



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

T E S I S

**“Estudio de la función del gen *hapC* de *Penicillium chrysogenum*
y su participación en la regulación de la biosíntesis de
penicilina”**

Para obtener el grado de

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

Q.F.B. CARLOS ISRAEL ALANIS DÍAZ

**Director:
Dr. Francisco Fierro Fierro**

**Asesor:
Dr. Jesús Eduardo Zúñiga León**

Ciudad de México a 21 de noviembre de 2022

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

Ciudad de México a 21 de noviembre de 2022

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

" Estudio de la función del gen *hapC* de *Penicillium chrysogenum* y su participación en la
regulación de la biosíntesis de penicilina "

que presentó

QFB Carlos Israel Alanis Díaz

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesor: Dr. Eduardo Zúgna León

Jurado:

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Secretario: Dr. Eduardo Zúgna León

Vocal: Dr. Ulises Carrasco Navarro

Vocal: Dra. Dulce María Andrade Pavón

A mi familia

*A mi hermano Arturo Jean Paul,
a mis padres, María e Israel,
mientras ustedes estén, todo está bien.*

A Mayra Flores, eres esencia de mi vida.

*A Senorina, quisiera que estuvieras aquí
para hacer juntos todo lo que prometimos.*

*A todos los seres humanos que no tienen acceso a la educación, a los que no tienen la dicha de sostener
un libro, a los que sueñan con un futuro mejor, a los que construyen para todos, este trabajo es suyo.*

Agradecimientos

Al pueblo de México que con el sudor de su frente aportan para que la educación sea gratuita, sin su contribución este y muchos proyectos no serían posibles.

Al Dr. Francisco Fierro Fierro por permitirme formar parte de este proyecto y por su plena confianza.

Al Dr. Eduardo Zúñiga León, por sus enseñanzas en bioinformática, por las tutorías y por todo el apoyo.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino por sus muy valiosas observaciones en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Octavio Loera Corral, por el apoyo brindado para poder concluir este proyecto, sus palabras me sirvieron de mucho.

A los compañeros del Laboratorio de Ingeniería genética y metabolitos secundarios, de quienes aprendí más que técnicas y métodos.

A la Dra. Dulce María Andrade Pavón y al Dr. Ulises Carrasco Navarro por aceptar revisar este escrito.

Resumen

Pocos estudios han profundizado en analizar los elementos básicos que dirigen la expresión de los genes biosintéticos de penicilina, como las cajas TATA. En *Aspergillus nidulans* se han caracterizado con detalle cajas reguladoras CCAAT presentes en los promotores de los genes que forman el clúster de penicilina, así como el complejo proteico que regula la transcripción de estos genes. En el presente trabajo se determinó experimentalmente que la atenuación de la subunidad HapC de *Penicillium chrysogenum*, necesaria para la formación del complejo Hap (complejo de unión a CCAAT), afecta negativamente la producción de penicilina, la resistencia a estrés oxidante y la viabilidad celular. Por medio de análisis bioinformáticos se identificaron cajas CCAAT presentes en el genoma del hongo, el enfoque NSAF permitió el enriquecimiento de estos datos y se encontró que las cajas se localizan principalmente en promotores de genes relacionados con la biosíntesis y el metabolismo. Por otro lado, se construyeron modelos de homología de cada subunidad que forman el complejo Hap, por medio del docking proteína-proteína y proteína-DNA se logró predecir la arquitectura de la asociación entre las tres subunidades formadoras del complejo Hap y se determinó su interacción con su secuencia blanco. La información obtenida se comparó principalmente con resultados de investigaciones realizadas sobre el complejo de *A. nidulans*.

Abstract

Few studies have delved into the basic elements that direct the expression of penicillin biosynthetic genes, such as the TATA boxes. In *Aspergillus nidulans*, regulatory CCAAT boxes present in the promoters of the penicillin-gene-cluster have been characterized in detail, as well as the protein complex that regulates the transcription of these genes. In the present work, it was experimentally determined that the attenuation of HapC subunit of *Penicillium chrysogenum*, necessary for the assemble of the Hap complex (CCAAT-binding complex), negatively affects penicillin production, resistance to oxidative stress and cell viability. Through bioinformatic analysis, CCAAT boxes present in the genome of the fungus were identified, the NSAF approach allowed the enrichment of these data and it was found boxes are mainly localized in biosynthesis and metabolism gene promoters. Moreover, homology models were built to each subunit that form the Hap complex, by means of protein-protein and protein-DNA docking, the architecture of the association between the three subunits that forms the Hap complex was predicted and their interaction with their target sequence was determined. The information obtained was mainly compared with results of investigations carried out on the *A. nidulans* complex.

Índice	1
Lista de figuras.....	4
Lista de cuadros	9
I. Introducción	11
II. Antecedentes	14
1. Antibióticos y la importancia de la penicilina.....	14
2. Penicilina e investigación biotecnológica.....	14
3. <i>Penicillium chrysogenum</i>	17
4. Sobre la taxonomía y nomenclatura	17
5. Producción de metabolitos.....	22
6. Biosíntesis de penicilina y su agrupación en clúster.....	23
7. Regulación de la biosíntesis de penicilina en <i>P. chrysogenum</i>	25
8. Desarrollo evolutivo en la biosíntesis de penicilina	27
9. Mejora genética para el incremento en la producción de penicilina	29
10. Mejoramiento clásico de la cepa.....	30
11. Mejoramiento de la cepa basado en la genómica.....	32
12. Complejo de unión a CCAAT	33
13. Función de los CBCs	37
14. Estructura de las subunidades del CBC e interacción entre las mismas.....	41
15. Estructura del complejo Hap en ausencia de DNA	45
16. Ensamble y translocación nuclear del CBC en <i>A. nidulans</i>	46
17. Estructura del CBC y mecanismo de unión al DNA	47
18. Regulación postraducciona del CBC por estados celulares redox.....	51
19. Importancia de la bioinformática como herramienta para el análisis de la regulación de la expresión génica y de la interacción de proteínas.....	53
19.1 Análisis genómico de cajas reguladoras de la transcripción en promotores	53
19.2. Modelos de homología de las subunidades Hap de <i>P. chrysogenum</i>	53
19.3. Análisis de interacción proteína-proteína mediante Docking.....	54
III. Justificación	57
IV. Hipótesis.....	58
V. Objetivos.....	59
VI. Desarrollo experimental	60
1. Microorganismos	60

2. Vector de silenciamiento pGdpki-RNAi/HapC y transformación	60
3. Medios de cultivo	61
4. Confirmación de la inserción del plásmido pGdpki-RNAi/HapC en el DNA genómico por PCR de punto final	61
5. Colecta de conidios de las cepas silenciadas y cepas control.....	63
6. Cuenta de conidios	63
7. Análisis fenotípico de cepas atenuadas de <i>hapC</i>	64
8. Medición de niveles de expresión de cepas atenuadas del gen <i>hapC</i> y de mutantes HapC1, HapC2 y HapC6 por qPCR	64
9. Ensayo de viabilidad.....	65
10. Prueba de estrés oxidativo en conidios	65
11. Prueba de estrés oxidativo en micelio	65
12. Producción específica de penicilina.....	65
13. Cinética de conidiación.....	66
14. Análisis bioinformático.....	67
14.1. Búsqueda de genes regulados por el complejo HAP (análisis de cajas CCAAT).....	67
14.2. Construcción de modelos de homología	68
14.2.1. Búsqueda de plantillas.....	68
14.2.2. Construcción de modelos.....	68
14.2.3. Estimación de la calidad del modelo	68
14.3. Docking proteína-proteína y proteína-DNA.....	69
VII. Resultados y discusión.....	71
1. Morfología macroscópica y microscópica.....	71
2. Expresión del gen <i>hapC</i>	72
2.1 Extracción de RNA y Síntesis de cDNA	72
2.2 Niveles de expresión del gen <i>hapC</i> por PCR en tiempo real	73
3. Producción específica de penicilina.....	74
4. Cinética de conidiación.....	75
5. Viabilidad y resistencia a estrés oxidante	77
5.1 Viabilidad	77
5.2 Estrés oxidante en conidios.....	77
5.3 Estrés oxidante en micelio	78
6. Análisis bioinformático.....	80

6.1 Búsqueda de genes regulados por el complejo HAP	80
6.2 Construcción de modelos de homología	83
6.3 Comparación de estructuras	85
6.4 Docking proteína-proteína y proteína-DNA.....	87
VIII. Conclusiones	96
IX. Bibliografía	98
X. Anexos	112
Anexo I. Medios de cultivo.....	112
Anexo II. Extracción de RNA y purificación con DNAsas	114
Anexo III. Síntesis de cDNA y cuantificación	115
Anexo IV. Estrés oxidante en micelio	116
Anexo V. Estimación de la calidad de los modelos de homología y del docking molecular.	120

Lista de figuras

		Página
Figura 1	Complejo HAP regulando la expresión de los genes biosintéticos de penicilina en <i>A. nidulans</i> .	12
Figura 2	Ubicación de cajas CCAAT en los promotores de los genes pcbAB-pcbC y penDE de <i>P. chrysogenum</i> .	13
Figura 3	Resumen esquemático del camino evolutivo de la producción de penicilina por <i>Penicillium</i> NRRL 824.	16
Figura 4	Primer dibujo de la especie <i>Penicillium chrysogenum</i> .	18
Figura 5	Árbol de ML de mejor puntuación de conjuntos de datos parciales combinados de β -tubulina, calmodulina y RPB2.	21
Figura 6	Ruta de biosíntesis de penicilina.	24
Figura 7	Organización en clústers de los genes biosintéticos de penicilina en <i>P. chrysogenum</i> y <i>A. nidulans</i> y de cefalosporina en <i>A. chrysogenum</i> .	25
Figura 8	Resumen esquemático de la biosíntesis de penicilina por <i>P. chrysogenum</i> .	28
Figura 9	Modelo resumido del conocimiento de la acción del CBC (PenR) sobre el grupo de genes de biosíntesis de penicilina en <i>A. nidulans</i> y representación esquemática de la región promotora de <i>amdS</i> de <i>A. nidulans</i> .	35

Figura 10	Comparación de los dominios evolutivos conservados de HapB y HapE con sus homólogos.	36
Figura 11	Arquitectura de las subunidades formadoras de CBC.	43
Figura 12	Estructura terciaria de las subunidades del complejo Hap en comparación con histonas.	44
Figura 13	Alineación de secuencias de subunidades individuales.	45
Figura 14	Gráfico del CBC unido al dúplex de DNA en la caja CCAAT de 23 pb derivado del promotor <i>cycA</i> de <i>A. nidulans</i> , CBC en y sin DNA y su representación de superficie.	49
Figura 15	Interacciones del CBC con la columna vertebral del DNA y las bases de DNA de la caja CCAAT	50
Figura 16	Ilustración de la regulación redox del CBC y la respuesta al estrés oxidativo en <i>A. nidulans</i> .	52
Figura 17	Mapa del plásmido pGpdPki-RNAi.	61
Figura 18	Gel de electroforesis de la inserción del plásmido de silenciamiento pGPgdpKi-RNAi/hapC	63
Figura 19	Morfología macroscópica de las cepas control y cepas mutantes en APD.	71
Figura 20	Morfología macroscópica de las cepas control y cepas mutantes en APD observadas en un estereoscopio a 10x.	72

Figura 21	Gráfica de barras de la expresión relativa del gen hapC de las cepas de <i>P. chrysogenum</i> transformadas con el vector pGdppki-RNAi y pGdppki-RNAi/hapC con respecto a Wisconsin 54-1255.	73
Figura 22	Curva temporal de producción específica de penicilina.	74
Figura 23	Cinética de conidiación.	76
Figura 24	Gráfica de barras con intervalos de confianza del número de conidios a las 12h de las cepas expuestas a estrés oxidante con H ₂ O ₂ a 150mM y 300mM.	77
Figura 25	Gráfica de barras con intervalos de confianza del % UFC a las 12h de las cepas expuestas a estrés oxidante con H ₂ O ₂ a 150mM y 300mM.	78
Figura 26	Conidios desarrollados de las cepas de <i>P. chrysogenum</i> creciendo en APD y APD + H ₂ O ₂ a 150 y 300 mM a las 48 horas.	79
Figura 27	Diagramas de dona, a la izquierda se observa el porcentaje de los promotores por número de cajas CCAAT encontradas y a la derecha la ubicación de estas.	81
Figura 28	Modelos obtenidos por homología con SWISS-MODEL para las subunidades del complejo Hap de <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255 y sus respectivos scores.	84
Figura 29	Comparación de las estructuras terciarias representadas de HapB con sus respectivos dominios, obtenidos por distintos tipos de elucidación.	85
Figura 30	Comparación de las estructuras terciarias representadas de HapB con sus respectivos dominios, obtenidos por distintos tipos de elucidación.	86
Figura 31	Comparación de las estructuras terciarias representadas de HapC con sus respectivos dominios, obtenidos por distintos tipos de elucidación.	86

Figura 32	Comparación de las estructuras terciarias representadas de HapE con sus respectivos dominios, obtenidos por distintos tipos de elucidación.	87
Figura 33	Complejo Hap de <i>A. nidulans</i> y se muestran las interacciones entre las subunidades HapB y HapE.	89
Figura 34	Diagrama esquemático de interacciones entre cadenas de proteínas del complejo Hap de <i>A. nidulans</i> y su tabla de estadísticas de las interfaces	90
Figura 35	Ilustración esquemática de los contactos proteína-proteína del complejo Hap de <i>A. nidulans</i> .	91
Figura 36	Representación gráfica del docking molecular de las tres subunidades del complejo Hap e interacción con el DNA.	92
Figura 37	Diagrama esquemático de interacciones entre cadenas de proteínas del complejo Hap de <i>P. chrysogenum</i> y su tabla de estadísticas de las interfaces	93
Figura 38	Ilustración esquemática de los contactos proteína-proteína del complejo Hap de <i>P. chrysogenum</i> .	94
Figura 39	Ilustración esquemática de los contactos Hap de <i>P. chrysogenum</i> -DNA.	95
Figura 40	Electroforesis en gel de agarosa del RNA total extraído, a la izquierda se observa el crudo de la extracción y a la derecha se muestra el RNA tratado con DNasas.	114
Figura 41	Fotografías del bioensayo de estrés oxidante en micelio a las 48 y 72 horas.	117

Figura 42	Fotografías del bioensayo de estrés oxidante en micelio a las 96 y 120 horas.	118
Figura 43	Fotografías del bioensayo de estrés oxidante en micelio a las 142 horas.	119

Lista de cuadros

		Página
Cuadro 1	Descripción general de cepas de <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i> estudiadas.	20
Cuadro 2	Mutaciones por tipo en la mejora de la biosíntesis de penicilina.	31
Cuadro 3	Modificaciones genéticas que conducen a una mayor producción de penicilina (tasas) en <i>P. chrysogenum</i> .	32
Cuadro 4	Caracterización del complejo de unión a CCAAT de eucariotas con sus respectivas subunidades.	39
Cuadro 5	Cepas usadas de <i>P. chrysogenum</i> .	60
Cuadro 6	Abundancia relativa de genes con enfoque NSAF que contienen promotores con la secuencia CCAAT a 400 pb antes del punto de inicio de la transcripción	82
Cuadro 7	Cuantificación de RNA por cepa, en la izquierda se muestra la cuantificación del RNA extraído en crudo y a la derecha el RNA tratado con DNasas	115
Cuadro 8	Cuantificación de cDNA por cepa, se muestran la absorbancia a 260 y 280, así como el cociente 260/280 y la cantidad obtenida en ng/ μ L	115
Cuadro 9	Información de la plantilla usada para el docking HapC:E	120
Cuadro 10	Reporte de ProQ V1.2 de la calidad de las subunidades HapE y HapC.	120
Cuadro 11	Información de la plantilla usada para el docking HapC:E:B	120
Cuadro 12	Puntajes del docking HapC:E:B	121
Cuadro 13	Reporte de ProQ V1.2 de la calidad de las subunidades HapE:C y HapB (sin fragmento de unión a DNA)	121

Cuadro 14	Información de la plantilla usada para el docking HapC:E:B (fragmento de unión a DNA)	121
Cuadro 15	Puntajes del docking HapC:E:B (fragmento de unión a DNA)	121
Cuadro 16	Reporte de ProQ V1.2 de la calidad de las subunidades HapE:C y HapB (fragmento de unión a DNA)	122
Cuadro 17	Información de la plantilla usada para el docking HapC:E:B	122
Cuadro 18	Puntajes del docking HapC:E:B	122
Cuadro 19	Reporte de ProQ V1.2 de la calidad del complejo HapE:C:B y ligando (DNA)	122

I. Introducción

A la fecha, no se han llevado a cabo estudios en profundidad de los elementos básicos que dirigen la expresión de los genes biosintéticos de penicilina, como las cajas TATA. Sin embargo, en *Aspergillus nidulans* se han caracterizado con mucho detalle cajas reguladoras CCAAT presentes en los promotores de los genes de dicha ruta, así como el complejo proteico regulador de la transcripción que se une a las mismas. Las cajas CCAAT son frecuentes en los promotores de organismos eucariotas, tanto en los casos que contienen cajas TATA como en los que no (promotores TATA-less).

Los primeros reportes de la regulación de los genes de penicilina por cajas CCAAT fueron publicados en 1996 por Then Bergh y col. y Litzka y col., quienes describieron cómo mutaciones en varias de las cajas presentes en los promotores de estos genes provocaban cambios en la expresión de los mismos, a la vez que se detectó un retraso en ensayos EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), indicativo de la unión de una proteína o complejo a estas cajas. El complejo de unión a cajas CCAAT se denominó originalmente PENR1 (Penicillin Regulator 1).

Posteriormente se identificó y caracterizó el complejo regulador de la transcripción que se une a las cajas CCAAT, y resultó ser un complejo de tipo HAP (Litzka y col. 1998), identificado originalmente en *Saccharomyces cerevisiae*. Además de complejo tipo HAP (HAP-like), o simplemente HAP, también se le han dado los nombres de CBC (CCAAT Binding Complex) y de AnCF (*Aspergillus nidulans* CCAAT Binding Factor). Steidl y col. (1999) determinaron que el complejo HAP de *A. nidulans* contiene las proteínas codificadas por los genes *hapB*, *hapC* y *hapE*, y observaron que mutaciones en cualquiera de estos genes provocaban fenotipos de pobre crecimiento, esporulación y expresión reducida de algunos genes, como *amdS* (**Figura 1**).

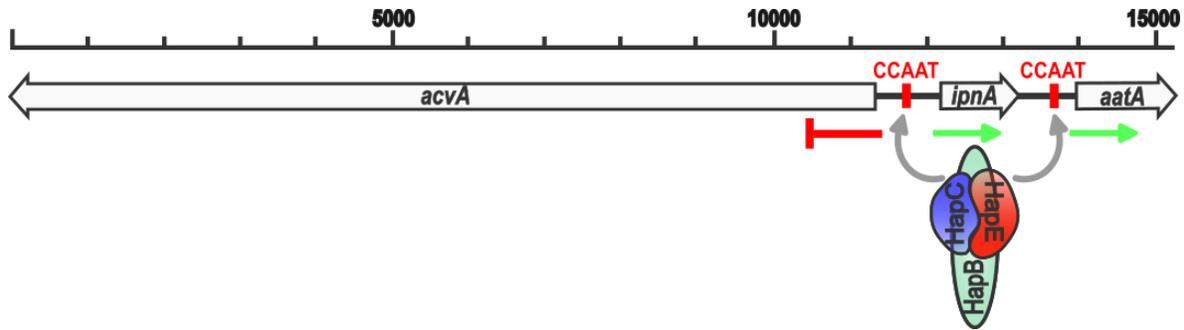


Figura 1. Complejo HAP que regula la expresión de los genes biosintéticos de penicilina en *A. nidulans* (Modificado de Hortschansky y col., 2016).

El complejo HAP regula un gran número de genes en los genomas de hongos filamentosos (Brakhage y col 1999; Brakhage, 2013; Hortschansky y col. 2016), entre ellos genes del metabolismo secundario, y particularmente aquellos pertenecientes a grupos en los cuales no existe un regulador específico (*narrow domain*). Posiblemente, el complejo CCAAT interacciona también en algunos promotores con otros factores de transcripción específicos de vías biosintéticas.

Los genes biosintéticos de penicilina en *P. chrysogenum* contienen numerosas cajas CCAAT en sus promotores (**Figura 2**): un total de seis cajas están presentes en la región intergénica que contiene los promotores de los genes *pcbAB* y *pcbC* y cuatro cajas más se encuentran en el promotor del gen *penDE*. En estudios preliminares realizados con los promotores *pcbAB* y *pcbC* fusionados al gen reportero *lacZ*, se comprobó que la mutación de algunas de estas cajas (concretamente las que presentan una mayor similitud de secuencia en los nucleótidos adyacentes al motivo central CCAAT) provocaba una drástica reducción en los niveles de expresión del gen reportero.

En el genoma de *P. chrysogenum* están presentes genes ortólogos a *hapB*, *hapC* y *hapE*. En nuestro laboratorio se ha clonado el gen *hapC* y se ha construido un plásmido de silenciamiento por RNAi con un fragmento de dicho gen. En el presente trabajo se pretende silenciar la expresión de *hapC*, lo cual debería causar la no formación (o, al menos, una reducción en la formación) del complejo HAP, para estudiar el fenotipo resultante, con especial énfasis en el efecto sobre la producción de penicilina.

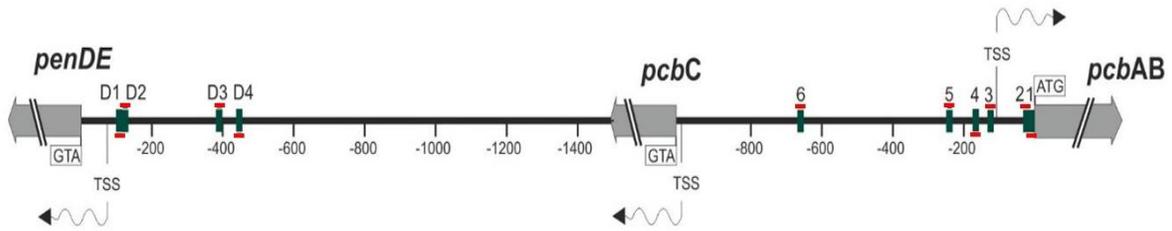


Figura 2. Ubicación de cajas CCAAT en los promotores de los genes *pcbAB-pcbC* y *penDE* de *P. chrysogenum*. Las cajas están numeradas corriente arriba desde el ATG del gen *pcbAB* en la región intergénica *pcbAB-pcbC* (1 al 6) y desde el ATG del gen *penDE* en el promotor de dicho gen (D1 a D4). La línea roja en la parte superior o inferior de cada caja indica la orientación de esta, sobre la hebra superior o sobre la inferior respectivamente. TSS: Transcriptional_Start_Site (Sitio de inicio de la transcripción).

II. Antecedentes

1. Antibióticos y la importancia de la penicilina

Los antibióticos son de los descubrimientos más importantes en la medicina, actualmente es muy improbable que alguien pueda vivir sin recibir alguna vez algún tipo de antimicrobiano (Belloso, 2009).

La historia de los antibióticos es muy extensa, y se puede decir que el primer producto antibacteriano de origen natural documentado fue descubierto por Freudenberg (Sternberg, 1896; Sierra & León 2019) que al estudiar la piocinasa, encontró que este pigmento azul liberado por el “bacilo piocianico (hoy *Pseudomonas aeruginosa*) impedía el crecimiento de otras bacterias. Estudios posteriores realizados por Emmerich y Löw demostraron que el pigmento inhibía el crecimiento de bacterias y además destruía bacterias patógenas tales como las del carbunco, los abscesos cutáneos, la fiebre tifoidea y la peste (Emmerich & Löw, 1899, Camacho, 2022;). Sin embargo, la piocinasa era muy inestable y tóxica para permitirse su uso en seres humanos (Gensini y col., 2007).

Alrededor de 1922, Alexander Fleming y Allison reportaron una sustancia que nombraron “lisozima”, presente en lágrimas humanas y que causaba que algunas bacterias se destruyeran. Las bacterias susceptibles eran primariamente no patógenas, por lo que nunca llegaron a tener un uso terapéutico (Fleming & Allison, 1922). Pero hacia 1928 descubrió, por descuido, un hongo capaz de inducir lisis en bacterias, y rápidamente demostró que el hongo producía una sustancia capaz de difundirse en el medio y causar la lisis celular; la llamó penicilina (Fleming, 1944; Bentley, 2005). La penicilina revolucionó la medicina ya que permitió el tratamiento de una gran variedad de enfermedades infecciosas y disminuyó la mortalidad de muchas de estas en un 50% (González y Orero, 2007).

2. Penicilina e investigación biotecnológica

El descubrimiento de la penicilina por Fleming es probablemente uno de los acontecimientos más importantes en la medicina a nivel mundial (Bartoszewska y col., 2011). *Penicillium chrysogenum* es de vital relevancia por ser pieza clave en la biosíntesis industrial del antibiótico β -lactámico y otros metabolitos secundarios (van den Berg y col., 2010).

Mediante técnicas clásicas de mutación y selección se han logrado obtener cepas de este hongo con niveles de producción de penicilina muy altos (**Figura 3**), algo que ha determinado de forma adicional la aparición de diversos cambios metabólicos en las cepas de *P. chrysogenum* (Jami y col., 2010a; Weber y col., 2012a).

Las cepas de producción actual derivan de la cepa NRRL 1951, que se aisló de fruta podrida en Peoria (Illinois, E.E.U.U.) (Raper y col., 1944), y cuya principal característica es su crecimiento en cultivos sumergidos, por lo cual fue sometida a mutagénesis y selección artificial, para el desarrollo de cepas de alta producción de penicilina. De esta forma se obtuvo la cepa Wisconsin 54-1255 (misma que se emplearía posteriormente para el análisis de la secuencia genómica de esta especie).

Durante los sucesivos procesos de mejora industrial se han logrado obtener cepas de alta producción, como las cepas P2, DS04825 y AS-P-78, hasta llegar a las que actualmente se emplean para la producción del antibiótico, con rendimientos de más de 50 mg/mL de penicilina (Ozcengiz y Demain, 2013). El uso intensivo de *P. chrysogenum* ha permitido desarrollar investigación enfocada en dilucidar el mecanismo de biosíntesis y regulación de penicilina, mismos que hasta la fecha no se han aclarado por completo. Además, con la secuenciación del genoma fue posible comprender los cambios genéticos en el linaje que condujeron a las cepas actuales.

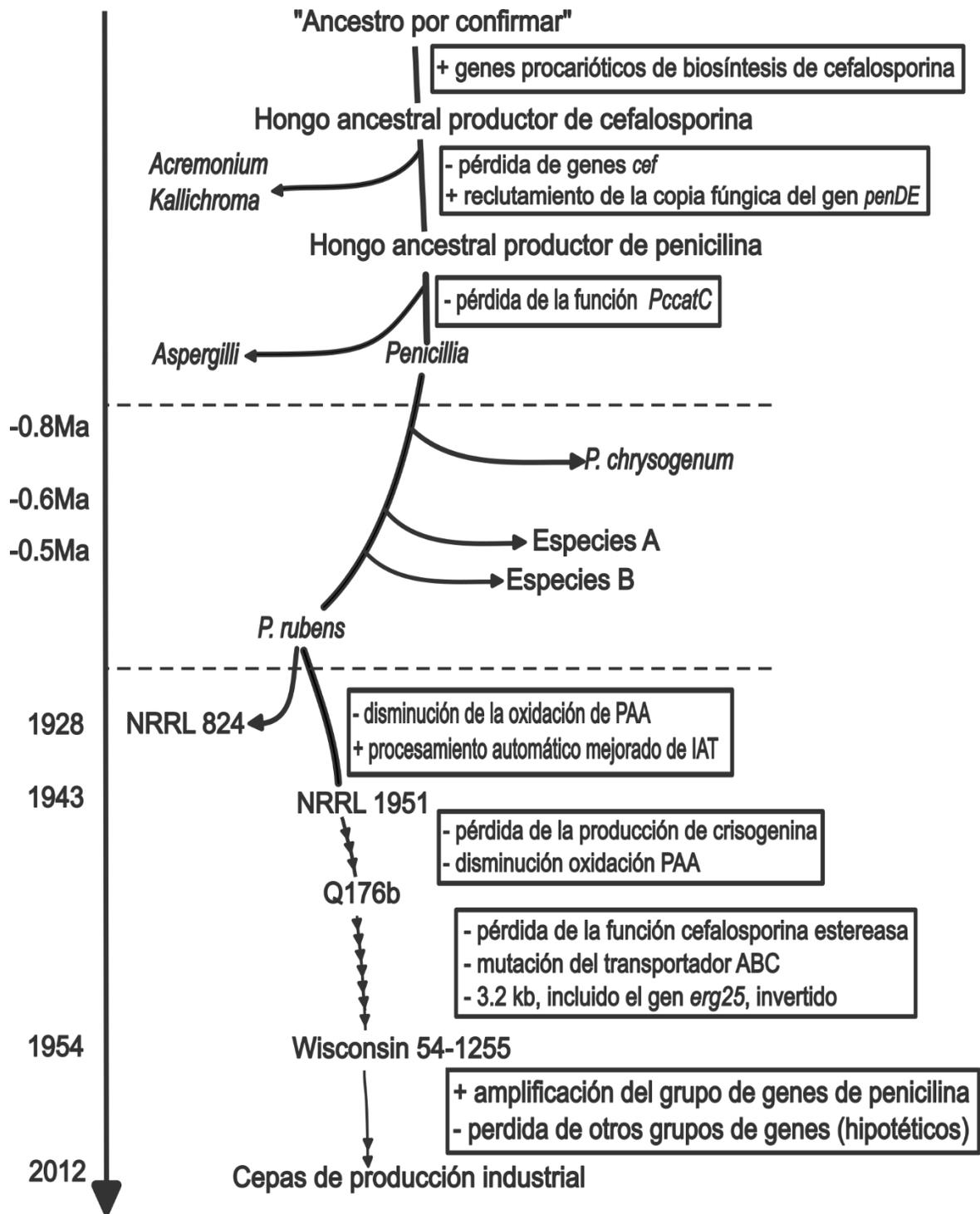


Figura 3. Resumen esquemático del camino evolutivo de la producción de penicilina por *Penicillium*. NRRL 824 (Fleming, 1929); aislado de Fleming; NRRL 1951; primer aislado de crecimiento sumergido (Raper y col. 1944); Q176b, primer aislado con producción de crisogenina disminuida (Anderson y col. 1953); Wisconsin 54-1255; estándar internacional de cepas de laboratorio (Elander, 2002). Modificado de van den Berg, 2013.

3. *Penicillium chrysogenum*

El género *Penicillium* se considera miembro de los deuteromicetos, hongos sin estado sexual conocido. Sin embargo, distintas investigaciones han identificado remanentes de actividad sexual en el pasado (Braumann y col., 2008; Hoff y col., 2008; Henk y col., 2011; Böhm y col., 2013). Por dicha razón, el hongo *P. chrysogenum* es considerado un hongo ascomiceto y se describe como un moho común transportado por el aire y normalmente identificado como un agente de deterioro de los alimentos (Samson y col., 2010). Es habitual encontrarlo casi en cualquier lugar de clima templado, ambientes tropicales y árticos (Ismail 2001; Bancercz y col., 2005; Henk y col. 2011). Además, se ha podido aislar de otros ambientes muy diferentes entre sí, como polvo, aire, productos alimenticios salados (Samson y col., 2010), humedad de espacios interiores como edificios y materiales de construcción (Chang y col., 1995; Hunter y Lea, 1994; Gravesen, 1999; Andersen y col., 2011; Roussel y col., 2012) y abono (Adeleye y col., 2004).

La especie *Penicillium chrysogenum* n. sp. fue reportada originalmente en 1910 por Charles Thom, en su libro “*Cultural studies of species of Penicillium*” (estudios de cultivo de especies de *Penicillium*), en el que se describen, de manera general, sus características morfológicas y de crecimiento en diferentes condiciones y medios de cultivo. Este microorganismo es nombrado así debido a la coloración amarilla-dorada que produce en la leche, el pan y la gelatina (pigmentación debida a la crisogenina). Thom, además, describe que “se encuentra en el pan, el queso, etc.” y añade que “aparece en diferentes variedades, las cuales producen pigmentación en distintas intensidades, pero que no se distinguen por sus características estructurales, mismas que persisten con el tiempo”.

4. Sobre la taxonomía y nomenclatura

Al adentrarme en el estudio del hongo, encontré que es nombrado de diferentes maneras, así que agregó este apartado, a manera de aclaración para que se facilite la comprensión del texto. Aunque *Penicillium chrysogenum* fue descrito por Thom en 1910 (**Figura 4**), el nombre es anterior a *Penicillium griseoroseum*, *Penicillium citreoroseum* y *Penicillium brunneorubrum*, descritos por Dierckx en 1901.

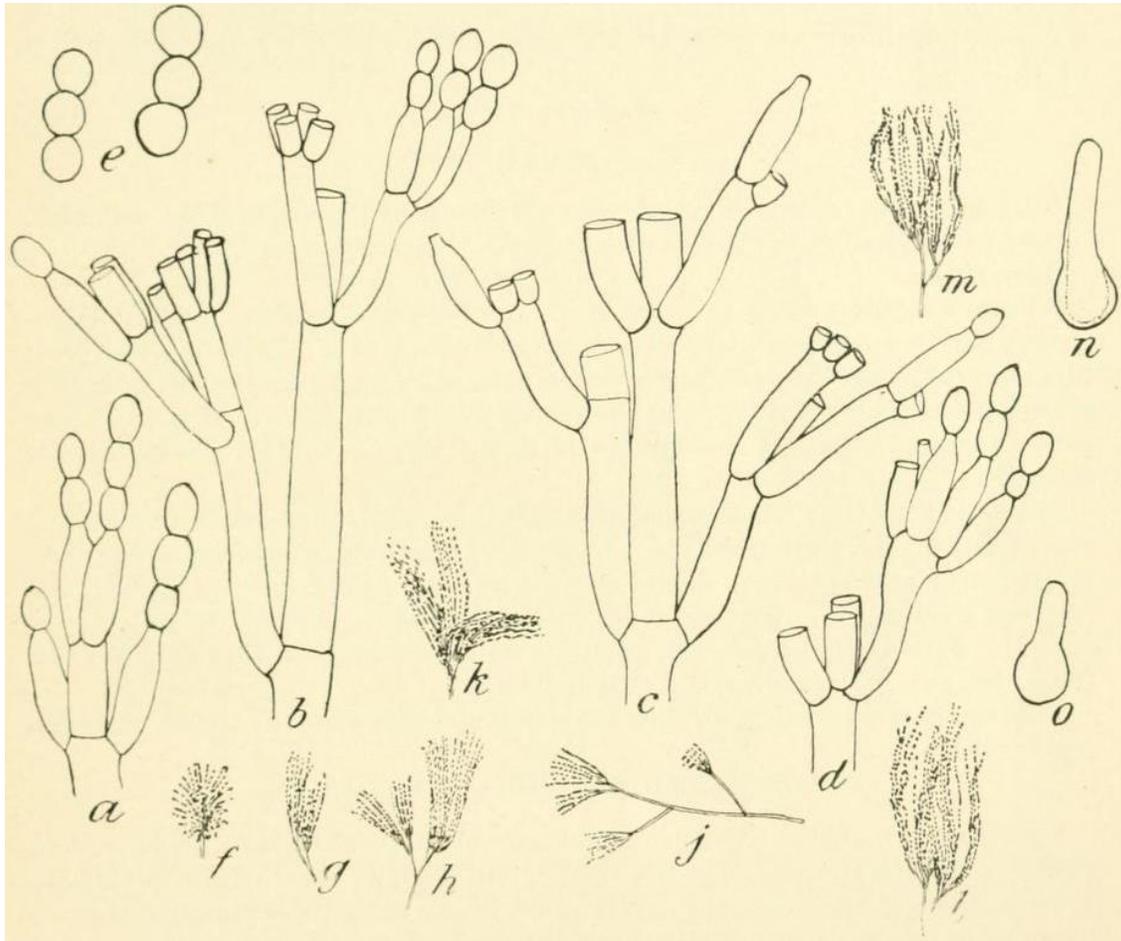


Figura 4. Primer dibujo de la especie *Penicillium chrysogenum*: a, b, c, d, e; ramificaciones de la fructificación de conidios a partir de placas de gelatina (x900); f, g, h, j, l, m; bocetos de fructificaciones de conidios en agar papa (x140); n, o; germinación de conidios (x900). Tomado de Thom, 1910.

Raper y Thom, en 1949, estudiaron extensamente la taxonomía de la especie y aceptaron cuatro especies con la denominación propuesta por ellos mismos como “serie *Penicillium chrysogenum*” que incluye a *P. chrysogenum*, *P. notatum*, *P. meleagrinum* y *P. cyaneofulvum*. No obstante, en 1977, Samson y colaboradores consideraron a *P. chrysogenum* como una especie amplia, rechazando así la denominación “serie *Penicillium chrysogenum*”. Más adelante, se incluyeron en el grupo a *P. flavigenum*, *P. nalgiovense* y *P. dipodomyis* (Frisvad y col., 1987, Banke y col., 1997; Frisvad & Samson, 2004). Cabe añadir que, aunque todas estas especies son productoras de penicilina, son claramente diferentes de *P. chrysogenum* (Frisvad y col., 1987, Andersen & Frisvad, 1994, Färber & Geisen 1994; Banke y col., 1997).

Ya en 1980, Pitt y colaboradores aceptaron las especies *P. griseoroseum* y *P. chrysogenum*, además sinonimizó a *P. citreoroseum* y *P. brunneorubrum* con *P. griseoroseum*. En contraste, los exhaustivos datos morfológicos y fisiológicos hallados mostraron que estas especies eran conespecíficas de *P. chrysogenum* (Frisvad & Filtenborg, 1989; Banke y col., 1997). Dado que el nombre *P. chrysogenum* era ampliamente utilizado, Frisvad y colaboradores (1990) y Kozakiewicz (1992) sugirieron conservar el nombre y rechazar el anterior *P. griseoroseum*, con sus sinónimos. La propuesta fue aceptada por el comité de hongos y líquenes (Committee for Fungi and Lichens) y *P. chrysogenum* figura como *nomen conservandum* (McNeill y col., 2006).

Fue en el año 2004 cuando Scott y colaboradores, estudiaron la taxonomía de *P. chrysogenum* utilizando datos de tipificación de secuencia de multilocus (MLST, por sus siglas en inglés) y demostraron que podía subdividirse en cuatro clados, sin embargo, el estudio se centró en aislamientos de interiores y se vinculó otros sinónimos de *P. chrysogenum* a esos clados.

En 2011, Houbraeken y colaboradores realizaron un análisis filogenético de los aislamientos de *P. chrysogenum* productores de penicilina más importantes y se reveló la presencia de dos clados altamente soportados, representados por dos especies. *P. chrysogenum* y *P. rubens* (fenotípicamente similares), aunque la primera produce ácido secalínico D y F y/o un metabolito relacionado con la lumpidina, mientras que la segunda no produce ninguno de estos metabolitos (**Cuadro 1 y Figura 5**). En su estudio reconocen la presencia de dos especies en *Penicillium chrysogenum sensu lato*; por otro lado, la presencia de cuatro linajes fue descrita por Scott y colaboradores en 2004. Los linajes 1 y 2 son *P. chrysogenum* y el linaje 4 corresponde a la cepa secuenciada de genoma completo que deriva de NRRL 1951, que es *P. rubens* (van den Berg, 2008), cabe mencionar que a la fecha también se ha secuenciado el genoma completo de la cepa *P. chrysogenum* NCPC10086, productora de alto rendimiento de penicilina (Wang y col., 2014).

