

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Efecto de una mutación de mimetismo alcalino en el factor de transcripción PacC de *Acremonium chrysogenum* sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos

T E S I S

que para obtener el grado de

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

B.E. Alberto Cristian López Calleja

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

México, D.F., Julio de 2010

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465

El presente trabajo fue financiado por el CONACYT a través de la beca de maestría con número de registro 268514 y del proyecto "Estudios moleculares de la regulación por pH en la producción de cefalosporina C por *Acremonium chrysogenum*" (ref. 54662 y 82647)

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios del Departamento de Biotecnología, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Francisco José Fernández Perrino y con la asesoría del Dr. Francisco Fierro Fierro y el Dr. Octavio Loera Corral.

México, D.F., a 19 de Julio de 2010

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la unidad Iztapalapa
aprobó la tesis

**“Efecto de una mutación de mimetismo alcalino en el factor de transcripción
PacC de *Acremonium chrysogenum* sobre la producción de antibióticos beta-
lactámicos”**

que presentó

Alberto Cristian López Calleja

Comité tutorial:

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesor: Dr. Octavio Loera Corral

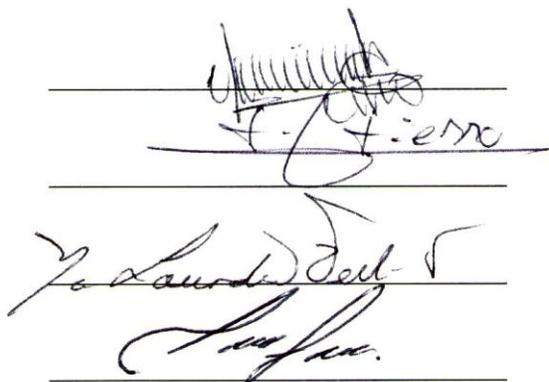
Jurado:

Presidente: Dr. Octavio Loera Corral

Secretario: Dr. Francisco Fierro Fierro

Vocal: Dra. Lourdes Villa Tanaka

Vocal: Dra. María Eugenia Hidalgo Lara



Handwritten signatures of the jury members over horizontal lines. The top signature is for Francisco Fierro Fierro, the middle for Lourdes Villa Tanaka, and the bottom for María Eugenia Hidalgo Lara.

*"Todos los seres,
todos los acontecimientos
de tu vida, están ahí
porque tú los has convocado.
De ti depende
lo que resuelvas hacer con ellos"*
(Richard Bach, 1977)

A mis familiares y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino, por abrirme las puertas al Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario, y brindarme la oportunidad de realizar este proyecto bajo su dirección y confianza. Por su apoyo, y por hacerme partícipe de otros de sus proyectos, obsequiándome así la oportunidad de enriquecer mis conocimientos en esta área de investigación.

A los Doctores: Francisco Fierro, Octavio Loera, Lourdes Villa y Ma. Eugenia Hidalgo, por el tiempo invertido en la revisión del presente documento y por sus amables sugerencias y cometarios.

A la Dra. Araceli Tomasini, por el apoyo brindado en las ocasiones en las que le fue solicitado, y por asistirme siempre en cuanto a la provisión de equipo, material y reactivos varios.

Un agradecimiento especial a Ara (Araceli) por su participación y colaboración en el proyecto, por su exhaustiva dedicación, por su tiempo y enorme esfuerzo invertido a la hora de las transformaciones, fermentaciones y bioensayos, y sobre todo, por aguantar presión y acoplarse a mi ritmo de trabajo y soportar uno que otro regaño.

A Jessie, por brindarme muchos ánimos para realizar este proyecto y por su valioso apoyo en cuanto a las técnicas de manejo de *Acremonium chrysogenum*. También por sus sabios consejos para tolerar la rebeldía de nuestro "hijito mal portado".

A mis amigos Karla y Jaime, por sus valiosos consejos y sustanciosas discusiones. Por su enorme apoyo y por los momentos amenos de recreación, tan necesarios para aliviar la tensión ocasional y llegar felizmente al término del trabajo. Y porque en incontables ocasiones Karla evitó alguna tragedia al socorrerme con material estéril.

No puedo dejar de mencionar a Ara (Itzel), quién me apoyó desde el inicio del proyecto con muchos ánimos y porras. Y quién también ha sido partícipe de la culminación de este trabajo, con sus sabios consejos, cariño, tolerancia y comprensión, sacrificando parte del tiempo que habría yo de dedicarle. Gracias, miles, de verdad.

A mis demás compañeros y amigos del laboratorio, quienes contribuyeron al hacer interesante y entretenido este trabajo con sus ocurrencias, bromas, conversaciones, etc. Gracias Paty, Danny Boy, Maura, Mariel, Ana Banana, Vicky, Octavio, Omar, Rox, Hugo (gracias también por tu apoyo con el HPLC y algunas dudas estadísticas), Pao, Sandra, Tere...

En fin, gracias queridos todos.

RESUMEN

La cefalosporina C (CPC) pertenece al grupo de antibióticos beta-lactámicos, los compuestos antimicrobianos más prescritos en la actualidad y los más importantes desde el punto de vista económico. La CPC es la base de las cefalosporinas semisintéticas de uso clínico, un grupo de antibióticos de amplio espectro y baja toxicidad, altamente efectivos contra microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos, en concentraciones relativamente bajas. Actualmente, la CPC se produce exclusivamente a partir del hongo filamentoso *Acremonium chrysogenum* y su biosíntesis se encuentra regulada, entre otros mecanismos, por el factor de transcripción PacC, a través de la señalización por pH ambiental.

Cuando las condiciones de pH ambiental son ácidas a neutras, el factor de transcripción PacC, con 621 residuos de aminoácidos, se encuentra en una conformación cerrada. Cuando las condiciones cambian a alcalinas ocurre toda una cascada de eventos que concluye en dos rompimientos proteolíticos sucesivos del factor de transcripción PacC, dejándolo en su forma activa, de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos. Una vez activado, PacC se dirige al núcleo y promueve la transcripción de la mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis de CPC.

En el presente trabajo se realizó, mediante técnicas de ingeniería genética, una eliminación de 366 residuos de aminoácidos del extremo carboxilo terminal en el factor de transcripción PacC de *A. chrysogenum*, de manera que la mutación generara directamente la forma activa de PacC.

La mutación se expresó en la cepa silvestre de *A. chrysogenum* bajo el control de un promotor constitutivo y del propio promotor del gen *pacC*, con la hipótesis de que la mutación introducida conduciría a un fenotipo de mimetismo alcalino y, por lo tanto, se podría observar un aumento en la producción de antibióticos beta-lactámicos, incluyendo la producción de CPC, aún cuando los valores de pH fuesen ácidos.

Como resultado, se obtuvieron once cepas portadoras de la mutación, de las cuales tres mostraron un incremento significativo en la producción de antibióticos beta-lactámicos en comparación con la cepa parental, tanto en un medio de fermentación con pH alcalino, como en uno amortiguado a pH ácido. Así mismo, la mayoría de las cepas mutantes mostraron niveles de producción superiores a la cepa parental, utilizando un medio definido con pH amortiguado a 5.5. Se confirma así que la estrategia empleada

permitió mejorar significativamente la producción de antibióticos beta-lactámicos en una cepa silvestre de *A. chrysogenum*.

ABSTRACT

Cephalosporin C (CPC) belongs to the beta-lactam antibiotics group, which are currently the most prescribed antimicrobials, and economically the most important drugs. This compound is the core of overall semisynthetic cephalosporins for clinical use. Cephalosporins have low toxicity and wide spectrum against Gram-negative and Gram-positive bacteria, in small concentrations. CPC is exclusively produced by the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. The biosynthesis pathway of CPC is strongly regulated by environmental pH signaling through transcription factor PacC.

When environmental pH is acidic to neutral, transcription factor PacC (621 aminoacid residues) has a closed conformation. When environmental pH becomes alkaline, a signal transduction pathway is activated which results in processing of PacC by two successive proteolytic steps, turning it to an active form (~ 250 aminoacid residues). At this point, activated PacC migrates to nucleus and stimulates the transcription of the majority of the CPC biosynthetic genes.

In this work, using genetic engineering techniques, we designed a mutation in the *A. chrysogenum* transcription factor PacC, removing 366 aminoacid residues from the C-terminal end, so that the mutated pacC resulted directly in its active form.

Mutated PacC was expressed in *A. chrysogenum* wild type under the control of a constitutive promoter and its own promoter, with the aim to demonstrate the hypothesis that this mutation would allow an alkaline mimicking phenotype, so that we could obtain an increase of beta-lactams titers, including CPC, irrespective of the pH values in the fermentation broth.

We obtained eleven strains with our mutation, and three of them showed a significant increase of beta-lactams production, in comparison with the parental strain, both in alkaline fermentation medium or in acidic buffered medium. In this way, the majority of the mutated strains showed higher levels than parental strain, in a chemically defined medium with pH buffered to 5.5. These results confirm that our genetic engineering strategy increased significantly beta-lactams production in *A. chrysogenum* wild type.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE GENERAL	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
ABREVIATURAS	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Historia de los antibióticos	1
1.2. Antibióticos beta-lactámicos	5
1.2.1. Clasificación y estructura química	6
1.2.2. Mecanismo de acción de los antibióticos beta-lactámicos	8
1.3. La cefalosporina C	8
1.3.1. <i>Acremonium chrysogenum</i>	9
1.3.2. Biosíntesis de cefalosporina C en <i>A. chrysogenum</i>	9
1.3.3. Organización estructural de los genes de biosíntesis de CPC en <i>A. chrysogenum</i>	12
1.3.4. Regulación de la biosíntesis de CPC	13
1.3.4.1. Precursores y vías de competencia	13
1.3.4.1.1. Disponibilidad de L- α -AAA	13
1.3.4.1.2. Disponibilidad de L-valina	14
1.3.4.1.3. Disponibilidad de L-cisteína	14
1.3.4.1.4. Disponibilidad de D-L-metionina	15
1.3.4.2. Influencia del fosfato y oxígeno	15
1.3.4.3. Regulación a nivel transcripcional	16
1.3.4.3.1. Efecto regulador de la metionina	16
1.3.4.3.2. Represión catabólica por fuente de carbono	16
1.3.4.3.3. CPR1 Regulador de cefalosporina C 1	17
1.3.4.3.4. Regulador global <i>velvet</i> (AcVEA)	17
1.3.4.3.5. Regulación por pH ambiental de la biosíntesis de CPC	18
2. ANTECEDENTES	22
2.1. Estudios sobre el mejoramiento genético de la producción de cefalosporinas	22
2.2. Estudios sobre la regulación por pH ambiental y mimetismo alcalino en la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos	25

3.0. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS	31
5.1. Objetivo general	31
5.2. Objetivos particulares	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1. Cepas	32
6.2. Vectores plasmídicos	32
6.3. Medios de cultivo	33
6.3.1. Medios de cultivo para bacterias	33
6.3.2. Medios de cultivo para hongos	34
6.4. Crecimiento de los microorganismos	37
6.4.1. Crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	37
6.4.2. Crecimiento de <i>A. chrysogenum</i>	37
6.4.2.1. Condiciones para la esporulación	37
6.4.2.2. Condiciones de crecimiento para la obtención de ADN total	37
6.4.2.3. Condiciones de crecimiento para la preparación de inóculo primario	37
6.5. Mantenimiento de los microorganismos	38
6.6. Obtención de ADN total de <i>A. chrysogenum</i>	38
6.6.1. Fenolización	39
6.6.2. Precipitación del ADN	39
6.6.3. Tratamiento con ARNasa	40
6.7. Electroforesis en gel de agarosa	40
6.8. Cuantificación de ácidos nucleicos	40
6.9. Amplificación del gen <i>pacC</i> por PCR	41
6.9.1. Diseño de cebadores	41
6.9.1.1 Fragmento <i>PpacC</i> ²⁷	42
6.9.1.2 Fragmento <i>SpacC</i> ²⁷	42
6.9.2. Condiciones para la reacción de PCR	43
6.10. Extracción de ADN a partir de geles de agarosa	44
6.11. Construcción de los vectores de expresión	44
6.11.1. Amplificación de los plásmidos pAN52.1 y pLXTtrpC	44

6.11.1.1. Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> y transformación por electroporación	-----	44
6.11.1.2. Obtención de ADN plasmídico	-----	45
6.11.1.2.1. Megapreparaciones	-----	45
6.11.1.2.2. Minipreparaciones	-----	46
6.11.2. Tratamiento del ADN con endonucleasas de restricción	-----	47
6.11.3. Construcción del vector de expresión para el gen <i>pacC</i> modificado utilizando su propio promotor	-----	48
6.11.3.1. Manipulación del plásmido pLXTtrpC	-----	48
6.11.3.1.1. Tratamiento con fosfatasa alcalina	-----	48
6.11.3.1.2. Tratamiento con la ADN ligasa del bacteriófago T4	-----	49
6.11.3.2. Manipulación del producto de PCR <i>PpacC²⁷</i>	-----	49
6.11.3.3. Clonación del inserto <i>PpacC²⁷</i> en el vector pLXTtrpC	-----	49
6.11.4. Construcción de un vector de expresión para el gen <i>pacC</i> modificado utilizando un promotor de expresión constitutiva	-----	50
6.11.4.1. Manipulación del plásmido pAN52.1	-----	50
6.11.4.1.1. Rellenado de extremos protuberantes con el fragmento Klenow	-----	51
6.11.4.2. Manipulación del producto de PCR <i>SpacC²⁷</i>	-----	52
6.11.4.3. Clonación del inserto <i>SpacC²⁷</i> en el vector pAN52.1 previamente tratado	-----	52
6.11.4.4. Amplificación del promotor <i>Pgpd</i> con el fragmento <i>SpacC²⁷</i> a partir del vector pSpacC-A	-----	53
6.11.4.4.1. Diseño de cebadores	-----	53
6.11.4.4.2. Condiciones para la reacción de PCR	-----	53
6.11.4.5. Clonación del producto de PCR <i>Pgpd-SpacC²⁷</i> en el plásmido pLXTtrpC	-----	54
6.11.4.5.1. Manipulación del plásmido pLXTtrpC	-----	54
6.11.4.5.2. Manipulación del producto de PCR <i>Pgpd-SpacC²⁷</i>	-----	54

6.11.4.5.3. Ligación del inserto Pgpd-Spac ²⁷ en el Vector pLXTtrpC -----	54
6.12. Transformación de <i>A. chrysogenum</i> ATCC 11550 -----	55
6.12.1. Crecimiento del micelio -----	55
6.12.2. Obtención de protoplastos -----	56
6.12.3. Transformación -----	57
6.12.4. Plaqueo -----	57
6.13. Comprobación por PCR de la integración de los vectores en las cepas transformantes -----	58
6.14. Evaluación del efecto de la mutación de mimetismo alcalino sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos en <i>A. chrysogenum</i> ATCC 11550 -----	59
6.14.1. Fermentación en cilindros de agar en medio complejo MCFA -----	59
6.14.2. Determinación de la concentración de antibióticos beta- lactámicos por bioensayo de actividad antibiótica frente a <i>E. coli</i> ESS2231 -----	59
6.14.2.1. Preparación de las placas de bioensayo -----	59
6.14.2.2. Preparación de la curva de calibración -----	60
6.14.2.3. Determinación de antibióticos beta-lactámicos -----	60
6.14.3. Fermentación en medio líquido complejo MCFA -----	60
6.14.4. Fermentación en medio líquido definido MDFAM/MES -----	61
6.15. Comprobación de expresión de la mutación de mimetismo alcalino por RT-PCR -----	62
6.15.1. Obtención de ARN total de <i>A. chrysogenum</i> -----	62
6.15.1.1. Consideraciones generales para la extracción y manejo de ARN -----	63
6.15.2. Electroforesis de ARN en geles desnaturizantes de agarosa con formaldehído -----	63
6.15.3. Tratamiento del ARN con ADNasa I -----	64
6.15.4. Reacción de PCR a partir de ADN obtenido por transcripción reversa de ARNm (RT-PCR) -----	64
7. RESULTADOS -----	67
7.1. Obtención de ADN total de <i>A. chrysogenum</i> -----	67

7.2. Amplificación de los fragmentos <i>SpacC²⁷</i> y <i>PpacC²⁷</i> por PCR	67
7.3. Construcción del vector de expresión para el gen <i>pacC</i> modificado utilizando su propio promotor	68
7.3.1. Ligación del inserto <i>PpacC²⁷</i> en el vector pLXTtrpC- <i>EcoRI</i>	68
7.4. Construcción del vector de expresión para el gen <i>pacC</i> modificado utilizando un promotor de expresión constitutiva	70
7.4.1. Tratamiento del vector pAN52.1 digerido con la endonucleasa <i>NcoI</i> con el fragmento Klenow	70
7.4.2. Ligación del inserto <i>SpacC²⁷</i> en el vector pAN52.1- <i>NcoI</i> - rellenado con Klenow	71
7.4.3. Amplificación por PCR del promotor <i>Pgpd</i> con el fragmento <i>SpacC²⁷</i> , a partir del vector pSpacC-A	73
7.4.4. Ligación del inserto <i>Pgpd-SpacC²⁷</i> en el vector pLXTtrpC- <i>EcoRI-BamHI</i>	74
7.5. Transformación de <i>A. chrysogenum</i> ATCC 11550	76
7.5.1. Obtención de protoplastos	76
7.5.2. Transformación	76
7.5.3. Comprobación de la integración de los vectores	77
7.6. Evaluación del efecto de la mutación de mimetismo alcalino sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos	78
7.6.1. Fermentación en cilindros de agar	78
7.6.2. Fermentación en medio líquido complejo MCFA	79
7.6.3. Fermentación en medio líquido definido MDFAM/MES	80
7.7. Comprobación de la expresión del gen mutado	81
7.7.1. Obtención de ARN total	81
7.7.2. RT-PCR	81
8. DISCUSIÓN	82
8.1. Amplificación de los productos de PCR <i>PpacC²⁷</i> y <i>SpacC²⁷</i>	82
8.2. Construcción de los vectores de expresión	82
8.2.1 Construcción del vector pPpacC ²⁷	82
8.2.2 Construcción del vector pSpacC ²⁷	82
8.3. Transformación de <i>A. chrysogenum</i> ATCC 11550	84
8.4. Evaluación del efecto de la mutación de mimetismo alcalino sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos	85

8.4.1. Fermentación en cilindros de agar de medio complejo MCFA	- 85
8.4.2. Fermentación en medio líquido complejo MCFA	----- 85
8.4.3. Fermentación en medio líquido definido MDFAM/MES	----- 87
8.5. Comprobación de la expresión de la mutación de mimetismo alcalino	- 89
9. CONCLUSIONES	----- 91
10. PERSPECTIVAS	----- 92
11. REFERENCIAS	----- 93

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Estructura química de los antibióticos betalactámicos. -----	7
Fig. 2. Ruta de biosíntesis de cefalosporina C (CPC) en <i>A. chrysogenum</i> . -----	11
Fig. 3. Organización estructural de los genes involucrados en la biosíntesis de CPC en <i>A. chrysogenum</i> .-----	12
Fig. 4. Activación del factor de transcripción PacC mediada por la señalización del pH ambiental. -----	21
Fig. 5. Proteína PacC esquematizada mostrando los tipos de mutaciones en ella que conducen a fenotipos de mimetismo alcalino (<i>pacC^c</i>) y mimetismo ácido (<i>pacC^{+/-}</i>). -----	26
Fig. 6. A) Esquema del factor de transcripción <i>pacC</i> , señalándose los sitios de rotura proteolítica. B) Cebadores diseñados con base en la secuencia original del gen <i>pacC</i> de <i>A. chrysogenum</i> .-----	42
Fig. 7. Diseño de cebadores para la reacción de RT-PCR.-----	65
Fig. 8. ADN total de <i>A. chrysogenum</i> ATCC 11550 en un gel de agarosa al 0.7 % (p/v).-----	67
Fig. 9. PCR de los fragmentos <i>SpacC²⁷</i> y <i>PpacC²⁷</i> .-----	67
Fig. 10. Digestiones con la endonucleasa <i>Bam</i> HI del ADN de minipreparaciones obtenidas de colonias transformadas con la ligación <i>PpacC²⁷</i> en el vector pLXTtrpC. -----	68
Fig. 11. Digestiones con <i>Eco</i> RI (a) y <i>Bam</i> HI (b) del ADN de minipreparaciones obtenidas de las colonias 2, 3 y 5, transformadas con la ligación <i>PpacC²⁷</i> en el vector pLXTtrpC.-----	69
Fig. 12. Mapa de restricción del plásmido p <i>PpacC²⁷</i> . -----	69
Fig. 13. Digestiones con la endonucleasa <i>Nco</i> I del ADN de minipreparaciones obtenidas de colonias transformantes con el plásmido pAN52.1 tratado con <i>Nco</i> I y rellenado con el fragmento Klenow (arriba), y de minipreparaciones del plásmido tratado con <i>Nco</i> I y recircularizado (abajo). -----	71
Fig. 14. Digestiones con <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III (A) y <i>Nco</i> I (B) del ADN de minipreparaciones obtenidas de transformantes con la ligación de <i>SpacC²⁷</i> en el vector pAN52.1- <i>Nco</i> I-Klenow. C) Di- gestiones con <i>Nco</i> I (1), <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III (2) y <i>Bam</i> HI (3) realizadas con una megaprepa- ración obtenida de la colonia 3; y digestión con <i>Bam</i> HI al plásmido pAN52.1.-----	72
Fig. 15. Mapa de restricción del plásmido p <i>SpacC²⁷</i> -A.-----	72
Fig. 16. Comprobación de la integridad del marco de lectura en el plásmido p <i>SpacC²⁷</i> . -----	73
Fig. 17. PCR del promotor <i>Pgpd</i> con el fragmento <i>SpacC²⁷</i> (3) y de sólo el fragmento <i>SpacC²⁷</i> (2) obtenidos a partir del plásmido p <i>SpacC²⁷</i> -A. -----	74
Fig. 18. A) Digestión <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI del ADN de minipreparaciones obtenidas de transformantes con la ligación <i>Pgpd</i> - <i>SpacC²⁷</i> en el vector pLXTtrpC. B) Digestión <i>Xba</i> I- <i>Bam</i> HI de las minipreparaciones obtenidas de las colonias 1, 2, 4, 9, 12 y 14.-----	74
Fig. 19. Mapa de restricción del plásmido p <i>SpacC²⁷</i> . -----	75
Fig. 20. Protoplastos de <i>A. chrysogenum</i> ATCC 11550 a las 3 horas de incubación con Driselase® 400X. -----	76
Fig. 21. Transformantes de <i>A. chrysogenum</i> WT. A) Control pLXTtrpC, B) p <i>SpacC²⁷</i> , C) p <i>PpacC²⁷</i> , E) Control positivo (protoplastos sin fleomicina), F) Control negativo (protoplastos con fleomicina).-----	76

Fig. 22. A) obtención de ADN total de las cepas transformantes y de la cepa silvestre. B) PCR del terminador <i>TtrpC</i> para las cepas P, X y parental, y del cassette de expresión de la mutación en las cepas S. -----	77
Fig. 23. Resultados de la fermentación en cilindros de agar. -----	78
Fig. 24. A) Cinética de producción de antibióticos beta-lactámicos B) Cinética de formación de biomasa y C) Cinética de evolución del pH en medio líquido complejo, para cada una de las cepas analizadas. -----	79
Fig. 25. A) Cinética de producción de antibióticos beta-lactámicos B) Cinética de formación de biomasa y C) Cinética de evolución del pH en medio líquido definido y amortiguado, para cada una de las cepas analizadas. -----	80
Fig. 26. ARN total de las cepas P3, S1, S3, X2 y WT. -----	81
Fig. 27. A) RT-PCR de las cepas P3, S1, S3, X2 y WT. B) Control negativo. -----	81

ABREVIATURAS

α	Coefficiente de significancia	M	Molar
6-APA	Ácido 6-aminopenicilánico	MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
7-ACA	Ácido 7-aminocefalosporánico	MFS	Major Facilitator Superfamily
7-ADAC	Ácido 7-aminodesacetilcefalosporánico	mg	miligramo
7-ADCA	Ácido 7-amino desacetoxicefalosporánico	mL	mililitro
7TMD	Proteína de 7 dominios transmembranales	mM	milimolar
A₂₃₀	Absorbencia a 230 nm de λ	mm	milímetro
A₂₆₀	Absorbencia a 260 nm de λ	MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
A₂₆₀	Absorbencia a 260 nm de λ	mV	milivoltio
ACV	δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina	nm	nanómetro
ACVS	ACV sintetasa	O.D.	Unidad de densidad óptica
ADN	Ácido desoxiribonucleico	°C	Grado Celsius
ADNc	ADN complementario	pb	pares de bases
Amp^R	Resistencia a ampicilina	P.E.	Producción específica
ARN	Ácido ribonucleico	p/v	peso/volumen
ARNm	ARN mensajero	PEG	Polietilenglicol
BSA_{ac}	Albúmina de suero bovino acetilada	pmol	picomol
CRE	Elemento regulador de represión catabólica por fuente de carbono	rpm	revoluciones por minuto
cm	centímetro	RFX	Regulator factor X
Cm^R	Resistencia a cloranfenicol	u	unidad
CoA	Coenzima A	V	Voltio
CPC	Cefalosporina C	v/v	volumen/volumen
DAC	Desacetilcefalosporina C	λ	Longitud de onda
DAO	D-aminoácido oxidasa	μF	micro Faraday
DAOC	Desacetoxicefalosporina C	μg	microgramo
DEPC	Dietilpirocarbonato	μL	microlitro
dNTPs	Mezcla de desoxiribonucleótidos trifosfato	μM	micromolar
DTT	Ditiotreitol		
g	gramo		
g	gravidades		
GLA	Glutaril oxidasa		
h	horas		
IPN	Isopenicilina N		
IPNS	Isopenicilina N sintasa		
kb	Kilobase		
kDa	Kilo Dalton		
L	Litro		
L-α-AAA	Ácido L- α -aminoadípico		

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia de los antibióticos

La historia de los antibióticos comienza cuando en la antigüedad se descubrió que la administración de ciertos remedios, entre los cuáles se incluían rábanos, poros, ajos, cebollas y diferentes tipos de mohos, resultaba efectiva como curación para muchas heridas o enfermedades infecciosas. Aun así, la sabiduría de la época aún no lograba conectar las propiedades antibacterianas de las sustancias químicas responsables con la curación de las heridas y el tratamiento de las enfermedades. El uso de tales remedios se remonta a más de 3000 años, desde los antiguos egipcios, babilonios, chinos e incas (Kong *et al.*, 2009).

La búsqueda de antibióticos, definidos como cualquier sustancia química producida por un organismo que resulta destructiva para otro, no comenzó sin embargo hasta después de 1880, de la mano de la "teoría germinal de las enfermedades infecciosas" propuesta por Louis Pasteur y que se basa en que toda enfermedad infecciosa tiene su causa en un germen, con la capacidad de propagarse entre las personas. A partir de entonces, los científicos comenzaron a buscar activamente sustancias que pudieran eliminar los gérmenes causantes de tales enfermedades.

En 1871, John Burdon-Sanderson observó que un medio de cultivo expuesto al aire se volvía turbio rápidamente, con el crecimiento de bacterias. Pero si algún moho del tipo *Penicillium* crecía también sobre la superficie del caldo, entonces se observaba menor turbidez (Burdon-Sanderson, 1871). Posteriormente, inspirados por el trabajo de Burdon-Sanderson, William Roberts (1874) Joseph Lister (1875) y John Tyndall (1876) reportaron observaciones similares, demostrando la actividad antimicrobiana del hongo *Penicillium* (aunque solamente Roberts y Lister relacionaron sus observaciones con algún compuesto antibacteriano). En 1877, Louis Pasteur y J. Francois Joubert reportaron la inhibición del crecimiento de *Bacillus anthracis* en cultivos contaminados con un moho identificado por Pasteur como *Penicillium notatum* (Pasteur y Joubert, 1877). Aunque recibió poca atención en su trabajo, Ernest Duchesne también demostró *in vitro* el antagonismo entre *Penicillium glaucum* y *Escherichia coli*. Posteriormente, demostraría que la co-inyección de una dosis letal de *Salmonella tiphy* con *P. glaucum* previene la infección de fiebre tifoidea en el cobayo (Duchesne, 1897).

En 1928, Alexander Fleming se encontraba estudiando la relación entre la morfología colonial de *Staphylococcus* y su virulencia. Antes de partir de vacaciones, inoculó placas de agar con *Staphylococcus* y las dejó almacenadas en la esquina de su mesa de trabajo. Cuando regresó, encontró varias de las placas contaminadas con mohos, y por lo tanto decidió desecharlas. Al día siguiente, encontró algunas de las placas desechadas sobre el lavabo, que aún no habían sido sumergidas en el desinfectante, y decidió reexaminarlas. Observó en una de las placas que las colonias de *Staphylococcus* que circundaban el crecimiento del moho parecían estar experimentando lisis, con lo que dedujo que el moho poseía propiedades antimicrobianas. Posteriormente, hizo subcultivos del moho y lo identificó como *Penicillium notatum*, caracterizó su crecimiento y elaboró un procedimiento sencillo para la extracción del agente lítico, que él mismo llamó "penicilina". Luego, junto con sus asistentes, realizó procedimientos de extracción más elaborados y demostró la efectividad de los extractos contra cultivos de *Staphylococcus*, *Streptococcus pyogenes* y *Pneumococcus*. Además, aplicó los extractos directamente a tejidos animales sin que estos resultaran ser tóxicos ni irritantes (Fleming, 1929).

Sin embargo, el uso de la penicilina como agente terapéutico para tratar infecciones se retrasó hasta 1940, cuando Howard Walter Florey, Ernst Chain y otros colaboradores reportaron el éxito de la penicilina para curar infecciones en ratones, ratas y gatos, y un año después describieron el éxito del primer uso clínico en 10 pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* (Abraham *et al.*, 1941). Alentados por esos resultados, se propusieron escalar el experimento, involucrando ahora a 100 pacientes. Para ello fue necesario incrementar también la producción del compuesto, de manera que llegaron a establecer un proceso de fermentación a gran escala en el Northern Regional Research Laboratory del departamento de Agricultura en Peoria, Illinois. En dicha institución, más tarde, aislaron una nueva cepa: *Penicillium chrysogenum*, que producía mayores cantidades de penicilina que las cepas usadas anteriormente (Kong *et al.*, 2009).

Con la llegada de la segunda guerra mundial, el ejército americano planteó la necesidad de contar con nuevos medicamentos para tratar las infecciones de sus heridos. Mientras que, la penicilina resultaba ser un excelente fármaco contra bacterias Gram-positivas, era necesario hallar alternativas eficaces para combatir microorganismos Gram-negativos. En 1943, Albert Schatz, Elizabeth Bugie y Selman Waksman obtuvieron un nuevo antibiótico, la estreptomina, con ayuda de técnicas de irradiación y mutación en una cepa de *Streptomyces griseus* aislada de la garganta de un pollo. Su actividad resultó ser altamente eficaz sobre *Mycobacterium tuberculosis*, por lo cual Waksman recibió en

1952 el Premio Nobel de Medicina. La estreptomina fue el primer antibiótico descubierto del grupo de los aminoglicósidos (Schatz *et al*, 1944). En 1949, Waksman y Hubert Lechevalier obtuvieron la neomicina, a partir de una cepa de *Streptomyces fradiae*. El antibiótico era similar a la estreptomina, aunque sin actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*; además, resultó ser bastante tóxico. Por lo anterior, su uso se limitó a aplicaciones tópicas y, en ocasiones, se administró por vía oral para limpieza intestinal (Waksman y Lechevalier, 1949). En 1957, Umezawa y colaboradores aislaron otro aminoglicósido a partir de *Streptomyces kanamyceticus*: la kanamicina, que resultó ser de amplio espectro, eficaz contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y *Mycobacterium* (Umezawa *et al*, 1957). Durante los siguientes años continuó el descubrimiento de aminoglicósidos, tales como paromomicina (1959), gentamicina (1963), nebramicina (1967), sisomicina (1970), dibekacina y amikacina (1972), netilmicina (1975), etc. Actualmente, los aminoglicósidos figuran todavía entre los antibióticos más utilizados en la práctica clínica, principalmente gentamicina, tobramicina, netilmicina y amikacina. En general, estos antibióticos presentan carácter básico, con presencia en su molécula de dos o más azúcares. Los aminoglicósidos son especialmente activos contra bacterias Gram-negativas y su mecanismo de acción ocurre por unión irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, impidiendo la síntesis de proteínas (García-Rodríguez, 1997).

