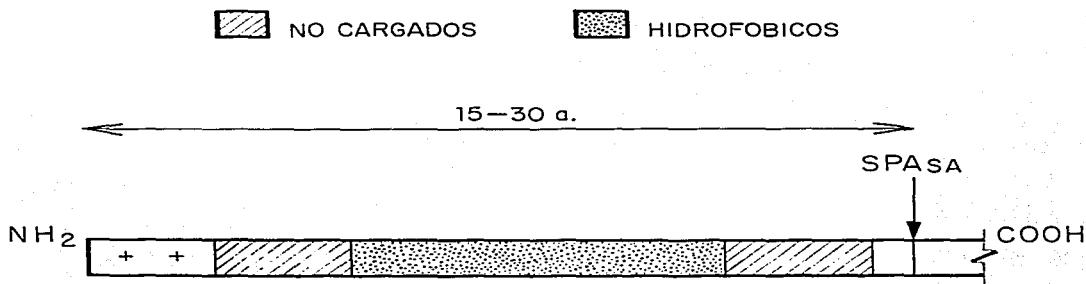
b) Procesamiento de la preproenzima

Una característica típica de todas las proteínas periplásmicas y de membrana externa de E.coli, es la presencia de una secuencia señal o péptido señal en la región amino terminal de la proteína. Esta secuencia señal permite que el precursor sea reconocido como un péptido de secreción por la maquinaria celular. En la mayoría de los casos la señal es removida proteolíticamente durante el proceso de secreción (34).

En E.coli se han descrito dos enzimas capaces de remover al péptido señal; estas enzimas han sido denominadas SPAsa I y SPAsa II. La primera es la que procesa el péptido señal de la mayoría de las proteínas de secreción, mientras que la SPAsa II se encarga de remover el péptido señal de las lipoproteínas. Ambos genes han sido clonados y secuenciados. De la comparación de secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de ambos genes, se sabe que no hay similitud entre ellos. Estas dos enzimas se localizan en la membrana interna y sólo son capaces de procesar proteínas que se localizan en el periplasma (34). Del análisis de las secuencias de los péptidos señal procesados por la SPAsa I se han podido establecer sus características típicas. En la figura V.1 se presentan éstas. Como se puede observar, el péptido señal esta constituido por una secuencia

Figura V.1. Características del péptido de secreción en procariontes.

Se indica la disposición más común de aminoácidos (a.) cargados positivamente (++), aminoácidos no cargados o hidrofóbicos. El sitio de corte proteolítico por la SPAsa se indica con una flecha.



de aminoácidos de 15 a 30 residuos de longitud. En esta región es posible distinguir claramente tres regiones: En la porción más cercana al amino terminal se localiza una región con aminoácidos básicos. Una segunda región que incluye varios aminoácidos hidrófobos y una tercera región formada primariamente por aminoácidos no cargados y que se halla a los flancos de la región hidrófoba.

Además de lo anterior, se conoce que la SPAsa I presenta una clara preferencia por ciertos aminoácidos en la vecindad del sitio de corte. Von Heijne (47) ha publicado recientemente un método que permite predecir los sitios de corte de la SPAsa I. Este autor se basó en un análisis estadístico de 36 proteínas de secreción y de origen procarionte y cuyo sitio de procesamiento del péptido señal era conocido. Con los datos obtenidos generó una tabla en la que se le asigna un valor a cada aminoácido, según sea su posición respecto al sitio de corte. La probabilidad de que ocurra un corte proteolítico por la SPAsa I es la suma de los valores asignados a los aminoácidos localizados en las posiciones -5 a $+2$, donde el 0 es el sitio probable de corte. Si uno desconoce el sitio lo que se hace es realizar el cómputo antes mencionado, al variar la posición del sitio de corte. Generalmente al graficar los valores calculados obtenidos, se obtiene un sitio con un valor claramente mayor, el cual es el sitio de corte más probable.

Se decidió aplicar el método anteriormente descrito, para analizar la región del precursor de la penicilino amidohidrolasa que se sabe es removida durante la secreción. Los valores obtenidos se graficaron y el resultado se presenta en la figura V.2.

Como se puede observar, el sistema de Von Heijne predice claramente el sitio de procesamiento observado in vivo. Por lo anterior, podemos afirmar que es muy probable que la SPAsa I sea la enzima encargada de procesar el péptido señal de esta penicilino amidohidrolasa. A lo anterior se debe aunar el hecho de que el péptido señal presenta además todas las características típicas de los péptidos de secreción (34).

c) Procesamiento de la proenzima

Como ya se mencionó para que se obtengan las subunidades A y B de la penicilino amidohidrolasa a partir del precursor son necesarios dos cortes proteolíticos. Se decidió aplicar el método de Von Heijne para analizar si la SPAsa I o una proteasa con la misma especificidad pudiera reconocer los sitios de corte observados in vivo. En la figura V.3 se presenta la gráfica obtenidas. Se puede observar que el sistema de Von Heijne predice el corte proteolítico que genera el carboxilo terminal de la subunidad A. Sin embargo no es capaz de predecir al sitio de corte que genera a la subunidad B tal y como se puede observar en la figura V.4.

Figura V.2. Probabilidad de corte de la SPAsa I en la región del péptido de secreción del precursor de la penicilino amidohidrolasa. Las barras indican el valor acumulado de probabilidad (ver texto) de que el sitio sea procesado por la SPAsa I. La flecha indica la posición del corte observado in vivo. A la izquierda de la gráfica en código de una letra, se presenta la secuencia de aminoácidos de la región.

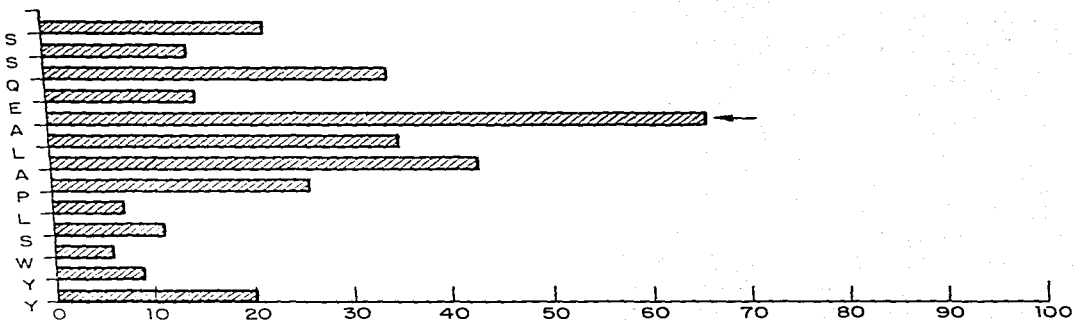


Figura V.3. Probabilidad de corte de la SPAsa I en la región carboxilo terminal de la subunidad de 24 kD de la penicilino amidohidrolasa. Los símbolos utilizados son los mismos de la figura V.2.

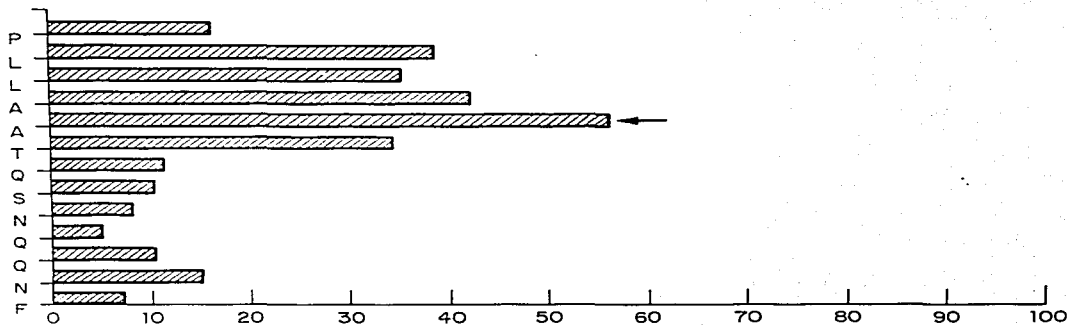
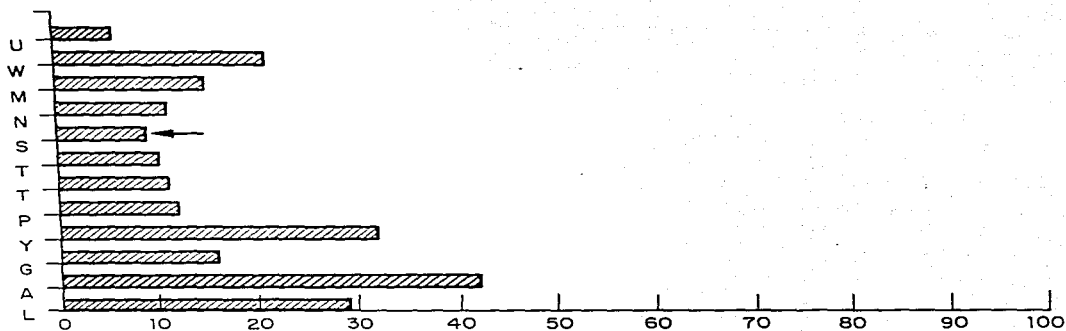


Figura V.4. Probabilidad de corte de la SPAsa I en la región amino terminal de la subunidad de 65 kD de la penicilino amidohidrolasa. Los símbolos son los mismos de la figura V.2.



De lo anterior es posible proponer que una proteasa con la misma especificidad que la SPAsa I o ella misma, pudiera ser la que genera a la subunidad A. Sin embargo, por lo que respecta a la subunidad B podemos decir que pareciera ser otra la enzima encargada de realizar el corte proteolítico que la genera a partir del precursor, o bien que la SPAsa I sea modificada para procesar específicamente dicho precursor.

Es importante mencionar que hemos reportado que en la vecindad al sitio de corte que produce a la subunidad B se localiza la secuencia Leu-Ala-Gly, la cual ha sido identificada como necesaria para que la SPAsa II procese a las lipoproteínas (49).

Por lo que respecta a esta secuencia en las prelipoproteínas, se había reportado inicialmente que el sitio necesario para que las lipoproteínas fueran procesadas debería de tener la secuencia Leu-Ala-Gly-Cys. Un precursor de lipoproteína que llevara dicha secuencia, primero es modificado por la adición de lípidos a la cisteína y posteriormente es procesado por la SPAsa II. Los experimentos con mutantes han demostrado que no es necesaria la presencia del lípido para que el precursor sea procesado, aunque en estos mutantes el sitio de procesamiento cambia (5). Al comparar la secuencia de algunos de dichos mutantes con la región del péptido conector de la penicilino amidohidrolasa, se encontró que uno de estos mutantes presenta gran similitud en secuencia y organización. En la figura V.5 se muestra una comparación entre ambas secuencias.