El hongo también se ha conocido en el pasado como *Penicillium notatum*, y se ha documentado como la fuente del descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1929, aunque el estudio realizado por Houbraeken en 2011 demostró que tanto el aislado de Fleming como la cepa Wisconsin 54-1255, no son realmente *P. chrysogenum*, sino *P. rubens*. En el presente trabajo se utilizará el nombre de *P. chrysogenum*, para facilitar la comparación con las referencias anteriores a 2011.

Cuadro 1. Descripción general de cepas de *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium rubens* estudiadas. Modificado de Houbranken y col., 2011.

Clave	Clave en otras colecciones	Nombre	Sustrato y ubicación	Comentarios
NRRL 820	DTO 100G5 = IBT 4395 = IBT 6067 = IMI 92220	<i>P. chrysogenum</i>	Fuente sin registro	Ex-lectotipo de <i>P. griseoroseum</i>
CBS 306.48	NRRL 807 = IBT 5233 = IMI 24314	<i>P. chrysogenum</i>	Queso, Storrs, Connecticut, EE. UU.	Ex-lectotipo de <i>P. chrysogenum</i>
DTO 87I2		<i>P. chrysogenum</i>	Crecimiento de hongos en el techo de un archivo, Utrecht, Países Bajos	Representativo del grupo 2 en el estudio realizado por Scott y col. 2004
DTO 102B4	IBT 26889 = C238	<i>P. chrysogenum</i>	Polvo doméstico, Wallaceburg, ON, Canadá	Ex-tipo de <i>P. notatum</i>
CBS 355.48	NRRL 821 = IBT 4344 = DTO 98D4 = IMI 39759	<i>P. chrysogenum</i>	Ramas de <i>Hyssopus</i> , Noruega	
CBS 197.46	NRRL 832	<i>P. rubens</i>	Contaminante de mosto, Bélgica	Primera cepa usada para la producción de penicilina en un cultivo sumergido (Raper y Thom, 1949)
CBS 205.57	NRRL 824 = IBT 30142 = IMI015378	<i>P. rubens</i>	Contaminación en cultivo bacteriano, Reino Unido	Cepa productora de penicilina original de Fleming
DTO 95E9	IBT 30661	<i>P. rubens</i>	Tapa de botella de cerveza, Bélgica	
NRRL 792	DTO 98E8 = IBT 30129	<i>P. rubens</i>	Fuente sin registro	Ex-lectotipo de <i>P. rubens</i>
CBS 307.48	NRRL 1951 = IBT 5857 = IMI 40233	<i>P. rubens</i>	Melón cantalupo mohoso, Peoria, Illinois, EE. UU.	“Cepa Wisconsin”. Parental de la mayoría de las cepas productoras de penicilina de alto rendimiento
Wisconsin 54-1255		<i>P. rubens</i>	Melón cantalupo mohoso, Peoria, Illinois, EE. UU.	Cepa secuenciada de genoma completo

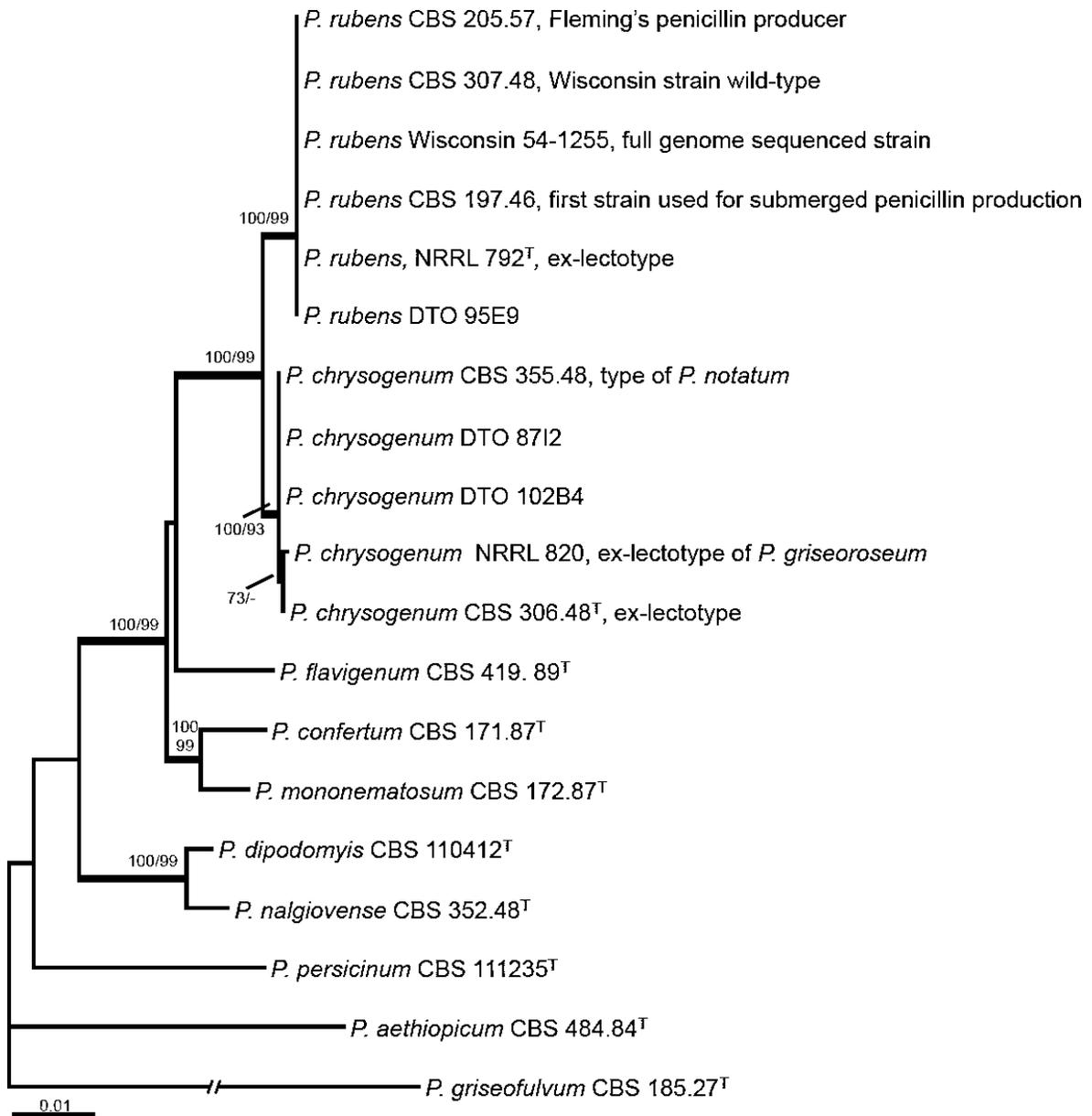


Figura 5. Árbol de ML de mejor puntuación de conjuntos de datos parciales combinados de β -tubulina, calmodulina y RPB2. Se muestran los valores BOOTSTRAP de la probabilidad máxima y las ramas admitidas sobre el 70% en el análisis de perfil de microsatélite (MP) o ML se indican con un guion. Tomado de Houbraken y col., 2011.

5. Producción de metabolitos

Todos los aislados de *P. chrysogenum* son reservorios amplios de enzimas como las sulfidril-hidrolasas, glucoamilasas, alcohol isoamílico-oxidasas y dihidroxiácido-deshidratasas relevantes en la industria alimentaria, complejos de coordinación y metabolitos secundarios con actividad antifúngica, citotóxica, antibacteriana, de los cuales los antibióticos β -lactámicos son los más estudiados, por lo que es usado en distintos tipos de industria (Charlang y col., 1981; Leiter y col., 2001; Jami y col. 2010b).

Las cepas silvestres de *P. chrysogenum* producen una diminuta cantidad de antibióticos β -lactámicos comparados con las cepas industriales actuales en condiciones de laboratorio (van den Berg, 2011). En un estudio realizado en el hábitat natural del hongo, se cuantificó la producción del antibiótico y se demostró la presencia de penicilina en el suelo y semillas del entorno, sin embargo, es difícil cuantificar la penicilina que producen ya que existen especies de *Bacillus* en el mismo entorno que son capaces de producir β -lactamasas (Hill, 1972).

En el genoma del hongo se encuentran rastros de otros metabolitos secundarios cuya producción por *P. chrysogenum* no ha sido reportada, como son los genes de la toxina viridicatum y griseofulvina, que pudieron perderse durante la evolución, mientras que en *Penicillium aethiopicum* sí se retenían (Chooi y col., 2010). Por otro lado, los genes de melanina están dispersos por el genoma (Pc21g16000, Pc21g16380, Pc21g16440 y Pc06g01310), mientras que en los “hongos negros” están agrupados y son funcionales (Woo y col., 2010).

Cabe mencionar que los hongos asociados con las raíces de las plantas pueden desencadenar respuestas en el sistema de defensa de las plantas, entre otras, conduciendo a un llamado estado de resistencia sistémica inducida, en el que la planta expresa varias proteínas de defensa que conducen a una mejor germinación y crecimiento de las semillas (Chen y col., 2006; Murali y col., 2012). Por esta razón, los extractos acuosos preparados a partir de micelio comercial seco de *P. chrysogenum* se pueden utilizar como aditivo para pulverización en suelos para mejorar el rendimiento del cultivo. Estudios detallados demostraron que el extracto en sí no tenía ninguna actividad antimicrobiana y que las moléculas de bajo peso

molecular, por debajo de 2000 Da, son necesarias para inducir el mecanismo de defensa en las plantas (Thuerig y col., 2006).

6. Biosíntesis de penicilina y su agrupación en clúster

La vía biosintética de penicilina se muestra en la **Figura 6**. El primer paso de la biosíntesis de penicilina es la condensación de los aminoácidos L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina para formar el producto ACV (δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina); este paso de reacción es catalizado por la enzima δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa (ACVS) (Ozcengiz y Demain, 2013). Posteriormente, el compuesto ACV es convertido al compuesto hidrofílico isopenicilina N (IPN) por la acción de la enzima isopenicilina-N-sintetasa (IPNS), enzima que cataliza la transferencia de cuatro átomos de hidrógeno al dióxígeno (Ozcengiz y Demain, 2013); esta reacción es llevada a cabo en el citosol (van der Lende y col., 2002). El tercer paso de biosíntesis consiste en el intercambio de la cadena de L- α -aminoadípico de la IPN por una cadena hidrofóbica de acil-CoA, reacción catalizada por la isopenicilina aciltransferasa (IAT) (Moreno-Vargas y col., 2012).

El clúster (o conjunto de genes) de biosíntesis de penicilina consiste en los genes *pcbAB* (δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa), *pcbC* (isopenicilina-N-sintetasa), y *penDE* (isopenicilina aciltransferasa) (Fierro y col., 1995). Al igual que en *P. chrysogenum*, en *Aspergillus nidulans* los genes de biosíntesis de penicilina también se encuentran agrupados en un clúster. La **Figura 7** muestra el agrupamiento de los genes de biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* y *A. nidulans*, junto con los dos clústers de biosíntesis de cefalosporina, otro antibiótico β -lactámico que es producido por el hongo *Acremonium chrysogenum* (Skatrud & Queener, 1989; Gutiérrez y col., 1991; Gutiérrez y col., 1992; Gutiérrez y col., 1999; Martin, 2000; Ozcengiz y Demain, 2013).

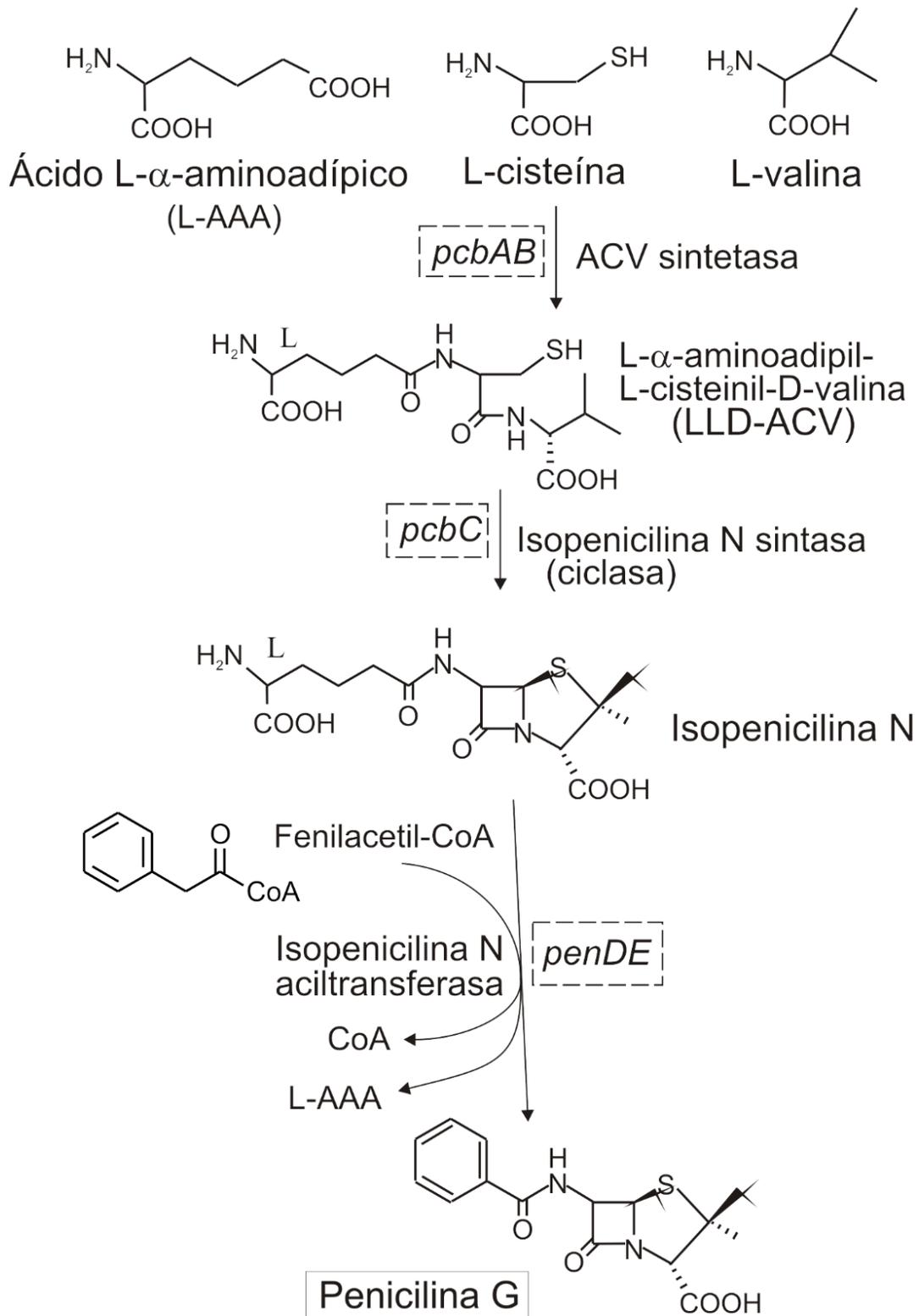


Figura 6. Ruta de biosíntesis de penicilina (Modificado de Cacycle, 2006)

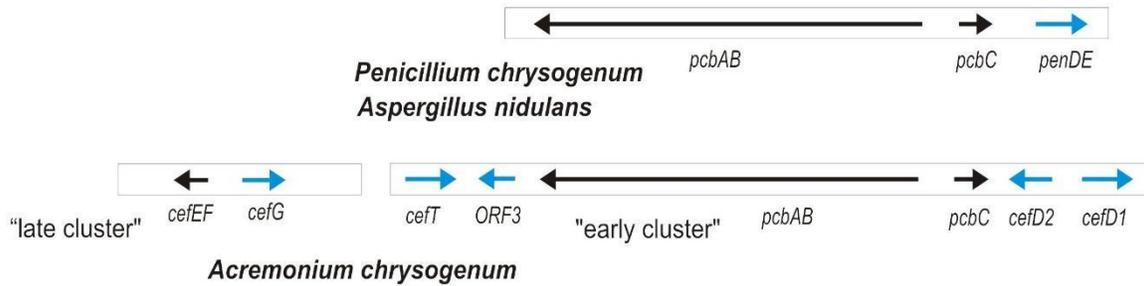


Figura 7. Organización en clústeres de los genes biosintéticos de penicilina en *P. chrysogenum* y *A. nidulans*, y de cefalosporina en *A. chrysogenum* (adaptado de Gutiérrez y col., 1991, 1992 y 1999; Weber y col., 2012a)

7. Regulación de la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*

Regularmente, los genes de biosíntesis de metabolitos secundarios como la penicilina (**Figura 7**) se encuentran agrupados en clústeres (Smith y col., 1990), los cuales son regulados por diferentes estímulos del medio como el pH, carbono, nitrógeno, temperatura y luz (van den Berg y col., 2007; Yin & Keller, 2011).

La regulación de la biosíntesis de penicilina se ha estudiado en gran profundidad, principalmente en *Aspergillus nidulans* (Brakhage y col. 2004 y 2009). Al contrario que en el caso de otras rutas de metabolitos secundarios de hongos, no se ha identificado un regulador específico de los genes de penicilina, sino que existen varios reguladores globales (factores transcripcionales de amplio dominio) que controlan la expresión de uno o varios de los tres genes de la ruta de penicilina. A continuación, se describen brevemente los circuitos reguladores y factores transcripcionales que se han descrito como moduladores de la expresión de los genes de penicilina.

Regulación por fuente de carbono. Esta regulación se lleva a cabo mediante un mecanismo conocido como represión por fuente de carbono. En presencia de fuentes como la glucosa, algunos de los genes de la ruta de penicilina son reprimidos transcripcionalmente. En *P. chrysogenum*, la represión es llevada a cabo por el regulador transcripcional CreA (Cepeda-García y col., 2014), mientras que en *A. nidulans* se ha demostrado que este regulador no juega un papel importante en la regulación por fuente de carbono (Espeso y col. 1993).

Regulación por fuente de nitrógeno. Los genes biosintéticos de penicilina también están sujetos a regulación por fuente de nitrógeno. Fuentes como el amonio reprimen la expresión de los genes *pcbAB* y *pcbC* en *P. chrysogenum* (Feng y col. 1994). El regulador global responsable de la regulación por fuente de nitrógeno en *A. nidulans* es el factor transcripcional AreA, y en *Neurospora crassa* el factor Nit-2. Ambos factores son proteínas de unión a DNA de tipo dedos de zinc, y reconocen cajas **GATA**. En *P. chrysogenum* se ha caracterizado el factor transcripcional NRE, posible ortólogo de AreA, el cual es capaz de unirse *in vitro* a un lugar en la región intergénica que separa los genes *pcbC-pcbAB* y que contiene dos sitios **GATA** (Haas y Marzluf, 1995), por lo cual el factor NRE es un candidato a ser el responsable de la regulación por fuente de nitrógeno de los genes de penicilina.

Regulación por pH. Los genes de penicilina se expresan mejor a niveles de pH ligeramente alcalinos, mientras que se ven reprimidos a pH ácido tanto en *P. chrysogenum* (Chu y col., 1997) como en *A. nidulans* (Espeso y col., 1993). La regulación por pH en *Aspergillus nidulans* es llevada a cabo por el regulador global PacC (Tilburn y col. 1995), el cual sufre un procesamiento proteolítico cuando el pH del medio es alcalino para unirse a promotores de genes que se expresan a pH alcalino y activar su transcripción. En *P. chrysogenum* PacC se une a varios sitios de unión consenso en la región intergénica *pcbAB-pcbC* (Suárez y Peñalva, 1996).

Regulación por el factor transcripcional AnCF (HAP). En *A. nidulans* se describió la función de las cajas CCAAT, presentes en muchos promotores de organismos eucariotas, en la regulación de los genes de penicilina, y se demostró que el factor de transcripción AnCF (también denominado HAP) se une a estas cajas para activar la transcripción de ciertos genes (Litzka y col. 1998). Varias cajas CCAAT están también presentes en la región intergénica *pcbAB-pcbC* y en el promotor del gen *penDE* en *Penicillium chrysogenum*.

Regulación por el factor transcripcional Pta1. En *P. chrysogenum* se identificó una secuencia de DNA en la región intergénica *pcbAB-pcbC* que era reconocida por una proteína de unión a DNA y cuya mutación causaba una importante disminución de la expresión del promotor *pcbAB* (Kosalková y col., 2000; Kosalková y col., 2007). Dicha secuencia se determinó mediante un ensayo de interferencia de uracilo (UIA, *Uracil Interference Assay*) como **TTAGTAA**, y la proteína que se une a ella se denominó Pta1.

Además de los circuitos y factores transcripcionales mencionados, la biosíntesis de penicilina se regula a través del regulador global del metabolismo secundario LaeA, tanto en *A. nidulans* (Bok y Keller, 2004) como en *P. chrysogenum* (Kosalková y col., 2009). LaeA es una proteína con actividad metiltransferasa que forma parte del complejo *Velvet*, formado por las proteínas VeA y VelB y LaeA, el cual regula procesos como la diferenciación sexual y asexual en respuesta a estímulos de luz en *A. nidulans* (Bayram y col., 2008). El mecanismo de acción de este complejo parece ser mediante la modificación del estado de la cromatina. Otro regulador de los genes de penicilina que actúa a nivel epigenético es la histona desacetilasa HdaA, cuya actividad reprime la expresión de clústeres del metabolismo secundario próximos a regiones teloméricas en *A. nidulans*, como ocurre con el clúster de penicilina (Shwab y col., 2007).

También se ha demostrado la participación de la ruta de transducción de señal de las proteínas G heterotriméricas en la biosíntesis de penicilina. La subunidad α FadA de *A. nidulans* (Tag y col., 2000) y la subunidad α Pga1 de *P. chrysogenum* (García-Rico y col., 2008) regulan positivamente la biosíntesis de penicilina.

Por otro lado, los complejos de coordinación captadores de hierro tienen un papel importante en la producción de penicilina, dado que la enzima isopenicilina N-sintasa, fundamental en la biosíntesis de penicilina, es dependiente de hierro (Burzlaff y col., 1999) ¿Será posible que algún factor de transcripción que regule la biosíntesis de penicilina sea a su vez regulado por la disponibilidad de hierro en el entorno?

8. Desarrollo evolutivo en la biosíntesis de penicilina

Dos de los tres genes biosintéticos de la penicilina (*pcbAB* y *pcbC*) son, pues, de origen bacteriano (van den Berg y col., 2008) y su agrupación está muy conservada entre los hongos productores de cefalosporinas y penicilinas (van den Berg y col., 2007). Posiblemente se adquirieron de una vía biosintética procariótica completa de producción de antibióticos β -láctamicos de tipo cefalosporina. A partir del hongo ancestro productor de β -láctamicos, se inició un largo tramo evolutivo. La actividad de la enzima desacetoxicefalosporina-C sintasa (expandasa) se perdió, lo que dio lugar a una clase divergente de hongos que solo producían penicilinas. Posteriormente la maquinaria para la síntesis de penicilina “reclutó” a un gen

fúngico que codifica para una enzima con actividad de aciltransferasa, lo que permitió una producción de penicilina más eficiente a través de la sustitución de las cadenas laterales hidrófobas. Este gen se duplicó y se vinculó físicamente a los otros genes biosintéticos de penicilina (Spröte y col., 2008). En *P. chrysogenum*, el gen copiado “*penDE*” adquirió por evolución una señal de dirección C-terminal que clasifica la enzima en el peroxisoma, donde también están presentes las CoA ligasas (van den Berg y col., 2008; Kiel y col., 2009), cuya función es activar las cadenas laterales naturales que permiten una producción eficiente (Figura 8).

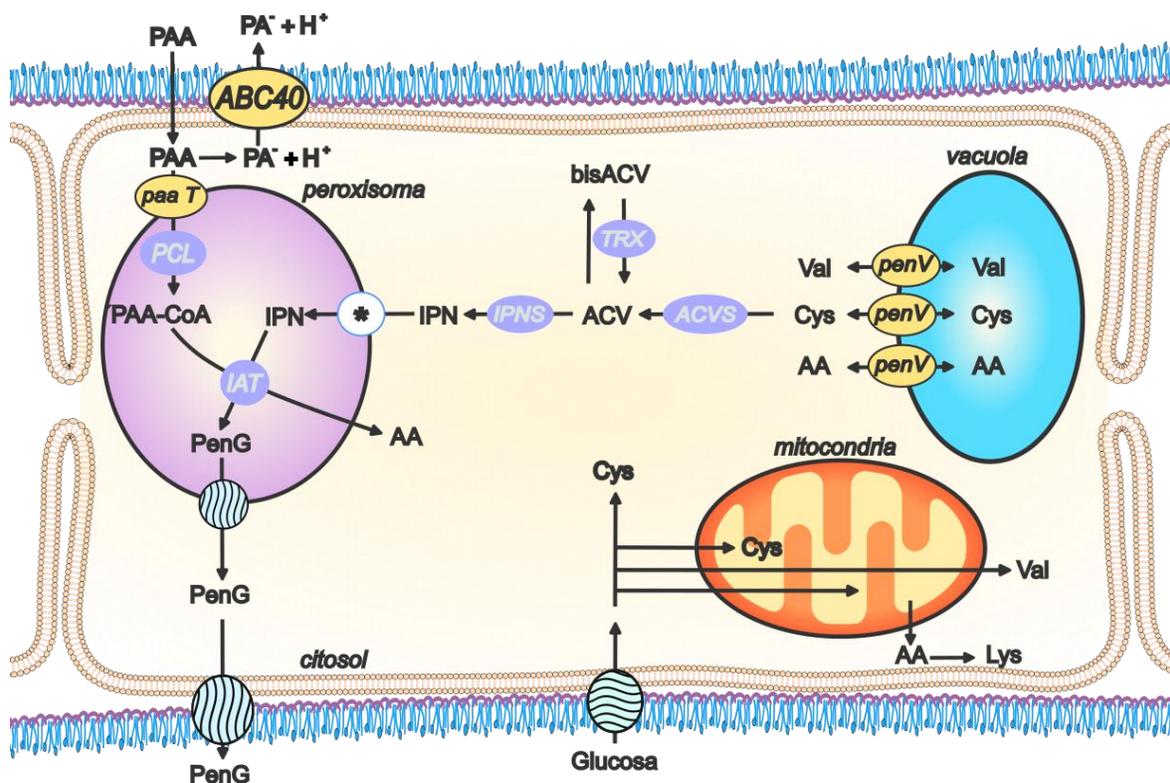


Figura 8. Resumen esquemático de la biosíntesis de penicilina por *P. chrysogenum*. Cys; cisteína, AA; aminoadipato, Lys; lisina, Val; valina, ACV; L-δ-(α-aminoadipoil)-L-cisteinil-D-valina, bisACV; dímero oxidado de ACV, IPN; isopenicilina N, PAA; ácido fenilacético, PA; fenil acetato, PAA-CoA; fenilacetil-Coenzima A, PenG; penicilina, ACVS; ACV sintetasa, TRX; tioredoxina reductasa (Cohen y col., 1994). IPNS; IPN sintetasa, PCL; PA-CoA ligasa, IAT; isopenicilina N acetiltransferasa, penV; transportador vacuolar MFS de aminoácidos (Pc22g22150; Fernández-Aguado y col., 2013a), ABC40; transportador ABC para secreción de PA (Pc22g17530; Weber y col., 2012b), paaT; transportador peroxisomal MFS para PAA (Pc21g01300; Fernández-Aguado y col., 2013b), * (asterisco); transportador peroxisomal MFS para IPN (probablemente Pc22g22150 homólogo de cefP; Ullán y col., 2010). Modificado de van den Berg, 2013.

Una mayor presión de selección natural hizo que la copia original del gen para la aciltransferasa en *Penicillium* (*Penicillia*) fuera redundante e inactiva, mientras que en *Aspergillum* (*Aspergilli*) permaneció activa (van den Berg y col. 2008; Kiel y col. 2009).

Durante el proceso de mejora de la cepa se perdió una copia del gen principal que codifica para el complejo policétido sintasa (PKS), por lo que se pueden encontrar dos copias del gen en la cepa Wisconsin 54-1255, mientras que solo una en la cepa DS17690 (van den Berg y col. 2008). Del mismo modo, se perdió la supuesta expresión de la escitalona deshidrata (*arpI* en *P. marneffeii*) durante la mejora de la cepa (Jami y col., 2010b; Woo y col., 2010). Estas observaciones ayudan a entender el por qué las esporas de las cepas industriales son de un verde menos intenso que las de la cepa Wisconsin 54-1255.

9. Mejora genética para el incremento en la producción de penicilina

El aislamiento de la cepa NRRL 1951 de un melón infectado comprado en el mercado local de Peoria, Illinois (Raper y col., 1944), hizo posible aumentar la producción de penicilina, mediante el cultivo con un concomitante. Durante la segunda guerra mundial la necesidad del antibiótico aumentó, por lo que se estimuló el desarrollo de su producción a niveles industriales (van den Berg, 2013).

Los programas clásicos de mejora de cepas de diversas multinacionales condujeron al desarrollo en paralelo de las cepas actuales usadas en la industria, las cuales producen varias docenas de gramos por litro, alrededor de 20 000 veces más que el aislado inicial de Fleming. Esta enorme mejora se ha visto facilitada por muchas adaptaciones en el metabolismo de los hongos (Lein, 1986; van den Berg, 2011).

Los cambios más destacados son los siguientes:

- Eliminación del catabolismo de cadena lateral (ácido fenilacético, PAA)
- Mayor nivel de enzimas biosintéticas (a través de la amplificación del grupo de genes)
- Aumento del flujo de carbono hacia los componentes básicos de los aminoácidos (aminoadipato, cisteína y valina)

Diversas investigaciones sobre mutantes que producen niveles significativamente reducidos del antibiótico han abierto el camino para comprender los conceptos básicos de la biosíntesis

de penicilina (Queener y col., 1978; Cantoral y col., 1993; Fierro y col., 1995). Afortunadamente, se ha secuenciado el genoma de *P. chrysogenum* (van den Berg y col., 2008), lo que permitirá un enfoque más dirigido y una mejor comprensión. Aun así, después de casi 100 años, la producción de penicilina no se comprende completamente, por lo que actualmente, los avances en biotecnología y las nuevas herramientas facilitarán el estudio y alcanzar su entendimiento completo.

10. Mejoramiento clásico de la cepa

La cepa NRRL 1951, que produjo penicilina en cultivo sumergido (Raper y col., 1944), fue el comienzo para que se desarrollaran cepas industriales altamente optimizadas. Para lograrlo, se utilizan agentes mutágenos como la radiación por UV, los rayos X y los agentes alquilantes de DNA, para producir mutaciones aleatorias y aislar las mejores mutantes en cuanto a la producción (van den Berg, 2013).

Uno de los primeros objetivos fue la reducción del pigmento crisogenina (Backus & Stauffer, 1955). La cepa Wisconsin 54-1255, derivada de tales mutaciones se convirtió en el estándar de laboratorio mundial (Elander, 2002). Esta cepa es la plataforma de la mayoría de los linajes industriales, y su DNA se utilizó para determinar la secuencia del genoma de *P. chrysogenum*.

Además de la reducción de crisogenina, la exposición a mutágenos indujo una amplia gama de modificaciones en el genoma, sin embargo, sólo se conocen dos relaciones directas entre mutación génica y la producción de penicilina:

- *pahA*: la vía del homogentisato (catabolismo del ácido fenilacético) está inactiva en gran medida en la cepa Wisconsin 54-1255 y las cepas derivadas (Rodríguez-Sáiz y col., 2001), lo que causa una mayor disponibilidad de la cadena lateral y, en consecuencia, un aumento en la síntesis de penicilina.
- *pcbAB-pcbC-penDE*: El clúster de genes de la penicilina se amplifica varias veces en las cepas de producción (Fierro y col., 1995; van den Berg y col., 2007).

En la **Cuadro 2**, se resumen otras mutaciones, aparentemente relevantes, para las cuales la anotación o la ubicación física sugieren una correlación con la síntesis o secreción de penicilina, pero no se ha demostrado la relación directa con la biosíntesis de antibióticos β -

lactámicos. Se sabe que mutaciones del metabolismo contribuyeron significativamente a la mejora de producción de penicilina, pero aún no se han identificado las mutaciones de las que deriva la mejora.

Cuadro 2. Mutaciones por tipo en la mejora de la biosíntesis de penicilina.

Se sugiere una correlación con la síntesis o secreción de penicilina	Contribuyeron a la mejora en la producción de penicilina, pero no se han identificado específicamente
<i>Erg25</i> ; codificación de C4-setrolmetiloxidasa, cuya orientación se revirtió en Wisconsin 54-1255 en el borde exterior de la región amplificada en cepas de producción posiblemente afectando el contenido de ergosterol de las membranas (van den Berg y col., 2007)	Tasas mejoradas en la producción de penicilina se correlacionan con el aumento de los volúmenes peroxisomales (van den Berg y col., 2008; Meijer y col., 2010), que parece estar asociado con el aumento en los niveles de transcripción de 27 genes que codifican proteínas asociadas a peroxisomas (van den Berg y col. 2008)
Pc12g04030; codificación de una cefalosporina esterasa putativa, cuyo marco abierto de lectura se alteró debido a una repetición de 14 pb, posiblemente disminuyendo la hidrólisis de β -lactámicos (van den Berg, 2010)	Expresión de factores de virulencia, útiles para aislamientos naturales, está disminuida en cepas de mayor producción (van den Berg y col., 2008).
Pc12g00440: codifica para un transportador ABC, que adquirió una mutación durante la mejora de la cepa, lo que sugiera un transporte de β -lactámicos (van den Berg, 2010)	La generación de NADPH aumenta en cepas de mayor producción (van den Berg y col., 2008)
	Los niveles de transcripción de genes de biosíntesis de aminoácidos y los niveles de aminoácidos aumentan en las cepas de mayor producción (van den Berg y col., 2008; van den Berg, 2011).
	Los cambios morfológicos están asociados con cepas de alta producción (van den Berg y col., 2008; van den Berg, 2011).
	Las cepas con alto contenido de penicilina parecen haber perdido la capacidad de utilizar celulosa, sorbitol y otras fuentes de carbono (Jami y col., 2010b).

11. Mejoramiento de la cepa basado en la genómica

La disponibilidad de la secuencia del genoma estimuló la aplicación de técnicas ómicas con el fin de identificar nuevas pistas para mejorar aún más los rendimientos de penicilina (**Cuadro 3**). Las derivaciones se pueden clasificar de la siguiente manera (van den Berg, 2013):

- Aumentan el flujo a través del metabolismo primario
- Aumentan el flujo a través de la vía biosintética
- Mejoran el equilibrio energético
- Disminuyen el catabolismo de las cadenas laterales
- Mejoran la homeostasis de los orgánulos

Cuadro 3. Modificaciones genéticas que conducen a una mayor producción de penicilina (tasas) en *P. chrysogenum*. Modificado de van den Berg, 2013.

Modificación	Enzima	Gen	Mejora del plegado	Fuente
Deleción	Serina/treonina cinasa ^a	Pc18g03490	1,37 ^b	Bartoszewska y col., 2011
	Acil-oxidasa ^c	Pc20g01800	1,6 ^d	Veiga y col., 2012
	Acil-CoA dehidrogenasa ^c	Pc20g07920	3,7 ^d	Veiga y col., 2012
	Oxalato hidrolasa ^e	Pc22g24830	1,36 ^d	Gombert y col., 2011
	L-aminoadipato-semialdehido dehidrogenasa ^f	Pc22g06310	2 ^g	Casqueiro y col., 1999
Sobreexpresión	IAT	Pc21g21370	1,6 ^b	Weber y col., 2012b
	PEX11 ^h	Pc12g09400	2 ^b	Kiel y col., 2005
	pptA	Pc13g04050	1,3 ^g	García-Estrada y col., 2008
	PCL	Pc22g14900	1,35 ^g	Lamas-Maceiras y col., 2006

^a Involucrado en autofagia (secuestro de peroxisomas por vacuolas)

^b De acuerdo con el título de penicilina V

^c Involucrado en beta-oxidación

^d De acuerdo con los rangos de producción de Ácido adipoil-6-aminopenicilánico

^e Formación de oxalato (precipitación con calcio)

^f Vía de la lisina y amino acetato

^g De acuerdo con el título de penicilina G

^h Factor de proliferación de peroxisomas

La mejora en la homeostasis de los orgánulos está orientada específicamente al peroxisoma, que, después del reclutamiento de la IAT, se convirtió en un compartimiento muy importante para la alta producción de penicilina en *P. chrysogenum*. Se demostró que existe una correlación directa entre el número de peroxisomas y la producción de penicilina, lo que fue conseguido de dos maneras distintas: aumentando la proliferación de peroxisomas o previniendo la autofagia de los peroxisomas por la vacuola (Meijer y col., 2010). Ambas modificaciones conducen a un aumento adicional al número de peroxisomas y la producción de penicilina. Se ha hallado que la delección de *pvcA* (Pc21g07250), que codifica para una GTPasa, aumenta la fusión vesícula-vacuola y da como resultado una disminución en la producción de penicilina (Xu y col., 2012).

12. Complejo de unión a CCAAT

La transcripción eucariota está regulada por un gran número de proteínas que se ensamblan en un orden definido en las regiones promotoras, río arriba del inicio de la transcripción (Venters & Pugh, 2009). Este proceso de ensamblaje se basa en la unión de factores de transcripción específicos de secuencia, como la proteína de unión a las cajas TATA (TBP), a los elementos reguladores en *cis* (Burley & Roeder, 1996). Después de la asociación de múltiples factores generales, se recluta a la RNA pol II y otras proteínas reguladoras (Fickett & Hatzigeorgiou, 1997). El ensamblaje multiproteico resultante constituye el complejo transcripcional basal, que permite la expresión génica.

Un elemento genético importante para el TBP, que se encuentra a menudo río arriba del sitio de unión en las regiones promotoras eucariotas es la caja pentamérica CCAAT. Se encuentra en la región 5' de ~30% de los genes eucariotas, entre 50 y 200 pb desde el punto de inicio de la transcripción, y puede estar presente en cualquier orientación reconocida por el complejo de unión a CCAAT (CBC) (Bucher, 1990; Marino-Ramirez, 2004).

El CBC reconoce la secuencia en una amplia variedad de organismos (Maity & de Combrugge, 1998; Mantovani, 1998). El primer complejo de unión identificado fue el complejo Hap de *Saccharomyces cerevisiae*, que consta de cuatro subunidades, Hap2p, Hap3p y Hap5p (esenciales para la formación del complejo de unión al DNA) y Hap4p, que no está involucrado directamente en la unión a DNA, pero tiene un dominio de activación

funcional (Pinkham & Guarente, 1985; Forsburg & Guarente, 1989; Olesen & Guarente, 1990; Xing & col., 1993; Mantovani, 1998).

Un enfoque bioquímico y genético condujo al descubrimiento de una caja CCAAT funcional y un complejo de unión a CCAAT (en ese momento llamado PenR) en el hongo filamentoso *A. nidulans*, un modelo excelente para el estudio de la regulación genética. *A. nidulans* metaboliza una amplia gama de fuentes de carbono y nitrógeno del medio ambiente y, puede utilizar acetamida como única fuente de carbono y nitrógeno (Bergh y col., 1996; Litzka y col., 1996).

En la búsqueda de factores de transcripción que regulan la biosíntesis de penicilina en *A. nidulans*, se identificaron sitios CCAAT en los promotores de los genes *amdS* (que codifica para la enzima catabólica acetamidasa), *acvA*, *ipnA* y *aata* (que codifican para las enzimas de biosíntesis del metabolismo secundario penicilina) que regulan la expresión de los mismos (Littlejohn & Hynes, 1992; Bergh y col., 1996; Litzka y col., 1996).