Aunque ya se contaba con la penicilina y la estreptomina, como los grandes hallazgos de la medicina en la década de los cuarenta del siglo pasado, aún no se alcanzaba a cubrir con los antibióticos existentes todo el espectro de microorganismos patógenos, por lo que la búsqueda de nuevos antibióticos continuó arduamente, principalmente a partir de microorganismos provenientes del suelo. En 1947 se logró el aislamiento del cloranfenicol a partir de *Streptomyces venezuelae*. El cloranfenicol era el antibiótico con mayor espectro antibacteriano conocido, eficaz frente a Gram-positivas, Gram-negativas y rickettsias; inicialmente se llamó cloromicetina indicando la presencia en su molécula de un átomo de cloro (Ehrlich *et al*, 1948).

Por las mismas fechas, intentando encontrar antibióticos con mayor amplitud de espectro y que éste incluyera a las rickettsias, Benjamin Minge Duggar obtuvo en 1945, después de analizar más de 7500 cepas de actinomicetos, la primera de las tetraciclinas conocida: la clorotetraciclina, obtenida a partir de una especie de *Streptomyces aureofaciens*. Junto al cloranfenicol, constituyeron los dos primeros antibióticos de espectro universal y de administración oral. En 1950, Alexander C. Finlay y colaboradores

descubrieron la oxitetraciclina, a partir de una cepa de *Streptomyces rimosus*. Posteriormente, la tetraciclina se obtuvo en forma semisintética, y con ello comenzó la era de las tetraciclinas semisintéticas (como demeclociclina, rolitetraciclina, metaciclina, doxiciclina y minociclina). Estos antibióticos fueron ampliamente utilizados durante los años 70 y 80 del siglo pasado, antes del desarrollo de los modernos antibióticos beta-lactámicos (Jukes, 1985).

En 1952, J. M. McGuire y colaboradores descubrieron la eritromicina, a partir de un cultivo de *Streptomyces erythreus* (McGuire *et al.*, 1952). La eritromicina es considerada como el prototipo de una nueva familia de antibióticos, denominados macrólidos, que se caracterizan por poseer una estructura macrolactónica a la que se unen uno o más azúcares. Su importancia se debió fundamentalmente a la semejanza de su espectro con el de la penicilina, que hizo que la eritromicina fuera el fármaco de elección en pacientes alérgicos a la penicilina. Además, la eritromicina resultó ser eficaz contra algunas bacterias Gram-negativas, actinomicetos, treponemas, micoplasmas, clamidias y algunas especies de *Bacteroides*, aunque es ineficaz contra *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*. Posteriormente, se obtuvieron la kitasamicina, oleandomicina, espiramicina, triacetiloleandomicina, josamicina, midecamicina, claritromicina, rokitamicina, etc., a partir de diferentes especies de *Streptomyces*. Los macrólidos inhiben la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad ribosomal 50S, inhibiendo la translocación del aminoacil ARNt (García-Rodríguez, 1997).

En 1957, P. Sensi y colaboradores comprobaron que los caldos del cultivo de *Streptomyces mediterranei* poseían actividad antimicrobiana. Las sustancias que se obtuvieron se denominaron rifamicinas y se clasificaron como A, B, C, D y E, siendo la B la más potente y pudiendo aislarse en forma pura. A partir de ésta, y por la incorporación de diversos radicales, se consiguieron las rifamicinas semisintéticas, como la rifamicina SV, la rifampicina y la rifamida. La actividad biológica de las rifamicinas se centra en la inhibición de la síntesis de ARN debido a la alta afinidad de las rifamicinas por la ARN polimerasa de las bacterias sensibles (Riva y Silvestri, 1972).

Otros antibióticos que se han obtenido a lo largo de los años son: la novobiocina, obtenida a partir de *Streptomyces spheroides* en 1952; la fosfomicina, aislada en 1966 a partir de una cepa de *Streptomyces fradiae*; el nitroimidazol, aislado en 1962 a partir de *Streptomyces*, y del cual se obtiene químicamente el metronidazol con actividad antiparasitaria; la bacitracina de *Bacillus subtilis* (1943), la aerosporina de *Bacillus aerosporus* (1947), las polimixinas de *Bacillus polymyxa* (1947) y la colistina de *Bacillus*

colistinus; la lincomicina, obtenida a partir de una cepa de *Streptomyces lincolnensis* (cuyo mecanismo de acción y espectro son muy similares al de los macrólidos, pero con diferente estructura química), algunos glucopéptidos, como la vancomicina obtenida de *Nocardia orientalis* o la teicoplanina aislada de *Actinoplanes teichomyceticus*.

Sin embargo, con el creciente descubrimiento de nuevos antibióticos y sus aplicaciones, también comenzó la aparición de la resistencia bacteriana hacia muchos de ellos, por lo que, tratando de ampliar su espectro, mejorar sus características farmacocinéticas y combatir la continua resistencia microbiana, muchos de los antibióticos modernos se han obtenido a partir de modificaciones químicas de las penicilinas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, rifamicinas y algunos aminoglucósidos. En la lucha contra la resistencia bacteriana también se han aislado nuevos antibióticos naturales, por ejemplo: las everninomicinas, de naturaleza oligosacárida producidas por *Micromonospora carbonacea* (muy activas contra bacterias Gram-positivas resistentes a vancomicina y metilicina); la pristinamicina derivada de *Streptomyces pristinaespiralis*, eficaz en el tratamiento de infecciones por bacterias Gram-positivas, etc. La búsqueda de nuevos antibióticos continúa todavía, con un panorama más amplio sobre otras posibles dianas, como los mecanismos de síntesis de proteínas, pared celular, glicopéptidos, ácidos nucleicos, lipopolisacáridos en bacterias Gram-negativas, ácidos teicoicos en Gram-positivas, o que actúen inhibiendo procesos importantes para la sobrevivencia bacteriana, como el transporte de ciertos metabolitos y la adherencia a las células huésped, entre otros (García-Rodríguez, 1997).

1.2. Antibióticos beta-lactámicos

Después de casi 70 años de uso clínico, iniciados con la primera administración de penicilina a un paciente en 1941, los antibióticos beta-lactámicos son los antimicrobianos más prescritos en la actualidad, tanto en atención primaria como en hospitales. Además, son los más importantes desde el punto de vista económico. Son los más potentes y los menos tóxicos de todos los antibióticos conocidos (Lofty, 2006).

Varios microorganismos, como *Aspergillus nidulans*, *Acremonium chrysogenum*, *Penicillium chrysogenum*, algunos estreptomicetos y un pequeño número de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, son capaces de producir este tipo de antibióticos (Brakhage, 1998).

1.2.1. Clasificación y estructura química

Estructuralmente, los antibióticos beta-lactámicos, son esencialmente péptidos no ribosomales modificados que tienen rutas biosintéticas muy similares. El grupo se define básicamente por la presencia de un anillo beta-lactámico de cuatro átomos y, a excepción de unos cuantos antibióticos de tipo monolactama, contienen en su estructura un sistema bicíclico. Actualmente se conocen varios grupos de antibióticos beta-lactámicos, entre los cuales se encuentran penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, inhibidores de las betalactamasas, carbapenemas y monobactamas. La estructura básica de los antibióticos beta-lactámicos se esquematiza en la figura 1.

Las penicilinas, concretamente, contienen el anillo beta-lactámico unido a un anillo de tiazolidina, lo cual da origen al ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además, tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras, en la posición 6 del anillo beta-lactámico y que es la que define muchas de sus propiedades. Aunque muchas penicilinas son semisintéticas, su estructura básica, el 6-APA, es producida principalmente por *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus nidulans*.

Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión del anillo beta-lactámico con un anillo dihidrotiazínico. Al igual que ocurre con las penicilinas, las modificaciones en las cadenas laterales originan las diversas cefalosporinas. Son antibióticos de amplio espectro, altamente efectivos contra microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos en concentraciones relativamente bajas (Donowitz y Mandell, 1988). Las cefalosporinas de uso médico también son semisintéticas y se obtienen a partir de la cefalosporina C o de algunos de sus precursores, producidos principalmente por *Acremonium chrysogenum* y *Streptomyces clavuligerus* (Brakhage, 1998).

Las cefamicinas son antibióticos beta-lactámicos similares a las cefalosporinas, se distinguen de ellas por su origen, a partir de actinomicetos del género *Streptomyces*. Su estructura básica sólo se diferencia por la presencia de un grupo metoxi en lugar del átomo de hidrógeno situado en la posición 7, en el anillo beta-lactámico. El grupo 3-carbamoilo les concede una gran estabilidad ante las enzimas hidrolíticas presentes en los tejidos. A partir de la cefamicina C obtenida de *Streptomyces lactamadurans* se sintetizaron las primeras cefamicinas de uso clínico (Stapley *et al*, 1972).

Los inhibidores de betalactamasas usados clínicamente son también de estructura beta-lactámica. El ácido clavulánico (producido por *Streptomyces clavuligerus*), por ejemplo, tiene un núcleo similar al ácido penicilánico, con una sustitución del átomo de azufre en posición 1 por un átomo de oxígeno (lo cual incrementa la reactividad de la molécula y le proporciona mayor afinidad por parte de las betalactamasas), también carece de la cadena lateral acilamino en posición 6 (Reading y Cole, 1977).

Las carbapenemas contienen un anillo beta-lactámico fusionado a un anillo pirrolidínico. Esta modificación, además de las cadenas laterales y la posición espacial de las mismas, condiciona una mayor resistencia a las betalactamasas, incrementando su potencia y espectro antibacteriano. Son, por ello, los antibióticos beta-lactámicos de más amplio espectro y actividad (Birnbaum *et al.*, 1985). Se obtienen a partir de *Streptomyces clavuligerus*, *S. olivaceus*, *Erwiniacarotovor*a y *Serratia sp.*

Las monobactamas tienen una estructura beta-lactámica sencilla, con una estructura monocíclica en la que el anillo beta-lactámico no está fusionado con otro anillo (Marín y Gudiol, 2003). Algunos microorganismos productores de monobactamas son: *Nocardia uniformis*, *Agrobacterium radiobacter* y *Pseudomonas acidophila*.

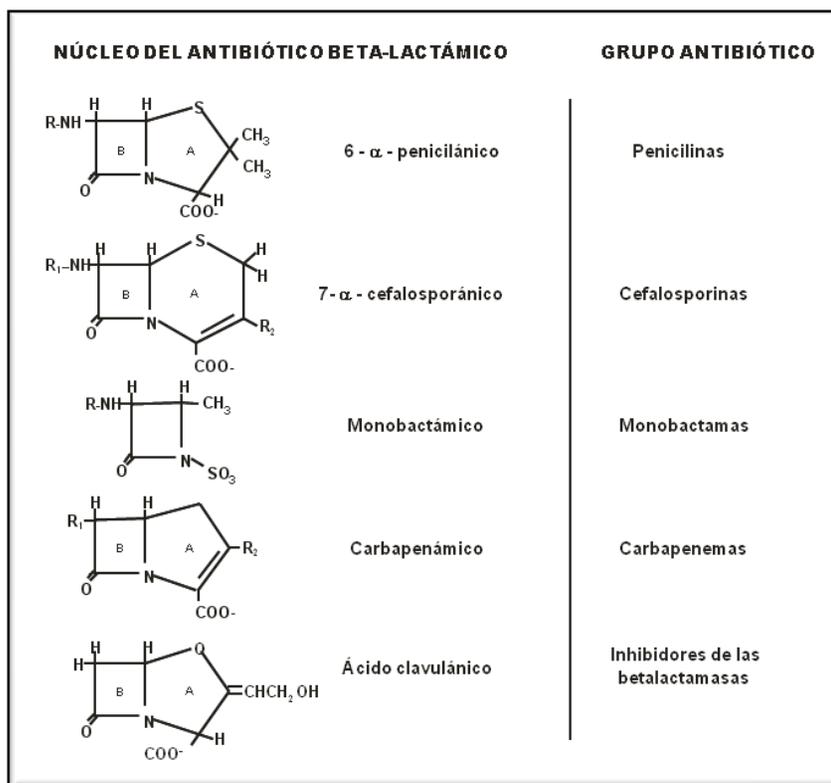


Fig. 1. Estructura química de los antibióticos betalactámicos (Marín y Gudiol, 2003).

1.2.2. Mecanismo de acción de los antibióticos beta-lactámicos

Los antibióticos beta-lactámicos son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglicano, componente principal de la pared celular de bacterias Gram-positivas (y en menor proporción, de la pared celular de las Gram-negativas y ácido-alcohol resistentes). El peptidoglicano está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina. El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí para formar una malla. Los antibióticos beta-lactámicos inhiben precisamente esta unión o transpeptidación. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular.

Los componentes del peptidoglicano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplasmática al espacio que existe entre ésta y la pared celular, donde se encuentran las transpeptidasas y carboxipeptidasas, que son las encargadas de formar los tetrapéptidos unidos (y que también son capaces de fijar los antibióticos beta-lactámicos). Los anillos de estos antibióticos poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del dipéptido D-alanina-D-alanina (que es el sustrato natural reconocido por las transpeptidasas en la reacción de entrecruzamiento de la mureína), y eso permite una unión covalente del antibiótico al centro activo de la transpeptidasa. También se ha descrito que, adicionalmente, pueden inhibir a las carboxipeptidasas y a algunas endopeptidasas (Zapun *et al.*, 2008) y que pueden ejercer su efecto activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano (Tipper, 1985).

1.3. La cefalosporina C

En 1945, Giuseppe Brotzu fue el primero en describir el efecto antibiótico de los extractos generados por *Acremonium chrysogenum*, un hongo filamentoso que él mismo aisló del mar, de una región cercana a la zona de desagüe de la red de alcantarillas de la ciudad de Cagliari, en Italia. Tales extractos resultaron ser efectivos en contra de microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, particularmente de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella tiphy* (Brotzu, 1948). Años más tarde, Abraham *et al.* (1954)

aislaron y purificaron el componente activo a partir de los caldos de cultivo, y en 1961 se determinó la estructura del compuesto, denominado cefalosporina C (CPC) (Abraham y Newton, 1961).

Actualmente, la cefalosporina C es la base de las cefalosporinas de uso médico, las cuales son todas semisintéticas. A partir de la CPC se obtiene el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), que posteriormente es modificado con diferentes cadenas laterales, dando lugar a las cuatro generaciones de cefalosporinas de las que se dispone en la actualidad. Las variaciones introducidas en el carbono 7 del 7-ACA modifican su actividad antibacteriana y sus características farmacocinéticas (Mediavilla y García-Lobo, 2005). Otro intermediario derivado de la CPC, que también se utiliza para la elaboración de cefalosporinas semisintéticas es el ácido 7-amino desacetoxicefalosporánico (7-ADCA). Tanto la CPC como los precursores 7-ACA y 7-ADCA se obtienen a partir de procesos de fermentación que utilizan casi exclusivamente al hongo filamentoso *Acremonium chrysogenum* como productor (Nijland *et al.*, 2008).

1.3.1. *Acremonium chrysogenum*

A. chrysogenum (sinónimo: *Cephalosporium acremonium*) se incluye dentro del grupo de los deuteromicetos, organismos que por carecer de una etapa de reproducción sexual conocida han sido difíciles de analizar genéticamente. Sin embargo, gracias a la aplicación de técnicas moleculares, se ha facilitado la caracterización y el análisis de varias de sus rutas metabólicas, incluyendo la biosíntesis de CPC, entre otras (Schmitt *et al.*, 2004b).

A. chrysogenum, al microscopio, se puede encontrar en cinco estados morfológicos distintos: hifas hinchadas con crecimiento apical y ramificaciones, fragmentos de hifas, artrosporas, conidios y esporas germinales (Tollnick *et al.*, 2004).

1.3.2. Biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum*

La biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum*, al igual que la de los demás antibióticos beta-lactámicos, comienza con la formación del tripéptido δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV), que se origina por la condensación de tres aminoácidos: ácido L- α -aminoadípico (L- α -AAA), L-cisteína, y L-valina. El L- α -AAA es un aminoácido no proteinogénico que se deriva de la ruta del aminoadipato, específica en hongos, y que

conduce a la formación de L-lisina. Todas las reacciones necesarias para la formación del tripéptido son catalizadas por una sola enzima multifuncional, llamada ACV sintetasa (ACVS). La ACVS es codificada por un gen estructural denominado *pcbAB* (Gutiérrez *et al.*, 1991).

En el segundo paso de la síntesis, el tripéptido se cicla de manera oxidativa, dando lugar a la formación de una estructura bicíclica que consiste en el anillo β -lactámico de cuatro miembros fusionado con un anillo tiazolidínico de cinco miembros, característico de todas las penicilinas. El compuesto resultante se llama isopenicilina N (IPN) y su formación es catalizada por la enzima isopenicilina N sintasa (IPNS), codificada por el gen *pcbC* (Samson *et al.*, 1985). La IPN es el precursor tanto de la biosíntesis de penicilina como de cefalosporina C y cefamicinas.

En la siguiente etapa de la producción de CPC tiene lugar la isomerización de la cadena lateral del L- α -AAA de la IPN, originándose un D-enantiómero: la penicilina N; dicha reacción es llevada a cabo por un sistema de varias enzimas. Una de ellas es la isopenicilinil N-CoA sintetasa que convierte la IPN a isopenicilinil-CoA y es codificada por el gen *cefD1*; esta enzima muestra una alta similitud con las sintetatas de ácidos grasos de cadenas largas dependientes de CoA (Turgay *et al.*, 1992; Ullán *et al.*, 2002a). La siguiente enzima participante es la isopenicilinil N-CoA epimerasa que transforma la isopenicilinil-CoA a penicilinil-CoA, y es codificada por el gen *cefD2* (Ullán *et al.*, 2002a). La formación final de penicilina N requiere de la hidrólisis del tioéster penicilinil-CoA, ésta reacción ocurre de manera no estereoespecífica por medio de diferentes tioesterasas que se encuentren presentes en el ambiente celular (Knihinicki *et al.*, 1991).

A continuación, la penicilina N es transformada a desacetoxicefalosporina C (DAOC) mediante la DAOC sintetasa, con actividad expandasa. Este paso de la expansión del anillo involucra la apertura oxidativa del anillo tiazolidínico para formar un anillo dihidrotiazínico de seis miembros, característico de los compuestos con núcleo cefem-3 (cefalosporinas y cefamicinas). En el siguiente paso, el grupo metilo en el C-3 de la DAOC es hidroxilado y oxidado para formar desacetilcefalosporina C (DAC), reacción catalizada por la enzima DAC hidroxilasa. Ambas enzimas son codificadas por un mismo gen: *cefEF* (Samson *et al.*, 1987).

En la última etapa de la ruta de biosíntesis, un grupo acetilo proveniente del acetil-CoA es transferido al grupo OH de la DAC para formar cefalosporina C, esta reacción es catalizada por el producto del gen *cefG*, la acetil CoA:DAC acetil transferasa (Gutiérrez *et*

al., 1992). En la figura 2 se muestra un esquema completo de la biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum*.

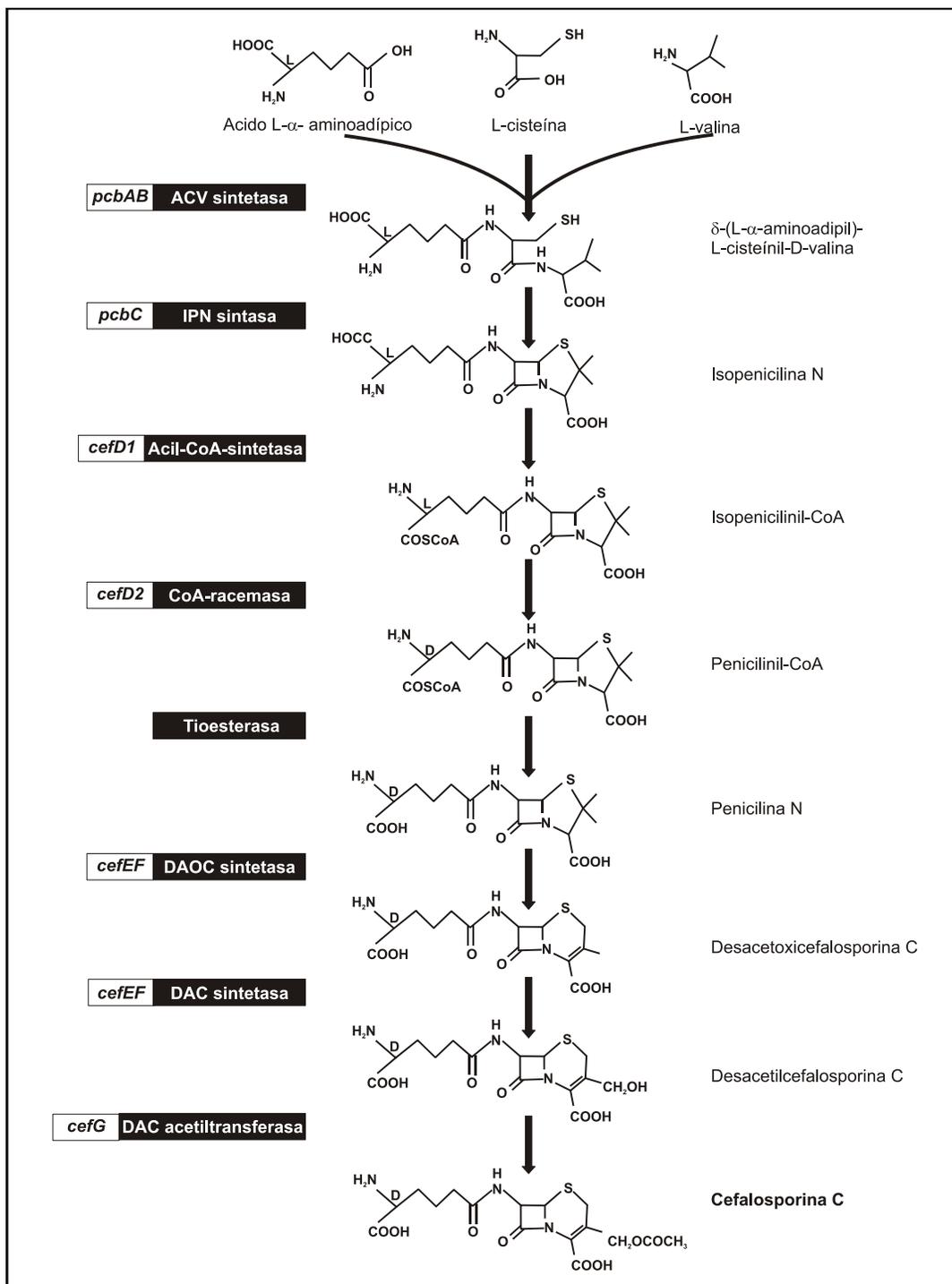


Fig. 2. Ruta de biosíntesis de cefalosporina C (CPC) en *A. chrysogenum*. (Schmitt et al., 2004b).

1.3.3. Organización estructural de los genes de biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum*

Los genes involucrados en la biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum* están organizados en dos conjuntos (*cluster*) separados: 1) el clúster temprano, que incluye los genes responsables de los cuatro pasos iniciales de la ruta (*pcbAB*, *pcbC*, *cefD1* y *cefD2*) y que se encuentra localizado en el cromosoma VI, y 2) el clúster tardío, con los genes involucrados en los pasos finales de la biosíntesis de CPC (*cefEF* y *cefG*) y que se encuentra ubicado en el cromosoma II (Gutiérrez *et al.*, 1991, 1992 y 1997).

Dentro del clúster temprano se encuentra también el gen *cefT*, localizado corriente abajo del gen *pcbAB*, que codifica una proteína que funciona como bomba de exportación multidrogas, una proteína de membrana perteneciente a la superfamilia principal de facilitadores [Major Facilitator Superfamily; (MFS)]. Si bien la proteína CefT no es esencial para la biosíntesis de CPC, sí se encuentra estrechamente relacionada con su secreción (Ullán *et al.*, 2002b).

Recientemente, dentro del clúster temprano de cefalosporina y corriente abajo del gen *cefD1*, se ha encontrado otro gen más: el gen *cefM*, que codifica otra proteína membranal perteneciente a la MFS y que resulta ser esencial para la biosíntesis de CPC: la proteína CefM parece estar involucrada en la translocación de la penicilina N desde el lumen del peroxisoma hacia el citosol, donde posteriormente es convertida a CPC. Anteriormente se creía que todas las etapas de la biosíntesis de CPC eran citosólicas. Sin embargo, la evidencia reciente sugiere que la epimerización de la IPN a penicilina N es catalizada por enzimas peroxisómicas, lo que involucraría un sistema de transporte a través de la membrana peroxisomal (Teijeira *et al.*, 2009). La organización estructural de los genes involucrados en la biosíntesis de CPC se resume en la figura 3.

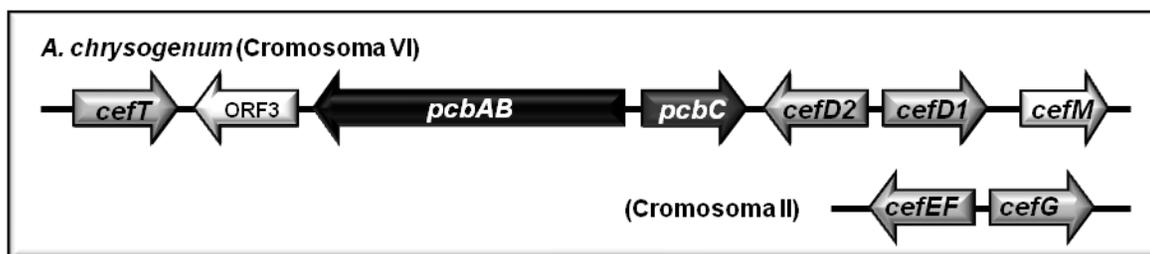


Fig. 3. Organización estructural de los genes involucrados en la biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum* (Brakhage *et al.*, 2009)

La distribución de los genes biosintéticos de CPC en dos clústeres separados parece obedecer a rasgos meramente evolutivos. Se ha especulado con que los genes de biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos fueron transferidos en un solo clúster a partir de un ancestro procarionte a un ancestro común de los hongos sintetizadores de beta-lactamas. Después, los genes se repartieron en dos clústeres en dos cromosomas diferentes, de tal manera que un clúster codificaría los genes tempranos de la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos, y el otro los genes tardíos. Posiblemente, un ancestro común de *Aspergillus nidulans* y *Penicillium* evolucionó en forma distinta a *A. chrysogenum*, perdiendo el segundo clúster con los genes tardíos de la biosíntesis de CPC (Brakhage *et al.*, 2009).

1.3.4. Regulación de la biosíntesis de CPC

La complejidad de la biosíntesis de CPC y de sus precursores implica diferentes niveles de regulación. Existe evidencia de mecanismos reguladores que actúan tanto a nivel de la transcripción de los genes biosintéticos como sobre la actividad de las enzimas involucradas. Además, la absorción y disponibilidad de precursores, la compartimentación de la biosíntesis y la exportación son posibles puntos de regulación con influencia sobre la producción de CPC.

1.3.4.1. Precursores y vías de competencia

La biosíntesis de todos los antibióticos beta-lactámicos está basada primariamente en la disponibilidad de tres aminoácidos: ácido L- α -aminoadípico (L- α -AAA), L-cisteína, y L-valina. Mientras que los dos últimos son aminoácidos ubicuos, el L- α -AAA es un intermediario en la ruta de biosíntesis de L-lisina en hongos.

1.3.4.1.1. Disponibilidad de L- α -AAA

Las bacterias productoras de antibióticos beta-lactámicos cuentan con su propia ruta de biosíntesis para el L- α -AAA; sin embargo, en los hongos no ocurre así. La biosíntesis de L-lisina en hongos comienza con la condensación de α -cetoglutarato y acetil-CoA, lo que da lugar a la formación de homocitrato, que después de ser isomerizado experimenta una descarboxilación oxidativa seguida de una aminación para formar L- α -AAA.

Posteriormente, el L- α -AAA es convertido a α -AA- δ -semialdehído mediante la acción de la α -aminoadipato reductasa para dar lugar a la formación de L-lisina.

Dado que el L- α -AAA es el punto de ramificación entre las rutas de competencia de la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos en hongos y de L-lisina, su disponibilidad intracelular resulta ser un parámetro muy importante en la regulación de la biosíntesis de CPC. Se ha observado que altas concentraciones de L-lisina disminuyen la formación de CPC en *A. chrysogenum*, y que la adición de L- α -AAA revierte el efecto. El efecto de la L-lisina sobre el pool de antibióticos beta-lactámicos puede ser el resultado de inhibición por retroalimentación, o de represión de ciertos genes y enzimas en la ruta de biosíntesis de L-lisina.

1.3.4.1.2. Disponibilidad de L-valina

Otro factor crucial para la iniciación de la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos es la disponibilidad de L-valina. La biosíntesis de este aminoácido se encuentra estrechamente relacionada con la ruta biosintética de la leucina. Su formación comienza con la conversión de dos moles de piruvato a α -acetolactato, el cual posteriormente es reducido a α,β -dihidroxisoalerato y cetoisoalerato para, finalmente, formar L-valina. Se ha visto que en *A. chrysogenum* altos niveles de L-valina inhiben por retroalimentación los primeros pasos de la ruta, aunque no se han observado otros efectos competitivos de la biosíntesis de L-valina con la biosíntesis de CPC.

1.3.4.1.3. Disponibilidad de L-cisteína

Otro paso limitante en la biosíntesis de CPC es la disponibilidad de L-cisteína, la cual puede formarse mediante cuatro rutas distintas: 1) vía autotrófica, por la cual se asimila azufre inorgánico mediante la serina *O*-acetiltransferasa y la *O*-acetilserina sulfhidrilasa; 2) vía de la sulfhidrilación directa, en la que se incorpora un azufre reducido al intermediario *O*-acetil-L-serina para formar L-cisteína; 3) vía de la transulfuración, en la que la incorporación del azufre es catalizada por la *O*-acetilhomoserina sulfhidrilasa; y 4) transulfuración reversa, en la cual el azufre de la L-metionina es transferido hacia la L-cisteína a través de otros cuatro intermediarios. Aunque *A. chrysogenum* es capaz de llevar a cabo las cuatro rutas, utiliza preferentemente la vía de la transulfuración reversa

para abastecerse de la L-cisteína necesaria para la biosíntesis de CPC; mientras que, el resto de L-cisteína esencial para su metabolismo es obtenido por la vía autotrófica.

1.3.4.1.4. Disponibilidad de D-L-metionina

Ahora se sabe que el azufre incorporado de la L-metionina es el precursor efectivo del átomo de azufre presente en la molécula de CPC. Se ha observado que altos niveles de metionina en el medio de cultivo, particularmente del isómero D-, estimulan significativamente la producción de antibióticos beta-lactámicos, y que tales cantidades de metionina son necesarias para alcanzar una producción óptima de CPC, debido posiblemente a la degradación de la misma por acción de las aminoácido oxidasas intracelulares (Martín y Demain, 2002).

La disponibilidad de metionina parece jugar dos papeles muy importantes en la biosíntesis de CPC: por un lado, es el principal proveedor de L-cisteína mediante la vía de la transulfuración reversa, y por el otro parece tener también un efecto inductor sobre los genes biosintéticos de CPC (Velasco *et al.*, 1994).