1 MKLWFSTLKLKRAAVLLFSCVALAGSPNNQTNAS
 2 LALTAGKNRETIVAQFAQGGANGLAGYPTTSMWV

Figura V.5. Similitud entre las regiones amino terminal de la penicilino amidohidrolasa (1) y la penicilinasas de B.licheniformis (2). Los residuos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias se presentan encerrados entre líneas. Las flechas indican los sitios de corte observados in vivo.

Como es posible observar entre ambas secuencias hay similitud a nivel de aminoácidos y distribución de aminoácidos cargados, además de que en ambos casos el corte proteolítico se efectúa antes de un residuo de serina.

De lo anterior se deduce que probablemente la misma enzima que procesa a la proteína mutante penP527P28 (49), sea la que produce el corte proteolítico que genera la subunidad B.

d) ¿Porqué la necesidad de un procesamiento complejo ?

Un hecho que llama la atención inmediatamente cuando se estudia la penicilino amidohidrolasa es la complejidad del sistema de procesamiento que permite la obtención de la enzima activa y surge la pregunta Para qué se ha seleccionado ese sistema de producción ?. Quizás la respuesta más probable sea la misma que se supone para la producción de insulina en eucariontes, ya que también en ese caso las dos subunidades de insulina se producen a partir de un precursor común y entre ambas subunidades se halla un péptido conector, cuyo papel es el de permitir que ambas subunidades se conformen adecuadamente y se obtenga insulina

funcional. En este sentido, es importante resaltar que cuando las dos subunidades de la penicilino amidohidrolasa se separan físicamente por técnicas cromatograficas, es muy difícil reasociarlas y regenerar la actividad enzimática nuevamente (12).

VI. Termoregulación

a) Introducción

b) Resultados y discusión

a) Introducción

Los estudios sobre la producción de las proteínas de membrana externa llamadas porinas, han demostrado que existen varios tipos de regulación que modulan los niveles de éstas (30). Un tipo de regulación que ha recibido poco interés es el de la termoregulación (23), nombre con el que se conoce al efecto que tiene la temperatura sobre los niveles y actividades de varias proteínas. Es importante mencionar que este efecto no se debe al sistema global de regulación conocido como "Heat shock", ni se debe tampoco a inactivación de las proteínas, sino que pareciera más bien un nuevo sistema global de regulación (23).

Lundrigan y Earhart (23) han demostrado que diversos genes que codifican para proteínas de membrana externa, experimentan termoregulación. El nivel al cual se ejerce la termoregulación se desconoce, pero es posible pensar que puede actuar a nivel de la transcripción, es decir permitir o no la formación del RNA mensajero. Otro nivel de regulación podría ser el nivel postranscripcional. Por ejemplo: a 37° C una proteasa se activa y degrada un cierto grupo de proteínas, pero a menor temperatura dicha proteasa no es lo suficientemente activa como para causar un decremento substancial en la cantidad y/o actividad de dichas proteínas. Aquí, es importante mencionar que este tipo de termoregulación ha sido ya reportado en *E.coli* y la proteasa responsable se sabe que está codificada por el gene ompT (30). Por otro lado es posible pensar en otros mecanismos postranscripcionales, temperatura dependientes, que alteraren los niveles finales de la actividad de una proteína. Algunos de ellos podrían ser:

- 1) Alteración en la vida media del RNA mensajero.
- 2) Cambios en la eficiencia de traducción de un determinado RNA.
- 3) Alteraciones en los niveles de secreción etc.

La penicilino amidohidrolasa es una proteína cuyos niveles finales pueden ser alterados drásticamente por la temperatura. Como se ha mencionado (capítulo II) solo es posible detectar esta actividad enzimática en células crecidas a 30°C (9,39) y es importante indicar que este efecto no es por inactivación de la enzima, ya que el ensayo de la actividad para penicilino amidohidrolasa se efectúa a 42°C.

Es difícil cuantificar la magnitud del efecto de la termoregulación a partir del análisis de las porinas, ya que en general éstas no poseen actividades enzimáticas medibles. Sin embargo, otro es el caso de la penicilino amidohidrolasa ya que es muy sencillo medir su actividad (10), por lo que el gene pac puede ser de mucha utilidad para conocer algunos aspectos de este sistema de regulación. Con base en estos elementos se decidió estudiar el efecto de la temperatura en los niveles de actividad de la penicilino amidohidrolasa en distintas cepas.

b) Resultados y discusión.

Como se mencionó en el capítulo III, hemos reportado la clonación del gene pac de la cepa ATCC11105 en plásmidos multicopia y la construcción de mutaciones en la región de control de dicho gene. Una de las mutaciones generadas permite la expresión constitutiva del gene pac, ya que se substituyó completamente la región de DNA donde se localiza el promotor de la transcripción de dicho gene y todo el DNA que se halla en la

región que precede al promotor. Aquí es importante mencionar que el concepto de promotor que utilizamos es el de aquella región de DNA que precede al (los) gene(s) estructural(es). Esta región se caracteriza por poseer una secuencia a la cual se une la RNA polimerasa y forman primeramente el complejo cerrado y posteriormente el complejo abierto (37a).

Al utilizar los plásmidos mencionados, se decidió estudiar el efecto de la temperatura en la producción de la penicilino amidohidrolasa. Para ello, se midió la actividad de esta enzima en la cepa ATCC11105 y en dos cepas que se obtuvieron al transformar la cepa de *E. coli* HB101 con los plásmidos pPA2 y pPA10, por las siguientes razones:

- 1) La cepa ATCC11105 es la cepa silvestre que se utiliza en la industria para la producción de la penicilino amidohidrolasa.
- 2) El plásmido pPA2 tiene clonado el gene pac completo con sus regiones de control intactas (43).
- 3) El plásmido pPA10 lleva el gene pac, pero el promotor nativo del gene ha sido deletado y el gene se expresa a partir de un promotor del vehículo molecular donde se encuentra clonado (37).

Con este experimento se esperaba contestar las siguientes preguntas:

- i) ¿Cual es la magnitud del efecto de termoregulación en el gene pac ?.
- ii) ¿Es posible observar termoregulación en genes que se localicen en plásmidos multicopia ?.

iii) En caso de que el efecto termoregulador se presente en plásmidos multicopia, este efecto es promotor dependiente ?.

Los datos obtenidos al realizar las mediciones mencionadas, se presentan en la tabla VI.1.

Actividad enzimática relativa

Temperatura de crecimiento

Cepa	30°C	37°C
HB101	0	0
ATCC11105	100	<3
HB101 (pPA2)	100	5
HB101 (pPA10)	100	7

TABLA VI.I. Actividad relativa de penicilino amidohidrolasa en cepas de *E. coli*, que llevan plásmidos pPA2 o pPA10 (37,43).

Como se puede observar, la actividad enzimática disminuye en más del 90% cuando las células son crecidas a 37°C. Además, este efecto no sólo se observó en la cepa ATCC11105, sino que también fue posible observarlo en la cepa HB101

portadora del gene pac en plásmidos multicopia aún cuando la expresión del gene pac no proviene de las regiones de control nativas del gene como es el caso del plásmido pPA10.

Los resultados anteriores demuestran que el efecto termoregulador puede alterar drásticamente los niveles de una enzima, aún cuando su gene estructural se encuentre en multicopia. Por otra parte, el hecho de que aún en la cepa que lleva el plásmido pPA10 se pueda observar termoregulación, sugiere fuertemente que el efecto no se lleva a cabo a nivel transcripcional, ya que casi todo el DNA original localizado en la region 5' del gene estructural ha sido deletado. Sin embargo aún quedan 54 pares de bases del gene original que anteceden al triplete ATG que se encuentra al principio del gene estructural (37). Esta región podría ser la responsable de la termoregulacion a nivel transcripcional.

Por otro lado, otra pregunta obvia es ¿cuál es el sistema genético encargado de la termoregulación?. Esta pregunta resulta interesante ya que como se puede observar en la tabla VI.I, la termoregulación no es un fenómeno exclusivo de la cepa ATCC11105, ya que se observó también en la cepa HB101. En este sentido se ha identificado un locus genético que interviene en la termoregulación de varias de las porinas. A este locus se le ha denominado envY y se sabe que su delección ocasiona una ausencia de termoregulación de la mayor parte de las porinas, excepto el producto del gene ompT, el cual en una cepa envY se sigue termoregulando normalmente (23). Este último dato sugiere que debe existir al menos otro locus involucrado en la termoregulación de ompT.

Con el propósito de conocer que sistema es el que termoregula al gene pac, se decidió transformar los plásmidos pPA2 y pPA10 en las cepas RW193 y UT5600, las cuales son isogénicas excepto para el gene envY, ya que la cepa UT5600 es envY. A las cepas resultantes se les midió la actividad de penicilino amidohidrolasa. Los valores obtenidos se presentan en la tabla VI.II.

Actividad enzimática relativa

Temperatura de crecimiento

Cepa	30°C	37°C
RW193	0	0
UT5600	0	0
RW193 + pPA2	100	5
UT5600 + pPA2	100	5
RW193 + pPA10	100	5
UT5600 + pPA10	100	8

TABLA VI.II. Actividad relativa de penicilino amidohidrolasa en cepas de E.coli, que llevan plásmidos pPA2 o pPA10 .

Como se puede observar, la termoregulación del gene pac no se ve afectada en ninguna de las cepas analizadas, lo cual indica que el gene envY no juega un papel predominante en la termoregulación del gene pac.

Del análisis de los datos presentados surgen diversas preguntas:

- 1) ¿Existen más genes que se termoregulen en la cepa UT5600 ?.
- 2) El proceso de termoregulación ¿es común en distintas cepas de E.coli y otras bacterias ?.
- 3) ¿Cual es el papel fisiológico de la termoregulación ?.

Una manera sencilla de contestar la primera pregunta, es analizar el patrón de proteínas totales por medio de geles de poliacrilamida- SDS, de las cepas RW193 y UT5600 crecidas a 30 y 37°C.

En la figura VI.1 se presenta el resultado de dicho análisis. Como se puede observar la cepa UT5600 a pesar de la mutación envY aún presenta termoregulación para varias proteínas. El método anterior también se aplicó para estudiar si en otras cepas bacteriana existía termoregulación. Las cepas que se analizaron fueron: E.coli ATCC9637, Salmonella thypymurium, Salmonella gallinarum y un aislado clínico de E.coli. El patrón de proteínas totales de dichas cepas crecidas a 30 o 37°C se presenta en la figura VI.2. Como se puede observar, todas las cepas analizadas presentaron cambios en el patrón de proteínas totales, por lo que puede decirse que el fenómeno de termoregulación no es exclusivo de algunas cepas de E.coli.

Figura VI .1. Patrón de proteínas totales de *E.coli* K-12. cepas RW193 (carriles 1 y 2) y cepa UT5600 (carriles 3 y 4). Las cepas fueron crecidas a 30° C (carriles 1 y 3) o a 37° C (carriles 2 y 4).