La activación completa de la expresión de *amdS* por AmdR depende estrictamente de una secuencia de caja CCAAT, que actúa en *cis* en el promotor *amdS*, flanqueada río arriba por el sitio de unión a AmdR (van Heeswijck & Hynes, 1991). De esto se concluye que un CBC similar a Hap también está presente en *A. nidulans* y se le denominó AnCF (factor de unión a CCAAT de *A. nidulans*, por sus siglas en inglés) (van Heeswijck y Hynes, 1991) ver **Figura 9**. De manera similar, una proteína de *A. nidulans* denominada AnCP se une a una secuencia CCAAT presente en el promotor del gene Taka-amilasa de *Aspergillus oryzae* (Nagata y col., 1993; Kato y col., 1997).

Mediante la clonación de los genes *hapC*, *hapB* y *hapE* de *A. nidulans* se demostró la similitud de PenR con el complejo Hap, ya que codifican proteínas con regiones centrales de alta similitud con Hap3, Hap2 y Hap5 de *S. cerevisiae* y con las subunidades A, B y C del complejo homólogo de mamíferos NF-Y (Papagiannopoulos y col., 1996; Litzka y col., 1998; Steidl y col., 1999).

Durante mucho tiempo no se identificó ningún homólogo funcional de Hap4 en hongos distintos de *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Hansenula polymorpha* (Bourgarel y col., 1999; Sybirna y col., 2005). Sin embargo, los homólogos de Hap4 de cepas mutantes de *K. lactis* y *H. polymorpha* son capaces de complementar la delección de *hap4*. Posteriormente, se encontró un indicio de la existencia de más homólogos de Hap4, debido al hecho de que

todos los homólogos fúngicos de Hap5 contienen un motivo de aminoácidos conservados, que es importante para el reclutamiento de la subunidad Hap4 en el complejo Hap2/3/5 en *S. cerevisiae* (McNabb y col., 1997).

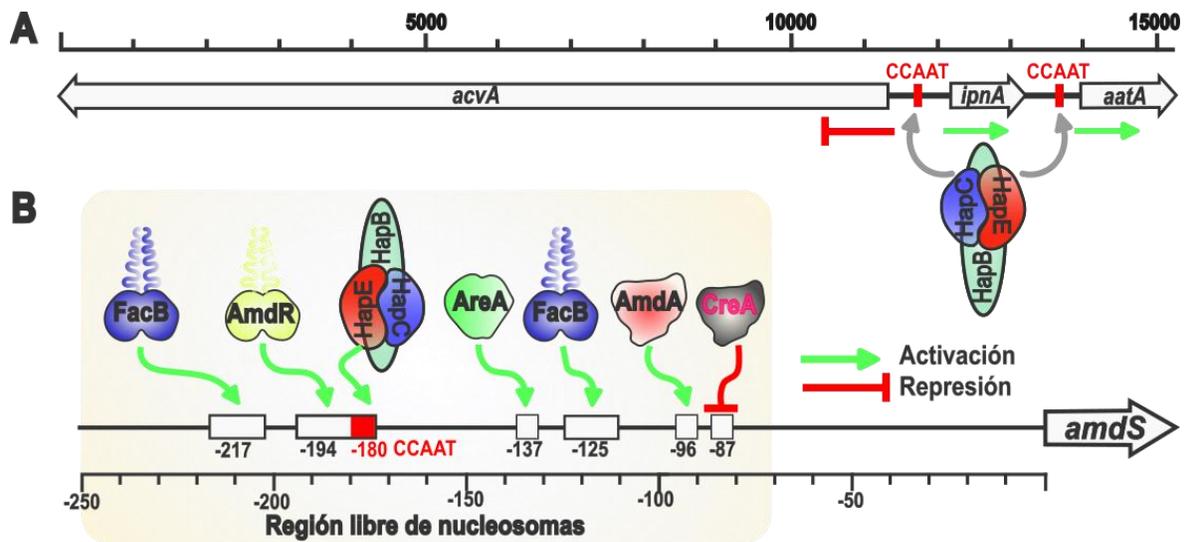


Figura 9. (A) Modelo resumido de la acción del CBC (PenR) sobre el grupo de genes de biosíntesis de penicilina en *A. nidulans*. El CBC tiene un efecto positivo sobre la expresión de *ipnA* y *aatA* y, simultáneamente, un efecto negativo sobre *acvA*. **(B) Representación esquemática de la región promotora de *amdS* de *A. nidulans*.** Los sitios de unión reguladores que actúan en *cis*, identificados como activadores y represores transcripcionales, se muestran como rectángulos. Los números representan sus posiciones relativas con respecto al punto de inicio de la traducción. La caja CCAAT en la posición -180 y la región constitutivamente libre de nucleosomas de ~180 pb están marcadas en rojo y gris, respectivamente. Modificado de Hortschansky, 2016.

En *Aspergillus spp.*, se identificó el primer homólogo putativo de Hap4 empleando la subunidad HapB de *A. nidulans* en un sistema de selección “dos híbridos” de levadura (Tanaka y col., 2002). La proteína identificada no mostró similitud con secuencias de Hap4 de *S. cerevisiae*, excepto por un motivo de 16 aminoácidos en el extremo N-terminal, esencial para la interacción de Hap4 con Hap5 en un complejo ensamblado Hap2/3/5 (McNabb y col., 2005).

Sorprendentemente, una cepa de *A. nidulans* delecionada para el gen similar a *hap4* no mostró el crecimiento lento característico de mutantes de deleción de *hapB*, *hapC* o *hapE* en cualquier fuente de carbono. Además, el gen similar a *hap4* de *A. nidulans* no pudo complementar el defecto de crecimiento de una cepa de deleción de *hap4* de *S. cerevisiae* en lactato. En conclusión, el regulador recientemente identificado no era un homólogo de Hap4

13. Función de los CBCs

El complejo de unión a CCAAT (CBC) consiste en una estructura central heterotrimérica, que está altamente conservada desde eucariotas simples como las levaduras hasta el hombre, pero ausente en bacterias. Constituye un importante regulador transcripcional general (**ver Cuadro 4**). En genomas eucariotas hay una alta prevalencia de la caja CCAAT, actualmente se ha descrito gran cantidad de genes regulados negativa o positivamente por el complejo, incluidos genes promotores del ciclo celular y la pro-supervivencia (Mantovani, 1998; Ceribelli y col., 2008).

Los motivos CCAAT se encuentran entre las secuencias reguladoras que no están ocupadas por octámeros de nucleosomas (Segal y col., 2006). Esto asegura la accesibilidad al DNA genómico para otros factores de transcripción y remarca el papel del CBC en el reconocimiento y la organización del promotor (Oldfield y col., 2014).

En mamíferos, la subunidad NF-YB es necesaria para el desarrollo embrionario temprano y las mutaciones sobre la misma subunidad causa defectos severos en el desarrollo (Matuoka & Chen, 1999; Bhattacharya y col., 2003; Deng y col., 2007, Yoshioka y col., 2007). Es de particular interés que en las especies de hongos el CBC participa en la regulación del metabolismo primario y secundario, la respuesta a estrés oxidativo, la homeostasis del hierro, la virulencia en huéspedes animales y vegetales y la resistencia a los azólicos de los patógenos fúngicos (Littlejohn y Hynes, 1992; Bergh y col., 1996; Hortschansky y col., 2007; Schrettl y col., 2010; Thön y col., 2010; Gsaller y col., 2016). Debido a la variedad de vías que regula el CBC y su importancia, su estudio es de vital importancia en biotecnología, agricultura y medicina.

En *S. cerevisiae*, el complejo Hap desempeña un papel importante en el control de los genes involucrados en la respiración en respuesta a la fuente de carbono, y la subunidad activadora Hap4p está fuertemente regulada por el cambio de glucosa a fuentes de carbono no fermentables (Forsburg y Guarente, 1989). El complejo Hap de *A. nidulans*, por el contrario, resulta no ser necesario para la activación de genes implicados en la fosforilación oxidativa. La capacidad de las cepas de delección *hapB/C/E* para crecer en fuentes de carbono como el acetato y el glicerol (Fig. 3) distingue claramente a *A. nidulans*, un aerobio obligado, de los

mutantes hap de *S. cerevisiae*, que no son viables en fuentes de carbono no fermentables (Pinkham y Guarente, 1985; McNabb y col., 1995).

En hongos filamentosos, el complejo se ha implicado en la regulación de genes relacionados con el catabolismo de fuentes únicas de carbono (por ejemplo, taka-amilasa (Nagata y col., 1993; Kato y col., 1997, fuentes únicas de nitrógeno (hidrólisis de formamida y acetamida, como fuentes de carbono y nitrógeno) (Papagiannopoulos y col., 1996).

Además, el complejo afecta a la expresión de genes implicados en el metabolismo secundario: biosíntesis de penicilina (Bergh y col., 1996; Litzka y col., 1996 y 1998) y en la asimilación de amonio (glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP) (Chen y col., 1998). Se ha detectado una unión de proteína a una secuencia CCAAT en la región 5' del gen *yA*, específico de conidiación de *A. nidulans*, pero no se ha establecido que la proteína sea AnCF (Aramayo & Timberlake., 1993).

El complejo Hap es necesario para la expresión de genes implicados en la fosforilación oxidativa en respuesta al crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (Pinkham & Guarente, 1985); además se ha descubierto que los genes que no participan en la respiración están sujetos a la regulación por el complejo Hap (Dang y col., 1996a y 1996b).

Estudios moleculares mostraron que el gen *hapC* de *A. nidulans* es un homólogo del gen *HAP3* de *S. cerevisiae* (Papagiannopoulos y col., 1996) y que la delección de este gen resultó en niveles bajos de expresión de los genes *amdS*, *aata* e *ipnA* fusionados al gen reportero *lacZ* (Papagiannopoulos y col., 1996; Litzka y col., 1998). Además, la eliminación de *hapC* resultó en la pérdida de unión de AnCF y PENR1 a las secuencias de CCAAT del promotor del gen *amdS*, de los genes de biosíntesis de penicilina y del gen para la taka-amilasa, lo que indica que estos complejos contienen un componente codificado en *hapC* (Papagiannopoulos y col., 1996; Kato y col., 1997; Litzka y col., 1998). Esto se confirmó directamente en ensayos que utilizaron antisuero anti-HapC (Kato y col., 1997; Litzka y col., 1998) o que reconstituyeron un complejo de unión a CCAAT utilizando HapC recombinante junto con Hap2p y Hap5p expresados en *S. cerevisiae* (Kato y col., 1997).

Cuadro 4. Caracterización del complejo de unión a CCAAT de eucariotas con sus respectivas subunidades. Tomado de Hortschansky, 2016.

	Especies	Designación	Subunidades	Referencias
Ascomicetos	Especies de <i>Aspergillus</i>	Hap (AnCF, AoCP, AnCP, PenR1)	HapB/C/E/X	Brakhage y col., 1999; Tsukagoshi y col., 2001; Tanaka y col., 2002
	<i>Neurospora crassa</i>	AAB1	Hap2/3/5	Chen & Kinsey, 1995; Chen y col., 1998
	<i>Trichoderma reesei</i>	Hap	Hap2/3/5	Zeilinger y col., 1998 y 2003
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Hap	HapX	
	<i>Fusarium verticillioides</i>	Hap	Hap2/3/5	Ridenour y col., 2012
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hap	Hap2/3/4/5	Hahn & Guarente, 1998; Forsburg & Guarente, 1989; McNabb y col., 1995
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Hap	Hap2/3/4/5	Bourgarel y col., 1999; Mulder y col., 1994; Nguyen y col., 1995
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Php	Php2/3/4/5	Olesen y col., 1991; McNabb y col., 1997; Mercier y col., 2006
	<i>Candida albicans</i>	Hap	Hap2/3/31/41/42/43/5	Johnson y col., 2005
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Hap	Hap2/3/5/X	Jung y col., 2010
Basidiomicetos	<i>Ustilago maydis</i>	Hap	Hap2/3/5/Yap1	Mendoza-Mendoza y col., 2009; Molina & Kahmann, 2007
Plantas	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hap	Hap2/3/5	Edwards y col., 1998
		NF-Y	NF-YA/B/C	Laloum y col., 2013
Anfibios	<i>Xenopus laevis</i>	NF-Y	NF-YA/B/C	Li y col., 1998
Mamíferos	Humanos	NF-Y	NF-YA/B/C	Mantovani, 1999
	Ratas	CBF (NFY)	CBF-B/A/C	Maity & de Crombrughe, 1998

Posteriormente se clonaron los genes que codifican dos componentes adicionales al complejo AnCF, *hapB* y *hapE*, que codifican proteínas del núcleo central con alta similitud con Hap2p y Hap5p de *S. cerevisiae*, así como con las correspondientes de mamíferos. Adicionalmente, se demostró que las subunidades HapB, HapC y HapE son necesarias y suficientes para la unión al DNA mediante la reconstitución del complejo *in vitro* y que deleciones de los genes *hapB* y *hapE* dan como resultado la pérdida de la actividad de unión de AnCF y fenotipos similares a los observados con la deleción de *hapC* (Steidl y col., 2020). La deleción del gen *hapE*, así como la mutación o deleción de la caja CCAAT, dieron como resultado la pérdida tanto de una región libre de nucleosomas de aproximadamente 180 pb como de un sitio hipersensible a la DNAasa I en el promotor *amdS*. Sorprendentemente, estos hallazgos confirmaron un papel del CBC como factor de unión al DNA en el establecimiento de estructuras de cromatina abiertas en distintas regiones promotoras mediante la prevención de la formación de nucleosomas (Narendja y col., 1999).

La deleción independiente de cada uno de los tres genes, *hapB*, *hapC* y *hapE*, da como resultado fenotipos idénticos de crecimiento lento y débilmente conidantes, que es consistente con los tres productos genéticos que interactúan para formar el complejo funcional (en el que cada subunidad es esencial). Pero, la viabilidad de las cepas delecionadas de *hapB*, *hapC* y *hapE* en *A. nidulans* indica que el complejo Hap no es absolutamente necesario para la transcripción de ningún gen esencial. Es probable que el fenotipo de crecimiento lento sea el resultado de una expresión subóptima de muchos genes que están sujetos a controles regulatorios adicionales. Esto es ejemplificado por el gen *amdS*: aunque la secuencia CCAAT y el complejo *hap* tienen un efecto importante en la expresión, el gen aún puede responder a otros mecanismos de control. Además, la producción de penicilina se reduce, pero no se suprime, en una cepa delecionada de *hapC* (Litzka y col., 1998).

La deleción de los genes *hapB*, *hapC* y *hapE* dan como resultado fenotipos idénticos de crecimiento lento, conidiación deficiente y expresión reducida del gen *amdS*, que codifica para acetamidasa (Andrianopoulos & Hynes, 1990), además en cepas con deleciones de *hapB* y *hapE* la inducción de *amdS* por omega-aminoácidos que dependen de la actividad de AmdR se suprime, al igual que el crecimiento en cultivos que contienen ácido γ -aminobutírico (GABA), por lo tanto, se concluye que la activación de la expresión génica por el regulador

específico de la vía AmdR depende de la función de AnCF (Hynes & Davis, 1996; Steidl y col., 2020).

14. Estructura de las subunidades del CBC e interacción entre las mismas

A finales de la década de los 90's, estaba claro que los distintos tramos de aminoácidos dentro de los dominios de unión al DNA y de asociación de las tres subunidades centrales de CBC están altamente conservados evolutivamente (con una identidad de aminoácidos >50%). Los análisis mutacionales de los dominios conservados en NF-YA y Hap2 determinaron que estos dominios son absolutamente necesarios para la interacción de las subunidades y la unión al DNA (Olesen y col., 1990; Sinha y col., 1996).

Esto también es válido para las partes conservadas en Hap3 y NF-YB (CBF-A) (Xing y col., 1993; Sinha y col., 1996), así como para Hap5 y NF-YC (CBF-C) (McNabb y col., 1997; Kim y col., 1996). Sin embargo, las posiciones relativas de los dominios dentro de las subunidades difieren fuertemente, y sus regiones contiguas apenas muestran similitud de secuencia entre levaduras, hongos filamentosos y mamíferos (**Figura 11**). Una característica de estas regiones no conservadas es su desorden intrínseco, que es inherente a los reguladores transcripcionales eucariotas. En consecuencia, un estudio sistemático reveló que NF-YA con un desorden general del 96.25% ocupó tres de todos los factores de transcripción humanos analizados (Liu y col., 2006).

Con la excepción de *Aspergillus spp.* prácticamente no se sabe nada sobre la función específica de estas regiones desordenadas en especies de hongos. Se demostró que fuera del dominio central conservado de HapB, había evolucionado una segunda secuencia de señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) conservada evolutivamente (**Figura 11A**) (Tüncher y col., 2005). De acuerdo con el hecho obvio de que, en los mamíferos, el NF-Y carece de una cuarta subunidad activante similar a Hap4, tanto las subunidades NF-YA como NF-YC contienen tramos largos ricos en glutamina en sus respectivos N-terminales (NF-YA) o C-terminales (NF-YC), que funcionan como dominios de activación (Coustry y col., 1996). Un sello estructural de todos los homólogos de Hap3 y Hap5 es la presencia de un motivo de pliegue de histona característico (HFM, por sus siglas en inglés) (**Figura 11B, C**). Estos dominios similares a HFM poseen una estructura secundaria específica que comprende una

hélice α central larga, que está flanqueada por dos hélices α adicionales más cortas y se dimeriza mediante un modo de ensamblaje de la cabeza a la cola a través de contactos hidrófobos extensos (Arents y col., 1991; Gnesutta y col., 2013). En particular, se predice una NLS fuera del dominio central similar al H2B en la subunidad Hap3 de *C. albicans*. Ésta es una excepción interesante al hallazgo de que solo los homólogos de Hap2 contienen al menos un NLS. Además, este hongo dimórfico codifica una segunda subunidad similar a Hap3 (Hap31), lo que llevó a la hipótesis de que CaHap3 y CaHap31 podrían formar CBC heterotriméricos alternativos distintos al asociarse con CaHap2 o CaHap5 (Johnson y col., 2005; Baek y col., 2008).

En todos los eucariotas, el CBC se ensambla con al menos tres subunidades. Dos de ellas demostraron estar estructuralmente relacionadas con las histonas arqueales Hmf-2 y las histonas eucariotas (Sandman y col., 1990;), mientras Romier y col., 2003 que la tercera subunidad de la estructura, que es responsable del reconocimiento específico de la caja CCAAT, aún no se ha caracterizado. Es muy llamativo que, debido a la alta conservación dentro de los eucariotas, la subunidad puede intercambiarse con funcionalidad en diferentes especies (Tüncher y col., 2005). En *Aspergillus nidulans*, las subunidades HapC y HapE son similares a histonas, mientras que la subunidad HapB le confiere la especificidad al DNA.

Los HMF de HapC y HapE muestran una identidad de secuencia de aproximadamente el 75% con sus homólogos humanos NF-YB y NF-YC, lo que refleja su alta conservación estructural. Tanto HapC, relacionada con la histona H2B, como HapE relacionada con H2A (Maity & de Crombrughe, 1998; Mantovani, 1999) adoptan estructuras terciarias similares, incluyendo tres hélices ($\alpha 1$ - $\alpha 3$), conectadas por segmentos de bucle corto (L1-L2). Perpendicular a su eje largo, la hélice $\alpha 2$ está flanqueada por las hélices más cortas $\alpha 1$ y $\alpha 3$ (**Figura 12**). Este pliegue representa un sello distintivo de las proteínas histonas, que se ensamblan en nucleosomas y, por tanto, organizan estructuralmente el empaquetamiento del DNA (Luger y col., 1997). Además del HFM, HapC y HapE albergan extensiones C y N terminales, que interaccionan con varios reguladores transcripcionales. En su C-terminal, ambas subunidades poseen una hélice 3_{10} (un tipo de estructura secundaria de proteínas poco común. Son más estrechas y largas que una hélice alfa) de cuatro vueltas. Además, HapE comprende una extensión N-terminal, denominada αN , que también forma parte de la histona H3, pero adopta una orientación diferente.

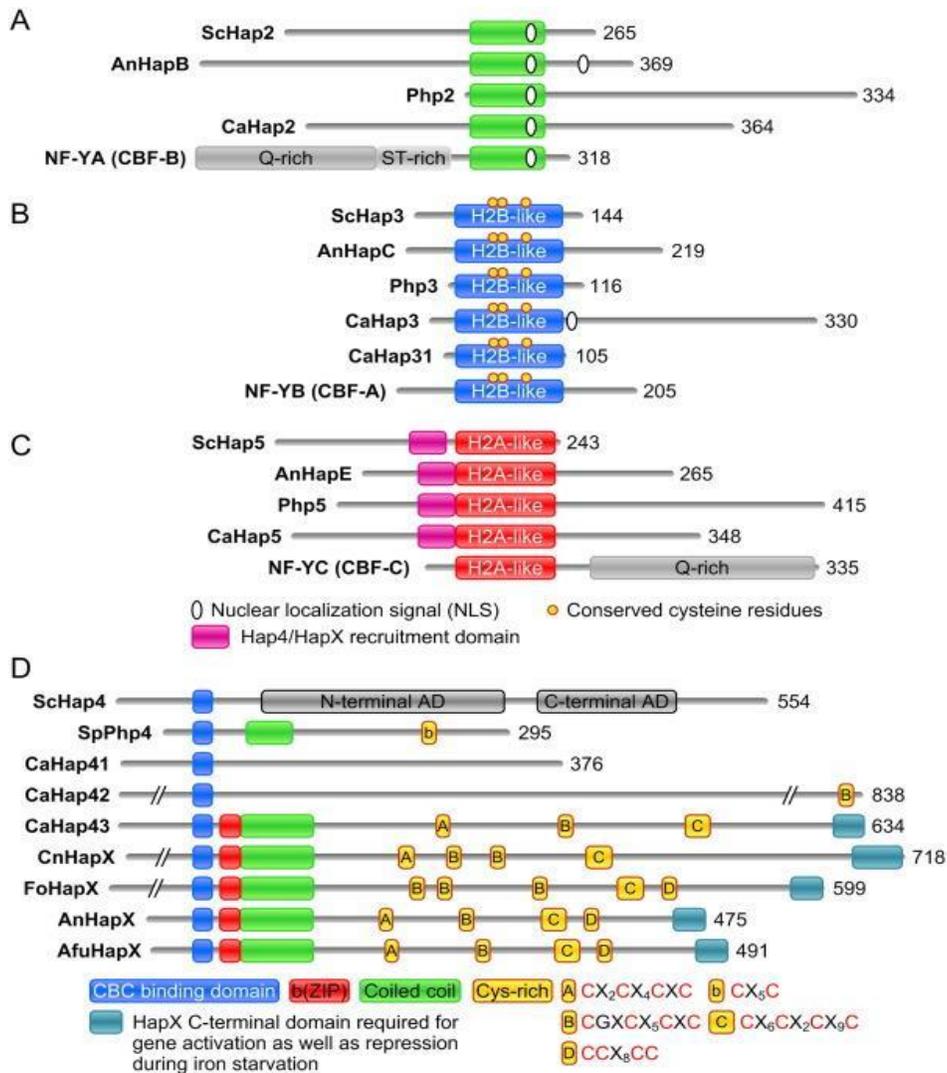


Figura 11. Arquitectura de las subunidades formadoras de CBC fúngicos seleccionadas en comparación con las respectivas subunidades NF-Y humanas (A-C). Los dominios marcados en verde, azul y rojo representan dominios conservados evolutivamente de los CBC centrales heterotriméricos que son suficientes para la interacción de las subunidades y su unión al DNA. La(s) posición(es) de los NLS putativos o verificados experimentalmente en todos los homólogos de Hap2 se indican con óvalos blancos. Tres residuos de cisteína conservados en el dominio similar a H2B de los homólogos de Hap3 se indican con puntos amarillos. Los dominios de reclutamiento de Hap4/HapX específicos de hongos de los homólogos de Hap5 se marcan en rosa. (D) Vista esquemática de la organización del dominio Hap4 en comparación con los homólogos de Hap4/HapX de *S. pombe* (Sp), *C. albicans* (Ca), *C. neoformans* (Cn), *F. oxysporum* (Fo), *A. nidulans* (An), *Astfumigatus* (Afu). El dominio mínimo de 16 a.a. requerido para la unión de CBC se muestra en azul. Los dominios de activación (AD) mapeados en *S. cerevisiae* Hap4 se muestran en gris. Las regiones básicas y los dominios de bobina enrollada se muestran en rojo y verde, respectivamente. Las regiones ricas en cisteína con distintos espacios entre a.a. están en amarillo. En turquesa se observa el motivo conservado C-terminal de ~25 a.a., que es esencial en *A. fumigatus* para la función de HapX durante la ausencia de Fe. Tomado de Hortschansky y col., 2016.

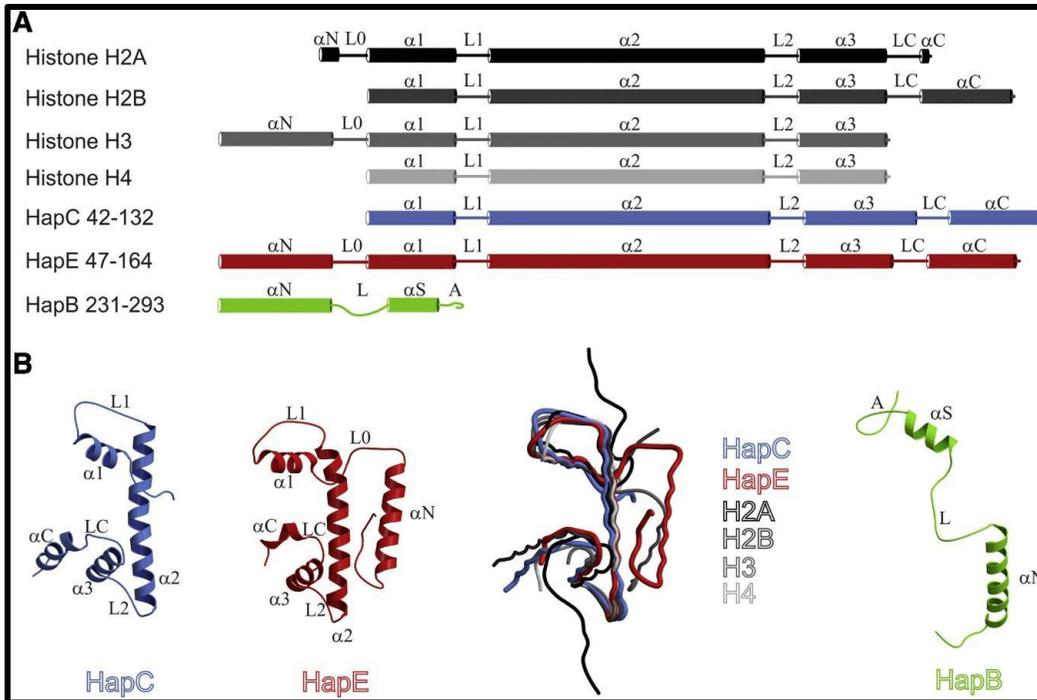


Figura 12. Estructura terciaria de las subunidades del complejo Hap en comparación con histonas. **A)** Representación esquemática de la arquitectura de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, así como de las subunidades HapC, HapE y HapB. Los elementos de la estructura secundaria están etiquetados. **B)** Estructuras terciarias HapC, HapE y HapB se muestran como cintas individuales, las estructuras superpuestas de HapC, HapE e histonas se ilustran como bobinas. Los colores se asignan de acuerdo con A. (Tomado de Huber y col., 2012)

Mientras que HapC y HapE probablemente evolucionaron a partir de un ancestro histónico común, la tercera subunidad del CBC, HapB, no muestra ninguna similitud aparente con otro dominio estructural de proteína determinada a la fecha, como se deduce del estudio de la base de datos Dali (Holm y Rosenström, 2010). En complejo con el DNA, el dominio central de HapB, que es idéntico en ~65% a la secuencia de su contraparte humana NF-YA, se puede subdividir en cuatro partes principales:

1. La hélice N-terminal αN (residuos de aminoácidos (aa): 240-258).
2. Enlazador L (residuos aa: 259-272).
3. Sensor de hélice designado αS (residuos aa: 273-280).
4. Región de bucle C-terminal denominada ancla A (residuos aa: 281-293).

Debido a que ambas hélices de HapB no están restringidas en su orientación entre sí, HapB adopta una estructura ligeramente plegada que esencialmente requiere del heterodímero HapC/HapE como andamio para que funcione como un factor de transcripción específico de la secuencia (Huber *et al.*, 2012).

15. Estructura del complejo Hap en ausencia de DNA

Comparable a las histonas, HapC y HapE se asocian a una estructura de apretón de manos. Este conjunto antiparalelo cabeza-cola yuxtapone el bucle L1 de HapC y el bucle L2 de HapE y viceversa. Las interacciones extensas entre estas regiones de bucle y las hélices $\alpha 2$ de HapC y HapE crean un complejo apretado, que involucra más del 30% de la superficie del total de cada subunidad. Los contactos hidrofóbicos de interfaz de HapC y HapE involucran a las cisteínas 74 y 78, los cuales se han demostrado cruciales para la estabilidad general del CBC y su regulación redox (Thön y col., 2010).

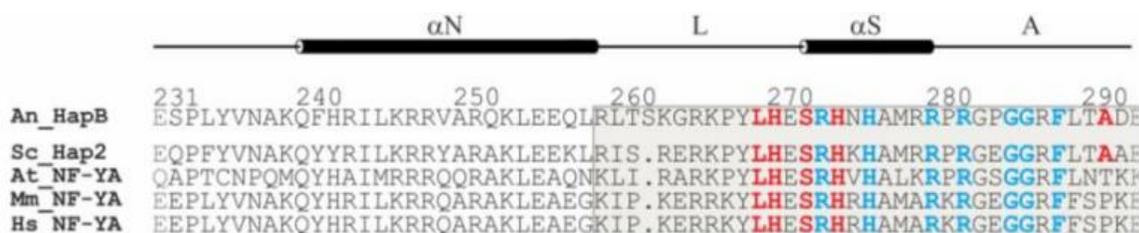


Figura 13. Alineación de secuencias de subunidades individuales. La secuencia se muestra sólo para los dominios centrales conservados de HapB de *A. nidulans* (An) y sus correspondientes homólogos de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Arabidopsis thaliana* (At), *Mus musculus* (Mm) y *Homo sapiens* (Hs). Los números de residuos se asignan de acuerdo con las secuencias completas de HapB de *A. nidulans*, derivados de la base de datos de Uniprot. Se muestran la estructura secundaria (α : hélice) para las subunidades del CBC de *A. nidulans*; 4 residuos de aminoácidos estructuralmente desordenados se representan en gris; la parte C-terminal de HapB, que está desordenada en la estructura del CBC sin interacción con el DNA, se indica mediante un recuadro gris; los residuos de aminoácidos que interactúan con el esqueleto de azúcar-fosfato del DNA están coloreados en rojo; los aminoácidos que forman enlaces de H con las bases del DNA están resaltados en azul. (Tomado de Huber y col., 2012).

El eje de simetría rotacional pseudo-doble que relaciona los HFM de HapC y HapE se encuentra entre sus hélices $\alpha 2$. Paralelamente a este eje, el heterodímero HapC/HapE está flanqueado por las hélices αN de HapB y HapE. Aunque no están perfectamente pronunciadas, ambas hélices αN siguen la simetría pseudo-doble del complejo central, lo que podría indicar una relación evolutiva. La hélice αN de HapB interactúa con las hélices $\alpha 2$ y αC de HapC, así como con la hélice αC de HapE a través de enlaces de hidrógeno y puentes de sal. Estos contactos son selectivos de proteínas porque HapB no puede asociarse con NC2, un represor transcripcional que está estructuralmente relacionado con el heterodímero HapC/HapE (Zemzoumi y col., 1999). Sorprendentemente, la parte C-terminal de HapB (residuos aa 259-293), que se demostró como la fracción de la secuencia de DNA que

confiere especificidad del CBC (Olesen & Guarente, 1990; Maity & de Crombrughe, 1992; Xing y col., 1993 y 1994), está estructuralmente desordenado en ausencia de DNA (**Figuras 13 y 14**).

16. Ensamble y translocación nuclear del CBC en *A. nidulans*

Sólo los homólogos de Hap2 contienen al menos un NLS. Sin embargo, las tres subunidades de CBC son necesarias para la unión al DNA. Por lo tanto, se debe haber desarrollado un mecanismo que permita que las otras subunidades sean transportadas al núcleo. Aunque se ha discutido un modo de ensamblaje de un solo paso para el complejo Hap de *S. cerevisiae* (McNabb y col., 2005), mientras tanto se acepta un mecanismo de dos pasos. Primero, las subunidades similares a HFM se ensamblan en un heterodímero que luego es reconocido por la tercera subunidad. Este modo de interacción se asemeja a la asociación cabeza-cola de las histonas H2A y H2B o H3 y H4, que finalmente se fusionan con la partícula del nucleosoma (Luger y col., 1997). Las siguientes líneas de evidencia apoyan el mecanismo evolutivo conservado de dos pasos:

- CBF-B (NF-YA) no interactúa con CBF-A (NF-YB) o CBF-C (NF-YC), sólo con el heterodímero CBF-A/C (NF-YB/C) preformado (Liang & Maity, 1998).
- CBF-C de rata (NF-YC) es capaz de formar un complejo de DNA proteico estable junto con *S. cerevisiae* Hap2 y Hap3 (Sinha y col., 1995).
- Hap2 y Hap5 de *S. cerevisiae* forman un CBC *in vitro* junto con HapC de *A. nidulans* (Kato y col., 1998).
- La estructura cristalina del heterodímero NF-YB/C humano muestra interacciones estrechas de ambas subunidades entre sus regiones HFM (Romier y col., 2003).

Los primeros resultados sobre la importación de todas las subunidades se obtuvieron con *A. nidulans*. Un análisis detallado con subunidades de Hap marcadas con proteínas verdes fluorescentes (GFP, por sus siglas en inglés), producidas en una cepa de tipo salvaje y en todas las posibles cepas de delección de *hap* ($\Delta hapB$, $\Delta hapC$, $\Delta hapE$), llevó a la conclusión de que el ensamblaje de todo el CBC tiene lugar en el citoplasma (Steidl y col., 2004). Posteriormente, el NLS2 no conservado de HapB interactúa con la maquinaria de

importación nuclear y permite la translocación de CBC en el núcleo a través de un mecanismo "piggy-back".

La conservación evolutiva de este mecanismo de importación nuclear está respaldada por estudios de localización nuclear que utilizan proteínas de fusión con GFP de *A. nidulans* HapB, *S. cerevisiae* Hap2 y NF-YA humano, tanto en *A. nidulans* como en *S. cerevisiae* (Tüncher y col., 2005):

- En *A. nidulans*, la subunidad NF-YA se importa al núcleo cuando NLS2 de HapB es parte de la misma proteína, por lo que se entiende que NLS2 es necesaria para la localización nuclear.
- Asimismo, HapB y NF-YA se localizaron en el núcleo de un mutante de delección de *hap2* de *S. cerevisiae*. La complementación parcial o total de los fenotipos de delección *hapB* y *hap2* indica que HapB, Hap2 y NF-YA son funcionalmente intercambiables

Vale la pena mencionar que se discute un mecanismo alternativo de importación nuclear para el NF-Y humano (Kahle y col., 2005). Anteriormente, se demostró que la importación nuclear de NF-YB y NF-YC es independiente de NF-YA y se supone que la importina-13 reconoce el heterodímero NF-YB/C preformado, pero no las subunidades individuales, mientras que la localización nuclear de NF-YA se lleva a cabo mediante importina- β (Hortschansky, 2016).

17. Estructura del CBC y mecanismo de unión al DNA

Durante mucho tiempo había sido una pregunta abierta de cómo el CBC gana especificidad de secuencia para el pentanucleótido CCAAT. La estructura cristalina descrita del complejo *A. nidulans* CBC:DNA reveló un modo novedoso de unión al DNA y proporcionó conocimientos profundos sobre el reconocimiento de la caja CCAAT a nivel atómico (Huber y col., 2012). Las subunidades de CBC de tipo histona, HapC y HapE, inducen la flexión del DNA de tipo nucleosoma al interactuar con la estructura de azúcar-fosfato, mientras que HapB ancla firmemente el CBC a la caja CCAAT mediante la detección y el ensanchamiento de surcos menores. La estructura CBC:DNA cristalizada permitió visualizar la posición de la hélice N-terminal de HapE (α N) dentro del CBC y en relación con la columna vertebral

del DNA (**Figura 14**). Se demostró que este dominio es importante para la interacción con HapX (Hortschansky y col., 2007). Curiosamente, la estructura terciaria de la subunidad HapB no muestra ninguna similitud con ningún dominio proteico conocido a la fecha; se compone de una hélice N-terminal seguida de un bucle, una hélice sensor α S y un ancla A. Mientras que el N-terminal de HapB media la asociación con HapC y HapE, su parte C-terminal le confiere especificidad de secuencia al interactuar con el DNA. Mientras que la mayoría de los factores de transcripción se insertan en el surco principal del DNA, dado que ofrece más sitios de contacto con las bases del DNA, HapB se une al surco menor del DNA y lo ensancha desde 12 Å hasta 19 Å. Esta deformación estructural no es lograda por la hélice del sensor α S, sino por el ancla A, que funciona como un tentáculo y se inserta en la caja CCAAT. Las mediciones de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) de mutantes HapB truncados basados en la estructura demostraron que el ancla A es esencial para la unión de alta afinidad del CBC a la caja CCAAT (Huber y col., 2012). En conjunto, con respecto a la organización del dominio de HapB, el CBC representa un aglutinante de surco menor único. En particular, se informó de un modo de unión de DNA similar a una histona específica de secuencia idéntica para el complejo NF-Y humano (Nardini y col., 2013). Los análisis de transcriptoma y ocupación de NF-Y en todo el genoma revelaron que la capacidad de flexión del DNA de secuencia específica del CBC es un requisito previo para su función como un “remodelador de pseudo-cromatina” al facilitar una conformación de cromatina permisiva seguida por el reclutamiento de control del crecimiento y factores de transcripción maestros específicos del tipo de célula (Fleming y col., 2013; Oldfield y col., 2014).

Adicionalmente, se demostró que el complejo Hap solo y en interacción con el DNA muestra una alta similitud estructural entre sí, lo que implica que la unión al DNA no induce reordenamientos estructurales en el complejo central. En contraste con la estructura CBC, en el complejo CBC:DNA también se visualizan segmentos C-terminal de HapB (residuos aa: 259-293) atados a la caja CCAAT. La doble hebra de DNA unida a CBC, aproximadamente cuatro vueltas, adopta la estructura de una hélice B de forma cóncava que cubre las subunidades HapC y HapE a lo largo de su eje de simetría pseudo-2 veces con un ángulo de flexión de 73°, comparado con 0° para el DNA B ideal. La curvatura se asemeja a la flexión del DNA en los nucleosomas (ángulo de flexión de 68°) (Luger y col., 1997), y resalta la relación evolutiva del CBC con las histonas (Liberati y col., 1998).