1.3.4.2. Influencia del fosfato y oxígeno

Se ha observado que un exceso de fosfato tiene un efecto negativo sobre la producción de CPC en *A. chrysogenum*, posiblemente debido a que el fosfato incrementa la tasa de consumo de glucosa, acelerando por lo tanto la represión catabólica por fuente de carbono. También se ha sugerido que el fosfato podría actuar sobre las enzimas IPNS y DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa formando complejos con el hierro requerido para la actividad enzimática (Lübbe *et al.*, 1984).

La disponibilidad de oxígeno es muy importante para la producción de antibióticos beta-lactámicos. Una buena aireación siempre es un prerequisite para obtener altos títulos de tales antibióticos, posiblemente debido a que las mismas enzimas IPNS y DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa requieren también de oxígeno para llevar a cabo su actividad (Hilgendorf *et al.*, 1987).

1.3.4.3. Regulación a nivel transcripcional

Hasta antes de la década de los 90 del siglo pasado, el conocimiento que se tenía acerca de la regulación de la biosíntesis de CPC provenía solamente de mediciones de productos e intermediarios. Tras la clonación y secuenciación de los genes biosintéticos se facilitó en gran medida el análisis de la regulación a nivel transcripcional.

1.3.4.3.1. Efecto regulador de la metionina

La metionina tiene un efecto estimulador sobre la producción de CPC, aumentando principalmente los niveles de transcripción de los genes *pcbAB*, *pcbC*, *cefEF* y *cefG* (Velasco *et al.*, 1994; Martín y Demain, 2002). Además, en la región intergénica de los genes *pcbAB* y *pcbC* se ha encontrado una región consenso CANNTG que es reconocida por ciertos factores de transcripción bHLH (hélice-bucle-hélice) involucrados en las vías de señalización del control por azufre en *Saccharomyces cerevisiae*, lo que parece sugerir una señalización cruzada de la regulación por azufre con la biosíntesis de CPC (Velasco *et al.*, 1994).

1.3.4.3.2. Represión catabólica por fuente de carbono

La glucosa promueve el crecimiento en los hongos productores de antibióticos beta-lactámicos, pero a altas concentraciones tiene un efecto negativo sobre la producción de los mismos. En la cepa silvestre de *A. chrysogenum* un 6.3% de glucosa provoca que la transcripción de los genes *pcbC* y *cefEF* se vea totalmente inhibida o disminuida. En *Aspergillus nidulans* y *Trichoderma reesei* la represión de la transcripción por glucosa se encuentra regulada por los represores CREA y CRE1, respectivamente. En *A. chrysogenum* se logró identificar y aislar el gen codificante para una proteína CRE1 con alta similitud con los represores CRE de *A. nidulans* y *T. reesei*. La proteína CRE1 de *A. chrysogenum*, al igual que las otras dos, contiene dos dedos de zinc del tipo Cys₂-Hys₂, los cuales reconocen secuencias de unión consenso 5'-SYGGRG-3'. Los promotores de los genes *pcbC* y *cefEF* contienen varios sitios supuestos de unión a CRE1, a través de los cuales el factor de transcripción podría reprimir la expresión de dichos genes. Además, el factor CRE1 se encuentra autorregulado, al presentar sitios de unión para CRE1 en las regiones promotoras del gen codificante *cre1* (Schmitt *et al.*, 2004b).

1.3.4.3.3. CPCR1 Regulador de cefalosporina C 1

Buscando proteínas que interactuaran con las regiones promotoras de los genes biosintéticos de CPC se logró identificar el factor de transcripción CPCR1, el cual es el primer miembro de la familia RFX de factores de transcripción descrito en hongos. Los factores RFX forman parte de un grupo de proteínas de unión al ADN que contienen el motivo hélice-giro-hélice modificado conocido como "winged helix" y se encuentran involucradas en mecanismos de regulación que no son específicos para la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos en hongos, tales como la reparación del ADN, divisiones meióticas e, incluso, la respuesta inmune en los humanos. Además del dominio de unión al ADN, la proteína CPCR1 presenta un sitio de homodimerización, sin el cual su actividad resulta nula. CPCR1 se une en forma de dímero al promotor de los genes *pcbAB* y *pcbC* y promueve su transcripción, aunque es más probable que su interacción se dé preferentemente con otro tipo de proteínas reguladoras (Schmitt *et al.*, 2004a).

1.3.4.3.4. Regulador global *velvet* (AcVEA)

En hongos, el producto del gen *velvet* (*veA*) es un regulador global de la morfogénesis. Mientras que la conidiación ocurre siempre en presencia de luz (en las cepas silvestres), una mutación en el gen *veA* elimina tal dependencia resultando en cepas capaces de producir conidios aún en la oscuridad. La eliminación completa del gen *veA* origina cepas incapaces de producir estructuras sexuales (cleistotecio), y la sobreexpresión del gen permite el desarrollo de cleistotecio aún en condiciones desfavorables. Estas observaciones condujeron a la conclusión de que el producto del gen *veA* regula negativamente el desarrollo asexual, a la vez que regula positivamente el desarrollo sexual. Además, también regula la expresión de los genes biosintéticos de beta-lactámicos en *A. nidulans*. En *A. chrysogenum* el polipéptido AcVEA regula positivamente la expresión transcripcional de los seis genes biosintéticos de CPC. La interrupción del gen *AcveA* disminuye la expresión de los genes biosintéticos, particularmente del gen *cefEF*, y, por lo tanto, disminuye drásticamente la producción de CPC en aproximadamente el 80% (Dreyer *et al.*, 2007).

1.3.4.3.5. Regulación por pH ambiental de la biosíntesis de CPC

Para sobrevivir y proliferar, los microorganismos se tienen que adaptar al pH de su ambiente. La adaptación al pH ambiental requiere no sólo de un sistema homeostático interno, sino también de medios para asegurar que las moléculas directamente expuestas al ambiente, tales como permeasas, enzimas secretadas y metabolitos exportados, sean sintetizados solamente con valores de pH en los cuales puedan funcionar (Peñalva *et al.*, 2008). Muchos hongos filamentosos son capaces de sobrevivir y crecer en un amplio intervalo de pH ambiental, el cual puede ser tan ácido como 2 o tan alcalino como 10. Aparte de su capacidad homeostática, estos organismos tienen que adaptar la secreción de enzimas y de metabolitos secundarios en respuesta al pH ambiental. Tanto las penicilinas como las cefalosporinas se producen en cantidades elevadas siempre a pH ambiental alcalino (Schmitt *et al.*, 2004b).

La regulación genética mediada por el pH ambiental es un sistema ampliamente utilizado en el reino de los hongos, y su mejor caracterización se ha realizado en el ascomiceto *Aspergillus nidulans*. Existen siete genes involucrados en la regulación por pH: *pacC*, que codifica el factor de transcripción PacC, y los genes *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* y *palI*, cuyos productos, junto con el factor de transcripción PacC, conforman toda una ruta de señalización en respuesta al pH ambiental (revisado por Peñalva *et al.*, 2008).

PacC es un factor de transcripción importante para la expresión genética en respuesta al pH ambiental en los hongos filamentosos. Contiene tres dedos de zinc Cys₂-Hys₂, de los cuales solamente dos hacen contacto con el sitio de unión al ADN mientras que el dedo uno interactúa con el dedo dos. PacC se une a sitios consenso de unión 5'-GCCAAG-3' en las regiones promotoras de los genes que regula (Espeso *et al.*, 1997).

En condiciones ácidas predomina la forma PacC⁷², el producto de traducción de 72 kDa, conformado por 674 aminoácidos. Tres regiones de interacción de PacC⁷² lo mantienen aparentemente en una forma inactiva, previniendo su procesamiento proteolítico. Con el cambio del pH ambiental a neutro y/o alcalino, PacC⁷² experimenta dos roturas proteolíticas sucesivas. La primera es dependiente de la señal de transducción por pH, en la que una proteasa señalizadora rompe PacC⁷² a nivel de la "caja de la proteasa señalizadora" de 24 residuos, eliminando aproximadamente 180 aminoácidos del extremo C-terminal, para formar un producto de alrededor de 495 aminoácidos, conocido como el intermediario PacC⁵³ (Díez *et al.*, 2002).

Los productos de los genes *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* y *palI* son los que transmiten la señal de pH ambiental alcalino a PacC.

PalH es un receptor de siete dominios transmembranales (7TMD). Por su localización en la membrana plasmática, podría desempeñar un papel como sensor del pH extracelular (Negrete-Urtasun *et al.*, 1999). El extremo C-terminal de PalH interactúa fuertemente con PalF, la cual es una proteína del tipo de las arrestinas, que facilitaría la regulación cascada abajo de la señalización mediada por receptores 7TMD (Herranz *et al.*, 2005; Lefkowitz y Shenoy, 2005).

PalI se localiza también en la membrana plasmática y su papel es importante debido a que ayuda a la localización de PalH en la membrana plasmática (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2007). Además, también podría funcionar como un sensor del pH extracelular (Denison *et al.*, 1998).

PalA y PalB forman parte de un complejo de transporte endosomal que también es requerido para la señalización por pH. PalA se une a PacC mediante dos motivos YPXL que flanquean el sitio de rotura por la proteasa señalizadora y lo secuestran al complejo endosomal. PalB es una proteína del tipo de las calpaínas y posiblemente desempeñe el papel de la proteasa señalizadora que da lugar a PacC⁵³ (Rodríguez-Galán *et al.*, 2009). El papel que desempeña PalC permanece incierto aún, posiblemente interactúe como un mediador entre el complejo de la membrana plasmática y el complejo de transporte endosomal (Peñalva *et al.*, 2008).

La siguiente rotura es independiente del pH ambiental y es catalizada por el proteosoma, que elimina aproximadamente otros 245 residuos del extremo C-terminal, dejando intacta la región de los dedos de zinc (dominio de unión al ADN) y dando lugar a la forma funcional PacC²⁷, de alrededor de 250 residuos. En condiciones ácidas, las interacciones intramoleculares de PacC⁷² prevendrían el acceso al proteosoma (Hervás-Aguilar *et al.*, 2007).

PacC²⁷ se une entonces a los sitios blanco en los promotores de genes expresados preferencialmente a pH alcalino para activar su expresión, y etiqueta sitios en los promotores de los genes expresados preferentemente a pH ácido para prevenir su expresión (Peñalva *et al.*, 2008). La activación del factor de transcripción PacC mediada por la señalización del pH ambiental en *A. nidulans* se resume en la figura 4.

Las mutaciones de inactivación en cualquiera de los seis genes de la ruta de Pal y en *pacC* se traducen en un fenotipo de mimetismo ácido, y conducen a la alta expresión de

los genes que se expresan preferencialmente en condiciones ácidas y a bajos niveles de expresión de los genes expresados en condiciones alcalinas (Peñalva y Arst, 2004).

Al truncar PacC⁷² entre 250 y 586 residuos del extremo C-terminal se origina lo contrario: un fenotipo de mimetismo alcalino, en el cual los genes expresados preferencialmente en condiciones alcalinas son altamente expresados; mientras que, los genes expresados preferencialmente en pH ácido se expresan pobremente (Orejas *et al.*, 1995; Espeso y Arst, 2000).

Varios genes o funciones son regulados por el factor de transcripción PacC, particularmente los genes que codifican para enzimas extracelulares, permeasas, y enzimas involucradas en la exportación o síntesis de metabolitos secundarios. Además, la existencia de cinco posibles sitios de unión a PacC en la región promotora del gen *pacC* de *A. chrysogenum* sugieren una fuerte autorregulación del gen (Schmitt *et al.*, 2004b). Aunque PacC no es un regulador específico de la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos, sí tiene un efecto general sobre la expresión de los genes biosintéticos de los mismos.

En *A. chrysogenum*, la región promotora intergénica entre los genes *pcbAB* y *pcbC* contiene dos sitios de unión para PacC. Lo mismo ocurre en el caso de las regiones promotoras de los genes *cefEF* y *cefG*, genes específicos de la biosíntesis de cefalosporinas (Schmitt *et al.*, 2001).

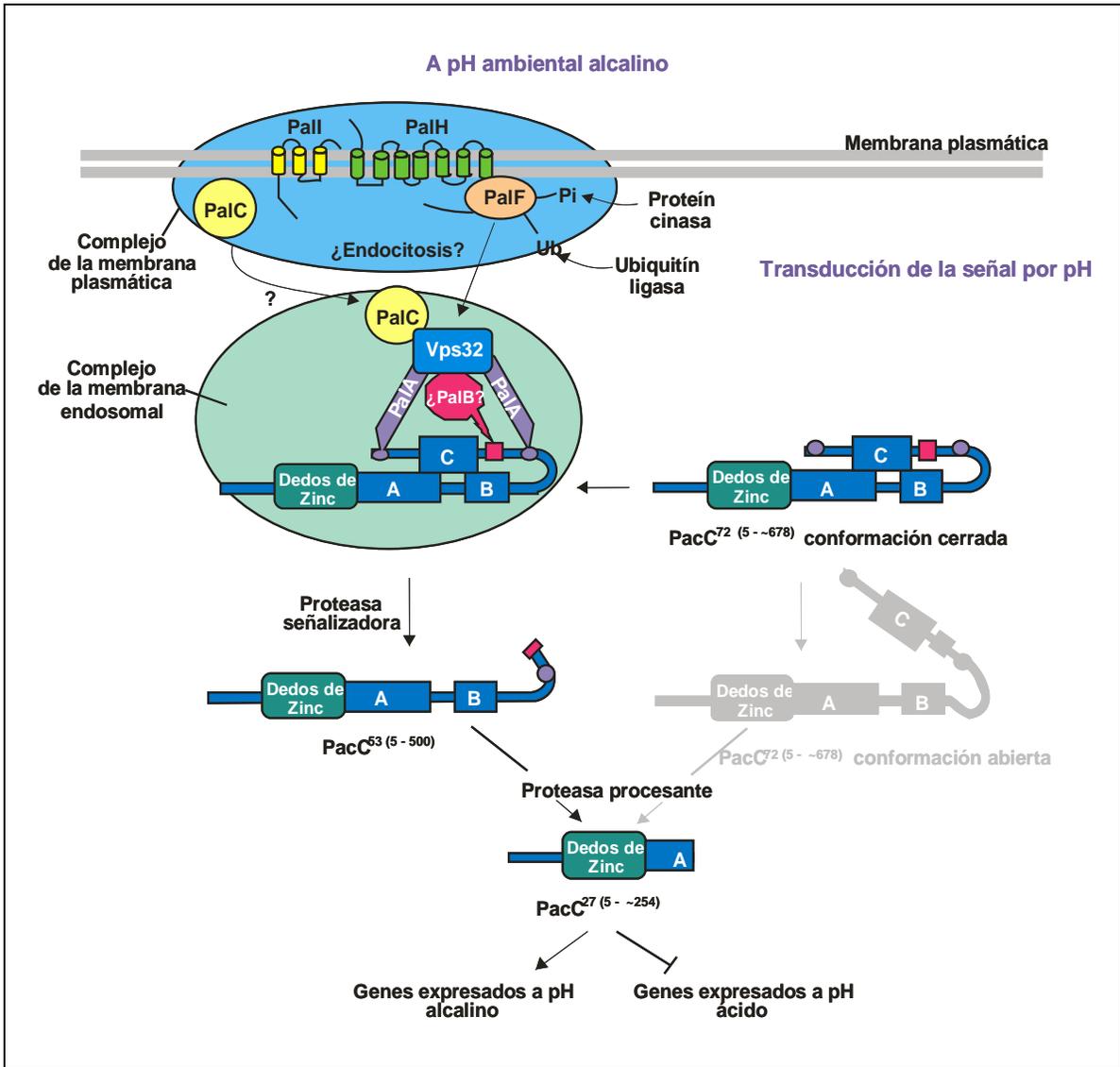


Fig. 4. Activación del factor de transcripción PacC mediada por la señalización del pH ambiental (Peñalva, 2008).

2. ANTECEDENTES

2.1. Estudios sobre el mejoramiento genético de la producción de cefalosporinas.

La aplicación de los antibióticos para uso clínico comenzó con el descubrimiento de la eficacia de la penicilina en el tratamiento de algunas infecciones (Fleming, 1929), lo que significó el descubrimiento más importante en toda la historia de la medicina. Posteriormente, el descubrimiento de la cefalosporina (Brotzu, 1948) generó un nuevo grupo de antibióticos beta-lactámicos clínicamente significativos. Desde entonces, la utilización de antibióticos en la terapia de enfermedades infecciosas ha salvado más vidas que cualquier otro desarrollo médico.

Gracias al avance en el conocimiento de las técnicas bioquímicas y moleculares se ha logrado describir las rutas biosintéticas de los antibióticos beta-lactámicos en hongos productores, así como su regulación a nivel molecular. Y aunque el mayor progreso se ha alcanzado con estudios de la biosíntesis de penicilina en *Aspergillus nidulans* y *Penicillium chrysogenum*, actualmente se tiene también descrita la ruta de biosíntesis de CPC en *Acremonium chrysogenum* y algunos de sus mecanismos de regulación (Schmitt *et al.*, 2004b).

El creciente conocimiento en la genética molecular de la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos ha abierto nuevas posibilidades para mejorar de manera racional las cepas productoras de tales antibióticos, y uno de los blancos más importantes desde entonces ha sido también el hongo productor de CPC, *Acremonium chrysogenum*.

Un prerequisite para realizar ingeniería molecular es la disponibilidad de las herramientas moleculares adecuadas: promotores fuertes o inducibles, marcadores de selección para transformación, plásmidos y métodos de integración eficientes, etc. En la década de los 80 del siglo pasado se logró finalmente la obtención de un sistema eficiente de transformación integrativa para *A. chrysogenum* (Queener *et al.*, 1985; Skatrud *et al.*, 1987). A partir de entonces se han utilizado tres diferentes marcadores de selección: los genes bacterianos para la resistencia a higromicina B y fleomicina, y una versión mutada del gen de la β -tubulina de *A. chrysogenum*, que confiere resistencia al fungicida benomilo. Con tales herramientas moleculares disponibles, se han realizado esfuerzos por tratar de mejorar genéticamente la producción de CPC. Algunas de las estrategias utilizadas han sido: el aumento en el número de copias de los genes biosintéticos, la

utilización de promotores más fuertes y el mejoramiento del metabolismo aeróbico. Algunos ejemplos se describen a continuación.

En 1989, Skatrud y Queener amplificaron el gen *pcbC* en *A. chrysogenum*, sin obtener un incremento significativo en la producción de CPC. Esto estaría indicando que la actividad isopenicilina N sintasa (o ciclasa) no es una etapa limitante en la biosíntesis de los antibióticos beta-lactámicos.

Ese mismo año, Skatrud *et al.* (1989) reportaron un incremento del 15% en la producción de CPC utilizando una cepa industrial de *A. chrysogenum* (394-4) transformada con una copia extra del gen *cefEF* (DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa); aunque, sin ellos saberlo, el gen *cefG* también iba presente en la transformación. Poco después Mathison *et al.* (1993) clonaron solamente el gen *cefG* y lo transformaron en la cepa silvestre de *A. chrysogenum*, aumentando su número de copias cerca de cinco veces. Con ello, obtuvieron un aumento de tres veces en la producción de CPC, demostrando que solamente las copias adicionales del gen *cefG* y los niveles correspondientes de su ARNm estaban directamente relacionadas con los títulos de CPC, y sugiriendo que esta enzima podría ser un paso limitante en la ruta biosintética.

En otra investigación se utilizó también el gen *cefG*, aunque expresado bajo el control del promotor constitutivo del gen *gpdA* de *Aspergillus nidulans* y del promotor fuerte no constitutivo del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum*. En general, se observó un alto nivel de transcripción del gen en todas las transformantes obtenidas, confirmando que el gen *cefG* es limitante para la biosíntesis de CPC (Gutiérrez *et al.*, 1997).

Dado que la biosíntesis de CPC se ve regulada también por el contenido de oxígeno en el medio (Hilgendorf *et al.*, 1987) y que bajos niveles de éste reducen drásticamente la producción de CPC, DeModena *et al.* (1993) mejoraron el metabolismo aeróbico de *A. chrysogenum* al expresar el gen *vgb* de *Vitreoscilla sp.* (que codifica para una proteína bacteriana de tipo hemoglobina) bajo el control del promotor constitutivo TR1 de *Trichoderma reesei*. El resultado fue la obtención de títulos de CPC hasta 5 veces más altos que los controles.

Otro ejemplo interesante lo constituyó el aumento en el número de copias del gen *mecB*, el cual codifica para la enzima cistationina- γ -liasa, necesaria para la biosíntesis de cisteína vía transulfuración reversa. Algunas de las transformantes obtenidas con múltiples copias del gen *mecB* mostraron alta actividad de la enzima, y una de ellas mostró alta producción de cefalosporina, concluyéndose que sólo los niveles moderadamente incrementados de cistationina- γ -liasa estimulan la producción de CPC,

pero en exceso son perjudiciales tanto para el crecimiento como para la producción (Kosalková *et al.*, 2001).

En 2004 Ullán *et al.* introdujeron copias adicionales de un fragmento que contenía los genes *cefD1* y *cefD2* de *A. chrysogenum*, obteniendo como resultado un incremento del 80-100% en la producción de CPC.

Otra razón para la construcción de cepas de *A. chrysogenum* modificadas genéticamente es el intento de producir otros intermediarios de las cefalosporinas de uso clínico, que sean más rentables que la misma CPC en cuanto a modificaciones químicas. Tal es el caso del ácido 7-amino cefalosporánico (7-ACA) y del ácido 7-amino desacetoxicefalosporánico (7-ADCA), los cuales usualmente se obtienen enzimáticamente o químicamente a partir de la CPC o de la penicilina G. En un intento por obtener 7-ACA directamente por la conversión de CPC, Isogai *et al.* (1991) transformaron *A. chrysogenum* con el ADNc para una D-aminoácido oxidasa de *Fusarium solani* y el gen de una glutaril acilasa proveniente de *Pseudomonas diminuta*, con lo que lograron obtener cantidades detectables de 7-ACA en los caldos de fermentación, aunque sin ser comercialmente significativas.

En otro ejemplo, Velasco *et al.* (2000) obtuvieron 7-ADCA utilizando la desacetoxicefalosporina C (DAOC) producida endógenamente por *A. chrysogenum*. En primer lugar, obtuvieron una cepa de *A. chrysogenum* que acumulaba DAOC, al interrumpir el gen *cefEF* y reemplazar su actividad por la del producto del gen *cefE* de *Streptomyces clavuligerus* expresado bajo el control del promotor del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum*. A continuación, la DAOC obtenida fue transformada a ácido 7-amino desacetoxicefalosporánico (7-ADCA) mediante dos reacciones enzimáticas consecutivas, catalizadas por una D-aminoácido oxidasa (DAO) de *Rhodotorula gracilis* y una glutaril oxidasa (GLA) de *Acinetobacter sp.*

Crawford *et al.* (1995) expresaron el gen *cefEF* de *A. chrysogenum* en *P. chrysogenum* con el propósito de utilizar su actividad expandasa/hidroxilasa para formar ácido adipoil-7-amino desacetilcefalosporánico (adipoil-7-ADAC) a partir de la adición de ácido adípico al medio de crecimiento. Después, se transformó la cepa obtenida con una copia del gen *cefG* de *A. chrysogenum*, lo que permite la conversión del adipoil-7-ADAC en ácido adipoil-7-amino cefalosporánico (adipoil-7-ACA), que mediante una conversión *in vitro* mediada por una glutaril-7-ACA-acilasa, originaría finalmente el 7-ACA (Monti *et al.*, 2000).

Otra estrategia novedosa consistió en expresar todo el clúster de cefalosporina (*cefD1*, *cefD2*, *cefEF* y *cefG*) de *A. chrysogenum* en una cepa de *P. chrysogenum* a la que le faltaba la actividad isopenicilina N aciltransferasa, resultando en la acumulación intracelular de cantidades significativas de cefalosporina C y desacetilcefalosporina C (Ullán *et al.*, 2007). Sin embargo, la cepa recombinante de *P. chrysogenum* carece aún de un mecanismo eficiente para la secreción de la CPC.

En 2008, Nijland *et al.* expresaron los genes *cefEF* y *cmcH* de *A. chrysogenum* y *Streptomyces clavuligerus*, respectivamente, en *P. chrysogenum* para conseguir la formación de ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cephem-4-carboxílico (ad7-ACCCA). Posteriormente, expresaron también el gen *cefT* de *A. chrysogenum* y obtuvieron una producción dos veces mayor de cefalosporina a partir de *P. chrysogenum*, demostrando que la producción de cefalosporinas por *P. chrysogenum* está limitada por la capacidad del hongo para secretar tales compuestos.

Recientemente, Liu *et al.* (2010) realizaron construcciones plasmídicas con combinaciones de los genes *cefEF*, *cefG* y *cefT* de *A. chrysogenum* y el gen *vgb* de *Vitreoscilla sp.* y transformaron con ellas una cepa industrial de *A. chrysogenum* (84-3-8), encontrando que varias transformantes con múltiples copias del gen *cefG* aumentaron significativamente la producción de CPC, y que la mejor combinación que aumentó drásticamente la producción fue una copia extra de los genes *cefG* y *cefEF*, además de la integración del gen *vgb*.

2.2. Estudios sobre la regulación por pH ambiental y mimetismo alcalino en la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos.

Dado que se ha observado que tanto las penicilinas como las cefalosporinas se producen en grandes cantidades bajo condiciones alcalinas, es clara la importancia que tiene el pH ambiental en la determinación de los niveles de transcripción de muchos genes, entre los que se encuentran los que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos (Peñalva *et al.*, 2008). A través de los años, se han realizado varios estudios para comprender mejor el mecanismo de la regulación por pH sobre la producción de tales antibióticos.

Algunos investigadores han realizado mutaciones que desencadenan fenotipos de mimetismo ácido o alcalino en *A. nidulans* y *P. chrysogenum*, observando sobreproducción significativa de penicilina en las cepas modificadas para expresar

mimetismo alcalino. Son siete los genes que se conocen cuyas mutaciones pueden mimetizar los efectos de un crecimiento a pH ambiental distinto del pH verdadero. Las mutaciones en cualquiera de los seis genes *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH*, o *palI*, producen mimetismo de tipo ácido, con niveles elevados de fosfatasa ácida y niveles reducidos de fosfatasa alcalina y producción de penicilina en *A. nidulans*. En contraste, algunas mutaciones en el gen *pacC* mimetizan los efectos de un crecimiento a pH alcalino, entre los que se observan elevados niveles de fosfatasa alcalina y sobreproducción de penicilina (Caddick *et al.*, 1986; Shah *et al.*, 1991; Espeso *et al.*, 1993; Arst *et al.*, 1994). Experimentos de genética clásica mostraron dos principales categorías de mutaciones en el gen *pacC*: 1) mutaciones de mimetismo alcalino, denominadas $pacC^c$ y 2) mutaciones de mimetismo ácido, denominadas $pacC^{+/-}$. El fenotipo $pacC^c$ incluye: niveles reducidos de fosfatasa ácida, fosfodiesterasa y γ -aminobutirato (GABA) permeasa; sensibilidad aumentada a neomicina, elevados niveles de fosfatasa alcalina y penicilina y morfología anormal con conidiación reducida a pH ácido. Las mutaciones $pacC^{+/-}$ muestran fenotipos parecidos a las de los genes *pal*, pero son menos extremas, y manifiestan crecimiento pobre a pH alcalinos.

Las mutaciones que truncan la secuencia original de la proteína PacC, a través de salto de marco o terminación de cadena entre los residuos 464 y 578, originan un fenotipo $pacC^c$. Y las mutaciones que truncan la secuencia entre los residuos 173 y 379 conducen a un fenotipo $pacC^{+/-}$ (Tilburn *et al.*, 1995). Lo anterior se puede observar en la figura 5.

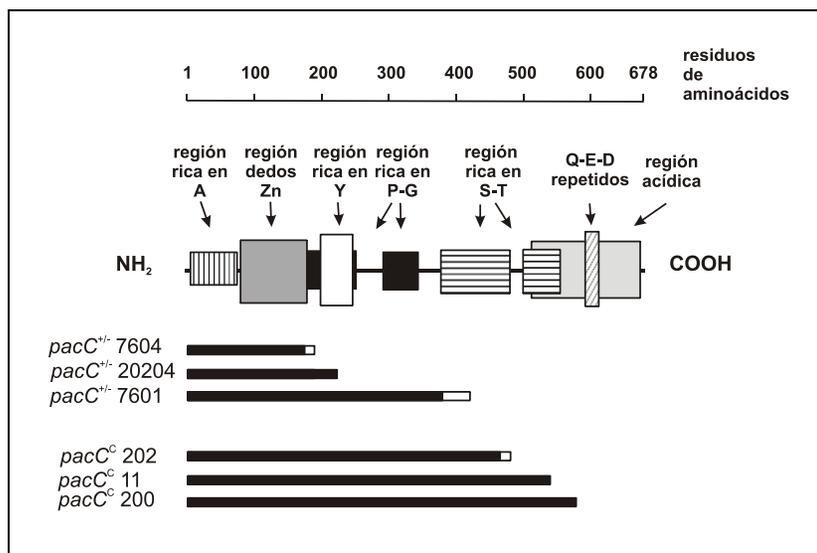


Fig. 5. Proteína PacC esquematizada mostrando los tipos de mutaciones en ella que conducen a fenotipos de mimetismo alcalino ($pacC^c$) y mimetismo ácido ($pacC^{+/-}$) (Tilburn *et al.*, 1995)

Existen muchos otros estudios similares enfocados a la regulación genética por el pH ambiental, principalmente en *A. nidulans*, que involucran mutaciones en los genes de la vía de señalización Pal o en el factor de transcripción PacC (Espeso *et al.*, 1997; Denison *et al.*, 1998; Espeso *et al.*, 2000; Espeso y Arst, 2000; Díez *et al.*, 2002), aunque la mayoría de las mutaciones estudiadas han sido obtenidas a través de métodos de genética clásica, métodos físicos o químicos o mecanismos de recombinación homóloga (Mingot *et al.*, 1999; Peñalva y Arst, 2002; Fernández-Martínez *et al.*, 2003; Flaherty *et al.*, 2008).

Además, los enfoques de estos estudios se han dirigido básicamente a observar los efectos sobre la diferenciación celular, esporulación y patogénesis en microorganismos como *A. nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, etc. Por ello, no existen suficientes estudios que describan los efectos de dichas mutaciones sobre la expresión de los genes biosintéticos (y la producción) de CPC en *Acremonium chrysogenum*.

Recientemente, se llevaron a cabo algunos estudios moleculares sobre la regulación por pH ambiental en la producción de CPC en *A. chrysogenum* (Cuadra, 2008). Los resultados confirmaron la importancia del pH como elemento clave regulador en la producción de CPC, apoyando la hipótesis de que sólo algunos de los genes involucrados en la producción están regulados por el pH ambiental (entre ellos, el gen *cefT* y el gen *cefD2*). Además, se observó el efecto del aumento del número de copias del gen *pacC* en la cepa C10 de *A. chrysogenum*, con lo que se consiguió un aumento del 55% en la producción de CPC por una de las transformantes obtenidas.

El presente trabajo persigue continuar con la misma línea de investigación, utilizando la regulación genética por pH ambiental para intentar incrementar la producción de cefalosporina C.

3. JUSTIFICACIÓN

La cefalosporina C y sus derivados semisintéticos son antibióticos beta-lactámicos de gran interés. Por su alta especificidad, son utilizados eficientemente para el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas causadas por microorganismos resistentes a otros antibióticos; su baja toxicidad provoca además efectos secundarios mínimos en el paciente. Adicionalmente, la continua resistencia microbiana hacia las penicilinas ha cambiado gradualmente la demanda de éstas hacia las cefalosporinas (Weil *et al.*, 1995). Tales características, entre otras, hacen de las cefalosporinas un producto de alto valor agregado, y actualmente se calcula que sus ventas anuales representan el 22% del mercado mundial de antibacterianos (Kresse *et al.*, 2007).