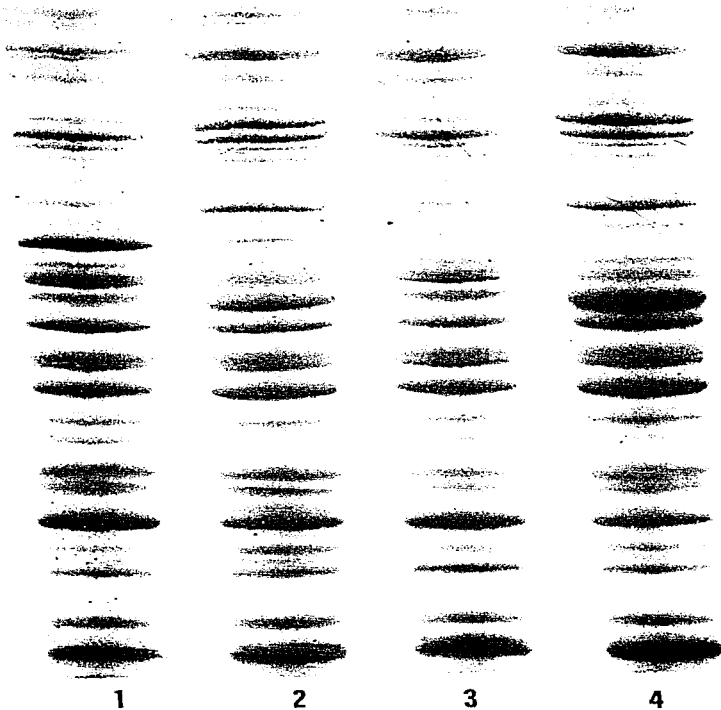
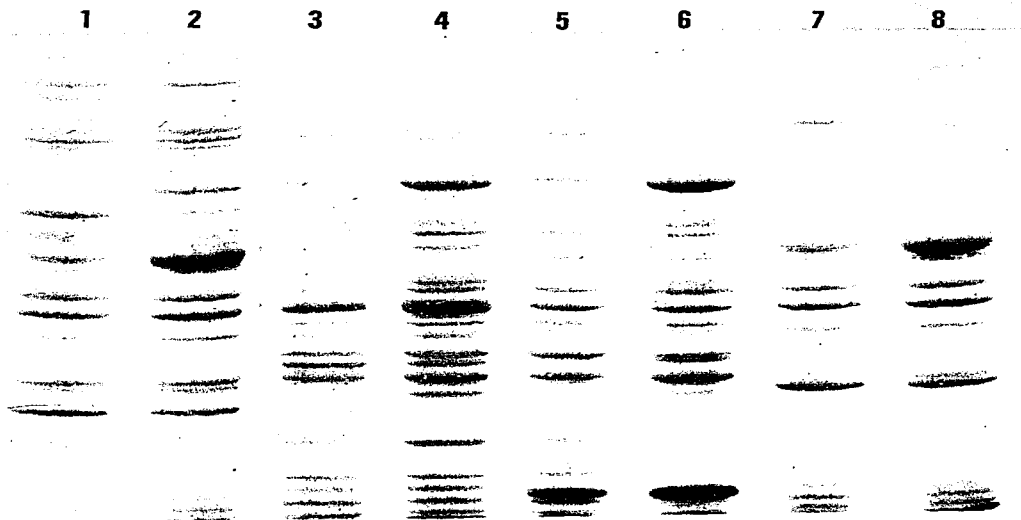


Figura VI .2. Patrón de proteínas totales de distintas cepas bacterianas crecidas a 30 o 37°C. 1 y 2, *E.coli* ATCC11105; 3 y 4. *Salmonella thypymurium*; 5 y 6, *Salmonella gallinarum*; 7 y 8, un aislado clínico de *E.coli*. Los 1,3,5,7 y 2,4,6 corresponden a crecimiento a 30°C y 37°C respectivamente.



Por lo que respecta al posible papel fisiológico de la termoregulación, se ha sugerido que este tipo de regulación es un mecanismo que le permite a la célula conocer si su estado es parasítico o de vida libre (30). Algunas bacterias pueden tener distintos habitats, por ejemplo: E.coli puede encontrarse en el suelo, sedimentos, agua y dentro del intestino humano. El medio ambiente del intestino se le considera el habitat primario y se caracteriza por su abundancia de alimento y una temperatura constante de 37 ° C. Por el contrario, los demás habitats son extremadamente variables en todos sentidos y demandan una adaptación constante de las células.

Se piensa que la variabilidad en las proteínas de membrana externa ocasionada por la termoregulación, es un respuesta adaptativa a la diferencia de osmolaridad, concentración de nutrientes y presencia de sustancias inhibitoras del crecimiento, que la célula bacteriana enfrenta en diferentes medios ambientes. En este sentido los estudios realizados con las porinas OmpF y OmpC coinciden con la hipótesis anterior , ya que a bajas temperaturas y baja osmolaridad, la porina OmpF es la más abundante. Esta porina se caracteriza por permitir el paso de sustancias de mayor peso molecular que la porina OmpC. Las condiciones bajo las cuales OmpF es más abundante son aquellas que E.coli enfrenta cuando ha abandonado el organismo humano, es decir que se encuentra en medios ambientes variables y generalmente pobres en alimento, por lo que una porina como OmpF es una ventaja (30).

VII. Regulación por ácido fenilacético; Posible papel fisiológico de la penicilino amidohidrolasa.

Se sabe que la expresión del gen estructural de la enzima penicilino amidohidrolasa es inducida por la presencia de ácido fenilacético en el medio (39). En este sentido hemos reportado que ésta regulación parece ser a nivel transcripcional (43).

También se sabe que el gen pac se regula también por represión catabólica (26). Los datos de secuencia nucleotídica de la región reguladora de este gen, sugieren que éste presenta la organización típica de genes que intervienen en la asimilación de fuentes de carbono (43).

Todo lo anterior nos permite suponer que quizá el gen estructural de la enzima penicilino amidohidrolasa (pac) participe de alguna manera en la utilización del ácido fenilacético como fuente de carbono.

A fin de proponer un probable papel de la penicilino amidohidrolasa en la vía de utilización del ácido fenilacético, se procedió primeramente a estudiar lo que se sabe sobre dicha vía .

Las Pseudomonas son capaces de metabolizar un amplio intervalo de compuestos aromáticos. De hecho, la mayor parte de lo que se sabe hasta el momento acerca de la degradación biológica de compuestos aromáticos, proviene del estudio de estos microorganismos (8). Aunque E.coli ha sido utilizada en numerosos estudios bioquímicos, su habilidad para crecer en compuestos aromáticos no ha sido bien estudiada. El hecho de que E.coli

pueda catabolizar compuestos aromáticos no debe sorprender ya que se ha demostrado que este tipo de compuestos provenientes de la degradación de tirosina, se encuentran en las heces fecales. Los trabajos de Burlingame y Chapman (8) han demostrado que E.coli es capaz de metabolizar ciertos compuestos aromáticos y utilizarlos como fuente de carbono. En la tabla VII.I se presentan algunos de los resultados de dichos autores.

Cepa de <u>E.coli</u>	No.de casos	Acidos aromáticos utilizados para crecer					
		FA	3-HFA	4-HFA	3-FP	3-3-HFP	3-HC
B	1	-	+	+	+	+	+
C	1	-	+	+	+	+	+
W	2	+	+	+	+	+	+
K-12	2	+	-	-	+	+	+
NCTC 5928	1	+	-	-	+	+	+
Aislados clínicos	19	-	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	+	+
	8	-	-	-	+	+	+
	1	-	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-
	3	+	-	-	+	+	+
	27	+	+	+	+	+	+

Tabla VII.1. Crecimiento de diferentes cepas de E.coli en medios de cultivo que contienen distintas fuentes de carbono. + se observó crecimiento celular. - no se observó crecimiento celular. FA= Acido fenilacético. 3-HFA= 3-hidroxifenilacético. 4-HFA= 4-hidroxifenilacético. 3FP= 3-fenilpropiónico. 3-3 HFP= 3,3-hidroxifenilpropiónico. 3-HC= ácido 3-hidroxicinámico.

Como se puede observar en la tabla, diversas cepas de E.coli son capaces de utilizar compuestos aromáticos para crecer. También se ve que existe una gran especificidad para dicha utilización, pues algunas cepas son capaces de crecer en ácido fenilacético pero no pueden utilizar 3-hidroxifenilacético.

Las vías de utilización de fenil-propionico, 3-hidroxi-fenilacético y 4-hidroxifenilacético en E.coli, han sido descritas en su totalidad y son prácticamente iguales a las descritas para Pseudomonas, siendo los productos finales de estas vías son ácidos succínico y pirúvico. Se ha determinado que para realizar la asimilación del 3 y 4- hidroxifenilacético se necesitan al menos 8 enzimas, que incluyen una permeasa, lo cual hace a esta vía una de las más largas descritas en E.coli (8).

Por lo que respecta a la vía del fenilacético, parece ser distinta a la de los compuestos mencionados, ya que en cepas de Pseudomonas y E.coli capaces de utilizar ácido fenilacético como fuente de carbono, no ha sido posible detectar la actividad de dioxigenasa que ocasiona la ruptura del anillo aromático y que es típica de las vías degradativas del 3 y 4 hidroxifenil acético (11).

Un hecho que es importante resaltar es el de que la vía de utilización de fenilacético ha sido mapeada en el cromosoma de E.coli K-12 y se ha localizado alrededor del minuto 30.4. Esta región del cromosoma se piensa que no posee genes esenciales para el crecimiento en laboratorio ya que es posible deletar 60 Kb. de esta región sin que esto genere un fenotipo distinto al silvestre. Se ha sugerido que esta región del cromosoma de E.coli al ser prácticamente silenciosa desde el punto de vista de identificación de mutantes, puede contener genes poco usuales, es decir genes involucrados en funciones que no se han estudiado en el laboratorio (11).

De lo poco que se conoce hasta el momento de la vía de utilización del ácido fenilacético, se sabe que el mecanismo es inducible y se han identificado al menos dos locus que intervienen en esta vía, donde uno de ellos tiene que ver con el transporte del ácido fenilacético (11). Por otra parte se sabe que todo el fenilacético que toman las células es modificado a 2-hidroxifenilacético, pero las mismas células son incapaces de utilizar al 2-hidroxifenilacético si se coloca a éste en el medio. Con base en estos datos, se piensa que las células toman el ácido fenilacético del medio e intracelularmente lo modifican a 2-hidroxifenilacético, pero son incapaces de tomar a este compuesto directamente del medio (11).

En este punto es importante recordar algunos datos que sobre la enzima penicilino amidohidrolasa se conocen; 1) Es una enzima que se localiza en el periplasma, y 2) La enzima parece reconocer al grupo fenilo sin importar demasiado las cadenas laterales que se hallen unidas a dicho grupo (capítulo II).