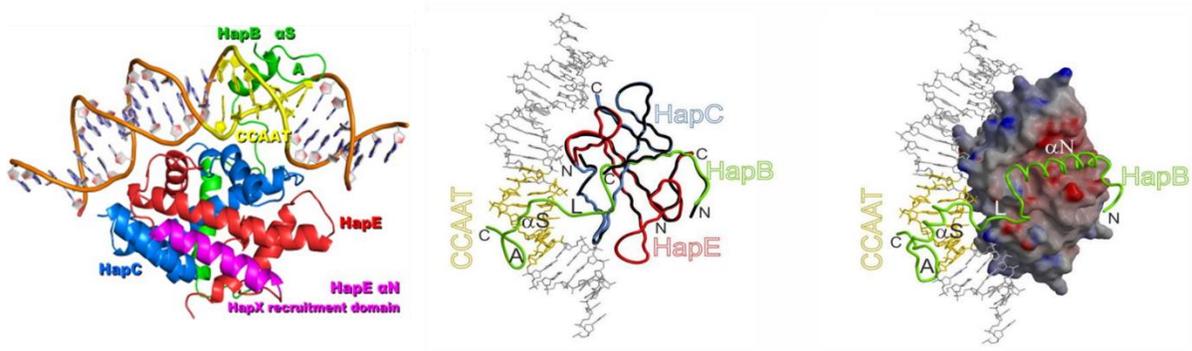


Figura 14. **A la izquierda)** Gráfico del CBC unido al dúplex de DNA en la caja CCAAT de 23 pb derivado del promotor *cycA* de *A. nidulans*. Tomado de Hortschansky y col., 2016. **Al centro)** CBC sin DNA (negro) y unido a DNA (en colores) La caja CCAAT es resaltada en amarillo y el DNA en gris. Todas las proteínas se presentan como espirales. **A la derecha)** Representación de superficie del CBC, Las distribuciones de carga superficial se muestran para HapC y HapE, los colores indican el potencial electrostático negativo y positivo (-30kT/e en rojo brillante a 30kT/e en azul brillante) Hap B se ilustra como bobina. Tomado de Huber y col., 2012

En la **Figura 15** se pueden observar los contactos proteína-DNA, las bases de la hebra de Watson se numeran consecutivamente comenzando con 1 en el extremo 5' del motivo CCAAT, y a las bases ubicadas río arriba de la caja CCAAT se les asignan números negativos. Las bases cebadas en la hebra complementaria de Crick se numeran de acuerdo con su socio vinculante. Las interacciones se agrupan en cuatro secciones y todas se ilustran en la Figura 15A: (B-C) HapC y HapE con la columna vertebral de DNA, (D-E) el enlazador L de HapB con la columna vertebral de azúcar-fosfato, (F) la hélice αS de HapB con la columna vertebral de DNA y las bases de DNA, y (G) el ancla A con la columna vertebral de DNA y las bases de DNA. Dentro de estos grupos, la descripción comienza en la posición 1 del cuadro CCAAT avanzando hacia las posiciones 1' y 2.

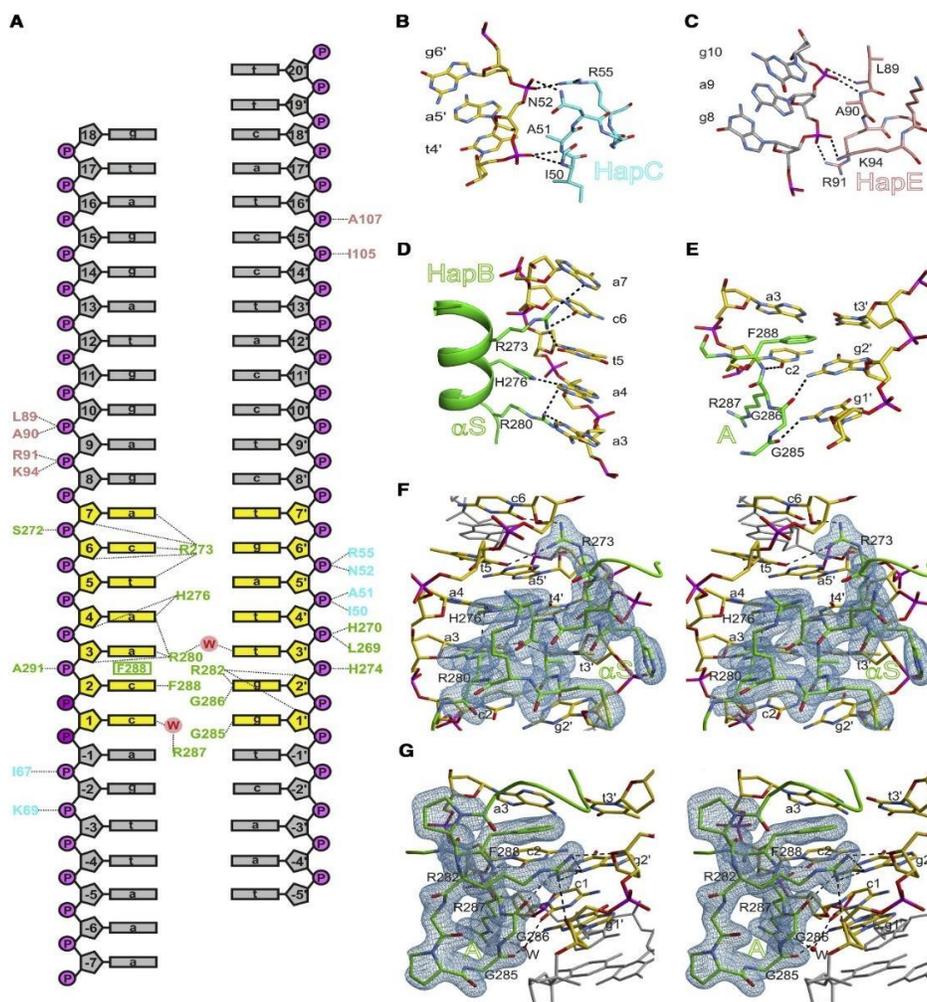


Figura 15. Interacciones del CBC con la columna vertebral del DNA y las bases de DNA de la caja CCAAT. Los nucleótidos de DNA se representan en gris y los grupos fosfato en púrpura. Tanto el Watson como la hebra Crick de la caja CCAAT están coloreados en amarillo. Los residuos aa cruciales para las interacciones del DNA están coloreados en azul (HapC), en rojo (HapE) y en verde (HapB). Los enlaces de hidrógeno se indican mediante líneas punteadas. Las moléculas de agua que forman parte de las redes de enlaces de hidrógeno están coloreadas en rojo. Phe288 se somete a apilamiento con bases de DNA. (A) Ilustración esquemática de todos los contactos proteína-DNA. (B) Ilustración de interacciones seleccionadas independientes de la secuencia de HapC y la columna vertebral de DNA dentro de la caja CCAAT. (C) Sitios de contacto seleccionados de HapE y la columna vertebral de DNA. (D) Ilustración de interacciones específicas de secuencia seleccionadas de la hélice del sensor α S de HapB con el cuadro CCAAT (véase también A y F). (E) Ilustración de interacciones seleccionadas específicas de la secuencia del ancla A de HapB con el recuadro CCAAT (véase también A y G). (F) Ilustración estereo de la hélice α S (residuos a.a. 273–280) de HapB unida a la caja CCAAT. La densidad de electrones (azul) representa un $2F_o - F_c$ -omitir mapa contorneado a 1.0σ . Se representan interacciones importantes para la especificidad de la secuencia del CBC. (G) Ilustración estereo del ancla A (residuos aa 281–288) de HapB unido a la caja CCAAT. La densidad de electrones (azul) representa un $2F_o - F_c$ -omitir mapa contorneado a 1.0σ . Se ilustran los contactos cruciales para la afinidad del CBC con el cuadro CCAAT. (Tomado de Huber y col., 2012).

18. Regulación postraduccional del CBC por estados celulares redox

La capacidad de mantener el equilibrio redox es fundamental para todos los organismos. En consecuencia, múltiples sensores reguladores monitorean continuamente el estado redox para controlar los procesos que mantienen la homeostasis redox y la protección celular del daño por la regulación global y específica de la transcripción (Marinho y col., 2014). Un mecanismo principal de la regulación redox es la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de modificaciones oxidativas de residuos cisteína en proteínas.

Estudios anteriores demostraron que el ambiente celular redox regula postranscripcional de la asociación de la subunidad NF-Y y la unión al DNA (Nakshatri y col., 1996). Experimentos realizados en *A. nidulans* esclarecieron los mecanismos moleculares precisos subyacentes (Thön y col., 2010). Todos los homólogos de HapC de hongos y vertebrados contienen tres residuos de cisteína conservados en su HFM central (**Figura 11B**). Solo se ha descrito una excepción en la familia de proteínas vegetales NF-YB que posee sólo las dos últimas de estas cisteínas conservadas (Hackenberg y col., 2012). En *A. nidulans*, el CBC detecta el estado redox de la célula mediante la modificación oxidativa de los dos primeros de estos residuos de cisteína. Sin embargo, la formación estable de heterodímeros de HapC/HapE y la formación estable de CBC:DNA requiere tioles libres, por lo que la oxidación de las cisteínas en HapC bloquea el ensamblaje de CBC.

Paradójicamente, el CBC actúa como represor de *napA* (que codifica el homólogo de levadura Yap1, NapA). Por lo que, las ROS inactivan el CBC mediante la oxidación de HapC, causando un aumento la expresión directamente de los genes diana *napA* y NapA mediante la desrepresión del CBC e indirectamente mediante la activación del sensor de peróxido NapA y su unión a elementos sensibles a Yap (YRE). Esta respuesta provoca la inducción del sistema de tiorredoxina de *A. nidulans* (Thön y col., 2007), que reprime la actividad de NapA y reactiva a HapC mediante circuitos de retroalimentación interconectados (**Figura 16**). Por medio de la autorregulación mediada por CBC del gen *hapB* (Steidl y col., 2001), es decir, un mecanismo que controla los niveles de CBC nuclear mediante transporte piggy-back (Steidl y col., 2004), la expresión de *hapB* se deprime en condiciones de estrés oxidativo. Como *hapC* y *hapE* se expresan constitutivamente, un nivel celular elevado de HapB da como resultado un nivel elevado de CBC nuclear que permite la inducción sucesiva

de mecanismos de defensa antioxidantes (producción de enzimas como catalasa (CatB), tiorredoxina (TrxA), tiorredoxina reductasa (TrxR) y peroxirredoxina (PrxA)). Aunque no se ha estudiado con tanto detalle, la señalización de ROS a través del CBC también se ha demostrado en *S. cerevisiae* durante la biogénesis mitocondrial (Chevtzoff y col., 2010). Además, la inactivación de Hap3 en el patógeno vegetal *Fusarium verticillioides* disminuyó significativamente la tolerancia de este hongo al estrés oxidativo (Ridenour y col., 2014). En lo tanto, el CBC es uno de los principales sensores redox de la célula eucariota y un miembro de un mecanismo afinado para la adaptación a diferentes niveles de estrés oxidativo.

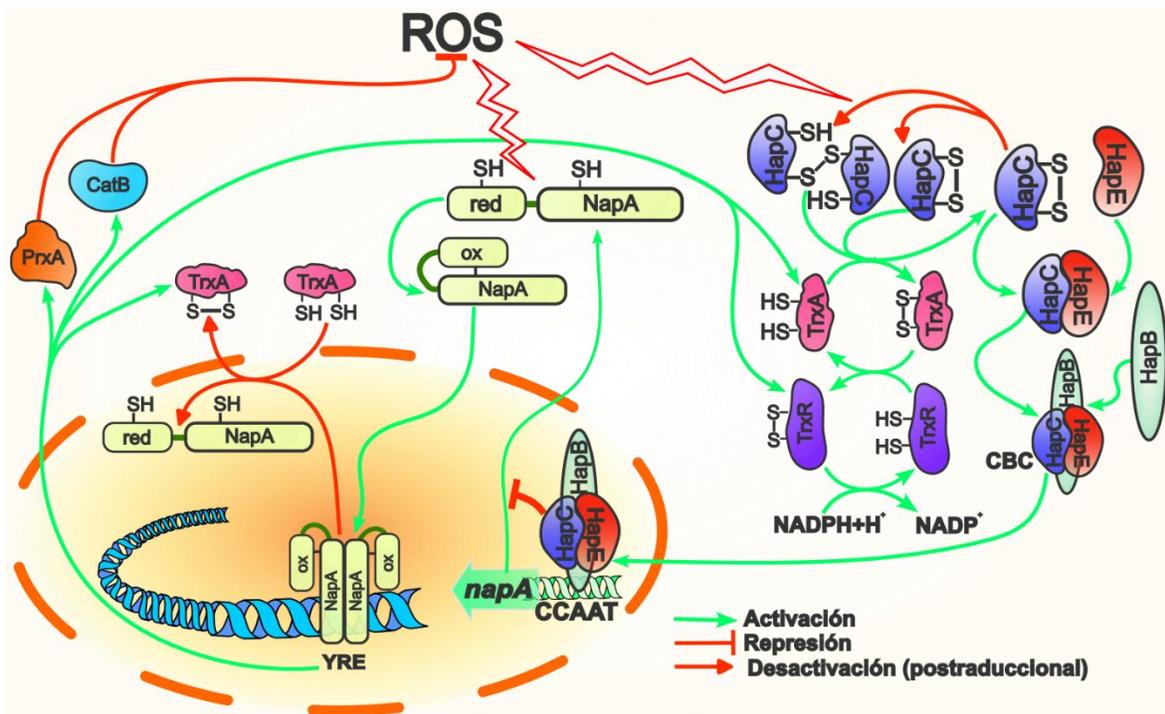


Figura 16. Ilustración de la regulación redox del CBC y la respuesta al estrés oxidativo en *A. nidulans*. El CBC y NapA están controlados por bucles de retroalimentación interconectados. En la ausencia de ROS, el CBC reprime la expresión de *napA*. Las ROS inactivan el CBC mediante la oxidación de HapC, lo que conduce a su retención citoplásmica, y activa a NapA mediante el enmascaramiento oxidativo de su señal de exportación nuclear. Consecuentemente, NapA se transporta al núcleo e induce la expresión de *napA* y los genes diana de NapA (*txrA*, *txrR*, *prxA* y *catB*) por medio de la unión a elementos sensibles a Yap (YRE). La respuesta a ROS desencadena la activación del sistema de tiorredoxina (TrxA/TrxR) que conduce a la inactivación de la actividad de NapA mediante la reducción y exportación nuclear. Simultáneamente, el CBC se reactiva mediante la reducción de HapC oxidado y subsecuentemente, se transporta piggy-back al núcleo mediante HapB. Modificado de Hortschansky, 2016.

19. Importancia de la bioinformática como herramienta para el análisis de la regulación de la expresión génica y de la interacción de proteínas

19.1 Análisis genómico de cajas reguladoras de la transcripción en promotores

Las regiones promotoras contienen patrones/cajas identificadas a menudo en genes coexpresados, los cuales pueden estar funcionalmente corregulados. En este sentido, se piensa que los mismos patrones reguladores no pueden existir en grupos de genes expresados de manera opuesta. También se espera que estos patrones sean sobrerrepresentados en promotores de un grupo de genes y subrepresentado en otro. La expresión de genes depende básicamente de dos mecanismos. El primero implica la remodelación de la cromatina, controlando la localización y accesibilidad de los genes (Meyer, 2001), mientras que el segundo se encarga de regular genes mediante la identificación de patrones/cajas dentro de regiones promotoras (Qiu, 2003). Por lo tanto, en un conjunto de genes similarmente expresados y distantemente localizados, es más probable que la regulación sea gobernada por factores de transcripción mediante una vía de identificación de patrones/cajas que por remodelación de la cromatina.

La metodología general para la identificación de genes posiblemente regulados por el complejo Hap es la siguiente: I) extracción de secuencias promotoras a partir del genoma de *P. chrysogenum*, II) identificación de la secuencia CCAAT dentro de los promotores, III) identificación de otros patrones sobrerrepresentados en este grupo de promotores y analizar su relación con CCAAT, IV) identificación de genes posiblemente corregulados por el complejo HAP, V) caracterización funcional de este grupo de genes para determinar funciones, procesos y vías de señalización reguladas en *P. chrysogenum*, y VI) finalmente, ligar la presencia de la caja CCAAT, otros patrones sobrerrepresentados, el grupo de genes que portan estas secuencias, la funcionalidad de los genes y el complejo HAP para crear hipótesis

19.2. Modelos de homología de las subunidades Hap de *P. chrysogenum*

Se entiende que la estructura molecular de las proteínas determina la función biológica, lo que ha motivado la determinación experimental de las estructuras proteicas, al proporcionar información valiosa sobre la función molecular. Esto permite un diseño efectivo de

experimentos como la mutagénesis dirigida, estudios de mutaciones relacionadas con enfermedades o el diseño de inhibidores específicos. Actualmente, se han logrado avances en el campo de la dilucidación experimental de estructuras por cristalografía de rayos X y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), sin embargo, estas técnicas consumen mucho tiempo, además de ser costosas y tener dificultades técnicas asociadas; el éxito del experimento no está garantizado (Schwede y col., 2003; Leman y col., 2020).

A la fecha, más de 195 000 estructuras proteicas experimentales se han depositado en el Banco de Datos de Proteínas (PDB, por sus siglas en inglés). Sin embargo, este número es bajo comparado con el número de secuencias de proteínas conocidas, más de 226 770 000 entradas en la base de datos de TrEMBL. Es decir, sólo el 0.086% de estas se han dilucidado vía experimental. Debido a lo anterior, el modelado, diseño y acoplamiento macromolecular computacional ha generado mucho interés en los años recientes. Entre los enfoques teóricos actuales, el modelado comparativo es un método que puede generar de manera confiable una estructura 3D de la proteína objetivo a partir de su secuencia de aminoácidos. Para una construcción eficiente, es necesario al menos una estructura 3D resuelta experimentalmente, con una alta similitud entre secuencia molde y la secuencia objetivo (Brenner, 2001; Tramontano y col., 2001; Schwede y col., 2003).

Un servidor muy útil, es SWISS-MODEL, que realiza un modelado automatizado y fácil de usar. Está diseñado, en el caso más simple, para trabajar con sólo una secuencia de aminoácidos de la proteína objetivo. En el presente trabajo, se utilizó este servidor para la construcción de los modelos de homología de las subunidades del complejo Hap de *P. nidulans*.

19.3. Análisis de interacción proteína-proteína mediante Docking

Las interacciones moleculares, incluyendo proteína-proteína, enzima-sustrato, proteína-ácidos nucleicos y proteína-fármacos, juegan un papel importante en múltiples procesos biológicos, tales como la transducción de señales, transporte, diferenciación celular, expresión de genes, inhibición de enzimas, reconocimiento antígeno-anticuerpo, incluso el ensamblaje de proteínas multidominio (Jones y col., 1999; Gurung y col., 2017). Estas interacciones conllevan a la formación de complejos estables esenciales para realizar sus

funciones biológicas y el conocimiento de la estructura de las proteínas es importante para comprender su mecanismo de interacción. Muchas estructuras con interacciones proteína-proteína se han depositado en PDB, sin embargo, el número es menor comparado con la cantidad de estructuras proteicas individuales. La estructura terciaria de las proteínas es necesaria para conocer el modo de unión y afinidad entre la interacción de las moléculas. Sin embargo, a menudo es difícil y costoso obtener estructuras complejas por métodos experimentales, tales como rayos X, cristalografía o resonancia magnética nuclear. Por esta razón, el *docking* computacional es considerado un importante enfoque para conocer las interacciones proteína-proteína o proteína-ligando. Como tal, el docking molecular, predice computacionalmente las interacciones entre dos moléculas, y ha desempeñado un papel importante en la obtención de estructuras más complejas. Conceptualmente, el *docking* molecular hace referencia a la predicción de un complejo proteína-proteína a partir de las estructuras individuales de las proteínas (Vakser, 2014; Yan y col., 2020). Este utiliza las estructuras individuales de dos moléculas de interés y el acoplamiento molecular muestra los sitios de unión putativos por medio de un algoritmo de búsqueda y los evalúa en función de una puntuación de energía. Luego, estos sitios se clasifican de acuerdo con sus puntajes de energía de enlace, en los que los modelos mejor calificados se seleccionan como las estructuras predichas (Huang, 2014; Yan y col., 2020).

HDOCK es un servidor especializado para realizar el acoplamiento proteína-proteína, que combina el modelado basado en plantillas y el acoplamiento *ab initio* sin plantilla. El servidor incorpora automáticamente la información de la interfaz de unión de PDB y/o la información biológica de entrada del usuario. Además, también permite el acoplamiento proteína-RNA/DNA, un área relativamente nueva de acoplamiento molecular (Yan y col., 2017). En el presente trabajo se usará este servidor para realizar el acoplamiento de las subunidades de Hap de *P. chrysogenum* y la interacción con la secuencia CCAAT.

PDBsum es un servidor que proporciona información resumida sobre cada modelo estructural determinado experimentalmente en PDB. Es útil porque permite crear figuras de los acoplamientos, que permiten una mejor visualización de la información, así como la

obtención de los diagramas de topología e interacciones proteína-proteína (Laskowski, 2008). El servidor, además, acepta los archivos propios en formato PDB, para generar un conjunto de análisis privado para cada estructura generada, sea obtenida experimentalmente o por modelados computacionales. En el presente trabajo se usó para la obtención de los diagramas de interacciones de los acoplamientos realizados para las subunidades Hap, dado que es muy rápido, fácil de usar y flexible, comparado con el método manual realizado en PyMOL.

III. Justificación

Penicillium chrysogenum es un hongo filamentoso de gran importancia biotecnológica. Se usa a nivel industrial en la producción del antibiótico penicilina. Además, se están desarrollando cepas que permiten la producción de otros metabolitos mediante técnicas de biología sintética para la expresión de clústeres de genes heterólogos. Por otro lado, este hongo es un modelo para el estudio de la regulación del metabolismo secundario y otros procesos celulares importantes típicos de los hongos filamentosos.

Las cajas reguladoras CCAAT son abundantes en los promotores de los genes de células eucariotas. En los hongos filamentosos se ha caracterizado en especies del género *Aspergillus* el complejo regulador de la transcripción HAP, uno de cuyos integrantes es la proteína HapC. El complejo HAP regula diversos procesos celulares y, en concreto, se ha caracterizado su papel en la regulación de la expresión de los genes de penicilina en *A. nidulans*.

En *P. chrysogenum* están presentes varias cajas reguladoras CCAAT en los promotores de los genes biosintéticos de penicilina *pcbAB*, *pcbC* y *penDE*. En estudios previos se ha comprobado la funcionalidad de algunas de estas cajas para la expresión de los genes correspondientes. El interés de este proyecto radica en corroborar que el complejo HAP de *P. chrysogenum* regula la expresión de los genes de penicilina, para lo cual se silenciará la proteína codificada por el gen *hapC*, la cual es indispensable para la formación del complejo HAP, y se analizará el fenotipo resultante de dicho silenciamiento.

IV. Hipótesis

La proteína HapC de *Penicillium chrysogenum* forma parte del complejo HAP de unión a cajas CCAAT y participa en la regulación de la expresión de los genes de penicilina, de modo que su silenciamiento por RNAi provocará una reducción en los niveles de producción de dicho antibiótico.

V. Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto del silenciamiento mediante RNAi del gen codificante de la proteína HapC de *Penicillium chrysogenum* y su posible participación en la regulación de la biosíntesis de penicilina.

Objetivos particulares

- Silenciar mediante RNAi la expresión de la proteína HapC.
- Caracterizar fenotípicamente las mutantes silenciadas de HapC en aspectos como la resistencia a estrés y producción de penicilina.
- Análisis *in-silico* de la presencia de cajas CCAAT en promotores de *P. chrysogenum* a nivel genómico y análisis de enriquecimiento (gene ontology, pathways) de los genes con presencia de dichas cajas en sus promotores.
- Análisis *in-silico* de docking proteína-proteína de HapC con otras proteínas que forman el complejo regulador transcripcional HAP.
- Análisis *in-silico* de docking proteína del complejo regulador transcripcional Hap con DNA que contiene una caja CCAAT.

VI. Desarrollo experimental

1. Microorganismos

- *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255, reidentificada como *Penicillium rubens*, usada como cepa para experimentos de transformación; obtenida por mutación y selección de la cepa *P. chrysogenum* NRRL 1951 (López-Nieto y col., 1985; Cantoral y col., 1987; 1993; Díez y col., 1987), esta cepa posee una sola copia de la agrupación de genes biosintéticos de penicilina.
- *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 con el plásmido pGdpPki-RNAi/hapC integrado en el DNA cromosómico.

Cuadro 5. Cepas usadas de *P. chrysogenum*

Cepas control:
<i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255
<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi
Cepas <i>HapC</i> silenciadas:
<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi/hapC1
<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi/hapC6

- *Micrococcus luteus* ATCC-9341 (Álvarez y col., 1987) bacteria Gram positiva de la familia de las Micrococcaceae, usada como cepa de valoración contra penicilina G en bioensayos.

2. Vector de silenciamiento pGdpki-RNAi/HapC y transformación

Vector que contiene los promotores de los genes *gdp* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y *pki* (piruvato cinasa) enfrentados y separados por un sitio de restricción *NcoI*. Incluye una cassette de resistencia a fleomicina (Pgdh::ble::Tcyc) y el gen de resistencia a ampicilina (Quino, 2011), posteriormente se añadió parte de la secuencia del gen *hapC* para generar las cepas silenciadas de *HapC*, obteniéndose la construcción ***pGdpki-RNAi/hapC***.

Se transformó la cepa Wisconsin 54-1255 por medio de protoplastos y se seleccionaron por resistencia a fleomicina.

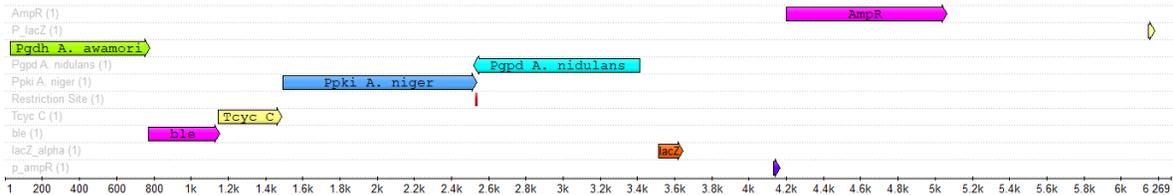
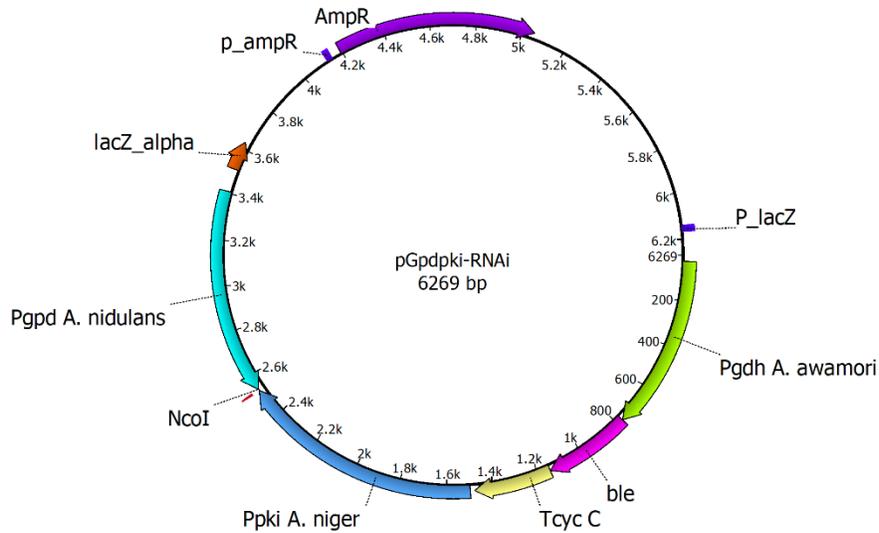


Figura 17. Mapa del plásmido pGdpPki-RNAi.

3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo usado fueron los siguientes:

- Medio Power
- Medio PMMY
- Medio MCFP
- Medio MCIP
- Medio TSB

Para más información consultar el **Anexo I**.

4. Confirmación de la inserción del plásmido pGdpPki-RNAi/HapC en el DNA genómico por PCR de punto final

En un trabajo previo realizado en el mismo grupo de trabajo, se construyó el plásmido de atenuación pGdpPki-RNAi/hapC, y se transformó por protoplastos a *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, aquí se describe brevemente la metodología usada: se realizó la selección de transformantes por resistencia al antibiótico (fleomicina); con un lote de

transformantes homocariontes seleccionados, posteriormente se confirmó la inserción del plásmido en el genoma por PCR de punto final.

La extracción de DNA genómico a partir de micelio de 72 horas de crecimiento de las cepas control: *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y *P. chrysogenum* pGdpki-RNAi, así como del lote de atenuados con el plásmido pGdpki-RNAi/hapC.

Se verificó la calidad del DNA genómico en una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se prepararon las mezclas de PCR con 50 ng de DNA genómico y los oligonucleótidos:

Pki1(gpd1)F: TCTCTCTTCTCTCGCTCAC

Gpd1(pki1)R: TACTCCATCCTTCCCATCC

Se usó la enzima *Taq* DNA polimerasa para la amplificación con una temperatura de hibridación de 60°C y 1 minuto de extensión.

Las reacciones de PCR se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1% esperando los siguiente:

- DNA cepa control (-) *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255: sin amplicón
- DNA cepa control (+) Transformante *P. chrysogenum* con pGdpki-RNAi: 251 pb (148 pb promotor *pki* y 103 pb promotor *gpd*)
- Control (+) Plásmido purificado y vacío pGdpki-RNAi: 251 pb
- Cepas atenuadas con plásmido pGdpki-RNAi/hapC: 705 pb (251 pb de promotores + 454 pb de inserto de atenuación de *hapC*)

En el presente trabajo, se utilizaron las dos cepas identificadas como pGdpki-RNAi/HapC1, pGdpki-RNAi/HapC6. Se la cepa pGdpki-RNAi/HapC2 no se incluyó en los experimentos debido a que presentaba un fenotipo no característico de *P. chrysogenum* (posiblemente una contaminación). Es importante mencionar que los experimentos presentados en este documento, las cepas pGdpki-RNAi/HapC1, pGdpki-RNAi/HapC6 se seleccionaron una segunda vez por resistencia a fleomicina.

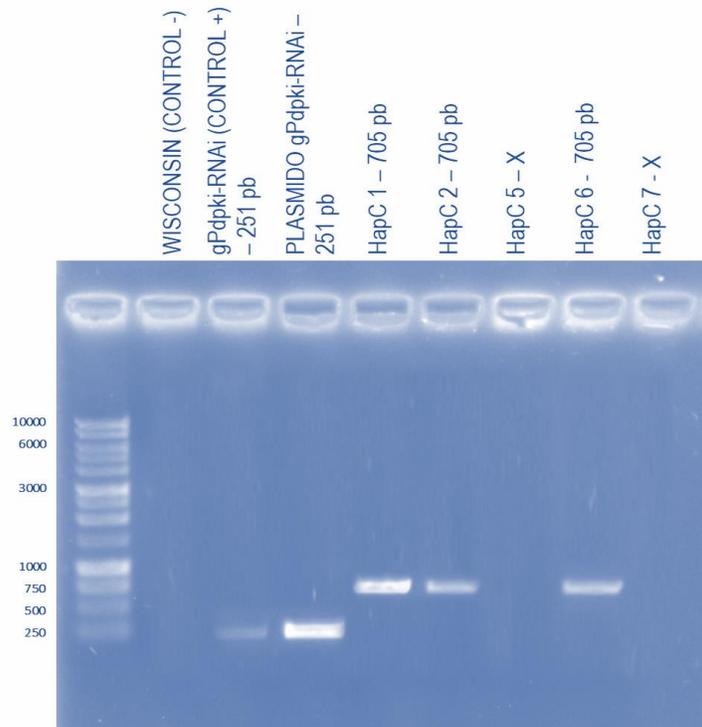


Figura 18 Gel de electroforesis de la inserción del plásmido. Se muestra la amplificación del plásmido pGPgdpKi-RNAi/*hapC* después de realizar la transformación.

5. Colecta de conidios de las cepas silenciadas y cepas control

Las cepas mencionadas se inocularon en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Power a 28°C, hasta observar esporulación visible, que es fácilmente detectada por la presencia de un color verdoso que aparece sobre el micelio. Posteriormente las esporas se colectaron usando aproximadamente 25 mL de solución salina isotónica con Tritón-X 100 al 0.01%; se usaron perlas de vidrio para facilitar el desprendimiento de las esporas y, finalmente, se colectaron en tubos Falcon de 50 mL. Las esporas colectadas se almacenaron en refrigeración a 4°C.

6. Cuenta de conidios

Los tubos Falcon que contienen los conidios se agitaron en vortex, posteriormente se tomaron alícuotas de 10 µL y se llevaron a un volumen final de 500 µL con solución salina isotónica con Tritón-X 100 al 0.01%, se agitó la dilución por medio del vortex, se tomaron 10 microlitros de cada solución y se colocaron en una cámara de Petroff-Hausser para el cálculo del número de conidios por mililitro.

7. Análisis fenotípico de cepas atenuadas de *hapC*

El presente estudio se concentró en estudiar principalmente la viabilidad de las cepas silenciadas, la resistencia a estrés oxidativo en micelio y conidios y la producción específica de penicilina, ya que en estudios realizados en otras especies de hongos se han reportado que el silenciamiento altera estos procesos.

8. Medición de niveles de expresión de cepas atenuadas del gen *hapC* y de mutantes HapC1, HapC2 y HapC6 por qPCR

Se realizó la medición de los niveles de expresión de las cepas estudiadas, para esto se extrajo RNA a partir de una muestra de micelio de las cepas, siguiendo el método de Trizol, posteriormente se verificó la integridad y calidad del RNA por electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó la cantidad en lector de microplaca.

La síntesis de cDNA se realizó siguiendo las indicaciones del kit SuperScript III First-Strand (ThermoFisher Scientific). Los oligonucleótidos de prueba fueron:

HapC (Pc14g01630)

AGTGAAGCCTCGGAGAAATG (Sense)

TCTTGAGTGCTTCAGCGTAAT (AntiSense)

El gen de control usado fue Actina (act-gamma Actin Pc20g11630) con los oligonucleótidos:

AGAAGTTGCTGCTCTCGTCA (sense)

CGACAATGGAAGGAAAACA (antisense)

Una vez determinada la temperatura de amplificación idónea (bandas definidas y sin inespecificidades) tanto para el gen de prueba como para el gen control, se procedió a realizar la qPCR siguiendo el protocolo indicado por el kit qPCR iTaq Universal SYBR Green Supermix (BIO-RAD) usando 1 μ L de RNA de una suspensión a 50 ng/ μ L. Las condiciones fueron las siguientes:

Proceso	Condiciones
Desnaturalización inicial	95°C durante 30 s
Desnaturalización	95°C durante 10 s / 40 ciclos
Alineamiento/Extensión	60°C durante 20 s / 40 ciclos
Curva Melt	60°C-95°C

9. Ensayo de viabilidad

Se inocularon 50 conidios por cepa en APD (cajas Petri 90 × 15 mm), se incubaron durante 48 horas a 28°C. Una vez transcurrido el tiempo, se cuentan las UFC y se calcula el porcentaje de viabilidad con la siguiente fórmula:

$$\%Viabilidad = \frac{Colonias\ observadas}{Conidios\ inoculados} * 100\%$$

10. Prueba de estrés oxidativo en conidios

Se toman 100 µL de cuentas controladas 10⁴ conidios/mL y se incuban en 900 µL de H₂O₂ a 150 y 300 mM durante 15 minutos. Posteriormente se inoculan 50 µL de la solución con conidios en APD a 27°C durante 12 horas y, finalmente, se cuentan las UFC.

11. Prueba de estrés oxidativo en micelio

Se prepararon cuentas controladas de 10⁴, 10⁵ y 10⁶ conidios/mL, por duplicado, de cada una de las cepas y se expusieron a H₂O₂, a 100 y 200 mM durante 15 minutos. Posteriormente se inocularon 5 µL en APD (cajas de bioensayo 23 × 23cm) y en medio Power, en condiciones de 28°C por 5 días, se monitoreó el crecimiento diariamente.

12. Producción específica de penicilina

Se realizó una colecta de conidios de cada una de las cepas usadas de *P. chrysogenum*, se inocularon 5x10⁸ conidios en 100 mL de medio MCIP en condiciones de 28°C, 250 rpm por 24 h, después del tiempo, se transfirieron 8 mL del medio con biomasa desarrollada a 50 mL de medio MCFP haciendo un triplicado biológico, se incubó a 28°C y 250 rpm durante 120 h, se tomaron de muestras de 2 mL cada 24 horas.

Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm, t_{amb} durante 10 min y se recuperó el sobrenadante, conservándolo a 4°C para la medición de pH y posteriores bioensayos. La biomasa se lavó por centrifugación con solución salina al 0.9% y HCl 0.1 M, posteriormente se secó en una estufa a 80°C durante 72 horas y se cuantificó su peso seco.

Del medio de cultivo recuperado se tomaron 50 μL por triplicado, en paralelo se realizó de una curva de inhibición del crecimiento por penicilina G (0.1, 0.5, 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por duplicado, la cepa usada es *Micrococcus luteus* ATCC-9341 a una $\text{DO}_{\text{inicial}} = 1$ a 600 nm en TSB que se llevó a una $\text{DO}_{\text{final}} = 0.01$ en 220 mL de medio TSB con 1% de agar bacteriológico vertido en placas de bioensayo.

Se perforaron pocillos en placas de bioensayo con un sacabocados de 0.8 mm de diámetro. A cada muestra de medio de cultivo se le agregaron 60 μL , por triplicado además de 60 μL por duplicado de la curva de penicilina G, las placas se refrigeraron a 4°C durante 2 horas para permitir que el antibiótico difunda en el medio de cultivo y posteriormente se incubaron de 12-15 horas a 30°C. Finalmente se midieron los halos de inhibición y se calculó la producción específica de penicilina.

Es importante mencionar que la cepa de valoración (*M. luteus* ATCC-9341) se inoculó en TSB para el aislamiento de la colonia a usar y en medio TSB para la obtención de biomasa (1 colonia aislada en 30 mL de TSB a 30°C y 200 rpm durante ~12 h), para los bioensayos se ocupó TSB con 1.1% de agar bacteriológico en el medio de cultivo para permitir la difusión del medio de cultivo a probar. Las placas se incubaron a 30°C durante ~12 h.

13. Cinética de conidiación

Se siguió la siguiente metodología para el estudio de cinética de conidiación de las cepas *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, pGPgdpKi-RNAi, pGPgdpKi-RNAi/hapC1 y pGPgdpKi-RNAi/ hapC6:

Se propagaron 25 μL de una cuenta controlada de 1×10^6 conidios/mL sobre la superficie de placas Petri de 60×15 mm con medio PDA. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 5 días, el muestreo se realizó diariamente, para ello se extrajeron 5 cilindros de 0.8 mm de diámetro por duplicado, los cilindros se depositaron en tubos Falcon con 15 mL de solución salina + Tritón X-100 al 0.01%, posteriormente se agitó en Vortex durante 1 min y se tomaron alícuotas para realizar el conteo.

14. Análisis bioinformático

14.1. Búsqueda de genes regulados por el complejo HAP (análisis de cajas CCAAT)

La búsqueda de los genes regulados transcripcionalmente por el complejo Hap se realizó utilizando las secuencias promotoras de los genes que conforman el genoma de *P. chrysogenum*, mediante el lenguaje de programación de Python 3.8 y a través de un entorno interactivo, denominado Jupyter notebook. Se utilizó el patrón de búsqueda CCAAT, acotado por los siguientes parámetros:

- Bases contiguas corriente arriba y corriente abajo de la caja CCAAT (400 pb aproximadamente).

Los datos de los genes posiblemente regulados transcripcionalmente por el complejo HAP fueron sometidos a un análisis de ontología genética con información disponible en KEGG, posteriormente se aplicó el método del factor de abundancia espectral normalizada (NSAF, por sus siglas en inglés), NSAF se usa para enriquecer abundancias de proteínas en mezclas complejas tomando en cuenta el tamaño de la proteína y la variabilidad entre corridas, con el fin de que las proteínas más grandes generen más recuentos espectrales que las proteínas pequeñas (Washburn y col., 2001; Liu y col., 2004; Powell y col., 2004; Zybilov y col., 2006; McIlwain y col., 2012).

El algoritmo usado se define como:

$$NSAF_N = \frac{\frac{S_N}{L_N}}{\sum_{i=1}^n \left(\frac{S_i}{L_i}\right)}$$

Donde N es el índice de la proteína, S_N es el número de espectro vinculado a la proteína N, L_N es la longitud de la proteína N y n es el número total de proteínas presentes.