Todas las cefalosporinas comerciales son semisintéticas y derivan principalmente del 7-ACA (ácido 7-amino cefalosporánico) y del ácido 7-amino desacetoxicefalosporánico (7-ADCA), los cuales se sintetizan mediante diferentes métodos químicos o enzimáticos a partir de la CPC. Actualmente, *Acremonium chrysogenum* es el único productor conocido de CPC. Sin embargo, aún después de 50 años de fermentación y algunos intentos de mejoramiento genético, la producción de CPC no es completamente satisfactoria, en comparación con los títulos de penicilina obtenidos por cepas productoras de *P. chrysogenum* (Elander, 2003). Esto conduce a la búsqueda de nuevas estrategias fisiológicas o de mejoramiento genético que permitan alcanzar producciones satisfactorias de CPC.

La aplicación de las técnicas del ADN recombinante en otros hongos y el diseño de nuevas rutas metabólicas han permitido obtener excelentes incrementos en la producción de metabolitos secundarios de interés industrial (Diez *et al.*, 1997). Por tal razón, la aplicación de la ingeniería genética, basada en los grandes avances en el conocimiento de la biología molecular de la biosíntesis de compuestos beta-lactámicos y sus niveles de regulación, surge como una posibilidad interesante para desarrollar cepas mejoradas de *A. chrysogenum* sobreproductoras de CPC.

El conocimiento actual acerca de la regulación por el pH ambiental de la expresión de genes cuyos productos finales deben funcionar extracelularmente, como es el caso de los antibióticos beta-lactámicos, y la participación clave del factor de transcripción PacC como regulador positivo de la expresión de los genes *pcbAB*, *pcbC*, *cefEF* y *cefG* (necesarios para la biosíntesis de CPC), hacen del gen *pacC* un blanco interesante para el mejoramiento genético de *A. chrysogenum*. Existe la posibilidad de que mutaciones

específicas en el gen *pacC*, que originen un fenotipo de mimetismo alcalino (*pacC*^c) en *A. chrysogenum*, puedan mejorar la producción de CPC. Tal estrategia podría resultar atractiva desde el punto de vista comercial, proporcionando nuevas expectativas sobre la mejora de la producción de antibióticos beta-lactámicos por microorganismos de interés industrial.

4. HIPÓTESIS

Con base en los conocimientos sobre la regulación genética por pH ambiental y la participación clave del factor de transcripción PacC (en su conformación activa, PacC²⁷) en la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos, en *Acremonium chrysogenum*, el presente trabajo se propuso demostrar la siguiente hipótesis:

Si se amplifica por PCR un fragmento del gen *pacC* de *A. chrysogenum* que codifique sólo para la forma funcional del factor de transcripción PacC²⁷ (truncado en el residuo Ser²⁵⁵) y se expresa en *A. chrysogenum*, ya sea bajo el control de su propio promotor o de un promotor constitutivo, la producción de antibióticos beta-lactámicos (al ser un proceso regulado positivamente por PACC) aumentará de manera significativa en forma independiente del pH ambiental.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Obtener una mutación de mimetismo alcalino en el factor de transcripción PacC de *Acremonium chrysogenum* y evaluar su efecto sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos.

5.2. Objetivos particulares

- ❑ Amplificar el gen *pacC* truncado en la base 1764 de la secuencia reportada por Schmitt *et al.* (2001), de manera que codifique directamente para la forma funcional del factor de transcripción PacC²⁷.
- ❑ Construir un vector de expresión para el gen *pacC* modificado, utilizando su propio promotor.
- ❑ Construir un vector de expresión para el gen *pacC* truncado, utilizando un promotor de expresión constitutiva.
- ❑ Transformar la cepa silvestre de *A. chrysogenum* con los vectores de expresión.
- ❑ Evaluar los efectos de la mutación sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos en *A. chrysogenum*.
- ❑ Comprobar la integración de los vectores y la expresión de la mutación en las cepas transformantes.

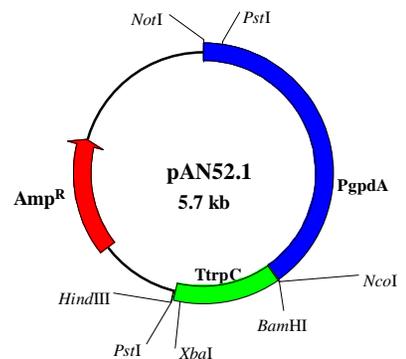
6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas

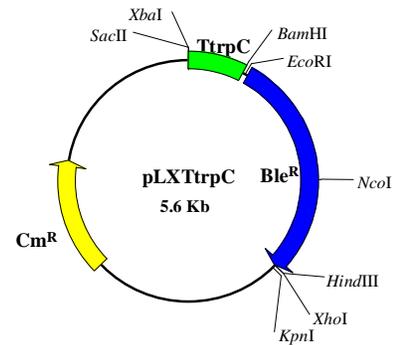
- *Acremonium chrysogenum* ATCC 11550 (Brotzu): Cepa silvestre, productora de cefalosporina C, desacetilcefalosporina C y penicilina N.
- *Escherichia coli* DH5a: Cepa utilizada para experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite la obtención de células quimiocompetentes y electrocompetentes con alta eficiencia de transformación (hasta 1×10^8 transformantes/ μg de ADN). Posee una deleción en el gen *lacZ*, lo que permite seleccionar de manera fácil colonias transformantes con plásmidos capaces de originar α -complementación.
- *Escherichia coli* XL1-Blue: Cepa utilizada para experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite la obtención de células competentes por el método químico y electrocompetentes con alta eficiencia de transformación (hasta 1×10^9 y 7.5×10^9 transformantes/ μg de ADN, respectivamente). También permite la selección por el mecanismo de α -complementación.
- *Escherichia coli* ESS2231: Cepa supersensible a antibióticos beta-lactámicos, utilizada para la cuantificación de cefalosporina C mediante bioensayo.

6.2. Vectores plasmídicos.

- pAN52.1 (Punt *et al.*, 1990): Plásmido derivado del pUC19, con el promotor del gen *gpd* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) de *A. nidulans* y el terminador *TtrpC* (región de terminación de la transcripción del gen *trpC*). Contiene también un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en *Escherichia coli*.



- **pLXTrpC** (Cuadra, 2008): Plásmido derivado del pULC43 reportado por Gutiérrez (1994), el cual contiene un marcador de selección en hongos conformado por el gen de resistencia a fleomicina (*ble*) de *Streptoalloteichus hindustanus* expresado bajo la región promotora del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum* y la región de terminación de la transcripción del gen *cyc1* de *Saccharomyces cerevisiae*. También contiene un gen de resistencia bacteriana a cloranfenicol. El plásmido pLXTrpC contiene además la región terminadora del gen *trpC* (proveniente del pAN52.1) unida al sitio múltiple de clonación.



6.3. Medios de cultivo

6.3.1. Medios de cultivo para bacterias

LB o Luria-Bertani (Medio de cultivo para *Escherichia coli*, Miller, 1972) (g/L):

Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Agar (medio sólido)	20
Ajustar pH a 7.5	

TB (Medio de cultivo para *E. coli*, para la obtención de ADN plasmídico, Sambrook y Rusell, 2001) (g/L):

Extracto de levadura	24
Bactotripton	10
Glicerol	4 mL
Se añade agua destilada hasta 900 mL, después de esterilizar se añaden 100 mL de una solución estéril de KH_2PO_4 170 mM y K_2HPO_4 720 mM.	

GYT (Medio de cultivo para almacenar células electrocompetentes de *E. coli*, Sambrook y Rusell, 2001) (g/L):

Glicerol	100 mL
Extracto de levadura	1.25
Bactotriptona	2.5

6.3.2. Medios de cultivo para hongos

LPE (Medio de esporulación y mantenimiento, modificado de Le Page y Campbell, 1946) (g/L)

Glucosa	1
Extracto de levadura	2
NaCl	1.5
CaCl ₂	10
Agar	20
Ajustar pH a 6.8	

CCM (Medio completo, Minuth *et al.*, 1982) (g/L)

Caldo de tripticaseína de soya	5
Sacarosa	3
Extracto de levadura	11
Extracto de carne	1
Glucosa	15
NaCl	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .H ₂ O	0.5
FeSO ₄	0.01
Agar (medio sólido)	20
Ajustar pH a 7.0	

MSMA (Medio semilla modificado, Adinarayana *et al.*, 2003) (g/L):

Glucosa	10
Sólidos de maceración de maíz	5
Almidón soluble	15
Extracto de levadura	4
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
CaCO ₃	1
Ajustar a pH 7.0	

TSB (Caldo de soya y tripticaseína) (g/L):

Peptona de caseína	16
Peptona de soya	3
Glucosa	2.5
NaCl	6
K ₂ HPO ₄	2.5
Agar	
(Cuando se utilizó para bioensayos se agregaron 10 g/L de agar)	20
Ajustar pH a 7.0	

TSAS (Queener *et al.*, 1985) (g/L):

Sacarosa	103
Peptona de caseína	16
Peptona de soya	3
Glucosa	2.5
NaCl	6
K ₂ HPO ₄	2.5
Agar	20
Ajustar pH a 7.0	

MCFA (Medio complejo de fermentación de *Acremonium*, Caltrider y Niss, 1966) (g/L)

Sacarosa	1
CaCO ₃	1.5
Sólidos de maceración de maíz	5
Melaza de caña	30
Extracto de carne	30
Agar (Medio sólido)	20
Ajustar pH a 6.8.	

MDFAM/MES (Medio definido de fermentación para *A. chrysogenum*, Caltrider *et al.*, 1968) (g/L)

Sacarosa	1.5
Glucosa	5
DL-Metionina	30
Solución de sales N°1	8 mL
Solución de sales N°2	144 mL
Ajustar pH a 5.0	

Solución de sales N°1 (g/L):

Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	2
--	---

Solución de sales N°2 (g/L):

MES (C ₆ H ₃ NO ₄ S.H ₂ O)	185.1
Na ₂ SO ₄ .10H ₂ O	11.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.4
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.05
CaCl ₂	0.34

6.4. Crecimiento de los microorganismos

6.4.1. Crecimiento de *Escherichia coli*

Para el crecimiento de *E. coli* en medio sólido se utilizó normalmente medio LB, o TSB al 1% en el caso de los bioensayos realizados para medir actividad antibiótica de los caldos de fermentación. En el caso de crecimiento en medio líquido, se utilizó principalmente medio LB, o TB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina o 25 µg/mL de cloranfenicol cuando se requirió hacer extracción de ADN plasmídico. La incubación en todos los casos fue a 37 °C durante 12 a 14 horas, con agitación de 200 rpm en el caso del cultivo en medio líquido.

6.4.2. Crecimiento de *A. chrysogenum*

6.4.2.1. Condiciones para la esporulación

Con ayuda de una varilla de vidrio de punta redondeada, se sembró *A. chrysogenum* en placas de LPE o CCM, con aproximadamente 25 mL de medio, y se incubaron a 28 °C durante 6 a 7 días.

6.4.2.2. Condiciones de crecimiento para la obtención de ADN total

Con ayuda de una varilla de vidrio de punta redondeada, se levantó el micelio proveniente de seis placas de medio LPE o CCM sembradas previamente con *A. chrysogenum*, con seis o siete días de crecimiento. El micelio se inoculó en 100 mL de medio líquido CCM y se incubó a 28 °C y 250 rpm durante 48 horas.

6.4.2.3. Condiciones de crecimiento para la preparación de inóculo primario

Cuando se preparó el inóculo para las fermentaciones realizadas, se recogió el micelio proveniente de tres placas de medio CCM y se maceró, con ayuda de perlas de vidrio de 5 mm de diámetro y vortex, en 5 mL de NaCl 0.9 % (v/v) estéril. Se recuperó el

micelio macerado con ayuda de una punta cortada de 5 mL y se preinoculó en 45 mL de medio MSMA, incubándose a 25 °C y 250 rpm durante 38 horas.

6.5. Mantenimiento de los microorganismos

Las cepas de *E. coli* se conservaron a 4 °C en placas de Petri selladas, durante al menos un mes, o en glicerol a -20 °C, en una concentración final del 40%.

Para las cepas de *A. chrysogenum*, se maceró primero el micelio en solución de NaCl 0.9% (v/v) estéril y después se almacenaron a -20 °C en glicerol al 40%. Fue necesario reactivar las cepas cada 3 ó 6 meses, resembrándolos y volviéndolos a almacenar en glicerol.

6.6. Obtención de ADN total de *A. chrysogenum*

La obtención del ADN total de *Acremonium chrysogenum* se realizó de acuerdo al método descrito por Specht *et al.* (1982), modificado por Fernández (1997).

Se recogió el micelio resultante de 100 mL de cultivo de *A. chrysogenum* en medio CCM líquido, a través de un filtro de nylon estéril de 30 µm de diámetro de poro (Nytal, Suiza). El micelio retenido se lavó con un volumen de NaCl al 0.9% (p/v), y en seguida se lavó con otro volumen de amortiguador A¹. Posteriormente, se secó con papel de filtro y se congeló a -70 °C para su posterior liofilización.

Se maceraron 0.5 g de micelio liofilizado con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, y se recogió parte del polvo obtenido en un tubo Eppendorf de 1.5 mL (aproximadamente 25 mg de micelio pulverizado). A continuación se le añadieron 0.5 mL de amortiguador de lisis I², se homogeneizó suavemente la mezcla y posteriormente se le añadieron 0.5 mL de fenol neutro³ y 0.5 mL de CIA⁴. Se mezcló lentamente por inversión y se incubó a 50 °C durante 20 minutos (con mezclas por inversión cada 5 minutos). Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó la mezcla a 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa, la cual

¹ **Amortiguador A:** Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 100 mM pH 8.0

² **Amortiguador de lisis I:** EDTA 100 mM pH 8, SDS 1% (p/v), Tris-HCl 0.2 M. Se ajusta el pH a 8.2

³ **Fenol neutro:** Se mezclan por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con un volumen de Tris-HCl 1 M pH 8.0. Se deja reposar hasta que se separen claramente dos fases. Los lavados se repiten hasta que el fenol alcance un pH neutro. El fenol ácido se prepara mezclando un volumen de fenol en cristales con un volumen de H₂O, se agita y se deja reposar, luego se retira la fase acuosa.

⁴ **CIA:** 24 volúmenes de cloroformo con 1 volumen de alcohol isoamílico.

contiene el ADN total extraído. Posteriormente se eliminaron las proteínas por fenolización y el ARN por tratamiento con ARNasa.

6.6.1. Fenolización

La fase acuosa con el ADN extraído se homogeneizó con un volumen de fenol-neutro, se mezcló suavemente por inversión durante 2 a 5 minutos y después se centrifugó a 14000 rpm durante otros 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo Eppendorf® estéril donde se le agregó medio volumen de fenol neutro y medio volumen de CIA, se mezcló suavemente por inversión de 2 a 5 minutos y se centrifugó en las mismas condiciones del paso anterior. Se repitió esta extracción con fenol-CIA hasta que se obtuvo una interfase limpia (no fueron necesarias más de cinco extracciones). La fase acuosa se recuperó y se homogeneizó solamente con un volumen de CIA, se mezcló por inversión de 2 a 5 minutos y se centrifugó en las condiciones antes descritas.

6.6.2. Precipitación del ADN

Se transfirió la fase acuosa a otro tubo estéril para precipitar el ADN, agregando 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2. Se dejó precipitar durante toda la noche a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 20 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 0.5 mL de etanol al 70% (v/v), se centrifugó nuevamente a 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 5 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El precipitado se dejó secar durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente (el tubo se dejó con la tapa abierta). El ADN, obtenido como un precipitado blanco, se resuspendió en 50 μ L de TE⁵ o en 50 μ L de H₂O destilada estéril y se conservó a 4 °C.

⁵ TE: EDTA 1 mM pH 8.0 y Tris-HCl 10 mM pH 8.0.

6.6.3. Tratamiento con ARNasa

A cada muestra de ADN se le agregó ARNasa⁶ en una concentración final de 100 µg/mL. La mezcla se incubó a 37 °C durante 90 minutos. Pasado el tiempo de incubación se eliminó la ARNasa con una extracción de fenol-CIA y otra de CIA. El ADN se precipitó como en el apartado anterior, y el resultado se visualizó en un gel de agarosa al 0.7%, cuantificándose posteriormente como se indica en la sección 6.8.

6.7. Electroforesis en gel de agarosa

La técnica se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos por Sambrook y Russell (2001) para la electroforesis en gel de agarosa. Se utilizó agarosa en concentraciones de entre el 0.7% y el 1% (p/v), disuelta por calentamiento con microondas en amortiguador TAE 1X⁷. Las muestras de ADN se mezclaron con H₂O destilada estéril y un décimo del volumen final de amortiguador de carga 6X⁸, y se calentaron de 5 a 10 minutos a 65 °C, enfriándose posteriormente en un baño de hielo. Se utilizó amortiguador TAE 1X para sumergir los geles antes de ser cargados con las muestras de ADN y el marcador de peso molecular (1 kb, Promega[®]) previamente preparados. Se les aplicó un voltaje de 10 V/cm de gel durante 45 a 90 minutos (dependiendo del tamaño del gel).

Posteriormente, se tiñeron los geles en un baño de bromuro de etidio⁹ (0.5 µg/mL en agua) durante aproximadamente 20 minutos y después se fotografiaron en un equipo de fotodocumentación Gel Doc II (Bio-Rad).

6.8. Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de las muestras se realizó por espectrofotometría, al mismo tiempo que se verificó su pureza, de acuerdo con Sambrook y Rusell (2001).

⁶ **ARNasa 10 mg/mL.** Se disuelve en Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y NaCl 15 mM. Hervir durante 15 minutos, se enfria lentamente, se reparte en alícuotas y se conserva a -20°C o -70°C.

⁷ **TAE 50X:** Tris base 242 g, ácido acético glacial 57.1 mL, EDTA 0.5 M pH 8.0 100 mL. Agua destilada hasta 1 litro.

⁸ **Amortiguador de carga 6X:** Azul de bromofenol al 0.25% (p/v), sacarosa al 40% (p/v), xilenocianol al 0.25% (p/v). Se esteriliza y se conserva a 4° C.

⁹ **Solución stock de bromuro de etidio:** 10 mg/mL. Se conserva a 4°C.

Se prepararon diluciones en agua y se midieron sus absorbencias a longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm, utilizando agua como blanco. Después se realizaron los cálculos pertinentes utilizando los siguientes criterios:

- ❑ El cociente A_{260}/A_{280} debe ser cercano a 1.8 (ADN) y 2.0 (ARN) si están libres de impurezas que absorben en el ultravioleta. Cocientes menores se deben a contaminación por proteínas, fenol o material insoluble.
- ❑ El cociente A_{260}/A_{230} debe ser mayor que 2 y menor que 2.4 tanto para ADN como para ARN. Cocientes menores se deben a contaminación por una sal de guanidina o por β -mercaptoetanol.
- ❑ Una unidad de densidad óptica a 260 nm ($O.D._{260}$) equivale a la de una solución con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN de doble cadena y a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ARN.

6.9. Amplificación del gen *pacC* por PCR

Se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (Saiki *et al.* 1985) para amplificar, a partir del ADN total de *A. chrysogenum*, un fragmento del gen *pacC*, truncado de manera que se originara una mutación de mimetismo alcalino.

6.9.1. Diseño de cebadores

Se obtuvo la secuencia del gen *pacC* de *Acremonium chrysogenum* contenida en la base de datos de GenBank, con número de acceso AJ251521.1. En la secuencia de aminoácidos correspondiente se localizó el sitio de procesamiento proteolítico alrededor del aminoácido Ser²⁵⁵ (de acuerdo a Schmitt *et al.*, 2001). Con ello se determinó que los productos de amplificación deberían abarcar hasta el par de bases número 971 (correspondiente al sitio de procesamiento). Además, fue necesario añadir un codón de fin de la traducción. La figura 6 esquematiza los sitios de diseño de los cebadores con relación al gen *pacC* y su promotor.

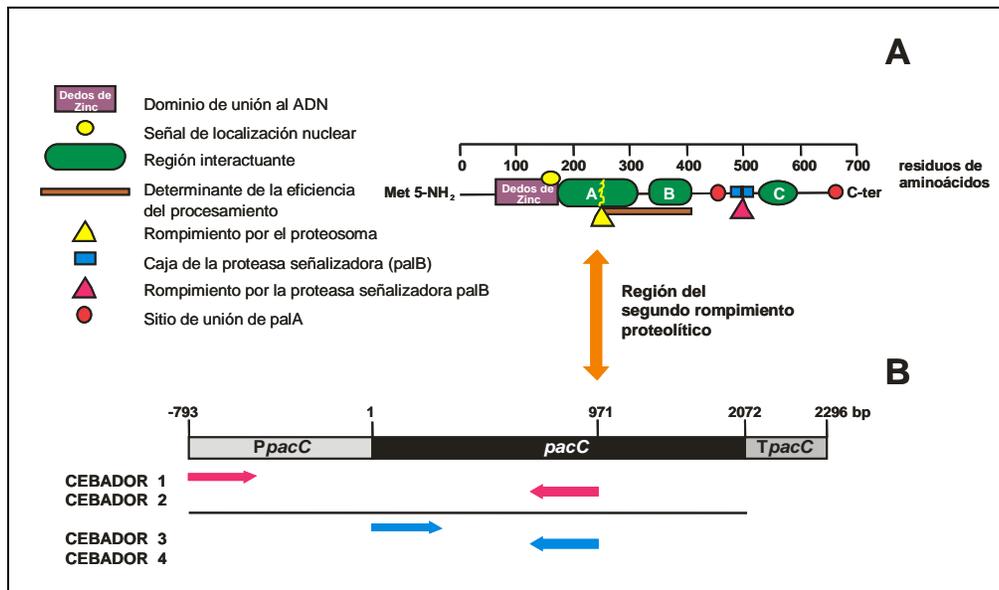


Fig. 6. A) Esquema del factor de transcripción *pacC*, señalándose los sitios de rotura proteolítica. B) Cebadores diseñados con base en la secuencia original del gen *pacC* de *A. chrysogenum*

6.9.1.1 Fragmento *PpacC*²⁷

Para la amplificación del fragmento *PpacC*²⁷ (que incluye su propio promotor) los cebadores diseñados fueron los siguientes:

Cebador 1 5'CCAGAATTCTGAGATGGTGTCTACCGTTC3'
 Cebador 2 5'GATGAATTC**TT**AGGACGAGGGGTCGATCT3'

El cebador 1 incluye un sitio de corte para la endonucleasa de restricción *EcoRI* (subrayado) seguido inmediatamente por el par de bases número -793 de la secuencia del gen. El cebador 2 incluye el codón de paro (en negrita) inmediatamente después del par de bases 971, seguido por un sitio de corte para la enzima *EcoRI*.

6.9.1.2 Fragmento *SpacC*²⁷

Para la amplificación del fragmento *SpacC*²⁷ (que no incluye el promotor del propio gen) los cebadores diseñados fueron los siguientes:

Cebador 3 5'TCTCCCCCGCCCCGAC3'
 Cebador 4 5'GATGGATCC**TT**AGGACGAGGGGTCGATCTCAC3'

El cebador 3 comienza desde el par de bases número 4 (inmediatamente después del codón de inicio de la traducción) y el cebador 4 incluye también un codón de paro (en negrita) seguido por un sitio de corte para la endonucleasa de restricción *Bam*HI.

6.9.2. Condiciones para la reacción de PCR

Con el fin de minimizar al máximo la posibilidad de errores en el momento de la amplificación, se utilizó la enzima *Pfu*, una polimerasa termoestable de alta fidelidad proveniente del microorganismo termófilo *Pyrococcus furiosus*. Cada reacción consistió en una mezcla de los siguientes reactivos:

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H ₂ O destilada desionizada estéril	-----	29
Amortiguador (10X)	1X	5
MgSO ₄ (25 mM)	2.5 mM	5
Mezcla de dNTP's (10 mM)	200 µM	1
Cebador F (20 µM)	1 µM	2.5
Cebador R (20 µM)	1 µM	2.5
ADN molde (25 ng/µL)	100 ng	4
<i>Pfu</i> polimerasa (1 U/µL)	1 u	1
Volumen de reacción		50

Se prepararon cuatro reacciones en cuatro tubos estériles de 200 µL y se colocaron en un termociclador marca Eppendorf® con las siguientes condiciones de operación:

		SpacC ²⁷		PpacC ²⁷	
CICLOS	Proceso	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización	94 °C	5'	94 °C	5'
30	Desnaturalización	94 °C	30''	94 °C	30''
	Hibridación	65 °C	45''	60 °C	45''
	Polimerización	72 °C	1' 10''	72°C	2'
1	Polimerización	72 °C	8'	72 °C	8'

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% (p/v)

6.10. Extracción de ADN a partir de geles de agarosa

Después de que se separaron y visualizaron los productos de PCR en un gel de agarosa, se purificaron las bandas de interés utilizando el kit de purificación de ADN a partir de geles de agarosa Quiaex (Quiagen®). Se obtuvo la secuencia de nucleótidos del ADN obtenido y los resultados se procesaron con el programa Seqman (DNASTAR®), con el propósito de compararlos con la secuencia original del gen *pacC*.

6.11. Construcción de los vectores de expresión

6.11.1. Amplificación de los plásmidos pAN52.1 y pLXTtrpC

Estos dos plásmidos fueron transformados por separado en células de *Escherichia coli* DH5- α . Posteriormente se realizó su extracción a gran escala por el método de megapreparaciones.

6.11.1.1. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* y transformación por electroporación

La preparación de células electrocompetentes se realizó de acuerdo a lo descrito por Sambrook y Russell (2001), de la siguiente manera. A partir de una placa de medio LB con colonias aisladas de *E. coli* DH5 α (o XL1-Blue), se inoculó una colonia en 50 mL de medio LB contenidos en un matraz de 250 mL, incubándose a 37 °C y 250 rpm durante 12 a 14 horas. Después se tomó una alícuota de 3 mL del cultivo obtenido, para inocular 125 mL de medio LB fresco (en un matraz de 500 mL). Posteriormente, se incubó a 37 °C y 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó 0.4 unidades de densidad óptica a 600 nm de longitud de onda.

En seguida se colocó el cultivo en hielo durante 30 minutos. Luego, se recogieron las células por centrifugación a 4 °C y 2500 rpm (1000 \times *g*) durante 20 minutos y se decantó el sobrenadante para resuspender el precipitado en 60 mL de H₂O destilada desionizada estéril y fría (< 4 °C). Nuevamente se recogieron las células bajo las mismas condiciones de centrifugación y se desechó el sobrenadante. Las células se

resuspendieron en 16 mL de glicerol al 10% (v/v), estéril y frío. Se centrifugó de nuevo, para luego resuspender el precipitado en 6 mL de glicerol al 10% (v/v) y volver a centrifugar. Las células se resuspendieron en 600 µL de medio GYT frío y se centrifugó nuevamente, desechando el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado obtenido en 500 µL de medio GYT frío, se homogeneizó suavemente y se repartió en alícuotas de 40 µL. Las alícuotas de células electrocompetentes se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C.

El método utilizado para la transformación de células electrocompetentes de *E. coli* por electroporación fue el descrito por Zhou *et al.* (1995). Se descongeló una alícuota de células electrocompetentes (40 µL) en un baño de hielo y se mezcló con 1 µL de plásmido, o con 5 µL de mezcla de ligación (véase más adelante). Se mezcló suavemente con la pipeta y se transfirió a una celda de electroporación previamente enfriada a -20 °C. Posteriormente, se le aplicó un voltaje de 2500 mV/cm (20 µF de capacitancia y 200 ohm de resistencia) durante aproximadamente 5 milisegundos, en un equipo Electroporator 2510 (Eppendorf®). Lo más rápidamente posible se añadió 1 mL de medio LB, y se mezcló por inversión para posteriormente incubarse la mezcla (en otro tubo Eppendorf® de 1.5 mL) a 37 °C y 250 rpm durante una hora. Transcurrido el tiempo de incubación, se sembró una alícuota de la mezcla de transformación en una placa de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL).

6.11.1.2. Obtención de ADN plasmídico

6.11.1.2.1. Megapreparaciones

Para la extracción de ADN plasmídico a gran escala se siguió un método descrito por Holmes y Quigley (1981), con modificaciones de Fernández (1997). Para ello se seleccionó una colonia portadora de cada plásmido y se inoculó en 100 mL de medio líquido TB, suplementado con 100 µg/mL de ampicilina (para el caso del pAN52.1) ó 25 µg/mL de cloranfenicol (para el pLXTtrpC). Se incubaron a 37 °C con agitación constante de 200 rpm durante 12 horas.

Pasado el tiempo de incubación, se recogieron las células por centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos. El precipitado se resuspendió en 6 mL de STET¹⁰ y se le agregaron 360 µL de una solución de lisozima (10 mg/mL en H₂O), se mezcló

¹⁰ **STET:** EDTA 50 mM pH 8.0, Sacarosa 8% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 8.0, Tritón X-100 al 0.5 (v/v).

suavemente durante 30 segundos, luego se repartió en alícuotas de 350 μL . Inmediatamente después, las alícuotas se calentaron durante 45 segundos en un baño con agua en ebullición. Las proteínas, restos celulares y ADN cromosómico se precipitaron por centrifugación a 14000 rpm durante 15 minutos y posteriormente se retiraron con ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico de cada alícuota se precipitó con 40 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 600 μL de isopropanol, se mezcló por inversión y se mantuvo en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos; posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm y se descartó el sobrenadante. El precipitado de cada alícuota se lavó con 500 μL de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 14000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el ADN plasmídico se dejó secar a temperatura ambiente para luego resuspenderlo en 50 μL de H_2O destilada estéril. Se juntaron todas las alícuotas en un mismo volumen, se limpiaron por fenolización y se trataron con ARNasa.

6.11.1.2.2. Minipreparaciones

El procedimiento a seguir fue el descrito por Holmes y Quigley en 1981, es parecido al de las megapreparaciones pero en este caso se obtuvo ADN plasmídico a pequeña escala, lo que fue muy útil cuando se requirieron hacer múltiples análisis de restricción en el menor tiempo posible.

Para esto se seleccionaron al azar colonias transformantes de interés y se inocularon, con ayuda de un palillo estéril, en 1 mL de medio TB suplementado con el antibiótico de selección del plásmido, habiéndolas resembrado e identificado previamente en una placa de medio LB con el mismo antibiótico. Se incubaron a 37 °C con agitación constante de 200 rpm durante 12 horas.

Pasado el tiempo de incubación, se recogieron las células de cada muestra por centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos. El precipitado se resuspendió en 350 μL de STET y se le agregaron 10 μL de la solución de lisozima (10 mg/mL en H_2O), se mezcló suavemente durante 30 segundos y se calentó durante 45 segundos en un baño con agua en ebullición. Las proteínas, restos celulares y ADN cromosómico se precipitaron por centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se retiraron con ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipitó con 40 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 600 μL de isopropanol, se mezcló por inversión y se mantuvo en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos; posteriormente, se centrifugó durante 5

minutos a 14000 rpm y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500 μL de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 14000 rpm; se desechó el sobrenadante y el ADN plasmídico se dejó secar a temperatura ambiente para luego resuspenderlo en 30 μL de TE o H_2O destilada estéril. Se requirió sólo 1 μL de cada minipreparación para realizar los ensayos de restricción pertinentes.

6.11.2. Tratamiento del ADN con endonucleasas de restricción

Se siguieron las indicaciones descritas por el proveedor de las enzimas utilizadas. Cada enzima tiene sus condiciones óptimas de temperatura, concentración de sales y pH, y el volumen utilizado de las enzimas nunca debe superar 1/10 del volumen total de la reacción, debido a la alta concentración de glicerol presente en las soluciones en que se presentan. Además, es conveniente tener la muestra de ADN de buena calidad (bien diluido y limpio) para evitar alterar las condiciones de la reacción (Fernández, 1997).

En general, para cada digestión de ADN con una enzima de restricción se utilizaron las siguientes condiciones.

REACTIVO	Concentración final	Volumen final (μL)
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ estéril	-----	Variable
Amortiguador (10X)	1X	
ADN	n μg	
Enzima de restricción (10 u/ μL)	2n U	
Volumen de reacción		

Se incubó a la temperatura adecuada (generalmente 37 $^{\circ}\text{C}$), y posteriormente se limpió el ADN mediante una extracción con fenol-CIA y otra con CIA, resuspendiéndose en H_2O destilada estéril. Los resultados de cada digestión se visualizaron en un gel de agarosa (entre el 0.7% y el 1%, p/v).