Dada la actividad enzimática de la penicilino amidohidrolasa, es posible pensar que ésta le permite a la célula degradar una amplia gama de derivados del ácido fenilacético, primeramente en ácido fenilacético y el radical correspondiente. Posteriormente el fenilacético así producido puede ser utilizado como fuente de carbono. La hipótesis anterior se ve apoyada por el hecho de que se sabe que la actividad medible de la enzima penicilino amidohidrolasa, se haya regulada por la temperatura (ver capítulo VI). Este tipo de regulación hace que la actividad de penicilino amidohidrolasa sólo se detecte a 30°C y no a temperaturas mayores. Es decir en las temperaturas que *E. coli*

experimenta cuando no se localiza dentro del organismo humano. La manera más común en que E.coli abandona al organismo humano es a través de las heces fecales y es ahí donde precisamente se localizan gran cantidad de compuestos fenólicos (11). Debido a lo anterior, no es difícil pensar que la presencia de una actividad enzimática como la de la penicilino amidohidrolasa es una ventaja, pues le puede permitir a la célula, una vez que ha abandonado al organismo humano, utilizar como fuente de carbono derivados fenólicos presentes en las heces.

Lo antes expuesto sugiere una serie de preguntas:

-¿En donde se localiza el gen pac en la cepa de E.coli ATCC11105. En plásmidos o en el cromosoma ?.

-¿Tiene algún efecto la delección del gen pac del genóma de E.coli ATCC11105 en la capacidad de esta cepa para utilizar ácido fenilacético como fuente de carbono?

- Otras cepas capaces de utilizar ácido fenilacético como fuente de carbono, ¿poseen actividad de penicilino amidohidrolasa?.

El contestar las anteriores preguntas es un algo necesario para entender el papel que la penicilino amidohidrolasa tiene dentro de la economía celular. En este punto es importante recordar que se ha sugerido la actividad de esta enzima sobre penicilina G es un propiedad incidental de una proteína que en la célula tiene una función totalmente distinta (17).

**VIII. Conclusiones generales y
perspectivas.**

Este estudio ha permitido tener una imagen más clara y completa de la organización y regulación del gen estructural de la enzima penicilino amidohidrolasa. Asimismo, ha permitido entender mejor la manera en que es procesado el precursor proteico de esta enzima, además de las similitudes que hay entre esta enzima con proteínas que unen penicilina y con serina proteasas.

Los resultados han sido varios. Por un lado se han publicado dos artículos en revistas internacionales como productos directos de esta tesis doctoral. Hay también un manuscrito en preparación sobre las similitudes a nivel de secuencia de aminoácidos entre la penicilino amidohidrolasa y otras proteínas. Existen una gran cantidad de datos experimentales sobre la termoregulación, los cuales al ser complementados con otros datos experimentales deberán de permitir tener una imagen más clara de este mecanismo de regulación.

Además de lo anterior, el presente trabajo permite sugerir ciertos caminos para futuras investigaciones con el gen pac y su producto proteico. A continuación, se plantearan algunos problemas y se propondrán varios enfoques para resolverlos:

- 1- Identificación de los residuos principales que conforman el sitio activo de la enzima penicilino amidohidrolasa.

Con base en las similitudes de la penicilino amidohidrolasa con serina proteasas y β -lactamasas, se han propuesto algunos residuos que pudieran participar directamente en la estructuración del sitio activo (ver capítulo IV). Un enfoque para corroborar lo anterior sería utilizar mutagénesis dirigida para cambiar estos aminoácidos por otros similares o por algunos totalmente distintos. Con lo anterior se esperaría que la substitución de un aminoácido por otro similar probablemente aumentara o disminuyera la actividad enzimática. El cambio de un aminoácido por otro totalmente distinto, debería en principio eliminar la actividad enzimática. Al enfoque anterior se le deben aunar enfoques puramente bioquímicos como aquellos que se han utilizado para identificar sitios activos en serina proteasas.

2- Identificación de los genes involucrados en el procesamiento del precursor proteico de la penicilino amidohidrolasa.

Con el fin de identificar el o los genes que intervienen en la maduración del precursor proteico de la enzima penicilino amidohidrolasa, sería recomendable la utilización de cepas mutantes que no produzcan las enzimas SPAsa I y SPAsa II (ver capítulo V) y por medio de anticuerpos, analizar si en las cepas mutantes hay algún cambio en el procesamiento del precursor. Dependiendo de los resultados que se obtengan, quizás sería necesario complementar los datos con experimentos in vitro, por

medio de las enzimas SPAsa I y II purificadas y el precursor radioactivo producido por un sistema acoplado de transcripción-traducción.

Si con el enfoque anterior no se logra identificar el o los genes que intervienen en el procesamiento, se podría intentar una mutagénesis química generalizada, para lo cual se recomienda utilizar una cepa que lleve al gen pac en plásmidos multicopia, esto con el fin de evitar que al realizar la mutagenesis se obtengan cepas que no produzcan la enzima por mutaciones en el propio gen pac. Después de la mutagenesis, se seleccionarían aquellas colonias que ya no produzcan a la enzima, y por medio de anticuerpos sería posible identificar a las que acumularan el precursor.

3- Probable papel del gen pac en el metabolismo celular.

Al poder contar con el gen pac clonado en plásmidos multicopia, es posible obtener una delección de dicho gen en la cepa ATCC11105. Después de obtener esto, se podría investigar el fenotipo generado, especialmente en cuanto a la asimilación de ácido fenilacético.

En este mismo sentido, otra pregunta interesante es la de dónde se localiza el gen pac, es decir si en la cepa ATCC11105, el gen se encuentra en plásmidos o en el cromosoma. Una manera sencilla de contestar dicha pregunta es por medio de la técnica de Southern. Si se obtiene que el gen se localiza en el cromosoma, sería recomendable mapearlo. Por otro lado si los resultados indican que el gen pac se encuentra en un elemento

extracromosomal como un plásmido, sería interesante estudiar más profundamente dicho plásmido para conocer que otros genes se encuentran en él.

4- Sobreproducción de la enzima.

Con base en la literatura, es evidente que E.coli es un microorganismo que no puede secretar grandes cantidades de penicilino amidohidrolasa (33,42). Si se deseara sobreproducir la enzima en grandes cantidades, sería recomendable utilizar otros sistemas de expresión, tales como Bacillus o Streptomyces, aunque en éstos sistemas no se sabe si el precursor de la enzima se procesaría adecuadamente. Ahora bien, si sólo se desea incrementar un poco la producción de la enzima, las estrategias de cambio de regiones de regulación y selección de mutantes en E.coli es lo más recomendable.

Por último quisiera hacer hincapié en que si bien el gen pac presenta cierto número de particularidades, también presenta una gran similitud con otros genes cuyos productos intervienen en la asimilación de fuentes de carbono, sobre los cuales hay gran cantidad de información, tales como los operones de Lac o Gal. Debido a esto considero, que por el momento, las preguntas que se deben tratar de responder son aquellas que sean novedosas, es decir preguntas relevantes para el entendimiento de aspectos propios del gen pac como sería el procesamiento del precursor,

la termoregulación, regulación por ácido fenilacético y su papel (si tiene alguno) dentro de la vía de asimilación de este ácido.

X. Bibliografia

- 1) Ambler R.P. (1980) The structure of B-lactamases. Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. 289: 321-331.
- 2) Balasingham K., Warburton D., Dunhill P. y Lilly D. (1972) The isolation and kinetics of penicillin amidase from E.coli. Biochim. Biophys. Acta 276: 250-256.
- 3) Barbero J.L., Buesa J.M., Gonzalez de Buitrago G., Mendez E. Perez-Aranda A. y Garcia J.L. (1986) Complete nucleotide sequence of the penicillin acylase gene from Kluyvera citrophila. Gene 49: 69-80.
- 4) Bock A., Wirth G., Schmid G., Lang G. y Buckel P. (1983) The penicillin acylase from Escherichia coli ATCC 11105 consists of two dissimilar subunits. FEMS Microbiol. Lett. 20 135-139.
- 5) Bock A., Wirth R., Schmid G., Schumacher G., Lang G. y Buckel P. (1983) The two subunits of penicillin acylase are processed from a common precursor. FEMS Microbiol. Lett. 20 141-144.
- 6) Bruning., Bruns W., Collins J., Hann W., Hoppe J. y Mayer H. DNA-Sequenzen und DNA-Strukturen und die verwendendes Verfahren zur Herstellung von Penicillin-acylase. Eur. Patent Office No.01107828 (1984) 755-770.
- 7) Bruns W., Hoppe J., Tsai H., Brunning H., Maywald F., Collins J. y Mayer H. (1985). Structure of the penicillin acylase gene from Escherichia coli: a periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing. J. Mol. Appl. Genetics. 3: 36-44.
- 8) Burlingame, R. y Chapman, P.J. (1983) Catabolism of phenylpropionic acid and its 3-hydroxy derivatives by E.coli.

J.Bact. 155: 113-121.

- 9) Casas L.T. (1981) Produccion del acido 6-aminopenicilánico por hidrólisis enzimática de la penicilina G. Tesis de Maestria. UACPyP del CCH. Universidad Nal. Aut. de Mexico. 196 pags.
- 10) Cole M., Savidge T. y Vanderhaeghe H. (1975) Penicillin acylase (assay). In: Hash J.H. (ed) Met. enzymol. 47: 698-705. Academic press.
- 11) Cooper, R.A., Jones, D.C. y Parrot, S. (1985) Isolation and mapping of Escherichia coli k12 mutants defective in phenylacetate degradation. J. Gen. Microbiol. 131: 2753-2757.
- 12) Daumy G., Danley D. y McColl A. (1985) Role of protein subunits in Proteus rettgeri penicillin G acylase. J. Bact. 163: 1279-1281.
- 13) Daumy, G.O., Danley D., McColl A., Apostolakos D. y Vinick F.J. (1985) Experimental evolution of penicillin acylases from E.coli and Proteus rettgeri. J. Bacteriol. 163: 925-932.
- 14) Friedman D.I. y Imperiale M.J. (1987) RNA 3' end formation in the control of gene expression. Ann. Rev. Genet. 21: 453-488.
- 15) Gang D.M. y Shaikh K. (1976) Regulation of penicillin acylase in E.coli by cyclic AMP. Biochem. Biophys. Acta. 425: 110-114.
- 16) Garcia J.L., y Buesa J.M. (1986) An improved method to clone penicillin acylase genes: Cloning and expression in E. coli of penicillin G acylase from Kluyvera citrophila. Biotechnol. Jour. 3: 187-195.
- 17) Hamilton-Miller J.M.T. (1966) Penicillin acylases. Bacteriol. Rev. 30: 761-771.
- 18) Joris B., Ghuyssen J.M. Dive G., Renard A., Dideberg O.,

- Charlier P.y Knox J.R. (1988) The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the streptomyces R61 DD-peptidase family. *Biochem. J.* 250: 313-324.
- 19) Klivanov A. (1989) Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.* 14: 141-144.
- 20) Konecny J. (1981) Penicillin acylases as amidoñhidrolases and acyl transfer catalysts. *Biotechnol. Letters* 3: 112-117.
- 21) Kutzbach C. y Rauenbusch E. (1974) Preparation and General properties of Crystalline penicillin acylase from E.coli ATCC 11105. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354: 45-53.
- 22) Lowe D.A., Romancik G. y Elander R.P. (1981) Penicillin acylases: a Review of existing enzymes and the isolation of a new bacterial penicillin V acylase . *Dev. Ind. Microbiol.* 22: 163-180.
- 23) Lundrigan M.D. y Earhart C.F. (1984) Gene envY of Escherichia coli K-12 affects Thermoregulation of major porin Expression. *J. Bact.* 157: 262-268.
- 24) Mahajan P.B. (1984) Penicillin Acylases. An update. *Appl. Biochem. Biotech.* 9: 537-554.
- 25) Mahajan P.B. y Borkar P.S. (1984) Novel approaches to the purification of penicillin acylase. *Appl. Biochem. Biotech.* 9: 421-437.
- 26) Margolin A., Svedas V. y Berezin I. (1980) Substrate specificity of penicillin amidase from E.coli *Biochem. Biophys. acta* 6161: 283-289.
- 27) Matsuda A., Toma K. y Komatsu K. (1987) Nucleotide sequence of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a Pseudomonas strain. *J. Bact.* 169: 5821-5826.