Con el fin de enriquecer los datos obtenidos de los genes que cuentan con cajas CCAAT en sus promotores, los términos del algoritmo se modificaron obteniendo que: N es la vía específica, S_N es el número de genes con cajas CCAAT vinculados a la vía específica N, L_N es el número total de genes en el genoma vinculados a la vía N y n es el número total de genes que conforman el genoma.

14.2. Construcción de modelos de homología

14.2.1. Búsqueda de plantillas

Dado que el complejo HAP consta de tres subunidades diferentes (HapB, HapC y HapE), a cada una de las subunidades se les construyó un modelo de homología utilizando el servidor. La búsqueda de plantillas se realizó en la biblioteca de *SWISS-MODEL* (SMTL, última actualización: 2022-08-31, última versión de PDB incluida: 2022-08-26) cuyos moldes seleccionados fueron las subunidades del complejo homólogo de *Aspergillus nidulans* (sus subunidades se cristalizaron anteriormente por otro grupo de trabajo y están depositadas en PDB con la clave 4G92).

14.2.2. Construcción de modelos

Los modelos se construyeron con base en la alineación de la plantilla blanco utilizando ProMod3 (Studer y col., 2021) versión 3.2.1. Las coordenadas que se conservan entre la secuencia de prueba y la plantilla se copiaron de la plantilla modelo. Las inserciones y eliminaciones se remodelaron mediante una biblioteca de fragmentos. Las cadenas laterales se reconstruyeron. Finalmente, la geometría del modelo resultante se regularizó mediante el uso de un campo de fuerza.

14.2.3. Estimación de la calidad del modelo

GMQE y QMEANDisCo global dan una medición general de la calidad del modelo entre 0 y 1, con números más altos que indican una mayor calidad esperada. GMQE depende de la cobertura, es decir, es poco probable que un modelo que cubra solo la mitad de la secuencia objetivo obtenga una puntuación superior a 0.5. QMEANDisCo, por otro lado, evalúa el modelo 'tal cual' sin dependencia explícita de la cobertura.

La calidad global del modelo completo y por residuos se han evaluado utilizando la función de puntuación QMEAN (Studer y col., 2020 y 2021). En el presente trabajo no se abordará a profundidad la explicación de estos parámetros, debido a que se requieren conocimientos altos en biología estructural, para más información consultar <https://swissmodel.expasy.org/docs/help#GMQE>

El análisis de la puntuación **Z de QMEAN** (Benkert y col., 2011) está en desuso y las puntuaciones globales de GMQE y QMEANDisCo deben consultarse para obtener estimaciones de calidad del modelo global. Se basa en cuatro potenciales estadísticos de la fuerza media y su combinación lineal: la puntuación "QMEAN". Todas las puntuaciones, 5 en total, se comparan con lo que uno esperaría de estructuras determinadas experimentalmente de tamaño similar utilizando puntuaciones Z. En otras palabras: ¿Cuántas desviaciones estándar de la media es el puntaje del modelo dada una distribución de puntaje de un gran conjunto de estructuras determinadas experimentalmente? Por lo tanto, las puntuaciones Z alrededor de 0,0 reflejan una estructura "nativa" y, como regla general, una puntuación Z "QMEAN" por debajo de -4,0 indica un modelo con baja calidad.

14.3. Docking proteína-proteína y proteína-DNA

Paralelamente se construyó un docking proteína-proteína de las unidades de prueba y de los moldes, con el fin de comparar los modelos obtenidos por los distintos métodos. Las subunidades utilizadas son las siguientes:

Subunidad de <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	Identificador UniProt/ AlphaFold2	Unidad comparativa de <i>Aspergillus nidulans</i> (Nombre/identificador UniProt/longitud del templado)
HapB	B6GZ32 · B6GZ32_PENRW/ AF-B6GZ32-F1	HapB /P87249/64 aa
HapC	B6H5Z1 · B6H5Z1_PENRW/ AF-B6H5Z1-F1	HapC /Q5B5Z6/92 aa
HapE	B6GY78 · B6GY78_PENRW/ AF-B6GY78-F1	HapE /C8V0B5/119 aa

Una vez obtenidos los modelos de homología, se procedió a realizar el acoplamiento molecular de las tres subunidades HapB, HapC y HapE de *P. chrysogenum*, los acoplamientos se realizaron en el servidor HDOCK (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>). Cabe mencionar que también se procesaron con los softwares libres ClusPro, Path y Hex Protein Docking. Sin embargo, finalmente se optó por HDOCK debido a la velocidad del servidor y los resultados similares al complejo de *A. nidulans* cristalizado, además de que permite el acoplamiento con RNA-DNA. No fue necesario especificar las interacciones y distancias entre las subunidades del molde, debido a que se obtuvo una estructura similar a la del

complejo cristalizado. Es importante señalar que el servidor utilizó como molde para la interacción HapC:HapE el mismo que se utilizó para la construcción de modelos de homología de las subunidades.

El docking proteína-DNA se realizó en HDOCK, utilizando el mismo fragmento de DNA que fue usado junto con el complejo de *A. nidulans*, cuya clave en PDB es 4G92 y, finalmente, se analizó el modelo obtenido del acoplamiento mediante el servidor PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>).

VII. Resultados y discusión

El presente trabajo se realizó a fin de estudiar la funcionalidad del complejo Hap de *P. chrysogenum* sobre la biosíntesis de penicilina. Adicionalmente, se estudió el proceso de conidiación, viabilidad y la tolerancia a estrés oxidante, además se observó la morfología macroscópica y microscópica resultante.

Para un mejor entendimiento, los resultados se dividen en seis secciones: **I)** Morfología macroscópica y microscópica, **II)** Expresión del gen *hapC*, **III)** Producción específica de penicilina, **IV)** Cinética de conidiación, **V)** Viabilidad y resistencia a estrés oxidante y **VI)** análisis bioinformáticos (Búsqueda de genes regulados por el complejo Hap y docking).

1. Morfología macroscópica y microscópica

Las cepas control en medio APD muestran un crecimiento algodonoso con color de micelio blanco, y en el centro se observa una pigmentación verdosa debido al color de las esporas. Además, excreta al medio un pigmento de color amarillento. Las cepas silenciadas muestran un fenotipo macroscópico muy similar, el pigmento amarillento también es producido, pero con mayor intensidad (**Figuras 19 y 20**).

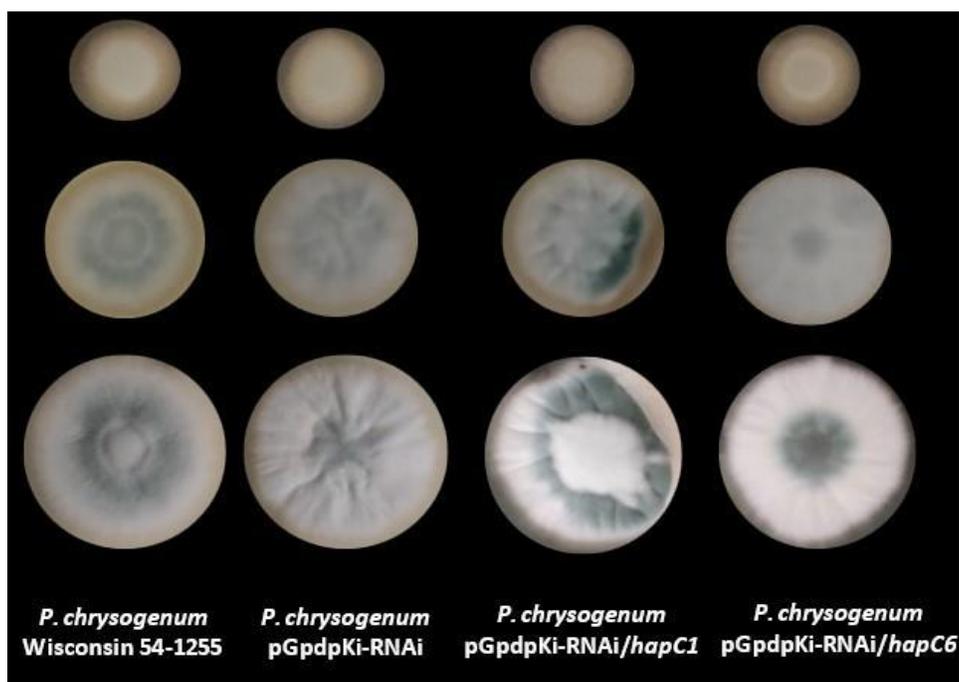


Figura 19. Morfología macroscópica de las cepas control y cepas mutantes en APD.

Para todas las cepas observadas con un aumento de 10x, se aprecia biomasa con pigmentación blanca en el día 2; el crecimiento es muy homogéneo durante los tiempos de incubación y a partir del día 3 se puede observar al micelio extenderse en el medio. Para el día 4 es visible la aparición de la coloración verde debida a los conidiación, sobre todo en la cepa pGdpKi-RNAi.

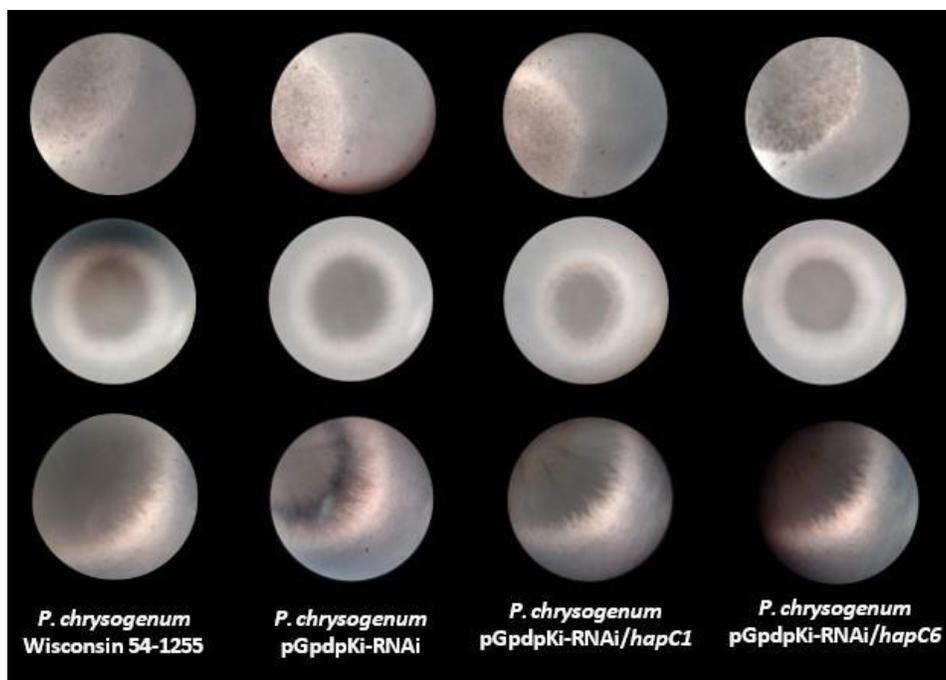


Figura 20. Morfología macroscópica de las cepas control y cepas mutantes en APD observadas en un estereoscopio a 10x.

2. Expresión del gen *hapC*

2.1 Extracción de RNA y Síntesis de cDNA

Se obtuvo RNA a partir de micelio a las 48 horas de cultivo. El resultado de la extracción se visualizó en una electroforesis en gel de agarosa, posteriormente se cuantificó para asegurar que se obtuvo en cantidad y calidad, ver **Anexo III**. La síntesis de cDNA se realizó con éxito obteniéndose de igual manera en cantidad y calidad, ver **Anexo IV**. El cDNA se estandarizó a 50 ng/mL y se realizó la PCR en tiempo real para la cuantificación relativa.

2.2 Niveles de expresión del gen *hapC* por PCR en tiempo real

En la **Figura 21** se muestran los resultados obtenidos en la PCR en tiempo real. Es evidente que la cepa Wisconsin 54-1255 y la cepa control pGdpki-RNAi no muestran diferencias en cuanto a la expresión del gen *hapC*, mientras que las cepas que tienen el vector con el fragmento de silenciamiento muestran una expresión relativa disminuida en ~80% con respecto a la cepa Wisconsin 54-1255. Las expresiones relativas de las cepas silenciadas pGdpki-RNAi/*hapC1* y pGdpki-RNAi/*hapC6* son de 0.109 y 0.165 respectivamente.

Es difícil predecir una diferencia en los fenotipos entre las cepas silenciadas, ya que su expresión varía en un 5.6%, pero es posible pronosticar un fenotipo distinto de estas con respecto a las cepas control. De acuerdo con lo reportado en otras especies de hongos, se esperan disminuidos los procesos de producción de penicilina, esporulación, viabilidad y resistencia a estrés oxidante.

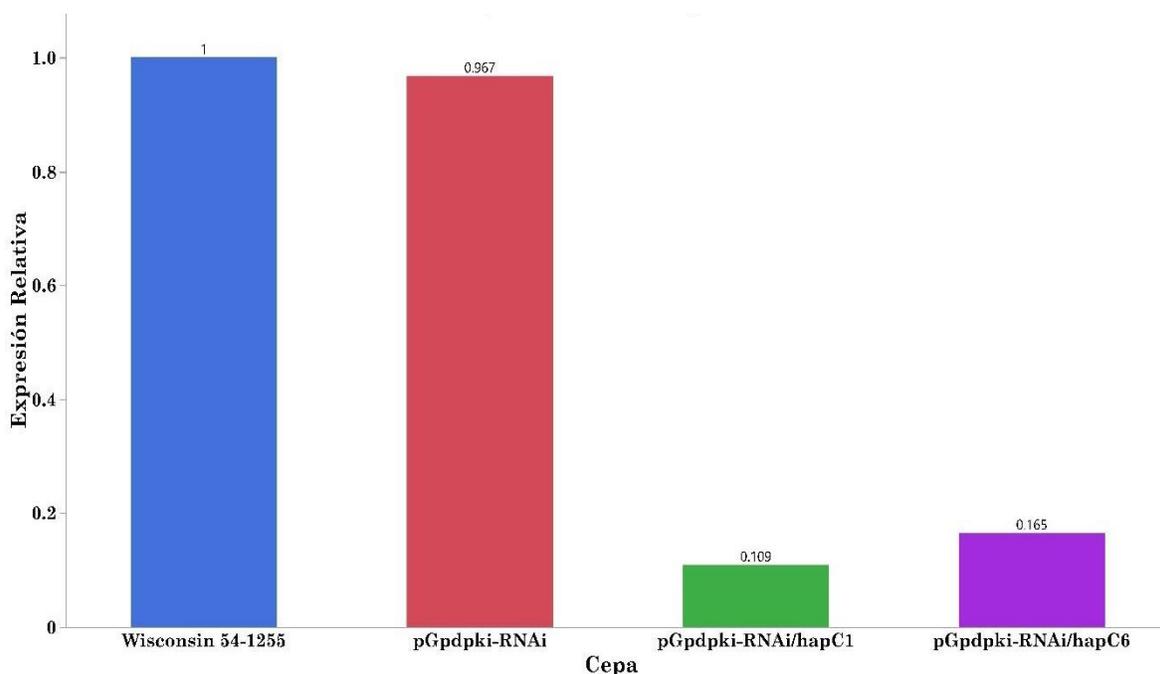


Figura 21. Gráfica de barras de la expresión relativa del gen *hapC* de las cepas de *P. chrysogenum* transformadas con el vector pGdpki-RNAi y pGdpki-RNAi/*hapC* con respecto a Wisconsin 54-1255.

3. Producción específica de penicilina

En la **Figura 22** se muestra la producción específica de penicilina. Las curvas temporales de las cepas control Wisconsin 54-1255 y pGPgdpKi-RNAi, muestran diferencias significativas en su producción de los días 1 al 4. Lo anterior puede deberse a la naturaleza del plásmido, ya que su integración es ectópica (por consiguiente, es posible que se alteren o activen procesos metabólicos distintos durante su crecimiento). La producción de penicilina después del quinto día no difiere significativamente, siendo de 0.702 y 0.770 μg de penicilina por mg de biomasa seca, respectivamente. Por otro lado, las cepas silenciadas pGpdpki-RNAi/hapC1 y pGpdpki-RNAi/hapC6 muestran una producción significativamente disminuida durante el tiempo de cultivo con respecto a las cepas control y en su quinto día de cultivo producen 68.66% y 31.34% menos penicilina, respectivamente, que la cepa Wisconsin 54-1255.

Es importante mencionar que las cepas silenciadas producen una cantidad de antibiótico significativamente diferente durante el cultivo, siendo menor la de la cepa pGpdpki-RNAi/hapC1. Esto es consistente con los resultados del apartado anterior, por lo que una menor expresión del complejo Hap implicaría una menor producción de penicilina.

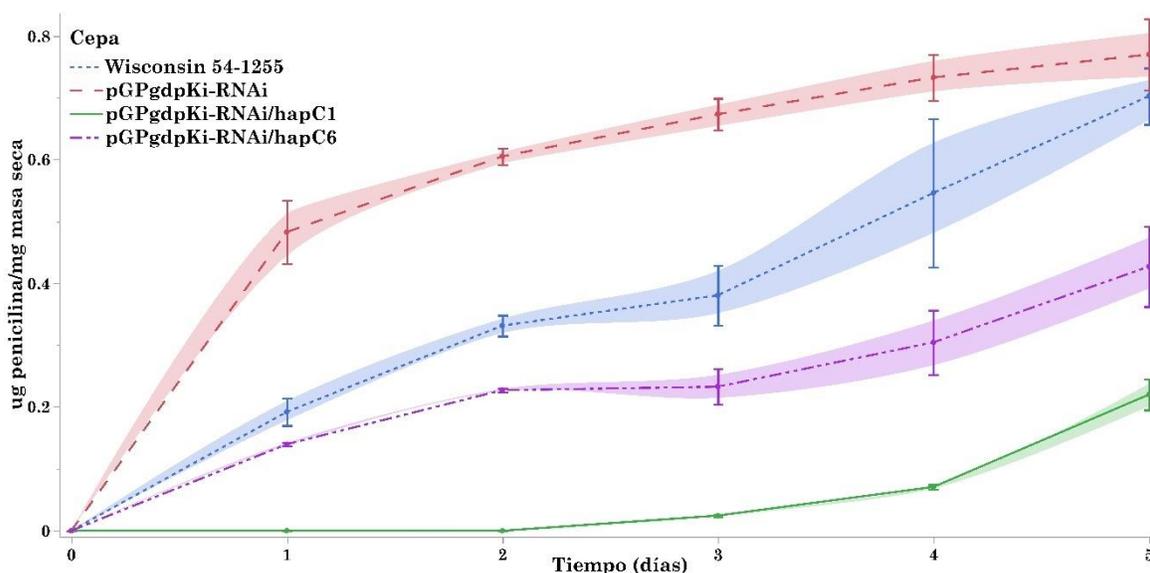


Figura 22. Curva temporal de producción específica de penicilina, se usó el método de alisado por media móvil con un Bootstrap de confianza de 300, los intervalos de confianza se construyeron usando un $\alpha=0.05$.

4. Cinética de conidiación

Los resultados obtenidos de la cinética de conidiación se muestran en la **Figura 23**. En ella se observa que ocurre algo similar a lo que ocurre en el caso de la producción específica de penicilina: las cepas control difieren significativamente en la producción de esporas del día 1 al 4, pero no así en su quinto día. Mientras que las cepas silenciadas muestran en todo momento una menor producción de esporas con respecto a las cepas control.

La producción de esporas por pGdpki-RNAi/*hapC1* del día 0 al 3 es menor a las otras cepas, y gráficamente es difícil observar su producción. Sin embargo, al cuarto y quinto día la producción aumenta exponencialmente y es significativamente superior a la producción de esporas por la cepa pGdpki-RNAi/*hapC6*, aunque manteniéndose por debajo de las cepas control. Esto podría ser indicativo de que existe un umbral de concentración del complejo, y si no se supera el umbral, el hongo prefiere la esporulación al crecimiento, quizá en espera de condiciones favorables que le permitan compensar el silenciamiento (aunque esto es mera especulación). Lo evidente es que el silenciamiento causa una disminución de la conidiación.

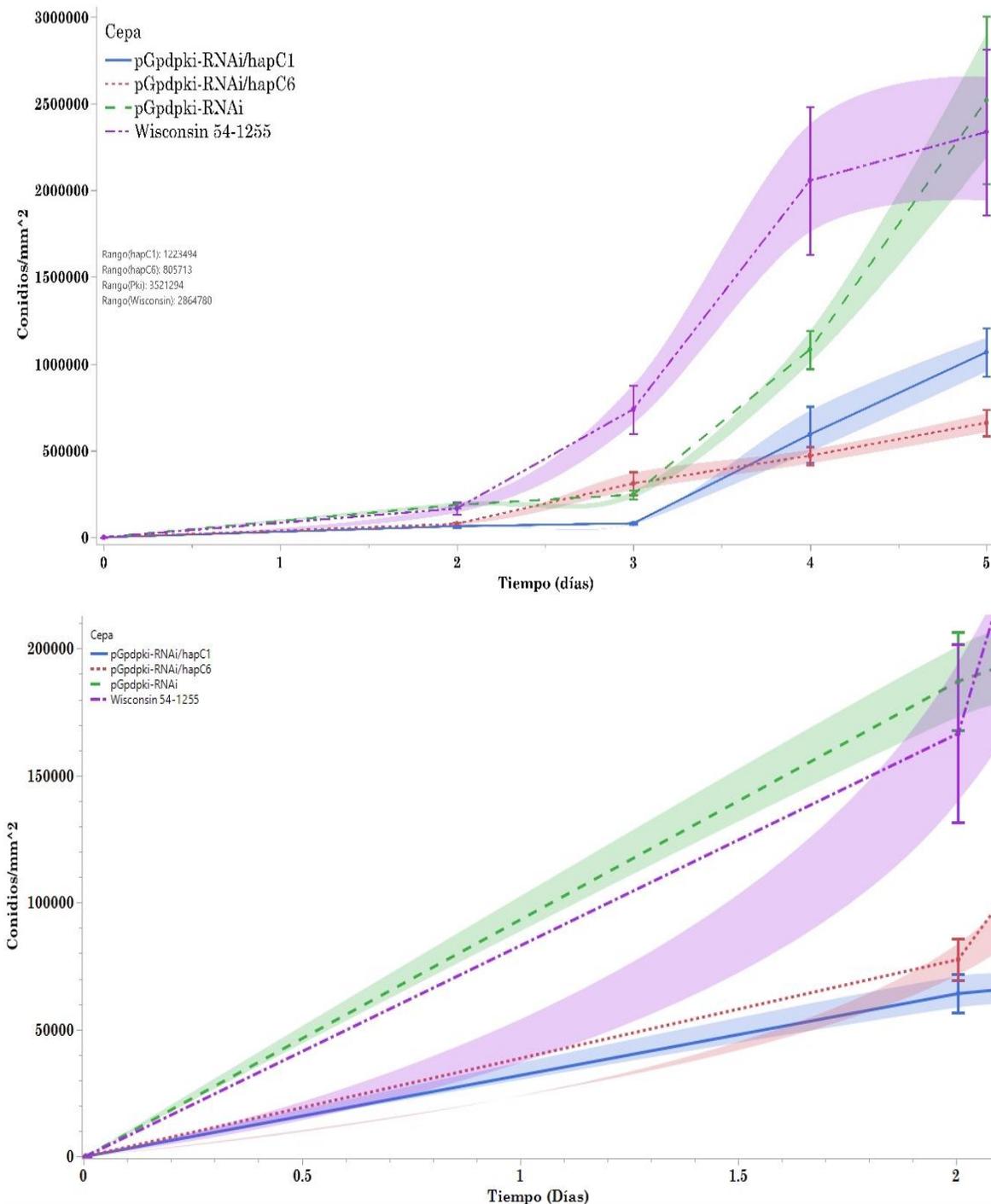


Figura 23. Cinética de conidiación. I) Se muestra el gráfico completo de la cinética **II)** Ampliación de los días 0-2. En ambos gráficos se usó el método de alisado por media móvil con un bootstrap de confianza de 300, los intervalos de confianza se construyeron usando un $\alpha=0.05$.

5. Viabilidad y resistencia a estrés oxidante

5.1 Viabilidad

Los resultados obtenidos del bioensayo de viabilidad muestran que no hay diferencia significativa entre las cepas control Wisconsin 54-1255 (**92.5%**) y pGPgdpKi-RNAi (**90.67%**), pero sí entre las cepas control y las cepas silenciadas, además de que estas son diferentes entre sí. La cepa pGdpki-RNAi/hapC1 presenta la menor viabilidad (**65%**), mientras que la viabilidad de pGdpki-RNAi/hapC6 es superior (**78.5%**) **Figura 24**. Los resultados son acordes a lo esperado y son consistentes con los niveles de expresión de la proteína HapC.

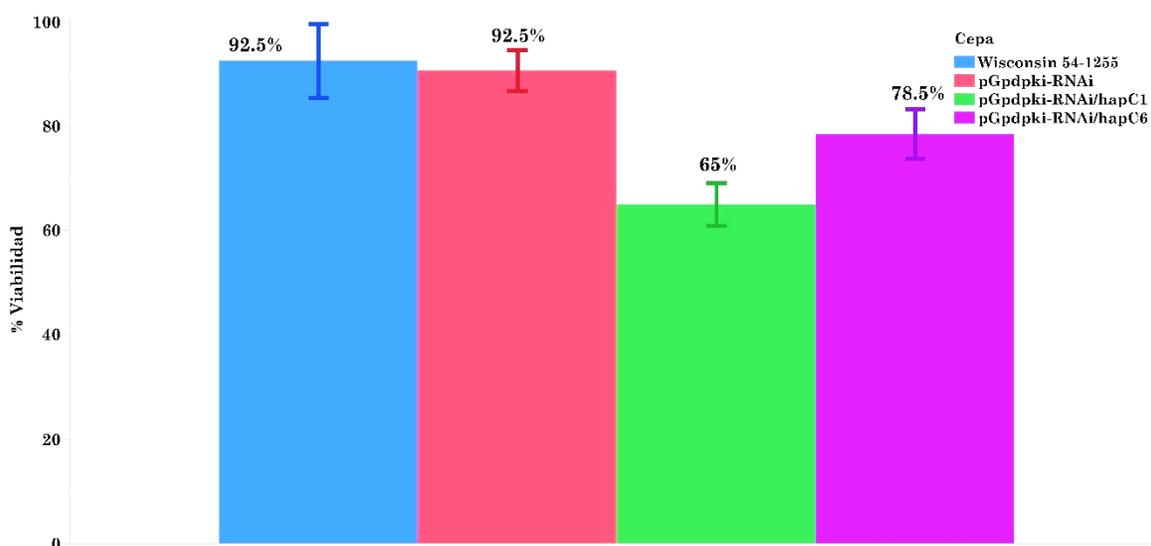


Figura 24. Gráfica de barras con intervalos de confianza del número de conidios a las 12 h de las cepas a expuestas estrés oxidante con H₂O₂ a 150 mM y 300 mM. Los intervalos de confianza se construyeron usando un $\alpha=0.05$.

5.2 Estrés oxidante en conidios

Es importante mencionar que todas las cepas estudiadas disminuyen su germinación conforme aumenta la concentración del agente oxidante (**Figura 25**). La germinación de las cepas Wisconsin 54-1255 y pGPgdpKi-RNAi con H₂O₂ a 150 mM es similar a la que se da en ausencia del agente oxidante. Con 300 mM son afectadas en ~50% con respecto a su propio crecimiento en ausencia de H₂O₂.

Cabe destacar que las cepas silenciadas son afectadas en mayor grado por el agente oxidante: así, la cepa pGdpki-RNAi/hapC1 con 150 mM de H₂O₂ disminuye su germinación en más del 80% con respecto a su control y con 300 mM no se observan UFC (siendo así la más afectada por estas condiciones). La cepa pGdpki-RNAi/hapC6 disminuye su germinación expuesta a 150 mM de H₂O₂ en un porcentaje cercano al 50%, mientras que con 300 mM disminuye su germinación en ~90% respecto de su propio control.

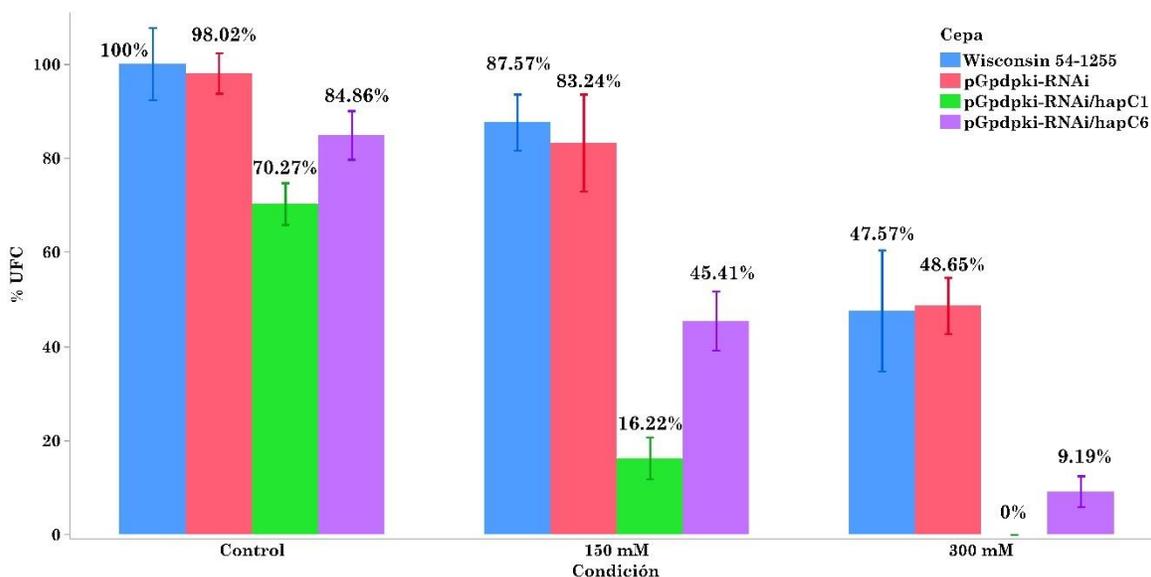


Figura 25. Gráfica de barras con intervalos de confianza del % UFC a las 12 h de las cepas expuestas a estrés oxidante con H₂O₂ a 150 mM y 300 mM. Los intervalos de confianza se construyeron usando un $\alpha=0.05$.

Se adjuntan fotografías de las colonias creciendo sin y con el agente oxidante a las 48 horas de incubación (**Figura 26**). En ellas se visualiza adecuadamente cómo las cepas silenciadas son afectadas en mayor grado en su crecimiento y en su resistencia al estrés oxidante con respecto a las cepas control.

5.3 Estrés oxidante en micelio

En el **Anexo 6** se adjuntan los resultados de este bioensayo. No se incluye aquí debido a que durante el desarrollo experimental surgieron fallas asociadas a la técnica.



Figura 26. Conidios desarrollados de las cepas de *P. chrysogenum* creciendo en APD y APD + H₂O₂ a 150 y 300 mM a las 48 horas. El contraste de las imágenes fue editado para una mejor apreciación.

Los resultados concuerdan con lo reportado para *A. nidulans*. Papagiannopoulos y col., 1996 reportaron que las cepas delecionadas del gen *hapC* muestran un fenotipo viable, pero de crecimiento lento, y que la deleción de *hap* presenta conidiación deficiente pero normal. Un trabajo complementario realizado por Steidl y col., 1999 menciona y demuestra que, las deleciones de los genes *hapB* y *hapE* forman parte del complejo Hap, por lo que la deleción de cada uno da como resultado el mismo fenotipo que se ve en la cepa con deleción de *hapC* (crecimiento lento).

Por otro lado, Thön y col., 2010, señalaron que el complejo de unión a CCAAT detecta el estado redox de la célula mediante modificaciones oxidativas de los grupos tiol dentro del motivo del pliegue histónico de HapC. En su estudio se reveló que dos residuos de cisteína son indispensables para la formación del subcomplejo HapC:E y la posterior unión de alta afinidad al DNA. Por lo que el HapC oxidado no puede participar en el ensamblaje del complejo, y se mantiene en el citoplasma, pero puede ser reciclado por el sistema de tiorredoxina *in vitro e in vivo*. Además, demostraron que la deleción del gen *hapC* produce una respuesta deteriorada al estrés oxidativo. Es posible que el mecanismo por el que *P. chrysogenum* medie la respuesta al estrés oxidativo mediante la subunidad HapC se encuentre conservado y sea muy similar al de *A. nidulans* (ver **Figura 16**).

Por último, como se muestra en el trabajo de Lizka y col., 1998, las cepas que poseen delecionado el gen *hapC* reducen la producción de penicilina. En este trabajo la cepa silenciada con ese mismo gen de *P. chrysogenum* muestra una disminución significativa en la producción de penicilina. Esto puede correlacionarse fácilmente con las abundantes cajas CCAAT que presenta el clúster de genes de biosíntesis penicilina (ver **Figura 2**).

6. Análisis bioinformático

6.1 Búsqueda de genes regulados por el complejo HAP

Con el fin de identificar la presencia de la caja CCAAT en el genoma de *P. chrysogenum*, se desarrolló un algoritmo bioinformático en Python. En primer lugar, se intentó identificar el patrón degenerado R-R-C-C-A-A-T-M-R en el genoma (donde M es A ó C y R es una purina: [AG][AG]CCAAT[AC][AG], [AG]GCCAAT[AC][AG], [AG][AG]CCAATC[AG],

[AG][AG]CCAAT[AC][AG]C, [AG][AG]CCAAT[AC][AG]CA. Sin embargo, fueron identificados únicamente 602 genes de los 13906 totales. Por lo tanto, se decidió usar el núcleo CCAAT para enriquecer la cantidad de genes encontrados. Tras usar este enfoque se identificaron 8836 genes, dentro de los cuales se incluyen promotores que contienen de 1 a 7 cajas. Entre los genes con promotores con más de 3 cajas se encuentra el gen biosintético *pcbAB*, el cual incluye 4 cajas localizadas en las posiciones a, b, c, d.

La búsqueda se diseñó de tal forma que se pudieran diferenciar regiones intergénicas o regiones fuera de esta región intergénica, es decir, regiones distantes encontradas en genes adyacentes, en la **Imagen 27** se muestra un diagrama dos de dona del porcentaje de abundancia por caja y su ubicación.

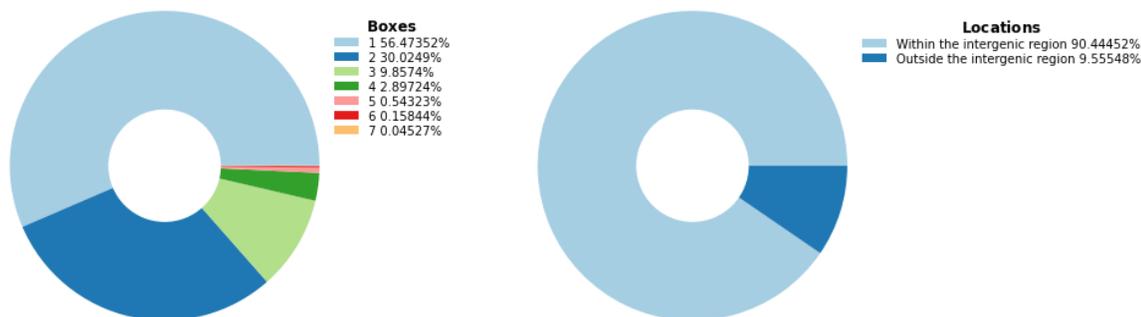


Figura 27. Diagramas de dona, a la izquierda se observa el porcentaje de los promotores por número de cajas CCAAT encontradas y a la derecha la ubicación de estas.

El enfoque NSAF permitió el enriquecimiento de los datos, en la **Cuadro 6** se muestran los 50 principales resultados por abundancia normalizada, y se observa que el número **19** y **39** son genes participantes en la biosíntesis de lisina y el metabolismo de cisteína y metionina respectivamente, también se encontraron genes que participan en la biosíntesis y degradación de valina, leucina e isoleucina (**67** y **71** respectivamente), y en la degradación de lisina (**79**), por otro lado **4, 6, 9, 13, 14, 19, 24, 32, 43** y **47** están implicados en la biosíntesis.

Cuadro 6. Abundancia relativa de genes con enfoque NSAF que contienen promotores con la secuencia CCAAT a 400 pb antes del punto de inicio de la transcripción.

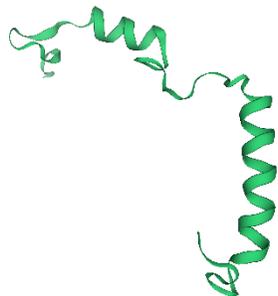
Vía	Encontrados*	Referencia**	NSAF
Sistema de transferencia de azufre	10	11	0.007577
Ciclo de vida viral - VIH-[PATH:pcs03250]	14	16	0.007293
Metabolismo del nitrógeno	19	22	0.007198
Función desconocida	22	26	0.007053
Biosíntesis de ácidos grasos	13	16	0.006772
Unión de extremos no homólogos	8	10	0.006668
Biosíntesis de esteroides	24	30	0.006668
Proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol	12	15	0.006668
Metabolismo secundario	8	10	0.006668
Biosíntesis de arginina	18	23	0.006523
Metabolismo de la galactosa	25	32	0.006512
Biosíntesis de ácidos grasos insaturados	14	18	0.006483
Metabolismo de la arginina y la prolina	48	62	0.006453
Biosíntesis del esqueleto terpenoide	17	22	0.006441
Proteínas de biosíntesis de lípidos	27	35	0.00643
Metabolismo de la tirosina	40	52	0.006411
Metabolismo del azufre	13	17	0.006374
Metabolismo de los cianoaminoácidos	19	25	0.006334
Metabolismo de la beta-alanina	22	29	0.006323
Biosíntesis de lisina	9	12	0.006251
Metabolismo de la porfirina	15	20	0.006251
Metabolismo de la histidina	12	16	0.006251
Metabolismo del almidón y la sacarosa	53	71	0.006222
Metabolismo de la glicina, la serina y la treonina	49	66	0.006188
Biosíntesis de folato	17	23	0.006161
Glucólisis / Gluconeogénesis	42	57	0.006141
Recombinación homóloga	14	19	0.006141
Metabolismo de ascorbato y aldarato	14	19	0.006141
Metabolismo de las pirimidinas	22	30	0.006112
Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato	29	40	0.006043
Metabolismo de glioxilatos y dicarboxilatos	34	47	0.006029
Sistema de secreción	13	18	0.00602
Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano	18	25	0.006001
Degradación del ARN	36	50	0.006001
Meiosis - levadura	51	71	0.005987
Metabolismo de la fenilalanina	28	39	0.005984
Metabolismo de las purinas	43	60	0.005973
Fosforilación oxidativa	58	81	0.005968
Vía pentosa fosfato	20	28	0.005953
Metabolismo de la cisteína y la metionina	39	55	0.00591
Metabolismo del metano	17	24	0.005904
Peroxisoma	51	72	0.005904
Preniltransferasas	12	17	0.005883
Varios tipos de biosíntesis de N-glicanos	19	27	0.005865
Glicosiltransferasas	44	63	0.005821
Ribosoma	159	228	0.005812
Vía de señalización MAPK - levadura	48	69	0.005798
Biosíntesis del ancla de glicosilfosfatidilinositol	16	23	0.005798
Metabolismo del propanoato	16	23	0.005798
Metabolismo de la tiamina	9	13	0.00577

Encontrados*; Genes de la vía con cajas CCAAT en sus promotores.

Referencia**; Genes totales de la vía en el genoma.

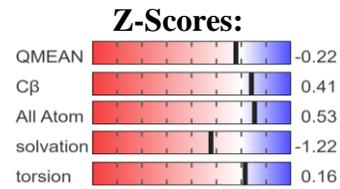
6.2 Construcción de modelos de homología

Se realizó la búsqueda de plantillas en SWISS-MODEL, y se encontraron en total 23 estructuras relacionadas evolutivamente, que coincidieron con la secuencia HapB, 2 911 para HapC y 1 994 para HapE. Se decidió usar como modelo las subunidades obtenidas por rayos X para *A. nidulans*, debido a que su complejo Hap ha sido estudiado en profundidad, además de que presenta una alta identidad de secuencia con más del 96% para las tres subunidades (Ver **Figura 28**).