6.11.3. Construcción del vector de expresión para el gen *pacC* modificado utilizando su propio promotor.

6.11.3.1. Manipulación del plásmido pLXTtrpC

Se digirieron 10 µg de ADN con la endonucleasa de restricción *EcoRI*. Se purificó la reacción y el resultado se visualizó en un gel de agarosa al 0.7% (p/v). Posteriormente, el vector se trató con fosfatasa alcalina para evitar su recircularización en el momento de la ligación.

6.11.3.1.1. Tratamiento con fosfatasa alcalina

Se utilizó la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Roche®), la cual cataliza la hidrólisis de los grupos 5' fosfato del vector digerido y, por lo tanto, evita su recircularización, debido a que la ADN ligasa requiere obligatoriamente de un extremo 5' fosforilado para la formación del enlace fosfodiéster (Sambrook y Rusell, 2001). Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H ₂ O _{dd} estéril	-----	7.5
Amortiguador (10X)	1X	2
ADN 5' fosforilado (1 µg/mL)	10 µg	10
Fosfatasa alcalina (20 u/µL)	1 u/pmol ADN	0.5
Volumen de reacción		20

La mezcla se incubó a 37 °C durante 60 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se inactivó la reacción calentándola a 65 °C durante 10 minutos y se purificó con una extracción de fenol-CIA y una de CIA. El resultado se visualizó en un gel de agarosa al 0.7%.

Para comprobar que se llevó a cabo la desfosforilación del vector con la fosfatasa alcalina, se hizo una recircularización del mismo con la ADN ligasa del bacteriófago T4 y se transformaron células de *E. coli*.

6.11.3.1.2. Tratamiento con la ADN ligasa del bacteriófago T4

Para la recircularización de un plásmido (cuando fue requerido) y la ligación de insertos a sus respectivos vectores, se utilizó la ADN ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas[®]), la cual cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un extremo 5' fosforilado y un extremo hidroxilo terminal de dos cadenas de ADN yuxtapuestas (Rossi *et al.*, 1997). Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

REACTIVO	Recircularización		Ligación de un inserto	
	Concentración recomendada	Volumen final (µL)	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H ₂ O _{dd} estéril	-----	Variable	-----	Variable
Amortiguador (10X)	1X	5	1X	2
Vector	25 - 50 ng	variable	50 - 400 ng (ADN total)	Variable
Inserto		-----		Variable
Polietilenglicol 4000 50% (sólo para extremos romos)	5%	5	5%	2
ADN ligasa T4 (5 u/µL)	5 u	1	1 - 5 u	1
Volumen de reacción		50		20

Se dejaron incubar las reacciones a 22 °C durante toda la noche, posteriormente se limpiaron las mezclas mediante una extracción con CIA, se precipitaron y se resuspendieron en 10 µL de H₂O destilada estéril.

6.11.3.2. Manipulación del producto de PCR PpacC²⁷

El producto de PCR PpacC²⁷ ya purificado se digirió con la enzima de restricción *EcoRI*. El ADN se purificó por fenolización, se precipitó y se resuspendió en 20 µL de H₂O destilada estéril.

6.11.3.3. Clonación del inserto PpacC²⁷ en el vector pLXTtrpC

Se utilizó la ADN ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas[®]) para ligar una proporción de 4.5 veces la cantidad de inserto por cantidad de vector, las condiciones de reacción fueron las siguientes:

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H ₂ O _{dd} estéril	-----	5.7
Amortiguador (10X)	1X	1
Vector (60 ng/µL)	50 – 400 ng (ADN total)	1
Inserto (150 ng/µL)		1.8
ADN ligasa T4 (5 u/µL)	1 – 5 u	1
Volumen de reacción		10

Se incubó a 22 °C durante 12 a 24 horas. Se limpió la mezcla con CIA, se precipitó y se resuspendió en 10 µL de H₂O destilada estéril, con ella se transformaron células de *E. coli*.

Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron al azar colonias transformantes para la obtención de minipreparaciones de ADN plasmídico, a las cuales se les realizaron ensayos de digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. El resultado se visualizó en un gel de agarosa al 0.8% (p/v). Posteriormente, se seleccionó al azar una de las colonias que comprobaron tener el vector de interés y se le realizó la extracción de ADN plasmídico a gran escala. El vector resultante fue designado pPpacC²⁷.

6.11.4. Construcción de un vector de expresión para el gen *pacC* modificado utilizando un promotor de expresión constitutiva

6.11.4.1. Manipulación del plásmido pAN52.1

Se tomaron 10 µg de ADN plasmídico y se digirieron con la enzima *NcoI* (Promega®). La mezcla se limpió por fenolización y se resuspendió en 20 µL de H₂O destilada estéril. El ADN resultante fue tratado con el fragmento Klenow de la ADN Polimerasa I de *E. coli*, con el propósito de rellenar los extremos cohesivos que dejó la digestión con *NcoI*. Se escogió este protocolo debido a que se propuso utilizar el codón de inicio (ATG) ubicado en el sitio de corte de la enzima *NcoI* como primer aminoácido del marco de lectura abierto para la traducción del producto amplificado de PCR *SpacC*²⁷.

6.11.4.1.1. Rellenado de extremos protuberantes con el fragmento Klenow

Se utilizó el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Promega®), una sola cadena polipeptídica que mantiene las actividades 5' → 3' polimerasa y 3' → 5' exonucleasa de la enzima completa, pero carece de la actividad 5' → 3' exonucleasa, por lo que se puede utilizar para rellenar extremos 5' protuberantes (Anderson *et al.*, 1980).

Las condiciones para el tratamiento con el fragmento Klenow fueron las siguientes:

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H ₂ O _{dd} estéril	-----	11.5
Amortiguador (10X)	1X	2
ADN	1 - 4 µg	4
dNTP's 10 mM	40 µM	1
BSA _{ac} (10 mg/mL)	20 µg/mL	0.5
Klenow (5 u/mL)	1 u/µg de ADN	1
Volumen de reacción		20

Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se inactivó la enzima a 65 °C durante otros 10 minutos. La mezcla de reacción se purificó con una extracción de fenol-CIA y una de CIA y se visualizó en un gel de agarosa al 0.7% (p/v).

Para verificar que la actividad del fragmento Klenow se llevó a cabo satisfactoriamente, se recircularizó el vector utilizando la ADN ligasa del bacteriófago T4, de la forma descrita en el apartado del tratamiento con fosfatasa alcalina, y se transformaron con él células de *E. coli*. Posteriormente, se obtuvieron minipreparaciones de ADN plasmídico de colonias transformantes aleatorias y se les realizaron ensayos de digestión con la enzima *Nco*I. El resultado se visualizó en un gel de agarosa al 0.7% (p/v).

Una vez comprobado el tratamiento con el fragmento Klenow dado al vector, éste fue digerido con la endonucleasa de restricción *Bam*HI (Promega®), se limpió con una extracción de fenol-CIA y una de CIA, se precipitó y se resuspendió en 20 µL de H₂O destilada estéril.

6.11.4.2. Manipulación del producto de PCR *SpacC*²⁷

El producto de PCR *SpacC*²⁷ ya purificado fue digerido también con la enzima de restricción *Bam*HI. El ADN se purificó con una extracción de fenol-CIA y una de CIA, se precipitó y se resuspendió en 20 µL de H₂O destilada estéril.

6.11.4.3. Clonación del inserto *SpacC*²⁷ en el vector pAN52.1 previamente tratado

Se llevó a cabo la ligación del producto de PCR *SpacC*²⁷ con el vector pAN52.1 utilizando la ADN ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas[®]). Se utilizó una proporción de 3.75 veces la cantidad de inserto por cantidad de vector. Condiciones utilizadas:

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H ₂ O _{dd} estéril		8
Amortiguador (10X)	1X	2
Vector (40 ng/µL)	50 – 400 ng (ADN total)	3
Inserto (150 ng/µL)		3
PEG 4000 50%	5%	2
ADN ligasa T4 (5 u/µL)	1 – 5 u	2
Volumen de reacción		20

Se incubó de 12 a 24 horas a 22 °C. La mezcla se limpió con CIA, se precipitó y se resuspendió en 10 µL de H₂O destilada estéril; con ella se transformaron células de *E. coli*. Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron al azar colonias transformantes para la obtención de minipreparaciones de ADN plasmídico, a las que se les realizaron ensayos de restricción con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (Promega[®]), simultáneamente, y con la enzima *Nco*I. El resultado se visualizó en un gel de agarosa al 0.7% (p/v).

La minipreparación que liberó un fragmento de aproximadamente 760 pb (*TtrpC*) con la doble digestión y en la que no cortó la enzima *Nco*I fue tratada con ARNasa y purificada por fenolización, para utilizarse como ADN molde en un PCR de *SpacC*²⁷ cuyas condiciones fueron descritas anteriormente. El producto de PCR resultante fue purificado

y su secuencia de nucleótidos comprobada. Posteriormente, se llevó a cabo la obtención de ADN plasmídico a gran escala a partir de la colonia correspondiente, mediante el método de megapreparaciones descrito anteriormente. El vector resultante fue designado como pSpacC-A.

6.11.4.4. Amplificación del promotor *Pgpd* con el fragmento *SpacC*²⁷ a partir del vector pSpacC-A

6.11.4.4.1. Diseño de cebadores

Se obtuvo la secuencia del plásmido pAN52.1N contenida en la base de datos de GenBank con número de acceso Z32697.1 y se diseñó un cebador a partir del par de bases número uno, que corresponde al inicio del promotor del gen *gpd* de *Aspergillus nidulans*. El cebador resultante fue el siguiente:

Cebador 5 5'GATGAATTCACAGAGGCCAGAGCATCAC3'

Este cebador lleva un sitio de corte para la enzima *EcoRI*, seguido por el par de bases número uno de la secuencia de nucleótidos del plásmido pAN52.1N.

El cebador reverso utilizado para esta reacción de PCR fue el mismo que se utilizó en la amplificación del fragmento *SpacC*²⁷ (Cebador 2), de manera que el producto resultante de PCR quedará delimitado por el inicio del promotor *Pgpd* y el par de bases 1764 de la secuencia del gen *pacC* de *A. chrysogenum*, flanqueado por los sitios de corte *EcoRI* y *BamHI*.

6.11.4.4.2. Condiciones para la reacción de PCR

Se prepararon cuatro reacciones en tubos estériles de 200 µL, de la misma manera en que se describió en el apartado 6.9.2. Condiciones del termociclador:

CICLOS	TEMPERATURA		TIEMPO
1	Desnaturalización	94 °C	5'
30	Desnaturalización	94 °C	30''
	Hibridación	65 °C	45''
	Polimerización	72 °C	3'30''
1	Polimerización	72 °C	8'

El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 0.7% (p/v). Se purificó la banda de interés y se determinó su secuencia de nucleótidos. Los resultados se procesaron con el programa Seqman para compararlos con la secuencia original del promotor *Pgpd* de *A. nidulans* y del gen *pacC* de *A. chrysogenum*.

6.11.4.5. Clonación del producto de PCR *Pgpd-SpacC²⁷* en el plásmido pLXTtrpC

6.11.4.5.1. Manipulación del plásmido pLXTtrpC

Se tomaron 10 µg del plásmido pLXTtrpC y se digirieron con la endonucleasa de restricción *EcoRI*. Se purificó la reacción y el resultado se visualizó en un gel de agarosa al 0.7% (p/v). Posteriormente, se digirió el ADN resultante con la enzima *BamHI*. La mezcla de reacción se purificó y se visualizó en un gel de agarosa. Para comprobar que se llevó a cabo la digestión del vector con ambas enzimas, se recircularizó el vector tratado con las enzimas y se transformó en células de *E. coli*.

6.11.4.5.2. Manipulación del producto de PCR *Pgpd-SpacC²⁷*

El producto de PCR *Pgpd-SpacC²⁷* ya purificado fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. La mezcla se purificó y posteriormente se digirió con *BamHI*. Se limpió la reacción y el resultado se visualizó en un gel de agarosa al 0.7% (p/v).

6.11.4.5.3. Ligación del inserto *Pgpd-SpacC²⁷* en el vector pLXTtrpC

Se utilizó la ADN ligasa del bacteriófago T4 y una proporción de 5.3 veces la cantidad de inserto por cantidad de vector, con las siguientes condiciones de reacción:

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H ₂ O _{dd} estéril	-----	11
Amortiguador (10X)	1X	2
Vector (150 ng/µL)	50 – 400 ng (ADN total)	1
Inserto (200 ng/µL)		4
ADN ligasa T4 (5 u/µL)	1 – 5 u	2
Volumen de reacción		20

Se limpió la mezcla de ligación con CIA, se precipitó y se resuspendió en 10 µL de H₂O destilada estéril, con ella se transformaron células de *E. coli*. Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron al azar colonias transformantes para la obtención de minipreparaciones de ADN plasmídico a las que se les realizaron ensayos de digestión con las enzimas *Bam*HI, *Eco*RI y con ambas simultáneamente. Por otro lado, también se realizó una digestión doble con *Bam*HI y *Xba*I. Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa al 0.7% (p/v).

Posteriormente, se seleccionó al azar una de las colonias que comprobaron tener el vector de interés y se le realizó la extracción de ADN plasmídico a gran escala. El vector resultante fue designado como pSpac²⁷, del cual se determinó su secuencia parcial de nucleótidos, para comprobar la integridad del marco de lectura.

6.12. Transformación de *A. chrysogenum* ATCC 11550

6.12.1. Crecimiento del micelio

Se inocularon 50 mL de medio CCM con el micelio procedente de tres placas de medio LPE o CCM-agar, incubadas previamente durante seis días a 28 °C. El cultivo se incubó a 25 °C durante 20 horas, con 250 rpm de agitación orbital. Transcurrido el tiempo de incubación se recogió el micelio por centrifugación a 4000 rpm durante 8 minutos y se decantó el sobrenadante; el precipitado se lavó con 100 mL de NaCl al 0.9% (p/v) y se recuperó el micelio de la misma manera.

6.12.2. Obtención de protoplastos

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Queener *et al.* (1985). Se resuspendió el micelio en 50 mL de TPC¹¹ suplementado con ditioneitol (DTT) 0.1 M, y se incubó durante 2 horas a 28 °C con agitación de 250 rpm. La incubación con DTT se realizó para reducir las uniones disulfuro de los componentes de la pared celular y facilitar el proceso de liberación de protoplastos. En seguida se recogió el micelio correspondiente a 15 mL de cultivo por centrifugación a 4000 rpm durante 8 minutos y se resuspendió en 4 mL de TPC.

En otros 4 mL de TPC se disolvieron 160 mg de Driselase[®] (concentración final 20 mg/mL) y se centrifugaron durante un minuto a 4000 rpm, el sobrenadante obtenido se adicionó al micelio previamente resuspendido en TPC. La mezcla obtenida se colocó en un matraz de 250 mL y se incubó durante el tiempo necesario para la liberación de protoplastos (no más de 5 horas) a 28 °C con agitación orbital de 100 rpm. Se observó la liberación de protoplastos en un microscopio de contraste de fases a 400 aumentos, con intervalos de una hora.

Una vez observada la liberación de protoplastos en la proporción adecuada, se filtró la suspensión protoplastos/restos de micelio a través de una membrana de nylon de 30 µm de diámetro de poro (Nytal, Suiza) previamente colocada sobre un embudo (todo ello esterilizado), con el fin de separar los protoplastos de los restos de micelio. En seguida se recuperaron los protoplastos por centrifugación a 2500 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente. El agregado celular obtenido se lavó con 5 mL de NaCl 0.8 M, recuperándose por centrifugación en las condiciones mencionadas anteriormente; el lavado con NaCl se repitió tres veces consecutivas. Luego se lavó el agregado celular con 5 mL de amortiguador NCM¹² y se centrifugó de la misma manera. Los protoplastos se resuspendieron en NCM a una concentración de 1×10^8 protoplastos/mL (aproximadamente 5 veces el volumen del precipitado) y se añadió 1/10 del volumen total de amortiguador CCM¹³. Se mezcló suavemente y se mantuvo esta suspensión de protoplastos en hielo hasta el momento de la transformación.

¹¹ **TPC** NaCl 0.8 M, amortiguador fosfato potásico 50 mM pH 7, después de esterilizar, añadir MgSO₄ 0.02 M.

¹² **Amortiguador NCM** NaCl 0.8 M, CaCl₂ 50 mM, MOPS 10 mM pH 7.

¹³ **Amortiguador CCM** CaCl₂ 50 mM, MOPS 10 mM pH 7, PEG 8000 18% (p/v).

6.12.3. Transformación

El procedimiento de transformación también fue descrito por Queener *et al.* (1985). Se mezclaron 100 μL de la suspensión de protoplastos con 10 μg de ADN plasmídico: pSpacC²⁷, pPpacC²⁷ y pLXTtrpC (control), por separado, en el fondo de tres tubos de 1.5 mL. Se homogeneizaron las mezclas por inversión y se mantuvieron en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se añadieron a cada tubo 500 μL de amortiguador CCM, se mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos más. Luego se agregaron 600 μL de amortiguador NCM a cada tubo para disolver el polietilenglicol presente en el amortiguador CCM. Se mantuvo la mezcla de transformación a temperatura ambiente hasta el momento del plaqueo.

6.12.4. Plaqueo

Se prepararon las bases de las placas de transformación, extendiendo 5 mL de medio TSAS con fleomicina en concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de acuerdo a lo reportado por Cuadra (2008), en cajas de Petri de 60 mm de diámetro. Una vez que el medio se encontraba a la temperatura adecuada (aproximadamente 48 °C), sin que empezara la solidificación del mismo, se plaquearon las mezclas de transformación junto con el medio en forma de cobertera. Para ello, y para cada placa, se agregaron a un tubo estéril de 15 mL 300 μL de mezcla de transformación y 5 mL de medio TSAS con fleomicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Rápidamente se homogeneizó cada mezcla y se extendió sobre las placas de transformación previamente preparadas. Se dejaron solidificar y se incubaron a 28 °C durante siete días. Para los controles positivo y negativo solamente se plaquearon 100 μL de la suspensión de protoplastos en medio TSAS sin fleomicina y 100 μL de protoplastos en medio TSAS con fleomicina, respectivamente.

Las colonias transformantes que aparecieron durante el tiempo de incubación fueron sembradas por punción en placas de medio TSAS con el doble de la concentración utilizada de fleomicina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la resiembra se realizó dos veces para asegurar que las colonias obtenidas se trataran de verdaderas transformantes (expresando la resistencia a fleomicina) y eliminar la posibilidad de haber obtenido heterocariontes.

6.13. Comprobación por PCR de la integración de los vectores en las cepas transformantes

Se obtuvo el ADN total de las cepas transformantes, como se describió en la sección 6.6. Posteriormente, se llevaron a cabo reacciones de PCR a partir del ADN obtenido de las cepas transformantes para comprobar la integración de los vectores en ellas, utilizando en este caso la polimerasa termoestable *Taq* proveniente de *Thermus aquaticus*.

En el caso de las cepas con el plásmido pSpac²⁷ se utilizó el cebador 5 descrito anteriormente y se diseñó otro cebador reverso para acotar la región final del terminador *TtrpC*, de manera que el producto de PCR abarcara todo el cassette de expresión de la mutación (promotor *PgpdA*, *SpacC*²⁷ y terminador *TtrpC*). El cebador diseñado fue el siguiente:

Cebador 6 5'CGTTCTAGAAAGAAGGATTACCTCT3'

Para el caso de las colonias transformantes con los vectores pPpac²⁷ y pLXTtrpC se amplificó únicamente la región correspondiente al terminador *TtrpC*. Aunque por cuestiones de tiempo no fue posible el diseño y adquisición de un cebador F para acotar el inicio de la región terminadora, se utilizó únicamente el cebador 6 y se intentó controlar el tamaño del producto de PCR manipulando el tiempo de elongación. Las condiciones para las reacciones fueron las siguientes:

		pPpac ²⁷ y pLXTtrpC	pSpac ²⁷
REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (µL)	
H ₂ O _{dd} estéril	-----	31.5	29
Amortiguador (10X)	1X	5	5
MgSO ₄ (25 mM)	2.5 mM	5	5
Mezcla de dNTP's (10 mM)	200 µM	1	1
Cebador F (20 µM)	1 µM	-----	2.5
Cebador R (20 µM)	1 µM	2.5	2.5
ADN molde (≈25 ng/µL)	100 ng	4	4
<i>Taq</i> polimerasa (1 u/µL)	1 U	1	1
Volumen de reacción		50	50

Condiciones de operación del termociclador:

		pPpac ²⁷ y pLXTtrpC		pSpac ²⁷	
CICLOS	Proceso	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización	94 °C	5'	94 °C	5'
30	Desnaturalización	94 °C	30''	94 °C	30''
	Hibridación	52 °C	1'	58 °C	1'
	Polimerización	72 °C	45''	72 °C	4'10''
1	Polimerización	72 °C	8'	72 °C	8'

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1%

6.14. Evaluación del efecto de la mutación de mimetismo alcalino sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos en *A. chrysoenum* ATCC 11550

6.14.1. Fermentación en cilindros de agar en medio complejo MCFA

De cada una de las transformantes obtenidas con los vectores pSpac²⁷, pPpac²⁷ y pLXTtrpC, se seleccionó una colonia de aproximadamente el mismo diámetro y se disolvió con ayuda de un palillo estéril en 100 µL de NaCl 0.9% (p/v). Se tomaron 2 µL de cada una de las suspensiones resultantes y se inocularon sobre la superficie de cilindros de agar de medio MCFA obtenidos con ayuda de un sacabocados de 6 mm de diámetro interno. Los cilindros inoculados se colocaron en cajas de Petri de 60 mm de diámetro y se incubaron a 25°C durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas. El experimento se realizó con 4 repeticiones para cada una de las cepas transformantes, incluyendo la cepa parental.

6.14.2. Determinación de la concentración de antibióticos beta-lactámicos por bioensayo de actividad antibiótica frente a *E. coli* ESS2231

6.14.2.1. Preparación de las placas de bioensayo

Por cada placa, se mezclaron 15 mL de una solución de células de *E. coli* ESS2231 D.O.₆₀₀ = 1.0 (en NaCl 0.9%) a 220 mL de medio TSB 1% mantenido a 48 °C y se

vertieron en placas estériles para bioensayo de 9 × 9 pulgadas. Una vez solidificadas las placas, se realizaron perforaciones de 6 mm de diámetro con ayuda de un sacabocados estéril para depositar en ellos 60 µL de las respectivas soluciones estándar de CPC y de las muestras del caldo de cultivo con o sin dilución, en el caso de fermentaciones en medio líquido. En el caso de los bioensayos con cilindros de agar, éstos simplemente fueron dispuestos en la superficie de la placa de bioensayo.

6.14.2.2. Preparación de la curva de calibración

Se preparó una solución stock de 500 µg/mL a partir de una solución de 1 mg/mL de cefalosporina C, sal de zinc (Sigma®), disuelta previamente en EDTA 10 mM. A partir de la solución stock se prepararon las soluciones estándares, con 1.0, 2.5, 5, 10, 25 y 50 µg/mL. La solución stock y los estándares se prepararon con agua destilada estéril.

6.14.2.3. Determinación de antibióticos beta-lactámicos

Al término del tiempo de fermentación, se colocaron con ayuda de un palillo estéril los cilindros de agar sobre la superficie del medio en las placas de bioensayo, de manera equidistante. Los estándares de CPC se colocaron dentro de los pozos previamente elaborados. En el caso de fermentaciones en medio líquido, se depositaron las muestras dentro de sus respectivos pozos. Las determinaciones, en cada caso, se hicieron por triplicado.

Se dejaron reposar las placas durante una hora a 4 °C, para permitir la difusión del antibiótico a través del medio. Posteriormente se incubaron a 37 °C durante 12 - 15 horas.

Al término de la incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición y los datos obtenidos se interpolaron en la curva patrón obtenida de cada placa, que relaciona directamente el logaritmo de la concentración de antibióticos beta-lactámicos con el diámetro del halo de inhibición.

6.14.3. Fermentación en medio líquido complejo MCFA

Para cada transformante, se preparó un inóculo primario, como se especificó en la sección 6.4.2.3. Pasado el tiempo de incubación, se tomaron 5 mL del inóculo primario y

se agregaron a 45 mL de medio líquido MCFA contenidos en un matraz de 250 mL con triple indentación, incubándose nuevamente a 28 °C durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas, con agitación orbital de 250 rpm. El experimento se llevó a cabo por duplicado.

Al término del tiempo de fermentación, se determinó la concentración de antibióticos beta-lactámicos presentes en el caldo de cultivo, como se especificó en la sección 6.13.2. También se determinó el pH y la cantidad de biomasa, con el objetivo de poder expresar la concentración de antibióticos beta-lactámicos en términos de producción específica. Para ello, las muestras se filtraron a través de una membrana de nylon de 30 µm de diámetro de poro, el extracto se colectó y se utilizó para medir inmediatamente el pH y la concentración de antibióticos. La biomasa se lavó tres veces con 10 mL de agua destilada estéril, se recuperó con ayuda de vacío en un filtro de papel Whatman® No. 4, previamente pesado, y se lavó con 10 mL de acetona para finalmente llevar el papel de filtro hasta peso constante durante 24 horas a 60 °C.

6.14.4. Fermentación en medio líquido definido MDFAM/MES

Fue necesario realizar una fermentación en un medio amortiguado a pH ácido, por lo que se utilizó el medio MDFAM/MES ajustado a pH 5.0. Para cada transformante, se tomaron 50 mL de inóculo primario y se filtraron a través de una membrana de nylon de 30 µm de diámetro de poro, estéril. El micelio obtenido se lavó dos veces con un volumen de solución fisiológica estéril. Con ayuda de una punta de 5 mL cortada se tomaron 5 mL del micelio lavado y se agregaron a 45 mL de medio líquido MDFAM/MES contenidos en un matraz de 250 mL con triple indentación. Se incubaron a 28 °C con agitación orbital de 250 rpm y se tomaron muestras por duplicado a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas de fermentación.

Cada muestra se filtró a través de una capa de fibra de vidrio estéril colocada en el fondo de un tubo Eppendorf® de 1.5 mL perforado, previamente pesado y depositado al mismo tiempo dentro de otro tubo sin perforar. Los caldos de fermentación se recuperaron al centrifugar los sistemas de filtración durante 10 segundos a 14000 rpm e inmediatamente se les determinó el pH con ayuda de tiras indicadoras y la concentración de antibióticos beta-lactámicos mediante bioensayo. La biomasa se determinó mediante el peso seco, al llevar a peso constante durante 24 horas a 60 °C los sistemas de filtración con el micelio retenido en ellos.

6.15. Comprobación de expresión de la mutación de mimetismo alcalino por RT-PCR

6.15.1. Obtención de ARN total de *A. chrysogenum*

Para la obtención de ARN se utilizó la técnica del Trizol, descrita por Sambrook y Rusell (2001). Para ello, se incubaron las cepas transformantes que presentaron mayor producción de antibióticos beta-lactámicos, la cepa parental y una cepa con el plásmido control, en las condiciones y tiempo en las que se obtuvo la mejor producción.

Al término del tiempo de incubación se recogió el micelio por filtración a través de filtros de nylon estériles de 30 μm de diámetro de poro y se lavó con un volumen de NaCl al 0.9% (p/v) estéril. Inmediatamente se congeló el micelio en nitrógeno líquido y se guardó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El micelio congelado se maceró en morteros de porcelana previamente enfriados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, agregando nitrógeno líquido constantemente.

Sin dejar que la muestra se descongelara, se tomaron, con ayuda de una espátula fría y estéril, aproximadamente 500 μL de volumen de micelio macerado, depositándose en tubos Eppendorf® estériles de 1.5 mL. Se agregó 1 mL de Trizol® a cada muestra y se homogeneizaron vigorosamente en vórtex. Se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 200 μL de cloroformo. Se mezclaron vigorosamente durante otros 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos. Luego se centrifugaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 15 minutos y se transfirió la fase acuosa (superior) a otros tubos estériles.

El ARN presente en la fase acuosa se precipitó con 500 μL de isopropanol, se mezcló por inversión y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 70% (v/v). Se centrifugó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 8000 rpm ($\approx 5000 \times g$) durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar brevemente a temperatura ambiente durante 5 -10 minutos. El ARN se resuspendió en 20 μL de H_2O destilada libre de ARNasas, y se colocó en baño de hielo durante 10 minutos; posteriormente se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos, con agitación constante. El ARN se cuantificó como se indicó en el apartado 6.8.

6.15.1.1. Consideraciones generales para la extracción y manejo de ARN

El material de porcelana (morteros y pistilos), el material de vidrio (matraces y frascos para soluciones) y el material metálico (espátulas y pinzas) se limpiaron primero con etanol y luego con cloroformo, luego se envolvieron en papel de aluminio y se esterilizaron dos veces en autoclave, después se esterilizaron por calor seco a 300 °C durante al menos 3 horas. El material de plástico (puntas para pipetas, tubos Eppendorf®, tubos para PCR, etc.) se esterilizaron dos veces en autoclave y se hornearon a 300 °C durante al menos 3 horas.

La mesa de trabajo y las pipetas se limpiaron primero con SDS al 1% (p/v) y luego con etanol y cloroformo. Durante la extracción de ARN se mantuvieron las espátulas, pinzas, morteros y pistilos lo más fríos posible.

El H₂O destilada necesaria para preparar soluciones que la requirieron, así como para resuspender el ARN, fue tratada primero con DEPC¹⁴, con el fin de inactivar posibles ARNasas, y se esterilizó dos veces en autoclave para eliminar completamente el DEPC.

En todo momento se trabajó con guantes de látex nuevos.

6.15.2. Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes de agarosa con formaldehído

Para que la movilidad electroforética del ARN fuera dependiente de su tamaño fue necesario desnaturalizar sus estructuras secundarias con formaldehído, por lo que los geles de electroforesis se prepararon de la siguiente manera: agarosa 1.2% (p/v), amortiguador MAE 1X y formaldehído 5.5 % (v/v). Primero se disolvió la agarosa en H₂O DEPC por calentamiento con microondas, después de dejó enfriar a aproximadamente 50 °C y se agregó el amortiguador MAE 10X¹⁵ y el formaldehído 37% (se trabajó en campana de extracción), luego se vertió sobre la cámara de electroforesis previamente lavada con SDS 1% y enjuagada con H₂O DEPC.

Después de que el gel solidificó, se colocó la cámara de electroforesis con el gel en el tanque previamente lavado con SDS 1% y enjuagado con H₂O DEPC. Se agregó amortiguador MAE 1X al tanque y se cargaron las muestras previamente preparadas en

¹⁴ **Tratamiento con DEPC (Dietilpirocarbonato):** Se agregó 0.1 % (v/v) de DEPC a la solución a tratar (a excepción de las que lleven Tris-HCl), se mezcló por agitación con una barra magnética durante toda la noche a 37° C.

¹⁵ **Amortiguador MAE 10X: MAE 10x:** MOPS 0.2 M, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM. Se ajustó a pH 7.0. Se esterilizó por filtración y se guardó protegido de la luz a 4°C.

amortiguador de carga para ARN 1X¹⁶ y calentadas a 55 °C durante 5 minutos; posteriormente, se aplicó un voltaje de 10 V/cm de gel durante 45 - 90 minutos. Los geles se fotografiaron en un equipo de fotodocumentación Gel Doc II (Bio-Rad).

6.15.3. Tratamiento del ARN con ADNasa I

Después de haber extraído el ARN, fue necesario eliminar el ADN contaminante, para evitar la posible interferencia de éste último en las técnicas siguientes. Para esto se utilizó la endonucleasa ADNasa I (Promega[®]), que degrada tanto el ADN de doble cadena como el de cadena sencilla (Moore, 1981). Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H ₂ O _{dd} DEPC	-----	2
Amortiguador (10X)	1X	5
ADN 5' fosforilado (1 µg/mL)	10 µg	40
DNasa I (1 u/µL)	1 u/µg ARN	5
Volumen de reacción		50

Se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación se detuvo la reacción agregándole 5 µL de la solución RQ1 Dnase Stop provista junto con la enzima y el amortiguador, o bien se eliminó la enzima mediante una extracción con fenol-cloroformo y el ARN se precipitó con etanol absoluto frío y acetato de sodio 3 M pH 5.2. Finalmente, se resuspendió en 10 µL de H₂O libre de ARNasas.