- 28) Mayer, H., Collins, J. y Wagner F. (1979) Cloning of the penicillin acylase gene of E.coli ATCC 11105 on multicopy plasmids. en: Timmis K.N. y Puhler A.(eds) : Plasmids of Medical, Enviromental and Commercial Importance. Elsevier, Amsterdam pp.459-470.
- 29) Morita H e Iwata T. (1984) Penicillin acylase activity in mutants of Escherichia coli highly sensitive to penicillin G. J. Ferment. Technol. 62: 217-220.
- 30) Nakae T. (1986) Outer membrane permeability of bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 13: 1-62.
- 31) Nakahama K., Yoshimura K., Marumoto R., Kikuchi M., Lee S.I., Hase, T. y Matsubara H. (1986) Cloning and sequencing of Serratia protease gene. Nucleic Acids Res. 14: 5843-5855.
- 32) Neurath H. (1984) Evolution of proteolytic enzymes. Science 224: 350-357.
- 33) Oh.S.J., Kim. Y.C., Park Y.W., Min S.Y. Kim I.S. y Kang H.S. (1987) Complete nucleotide sequence of the penicillin G acylase gene and the flanking regions, and its expression in Escherichia coli. Gene 56: 87-97.
- 34) Oliver D. (1985) Protein secretion in Escherichia coli. Ann. Rev. Microbiol.39: 615-648.
- 37) Oliver G., Valle F., Rosetti F., Gomez-Pedrozo M., Santamaria P., Gosset G. y Bolivar F.(1985) A common precursor for the two subnits of the penicillin acylase from Escherichia coli ATCC11105. Gene 40: 9-14.
- 37a) Reznikoff W.S. y McClure W.R.(1986) E.coli promoters. en : Reznikoff W.S. y Gold L. (eds) Maximizing gene expression. Butterworths. Boston pp. 1-33.

- 38) Savidge T.A. (1984) Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins. en : Vandame E. J.(ed) Biotechnology of industrial antibiotics. Marcel Deckker New York. pp. 172-224.
- 39) Savidge T.A. y Cole M. Penicillin acylase (Bacterial) en: J.H. Hash (ed) Met.enzymol. 43 : 705-711. Academic press.
- 40) Schomer U., Segner A. y Wagner F. (1984) Penicillin acylase from hybrid strain E.coli 5K(pHM12): Enzyme formation and hydrolysis of B-lactam antibiotic with whole cells. Appl. Env. Microbiol. 47: 307-312.
- 41) Shimizu M., Okachi R., Kimura K. y Nara T. (1975) Purification and properties of penicillin acylase from Kluyvera citrophila. Agr. Biol. Chem. 8: 1655-1661.
- 42) Schumacher, D., Sizmann, D., Haug, H., Buckel, P.y Bock, A. (1986) Penicillin acylase from E.coli: unique gene-protein relation. Nucleic Acids Res. 14: 5713-5727.
- 43) Valle F., Gosset G., Tenorio B., Oliver G. y Bolivar F. (1986) Characterization of the regulatory region of the Escherichia coli penicillin acylase structural gene. Gene 50: 119-122.
- 44) Vandame E.J. (1981) Penicillin acylases and B-lactamases. in: Rose A.H. (ed) Economic Microbiology, vol 5. Academic press New York pp. 467-522.
- 45) Vasanta N., Thompson L.D., Rhodes, C., Banner, C., Nagle, J. y Filpula, D. (1984) Genes for alkaline protease and neutral protease from Bacillus amyloliquefaciens. J. Bact. 159: 811-819.
- 46) Veronese F., Boccu E., Schiavon O., Greco G. y Giafreda L.

(1984). Immobilization of purified penicillin acylase in a polarized ultrafiltration membrane reactor. Ann. N.Y. Acad. Sci. 434: 127-130.

- 47) Von Heijne G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucleic Acid Res. 14: 4683-4691.
- 48) Williams J. y Zuel T. (1985) Penicillin acylase substrate specificity modification by *in vitro* mutagenesis. Jour. Cell. Biochem. sup. 9B: 99.
- 49) Wu H.C. y Hayashi, S. (1986) Lipoprotein secretion in bacteria. en : Microbiology-1986. Loretta Leive (ed) ASM press. Washington D.C. pags. 260-265.

IX. ARTICULOS PUBLICADOS.

GENE 1431

A common precursor for the two subunits of the penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105

(Recombinant DNA; protein processing; leader peptide; DNA sequence; pBR339 vector)

Guillermo Oliver, Fernando Valle, Francisco Rosetti, Marisa Gómez-Pedrozo, Patricia Santamaría, Guillermo Gosset and Francisco Bolívar*

Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos (México) Tel. (5273) 172399

(Received May 17th, 1985)

(Revision received June 10th, 1985)

(Accepted June 17th, 1985)

SUMMARY

Penicillin acylase (PA) is an industrial enzyme that is used to convert penicillin G into a precursor for semisynthetic penicillins. We have cloned a segment of DNA that codes for the two subunits required for PA activity. We also report the nucleotide sequence of a DNA fragment that codes for (i) the small subunit, (ii) the N-terminal region of the large subunit and (iii) a putative connecting peptide. These results confirm the existence of a common precursor for both peptides.

INTRODUCTION

The enzyme PA catalyzes the hydrolysis of benzylpenicillin to give phenylacetic acid and 6-APA, the latter being a key intermediate in the production of semisynthetic penicillins (Lowe et al., 1981). The active form of the enzyme consists of two different

subunits of 20.5 and 69 kDal (Bock et al., 1983a). These peptides are apparently produced from a precursor peptide, after proteolytic cleavage (Bock et al., 1983b). For many eukaryotic enzymes and hormones, one or more internal proteolytic cleavages are required for full activity (Steiner, 1976). To our knowledge, however, this mechanism has only been described in prokaryotes in the case of PA from *Escherichia coli* ATCC11105 (Bock et al., 1983a,b).

To understand better this novel processing mechanism at the molecular level, we have cloned the *pac* gene and determined the nt sequence of a region that codes for the 20.5-kDal subunit, as well as the first 78 N-terminal aa of the 69-kDal subunit. The possible existence of a connecting peptide between both subunits and the processing steps involved in the formation of the enzyme, are discussed.

* To whom correspondence and reprint requests should be addressed, at Apartado Postal 70479, México 04510 D.F. (México).

Abbreviations: aa, amino acid(s); 6-APA, 6-amino penicillanic acid; bp, base pair(s); DMBA, *p*-dimethylaminobenzaldehyde; kb, 1000 bp; LB, Luria broth; nt, nucleotide(s); ORF, open reading frame; PA, penicillin acylase; *pac*, *E. coli* gene coding for PA; SD, Shine-Dalgarno.

MATERIALS AND METHODS

(a) Bacterial strains, plasmids and phages

E. coli ATCC11105 and *Serratia marcescens* strains were obtained from the American Type Culture Collection, U.S.A. *E. coli* HB101 was described by Boyer and Roulland-Dussoix (1969). Bacteriophage M13mp8 and M13mp9 and their permissive host JM101 (Messing et al., 1981) were obtained from P. Seeberg. The cloning vehicle pBR339 is a deletion derivative of pBR329 (Covarrubias and Bolivar, 1982), that lacks the β -lactamase gene (F.B., unpublished results).

(b) 6-APA assay

(1) Qualitative bioassay

E. coli colonies carrying the *pac* gene grown in LB agar plates, were inoculated with 5 ml of soft agar overlay containing 1 mg/ml penicillin G and 0.5 ml of an overnight culture of the 6-APA-sensitive, penicillin G-resistant strain *S. marcescens* ATCC27117. Expression of *pac* gene resulted in growth inhibition of the 6-APA-sensitive strain (Schomer et al., 1984).

(2) Quantitative assay

Initial rates of 6-APA formation were determined based on the condensation of this molecule with DMBA as described by Balasingham et al. (1972).

(c) DNA manipulations and sequencing

Isolation of DNA from *E. coli* ATCC11105 was performed as described by Marmur (1961). Digestion of plasmid and phage DNA with restriction endonucleases was carried out as described by Bolivar and Backman (1979). Ligation of DNA fragments, transformation and transfection of competent cells were carried out as described by Cohen et al. (1972) and Messing et al. (1981).

Procedures described by Heidecker et al. (1980) and Messing et al. (1981) were used to determine the nucleotide sequence of the various restriction fragments cloned in M13 derivatives, using the Sanger dideoxy chain terminator method.

RESULTS AND DISCUSSION

(a) Cloning and mapping the PA structural gene

To clone the *pac* gene, DNA from *E. coli* ATCC11105 was digested with *EcoRI*, ligated to the *EcoRI*-cut cloning vehicle pBR339, and transformed into the *E. coli* HB101. In this manner we isolated the hybrid plasmid pPA2, that carries a 7.5-kb genomic DNA fragment. Mayer et al. (1979) have previously cloned the *pac* gene of *E. coli* ATCC11105 and subsequent subcloning experiments allowed them to localize this gene to a 8-kb *EcoRI* DNA fragment. Cells carrying pPA2 inhibited the growth of *S. marcescens* suggesting the presence of the *pac* structural gene in the cloned DNA fragment. This result was confirmed by measuring the formation of 6-APA in cell cultures using the DMBA method.

To further localize the *pac* gene on the DNA insert, we constructed a more detailed restriction map of plasmid pPA2 (not shown). Based on these data, another plasmid derivative (pPA4), was constructed, which carries a *HindIII* DNA segment from pPA2, of approx. 3 kb, inserted at the *HindIII* site of pBR339. This plasmid also expressed *pac* as demonstrated by the bioassay and DMBA methods. However, since expression could not be induced in pPA4 by phenylacetic acid (Casas, 1981), we presume that the regulatory sequences for the *pac* gene (i.e., the *pac* promoter), were lost in the construction of this plasmid. These results are also in agreement with those reported by Mayer et al. (1977).