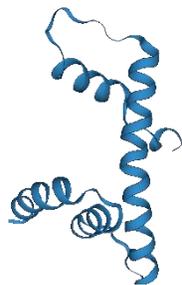
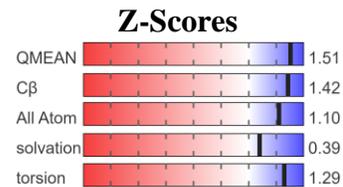
HapB unido a DNA / 4g92.1.A

GMQE:0.09
QMEANDisCo Global: 0.60 ± 0.11



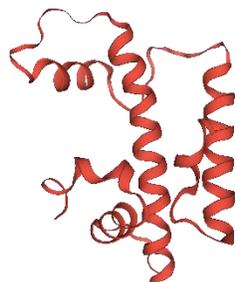
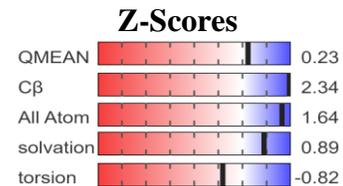
HapB / 4g91.1.A

GMQE 0.08
QMEANDisCo Global: 0.52 ± 0.12



HapC / 4g91.1.B

GMQE: 0.33
QMEANDisCo Global: 0.70 ± 0.09



HapE / 4g91.1.C

GMQE:0.32
QMEANDisCo Global: 0.64 ± 0.08

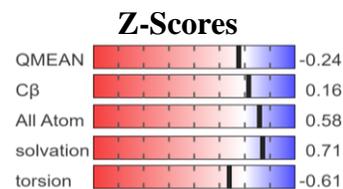


Figura 28. Modelos obtenidos por homología con SWISS-MODEL para las subunidades del complejo Hap de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y sus respectivos **scores**.

6.3 Comparación de estructuras

Se obtuvieron las subunidades Hap de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 por homología; estas estructuras se comparan en las **Figuras 29, 30, 31 y 32** con las del complejo de unión a CCAAT de *A. nidulans* FGSC A4 obtenido por rayos X y el predicho por AlphaFold2, así como el predicho por este último para las subunidades de *P. chrysogenum*. Al observar las estructuras, en todos los casos es evidente que presentan una arquitectura similar a las de *A. nidulans*. Esto puede atribuirse a que se presenta una alta identidad de secuencia de los rangos modelados, lo mismo que ocurre al comparar las subunidades de *A. nidulans* con la arquitectura de las histonas. Puede pensarse que, al menos para los fragmentos modelados, la estructura se ha conservado evolutivamente, debido a que estos dominios proteicos son de vital importancia para realizar el ensamblaje del complejo y su función de interacción con el DNA como se menciona en el trabajo de Huber y col., 2012. Al ser un resultado computacional, esto queda en espera de corroborarse, ya que esta información sólo ofrece una guía para su validación experimental.

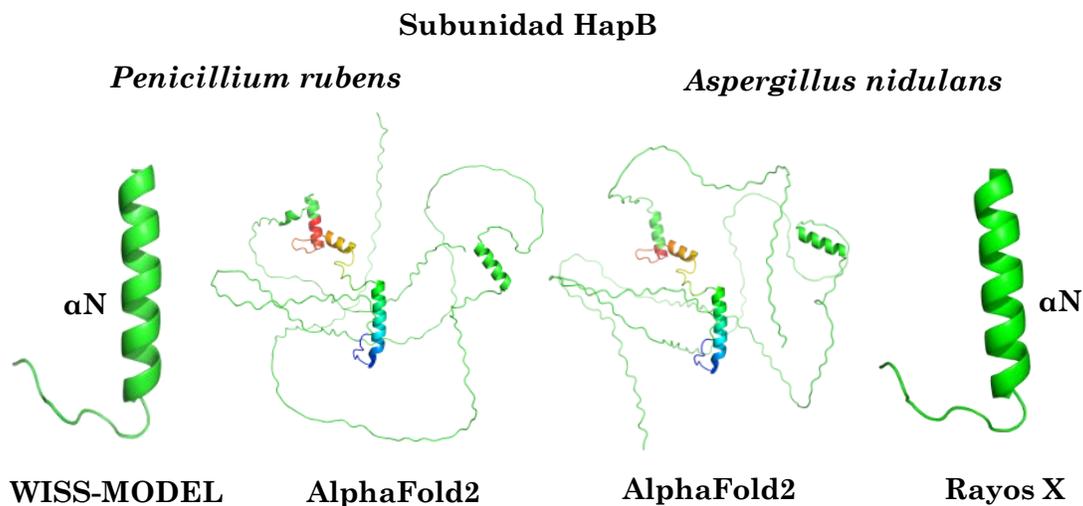


Figura 29. Estructuras de HapB. Comparación de las estructuras terciarias representadas de HapB con sus respectivos dominios, obtenidos por distintos tipos de elucidación.

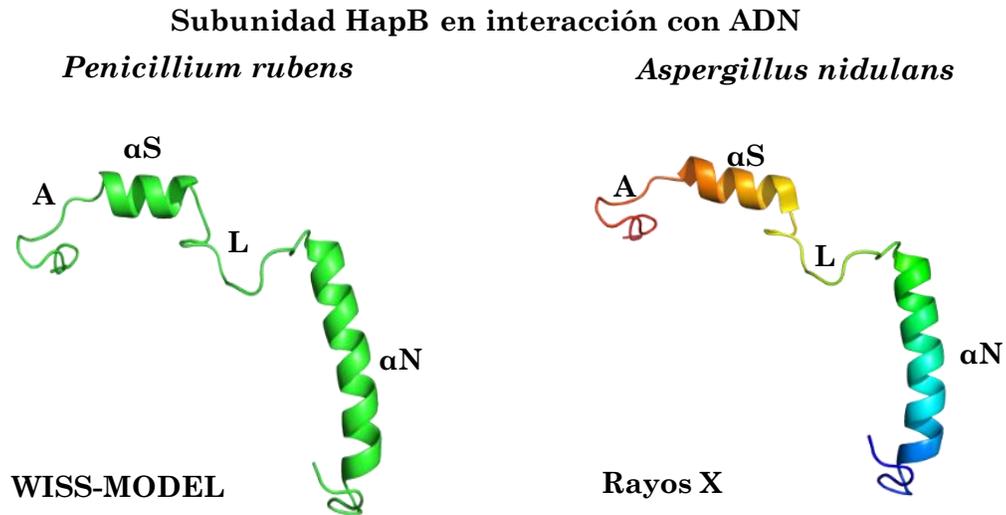


Figura 30. Estructuras de HapB en unión a DNA. Comparación de las estructuras terciarias representadas de HapB con sus respectivos dominios, obtenidos por distintos tipos de elucidación.

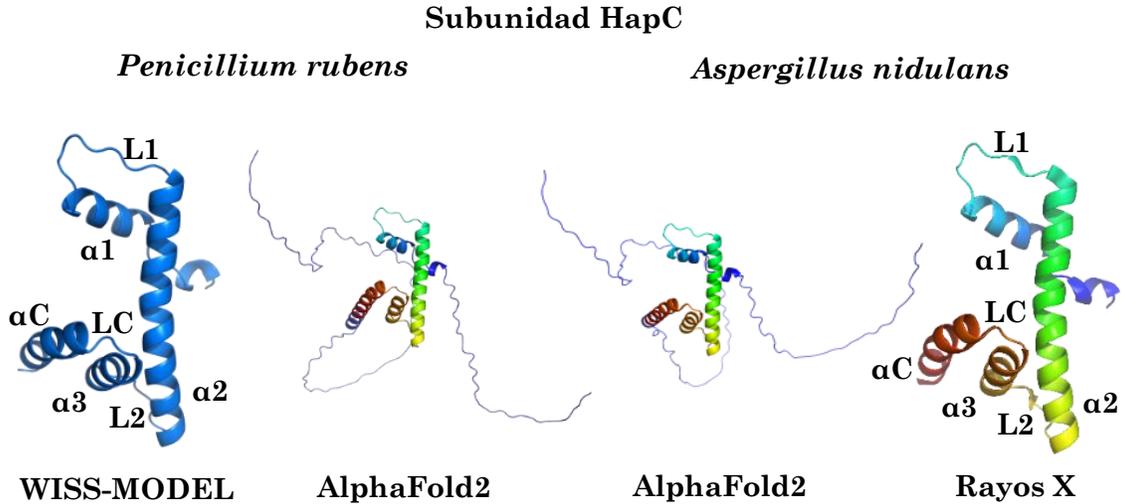


Figura 31. Estructuras de HapC. Comparación de las estructuras terciarias representadas de HapC con sus respectivos dominios, obtenidos por distintos tipos de elucidación.

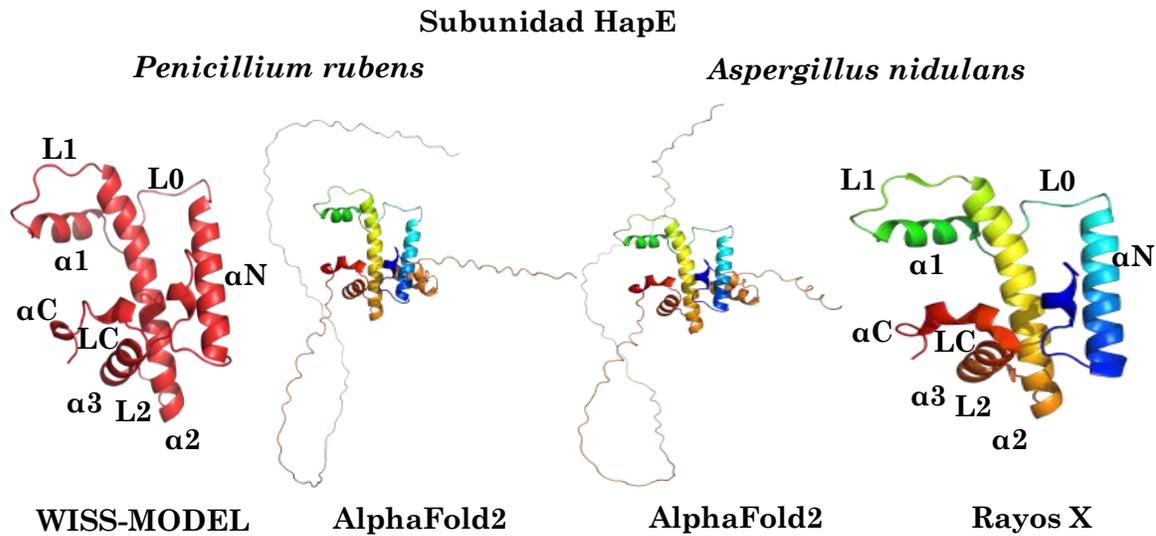


Figura 32. Estructuras de HapE. Comparación de las estructuras terciarias representadas de HapE con sus respectivos dominios, obtenidos por distintos tipos de elucidación.

6.4 Docking proteína-proteína y proteína-DNA

El acoplamiento molecular de las tres subunidades que forman el complejo Hap y su interacción con la caja CCAAT del DNA de *P. chrysogenum* permitió predecir la posible estructura tridimensional, además de ayudar a pronosticar qué residuos de aminoácido interaccionan dentro del mismo complejo y con el material genético. En la **Figura 33** se muestran las estructuras tridimensionales de los complejos Hap de *A. nidulans* que sirvieron de modelo para la construcción de los modelos de homología de las subunidades del microorganismo estudiado (obtenido de PDB con el código 4G92), mientras que en la **Figura 34** y **35** se muestran los diagramas esquemáticos y estadísticas de interacciones entre las cadenas de proteínas y el mapa de los contactos proteína-proteína.

En la **Figura 36** se muestran los modelos construidos del complejo Hap. Es importante mencionar que el acoplamiento de HapC:E se predijo mediante el modelo de homología basado en la plantilla del complejo de *A. nidulans*, por lo que las estructuras son muy similares (en el **Anexo V** se muestra información sobre el docking y la calidad) y visualmente no hay diferencias notables. Es importante mencionar que la cadena α N HapB conserva su cercanía y posición respecto a la cadena α C de HapE.

Para facilitar la visualización de las interacciones, en la **Figura 37** se muestran los diagramas esquemáticos y estadísticas de interacciones entre cadenas de proteínas, y el mapa de los contactos proteína-proteína, respectivamente de *A. nidulans*. Se predicen 163 interacciones entre HapB (13 aa) y HapC (17 aa). Por otro lado, HapB (6 aa) y HapE (6 aa) presenta el menor número de interacciones (55), mientras que el mayor número de interacciones (358) se da entre la subunidad HapC (57 a.a) y HapE (55 aa). El número de aminoácidos participantes es similar al observado en el complejo de *A. nidulans*, así como las interacciones entre las subunidades. Cabe mencionar que en el complejo cristalizado se observa un puente salino, mientras que el docking molecular predice 10.

En la **Figura 38** se presenta el mapa esquemático de los contactos proteína-proteína de *P. chrysogenum*, al igual que en *A. nidulans*, las cisteínas de HapC en las posiciones 74 y 78 muestran 7 (4:Arg143, 2:Ile146 y 1:Val163) y 6 (4:Leu159, 1:Ile162 y 1:Val163) interacciones, respectivamente, con HapE (interacción no enlazada). Estas interacciones se han demostrado cruciales para la estabilidad general del CBC y su regulación redox (Thön y col., 2010).

Por último, en la **Figura 39** se muestra la interacción del heterotrímero con el DNA. De igual manera que en la estructura cristalizada de *A. nidulans*, se predicen interacciones exclusivas de la subunidad HapB con las bases nitrogenadas de la caja CCAAT, y mayoritariamente con los nucleótidos de esta. Por otro lado, la interacción entre el DNA y HapC:E es exclusiva en las regiones flanqueantes de la caja CCAAT. Cabe añadir que el modelado computacional no muestra un cambio notorio en la posición de la subunidad HapB cuando interacciona con el DNA, en contraste cuando se encuentra en ausencia de la caja, ver **Figura 36**, esto concuerda con lo reportado por Huber y col., 2012. Es interesante que el docking molecular predice más interacciones entre el complejo Hap de *P. chrysogenum* que las obtenidas por cristalografía de rayos X de *A. nidulans*.

Por su similitud, es muy probable que el complejo Hap de *P. chrysogenum* actúe sobre el material genético de igual manera que el complejo de su homólogo de *A. nidulans*.

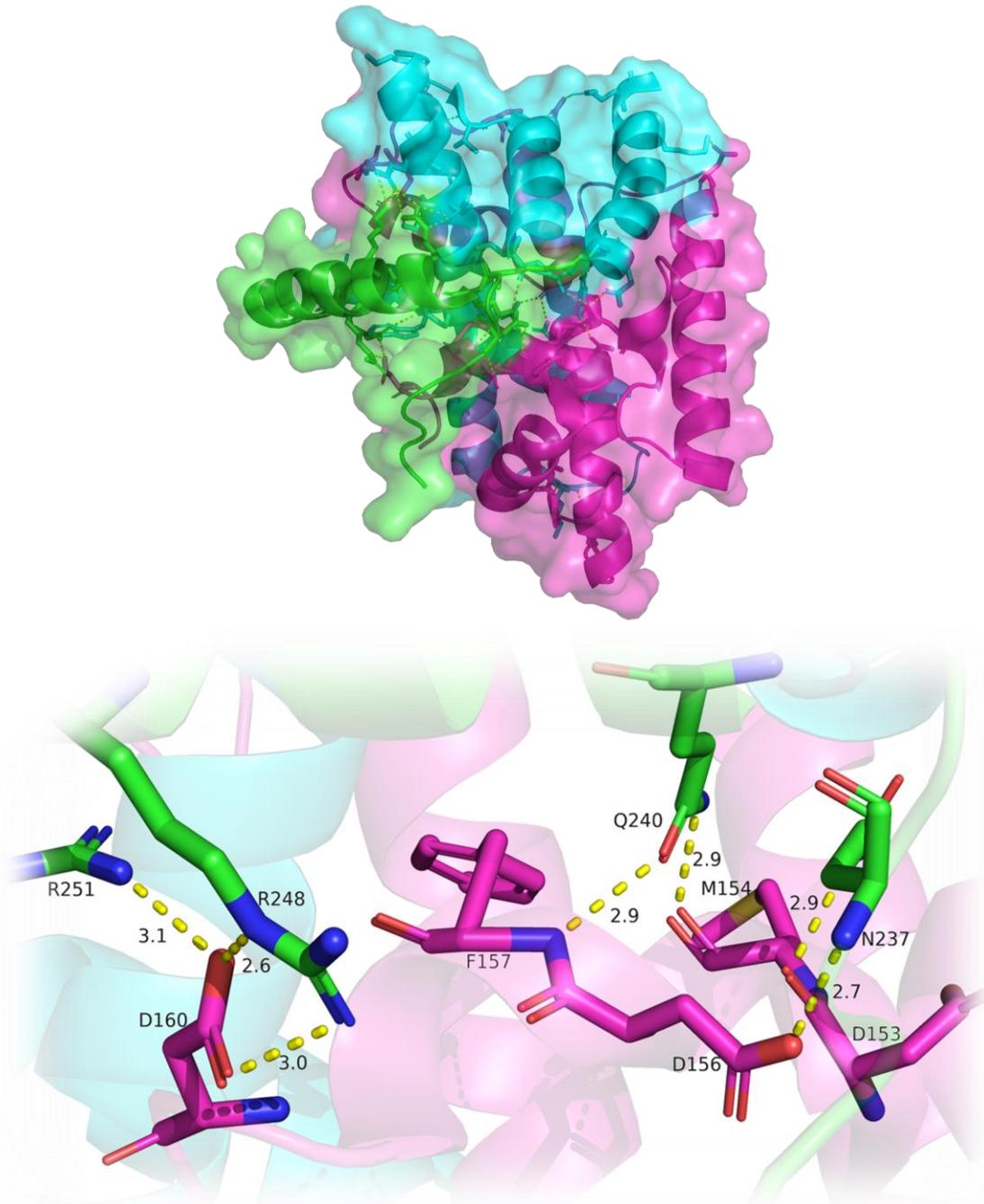
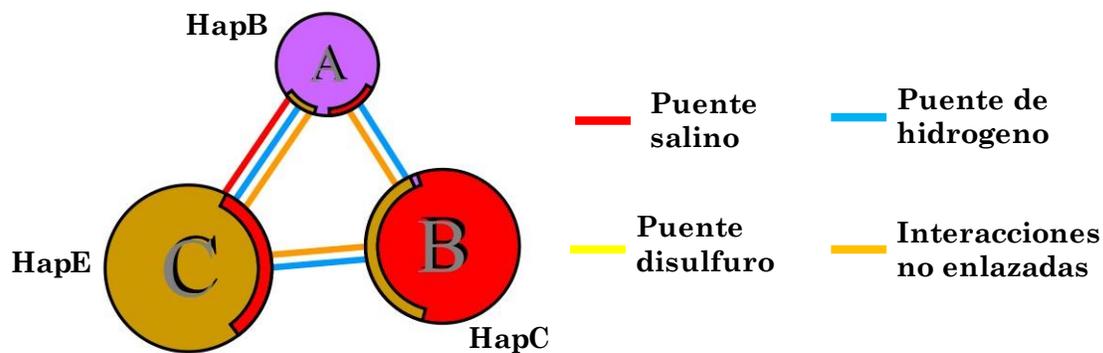


Figura 33. I) Complejo Hap de *A. nidulans*, a la izquierda se muestra el modelo de dibujo animado con superficie e interacciones entre subunidades (HapB; color verde, HapE; color morado, HapC; color Azul). **II) Interacciones entre las subunidades HapB y HapE**. Se visualizó mediante el programa PyMOL, las distancias entre las interacciones se buscaron a no más de 5Å.



Cadenas	Residuos	Área de interfaz (Å)	Puentes salinos	Puentes disulfuro	Puentes de hidrogeno	Interacciones no enlazadas
A:B	9:13	543:542	-	-	9	82
A:C	6:6	352:352	1	-	6	42
B:C	57:55	2876:2806	-	-	16	284

Figura 34. Arriba) Diagrama esquemático de interacciones entre las subunidades Hap de *A. nidulans*. Las cadenas que interactúan están unidas por líneas de colores, las cuales representan un tipo de interacción. El área de cada círculo es proporcional al área de superficie de la cadena de proteínas correspondiente. La extensión de la región de interfaz en cada cadena está representada por una cuña de color cuyo color corresponde al color de la otra cadena y cuyo tamaño significa el área de superficie de la interfaz. Abajo) Tabla de estadísticas de las interfaces del complejo Hap de *A. nidulans*.

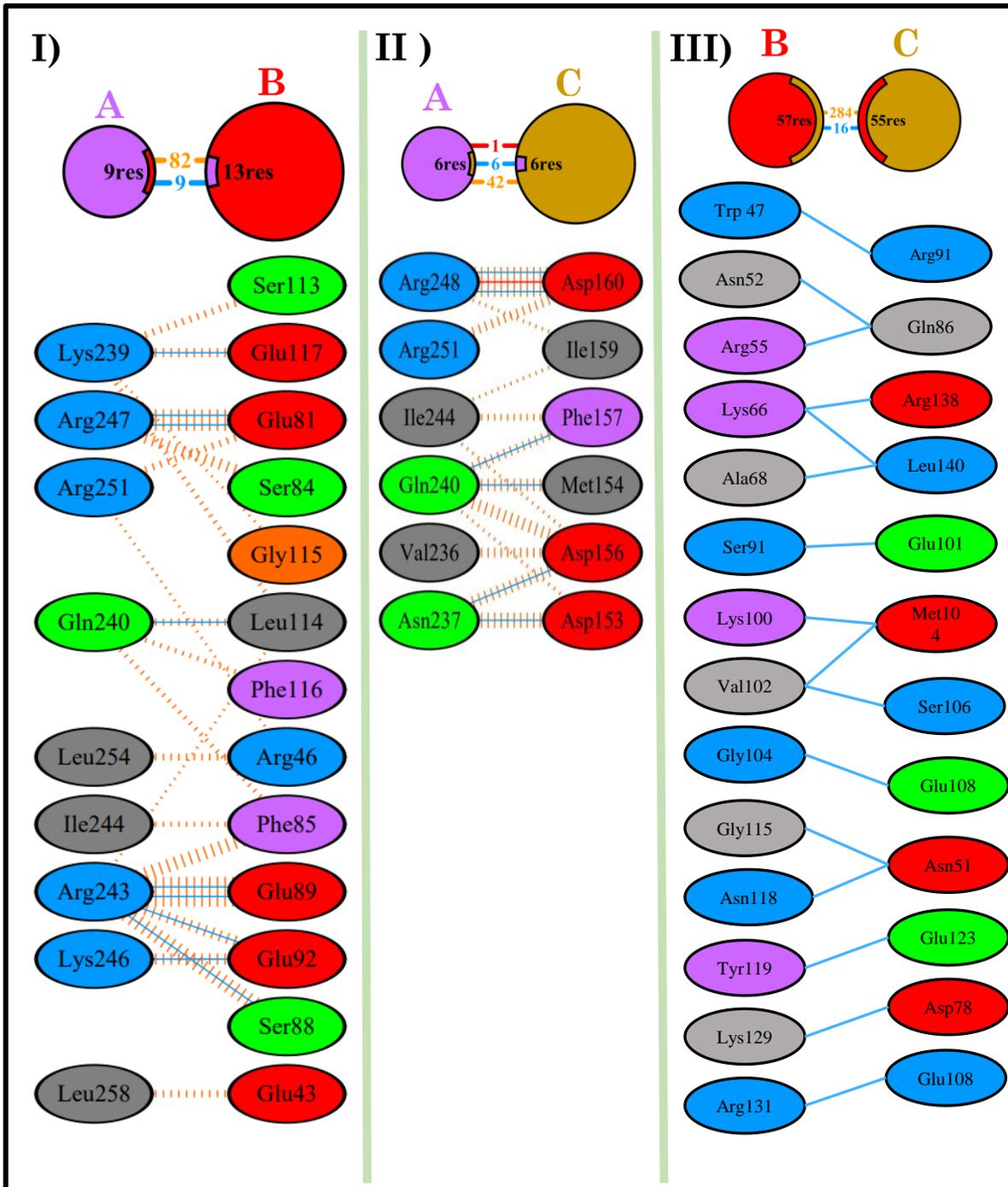


Figura 35. Ilustración esquemática de los contactos proteína-proteína del complejo Hap de *A. nidulans*. Las letras en el encabezado representan; A: HapB, B;HapC; C;HapE, el número de líneas entre dos residuos indican en número de enlaces de H potenciales entre ellos, para contactos no unidos, que pueden ser abundantes, el ancho de la línea rayada es proporcional al número de contactos atómicos, estos enlaces no se muestran en **III**, debido al alto número de aa participantes. Colores de los aminoácidos: **Positivo (H,K,R)**; **negativo (D, E)**; **S,T,N,Q=neutro**; **A,V,L,I,M = alifático**; **F,Y,W = aromático**; **P,G = Pro y Gly**; **C = cisteína**.

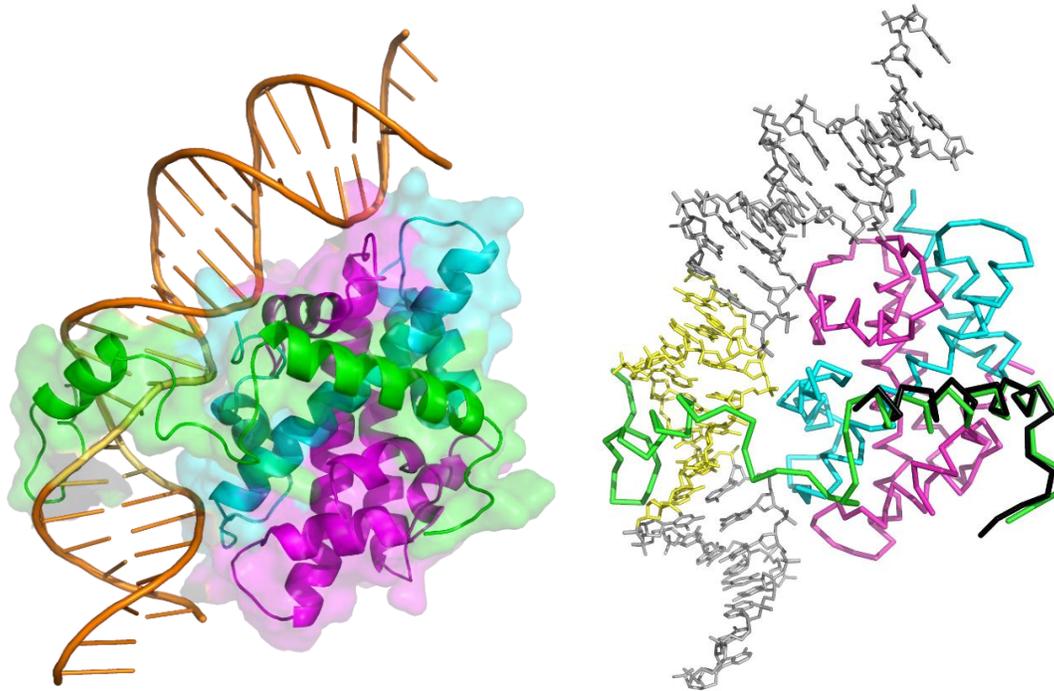
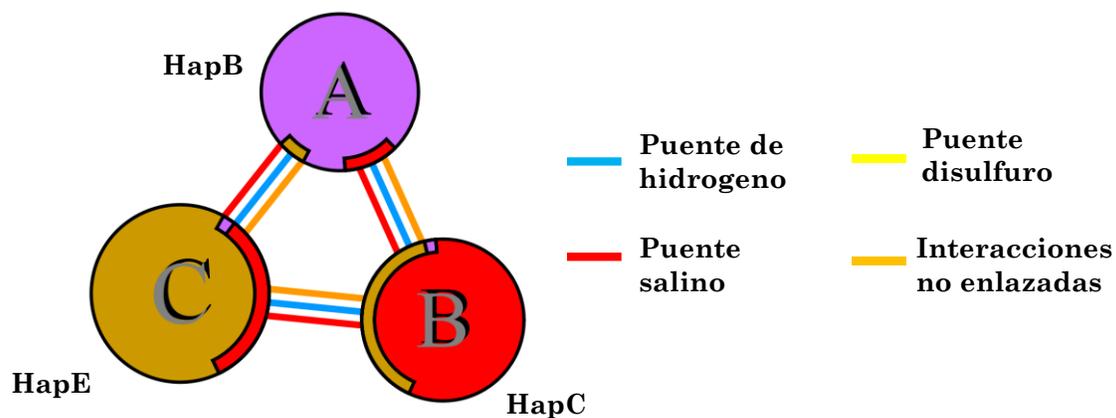


Figura 36. Representación gráfica del docking molecular de las tres subunidades del complejo Hap de *P. chrysogenum* e interacción con el DNA. A la izquierda) Representación de dibujos animados del heterotrímero en interacción con la caja CCAAT. A la derecha) Superposición del complejo en ausencia y presencia de DNA (gris) la caja CCAAT se muestra en amarillo, las proteínas se muestran en cintas. El complejo en ausencia de DNA se presenta en negro y en interacción se muestra HapB en verde, HapC en azul y HapE en morado.



Cadenas	Residuos	Área de interfaz (Å)	Puentes salinos	Puentes disulfuro	Puentes de hidrógeno	Interacciones no enlazadas
A:B	13:17	780:785	5	-	5	153
A:C	6:6	405:451	2	-	3	50
B:C	57:55	2890:2852	3	-	29	326

Figura 37. I) Diagrama esquemático de interacciones entre las subunidades Hap de *P. chrysogenum*. Las cadenas que interactúan están unidas por líneas de colores, las cuales representa un tipo de interacción. El área de cada círculo es proporcional al área de superficie de la cadena de proteínas correspondiente. La extensión de la región de interfaz en cada cadena está representada por una cuña de color cuyo color corresponde al color de la otra cadena y cuyo tamaño significa el área de superficie de la interfaz. **II) Tabla de estadísticas de las interfaces complejo Hap de *P. chrysogenum*.**

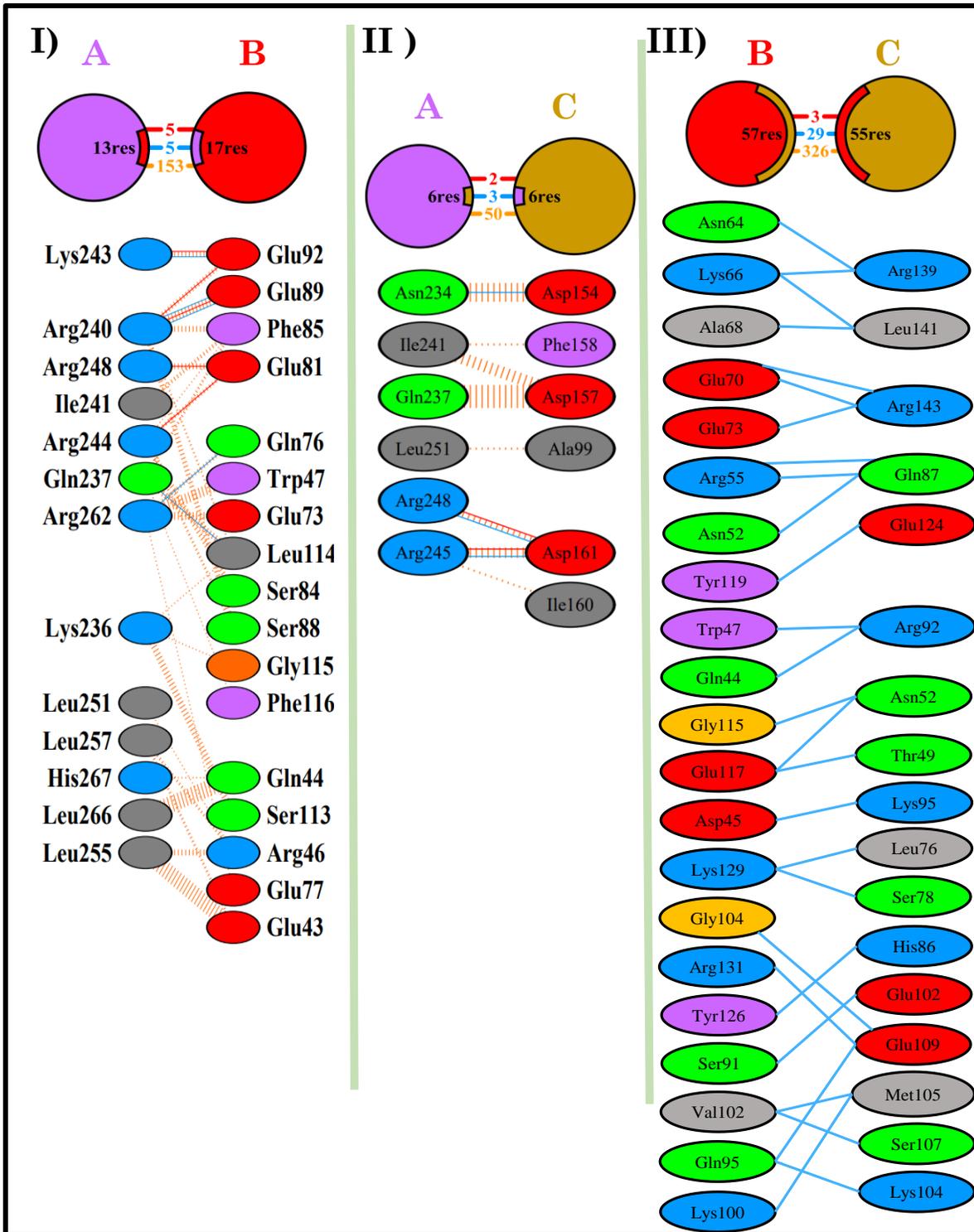


Figura 38. Ilustración esquemática de los contactos proteína-proteína del complejo Hap de *P. chrysogenum*. Las letras en el encabezado representan; A: HapB, B;HapC; C;HapE, el número de líneas entre dos residuos indican en número de enlaces de H potenciales entre ellos, para contactos no unidos, que pueden ser abundantes, el ancho de la línea rayada es proporcional al número de contactos atómicos, estos enlaces no se muestran en III, debido al alto número de aminoácidos participantes. Colores de los aminoácidos: Positivo (H,K,R); negativo (D, E); S,T,N,Q=neutro; A,V,L,I,M = alifático; F,Y,W = aromático; P,G = Pro y Gly; C = cisteína.

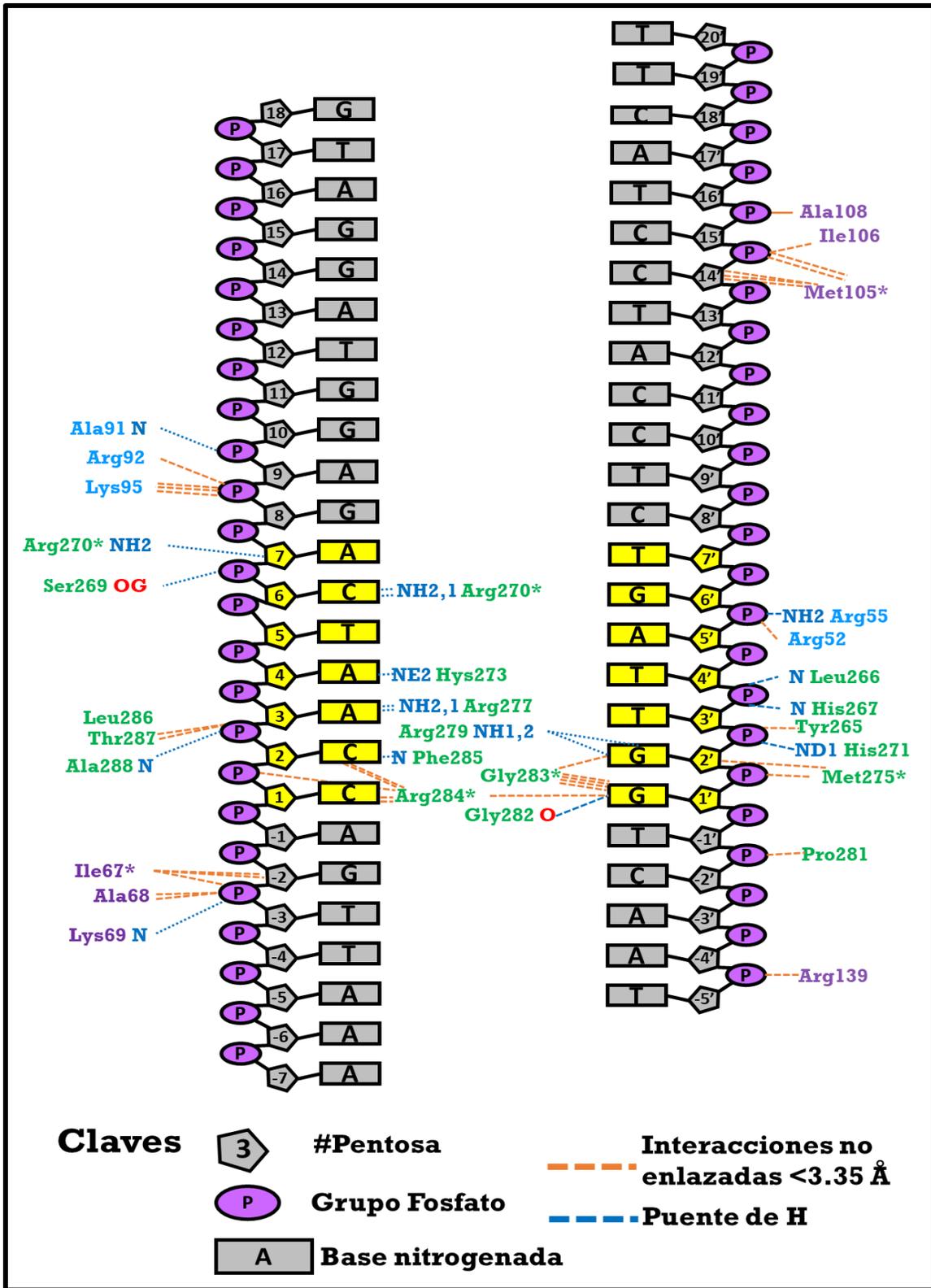


Figura 39. Ilustración esquemática de la interacción Hap-DNA de *P. chrysogenum*. Tanto la hebra Watson como la Crick de la caja CCAAT están coloreadas en amarillo. Los aminoácidos que interactúan están coloreados en azul (HapC), en morado (HapE) y en verde (HapB).

VIII. Conclusiones

Se logró el silenciamiento mediante la transformación de *P. chrysogenum* con el vector de silenciamiento pGdpki-RNAi/hapC de la subunidad HapC, obteniéndose dos cepas atenuadas: pGdpki-RNAi/hapC1 y pGdpki-RNAi/hapC6.

Las cepas silenciadas mostraron deficiencias en la viabilidad, conidiación, resistencia a estrés oxidante y producción específica de penicilina. En general, los resultados son consistentes con los niveles de la expresión del complejo, por lo que una disminución de la expresión del gen afecta negativamente los procesos de viabilidad, conidiación, resistencia a estrés oxidante y producción específica de penicilina.

La producción específica de penicilina de pGdpki-RNAi/hapC1 y pGdpki-RNAi/hapC6 fue menor a las cepas control durante los tiempos de cultivo y en el quinto día se obtuvo una reducción del **68.66%** y **31.34%**, respectivamente, comparado con la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-12-55.

La conidiación de las cepas silenciadas es significativamente menor a las cepas control.