6.15.4. Reacción de PCR a partir de ADN obtenido por transcripción reversa de ARNm (RT-PCR)

Para comprobar la expresión de la mutación en las cepas que mostraron mayor producción de antibióticos beta-lactámicos fue necesario realizar una reacción de RT-PCR

¹⁶ **Tampón de carga para ARN 1.25X:** Para preparar 4 mL se mezclaron 2.2 mL de formamida desionizada, 0.8 mL de formaldehído 37%, 0.5 mL de MAE 10x, 0.4 mL de glicerol al 80% (v/v), 0.1 mL de azul de bromofenol al 2% (p/v) y 20 µL de bromuro de etidio 0.1% (p/v). Se almacenó a -20°C.

con unos cebadores diseñados específicamente para amplificar un segmento del gen mutado a partir de ADN sintetizado por transcripción reversa *in vitro*.

El cebador F se diseñó a partir de una región del gen *pacC*, aproximadamente 130 pb río abajo del codón de inicio. El cebador R se diseñó a partir del par de bases número 24 perteneciente al terminador *TtrpC* en dirección 5' → 3', con la hipótesis de que esta región se transcribe junto con el gen y se conserva aún en el ARNm. Solamente se amplificaría un producto de PCR con estos cebadores si las cepas expresan la mutación integrada con sus respectivos vectores. Los cebadores diseñados fueron los siguientes:

Cebador 7 5'CCTGTAACCAGAAGTTTCCC3'

Cebador 8 5'GATTCAGTAACGTTAAGTGGATC3'

La figura 7 esquematiza el diseño de cebadores para la comprobación de la expresión de la mutación por RT-PCR a partir de ARN total de las cepas analizadas.

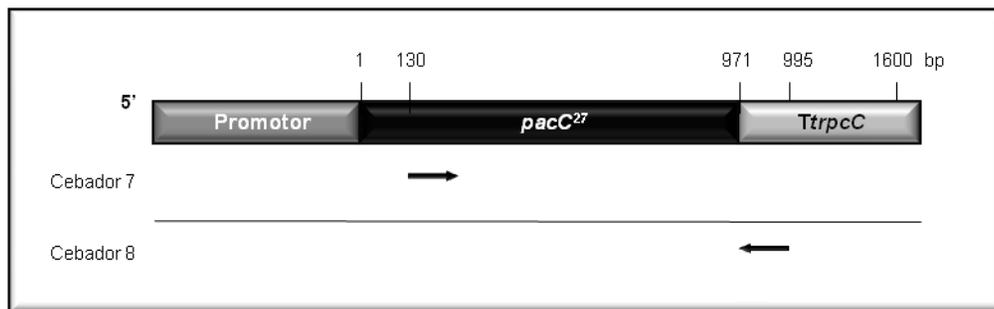


Fig. 7. Diseño de cebadores para la reacción de RT-PCR

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el kit One Step RT-PCR de Quiagen[®], el cual permite realizar, en un sólo tubo para cada muestra, las reacciones de transcripción reversa utilizando dos transcriptasas provenientes del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) y del virus de la mieloblastosis aviar (AMV). Posteriormente las transcriptasas se inactivan, al mismo tiempo que se activa la actividad "HotStar" de una ADN polimerasa (*Taq*) recombinante, encargada de llevar a cabo la amplificación de los productos de PCR a partir del ADN recién sintetizado mediante transcripción reversa. Las condiciones de las reacciones fueron las siguientes:

REACTIVO	Concentración recomendada	Volumen final (µL)
H ₂ O Libre de ARNasas	-----	29
Amortiguador (5X)	1X	10
Mezcla de dNTP's (10 mM)	400 µM	2
Cebador F (10 µM)	0.6 µM	3
Cebador R (10 µM)	0.6 µM	3
ARN molde (≈20 ng/µL)	100 ng	4
Mezcla de enzimas	2 µL	2
Volumen de reacción		50

Condiciones de operación del termociclador:

CICLOS	TEMPERATURA		TIEMPO
	Transcripción reversa	50 °C	30'
	Inactivación de las transcriptasas y activación de la polimerasa.	95 °C	15'
30	Desnaturalización	94 °C	1''
	Hibridación	60 °C	45''
	Polimerización	72 °C	1'
1	Polimerización	72 °C	8'

También se llevaron a cabo reacciones de PCR a partir del ARN tratado con ADNasa como control negativo de las reacciones de RT-PCR, para lo cual se utilizó la enzima *Taq* polimerasa, los cebadores del RT-PCR y las mismas condiciones del termociclador. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 1% (p/v).

7. RESULTADOS

7.1. Obtención de ADN total de *A. chrysogenum*

La figura 8 muestra el resultado de la extracción de ADN total de *A. chrysogenum* ATCC 11550 (cepa silvestre), visualizado en un gel de agarosa al 0.7% (p/v). Las bandas correspondientes al ADN tienen un tamaño similar al del ADN del fago lambda del carril 1.

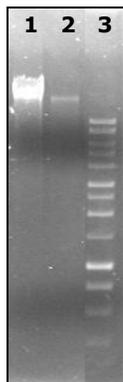


Fig. 8. ADN del fago lambda (1). Dilución 1/50 del ADN total de *A. chrysogenum* ATCC 11550 (2)

7.2. Amplificación de los fragmentos *SpacC²⁷* y *PpacC²⁷* por PCR

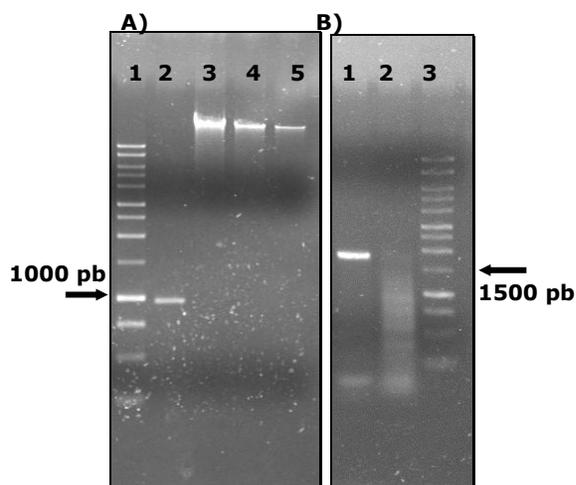


Fig. 9. A) PCR del fragmento *SpacC²⁷*, de 975 pares de bases. B) PCR del fragmento *PpacC²⁷*, de 1776 pb. Geles de agarosa al 0.7 % (p/v).

En la figura 9 se muestran los resultados para la amplificación por PCR de los fragmentos *SpacC²⁷* (A) y *PpacC²⁷* (B), en los cuales se amplificaron las bandas correspondientes a los productos esperados, de 975 y 1776 pb, respectivamente.

7.3. Construcción del vector de expresión para el gen *pacC* modificado utilizando su propio promotor

7.3.1. Ligación del inserto *PpacC²⁷* en el vector *pLXTtrpC-EcoRI*

Se realizó la ligación del fragmento *PpacC²⁷* en el vector *pLXTtrpC*, digeridos ambos solamente con la enzima *EcoRI*. Fue necesario desfosforilar el vector con fosfatasa alcalina para disminuir las probabilidades de que se recircularizara el vector sin el inserto durante la reacción de ligación. En la figura 10 se observa el resultado de la digestión con la endonucleasa *BamHI* del ADN de minipreparaciones obtenidas de colonias transformantes con la ligación *PpacC²⁷* en el vector *pLXTtrpC*. Se puede observar que solamente las colonias 3 y 5 liberan una banda de ≈ 1500 pb (correspondiente a la mayor parte del gen *pacC* y su promotor) y otra de ≈ 5900 pb, lo que indica que tales colonias poseen el inserto de interés en la dirección correcta. Mientras que, las colonias 1, 7, 9 y 10 liberan una banda de ≈ 7100 (correspondiente a la mayor parte del vector con el inserto) y otra de ≈ 300 , lo que indicaría que también poseen el inserto, pero en la orientación contraria. Las colonias 2, 4, 6, 8, 11, 12, 13, y 14 no contienen el inserto, lo que indica que en tales casos el vector fue capaz de recircularizarse (probablemente debido a que la fosfatasa alcalina no llevó a cabo su actividad por completo).

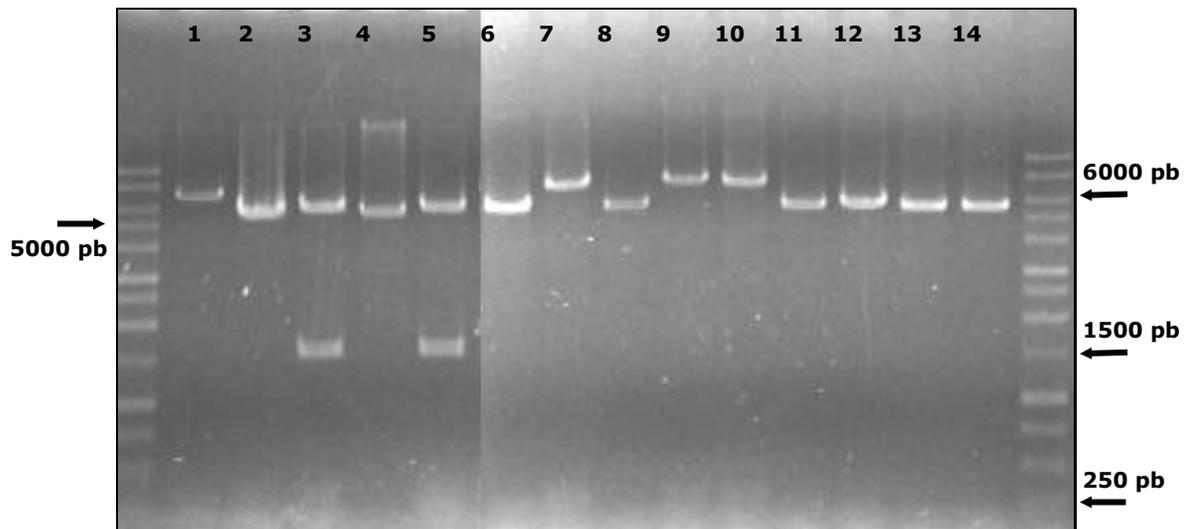


Fig. 10. Digestiones con la endonucleasa *BamHI* del ADN de minipreparaciones obtenidas de colonias transformadas con la ligación *PpacC²⁷* en el vector *pLXTtrpC*.

En la figura 11 se muestra el resultado de la digestión con *EcoRI* (a) y *BamHI* (b) del ADN de las minipreparaciones obtenidas a partir de las colonias 2, 3 y 5. La digestión con *EcoRI*, para las colonias 3 y 5, libera una banda de aproximadamente 1770 pb correspondiente al fragmento *Ppac*²⁷ y otra banda de 5600 pb correspondiente al vector, comprobándose así que dichas colonias contienen el plásmido de interés.

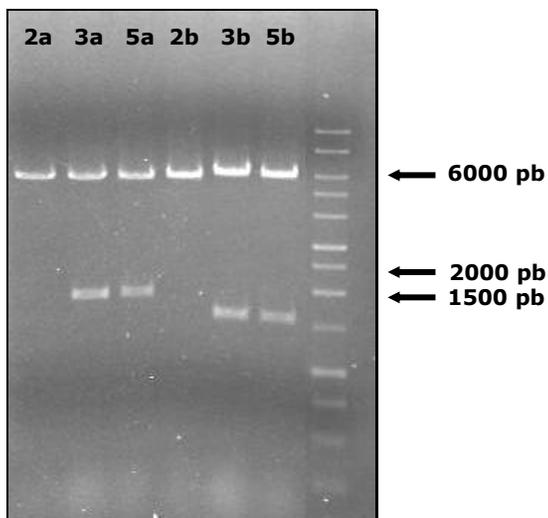


Fig. 11. Digestiones con *EcoRI* (a) y *BamHI* (b) del ADN de minipreparaciones obtenidas de las colonias 2, 3 y 5, transformadas con la ligación *Ppac*²⁷ en el vector pLXTtrpC.

El plásmido obtenido se designó pPpac²⁷ y su mapa de restricción se representa en la figura 12.

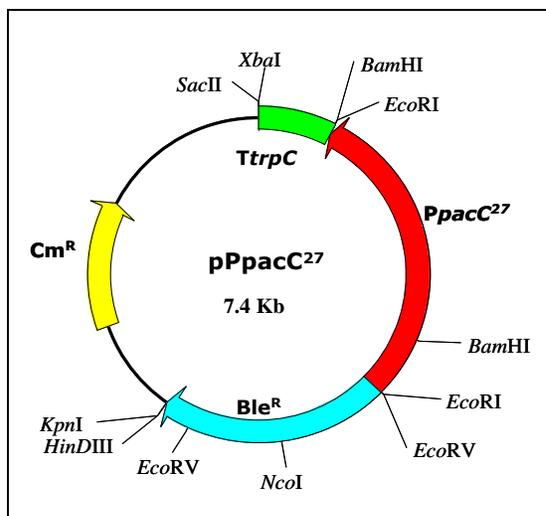


Figura 12. Mapa de restricción del plásmido pPpac²⁷.

7.4. Construcción del vector de expresión para el gen *pacC* modificado utilizando un promotor de expresión constitutiva

7.4.1. Tratamiento del vector pAN52.1 digerido con la endonucleasa *NcoI* con el fragmento Klenow

Se utilizó el plásmido pAN52.1 con la finalidad de fusionar el fragmento *SpacC*²⁷ con el promotor constitutivo *PgpdA* contenido en el vector. Una vez que fue digerido el plásmido con la enzima *NcoI*, fue tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, con la finalidad de rellenar con nucleótidos complementarios los extremos cohesivos resultantes de la digestión, dejando ambos extremos romos. Con este tratamiento se esperaba que el extremo 3' del promotor finalizara justo después del codón de inicio (ATG, incluido en el sitio de corte de la enzima *NcoI*) hacia el extremo 3', para fusionarse luego con el fragmento *SpacC*²⁷ (el cual comienza en su extremo 5' justamente con el segundo codón de la secuencia codificante del gen *pacC*, con lo que se evitaría una repetición ATGATG).

Fue necesario comprobar que el tratamiento con el fragmento Klenow hubiera funcionado adecuadamente, por lo que se recircularizó el vector tratado y se transformó en células de *E. coli*. En la figura 13 se observa que al digerir con *NcoI* diferentes minipreparaciones obtenidas de colonias transformantes éstas no se linearizan, indicando que efectivamente se rellenaron los extremos cohesivos que quedaron de la digestión con *NcoI* y que al ligarse los extremos romos resultantes se perdió el sitio de corte para la enzima.

En la parte de abajo de la figura 13 se observa el resultado de la digestión con la misma enzima del ADN de minipreparaciones obtenidas de transformantes con el vector digerido únicamente con *NcoI* y recircularizado, en el cual todas las muestras se linearizaron de nuevo, como era de esperarse.

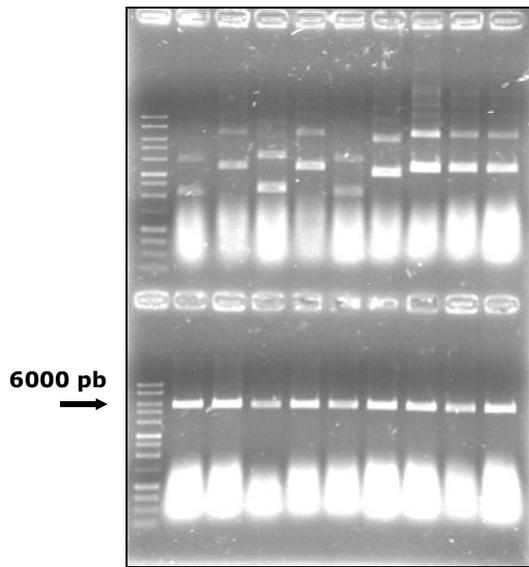


Fig. 13. Digestiones con la endonucleasa *NcoI* del ADN de minipreparaciones obtenidas de colonias transformantes con el pAN52.1 tratado con *NcoI* y rellenado con el fragmento Klenow (arriba), y con minipreparaciones del plásmido tratado no *NcoI* y recircularizado (abajo).

7.4.2. Ligación del inserto *SpacC²⁷* en el vector pAN52.1-*NcoI*-rellenado con Klenow

El vector, previamente tratado con *NcoI* y el fragmento Klenow, fue digerido con la enzima *BamHI* para generar un extremo 5' cohesivo correspondiente al terminador *TtrpC* y de esta manera poder direccionar la clonación del fragmento *SpacC²⁷* en el vector. Posteriormente, para confirmar que el gen fue clonado en el vector, se realizaron digestiones dobles con *BamHI* y *HindIII* del ADN de minipreparaciones de ADN plasmídico obtenidas de transformantes con la ligación. En la figura 14-A se observa que solamente la colonia 3 poseía el inserto de interés de 970 pb, ya que la digestión con *BamHI* y *HindIII* liberó una banda de ≈ 6000 pb; mientras que, en el caso de las demás colonias se liberó una banda de ≈ 5000 pb, indicando que éstas últimas poseen solamente el vector recircularizado sin inserto. En todos los casos se liberó también una banda de ≈ 750 pb coincidente con el tamaño del terminador *TtrpC*. En la figura 14-B se observa que al digerir con *NcoI* el ADN de las mismas minipreparaciones no hay efecto de la enzima, como estaba previsto que ocurriera. Es importante mencionar que no se esperaban colonias transformantes con el vector recircularizado sin inserto, debido a que se trataba de una clonación direccionada (con un extremo romo y un extremo *BamHI*). Sin embargo,

la presencia de colonias con el plásmido recircularizado, pero sin el sitio de corte *NcoI*, indica que la digestión con la enzima *BamHI* no se llevó a cabo completamente.

En la figura 14-C se tiene el resultado de la digestión con *NcoI*, *BamHI-HindIII* y *BamHI* de una megapreparación de ADN plasmídico obtenida a partir de la colonia 3, con el vector y el inserto de interés. La doble digestión con *BamHI* y *HindIII* libera un fragmento de aproximadamente 760 pb, correspondiente al terminador *TtrpC*. Por su parte, la digestión sencilla con *BamHI* lineariza el plásmido y confirma su tamaño de \approx 6700 pb. El plásmido obtenido se designó como pSpac-A y su mapa se muestra en la figura 15.

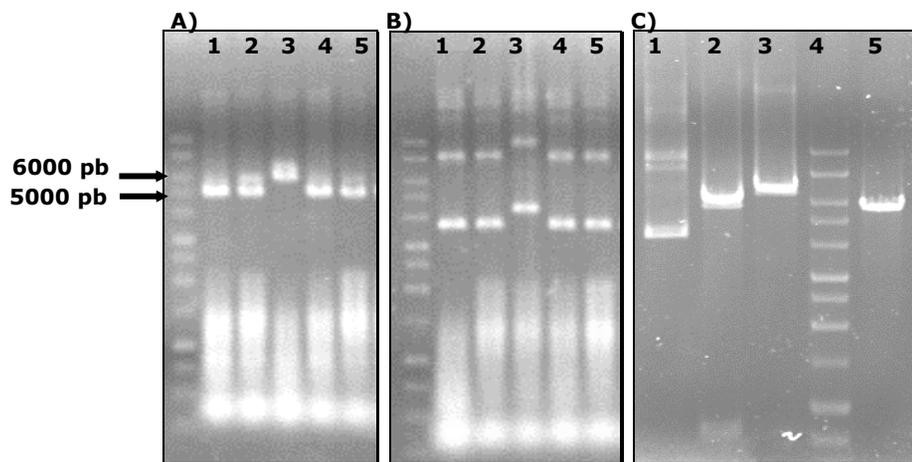


Fig. 14. Digestiones con *BamHI-HindIII* (A) y *NcoI* (B) del ADN de minipreparaciones obtenidas de transformantes con la ligación de *SpacC²⁷* en el vector pAN52.1-*NcoI*-Klenow. C) Digestiones con *NcoI* (1), *BamHI-HindIII* (2) y *BamHI* (3) realizadas con una megapreparación obtenida de la colonia 3; marcador de peso molecular de 1 kb (Promega®) (4), y digestión con *BamHI* al plásmido pAN52.1 (5).

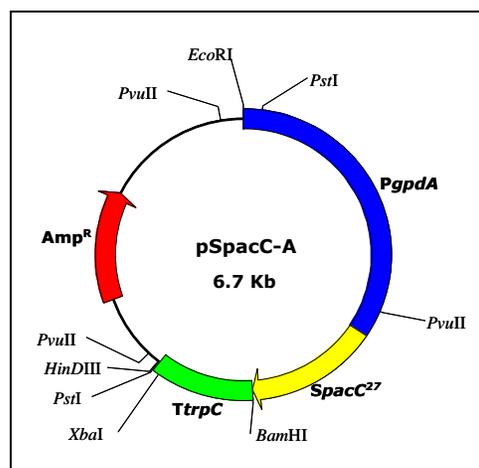


Figura 15. Mapa de restricción del plásmido pSpac-A.

La figura 16 muestra el resultado de la secuenciación parcial del plásmido pSpacC-A, donde se comprueba la integridad exacta del marco de lectura, demostrando que éste no fue alterado durante las distintas etapas de la construcción del vector.

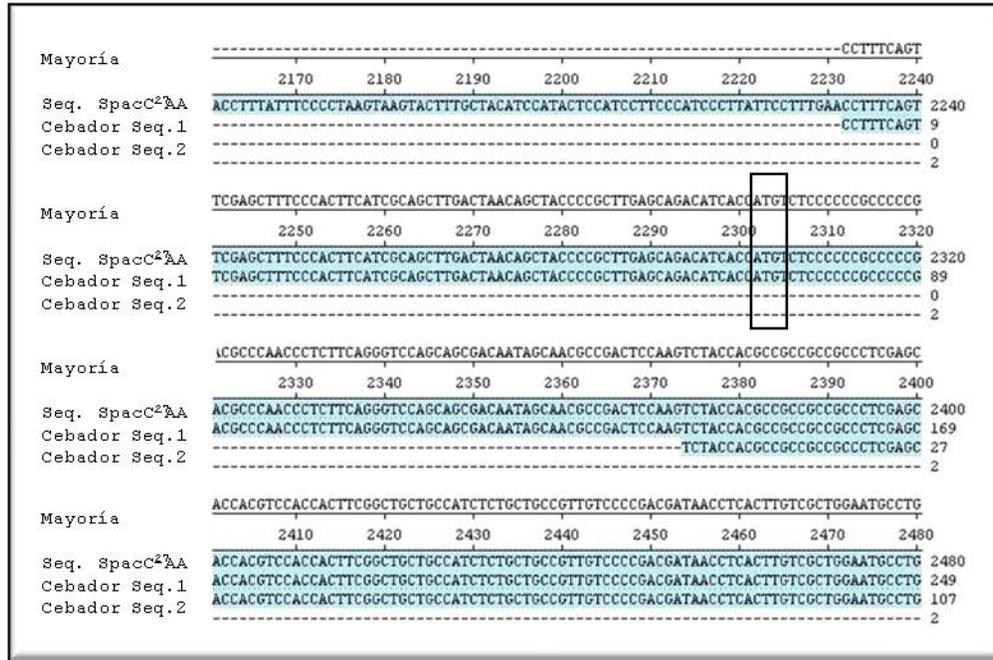


Fig. 16. Comprobación de la integridad del marco de lectura en el plásmido pSpacC²⁷

7.4.3. Amplificación por PCR del promotor *Pgpd* con el fragmento *SpacC²⁷*, a partir del vector pSpacC-A

Un producto de PCR, abarcando desde el inicio del promotor hasta el término del fragmento *SpacC²⁷* (*PgpdA-SpacC²⁷*), se amplificó a partir del plásmido pSpacC-A con la finalidad de subclonarlo posteriormente en el vector pLXT_{trpC} para cambiar el marcador de resistencia a ampicilina por el marcador de resistencia a cloranfenicol contenido en éste último vector. Se obtuvo un producto de 3276 pb, correspondiente al promotor *PgpdA* de 2301 pb fusionado con el fragmento *SpacC²⁷* de 971 pb. El resultado se ilustra en la figura 17.

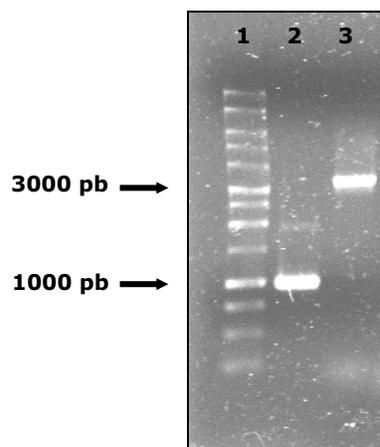


Figura 17. PCR del promotor *Pgpd* con el fragmento *SpacC²⁷* (carril 3) y de sólo el fragmento *SpacC²⁷* (2) obtenidos a partir del plásmido pSpacC-A

7.4.4. Ligación del inserto *Pgpd-SpacC²⁷* en el vector pLXTtrpC-*EcoRI-BamHI*

El producto de PCR *Pgpd-SpacC²⁷* se subclonó en el vector pLXTtrpC y se obtuvo finalmente el plásmido pSpacC²⁷. En la figura 18-A se observa que la doble digestión con *BamHI* y *EcoRI* del ADN de minipreparaciones obtenidas de colonias transformantes con el plásmido pSpacC²⁷ libera el inserto de 3276 pb, únicamente para las colonias 1, 2, 4, 9, 12 y 14.

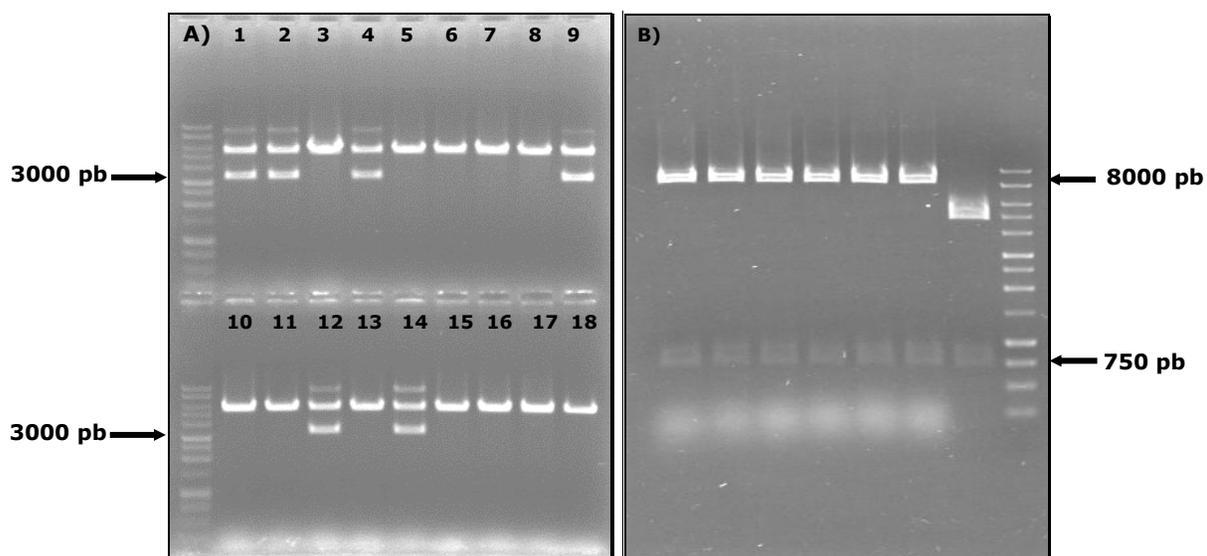


Fig. 18. A) Digestión *BamHI-EcoRI* del ADN de minipreparaciones obtenidas de transformantes con la ligación *Pgpd-SpacC²⁷* en el vector pLXTtrpC. B) Digestión *XbaI-BamHI* de las minipreparaciones obtenidas de las colonias 1, 2, 4, 9, 12 y 14.

Para corroborar que tales colonias contuvieran el inserto en la orientación correcta, se realizó una doble digestión *Xba*I y *Bam*HI al ADN de las minipreparaciones correspondientes. En la figura 18-B se observa que la digestión libera una banda de aproximadamente 750 pb, confirmando que efectivamente las colonias 1, 2, 4, 9, 12 y 14 contienen el vector con el inserto orientado correctamente, como se infiere del mapa de la figura 19.

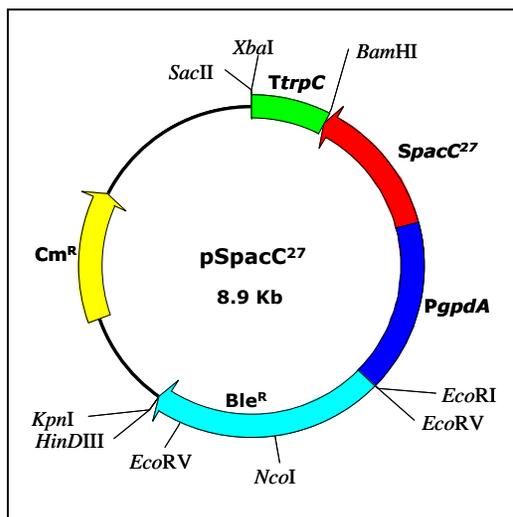


Figura 19. Mapa de restricción del plásmido pSpacC²⁷.

7.5. Transformación de *A. chrysogenum* ATCC 11550

7.5.1. Obtención de protoplastos

Se observó la liberación de protoplastos a partir de la primera hora de incubación con Driselase[®], y a las tres horas se consiguió la mayor formación de protoplastos, sin presentarse todavía lisis celular. En la figura 20 se muestra una fotografía al microscopio de contraste de fases de las fases de los protoplastos formados a las tres horas de incubación.

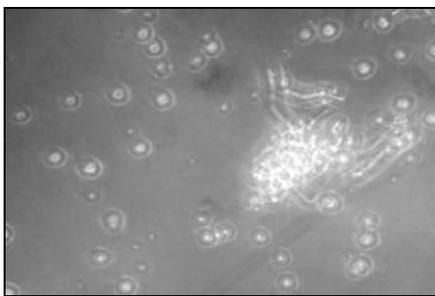


Fig. 20. Protoplastos de *A. chrysogenum* ATCC 11550 a las 3 horas de incubación con Driselase[®]. 400X.

7.5.2. Transformación

Se obtuvieron 3 colonias transformantes para el plásmido pSpacC²⁷ (que contiene un promotor constitutivo), 8 para el plásmido pPpacC²⁷ (que incluye el propio promotor del gen *pacC*) y 3 para el plásmido control pLXTtrpC (sin inserto). La figura 21 muestra las colonias obtenidas después de la doble resiembra en medio TSAS con 20 µg/mL de fleomicina; a la izquierda se muestran los controles positivo y negativo de la transformación.

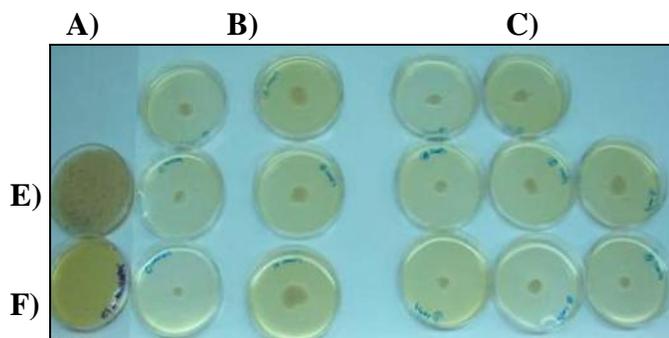


Fig. 21. Transformantes de *A. chrysogenum* WT. A) Control pLXTtrpC, B) pSpacC²⁷, C) pPpacC²⁷, E) Control positivo (protoplastos sin fleomicina), F) Control negativo (protoplastos con fleomicina).