Based on a detailed restriction map of pPA4, a series of derivative plasmids were constructed by *EcoRI* linker mutagenesis and deletions of desired restriction fragments (Fig. 1). These experiments enabled us to localize the *pac* gene into a region of approx. 2500 bp, between the *HindIII* and *SmaI* sites (coordinates 3.8 to 1.3 in pPA4, Fig. 1).

(b) Partial nucleotide sequence of the *pac* gene and its analysis

The idea that certain regulatory signals were lost during the construction of pPA4, is consistent with transcription of this gene proceeding from the *HindIII* to the *SmaI* sites (coordinates 3.8 to 1.3; Fig. 1). Using this information, we decided to determine the nt sequence of the *HindIII*-*BglII* DNA

		pRR339															HindIII															SD														
		AGCTCCTGATGTTTGACAGCGTTATGATCGGATAAGCTTCGTTGCTAGTATCAAAITTCGCTAAITATACACCTGGCCAGCGCTACAG																																												
1	ATG	AAA	AAT	AGA	AAT	CGT	ATG	ATC	GTC	AAC	TCT	GTT	ACT	GCT	TCC	CTG	ATG	TAT	TAT	TAT	TGC	AGC	TTA	CCT	GCA	CTG																				
	MET	LYS	ASN	ARG	ASN	ARG	MET	ILE	VAL	ASN	CYS	VAL	THR	ALA	SER	LEU	MET	TYR	TYR	TRP	SER	LEU	PRO	ALA	LEU																					
	GCT	CAG	CAG	TCC	TCA	AGT	GAC	ATA	AAG	ATT	GTT	CCG	GAT	GAA	TAC	GCC	ATC	CCC	CAT	ATT	TAT	GCC	AAT	GAT	ACA																					
	ALA	GLU	GLN	SER	SER	SER	GLU	ILE	LYS	ILE	VAL	ARG	ASP	GLU	TYR	GLY	MET	PRO	HIS	ILE	TYR	ALA	ASN	ASP	THR																					
	TGG	CAC	CTA	TTT	TAT	GCC	TAT	GCC	TAT	GTA	GTA	GCA	GAA	GAT	CCG	CTT	TTT	CAG	ATC	GAA	ATC	GCA	CCT	CGC	AGT																					
	TRP	HIS	LEU	PHE	TYR	GLY	TYR	VAL	ALA	GLN	VAL	LEU	SER	VAL	ARG	LEU	GLN	MET	GLU	MET	ALA	ARG	ALA	ARG	ARG																					
	AGT	CAA	GGG	ACT	GTC	CGG	GAA	GTC	GTT	GCC	AAA	GAT	TTT	GTC	AAA	TTT	GAT	AAA	GAT	ATC	CGT	CGT	AAC	TAC	100																					
	THR	GLN	GLY	THR	VAL	ALA	GLU	VAL	LEU	GLY	LYS	ASP	PHE	VAL	LYS	PHE	ASP	LYS	ASP	ILE	ARG	ARG	ASN	TYR	TRP																					
	CGC	GAT	CGT	ATC	CGC	CGC	CAA	ATT	GCT	GCC	GTT	TCC	CCA	GAC	GAT	ATG	TCC	ATT	CTG	120	GAA	GCC	TAC	GCT	GAT																					
	PRO	ASP	ARG	ILE	ARG	ALA	GLN	ILE	ALA	ALA	LEU	SER	PRO	GLU	ASP	MET	SER	ILE	LEU	GLN	GLY	TYR	ALA	ASP	GLY																					
	ATC	AAT	GCC	TGC	ATT	GAT	AAG	GTA	AAT	ACC	AAT	CCA	GAC	ACC	140	GTC	TA	CCA	AAA	CAG	TTT	AAT	ACA	TTT	GCC																					
	THR	ASN	ALA	TRP	ILE	ASP	LYS	VAL	ASN	THR	ASN	PRO	GLU	THR	LEU	LEU	PRO	LYS	GLN	PHE	ASN	THR	PHE	GLY	PHE																					
	ACT	CCT	AAC	CGC	TGC	CAA	CCC	TTT	GAT	160	GCC	ATC	ATA	TTT	GTC	CGC	ACC	ATC	GCA	AAC	CGC	TRC	TCT	GAT	ACC																					
	THR	PRO	LYS	ARG	TRP	GLU	PRO	PHE	ASP	VAL	ALA	MET	ILE	PHE	VAL	GLY	THR	MET	ALA	ASN	ARG	PHE	SER	ASP	SER																					
	ACT	AGC	GAA	ATT	GAT	AAT	CTG	GCA	CTG	CTA	ACC	GCT	TTA	AAA	GAT	AAA	TAT	GGT	GTA	TCA	CAA	GCC	ATC	GCC	GTA																					
	THR	SER	GLU	ILE	ASP	ASN	LEU	ALA	LEU	LEU	THR	ALA	LEU	LYS	ASP	LYS	TYR	GLY	VAL	SER	GLN	GLY	MET	ALA	VAL																					
	TTT	AAT	CAC	TTG	AAA	TCC	CTG	GTA	AAC	CCA	TCA	CGC	CCA	ACC	ACT	ATT	GCC	GTA	CAA	180	GAC	AGT	AAC	TAC	CCA																					
	TRP	ASN	GLN	LEU	LYS	TRP	LEU	VAL	ASN	PRO	SER	ALA	GLN	PRO	THR	THR	ILE	ALA	VAL	GLN	GLU	SER	ASN	TYR	PRO																					
	AAA	TTT	AAT	CAG	CAA	AAC	TCC	CAA	ACA	GCA	GCT	CTG	TTG	CCA	180	GCC	TAC	GAT	TTA	CCT	GCA	CCA	ATG	CTT	GAC																					
	LYS	PHE	ASN	GLN	GLN	ASN	SER	GLN	THR	ALA	ALA	LEU	LEU	PRO	ARG	TYR	ASP	LEU	PRO	ALA	PRO	MET	LEU	ASP	ARG																					
	CCA	GCA	AAA	GGG	GGC	GAT	GCC	CAA	CTG	200	GCC	TTA	ACA	GGA	GGG	AAG	ACA	CGG	GAA	ACT	ATT	GCT	GCA	CAA	TTT																					
	PRO	ALA	LYS	GLY	ALA	ASP	GLY	LEU	ALA	LEU	LEU	THR	ALA	GLY	LYS	ASN	ARG	GLU	THR	ILE	ALA	ALA	GLN	PHE																						
	CCA	GAG	GCT	GCT	200	ACT	GAT	CTG	GCC	GCC	TAT	CCA	ACC	ACC	ACC	AAT	ATG	TGG	TGG	ATC	GCC	AAA	ACC	AAA	200																					
	ALA	GLN	GLY	GLY	ALA	ASP	GLY	LEU	ALA	GLY	TYR	PRO	THR	THR	SEP	ASN	MET	TRP	VAL	ILE	GLY	LYS	SER	LYS	ALA																					
	CAG	GAT	GCC	AAA	CGA	ATC	ATG	GTA	AAT	GCT	CGC	CAG	TTT	CGC	TGG	TAT	CGC	CGT	CGC	220	TAT	ACT	TAT	GCT	ATT																					
	GLN	ASP	ALA	LYS	ARG	ILE	MET	VAL	ASN	GLY	PRO	GLN	PHE	GLY	TRP	TYR	ALA	PRO	ALA	TYR	THR	TYR	GLY	ILE	GLY																					
	CTG	CAC	GCT	GCT	TAT	GAT	GTC	ACT	GCC	AAT	ACA	GCA	TTT	240	GCC	TAT	GCT	CGC	CTG	GTT	TTT	GCT	GAT	AAT	GCT																					
	LEU	HIS	GLY	ALA	GLY	TYR	ASP	VAL	THR	GLY	ASN	THR	PRO	PHE	ALA	TYR	PRO	GLY	LEU	VAL	PHE	GLY	HIS	ASN	GCT																					
	CTG	ATT	TCC	TCC	GGA	TCA	ACC	GCA	GCT	TTG	GCC	GAT	GAT	GTC	GAT	ATT	TTT	GCT	260	VAL	ILE	SER	TRP	GLY	SER																					
	VAL	ILE	SER	TRP	GLY	SER	THR	ALA	GLY	PHE	GLY	ASP	ASP	VAL	ASP	ILE	PHE	ALA																												

Fig. 2. Nucleotide sequence of the *E. coli* HindIII-BglII fragment (coordinates 3.8-2.6 in Fig. 1). The complete nt sequence for the 20.5-kDal peptide is shown with the (SD) core sequence boxed. The putative signal peptide is underlined and the processing site is indicated by a vertical arrow. Reported N-terminal sequences for the 20.5-kDal and 69-kDal peptide subunits are underlined by horizontal arrows. The possible processing signal region for the 69-kDal peptide is underlined with a dashed line.

sitions 24 and 26. The most frequent protease (signal) cleavage sequence, Ala-X-Ala, is also present in this signal peptide. The collective observations above strongly support the hypothesis that this peptide is the signal peptide that allows the transport of the intact PA precursor to the periplasmic space.

A ribosome-binding site for PA can be located four bp upstream from the initial ATG codon (position 1, Fig. 2). The spacing between the SD core sequence, and the first ATG codon is unusual for most *E. coli* genes, however, such spacing has been reported in the case of the *rpoA* gene (Stormo et al., 1982).

The fact that two PA peptide subunits are produced from a common precursor (Bock et al.,

1983a,b), implies the presence of at least one additional proteolytic cleavage site besides the one required to cleave the signal peptide. One of these proteolytic cleavages could occur between residues threonine and serine (positions 289 and 290, Fig. 2), to give rise to the large PA subunit. An analysis of the aa sequence preceding the 69-kDal peptide reveals the sequence Leu-Ala-Gly (Fig. 2). This sequence has been identified in the *E. coli* lipoprotein as the signal for proteolytic cleavage with hydrolysis occurring before the additional cysteine residue (Watson, 1984). A similar signal sequence is also present in the *Bacillus licheniformis* penicillinase gene. In this case, the proteolytic cleavage site is located 7 aa after the signal, and the processed

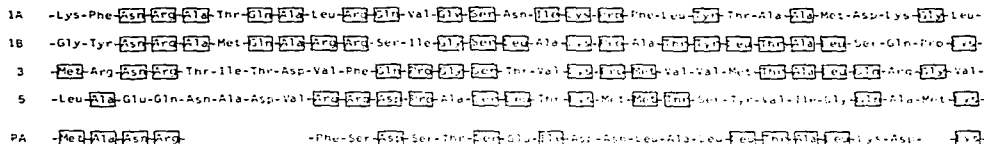


Fig. 3. Amino acid homologies between four penicillin-binding proteins of *E. coli* (1A, 1B, 3 and 5; Keck et al., 1985), and the corresponding region of the small subunit of PA. The PA aa sequence extends from the methionine residue, position 168, to the lysine residue, position 191, in Fig. 2. The conserved serine residue observed in all penicillin-binding proteins is located at position 177 in the small subunit of the PA.

protein starts, as in PA, with a serine residue (Watson, 1984). A similar scheme could be involved in the processing mechanisms of the PA 69-kDal subunit. It is interesting that after the sequence Leu-Ala-Gly, a cysteine residue appears in both cases cited above, and a tyrosine residue appears in the PA. These aa can be easily substituted by a single base transition (TAT to TGT) in the DNA.