La viabilidad de los conidios de las cepas pGdpki-RNAi/hapC1 (**65%**) y pGdpki-RNAi/hapC6 (**78.5%**) se reduce significativamente con respecto a las cepas control *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (**92.5%**) y pGdpki-RNAi (**90.67%**).

En todas las condiciones de estrés oxidante con H₂O₂, las cepas pGdpki-RNAi/hapC1 y pGdpki-RNAi/hapC6 presentan una menor viabilidad de sus conidios y crecimiento con respecto a las cepas control. Con 300 mM de H₂O₂, los conidios de pGdpki-RNAi/hapC1 **no son viables** y la viabilidad de los conidios de pGdpki-RNAi/hapC6 es menor en un **80.68%** con respecto a la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.

La búsqueda del núcleo CCAAT se encuentra en mayor cantidad en los promotores de genes que componen el genoma de *P. chrysogenum* (**8836**) que el patrón degenerado R-R-C-C-A-A-T-M-R (M es A ó C y R es una purina) (**602**).

El enfoque NSAF permitió enriquecer los datos, entre los 50 principales resultados se encuentran genes de biosíntesis y metabolismo y en este grupo se encuentran aquellos que

participan en el metabolismo de los tres aminoácidos precursores de la producción de penicilina (lisina, cisteína, valina).

Se obtuvieron las estructuras terciarias de cada subunidad del complejo Hap de *P. chrysogenum* por modelado de homología, usando como molde las subunidades de *A. nidulans*.

Las estructuras terciarias obtenidas para cada subunidad conservaron los dominios de sus homólogos de *A. nidulans*.

El docking molecular predijo la estructura cuaternaria del complejo Hap y sus posibles interacciones entre sí y con el DNA que contiene su secuencia blanco (caja CCAAT).

Las interacciones de las subunidades HapC:E incluyen a las Cys 74 y 78 de HapC, anteriormente reportadas como cruciales para la estabilidad del complejo.

Las predicciones de las interacciones del complejo Hap con el DNA se dan mayoritariamente con la subunidad HapB.

Es posible que el mecanismo de apertura del surco menor de la caja CCAAT ocurra de la misma forma que en *A. nidulans*.

IX. Bibliografía

1. Adeleye, I. A., Eruba, S., & Ezeani, C. J. (2004). Isolation and characterisation of antibiotic producing microorganisms in composted Nigerian soil. *Journal of environmental biology*, 25(3), 313–316.
2. Alvarez, E., Cantoral, J. M., Barredo, J. L., Díez, B., & Martín, J. F. (1987). Purification to homogeneity and characterization of acyl coenzyme A: 6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 31(11), 1675-1682.
3. Andersen, B., Frisvad, J. C., Søndergaard, I., Rasmussen, I. S., & Larsen, L. S. (2011). Associations between fungal species and water-damaged building materials. *Applied and environmental microbiology*, 77(12), 4180-4188.
4. Andersen, S. J., & Frisvad, J. C. (1994). Penicillin production by *Penicillium nalgiovense*. *Letters in Applied Microbiology*, 19(6), 486-488.
5. Anderson RF, Whitmore LM, Brown WE, Peterson WH, Churchill BW, Roegner FR, Campbell TH, Backus MP, Stauffer JF (1953) Production of penicillin by some pigmentless mutants of the mold, *Penicillium chrysogenum* Q176. *Industrial & Engineering Chemistry*, 45, 768–773.
6. Andrianopoulos, A. & Hynes M. (1990) Sequence and functional analysis of the positively acting regulatory gene *amdR* from *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology*, 10(6), 3194-203. doi: 10.1128/mcb.10.6.3194-3203.
7. Aramayo, R. & Timberlake, W. The *Aspergillus nidulans* *yA* gene is regulated by *abaA*. *The EMBO Journal*, 12(5), 2039-2048.
8. Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E., & Moudrianakis, E. N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(22), 10148-10152.
9. Backus, M. P., & Stauffer, J. F. (1955). The production and selection of a family of strains in *Penicillium chrysogenum*. *Mycologia*, 47(4), 429-463.
10. Baek, Y.U. Li, M. & Davis, D.A. (2008) *Candida albicans* ferric reductases are differentially regulated in response to distinct forms of iron limitation by the Rim101 and CBF transcription factors, *Eukaryot Cell*, 7(7), 1168–1179.
11. Banczerz, R., Ginalska, G., Fiedurek, J., & Gromada, A. (2005). Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9'. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(6), 253-260.
12. Banke, S., Frisvad, J. C., & Rosendahl, S. (1997). Taxonomy of *Penicillium chrysogenum* and related xerophilic species, based on isozyme analysis. *Mycological Research*, 101(5), 617-624.
13. Bartoszewska, M., Kiel, J. A., Bovenberg, R. A., Veenhuis, M., & van der Klei, I. J. (2011). Autophagy deficiency promotes β -lactam production in *Penicillium chrysogenum*. *Applied and environmental microbiology*, 77(4), 1413-1422.
14. Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., ... & Braus, G. H. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, 320(5882), 1504-1506.
15. Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos. *Revista del Hospital Italiano de Buenos Aires*, 29(2), 102-11.
16. Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343-350.
17. Bentley, R. (2005). The development of penicillin: genesis of a famous antibiotic. *Perspectives in biology and medicine*, 48(3), 444-452.

18. Bergh, K. T., Litzka, O., & Brakhage, A. A. (1996). Identification of a major cis-acting DNA element controlling the bidirectionally transcribed penicillin biosynthesis genes *acvA* (*pcbAB*) and *ipnA* (*pcbC*) of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, *178*(13), 3908-3916.
19. Bergh, K. T., Litzka, O., & Brakhage, A. A. (1996). Identification of a major cis-acting DNA element controlling the bidirectionally transcribed penicillin biosynthesis genes *acvA* (*pcbAB*) and *ipnA* (*pcbC*) of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, *178*(13), 3908-3916.
20. Bhattacharya, A., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R., De Crombrughe, B., & Maity, S. N. (2003). The B subunit of the CCAAT box binding transcription factor complex (CBF/NF-Y) is essential for early mouse development and cell proliferation. *Cancer research*, *63*(23), 8167-8172.
21. Bienert, S., Waterhouse, A., De Beer, T. A., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic acids research*, *45*(D1), D313-D319.
22. Bok, J. W., & Keller, N. P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic cell*, *3*(2), 527-535.
23. Bourgarel, D., Nguyen, C. C., & Bolotin-Fukuhara, M. (1999). HAP4, the glucose-repressed regulated subunit of the HAP transcriptional complex involved in the fermentation–respiration shift, has a functional homologue in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. *Molecular microbiology*, *31*(4), 1205-1215.
24. Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(1), 21-32.
25. Brakhage, A. A., Andrianopoulos, A., Kato, M., Steidl, S., Davis, M. A., Tsukagoshi, N., & Hynes, M. J. (1999). HAP-like CCAAT-binding complexes in filamentous fungi: implications for biotechnology. *Fungal Genetics and Biology*, *27*(2-3), 243-252.
26. Brakhage, A. A., Spröte, P., Al-Abdallah, Q., Gehrke, A., Plattner, H., & Tuencher, A. (2004). Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Molecular Biotechnology of Fungal beta-Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases*, 45-90.
27. Brakhage, A. A., Thön, M., Spröte, P., Scharf, D. H., Al-Abdallah, Q., Wolke, S. M., & Hortschansky, P. (2009). Aspects on evolution of fungal β -lactam biosynthesis gene clusters and recruitment of *trans*-acting factors. *Phytochemistry*, *70*(15-16), 1801-1811.
28. Brenner, S. E. (2001). A tour of structural genomics. *Nature Reviews Genetics*, *2*(10), 801-809.
29. Bucher, P. (1990). Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *Journal of molecular biology*, *212*(4), 563-578.
30. Burley, S. K., & Roeder, R. G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annual review of biochemistry*, *65*(1), 769-799.
31. Burzlaff, N. I., Rutledge, P. J., Clifton, I. J., Hensgens, C. M., Pickford, M., Adlington, R. M., ... & Baldwin, J. E. (1999). The reaction cycle of isopenicillin N synthase observed by X-ray diffraction. *Nature*, *401*(6754), 721-724.
32. Camacho Silvas, L. A. (2022). *Factores clínicos asociados a resistencia bacteriana derivados de la atención en salud en una institución médica de segundo nivel en la Ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México* (Doctoral Dissertation, Universidad Autónoma De Chihuahua).
33. Cantoral, J. M., Diez, B., Barredo, J. L., Alvarez, E., & Martín, J. F. (1987). High-frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Bio/technology*, *5*(5), 494-497.
34. Cantoral, J. M., Gutiérrez, S., Fierro, F., Gil-Espinosa, S., Van Liempt, H., & Martín, J. F. (1993). Biochemical characterization and molecular genetics of nine mutants of *Penicillium chrysogenum* impaired in penicillin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(1), 737-744.

35. Casqueiro, J., Gutiérrez, S., Bañuelos, O., Hijarrubia, M. J., & Martín, J. F. (1999). Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction. *Journal of bacteriology*, *181*(4), 1181-1188.
36. Cepeda-García C, Domínguez-Santos R, García-Rico RO, García-Estrada C, Cajiao A, Fierro F, Martín JF (2014) Direct involvement of the CreA transcription factor in penicillin biosynthesis and expression of the *pcbAB* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* *98*(16): 7113-7124. doi: 10.1007/s00253-014-5760-1
37. Ceribelli, M. Dolfini, D. Merico, D. Gatta, R. Vigano, A.M. Pavesi, G. Mantovani, R. The histone-like NF-Y is a bifunctional transcription factor, *Mol. Cell. Biol.* *28* (2008) 2047–2058.
38. Chang, J. C., Foarde, K. K., & VanOsdell, D. W. (1996). Assessment of fungal (*Penicillium chrysogenum*) growth on three HVAC duct materials. *Environment International*, *22*(4), 425-431.
39. Charlang, G. N. G. B., Ng, B., Horowitz, N. H., & Horowitz, R. M. (1981). Cellular and extracellular siderophores of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. *Molecular and cellular biology*, *1*(2), 94-100.
40. Chen, H., & Kinsey, J. A. (1995). Purification of a heteromeric CCAAT binding protein from *Neurospora crassa*. *Molecular and General Genetics MGG*, *249*(3), 301-308.
41. Chen, H., Crabb, J. W., & Kinsey, J. A. (1998). The *Neurospora aab-1* gene encodes a CCAAT binding protein homologous to yeast HAP5. *Genetics*, *148*(1), 123-130.
42. Chen, S., Dong, H., Fan, Y., Li, W., & Cohen, Y. (2006). Dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* induces expression of pathogenesis-related protein genes and resistance against wilt diseases in Bt transgenic cotton. *Biological Control*, *39*(3), 460-464.
43. Chevtzoff, C., Yoboue, E. D., Galinier, A., Casteilla, L., Daignan-Fornier, B., Rigoulet, M., & Devin, A. (2010). Reactive oxygen species-mediated regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(3), 1733-1742.
44. Chooi, Y. H., Cacho, R., & Tang, Y. (2010). Identification of the viridicatumtoxin and griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*. *Chemistry & biology*, *17*(5), 483-494
45. Chu, Y. W., Renno, D., & Saunders, G. (1997). Extracellular pH affects regulation of the *pcbAB* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Applied microbiology and biotechnology*, *47*(3), 250-254.
46. Cohen, G., Argaman, A., Schreiber, R., Mislovati, M., & Aharonowitz, Y. (1994). The thioredoxin system of *Penicillium chrysogenum* and its possible role in penicillin biosynthesis. *Journal of bacteriology*, *176*(4), 973-984.
47. Coustry, F., Maity, S. N., Sinha, S., & De Crombrughe, B. (1996). The transcriptional activity of the CCAAT-binding factor CBF is mediated by two distinct activation domains, one in the CBF-B subunit and the other in the CBF-C subunit. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(24), 14485-14491.
48. Coustry, F., Sinha, S., Maity, S. N., & CROMBRUGGHE, B. D. (1998). The two activation domains of the CCAAT-binding factor CBF interact with the dTAFII110 component of the *Drosophila* TFIID complex. *Biochemical Journal*, *331*(1), 291-297.
49. Dang, V. D., Bohn, C., Bolotin-Fukuhara, M., & Daignan-Fornier, B. (1996). The CCAAT box-binding factor stimulates ammonium assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*, defining a new cross-pathway regulation between nitrogen and carbon metabolisms. *Journal of bacteriology*, *178*(7), 1842-1849.
50. Dang, V. D., Valens, M., Bolotin-Fukuhara, M., & Daignan-Fornier, B. (1996). Cloning of the *ASN1* and *ASN2* genes encoding asparagine synthetases in *Saccharomyces cerevisiae*: differential regulation by the CCAAT-box-binding factor. *Molecular microbiology*, *22*(4), 681-692.
51. Deng, H., Sun, Y., Zhang, Y., Luo, X., Hou, W., Yan, L., ... & Zhang, H. (2007). Transcription factor NFY globally represses the expression of the *C. elegans* Hox gene *Abdominal-B* homolog *egl-5*. *Developmental biology*, *308*(2), 583-592.

52. Diez, B., Alvarez, E., Cantoral, J. M., Barredo, J. L., & Martin, J. F. (1987). Selection and characterization of *pyrG* mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase and complementation by the *pyr4* gene of *Neurospora crassa*. *Current genetics*, 12(4), 277-282.
53. Edwards, D., Murray, J. A., & Smith, A. G. (1998). Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in Arabidopsis. *Plant physiology*, 117(3), 1015-1022.
54. Elander, R. P. (2002). University of Wisconsin contributions to the early development of penicillin and cephalosporin antibiotics. *SIM News*, 52, 270-278.
55. Emmerich, R., & Löw, O. (1899). Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 31(1), 1-65.
56. Espeso, E. A., Tilburn, J., Arst Jr, H. N., & Penalva, M. A. (1993). pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *The EMBO Journal*, 12(10), 3947-3956.
57. Färber, P., & Geisen, R. (1994). Antagonistic activity of the food-related filamentous fungus *Penicillium nalgiovense* by the production of penicillin. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(9), 3401-3404.
58. Feng, B., Friedlin, E., & Marzluf, G. A. (1994). A reporter gene analysis of penicillin biosynthesis gene expression in *Penicillium chrysogenum* and its regulation by nitrogen and glucose catabolite repression. *Applied and environmental microbiology*, 60(12), 4432-4439.
59. Fernández-Aguado M, Ullán RV, Teijeira F, Rodríguez-Castro R, Martín JF. The transport of phenylacetic acid across the peroxisomal membrane is mediated by the PaaT protein in *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 97:3073–3084.
60. Fernández-Aguado, M., Teijeira, F., Martín, J. F., & Ullán, R. V. (2013). A vacuolar membrane protein affects drastically the biosynthesis of the ACV tripeptide and the beta-lactam pathway of *Penicillium chrysogenum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(2), 795-808.
61. Fickett, J. W., & Hatzigeorgiou, A. G. (1997). Eukaryotic promoter recognition. *Genome research*, 7(9), 861-878.
62. Fierro, F., Barredo, J. L., Diez, B., Gutierrez, S., Fernandez, F. J., & Martin, J. (1995). The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(13), 6200-6204.
63. Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British journal of experimental pathology*, 10(3), 226.
64. Fleming, A. (1944). The discovery of penicillin. *British Medical Bulletin*, 2(1), 4-5.
65. Fleming, A., & Allison, V. (1922). Observations on a bacteriolytic substance ("lysozyme") found in secretions and tissues. *British journal of experimental pathology*, 3(5), 252.
66. Fleming, J. D., Pavesi, G., Benatti, P., Imbriano, C., Mantovani, R., & Struhl, K. (2013). NF-Y coassociates with FOS at promoters, enhancers, repetitive elements, and inactive chromatin regions, and is stereo-positioned with growth-controlling transcription factors. *Genome research*, 23(8), 1195-1209.
67. Forsburg, S. L., & Guarente, L. (1989). Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes & development*, 3(8), 1166-1178.
68. Frisvad, J. C. (1987). High-performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Journal of Chromatography A*, 392, 333-347.
69. Frisvad, J. C., & Filtenborg, O. (1989). Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, 81(6), 837-861.

70. Frisvad, J. C., & Filtenborg, O. (1990a). Revision of *Penicillium* subgenus *Furcatum* based on secondary metabolites and conventional characters. In *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification* (pp. 159-172). Springer, Boston, MA.
71. Frisvad, J. C., Hawksworth, D. L., Kozakiewicz, Z., Pitt, J. I., Samson, R. A., & Stolk, A. C. (1990b). Proposals to conserve important species names in *Aspergillus* and *Penicillium*. In *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification* (pp. 83-89). Springer, Boston, MA.
72. Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O., & Samson, R. A. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in mycology*, *49*, 201-241.
73. García-Estrada, C., Ullán, R. V., Velasco-Conde, T., Godio, R. P., Teijeira, F., Vaca, I., ... & Martín, J. F. (2008). Post-translational enzyme modification by the phosphopantetheinyl transferase is required for lysine and penicillin biosynthesis but not for roquefortine or fatty acid formation in *Penicillium chrysogenum*. *Biochemical Journal*, *415*(2), 317-324.
74. García-Rico, R. O., Fierro, F., Mauriz, E., Gómez, A., Fernández-Bodega, M. Á., & Martín, J. F. (2008). The heterotrimeric G α protein Pga1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology*, *154*(11), 3567-3578.
75. Gensini, G. F., Conti, A. A., & Lippi, D. (2007). The contributions of Paul Ehrlich to infectious disease. *Journal of Infection*, *54*(3), 221-224.
76. Gidijala, L., Kiel, J. A., Bovenberg, R. A., Van Der Klei, I. J., & Berg, M. A. V. D. (2010). Biosynthesis of active pharmaceuticals: β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *27*(1), 1-32.
77. Gnesutta, N., Nardini, M., & Mantovani, R. (2013). The H2A/H2B-like histone-fold domain proteins at the crossroad between chromatin and different DNA metabolisms. *Transcription*, *4*(3), 114-119.
78. Gombert, A. K., Veiga, T., Puig-Martinez, M., Lamboo, F., Nijland, J. G., Driessen, A. J., ... & Daran, J. M. (2011). Functional characterization of the oxaloacetase encoding gene and elimination of oxalate formation in the β -lactam producer *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genetics and Biology*, *48*(8), 831-839.
79. González, J., & Orero, A. (2007). La penicilina llega a España: 10 de marzo de 1944, una fecha histórica. *Rev Esp Quimioterap*, *20*(4), 446-450.
80. Gravesen, S., Nielsen, P. A., Iversen, R., & Nielsen, K. F. (1999). Microfungal contamination of damp buildings--examples of risk constructions and risk materials. *Environmental Health Perspectives*, *107*(suppl 3), 505-508.
81. Gsaller, F., Hortschansky, P., Furukawa, T., Carr, P. D., Rash, B., Capilla, J., ... & Bromley, M. J. (2016). Sterol biosynthesis and azole tolerance is governed by the opposing actions of SrbA and the CCAAT binding complex. *PLoS pathogens*, *12*(7), e1005775.
82. Gurung, A. B., Bhattacharjee, A., Ajmal Ali, M., Al-Hemaid, F., & Lee, J. (2017). Binding of small molecules at interface of protein-protein complex *A newer approach to rational drug design. Saudi journal of biological sciences*, *24*(2), 379-388. doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.008
83. Gutiérrez, S., Diez, B., Alvarez, E., Barredo, J. L., & Martín, J. F. (1991). Expression of the penDE gene of *Penicillium chrysogenum* encoding isopenicillin N acyltransferase in *Cephalosporium acremonium*: production of benzylpenicillin by the transformants. *Molecular and General Genetics MGG*, *225*(1), 56-64.
84. Gutiérrez, S., Fierro, F., Casqueiro, J., & Martín, J. F. (1999). Gene organization and plasticity of the β -lactam genes in different filamentous fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *75*(1), 81-94.
85. Gutiérrez, S., Velasco, J., Fernandez, F. J., & Martín, J. F. (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. *Journal of bacteriology*, *174*(9), 3056-3064.

86. Haas, H., & Marzluf, G. A. (1995). NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum*, binds specifically to elements in the intergenic promoter regions of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters. *Current genetics*, 28(2), 177-183.
87. Hackenberg, D., Wu, Y., Voigt, A., Adams, R., Schramm, P., & Grimm, B. (2012). Studies on differential nuclear translocation mechanism and assembly of the three subunits of the *Arabidopsis thaliana* transcription factor NF-Y. *Molecular plant*, 5(4), 876-888.
88. Hahn, S., & Guarente, L. (1988). Yeast HAP2 and HAP3: transcriptional activators in a heteromeric complex. *Science*, 240(4850), 317-321.
89. Henk, D. A., Eagle, C. E., Brown, K., Van Den Berg, M. A., Dyer, P. S., Peterson, S. W., & Fisher, M. C. (2011). Speciation despite globally overlapping distributions in *Penicillium chrysogenum*: the population genetics of Alexander Fleming's lucky fungus. *Molecular Ecology*, 20(20), 4288-4301.
90. Henk, D. A., Eagle, C. E., Brown, K., Van Den Berg, M. A., Dyer, P. S., Peterson, S. W., & Fisher, M. C. (2011). Speciation despite globally overlapping distributions in *Penicillium chrysogenum*: the population genetics of Alexander Fleming's lucky fungus. *Molecular Ecology*, 20(20), 4288-4301.
91. Hill, P. (1972). The production of penicillins in soils and seeds by *Penicillium chrysogenum* and the role of penicillin β -lactamase in the ecology of soil bacillus. *Microbiology*, 70(2), 243-252.
92. Holm, L., & Rosenström, P. (2010). Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic acids research*, 38(suppl_2), W545-W549.
93. Hortschansky, P., Eisendle, M., Al-Abdallah, Q., Schmidt, A. D., Bergmann, S., Thön, M., ... & Haas, H. (2007). Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex—a novel mechanism of gene regulation by iron. *The EMBO journal*, 26(13), 3157-3168.
94. Hortschansky, P., Haas, H., Huber, E. M., Groll, M., & Brakhage, A. A. (2016). The CCAAT-binding complex (CBC) in *Aspergillus* species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(5), 560-570.
95. Houbraken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA fungus*, 2(1), 87-95.
96. Huang, S. Y. (2014). Search strategies and evaluation in protein–protein docking: principles, advances and challenges. *Drug discovery today*, 19(8), 1081-1096.
97. Huber, E. M., Scharf, D. H., Hortschansky, P., Groll, M., & Brakhage, A. A. (2012). DNA minor groove sensing and widening by the CCAAT-binding complex. *Structure*, 20(10), 1757-1768.
98. Hunter, C. A., & Lea, R. G. (1994). The airborne fungal population of representative British homes. *Health implications of fungi in indoor environments*, 141-153.
99. Hynes, M. J., & Davis, M. A. (1996). Regulation of acetamide catabolism. In *Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 381-393). Springer, Berlin, Heidelberg.
100. Ismail, M. A. (2001). Deterioration and spoilage of peanuts and desiccated coconuts from two sub-Saharan tropical East African countries due to the associated mycobiota and their degradative enzymes. *Mycopathologia*, 150(2), 67-84.
101. Jami, M. S., Barreiro, C., García-Estrada, C., & Martín, J. F. (2010a). Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(6), 1182-1198.
102. Jami, M. S., García-Estrada, C., Barreiro, C., Cuadrado, A. A., Salehi-Najafabadi, Z., & Martín, J. F. (2010b). The *Penicillium chrysogenum* extracellular proteome. Conversion from a food-rotting strain to a versatile cell factory for white biotechnology. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(12), 2729-2744.
103. Johnson, D. C., Cano, K. E., Kroger, E. C., & McNabb, D. S. (2005). Novel regulatory function for the CCAAT-binding factor in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 4(10), 1662-1676.

104. Jones, S., Van Heyningen, P., Berman, H. M., & Thornton, J. M. (1999). Protein-DNA interactions: a structural analysis. *Journal of molecular biology*, 287(5), 877-896.
105. Jung, W. H., Saikia, S., Hu, G., Wang, J., Fung, C. K. Y., D'Souza, C., ... & Kronstad, J. W. (2010). HapX positively and negatively regulates the transcriptional response to iron deprivation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathogens*, 6(11), e1001209.
106. Kahle, J., Baake, M., Doenecke, D., & Albig, W. (2005). Subunits of the heterotrimeric transcription factor NF-Y are imported into the nucleus by distinct pathways involving importin β and importin 13. *Molecular and Cellular Biology*, 25(13), 5339-5354.
107. Kato, M., Aoyama, A., Naruse, F., Kobayashi, T., & Tsukagoshi, N. (1997). An *Aspergillus nidulans* nuclear protein, AnCP, involved in enhancement of Taka-amylase A gene expression, binds to the CCAAT-containing *taaG2*, *amdS*, and *gatA* promoters. *Molecular and General Genetics MGG*, 254(2), 119-126.
108. Kato, M., Aoyama, A., Naruse, F., Tateyama, Y., Hayashi, K., Miyazaki, M., ... & Tsukagoshi, N. (1998). The *Aspergillus nidulans* CCAAT-binding factor AnCP/AnCF is a heteromeric protein analogous to the HAP complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*, 257(4), 404-411.
109. Kiel, J. A., Van den Berg, M. A., Fusetti, F., Poolman, B., Bovenberg, R. A., Veenhuis, M., & Van der Klei, I. J. (2009). Matching the proteome to the genome: the microbody of penicillin-producing *Penicillium chrysogenum* cells. *Functional & integrative genomics*, 9(2), 167-184.
110. Kim, I. S., Sinha, S., De Crombrughe, B., & Maity, S. N. (1996). Determination of functional domains in the C subunit of the CCAAT-binding factor (CBF) necessary for formation of a CBF-DNA complex: CBF-B interacts simultaneously with both the CBF-A and CBF-C subunits to form a heterotrimeric CBF molecule. *Molecular and Cellular Biology*, 16(8), 4003-4013.
111. Kosalková K, Marcos A. T., Fierro F., Hernando-Rico V., Gutiérrez S. & Martín J. F. (2000). A novel heptameric sequence (TTAGTAA) is the binding site for a protein required for high level expression of *pcbAB*, the first gene of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2423-2430.
112. Kosalková, K., García-Estrada, C., Ullán, R. V., Godio, R. P., Feltrer, R., Teijeira, F., ... & Martín, J. F. (2009). The global regulator *LaeA* controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie*, 91(2), 214-225.
113. Kosalková, K., Rodríguez-Sáiz, M., Barredo, J. L., & Martín, J. F. (2007). Binding of the PTA1 transcriptional activator to the divergent promoter region of the first two genes of the penicillin pathway in different *Penicillium* species. *Current genetics*, 52(5), 229-2377.
114. Kozakiewicz, Z. (1995). *Penicillium chrysogenum*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. *Descriptions of Fungi and Bacteria*, (126), Sheet-1257.
115. Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Baudin, M., & Niebel, A. (2013). CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many?. *Trends in plant science*, 18(3), 157-166.
116. Lamas-Maceiras, M., Vaca, I., Rodríguez, E., Casqueiro, J., & Martín, J. F. (2006). Amplification and disruption of the phenylacetyl-CoA ligase gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an aryl-capping enzyme that supplies phenylacetic acid to the isopenicillin N-acyltransferase. *Biochemical Journal*, 395(1), 147-155.
117. Laskowski, R. A. (2009). PDBsum new things. *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D355-D359.
118. Lein, J. (1986). The Panlabs penicillin strain improvement program. *Overproduction of microbial metabolites.*, 105-139.
119. Leiter, E., Emri, T., Gyémánt, G., Nagy, I., Pócsi, I., Winkelmann, G., & Pócsi, I. (2001). Penicillin V production by *Penicillium chrysogenum* in the presence of Fe³⁺ and in low-iron culture medium. *Folia microbiologica*, 46(2), 127-132.

120. Leman, J. K., Weitzner, B. D., Lewis, S. M., Adolf-Bryfogle, J., Alam, N., Alford, R. F., ... & Bonneau, R. (2020). Macromolecular modeling and design in Rosetta: recent methods and frameworks. *Nature methods*, 17(7), 665-680.
121. Li, Q., Herrler, M., Landsberger, N., Kaludov, N., Ogryzko, V. V., Nakatani, Y., & Wolffe, A. P. (1998). *Xenopus* NF-Y pre-sets chromatin to potentiate p300 and acetylation-responsive transcription from the *Xenopus hsp70* promoter in vivo. *The EMBO Journal*, 17(21), 6300-6315.
122. Liang, S. G., & Maity, S. N. (1998). Pathway of complex formation between dna and three subunits of CBF/NF-Y: Photocross-linking analysis of DNA-protein interaction and characterization of equilibrium steps of subunit interaction and DNA binding. *Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31590-31598.
123. Liberati, C., Ronchi, A., Lievens, P., Ottolenghi, S., & Mantovani, R. (1998). NF-Y organizes the γ -globin CCAAT boxes region. *Journal of Biological Chemistry*, 273(27), 16880-16889.
124. Littlejohn, T. G., & Hynes, M. J. (1992). Analysis of the site of action of the *amdR* product for regulation of the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics MGG*, 235(1), 81-88.
125. Litzka, O., Papagiannopolous, P., Davis, M. A., Hynes, M. J., & Brakhage, A. A. (1998). The penicillin regulator PENR1 of *Aspergillus nidulans* is a HAP-like transcriptional complex. *European journal of biochemistry*, 251(3), 758-767.
126. Litzka, O., Then Bergh, K., & Brakhage, A. A. (1996). The *Aspergillus nidulans* penicillin-biosynthesis gene *aat* (*penDE*) is controlled by a CCAAT-containing DNA element. *European journal of biochemistry*, 238(3), 675-682.
127. Liu, H., Sadygov, R. G., & Yates, J. R. (2004). A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Analytical chemistry*, 76(14), 4193-4201.
128. Liu, J., Perumal, N. B., Oldfield, C. J., Su, E. W., Uversky, V. N., & Dunker, A. K. (2006). Intrinsic disorder in transcription factors. *Biochemistry*, 45(22), 6873-6888.
129. López-Berges, M. S., Capilla, J., Turrà, D., Schafferer, L., Matthijs, S., Jöchl, C., ... & Di Pietro, A. (2012). HapX-mediated iron homeostasis is essential for rhizosphere competence and virulence of the soilborne pathogen *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell*, 24(9), 3805-3822.
130. López-Nieto, M. J., Ramos, F. R., Luengo, J. M., & Martín, J. F. (1985). Characterization of the biosynthesis in vivo of α -aminoadipyl-cysteinyl-valine in *Penicillium chrysogenum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 22(5), 343-351.
131. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome resolution core particle at 2.8 Å. *Nature*, 389(6648), 251-260.
132. Maity, S.N. & de Crombrughe, B. Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription, *Trends Biochem. Sci.* 23 (1998) 174–178.
133. Mantovani, R. (1998). A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic acids research*, 26(5), 1135-1143.
134. Mantovani, R. (1999). The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene*, 239(1), 15-27.
135. Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., & Antunes, F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox biology*, 2, 535-562.
136. Mariño-Ramírez, L., Spouge, J. L., Kanga, G. C., & Landsman, D. (2004). Statistical analysis of over-represented words in human promoter sequences. *Nucleic acids research*, 32(3), 949-958.
137. Martín, J. F. (2000). Molecular control of expression of penicillin biosynthesis genes in fungi: regulatory proteins interact with a bidirectional promoter region. *Journal of bacteriology*, 182(9), 2355-2362.
138. Matuoka, K., & Chen, K. Y. (1999). Nuclear factor Y (NF-Y) and cellular senescence. *Experimental cell research*, 253(2), 365-371.

139. McIlwain, S., Mathews, M., Bereman, M. S., Rubel, E. W., MacCoss, M. J., & Noble, W. S. (2012). Estimating relative abundances of proteins from shotgun proteomics data. *BMC bioinformatics*, *13*(1), 1-6.
140. McNabb, D. S., & Pinto, I. (2005). Assembly of the hap2p/hap3p/hap4p/hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, *4*(11), 1829-1839.
141. McNabb, D. S., Tseng, K. A., & Guarente, L. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* Hap5p homolog from fission yeast reveals two conserved domains that are essential for assembly of heterotetrameric CCAAT-binding factor. *Molecular and cellular biology*, *17*(12), 7008-7018.
142. McNabb, D. S., Xing, Y., & Guarente, L. (1995). Cloning of yeast HAP5: a novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes & development*, *9*(1), 47-58.
143. Meijer, W. H., Gidijala, L., Fekken, S., Kiel, J. A., van den Berg, M. A., Lascaris, R., ... & van der Klei, I. J. (2010). Peroxisomes are required for efficient penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Applied and environmental microbiology*, *76*(17), 5702-5709.
144. Mendoza-Mendoza, A., Eskova, A., Weise, C., Czajkowski, R., & Kahmann, R. (2009). Hap2 regulates the pheromone response transcription factor prf1 in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, *72*(3), 683-698.
145. Mercier, A., Pelletier, B., & Labbé, S. (2006). A transcription factor cascade involving Fep1 and the CCAAT-binding factor Php4 regulates gene expression in response to iron deficiency in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell*, *5*(11), 1866-1881.
146. Meyer, P. (2001). Chromatin remodelling. *Current opinion in plant biology*, *4*(5), 457-462
147. Molina, L., & Kahmann, R. (2007). An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *The Plant Cell*, *19*(7), 2293-2309.
148. Moreno-Vargas, L., Correa-Basurto, J., Maroun, R. C., & Fernández, F. J. (2012). Homology modeling of the structure of acyl coA: isopenicillin N-acyltransferase (IAT) from *Penicillium chrysogenum*. IAT interaction studies with isopenicillin-N, combining molecular dynamics simulations and docking. *Journal of molecular modeling*, *18*(3), 1189-1205.
149. Mulder, W., Scholten, I. H., de Boer, R. W., & Grivell, L. A. (1994). Sequence of the HAP3 transcription factor of *Kluyveromyces lactis* predicts the presence of a novel 4-cysteine zinc-finger motif. *Molecular and General Genetics MGG*, *245*(1), 96-106.
150. Murali, M., Sudisha, J., Amruthesh, K. N., Ito, S. I., & Shetty, H. S. (2013). Rhizosphere fungus *Penicillium chrysogenum* promotes growth and induces defence-related genes and downy mildew disease resistance in pearl millet. *Plant Biology*, *15*(1), 111-118.
151. Nagata, O., Takashima, T., Tanaka, M., & Tsukagoshi, N. (1993). *Aspergillus nidulans* nuclear proteins bind to a CCAAT element and the adjacent upstream sequence in the promoter region of the starch-inducible Taka-amylase A gene. *Molecular and General Genetics MGG*, *237*(1), 251-260.
152. Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., & Currie, R. A. (1996). Subunit association and DNA binding activity of the heterotrimeric transcription factor NF-Y is regulated by cellular redox. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(46), 28784-28791.
153. Nardini, M., Gnesutta, N., Donati, G., Gatta, R., Forni, C., Fossati, A., ... & Mantovani, R. (2013). Sequence-specific transcription factor NF-Y displays histone-like DNA binding and H2B-like ubiquitination. *Cell*, *152*(1-2), 132-143.
154. Narendja, F.M. Davis, M.A. Hynes, M.J. AnCF, the CCAAT binding complex of *Aspergillus nidulans*, is essential for the formation of a DNase I-hypersensitive site in the 5' region of the *amdS* gene, *Mol. Cell. Biol.* *19* (1999) 6523–6531
155. Nguyen, C., Bolotin-Fukuhara, M., Wésolowski-Louvel, M., & Fukuhara, H. (1995). The respiratory system of *Kluyveromyces lactis* escapes from HAP2 control. *Gene*, *152*(1), 113-115.

156. Oldfield, A. J., Yang, P., Conway, A. E., Cinghu, S., Freudenberg, J. M., Yellaboina, S., & Jothi, R. (2014). Histone-fold domain protein NF-Y promotes chromatin accessibility for cell type-specific master transcription factors. *Molecular cell*, *55*(5), 708-722.
157. Olesen, J. T., & Guarente, L. (1990). The HAP2 subunit of yeast CCAAT transcriptional activator contains adjacent domains for subunit association and DNA recognition: model for the HAP2/3/4 complex. *Genes & development*, *4*(10), 1714-1729.
158. Olesen, J. T., Fikes, J. D., & Guarente, L. E. O. N. A. R. D. (1991). The *Schizosaccharomyces pombe* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* HAP2 reveals selective and stringent conservation of the small essential core protein domain. *Molecular and cellular biology*, *11*(2), 611-619.
159. Ozcengiz, G., & Demain, A. L. (2013). Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. *Biotechnology advances*, *31*(2), 287-311.
160. Papagiannopoulos, P., Andrianopoulos, A., Sharp, J. A., Davis, M. A., & Hynes, M. J. (1996). The *hapC* gene of *Aspergillus nidulans* is involved in the expression of CCAAT-containing promoters. *Molecular and General Genetics MGG*, *251*(4), 412-421.
161. Pathak, A., Nowell, R. W., Wilson, C. G., Ryan, M. J., & Barraclough, T. G. (2020). Comparative genomics of Alexander Fleming's original *Penicillium* isolate (IMI 15378) reveals sequence divergence of penicillin synthesis genes. *Scientific reports*, *10*(1), 1-10
162. Pfeifer, K., Kim, K. S., Kogan, S., & Guarente, L. (1989). Functional dissection and sequence of yeast HAP1 activator. *Cell*, *56*(2), 291-301.
163. Pinkham, J. L., & Guarente, L. E. O. N. A. R. D. (1985). Cloning and molecular analysis of the *HAP2* locus: a global regulator of respiratory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *5*(12), 3410-3416.
164. Pitt, J. I., & Cruickshank, R. H. (1990). Speciation and synonymy in *Penicillium* subgenus *Penicillium*—towards a definitive taxonomy. In *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification* (pp. 103-119). Springer, Boston, MA.
165. Powell, D. W., Weaver, C. M., Jennings, J. L., McAfee, K. J., He, Y., Weil, P. A., & Link, A. J. (2004). Cluster analysis of mass spectrometry data reveals a novel component of SAGA. *Molecular and cellular biology*, *24*(16), 7249-7259.
166. Qiu, P. (2003). Recent advances in computational promoter analysis in understanding the transcriptional regulatory network. *Biochemical and biophysical research communications*, *309*(3), 495-501.
167. Queener, S. W., Sebek, O. K., & Vezina, C. (1978). Mutants blocked in antibiotic synthesis. *Annual Reviews in Microbiology*, *32*(1), 593-636.
168. Quino, M. J. Identificación de una aspartato-proteasa producida por *Amylomyces rouxii*, silenciamiento del gen que la codifica y efecto sobre la actividad tirosinasa (2011). Universidad Autónoma Metropolitana.
169. Raper, K. B., & Thom, C. (1949). A manual of the *Penicillia*. *A manual of the Penicillia*.
170. Raper, K. B., Alexander, D. F., & Coghill, R. D. (1944). Penicillin: II. Natural variation and penicillin production in *Penicillium notatum* and allied species. *Journal of bacteriology*, *48*(6), 639-659.
171. Ridenour, J. B., & Bluhm, B. H. (2014). The HAP complex in *Fusarium verticillioides* is a key regulator of growth, morphogenesis, secondary metabolism, and pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, *69*, 52-64.
172. Romier, C., Cocchiarella, F., Mantovani, R., & Moras, D. (2003). The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(2), 1336-1345.