7.5.3. Comprobación de la integración de los vectores

Se obtuvo el ADN total de las 14 transformantes obtenidas y de la cepa silvestre, el resultado se muestra en la figura 22-A. Para comprobar la integración de los vectores en las transformantes se realizaron reacciones de PCR, obteniéndose para las cepas P (con el plásmido pPacC²⁷) y X (pLXTrpC control) una banda de aproximadamente 700 pb (correspondiente al terminador *TtrpC* contenido en los vectores). En el caso de las cepas S (pSpacC²⁷) se obtuvo una banda de aproximadamente 4 kb, que corresponde al cassette de expresión de la mutación (desde el inicio del promotor *PgpdA* hasta el fin del terminador *TtrpC*). Con el ADN de la cepa silvestre no se consiguió amplificación de ningún fragmento en las mismas condiciones de PCR. El resultado se observa en la figura 22-B.

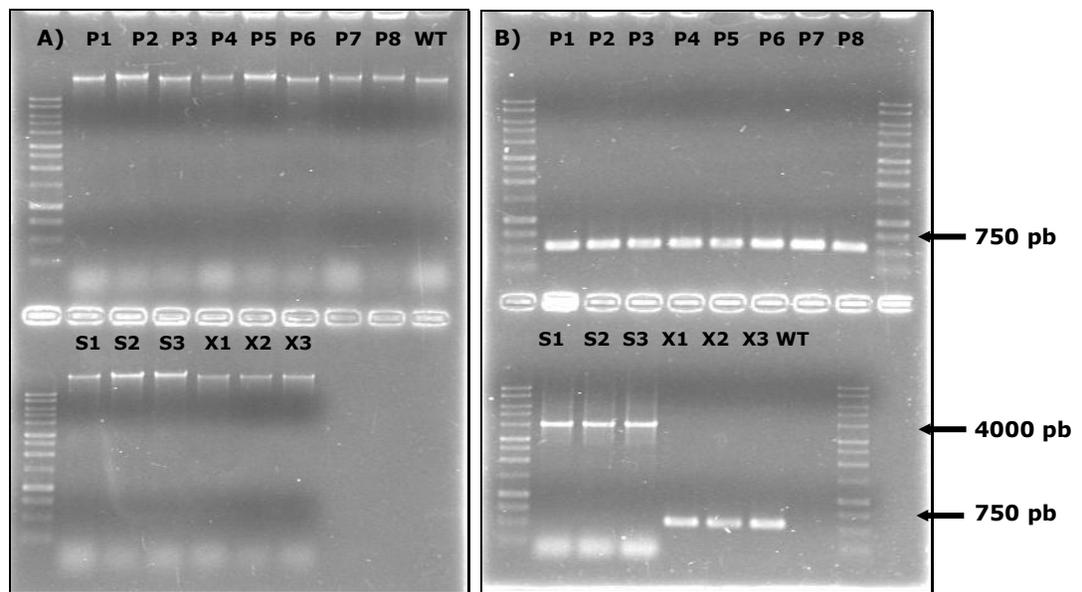


Fig. 22. A) obtención de ADN total de las cepas transformantes y de la cepa silvestre. B) PCR del terminador *TtrpC* para las cepas P, X y parental, y del cassette de expresión de la mutación en las cepas S.

7.6. Evaluación del efecto de la mutación de mimetismo alcalino sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos

7.6.1. Fermentación en cilindros de agar

La gráfica de la figura 23 muestra las cinéticas de producción de antibióticos beta-lactámicos en cilindros de agar, para cada una de las cepas transformantes y para la cepa sin transformar.

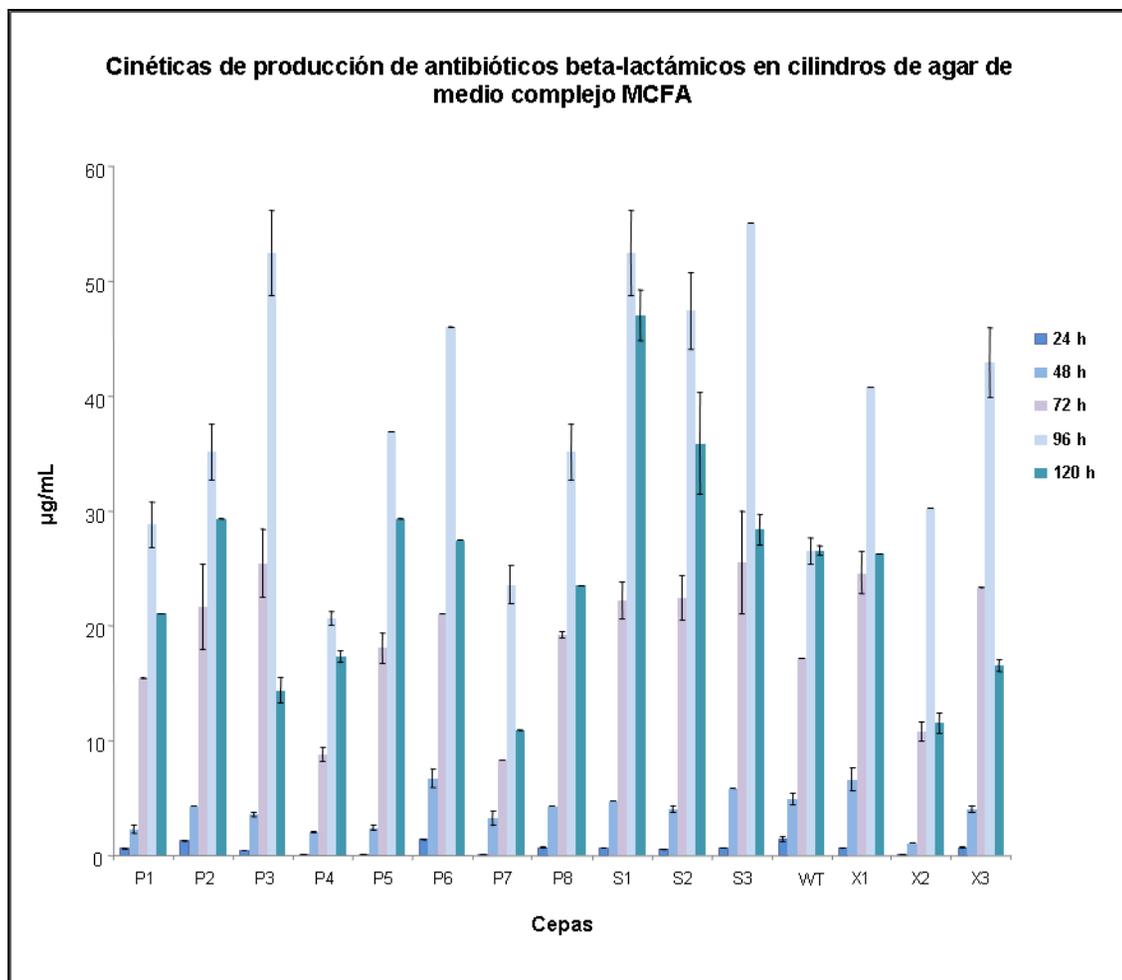


Fig. 23. Resultados de la fermentación en cilindros de agar. Los resultados se expresan en producción volumétrica. Las barras de error indican la desviación estándar. Las letras P, S y X representan las cepas transformantes con los plásmidos pPpac²⁷, pSpac²⁷ y pLXTtrpC, respectivamente. WT indica cepa parental.

7.6.2. Fermentación en medio líquido complejo MCFA

La figura 24 muestra las cinéticas de producción de antibióticos beta-lactámicos en medio líquido complejo para cada una de las cepas analizadas. Los resultados se expresan como producción específica, y también se muestran las cinéticas de formación de biomasa y de evolución del pH a lo largo de toda la fermentación.

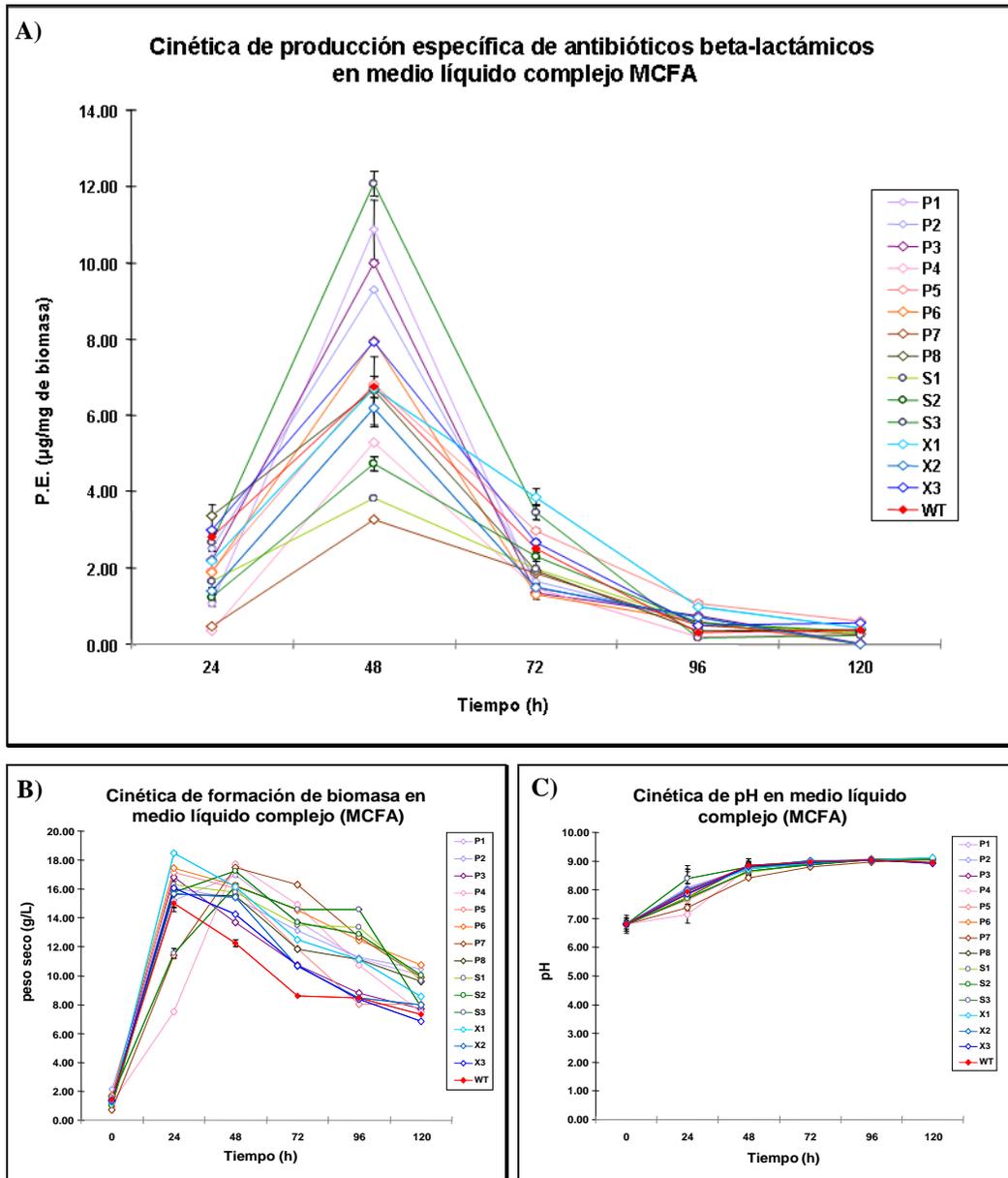


Fig. 24. A) Cinética de producción de antibióticos beta-lactámicos B) Cinética de formación de biomasa y C) Cinética de evolución del pH en medio líquido complejo, para cada una de las cepas analizadas.

7.6.3. Fermentación en medio líquido definido MDFAM/MES

En la figura 25 se muestran las cinéticas de producción de antibióticos beta-lactámicos en medio líquido definido MDFAM/MES, amortiguado a pH ácido para cada una de las cepas analizadas. Los resultados se expresan como producción específica. También se muestran las cinéticas de formación de biomasa y de evolución del pH a lo largo de toda la fermentación.

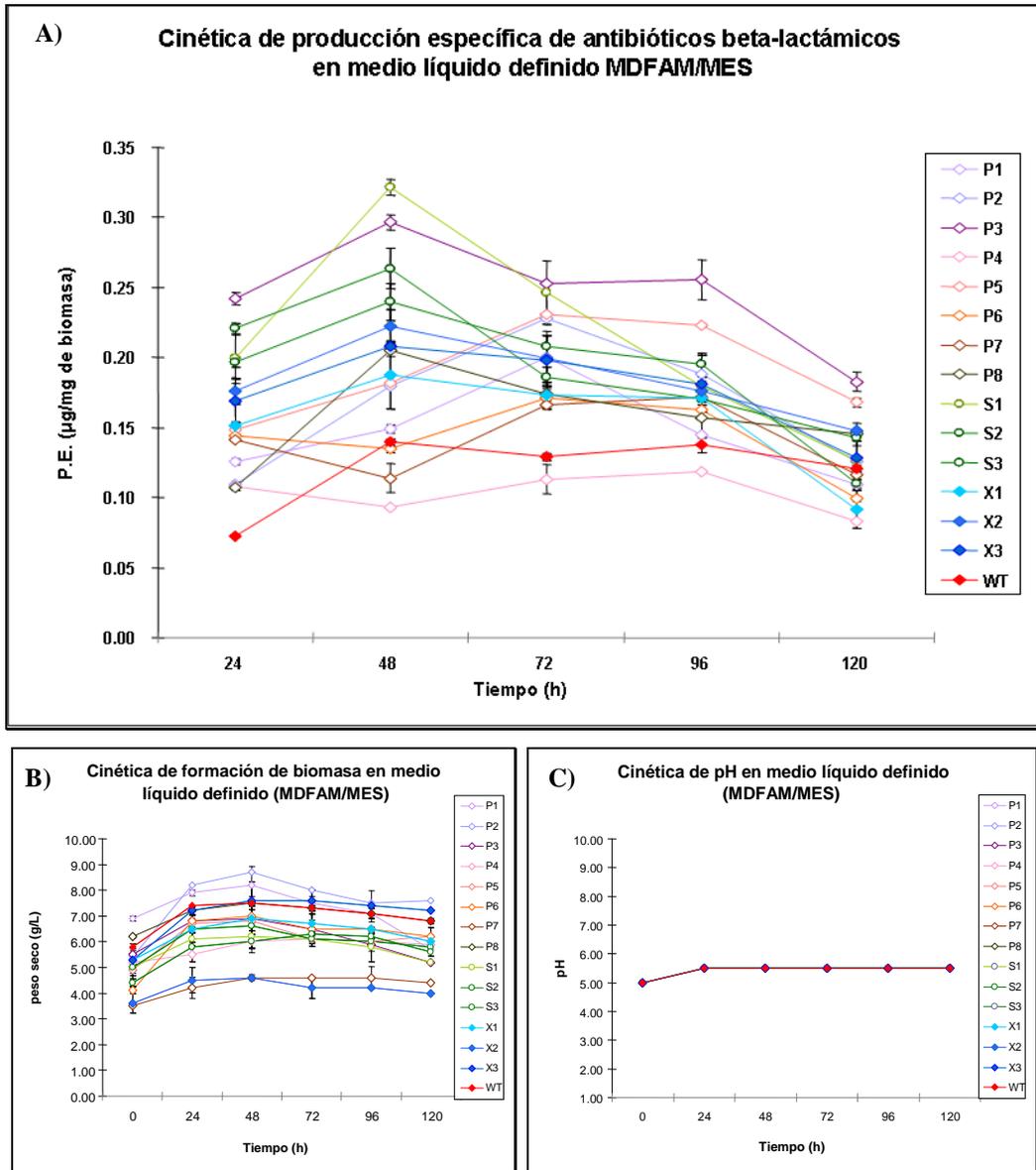


Fig. 25. A) Cinética de producción de antibióticos beta-lactámicos B) Cinética de formación de biomasa y C) Cinética de evolución del pH en medio líquido definido y amortiguado, para cada una de las cepas analizadas.

7.7. Comprobación de la expresión del gen mutado

7.7.1. Obtención de ARN total

Se obtuvo el ARN total (figura 26) de las cepas P3, S1 y S3, las cuales mostraron la mayor producción de antibióticos beta-lactámicos durante la fermentación con medio MDFAM/MES. También se obtuvo el ARN de la cepa X2 y de la cepa silvestre, para ser utilizados como controles.

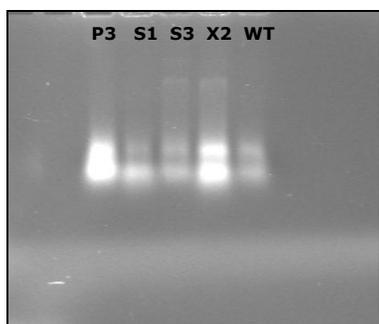


Fig. 26. ARN total de las cepas P3, S1, S3, X2 y WT

7.7.2. RT-PCR

El resultado de las reacciones de RT-PCR se muestra en la figura 27-A. Se amplificó una banda de ≈ 700 pb, correspondiente al ADNc del gen *pacC* mutado y flanqueado por el terminador *TrpC*, solamente en las muestras correspondientes a las cepas P3, S1 y S3. En la figura 27-B se muestra el resultado de la reacción de PCR a partir de ARN total, realizada como control negativo de la reacción de RT-PCR.

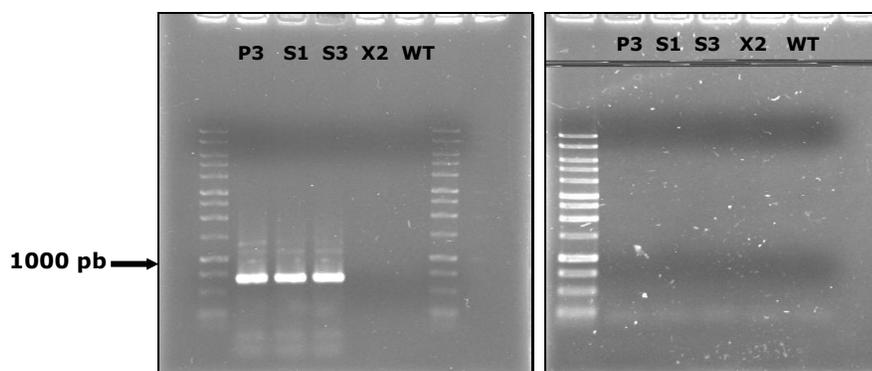


Fig. 27. A) RT-PCR de las cepas P3, S1, S3, X2 y WT. B) Control negativo

8. DISCUSIÓN

8.1. Amplificación de los productos de PCR *PpacC*²⁷ y *SpacC*²⁷

Se amplificaron exitosamente ambos fragmentos, para lo cual fue necesario estandarizar las condiciones de reacción utilizando la enzima *Taq* polimerasa. Una vez que se consiguió visualizar en el gel de agarosa una sola banda, del tamaño correspondiente para cada producto de PCR (Fig. 9), se repitieron las reacciones utilizando *Pfu* polimerasa. La enzima *Pfu* es una polimerasa de alta fidelidad que permite la amplificación confiable de fragmentos de hasta 30 kpb y que, a diferencia de la *Taq* polimerasa, no añade residuos de adenina en los extremos 3' de los productos de PCR. Esto permite que la clonación del inserto se lleve a cabo de manera directa, sin necesidad de utilizar otras estrategias como la clonación de productos de PCR en sistemas pGEM[®]-T.

8.2. Construcción de los vectores de expresión

8.2.1 Construcción del vector p*PpacC*²⁷

Se realizó la ligación del fragmento *PpacC*²⁷ en el vector pLXTtrpC, digeridos ambos solamente con la enzima *EcoRI*. Fue necesario desfosforilar primero el vector con fosfatasa alcalina para disminuir las probabilidades de que se recircularizara el vector sin el inserto durante la reacción de ligación. Sin embargo, a pesar del tratamiento con fosfatasa alcalina, se obtuvieron colonias transformantes con el vector recircularizado (Fig. 10), indicando que la enzima no llevó a cabo su actividad por completo. Cabe mencionarse que, si bien no se alcanzó el 100% de desfosforilación, el tratamiento con fosfatasa fue bastante efectivo, al comparar los controles de la ligación en los que se recircularizaron únicamente el vector sin desfosforilar y el vector desfosforilado: en el primer caso se obtuvieron más de 300 colonias por placa mientras que en el segundo caso solamente de 3 a 5 colonias.

8.2.2 Construcción del vector p*SpacC*²⁷

Aunque se obtuvo la construcción del plásmido p*SpacC*-A (Fig. 15) que contenía ya el cassette de expresión conformado por el promotor *PgpdA*, el fragmento *SpacC*²⁷ y el

terminador *TtrpC*, éste carecía aún de un marcador de resistencia para hongos. Esta eventualidad podría superarse con la posibilidad de cotransformar *A. chrysogenum* con este vector y con otro que contuviera un marcador dominante de selección en hongos (Nowak *et al.*, 1995), como por ejemplo el plásmido pULC43 (Gutiérrez, 1994).

Un problema adicional es que el vector pSpac²⁷, al ser derivado del pAN52.1, contiene también en su estructura un gen de resistencia a ampicilina, que codifica para una beta-lactamasa (Punt *et al.*, 1990). Si la integración en el genoma de *A. chrysogenum* de este gen procariótico ocurriera junto a algún promotor que facilitara su expresión, o dentro del marco de lectura de algún gen cuya interrupción no resultase letal, podría producirse una hipotética expresión de la beta-lactamasa, lo que afectaría negativamente a la producción de antibióticos beta-lactámicos. Aunque algunos autores (Liu *et al.*, 2010) han utilizado construcciones similares para transformar *A. chrysogenum* y medir efectos sobre la producción de CPC sin que se observase algún efecto negativo debido al marcador de resistencia a ampicilina contenido en sus vectores, en el presente trabajo se decidió cambiar tal marcador por otro de resistencia a cloranfenicol, lo cual se consiguió subclonando el fragmento que abarca desde el inicio del promotor *PgpdA* hasta el término del inserto *Spac*²⁷ en el vector pLXTtrpC, que contiene además de la resistencia a cloranfenicol (marcador de selección en bacterias), un cassette de resistencia a fleomicina como marcador de selección en hongos.

La resistencia a fleomicina, además de la resistencia a higromicina y benomilo, se ha utilizado frecuentemente en la transformación de hongos (Kück *et al.*, 1989). La fleomicina pertenece al grupo de antibióticos metalo-glicopeptídicos de la familia de la bleomicina (Berdy, 1980). Tanto la bleomicina como la fleomicina ocasionan daño a la molécula de ADN, preferentemente en secuencias repetidas invertidas con ADN de cadena sencilla y en lugares de ADN de doble cadena no metilados. La resistencia a estos antibióticos se encuentra mediada por el gen *ble*, que se encuentra en el transposón Tn5 de ciertas bacterias Gram-negativas, en el plásmido PUB110 de bacterias Gram-positivas y en el ADN cromosómico de algunos actinomicetos productores de fleomicina como *Streptoalloteichus hindustanus*. El producto del gen *ble* es una proteína con fuerte afinidad por la fleomicina y la bleomicina y que impide su activación por iones de hierro y oxígeno y, por lo tanto, evita el rompimiento del ADN por tales antibióticos (Drocourt *et al.*, 1990).

8.3. Transformación de *A. chrysogenum* ATCC 11550

Una vez que se obtuvieron las construcciones de los vectores de expresión con las mutaciones correspondientes, y que se hubo corroborado la secuencia de nucleótidos exacta de las fusiones que se pretendía realizar, se procedió a la transformación de *A. chrysogenum*. Para la transformación se utilizaron de 10 a 50 µg de ADN de los plásmidos pPpacC²⁷, pSpacC²⁷ y pLXTtrpC. El primero contiene la mutación del gen *pacC* expresado bajo el control de su propio promotor, el segundo contiene la misma mutación expresada bajo el control del promotor constitutivo *PgpdA* de *Aspergillus nidulans* y el tercero es solamente el vector sin ningún inserto. Los tres vectores contienen el mismo marcador de resistencia a fleomicina.

Se obtuvieron 8 transformantes para el plásmido pPpacC²⁷, 3 para pSpacC²⁷, y 3 para pLXTtrpC. Tal diferencia pudo estar dada por la cantidad de ADN que se utilizó para cada transformación, siendo mayor la del vector pPpacC²⁷. En la figura 21 se observa crecimiento en el control positivo, lo cual indica que los protoplastos obtenidos son verdaderamente viables. También se observa crecimiento nulo en el control negativo, indicando la buena funcionalidad de la fleomicina a la concentración mínima inhibitoria reportada de 10 µg/mL para la cepa silvestre (Cuadra, 2008). La relativamente baja frecuencia de transformación pudo deberse a que se utilizaron los vectores no linearizados; Skatrud *et al.* (1987) reportaron un incremento de hasta tres veces en la frecuencia de transformación de *A. chrysogenum* cuando el ADN plasmídico es linearizado en un sitio que no afecte a los marcadores de resistencia ni al cassette de expresión de la mutación. La transformación en hongos filamentosos es además un evento que normalmente siempre ocurre con bajas frecuencias de integración (Case *et al.* 1979; Tilburn *et al.* 1983; Queener *et al.*, 1985); en *A. chrysogenum* la recombinación homóloga es un evento muy raro y la integración del ADN ocurre casi siempre por transformación heteróloga, con muy baja frecuencia de integración (Walz y Kück, 1993). Para mejorar la eficiencia de transformación en *A. chrysogenum*, Skatrud *et al.* (1987) recomiendan realizar una separación de protoplastos y recuperar los más grandes, ya que estos presentan siempre una mejor regeneración de la pared celular.

8.4. Evaluación del efecto de la mutación de mimetismo alcalino sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos

8.4.1. Fermentación en cilindros de agar de medio complejo MCFA

Se realizó el análisis preliminar de las transformantes con una fermentación en cilindros de agar en medio complejo MCFA. En la figura 23 se muestra el resultado de las cinéticas de producción de antibióticos beta-lactámicos para cada cepa, incluyendo la cepa parental. Se puede observar que el pico de mayor producción para cada cepa se consigue a las 96 horas de incubación. Al procesar los datos mediante un análisis de varianza, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, se observó que en el sistema de fermentación, con un nivel de significancia $\alpha = 0.01$, se alcanzó la mayor producción de antibióticos beta-lactámicos en las cepas P6, S2, P3, S1 y S3, con producciones volumétricas de 45.99, 47.45, 52.44, 52.44 y 55.07 $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confianza del 99% = 8.93 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente, en comparación con la cepa parental (26.53 $\mu\text{g/mL}$).

Sin embargo, se observó que el crecimiento no era completamente homogéneo en las distintas transformantes analizadas, posiblemente debido a algún efecto negativo de la transformación sobre el crecimiento o la esporulación. La cantidad de esporas inoculadas de cada cepa en los cilindros tampoco fue un parámetro estricto, lo que también puede contribuir a ese efecto de crecimiento diferencial. Las diferencias en el crecimiento, por lo tanto, podrían estar afectando a los resultados de la producción de antibióticos beta-lactámicos en los cilindros de agar, por lo que se decidió llevar a cabo una fermentación líquida en el mismo medio complejo, con las 15 cepas analizadas (incluyendo la cepa parental), para poder considerar el efecto de la biomasa sobre la concentración de los antibióticos beta-lactámicos presentes, expresándose ésta última como producción específica.

8.4.2. Fermentación en medio líquido complejo MCFA

En la figura 24-A se muestran los resultados de la fermentación líquida en medio complejo MCFA. En este sistema se observó la máxima producción de antibióticos beta-lactámicos a las 48 horas de incubación, a diferencia de lo que ocurrió en el sistema de cilindros de agar. Tal diferencia en cuanto a los tiempos de producción entre los dos

sistemas puede deberse, principalmente, a la propia fisiología de *A. chrysogenum*, cuyo origen acuático pudiera favorecer preferentemente los mecanismos de absorción de nutrientes y síntesis de metabolitos secundarios en un sistema de fermentación líquido.

El análisis estadístico de los resultados para esta fermentación demostró que a las 48 horas se obtiene significativamente ($\alpha=0.01$) la mayor producción específica de antibióticos beta-lactámicos en las cepas S3, P1 y P3, de 12.003, 10.86 y 9.986 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de biomasa, respectivamente, con un intervalo de confianza del 99% de $\pm 0.51 \mu\text{g}/\text{mg}$ de biomasa, alcanzando producciones volumétricas de 195.81, 171.52 y 160.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (intervalo de confianza del 99% = 15.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivamente.

Los títulos de producción específica de antibióticos beta-lactámicos obtenidos por las cepas S3, P1 y P3 fueron significativamente superiores ($\alpha=0.01$) en un 75.25%, 57.6% y 44.9% (intervalo de confianza del 99% = 13.69%), respectivamente, en comparación con los títulos conseguidos con las cepas controles y la cepa parental, las cuales no mostraron diferencia significativa entre sí. Lo anterior revela que, al menos para estas tres transformantes, la mutación realizada tuvo un efecto positivo sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos en este sistema de fermentación y que, por otro lado, no hubo efecto significativo del plásmido sin inserto o de alguno de sus componentes sobre la producción de antibióticos.

Se observa también que el resto de las transformantes con los plásmidos pPpac²⁷ y pSpac²⁷ se comportan de manera heterogénea, lo cual es debido a que la transformación en hongos comúnmente resulta en la integración ectópica del ADN plasmídico en uno o varios loci del genoma mediante recombinación ilegítima, la cual no requiere de homología ni de ningún tipo de secuencias especiales (Edenberg, 2006). La integración azarosa del vector y de sus componentes pudo haber desorganizado otros genes o causado mutaciones o desregulaciones que, si bien no resultaron letales, sí afectaron de alguna manera a la biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos e incluso el crecimiento.

En la figura 24-B se observa que el comportamiento en cuanto a formación de biomasa de las cepas es muy similar; en la mayoría, la biomasa aumenta entre 7 y 9 veces a las 24 horas de incubación (o a las 48 horas en el caso de las cepas P4, P7 y S3). Puede observarse, al comparar las transformantes con la cepa parental, que la transformación pudo haber tenido algún efecto positivo sobre la formación de biomasa. Sin embargo, después de las 24 o 48 horas de fermentación la biomasa comienza a descender constantemente, lo cual puede ser el resultado de un proceso de autólisis

desencadenado por los altos valores de pH, una señal de envejecimiento que podría conducir a la muerte celular (White *et al.*, 2002).

La figura 24-C muestra que en todos los casos, incluyendo la cepa parental, el pH se comportó de la misma manera a partir de las 48 horas de incubación, alcanzando valores máximos de alrededor de 9.0. El objetivo del presente trabajo fue obtener mutaciones de mimetismo alcalino, y dado que el pH (que partió desde 6.8 al tiempo cero) alcanzó valores neutro-alcalinos desde las 24 horas de incubación, no fue posible observar el efecto real de la mutación introducida en el hongo. Por esa razón, decidió realizarse una fermentación adicional, en la que el medio líquido se encontrara amortiguado a un pH ácido, entre 5.0 y 5.5.

8.4.3. Fermentación en medio líquido definido MDFAM/MES

En la figura 25-A se muestran los resultados de la fermentación líquida en medio definido MDFAM/MES. En este sistema se observó la máxima producción de antibióticos beta-lactámicos para la mayoría de las cepas transformantes a las 48 horas de incubación, de forma similar a lo ocurrido en la fermentación llevada a cabo en el medio complejo.