Several groups (Bock et al., 1983a; Mayer et al., 1979) have described a small PA subunit of approx. 20.5 kDal. A polypeptide of this size would place the C-terminal region of this subunit around aa position 200 in Fig. 2. Between this putative C end, and the beginning of the 69-kDal subunit there are approx. 90 aa. At least two possible hypotheses can be argued to explain these observations: (1) the small subunit may exhibit anomalous migration on SDS-polyacrylamide gels, and its real M_r is about 31 000; or (2) a connecting peptide exists between the two subunits and it is removed post-translationally. We favor the latter option since several species of active PA can be found, after isoelectric focusing, suggesting that these differences arise from a proteolytic attack (Kutzbach and Rauenbusch, 1974).

Examination of the nt sequence preceding the proposed first ATG codon (52 bp) of PA did not reveal any obvious promoter region. As we previously mentioned we believe that these regulatory regions were deleted during the construction of plasmid pPA4. The fact that the *pac* gene is inducible by phenylacetic acid in cells carrying pPA2 plasmid, and is not (not shown) in cells carrying plasmid pPA4, supports this assumption. Thus, the *pac* gene inserted in plasmid pPA4 is probably transcribed from a promoter created during its construction.

Keck et al. (1985) have recently compared the aa sequence of the active site of various penicillin-

binding proteins from *E. coli* K-12. A comparison of these reported sequences to the aa sequence of PA reveals some interesting similarities (Fig. 3). These similarities (which are not extensive between the reported peptides) include a serine residue which is strongly conserved for all (position 177, Fig. 2), and suggest that the 20.5-kDal PA subunit is the one involved in penicillin binding. This notion is supported by studies which show that the specificity of PA for its substrate can be affected by replacing a specific methionine (Fig. 3) with other aa (Williams and Zuzel, 1985).

Finally, many relevant questions remain to be answered about the *pac* gene and of its products processing. In particular, it will be interesting to know if the processing mechanism, which produces both peptide subunits from a common precursor, is unique for the PA or whether it is a more general mechanism found in many prokaryotic systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Aileen O'Connor and Guadalupe Ochoa for some initial bioassay results. We are also grateful to Mario A. Cuevas and Salvador Antonio for the synthesis and purification of *EcoRI* linkers, to Dr. Xavier Soberón for the critical reading of the manuscript, and to Carmen González for the typing of this manuscript. G.G. is a recipient of a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico. G.O. is a fellow of the Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno Mexicano. This research was partially supported by Grant PCCBBNA-020164 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico.

REFERENCES

- Balasingham, K., Warburton, D., Dunnill, P. and Lilly, M.D.: The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 276 (1972) 250-256.
- Bock, A., Wirth, G., Schmid, G., Schumacher, G., Lang, G. and Buckel, P.: The penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105 consists of two dissimilar subunits. *FEMS Microbiol. Lett.* 20 (1983a) 135-139.
- Bock, A., Wirth, G., Schmid, G., Schumacher, G., Lang, G. and Buckel, P.: The two subunits of penicillin acylase are processed from a common precursor. *FEMS Microbiol. Lett.* 20 (1983b) 141-144.
- Bolivar, F. and Backman, K.: Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* 68 (1979) 245-267.
- Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D.A.: A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41 (1969) 459-472.
- Brüning, H., Bruns, W., Collins, J., Hahn, W., Hoppe, J. and Mayer, H.: DNA-Sequenz und DNA-Strukturen und die verwendendes Verfahren zur Herstellung von Penicillin-acylase. Eur. Patent Office No. 01107828 (1984) 755-770.
- Casas, L.T.: Producción del ácido 6-aminopenicilánico por hidrólisis enzimática de la penicilina G. M.S. Thesis. University of Mexico, 1981.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L.: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 2110-2114.
- Covarrubias, L. and Bolivar, F.: Construction and characterization of new cloning vehicles. VI. Plasmid pBR329, a new derivative of pBR328 lacking the 428-base pair inverted duplication. *Gene* 17 (1982) 79-89.
- Heidecker, G., Messing, J. and Gronenborn, B.: A versatile primer for DNA sequencing in the M13mp2 cloning system. *Gene* 10 (1980) 69-73.
- Keck, W., Glauner, B., Schwarz, U., Broome-Smith, J.K. and Spratt, B.G.: Sequences of the active-site peptides of three of the high- M_r penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1999-2003.
- Kutzbach, C. and Rauenbusch, E.: Preparation and general properties of crystalline acylase from *Escherichia coli* ATCC11105. *Z. Physiol. Chem.* 355 (1974) 45-53.
- Lowe, D.A., Romaneik, G. and Elander, R.P.: Penicillin acylases: a review of existing enzymes and the isolation of a new bacterial penicillin V acylase. *Develop. Indust. Microbiol.* 22 (1981) 163-180.
- Marmur, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 205-218.
- Mayer, H., Collins, J. and Wagner, F.: Cloning of the penicillin G-acylase gene of *Escherichia coli* ATCC11105 on multicopy plasmids, in Timmis, K.N. and Pühler, A. (Eds.), *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance*. Elsevier, Amsterdam, 1979, pp. 459-470.
- Messing, J., Crea, R. and Seeburg, P.H.: A system for shotgun DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* 9 (1981) 309-321.
- Perlman, D. and Halvorson, H.O.: A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J. Mol. Biol.* 167 (1983) 391-409.
- Schomer, U., Segner, A. and Wagner, F.: Penicillin acylase from the hybrid strain *Escherichia coli* 5K (pHM12): enzyme formation and hydrolysis of β -lactamase antibiotics with whole cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984) 307-312.
- Steiner, D.F.: Peptide hormone precursors: biosynthesis, processing and significance, in Parsons, A.J. (Ed.), *Peptide Hormones*. University Park Press, Baltimore, MD, 1976, pp. 49-64.
- Stormo, G.D., Schneider, T.D. and Gold, L.M.: Characterization of translational initiation sites in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* 10 (1982) 2971-2995.
- Watson, M.E.: Compilation of published signal sequences. *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 5145-5164.
- Williams, J.A. and Zuzel, T.J.: Penicillin acylase (E.C.3.4.11) substrate specificity. Modification by in vitro mutagenesis. *J. Cell Biochem. Sup.* 9B (1985) 99.

Communicated by R.L. Rodriguez.

GENE 01786

Characterization of the regulatory region of the *Escherichia coli* penicillin acylase structural gene

(Nucleotide sequence; primer extension; promoter identification)

F. Valle, G. Gosset, B. Tenorio, G. Oliver and F. Bolivar*

Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos (Mexico) Tel. (5273) 172399.

(Received March 28th, 1986)

(Accepted August 26th, 1986)

SUMMARY

Penicillin acylase is utilized in the enzymatic production of semisynthetic penicillins. The enzyme is composed of two different subunits that originate from a common precursor. The partial nucleotide (nt) sequence of the structural gene has been published. This paper reports the nt sequence of the regulatory region of this gene, the identification of a functional promoter, the transcriptional start point, and the description of possible regulatory regions.

INTRODUCTION

Penicillin acylase (PA) from *Escherichia coli* ATCC11105 catalyzes the conversion of penicillin G into phenylacetic acid and 6-APA, which is the starting compound for the industrial production of semisynthetic penicillins (Lowe et al., 1981). From the academic point of view, the enzyme and its structural gene possess several interesting features. For example, the mature enzyme is composed of two dissimilar subunits which originate from a common precursor via a complex processing mechanism (Bock et al., 1983; Bruns et al., 1985; Oliver et al., 1985). Also, the expression of the PA structural gene (*pac*) is under several regulatory controls such as temperature, oxygen level, cAMP control and phenylacetic acid level (Casas, 1981; Gang and

Shaikh, 1976). Our group and others have reported the cloning of the *pac* gene (Oliver et al., 1985; Mayer et al., 1979; Doretic et al., 1984) and its partial nucleotide sequence (Bruns et al., 1985; Oliver et al., 1985).

In this paper we report the nt sequence of the regulatory region of this gene, the identification of a functional promoter, the transcriptional start point, and possible CRP binding sites.

MATERIALS AND METHODS

(a) Plasmids and phages

Bacteriophage M13 strains mp8 and mp9 and their permissive host JM101, were obtained from P. Seeburg. Plasmids pPA2 and pPA4 carrying the *pac* gene have been described previously (Oliver et al., 1985).

(b) Enzymes and radiochemicals

All enzymes were obtained from New England Biolabs and [α -³²P]dATP was obtained from Radiochemical Center (Amersham).

* To whom correspondence and reprint requests should be addressed, at Apdo. Postal 70479, México D.F. (Mexico).

Abbreviations: 6-APA, 6-aminopenicillanic acid; bp, base pair(s); Cm, chloramphenicol; CRP, cyclic AMP receptor protein; DMBA, *p*-dimethylaminobenzaldehyde; nt, nucleotide(s); MI medium, see MATERIALS AND METHODS, section e; nt, nucleotide(s); PA, penicillin acylase; *pac*, *E. coli* gene coding for PA; Tc, tetracycline.

(c) DNA synthesis, sequencing and sequence analysis

Previously described procedures (Heidecker et al., 1980; Messing et al., 1981) were used to determine the nt sequence of various restriction fragments cloned in M13 derivatives by the dideoxy chain termination method. A DNA fragment 21 nt long was synthesized according to the phosphotriester method (Itoh et al., 1982). A computer search for likely promoter sequences was performed using the method described by Mulligan et al. (1984). A variation of this method was used to find possible CRP-binding sites using the reported consensus sequence (De Crombrughe et al., 1984).

(d) RNA purification and primer extension

Messenger RNA was purified from stationary phase bacterial cultures by the hot-phenol method described by Young and Furano (1981). Primer extensions were routinely performed by using 50 µg of total RNA and 1 pmol of the *pac* gene specific primer. Hybridization and extension reactions were carried out according to Leon et al. (1985).

(e) Assay of penicillin acylase activity

E. coli strain ATCC11105 carrying plasmids pPA2 and pPA4 was grown at 30 °C in M1 medium (Schomer et al., 1984) or M1 plus phenylacetic acid 0.1%. The initial rates of 6-APA formation were determined based on the condensation of this molecule with DMBA as previously reported (Balasingham et al., 1972).