El análisis estadístico de los resultados para esta fermentación reveló, con un nivel de significancia $\alpha=0.01$, que a las 48 horas se obtuvo la mayor producción específica de antibióticos beta-lactámicos en las cepas S3, P3 y S1, de 0.263, 0.296 y 0.321 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de biomasa (intervalo de confianza del 99% = 0.04 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de biomasa). La gran diferencia entre los títulos de antibióticos beta-lactámicos obtenidos en este sistema de fermentación respecto a los obtenidos en la fermentación en medio MCFA se debe a la composición del medio de fermentación: en el medio MDFAM/MES la disponibilidad de nutrientes es muy limitada, mientras que el medio complejo contiene, además de mayor cantidad de nutrientes, factores de crecimiento y bloques de construcción de macromoléculas que pueden simplificar notablemente el crecimiento y la biosíntesis de metabolitos secundarios. Aunque el medio MDFAM/MES no es óptimo para una mayor producción de CPC, sí es un medio con pH controlado a niveles ácidos, lo que lo hace accesible para que se pudiera realizar el análisis del efecto de la mutación de mimetismo alcalino sobre la producción de CPC.

Los títulos de producción específica de antibióticos beta-lactámicos obtenidos por las cepas S3, P3 y S1 fueron significativamente superiores ($\alpha=0.01$) a los títulos conseguidos

con la cepa parental en un 88.5%, 112.2% y 130.5%, respectivamente. En comparación con las cepas control, que tampoco mostraron diferencia significativa entre sí, las cepas S3, P3 y S1 fueron significativamente superiores en un 27.9%, 44% y 56.1% (intervalo de confianza del 99% = 12.6 %), respectivamente. Esto confirmaría, también para este sistema de fermentación, que la mutación introducida tuvo un efecto positivo sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos, al menos para las tres cepas mencionadas.

En el caso de las cepas restantes, incluyendo las cepas control, se observó nuevamente una variedad de comportamientos diferentes con respecto de unas a otras y de la cepa parental, posiblemente debido también a la integración azarosa del vector en el genoma de *A. chrysogenum*.

En la figura 25-B se observa un comportamiento muy similar de la producción de biomasa para todas las cepas analizadas, alcanzándose su mayor formación entre las 24 y 48 horas de fermentación, y disminuyendo lentamente después y manteniéndose de manera casi constante (probablemente debido al ligero aumento en el pH del medio de fermentación). Sin embargo, el aumento en la formación de biomasa con respecto al tiempo cero es mínimo, lo cual obedece a la naturaleza del medio de fermentación: al tratarse de un medio definido diseñado específicamente para la producción de CPC, contiene poca fuente de carbono asimilable para la formación de biomasa (Caltrider *et al.*, 1968). La mayor diferencia que se observa en el comportamiento de la producción de biomasa durante la fermentación radica en la cantidad de inóculo que se utilizó para cada cepa: ya que no fue posible estandarizar alguna técnica que permitiera manejar esporas, se tuvo que inocular con micelio, el cual pudo haber estado en distintas condiciones de esporulación para cada cepa en particular.

La figura 25-C muestra que en todos los casos, incluyendo la cepa parental, el pH se comportó de la misma manera a partir de las 24 horas de incubación, y alcanzó valores máximos de alrededor de 5.5, manteniéndose constante durante el resto de la fermentación. Esto fue ideal para relacionar el efecto de la mutación introducida con la producción de antibióticos beta-lactámicos en la cepa silvestre de *A. chrysogenum*.

La mayoría de las cepas transformantes con los plásmidos pPpacC²⁷ y pSpacC²⁷ mostraron una mayor producción específica significativa ($\alpha=0.01$) desde las 24 horas de fermentación, con respecto a la cepa parental, manteniéndose el pH en valores de 5.5. Esto sugiere que la estrategia de truncar el factor de transcripción PacC para que se exprese directamente en su forma funcional PacC²⁷ fue efectiva, de manera que ocasionó un fenotipo de mimetismo alcalino en *A. chrysogenum* (evidenciado por la mayor

producción de antibióticos beta-lactámicos a un pH ácido con respecto a la cepa parental). Este fenómeno ha sido reportado en *A. nidulans* cuando se realizaron mutaciones del mismo tipo (Caddick *et al.*, 1986; Shah *et al.*, 1991; Espeso *et al.*, 1993; Arst *et al.*, 1994).

Por otro lado, no hubo diferencias significativas ($\alpha=0.01$) entre las dos cepas que estadísticamente mostraron la mayor producción de antibióticos beta-lactámicos (S1 y P3), lo cual parece sugerir un mismo efecto al utilizar el promotor propio del gen *pacC* y el promotor constitutivo *PgpdA*, al menos para el presente trabajo. Aunque, el hecho de que las cepas con el plásmido *pSpacC*²⁷ presenten en la fermentación a pH ácido controlado mayor producción significativa que la mayoría de las cepas con el plásmido *pPacC*²⁷ sugiere, sin embargo, lo contrario. Dada la variabilidad de fenotipos presentes, parece ser que los efectos de ambos tipos de plásmidos sobre la producción específica de antibióticos beta-lactámicos obedecerían más bien a la integración azarosa del ADN plasmídico en el genoma de *A. chrysogenum* que a la naturaleza del promotor con que se expresa la mutación.

Es importante mencionar que en la fermentación líquida en medio complejo, la producción de antibióticos beta-lactámicos comenzó a decaer drásticamente después de las 48 horas de fermentación, coincidiendo con la elevación del pH a valores superiores a 8.0, lo cual posiblemente provocó algún tipo de hidrólisis química de la CPC o permitió la aparición de alguna actividad acetilhidrolasa alcalina (Velasco *et al.*, 2001). En la fermentación en medio definido también se observa una disminución de la producción después de las 48 o 72 horas de fermentación, la cual también pudiera estar relacionada con la expresión de las acetilhidrolasas.

8.5. Comprobación de la expresión de la mutación de mimetismo alcalino

Además de los resultados presentados anteriormente, que sugieren que las cepas P3, S1 y S3 presentan un fenotipo de mimetismo alcalino, fue necesario diseñar otro experimento que comprobara la correcta expresión de los genes introducidos, de forma que ésta pudiera correlacionarse con los efectos observados sobre la producción de antibióticos. Para esto, se realizó una estrategia de amplificación mediante RT-PCR, utilizando un cebador F que acotara una región del gen *pacC* y un cebador R diseñado para hibridar en la zona inicial del terminador *TtrpC* (la cual se esperaba que se transcribiera junto con el gen en el ARNm). De esta forma, sólo se amplificaría un

producto de PCR si el conjunto de gen *pacC* y terminador *TtrpC* se encontrara presente en el pool de ARN mensajeros de alguna de las cepas transformantes, corroborando entonces la expresión de la mutación integrada mediante la transformación. En la figura 27-A se observa el resultado de las reacciones de RT-PCR de las cepas P3, S1, S3 y de las cepas X2 y parental, como controles negativos de la expresión, a las 48 horas de fermentación en el medio definido MDFAM/MES amortiguado a pH 5.0. En el caso de las tres primeras cepas se logró amplificar una banda de aproximadamente 750 pb (la cual correspondería al ADNc de la secuencia codificante del factor de transcripción PacC truncado, a la que se le han eliminado los intrones). En el caso de la cepa control y de la cepa parental no se observó amplificación alguna, lo que es lógico porque en dichas cepas no se encuentra presente el terminador *TtrpC*.

9. CONCLUSIONES

- ❑ Las cepas transformantes P3, S1 y S3, con el gen *pacC* truncado de forma que se obtiene una mutación de mimetismo alcalino, mostraron un incremento significativo en la producción específica de antibióticos beta-lactámicos en comparación con la cepa parental y los controles.
- ❑ El uso de un medio con pH amortiguado permitió observar un efecto más marcado del mimetismo alcalino, ocasionado por la mutación introducida y evidenciado por los niveles superiores de producción de antibióticos beta-lactámicos en la mayoría de las cepas transformantes con la mutación.
- ❑ No se encontraron diferencias significativas, en cuanto a la producción específica de antibióticos beta-lactámicos, debidas a la expresión de la mutación por el propio promotor del gen *pacC* o por el promotor constitutivo *PgpdA*.

10. PERSPECTIVAS

- ❑ El presente trabajo aporta suficientes bases para intentar mejorar, utilizando la misma estrategia, la biosíntesis de CPC en cepas productoras de *A. chrysogenum* (por ejemplo la cepa C10), y observar el efecto de la mutación de mimetismo alcalino sobre la expresión de los genes biosintéticos, la producción de CPC y sus intermediarios, e incluso sobre el crecimiento de cepas ya mejoradas genéticamente
- ❑ Sería importante la elaboración o selección de un medio óptimo de fermentación amortiguado a pH ácido, que permita aprovechar mejor las ventajas de utilizar cepas mejoradas con mutaciones de mimetismo alcalino para la producción de CPC.
- ❑ Así mismo, es importante la estandarización de una técnica que permita la obtención y el manejo de esporas de *A. chrysogenum* para controlar los inóculos y monitorear mejor la formación de biomasa durante las fermentaciones.
- ❑ Es necesaria, también, la estandarización de una técnica más sensible, por ejemplo en HPLC, que permita cuantificar por separado los diferentes antibióticos beta-lactámicos producidos por *A. chrysogenum* en los caldos de fermentación y poder monitorear la producción de CPC, el compuesto beta-lactámico más importante producido por éste microorganismo.

11. REFERENCIAS

- Abraham EP, Newton GGF. 1961. **The structure of cephalosporin C.** *Biochem. J.* **79**:377–393.
- Abraham EP, Chain E, Fletcher CM, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA. 1941. **Further observations on penicillin.** *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **42**:3–9.
- Abraham EP, Newton GGF, Hale CW. 1954. **Purification and some properties of cephalosporin N, a new penicillin.** *Biochem J.* **58**:94–102.
- Adinarayana K, Prabhakar T, Srinivasulu V, Anitha V, Jhansi Lakshmi P. 2003. **Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation of *Acromonium chrysogenum*.** *Process Biochem.* **39**(2):171-177.
- Anderson S, Gait MJ, Mayol L, Young IG. 1980. **A short primer for sequencing DNA cloned in the single-stranded phage vector M13mp2.** *Nucl. Acid. Res.* **8**:1731-1743.
- Arst HN Jr, Bignell E, Tilburn J. 1994. **Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*.** *Mol. Gen. Genet.* **245**:787-790.
- Berdy J. 1980. **Bleomycin type antibiotics.** En: Berdy J. (ed.) Aminoacid and peptide antibiotics. Handbook of antibiotics compounds. Vol. IV. CRC Press. pp. 459-491.
- Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS. 1985. **Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin.** *Am. J. Med.* **78**:3-21
- Brakhage A. 1998. **Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 547-585.
- Brakhage A, Thön M, Spröte P, Scharf DH, Al-Abdallah Q, Wolke SM, Hortschansky P. 2009. **Aspects on evolution of fungal β -lactam biosynthesis gene clusters and recruitment of trans-acting factors.** *Phytochem.* **70**:1801-1811.
- Brotzu G. 1948. **Ricerca su di un nuovo antibiotico.** *Lav. Ist. d'Igiene Cagliari* **1948**:1–11.
- Burdon-Sanderson J. 1871. **Memoirs: The origin and distribution of microzymes (bacteria) in water, and the circumstances which determine their existence in the tissues and liquids of the living body.** *Quarterly J. Microscop. Sci.* **11**:323–352.
- Caddick MX, Brownlee AG, Arst HN Jr. 1986. **Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*.** *Mol. Gen. Genet.* **203**:346-353.
- Calcagno-Pizarelli AM, Negrete-Urtasun S, Denison SH, Rudnicka JD, Bussink H, Múnera-Huertas T, Stanton L, Hervás-Aguilar A, Espeso EA, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2007. **Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: PalI assists plasma membrane localization of PalH.** *Eukaryot. Cell.* **6**:2365-2375.
- Caltrider PG, Niss HF. 1966. **Role of methionine in cephalosporin synthesis.** *Appl Microbiol.* **14**: 746–753.
- Caltrider PG, Huber FM, Day LE. 1968. **Effect of methionine and sulfate on the metabolism of *Cephalosporium acremonium*.** *Am. Soc. Microbiol.* **16**:1913-1918.
- Case ME, Schweizer M, Kushner SR, Giles NH. 1979. **Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5259-5263.
- Chambers HF, Jawetz E. 1998. **Sulfonamides, trimethoprim, and quinolones.** En: Katzung BG (Ed.), Basic and Clinical Pharmacology, Appleton-Lange, pp. 761-763.

- Crawford L, Stepan AM, McAda PC, Rambossek JA, Conder MJ, Vinci VA, Reeves CD. 1995. **Production of cephalosporin intermediates by feeding adipic acid to recombinant *Penicillium chrysogenum* strains expressing ring expansion activity.** *Bio/technology* **13**:58-62.
- Cuadra T. 2008. **Estudios moleculares de la regulación por pH en la producción de cefalosporina C por *Acremonium chrysogenum*.** Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- DeModena JA, Gutiérrez S, Velasco J, Fernández FJ, Fachini RA, Galazzo JL, Hughes DE, Martín JF. 1993. **The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin.** *Bio/Technology* **11**:926-929.
- Denison SH, Negrete-Urtasun S, Mingot JM, Tilburn J, Mayer WA, Goel A, Espeso EA, Peñalva MA, Arst HN Jr. 1998. **Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous.** *Mol. Microbiol.* **30**:259-264.
- Díez B, Mellado E, Rodríguez M, Fouces R, Barredo JL. 1997. **Recombinant microorganisms for industrial production of antibiotics.** *Biotechnol. Bioeng.* **55**:216-226.
- Díez E, Álvaro J, Espeso EA, Rainbow L, Suárez T, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2002. **Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps.** *The EMBO J.* **6**:1350-1359.
- Donowitz GR, Mandell GL. 1988. **Beta-lactam antibiotics.** *N. Engl. J. Med.* **318**:490-500.
- Dreyer J, Eichhorn H, Friedlin E, Kürsteiner H, Kück U. 2007. **A homologue of the *Aspergillus velvet* gene regulates both cephalosporin C biosynthesis and hyphal fragmentation in *Acremonium chrysogenum*.** *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:3412-3422.
- Drocourt D, Camels T, Reynes JP, Baron M, Tiraby G. 1990. **Cassettes of the *Streptoalioitechus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes.** *Nucl. Acid. Res.* **18**:4009.
- Dubos RJ. 1939. **Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus*.** *J. Exptl. Med.* **70**:249-256.
- Duchesne E. 1897. **Contribution a l'étude de la concurrence vitale chez les microorganismes: antagonisme entre les moisissures et les microbes.** Tesis de doctorado. L'Ecole du Service de Sante Militaire de Lyon. Francia.
- Edenberg HJ. 2006. **Replicación, recombinación y reparación del DNA.** En: Devlin TM (ed.) *Bioquímica* 4ª ed. Ed. Reverté. España, pp. 186 -191.
- Ehrlich J, Gottlieb D, Burikolder PR, Anderson LE, Pridham TG. 1948. ***Streptomyces venezuelae*, n. sp., the source of chloromycetin.** *J. Bact.* **56**:467-477.
- Elander RP. 2003 **Industrial production of β -lactam antibiotics.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**:385-392.
- Espeso EA, Arst HN Jr. 2000. **On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene.** *Mol. Cell. Biol.* **20**:3355-63.
- Espeso EA, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 1993. **pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene.** *EMBO J.* **12**:3947-3956.

- Espeso EA, Tilburn J, Sánchez-Pulido L, Brown CV, Valencia A, Arst HN Jr, Peñalva MA. 1997. **Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC.** *J. Mol. Biol.* **274**:466-480.
- Espeso EA, Roncal T, Díez E, Rainbow L, Bignell E, Álvaro J, Suárez T, Denison SH, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2000. **On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction.** *The EMBO J.* **19**:719-728.
- Fernández FJ. 1997. **Caracterización de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*penDE*) de la ruta de penicilina.** Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de León. España.
- Fernández-Martínez J, Brown CV, Díez E, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA, Espeso EA. 2003. **Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC.** *J. Mol. Biol.* **334**:667-684.
- Flaherty JE, Pirttilä AM, Bluhm HM, Woloshuk CP. 2003. **PAC1, a pH regulatory gene from *Fusarium verticillioides*.** *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5222-5227.
- Fleming A. 1929. **On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*.** *Br. J. Exp. Pathol.* **10**:226-236.
- García-Rodríguez JA, Gomis M, González J, Prieto J. 1997. **Historia de la antibioterapia.** Ediciones Doyma, S.A. Madrid, España, p.p. 1-96.
- Gutiérrez S. 1994. **Caracterización de los genes *pcbAB* y *cefG* y análisis de las regiones del genoma de *A. chrysogenum* que contienen los genes *pcbC* y *cefEF* implicados en la biosíntesis de cefalosporina C.** Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de León. España.
- Gutiérrez S, Díez B, Montenegro E, Martín JF. 1991. **Characterization of the *Cephalosporium acremonium* *pcbAB* gene encoding α -amino adipyl-cysteiny-l-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: Linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin-biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains.** *J. Bacteriol.* **173**: 2354-2365.
- Gutiérrez S, Velasco J, Fernández FJ, Martín JF. 1992. **The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase.** *J. Bacteriol.* **174**: 3056-3064.
- Gutiérrez S, Velasco J, Marcos AT, Fernández FJ, Fierro F, Barredo JL, Díez B, Martín JF. 1997. **Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum* as shown by promoter replacement studies.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:606-614.
- Herranz S, Rodríguez JM, Bussink H, Sánchez-Ferrero JC, Arst HN Jr, Peñalva MA, Vincent O. 2005. **Arrestin-related proteins mediate pH signalling in fungi.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:12141-12146.
- Hervás-Aguilar A, Rodríguez JM, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva M.A. 2007. **Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC.** *J. Biol. Chem.* **282**:34735-34747.

- Hilgendorf P, Heiser V, Diekmann H, Thoma M. 1987. **Constant dissolved oxygen concentrations in cephalosporin C fermentation: applicability of different controllers and effect on fermentation parameters.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**:247–251.
- Holmes DS, Quigley M. 1981. **A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids.** *Anal. Biochem.* **114**:193-197.
- Isogai T, Fukagawa M, Aramori I, Iwami M, Kojo H, Ono T, Ueda Y, Kohsaka M, Imanaka H. 1991. **Construction of a 7-aminocephalosporanic acid (7ACA) biosynthetic operon and direct production of 7ACA in *Acetobacter chrysogenum*.** *Biotechnol.* **9**:188–191.
- Jukes T, 1985. **Some historical notes on chlorotetracycline.** *Rev. Infect. Dis.* **7**:702-707.
- Knihinicki RD, Day RO, Williams KM. 1991. **Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal antiinflammatory drugs--II. Racemization and hydrolysis of (R)- and (S)-ibuprofen-CoA thioesters.** *Biochem Pharmacol.* **42(10)**:1905-1911.
- Kosalková K, Marcos AT, Martín JF. 2001. **A moderate amplification of the *mecB* gene encoding cystathionine-gamma-lyase stimulates cephalosporin biosynthesis in *Acetobacter chrysogenum*.** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**:252-258.
- Kong K-F, Schneper L, Mathee K. 2009. **Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology.** *APMIS* **118**:1–36.
- Kresse H, Belsey MJ, Rovini H. 2007. **The antibacterial drugs market.** *Nature Rev. Drug. Discov.* **6**:19–20.
- Kück U, Walz M, Mohr G, Mracek M. 1989. **The 5' sequence of the isopenicillin N-synthetase gene (*pcbC*) from *Cephalosporium acetobacter* directs the expression of the prokaryotic hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*) in *Aspergillus niger*.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:358-365.
- Lefkowitz RJ, Shenoy SK. 2005 **Transduction of receptor signals by β -arrestins.** *Science* **308**:512–517.
- LePage GA, Campbell E. 1946. **Preparation of streptomycin.** *J. Biol. Chem.* **162**:163-171.
- Lister J. 1875. **A contribution to the germ theory of putrefaction and other fermentative changes, and to the natural history of torulae and bacteria.** *Trans. R. Soc. Edimb.* **27**:313.
- Liu Y, Gong G, Xie L, Yuan N, Zhu Ch, Zhu B, Hu Y. 2010. **Improvement of cephalosporin C production by recombinant DNA integration in *Acetobacter chrysogenum*.** *Mol. Biotechnol.* **44**:101-109.
- Lofty WA. 2007. **The utilization of beet molasses as a novel carbon source for cephalosporin C production by *Acetobacter chrysogenum*: Optimization of process parameters through statistical experimental designs.** *Biores. Technol.* **98**:3491–3498.
- Lübke C, Jensen SE, Demain AL. 1984. **Prevention of phosphate inhibition of cephalosporin synthetases by ferrous ion.** *FEMS Microbiol. Lett.* **25**:75–79.
- Marín M, Gudíol F. 2003. **Antibióticos beta-lactámicos.** *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.* **21**:42-45.
- Martín JF, Demain AL. 2002. **Unraveling the methionine-cephalosporin puzzle in *Acetobacter chrysogenum*.** *Trends Biotech.* **20**:502-507.

- ❑ Mathison L, Soliday C, Stepan T, Aldrich T, Rambousek J. 1993. **Cloning, characterization, and use in strain improvement of the *Cephalosporium acremonium* gene *cefG* encoding acetyl transferase.** *Curr. Genet.* **23**:33-41.
- ❑ McGuire JM, Bunch RL, Anderson RC, Boaz HE, Flynn EH, Powell HM, Smith JW. 1952. **[Ilotycin, a new antibiotic.]** *Schweiz Med Wochenschr.* **82**:1064-1065.
- ❑ Mediavilla A, García-Lobo JM. 2005. **Antibióticos beta-lactámicos.** En: Flórez J. Farmacología Humana, 4ª ed, Ed. Masson. Barcelona, España. pp. 1105 -1127.
- ❑ Miller J. 1972. **Experiments in molecular genetics.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp 352-355.
- ❑ Mingot J, Tilburn J, Díez E, Bignell E, Orejas M, Widdick DA, Sarkar S, Brown CV, Caddick MX, Espeso EA, Arst HN Jr, Peñalva MA. 1999. **Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed.** *Mol. Cell Biol.* **19**:1390-1400.
- ❑ Minuth W, Tudzynski P, Esser K. 1982. **Extrachromosomal genetics of *Cephalosporium acremonium*.** *Curr. Genet.* **5**:227-231.
- ❑ Moore S. 1981. **Pancreatic Dnase.** En: The Enzymes, 3a. ed. Boyer PD (ed.). Vol. 14, Academic Press, New York. pp. 281-296,
- ❑ Monti D, Carrea G, Riva S, Baldaro E, Frare G. 2000. **Characterization of an industrial biocatalyst: immobilized glutaryl-7-ACA acylase.** *Biotechnol. Bioeng.* **70**:239-244.
- ❑ Negrete-Urtasun S, Reiter W, Díez E, Denison SH, Tilburn J, Espeso EA, Peñalva MA, Arst HN Jr. **Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization.** *Mol. Microbiol.* **33**:994-1003.
- ❑ Nijland JG, Kovalchuk A, van den Verg M, Bovenberg RAL, Driessen AJM. 2008. **Expression of the transporter encoded by the *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* increases cephalosporin production in *Penicillium chrysogenum*.** *Fungal Gen. Biol.* **45**:1415-1421.
- ❑ Nowak C, Radzio R, Kück U. 1995. **DNA-mediated transformation of a fungus employing a vector devoid of bacterial DNA sequences.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 1077-1081.
- ❑ Orejas M, Espeso EA, Tilburn J, Sarkar S, Arst HN Jr, Peñalva MA. 1995. **Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxyterminal moiety.** *Genes Dev.* **9**:1622-1632.
- ❑ Pasteur L, Joubert J. 1877. **Charbon et septicemia.** *CR Acad. Sci. Paris.* **85**:101-15.
- ❑ Peñalva MA, Arst HN Jr. 2002. **Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:426-46.
- ❑ Peñalva MA, Arst HN Jr. 2004. **Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts.** *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:425-451.
- ❑ Peñalva MA, Tilburn J, Bignell E, Arst HN Jr. 2008. **Ambient pH gene regulation in fungi: making connections.** *Trends Microbiol.* **16(6)**:291-300.
- ❑ Punt PJ, Dingemans MA, Kuyvenhoven A, Soede RDM, Pouwels PH, van den Hondel CAMJJ. 1990. **Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene, encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.** *Gene* **93**:101-109.

- ❑ Queener SW, Ingolia TD, Skatrud PL, Chapman JL, Kaster KR. 1985. **A system for genetic transformation of *Cephalosporium acremonium***. Microbiology. D. Schlessinger (ed.). Am. Soc. for Microbiology. p.p. 468-472.
- ❑ Reading C, Cole M. 1977. **Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus***. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**:852-857.
- ❑ Riva S, Silvestri LG. 1972. **Rifamycins: a general View**. *Annu. Rev. Microbiol.* **26**:199-224.
- ❑ Roberts W. 1874. **Studies of biogenesis**. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **164**:457-477.
- ❑ Rodríguez-Galán O, Galindo A, Hervás-Aguilar A, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2009. **Physiological involvement in pH signaling of Vps24-mediated recruitment of *Aspergillus* PalB cysteine protease to ESCRT-III**. *J. Biol. Chem.* **284**:4404-4412.
- ❑ Rossi R, Montecucco A, Ciarrocchi G, Biamonti G. 1997. **Functional characterization of the T4 DNA Ligase: a new insight into the mechanism of action**. *Nucl. Acid. Res.* **25**:2106-2113.
- ❑ Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1985) **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**. *Science* **239**:487-491.
- ❑ Sambrook J, Russell DW. 2001. **Molecular cloning. a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- ❑ Samson SM, Belagaje R, Blankenship DT, Chapman JL, Perry D, Skatrud PL, van Frank RM, Abraham EP, Baldwin JE, Queener SW, Ingolia TD. 1985. **Isolation, sequence determination and expression in *Escherichia coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium***. *Nature.* **318**:191-194.
- ❑ Samson SM, Dotzlaw JE, Slisz ML, Becker GW, van Frank RM, Veal LE, Yeh WK, Miller JR, Queener SW, Ingolia TD. 1987. **Cloning and expression of the fungal expandase/hydroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis**. *Bio/Technology.* **5**:1207-1216.
- ❑ Schatz A, Bugie E, Waksman S, 1944. **Streptomycin: a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria**. *Proceedings of the Society for Experimental and Biological Medicine.* **55**:66-69.
- ❑ Schmitt EK, Kempken R, Kück U. 2001. **Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC**. *Mol. Genet. Genom.* **265**:508-518.
- ❑ Schmitt EK, Bunse A, Janus D, Hoff B, Friedlin E, Kürnsteiner H, Kück U. 2004a. **Winged Helix Transcription Factor CPC1 Is Involved in Regulation of β -Lactam Biosynthesis in the Fungus *Acremonium chrysogenum***. *Eukaryotic Cell.* **3**:121-134.
- ❑ Schmitt EK, Hoff B, Kück U. 2004b. **Regulation of cephalosporin biosynthesis**. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* **88**:1-43.
- ❑ Shah AJJ, Tilburn MW, Adlard MW, Arst HN Jr. 1991. **pH regulation of penicillin production in *Aspergillus nidulans***. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**:209-212.
- ❑ Skatrud PL, Queener SW. 1989. **An electrophoretic molecular karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium***. *Gene* **79**:331-338.
- ❑ Skatrud PL, Queener SW, Carr LG, Fisher DL. 1987. **Efficient integrative transformation of *Cephalosporium acremonium***. *Curr. Genet.* **12**:337-348.

- Skatrud PL, Tietz AJ, Ingolia TD, Cantwell CA, Fisher DL, Chapman JL, Queener SW. 1989. **Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium***. *Bio/Technology* **7**: 477-485.
- Specht CA, DiRusso C, Novotny CP, Ullrich RC. 1982. **A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi**. *Anal. Biochem.* **119**:158-163.
- Stapley EO, Jackson M, Hernandez S, Zimmerman SB, Currie SA, Mochales S, Mata JM, Woodruff HB, Hendlin D. 1972. **Cephamicins, a new family of β -lactam antibiotics I. Production by actinomycetes, including *Streptomyces lactamdurans* sp. n.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **2**:122-131.
- Stokes JL, Woodward CR. 1943. **Formation of tyrothricin in submerged cultures of *Bacillus brevis***. *J Bacteriol.* **46**:83-88.
- Teijeira R, Ullán RV, Guerra SM, García-Estrada C, Vaca I, Martín JF. 2009. **The transporter CefM involved in translocation of biosynthetic intermediates is essential for cephalosporin production**. *Biochem. J.* **418**:113-124.
- Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zissman JH, Lockington RA, Davies RW. 1983. **Transformation by integration in *Aspergillus nidulans***. *Gene.* 1983 **26**:205-221.
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Peñalva MA, Arst Jr HN. 1995. **The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH**. *The EMBO J.* **14**:779-790.
- Tipper DJ. 1985. **Mode of action of beta-lactam antibiotics**. *Pharmacol. Ther.* **27**:1-35.
- Tollnick C, Seidel G, Beyer M, Schüger K. 2004. **Investigations of the production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum***. *Adv Biochem. Engin./Biotechnol.* **86**:1-45.
- Turgay K, Krause M, Marahiel MA. 1992. **Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes**. *Mol. Microbiol.* **6(4)**:529-546.
- Tyndall J. 1876. **The optical deportment of the atmosphere in relation to the phenomena of putrefaction and infection**. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **166**:27-63.
- Ullán RV, Casqueiro J, Bañuelos O, Fernández FJ, Gutiérrez S, Martín JF. 2002a. **A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in *Acremonium chrysogenum***. *J. Biol. Chem.* **277**, 46216-46225.
- Ullán RV, Liu G, Casqueiro J, Gutiérrez S, Bañuelos O, Martín JF. 2002b. **The *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a putative multidrug efflux pump protein that significantly increases cephalosporin C production**. *Mol. Gen. Genom.* **267**:673-683.
- Ullán RV, Casqueiro J, Naranjo L, Martín JF. 2004. **Expression of *cefD2* and the conversion of isopenicillin N into penicillin N by the two-component epimerase system are rate-limiting steps in cephalosporin biosynthesis**. *Mol. Gen. Genom.* **272**: 562-570.
- Ullán RV, Campoy S, Casqueiro J, Fernández FJ, Martín JF. 2007. **Deacetylcephalosporin C production in *Penicillium chrysogenum* by expression of the isopenicillin N epimerization, ring expansion, and acetylation genes**. *Chem. Biol.* **14**:329-339.

- Umezawa H, Ueda M, Maeda K, Yagishita K, Kondo S, Okami Y, Utahara R, Osato Y, Nitta K, Takeuchi T. 1957. **Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin.** *J Antibiot.* **10**:181-188.
- Velasco J, Gutiérrez S, Fernandez FJ, Marcos AT, Arenos C, Martín JF. 1994. **Exogenous methionine increases levels of mRNAs transcribed from *pcbAB*, *pcbC*, and *cefEF* genes, encoding enzymes of the cephalosporin biosynthetic pathway, in *Acremonium chrysogenum*.** *J. Bacteriol.* **176**:985-991.
- Velasco J, Adrio JL, Moreno MA, Díez B, Soler G, Barredo JL. 2000. **Environmentally safe production of 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid using recombinant strains of *Acremonium chrysogenum*.** *Nat. Biotechnol.* **18**:857-861.
- Velasco J, Gutiérrez S, Casqueiro J, Fierro F, Campoy S., Martín JF. 2001. **Cloning and characterization of the gene *cahB* encoding a cephalosporin C acetylhydrolase from *Acremonium chrysogenum*.** *Appl. Microbiol Biotechnol.* **57**:360-356.
- Waksman SA, Lechevalier HA. 1949. **Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms.** *Science.* **109**:305-307.
- Walz M, Kück U. 1993. **Targeted integration into the *Acremonium chrysogenum* genome: disruption of the *pcbC* gene.** *Curr. Genet.* **24**:421-427.
- Weil J, Miramonti J, Ladisch MR. 1995. **Cephalosporin-C—mode of action and biosynthetic pathway.** *Enzyme Microb. Technol.* **17**:85–87.
- White S, McIntyre M, Berry DR, McNeil B. 2002. **The autolysis of industrial filamentous fungi.** *Crit. Rev. Biotechnol.* **22**:1-14.
- Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. 2008. **Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance.** *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:361–385.
- Zhou MY, Clark SE, Gómez-Sánchez CE. 1995. **Universal cloning method by TA strategy.** *Biotechniques* **19**:34-35.