RESULTS AND DISCUSSION

(a) Localization of the regulatory region of the *pac* gene

Previous studies have shown that the *pac*-coding region is located between *Hind*III and *Sma*I sites in plasmids pPA2 and pPA4 (Fig. 1). In pPA2, the *pac* gene expression is inducible by phenylacetic acid, while in pPA4 it is constitutive (Oliver et al., 1985). In order to localize more precisely the regulatory region of the *pac* gene, we constructed plasmid pPA25, as shown in Fig. 1. In this plasmid the *pac* expression is still inducible by phenylacetic acid (Fig. 1). These results strongly suggest the presence of the original regulatory region in pPA25.

(b) Nucleotide sequence of the regulatory region

A restriction map and the strategy used for the sequencing of the regulatory region of the *pac* gene is presented in Fig. 2. Fig. 3 displays the nt sequence obtained. This sequence extends by 328 bp towards the 5'-end, the one previously reported by us (Oliver et al., 1985), and by 236 bp, the sequence reported by Bruning et al. (1984). The comparison of our sequence with the one reported by Bruns et al. (1985) showed a total discrepancy in the DNA region 5' to the *Hind*III site (see Fig. 1, and position -22 in Fig. 3); however, our sequence coincides with the 94 nt presented by the same authors elsewhere (Bruning et al., 1984). Based on these data, we believe that our sequence is correct.

(c) Transcriptional start point and promoter localization

The transcriptional start point of the *pac* gene was determined by primer extension, using a synthetic

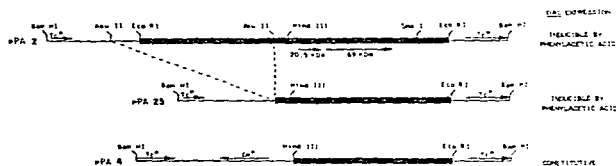


Fig. 1. Localization of the regulatory region of the *pac* gene. Plasmids pPA2 and pPA4 have been described previously (Oliver et al., 1985). Plasmid pPA25 is a deletion derivative of pPA2, which lacks a 3.8-kb DNA fragment between the two *Not*I sites. The plasmids were transformed into the *E. coli* strain ATCC11105, and PA activity was measured in cells grown in media with or without phenylacetic acid (see MATERIALS AND METHODS, section e). The arrows indicate plasmid-coded products. Only the chromosomal DNA region (heavy line) is drawn to scale, and relevant restriction sites are indicated.

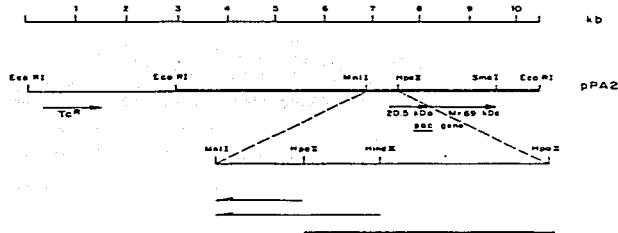


Fig. 2. Strategy for subcloning and sequencing (half-arrows) the *pac* regulatory region. A partial restriction map of plasmid pPA2 for the relevant region, is shown. The DNA fragments were cloned as blunt-ended fragments in the M13 vectors. Full arrows indicate plasmid-coded products. The heavy line indicates chromosomal DNA.

DNA primer that hybridizes at positions 62 to 82 (see Fig. 3) and RNA isolated from strain ATCC11105 carrying plasmid pPA2 grown on 0.1% phenylacetic acid. The result of one such experiment is shown in Fig. 4. The size of the reverse transcriptase product was 90 ± 1 nt. This result localizes the transcriptional start point (+1) 30 ± 1 nt from the translational start point (see Fig. 3). When the same experiment was done using RNA isolated from strain ATCC11105 without plasmid, the observed band was less intense (data not shown).

Inspection of the nt sequence upstream from the transcriptional start point reveals a putative -35 sequence TAGATA, which is identical in four out of six positions with the consensus sequence (TTGACA). The putative -10 sequence TAGTAT has four identities with the consensus (TATAAT) (see Fig. 3). The distance between the proposed -35 and -10 regions is 17 bp, the optimal distance for promoter activity. It is important to note that using the

algorithm developed by Mulligan et al. (1984) for promoter search, this promoter gets a high score.

(d) Analysis of the nucleotide sequence preceding the *pac* gene

PA synthesis is apparently subject to catabolite repression mediated by cAMP and the cAMP receptor protein CRP (Gang and Shaikh, 1976). Two potential CRP binding sites were found at nt coordinates -120 to -100, and -78 to -58. Both sites are homologous with the consensus sequence and their positions with respect to the transcription initiation site are -68/-69 and -109/-110, respectively. In this sense the reported distances of CRP-binding sites lie between -106/-107 and -36/-37. Using these criteria, both sequences are potential CRP-binding sites. The presence of two CRP-binding sites has been observed in other cases, like *lac*, *ara*, *cat*, where one site is the primary binding

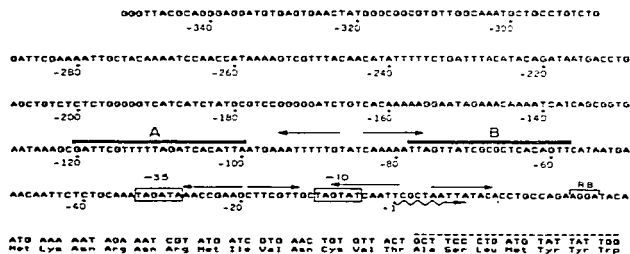


Fig. 3. Nucleotide sequence of the regulatory region of the *pac* gene. The 381 bp preceding the initiation ATG codon of the *pac* gene are presented. Heavy bars (A and B) indicate two putative CRP binding sites. The broken line indicates the zone where the synthetic oligodeoxynucleotide hybridizes in the primer extension experiments. Divergent arrows indicate palindromic sequences. A functional promoter (boxed), the identified transcriptional start-point (+1), and a putative ribosome-binding site (RB), are also indicated.

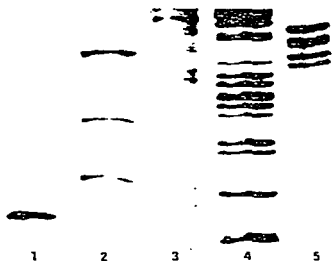


Fig. 4. Primer extension mapping. The 32 P-labeled DNA synthesized by reverse transcriptase was separated in a 20% polyacrylamide gel. Lane 1 shows the primer extension product. Lanes 2-5 show the M13mp9 DNA sequence (C, T, A and G, respectively) that was used as an M_r marker.

site. Although there is no evidence that secondary sites are essential for transcription activation, they may participate in the search by CRP for the main site (De Combrugge et al., 1984).

Another interesting feature found in this nt sequence is the presence of three imperfect palindromic sequences centered at positions - 86, - 19/ - 20 and + 3/ + 4. As can be seen in Fig. 3, one of these sequences lies between the two putative CRP binding sites, and the other ones are located around the 'Pribnow box'. At present, we do not know whether these sequences could be the recognition sites for regulatory proteins; however, it is known that in *E. coli* the *pac* gene is under negative control (Mayer et al., 1979). Similarly located palindromic sequences localized within different promoters have been identified as part of operators (Bennet and Yanofsky, 1978). In order to determine which sequences are actually involved in the regulation of this gene, we are performing mutagenesis experiments in this DNA region.

REFERENCES

- Balasingham, K., Warburton, D., Dunhill, P. and Lilly, M.D.: The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 276 (1972) 250-256.
- Bennet, G.N. and Yanofsky, C.: Sequence analysis of operator constitutive mutants of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 121 (1978) 179-192.
- Böck, A., Wirth, G., Schmid, G., Schumacher, G. and Buckel, P.: The two subunits of penicillin acylase from a common precursor. *FEMS Microbiol. Lett.* 20 (1983) 141-144.
- Bruning, H., Bruns, W., Collins, J., Hahn, W., Hoppe, J. and Mayer, H.: DNA-Sequenzen und DNA-Strukturen und die verwendete Verfahren zur Herstellung von Penicillinacylase. *Eur. Patent Office No.* 01107828 (1984) 755-770.
- Brun, W., Hoppe, J., Tsai, H., Bruning, H., Maywald, F., Collins, J. and Mayer, H.: Structure of the penicillin acylase gene from *Escherichia coli*: a periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing. *J. Mol. Appl. Genet.* 3 (1985) 36-44.
- Casas, L.T.: Producción del ácido 6-Aminopenicilánico por Hidrólisis Enzimática de la Penicilina G. M.S. thesis, University of México, 1981.
- De Combrugge, B., Busby, S. and Buc, H.: Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. *Science* 224 (1984) 831-838.
- Doretic, V., Franetic, O. and Glisin, V.: Instability of the plasmid carrying active penicillin acylase gene from *Escherichia coli*: conditions inducing insertional inactivation. *FEMS Microbiol. Lett.* 24 (1984) 173-177.
- Gang, D.M. and Shaikh, K.: Regulation of penicillin acylase in *Escherichia coli* by cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Acta* 425 (1976) 110-114.
- Heidecker, G., Messing, J. and Gronenborn, B.: A versatile primer for DNA sequencing in the M13 mp2 cloning system. *Gene* 10 (1980) 69-73.
- Itoh, H., Ike, Y., Ikuta, S. and Itakura, K.: Solid phase synthesis of polynucleotides. VI. Further studies on polystyrene copolymers for the solid support. *Nucl. Acids Res.* 10 (1982) 1755-1769.
- Leon, P., Romero, D., Garcíarrubio, A., Bastarrachea, F. and Covarrubias, A.: Glutamine synthetase-constitutive mutation affecting the *glu4LG* upstream promoter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 164 (1985) 1032-1038.
- Lowe, D.A., Romanick, G. and Elander, R.P.: Penicillin acylases: a review of existing enzymes and isolation of a new bacterial penicillin acylase. *Dev. Ind. Microbiol.* 22 (1981) 163-180.
- Mayer, H., Collins, J. and Wagner, F.: Cloning of the penicillin acylase of *Escherichia coli* ATCC11105 on multicopy plasmids. In Timmis, K.N. and Pühler, A. (Eds.), *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance*. Elsevier, Amsterdam, 1979, pp. 459-470.
- Messing, J., Crea, R. and Seeburg, P.H.: A system for shotgun DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* 9 (1981) 309-321.
- Mulligan, M., Hawley, D., Entriken, R. and McClure, W.: *Escherichia coli* promoter sequences predict *in vitro* RNA polymerase selectivity. *Nucl. Acid Res.* 12 (1984) 789-800.
- Oliver, G., Valle F., Rosetti, F., Gomez-Pedrozo, M., Santamaria, P., Gosset, G. and Bolivar, F.: A common precursor for the two subunits of the penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105. *Gene* 40 (1985) 9-15.
- Schomer, U., Segner, S. and Wagner, F.: Penicillin acylase from the hybrid strain *Escherichia coli* 5K[pHM12]: enzyme formation and hydrolysis of β -lactam antibiotics with whole cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984) 307-312.
- Young F.S. and Furano A.V.: Regulation of the synthesis of *E. coli* elongation factor Tu. *Cell* 24 (1981) 695-706.

Communicated by G. Wilcox