173. Roussel, S., Sudre, B., Reboux, G., Waser, M., Buchele, G., Vacheyrou, M., ... & Piarroux, R. (2011). Exposure to moulds and actinomycetes in Alpine farms: a nested environmental study of the PASTURE cohort. *Environmental research*, *111*(6), 744-750.
174. Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B (2010) Food and Indoor Fungi. CBS-KNAW-Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, pp 1–398.
175. Samson, R. A., Hadlok, R., & Stolk, A. C. (1977). A taxonomic study of the *Penicillium chrysogenum* series. *Antonie van Leeuwenhoek*, *43*(2), 169-175.
176. Sandman, K., Krzycki, J. A., Dobrinski, B., Lurz, R., & Reeve, J. N. (1990). Hmf, a DNA-binding protein isolated from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*, is most closely related to histones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(15), 5788-5791.
177. Schrettl, M., Beckmann, N., Varga, J., Heinekamp, T., Jacobsen, I. D., Jöchl, C., ... & Haas, H. (2010). HapX-mediated adaptation to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS pathogens*, *6*(9), 1-12.
178. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research*, *31*(13), 3381-3385.
179. Scott, J., Untereiner, W. A., Wong, B., Straus, N. A., & Malloch, D. (2004). Genotypic variation in *Penicillium chrysogenum* from indoor environments. *Mycologia*, *96*(5), 1095-1105.
180. Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thåström, A., Field, Y., Moore, I. K., ... & Widom, J. (2006). A genomic code for nucleosome positioning. *Nature*, *442*(7104), 772-778.
181. Schwab, E. K., Bok, J. W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., Keller, N. P. (2007). Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryot. Cell* *6*(9), 1656-1664.
182. Sierra, E. M & León M. Q. (2019). Ensayos clínicos en pacientes con cáncer de pulmón en Matanzas. *Revista Médica Electrónica*, *41*(5), 1684-1824.
183. Sinha, S., Kim, I. S., Sohn, K. Y., De Crombrugghe, B., & Maity, S. N. (1996). Three classes of mutations in the A subunit of the CCAAT-binding factor CBF delineate functional domains involved in the three-step assembly of the CBF-DNA complex. *Molecular and cellular biology*, *16*(1), 328-337.
184. Sinha, S., Maity, S. N., Lu, J., & De Crombrugghe, B. (1995). Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(5), 1624-1628.
185. Skatrud, P. L., & Queener, S. W. (1989). An electrophoretic molecular karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium*. *Gene*, *78*(2), 331-338.
186. Smith, D. J., Burnham, M. K., Bull, J. H., Hodgson, J. E., Ward, J. M., Browne, P., ... & Turner, G. (1990). Beta-lactam antibiotic biosynthetic genes have been conserved in clusters in prokaryotes and eukaryotes. *The EMBO journal*, *9*(3), 741-747.
187. Spröte, P., Hynes, M. J., Hortschansky, P., Shelest, E., Scharf, D. H., Wolke, S. M., & Brakhage, A. A. (2008). Identification of the novel penicillin biosynthesis gene *aatB* of *Aspergillus nidulans* and its putative evolutionary relationship to this fungal secondary metabolism gene cluster. *Molecular microbiology*, *70*(2), 445-461.
188. Steidl, S., Hynes, M. J., & Brakhage, A. A. (2001). The *Aspergillus nidulans* multimeric CCAAT binding complex AnCF is negatively autoregulated via its hapB subunit gene. *Journal of Molecular Biology*, *306*(4), 643-653.
189. Steidl, S., Papagiannopoulos, P., Litzka, O., Andrianopoulos, A., Davis, M. A., Brakhage, A. A., & Hynes, M. J. (1999). AnCF, the CCAAT binding complex of *Aspergillus nidulans*, contains products of the *hapB*, *hapC*, and *hapE* genes and is required for activation by the pathway-specific regulatory gene *amdR*. *Molecular and cellular biology*, *19*(1), 99-106.

190. Steidl, S., Tüncher, A., Goda, H., Guder, C., Papadopoulou, N., Kobayashi, T., ... & Brakhage, A. A. (2004). A single subunit of a heterotrimeric CCAAT-binding complex carries a nuclear localization signal: piggy back transport of the pre-assembled complex to the nucleus. *Journal of molecular biology*, *342*(2), 515-524.
191. Steinegger, M., Meier, M., Mirdita, M., Vöhringer, H., Haunsberger, S. J., & Söding, J. (2019). HH-suite3 for fast remote homology detection and deep protein annotation. *BMC bioinformatics*, *20*(1), 1-15.
192. Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J., & Schwede, T. (2020). QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, *36*(6), 1765-1771.
193. Studer, G., Tauriello, G., Bienert, S., Biasini, M., Johner, N., & Schwede, T. (2021). ProMod3—A versatile homology modelling toolbox. *PLoS computational biology*, *17*(1), 1-18.
194. Suárez, T., & Peñalva, M. A. (1996). Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent pcbAB–pcbC promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Molecular microbiology*, *20*(3), 529-540.
195. Sybirna, K., Guiard, B., Li, Y. F., Bao, W. G., Bolotin-Fukuhara, M., & Delahodde, A. (2005). A new Hansenula polymorpha HAP4 homologue which contains only the N-terminal conserved domain of the protein is fully functional in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, *47*(3), 172-181.
196. Tag, A., Hicks, J., Garifullina, G., Ake Jr, C., Phillips, T. D., Beremand, M., & Keller, N. (2000). G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Molecular microbiology*, *38*(3), 658-665.
197. Tanaka, A., Kato, M., Nagase, T., Kobayashi, T., & Tsukagoshi, N. (2002). Isolation of genes encoding novel transcription factors which interact with the Hap complex from *Aspergillus* species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, *1576*(1-2), 176-182.
198. Thom, C. (1910). *Cultural studies of species of Penicillium* (Vol. 118). US Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry.
199. Thön, M., Al Abdallah, Q., Hortschansky, P., Scharf, D. H., Eisendle, M., Haas, H., & Brakhage, A. A. (2010). The CCAAT-binding complex coordinates the oxidative stress response in eukaryotes. *Nucleic acids research*, *38*(4), 1098-1113.
200. Thön, M., Al-Abdallah, Q., Hortschansky, P., & Brakhage, A. A. (2007). The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: impact on development and oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(37), 27259-27269.
201. Thuerig, B., Felix, G., Binder, A., Boller, T., & Tamm, L. (2005). An extract of *Penicillium chrysogenum* elicits early defense-related responses and induces resistance in *Arabidopsis thaliana* independently of known signalling pathways. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *67*(3-5), 180-193.
202. Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., ... & Arst Jr, H. N. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal*, *14*(4), 779-790.
203. Tramontano, A., Leplae, R., & Morea, V. (2001). Analysis and assessment of comparative modeling predictions in CASP4. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *45*(S5), 22-38.
204. Tsukagoshi, N., Kobayashi, T., & Kato, M. (2001). Regulation of the amyolytic and (hemi-) cellulolytic genes in aspergilli. *The Journal of general and applied microbiology*, *47*(1), 1-19.
205. Tüncher, A., Spröte, P., Gehrke, A., & Brakhage, A. A. (2005). The CCAAT-binding complex of eukaryotes: evolution of a second NLS in the HapB subunit of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* despite functional conservation at the molecular level between yeast, *A. nidulans* and human. *Journal of molecular biology*, *352*(3), 517-533.

206. Ullán, R. V., Teijeira, F., Guerra, S. M., Vaca, I., & Martín, J. F. (2010). Characterization of a novel peroxisome membrane protein essential for conversion of isopenicillin N into cephalosporin C. *Biochemical Journal*, *432*(2), 227-236.
207. Vakser, I. A. (2014). Protein-protein docking: From interaction to interactome. *Biophysical Journal*, *107*(8), 1785-1793.
208. van den Berg M. A. *Penicillium chrysogenum*: Genomics of an antibiotics producer. In Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., Mukherjee, M., & Kubicek, C. P. (Eds.). (2013). *Genomics of soil- and plant-associated fungi* (Vol. 36). Springer Science & Business Media. DOI 10.1007/978-3-642-39339-6_10
209. van den Berg, M. A. (2010). Functional characterisation of penicillin production strains. *Fungal Biology Reviews*, *24*(1-2), 73-78.
210. van den Berg, M. A. (2011). Impact of the *Penicillium chrysogenum* genome on industrial production of metabolites. *Applied microbiology and biotechnology*, *92*(1), 45-53.
211. van den Berg, M. A., Westerlaken, I., Leeftang, C., Kerkman, R., & Bovenberg, R. A. (2007). Functional characterization of the penicillin biosynthetic gene cluster of *Penicillium chrysogenum* Wisconsin54-1255. *Fungal Genetics and Biology*, *44*(9), 830-844.
212. van der Lende, T. R., van de Kamp, M., van den Berg, M., Sjollem, K., Bovenberg, R. A., Veenhuis, M., ... & Driessen, A. J. (2002). δ -(1- α -Aminoacyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, that mediates the first committed step in penicillin biosynthesis, is a cytosolic enzyme. *Fungal Genetics and Biology*, *37*(1), 49-55.
213. van Heeswijk, R., & Hynes, M. J. (1991). The *amdR* product and a CCAAT-binding factor bind to adjacent, possibly overlapping DNA sequences in the promoter region of the *Aspergillus nidulans amdS* gene. *Nucleic acids research*, *19*(10), 2655-2660.
214. Veiga, T., Gombert, A. K., Landes, N., Verhoeven, M. D., Kiel, J. A., Krikken, A. M., ... & Daran, J. M. (2012b). Metabolic engineering of β -oxidation in *Penicillium chrysogenum* for improved semi-synthetic cephalosporin biosynthesis. *Metabolic Engineering*, *14*(4), 437-448.
215. Venters, B. J., & Pugh, B. F. (2009). How eukaryotic genes are transcribed. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *44*(2-3), 117-141.
216. Wang, F. Q., Zhong, J., Zhao, Y., Xiao, J., Liu, J., Dai, M., ... & Duan, B. (2014). Genome sequencing of high-penicillin producing industrial strain of *Penicillium chrysogenum*. In *BMC genomics*, *15*(1), 1-12.
217. Washburn, M. P., Wolters, D., & Yates, J. R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature biotechnology*, *19*(3), 242-247.
218. Weber, S. S., Bovenberg, R. A., & Driessen, A. J. (2012). Biosynthetic concepts for the production of β -lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology Journal*, *7*(2), 225-236.
219. Weber, S. S., Kovalchuk, A., Bovenberg, R. A., & Driessen, A. J. (2012). The ABC transporter ABC40 encodes a phenylacetic acid export system in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genetics and Biology*, *49*(11), 915-921.
220. Weidner, G., Steidl, S., & Brakhage, A. A. (2001). The *Aspergillus nidulans* homoaconitase gene *lysF* is negatively regulated by the multimeric CCAAT-binding complex AnCF and positively regulated by GATA sites. *Archives of microbiology*, *175*(2), 122-132.
221. Woo, P. C., Tam, E. W., Chong, K. T., Cai, J. J., Tung, E. T., Ngan, A. H., ... & Yuen, K. Y. (2010). High diversity of polyketide synthase genes and the melanin biosynthesis gene cluster in *Penicillium marneffei*. *The FEBS journal*, *277*(18), 3750-3758.
222. Xing, Y., Fikes, J. D., & Guarente, L. (1993). Mutations in yeast HAP2/HAP3 define a hybrid CCAAT box binding domain. *The EMBO Journal*, *12*(12), 4647-4655.

- 223.Xing, Y., Zhang, S., Olesen, J. T., Rich, A., & Guarente, L. (1994). Subunit interaction in the CCAAT-binding heteromeric complex is mediated by a very short alpha-helix in HAP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(8), 3009-3013.
- 224.Xu, X., Yang, J., An, Y., Pan, Y., & Liu, G. (2012). Over-expression of pcvA involved in vesicle–vacuolar fusion affects the conidiation and penicillin production in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology letters*, *34*(3), 519-526.
- 225.Yan, Y., Tao, H., He, J., & Huang, S. Y. (2020). The HDock server for integrated protein–protein docking. *Nature protocols*, *15*(5), 1829-1852.
- 226.Yan, Y., Wen, Z., Wang, X., & Huang, S. Y. (2017). Addressing recent docking challenges: a hybrid strategy to integrate template-based and free protein-protein docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *85*(3), 497-512.
- 227.Yin, W., & Keller, N. P. (2011). Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *The Journal of Microbiology*, *49*(3), 329-339.
- 228.Yoshioka, Y., Suyari, O., Yamada, M., Ohno, K., Hayashi, Y., & Yamaguchi, M. (2007). Complex interference in the eye developmental pathway by *Drosophila* NF-YA. *genesis*, *45*(1), 21-31.
- 229.Zeilinger, S., Mach, R. L., & Kubicek, C. P. (1998). Two adjacent protein binding motifs in the *cbh2* (cellobiohydrolase II-encoding) promoter of the fungus *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cooperate in the induction by cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(51), 34463-34471.
- 230.Zeilinger, S., Schmoll, M., Pail, M., Mach, R. L., & Kubicek, C. P. (2003). Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter *cbh2* associated with cellulase induction. *Molecular Genetics and Genomics*, *270*(1), 46-55.
- 231.Zybailov, B., Mosley, A. L., Sardiu, M. E., Coleman, M. K., Florens, L., & Washburn, M. P. (2006). Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of proteome research*, *5*(9), 2339-2347.

X. Anexos

Anexo I. Medios de cultivo

Medio Power: Medio para la esporulación y mantenimiento de *Penicillium chrysogenum*. Se esteriliza por autoclave a 120°C durante 20 minutos.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Sacarosa</i>	25 g
<i>Lactosa</i>	5 g
<i>Peptona de caseína</i>	2.5 g
<i>KCl</i>	26.1 g
<i>NaCl</i>	2 g
<i>NaNO₃</i>	1.5 g
<i>K₂HPO₄</i>	1000 mL
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	0.25g
<i>Sales Power</i>	1000 µL
<i>Agar bacteriológico</i>	20 g
<i>Agua destilada</i>	1000 mL

Sales Power: Se mezcla perfectamente y se conserva en un frasco limpio a temperatura ambiente (antes de cada uso agitar para resuspender los sedimentos).

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
<i>KH₂PO₄</i>	6 g
<i>FeSO₄·7H₂O</i>	1 g
<i>FeCl₃·6H₂O</i>	4 g
<i>CuSO₄·7H₂O</i>	0.2 g
<i>Agua destilada</i>	200 mL

Medio PMMY: Para obtención de micelio. Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Glucosa</i>	40 g
<i>NaNO₃</i>	3 g
<i>Extracto de levadura</i>	2g
<i>KCl</i>	0.5 g
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	0.5g
<i>FeSO₄·7H₂O</i>	0.01 g
<i>Agua destilada</i>	1000 mL

MCFP: Medio complejo de producción de penicilina de *P. chrysogenum*. Se ajusta el pH a 6.1 con el 90% del volumen final y enseguida se lleva al aforo, se esteriliza por autoclave a 120°C durante 20 minutos.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Lactosa</i>	55 g
<i>Sólidos de maceración de maíz</i>	35 g
<i>CaCO₃</i>	10 g
<i>KH₂PO₄</i>	7 g
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	3g
<i>Fenilacetato potásico al 40% (p/v)</i>	10 mL
<i>Agua destilada</i>	1000 mL

MCIP: Medio complejo de inóculo de *P. chrysogenum* para la inducción de estrés oxidativo y medición de penicilina. Se ajusta el pH a 5.7 con el 90% del volumen final y enseguida se lleva al aforo, se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos (antes de su uso se resuspenden los sólidos sedimentados).

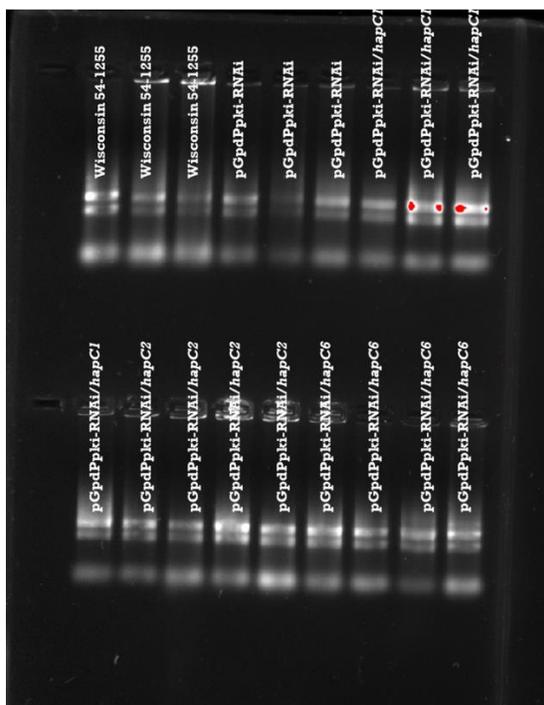
<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Sacarosa</i>	20 g
<i>Sólidos de maceración de maíz</i>	20 g
<i>Extracto de levadura</i>	10 g
<i>Agua destilada</i>	1000 mL

Medio de digerido de soya y caseína (TSB): Medio líquido para enriquecimiento de uso general, utilizado en procedimientos cualitativos para la prueba de esterilidad y para el enriquecimiento y cultivo de microorganismos aerobios no exigentes en exceso.

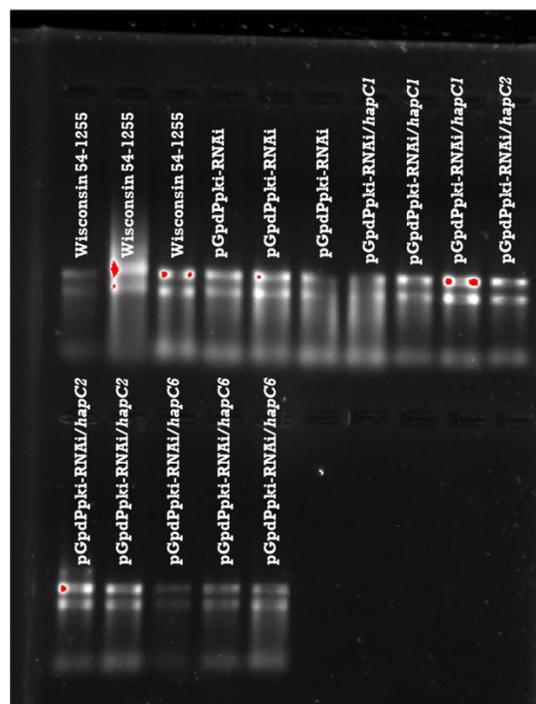
<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Digerido pancreático de caseína</i>	17 g
<i>Digerido péptico de harina de soja</i>	3 g
<i>Glucosa (dextrosa)</i>	2. 5g
<i>Cloruro sódico</i>	5 g
<i>Fosfato dipotásico de hidrógeno</i>	2.5g
<i>Agua destilada</i>	1000 mL

Anexo II. Extracción de RNA y purificación con DNasas

La electroforesis muestra que se obtuvo RNA, se observan las bandas características de un gel de este tipo. En la electroforesis del crudo de RNA se observan bandas superiores, indicativo de DNA genómico, el cual fue degradado mediante el tratamiento con DNasas (Figura 40).



Electroforesis en gel de agarosa de RNA extraído.



Electroforesis en gel de agarosa de RNA extraído tratado con DNasas.

Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa del RNA total extraído, a la izquierda se observa el crudo de la extracción y a la derecha se muestra el RNA tratado con DNasas.

En el Cuadro 7, se observa que de las cepas control, tanto como de las cepas silenciadas para el gen HapC, se tiene RNA en cantidad y de calidad. Es importante mencionar que el RNA no se ha purificado, por lo cual contiene moléculas usadas en la extracción.

Cuadro 7. Cuantificación de RNA por cepa, en la izquierda se muestra la cuantificación del RNA extraído en crudo y a la derecha el RNA tratado con DNasas, se muestran la relación 260/280 y 260/230 y la cantidad obtenida en ng/μL.

		Cuantificación de RNA extraído			Cuantificación de RNA tratado con DNasas					
		Cepa	1	2	3	Cepa	1	2	3	
Cepas control	<i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 541255		1.84	1.955	1.83	<i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	1.81	1.81	2.05	260/280
			0.645	1.165	0.425		0.72	0.7	1.57	260/230
			190.8	489.3	259.7		119.6	117.7	508.7	ng/mL
	<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi		1.98	2.025	2.02	<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi	1.98	1.95	2.01	260/280
			1.235	1.5	1.35		1.07	1.1	1.25	260/230
			1161.2	788.7	809.5		559.8	386.5	386.5	ng/mL
Cepas silenciadas	<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi/hapC1		2.095	1.66	1.77	<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi/hapC1	2.02	2.01	2.03	260/280
			1.56	0.335	0.38		1.47	1.53	1.75	260/230
			1281.9	265.9	504.6		444.8	587.9	594.7	ng/mL
	<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi/hapC6		1.93	1.865	1.905	<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi/hapC6	1.98	1.89	1.98	260/280
			1	0.865	0.665		0.76	0.88	0.92	260/230
			487.8	544.4	556.1		385	208.4	265.3	ng/mL

Anexo III. Síntesis de cDNA y cuantificación

De igual manera que en la sección anterior, se observa que el cDNA sintetizado se encuentra en cantidad y calidad para realizar trabajos posteriores, como determinar el nivel de atenuación de la expresión de la proteína HapC mediante la técnica de qPCR.

Cuadro 8. Cuantificación de cDNA por cepa, se muestran la relación 260/280 y 260/230 y la cantidad obtenida en ng/μL.

		Cuantificación de cDNA sintetizado				
		Cepa	1	2	3	
Cepas control	<i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255		1.55	1.55	1.56	260/280
			1.83	1.78	1.88	260/230
			565	930	828.2	ng/μL
	<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi		1.55	1.56	1.56	260/280
			1.88	1.85	1.8	260/230
			722.8	735.1	810.2	ng/μL
Cepas silenciadas	<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi/hapC1		1.56	1.56	1.56	260/280
			1.83	1.83	1.7	260/230
			817.4	716.4	674.6	ng/μL
	<i>P. chrysogenum</i> pGdpki-RNAi/hapC6		1.56	1.56	1.55	260/280
			1.88	1.82	1.78	260/230
			930	773	521.4	ng/μL

Anexo IV. Estrés oxidante en micelio

En las **Figuras 29, 30 y 31**, se muestran fotografías del bioensayo durante el tiempo de incubación. Cabe mencionar que se optó por usar una concentración de 200 mM en medio Power, debido a que a concentraciones menores las colonias crecen muy cercanas las unas con las otras, dificultando así la observación.

Se aprecia que todas las cepas son afectadas en su crecimiento radial conforme aumenta la concentración del agente oxidante. Es importante resaltar que, la cepa pGPgdpKi-RNAi/*hapC1* es la que presenta el menor crecimiento radial dentro de una misma condición. Se destaca que la cepa pGPgdpKi-RNAi/*hapC6* presentó un diámetro muy similar al de las cepas control Wisconsin 54-1255 y/o pGPgdpKi-RNAi, lo que no es consistente con los resultados de la expresión de *hapC*. Además, dentro de cada placa es difícil observar una diferencia en las distintas concentraciones de conidios para la misma cepa. Esto es indicativo de problemas intrínsecos de la técnica, como ejemplo, depender mucho de la manera en que se coloca el punto de aplicación, la forma de la gota y si se salpica, de modo que, aunque se tenga cuidado no es posible controlar estos aspectos, por esta razón, se decide poner los resultados presentados como un anexo.

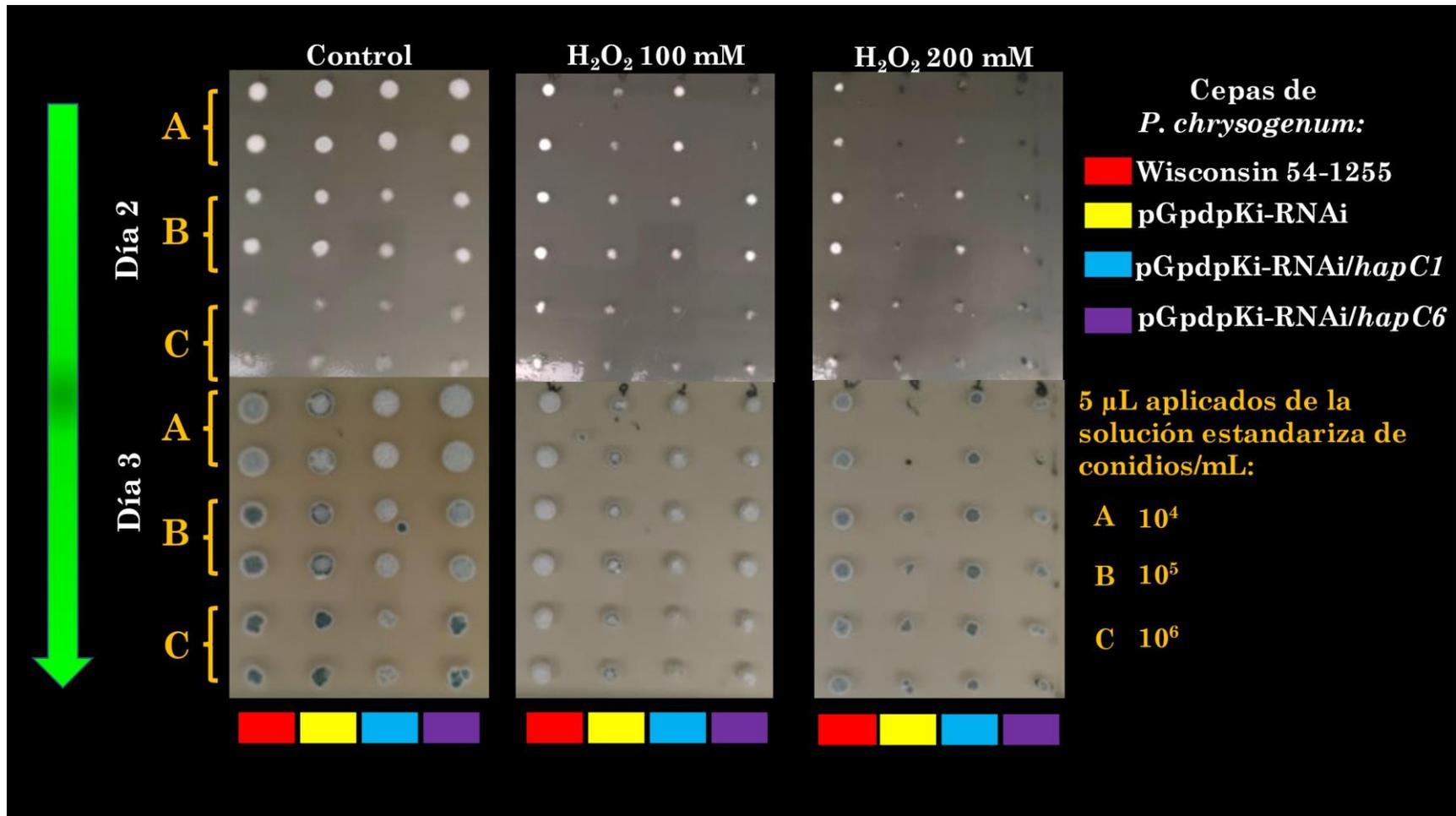


Figura 41. Fotografías del bioensayo de estrés oxidante en micelio a las 48 y 72 horas. Se muestra el día por fila y la condición por columna. Los colores debajo de las fotografías indican la cepa a la que pertenece la columna superior, mientras que las letras indican la concentración de conidios aplicada.

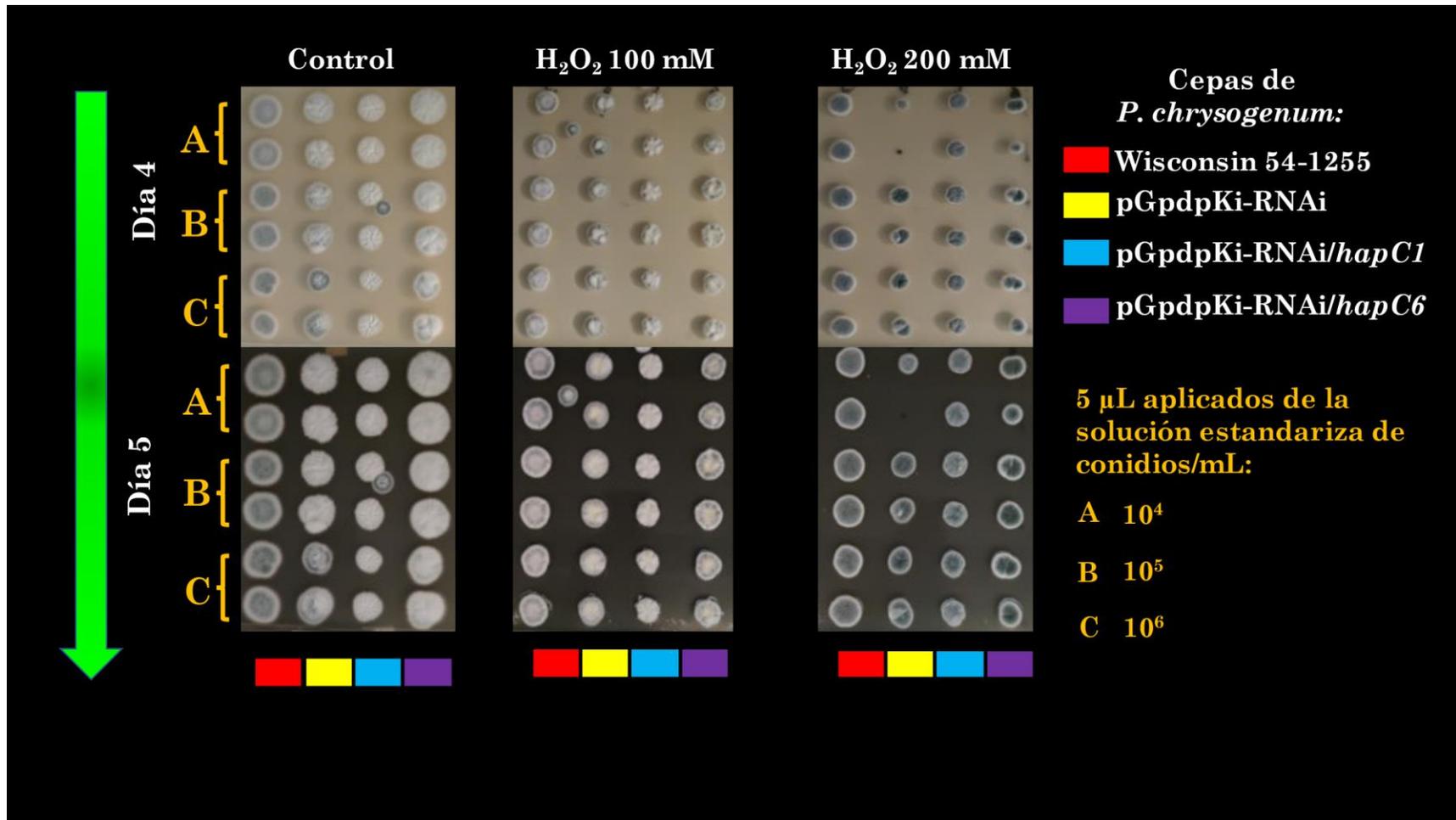


Figura 42. Fotografías del bioensayo de estrés oxidante en micelio a las 96 y 120 horas. Se muestra el día por fila y la condición por columna. Los colores debajo de las fotografías indican la cepa a la que pertenece la columna superior, mientras que las letras indican la concentración de conidios aplicada.

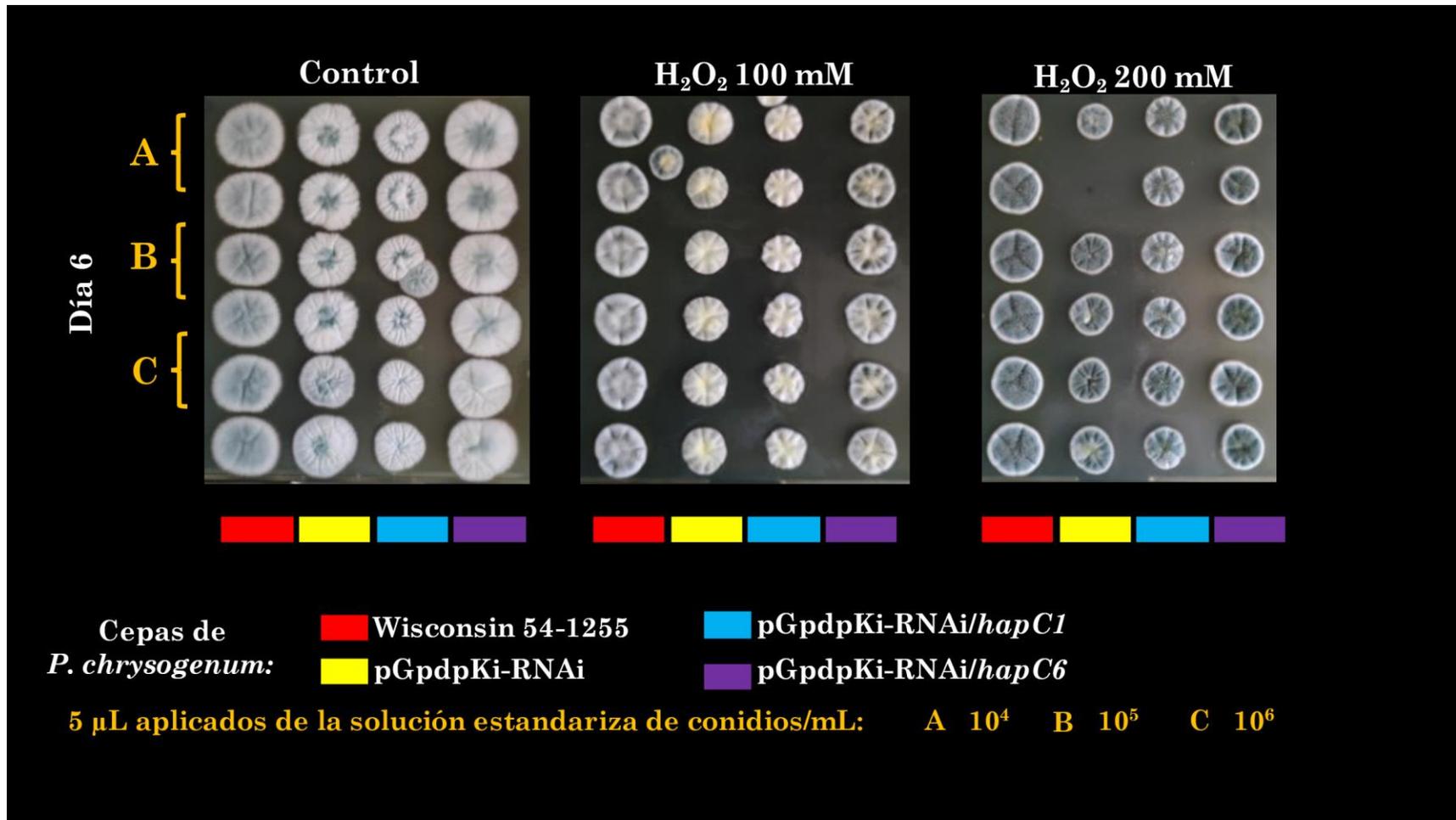


Figura 43. Fotografías del bioensayo de estrés oxidante en micelio a las 144 horas. Se muestra el día por fila y la condición por columna. Los colores debajo de las fotografías indican la cepa a la que pertenece la columna superior, mientras que las letras indican la concentración de conidios aplicada.

Anexo V. Estimación de la calidad de los modelos de homología y del docking molecular.

Se presentan los reportes de calidad de los modelos, así como el reporte de la calidad de las subunidades proteicas utilizados (para más información revisar <http://hdock.phys.hust.edu.cn/help.php#metric>). El puntaje de calidad por LGscore y Maxsub corresponde a lo siguiente:

Correcto	Bueno	Muy bueno
$1.5 < \text{LGscore}$	$3.0 \leq \text{LGscore} < 5.0$	$5.0 \leq \text{LGscore}$
$0.1 < \text{MaxSub}$	$0.5 \leq \text{MaxSub} < 0.8$	$0.8 \leq \text{MaxSub}$

1. Docking subunidades HapC:E

Cuadro 9. Información de la plantilla usada para el docking HapC:E.

Molécula	PDB ID	ID de cadena	Longitud de alineación	Cobertura	Seq_ID (%)
Receptor	4G92	C	117	1	99.1
Ligando	4G92	B	91	1	97.8

Nota: El modelo usado fue creado con base en la plantilla 4G92, por lo que se le asignó una alta confianza en HDock.

Cuadro 10. Reporte de ProQ V1.2 de la calidad de las subunidades HapE y HapC.

Receptor: HapE	
=====	
LGscore:	1.158
MaxSub:	0.134
Ligando: HapC	
=====	
LGscore:	0.931
MaxSub:	0.095
ADVERTENCIA: La calidad de la estructura de entrada es baja.	

2. Docking subunidades HapE:C:B (sin fragmento de subunidad B de interacción con DNA).

Cuadro 11. Información de la plantilla usada para el docking HapC:E:B

Molécula	PDB ID	ID de cadena	Longitud de alineación	Cobertura	Seq_ID (%)
Receptor	4G92	C	118	0.567	98.3
Ligando	4G92	A	28	1.000	100

Cuadro 12. Puntajes del docking HapC:E:B.

Parámetro	Modelo
Puntuación de acoplamiento	-227.11
Puntuación	0.8238
Ligando rmsd (Å)	92.09

Cuadro 13. Reporte de ProQ V1.2 de la calidad de las subunidades HapE:C y HapB (sin fragmento de unión a DNA).

Receptor: HapE:C	
=====	
LGscore:	4.735
MaxSub:	0.493
Ligando: HapB	
=====	
LGscore:	0.135
MaxSub:	0.012
ADVERTENCIA: La calidad de la estructura de entrada es baja.	

3. Docking HapE:C:B (fragmento de la subunidad B de con DNA)

Cuadro 14. Información de la plantilla usada para el docking HapC:E:B (fragmento de unión a DNA).

Molécula	PDB ID	ID de cadena	Longitud de alineación	Cobertura	Seq_ID (%)
Receptor	4G92	C	117	0.567	98..3
Ligando	4G92	A	61	1.000	100

Cuadro 15. Puntajes del docking HapC:E:B (fragmento de unión a DNA).

Parámetro	Modelo
Puntuación de acoplamiento	-235.63
Puntuación	0.8472
Ligando rmsd (Å)	1.05

Cuadro 16. Reporte de ProQ V1.2 de la calidad de las subunidades HapE:C y HapB (fragmento de unión a DNA).

Receptor: HapE:C	
=====	
LGscore:	4.735
MaxSub:	0.493
Ligand: HapB (fragmento de unión a DNA)	
=====	
LGscore:	0.043
MaxSub:	0.021
ADVERTENCIA: La calidad de la estructura de entrada es baja.	

4. Docking Complejo Hap:DNA

Cuadro 17. Información de la plantilla usada para el docking HapC:E:B.

Molécula	PDB ID	ID de cadena	Longitud de alineación	Cobertura	Seq_ID (%)
Receptor	4G92	C	118	0.439	98.3
Ligando	4G92	D	25	0.500	100

Cuadro 18. Puntajes del docking HapC:E:B.

Parámetro	Modelo
Puntuación de acoplamiento	-613.19
Puntuación	0.9999
Ligando rmsd (Å)	1.10

Cuadro 19. Reporte de ProQ V1.2 de la calidad del complejo HapE:C:B y ligando (DNA).

Receptor: HapE:C:B	
=====	
LGscore:	3.070
MaxSub:	0.310
Ligando: DNA	
=====	
Nota: No se realiza control de calidad para esta estructura de DNA ingresada.	



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00301

Matrícula: 2202800559

Estudio de la función del gen *hapC* de *Penicillium chrysogenum* y su participación en la regulación de la biosíntesis de penicilina.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 21 del mes de noviembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO
DRA. DULCE MARIA ANDRADE PAVON
DR. JESUS EDUARDO ZUÑIGA LEON
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO



CARLOS ISRAEL ALANIS DIAZ
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: CARLOS ISRAEL ALANIS DIAZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISO

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

VOCAL

DRA. DULCE MARIA ANDRADE PAVON

VOCAL

DR. JESUS EDUARDO ZUÑIGA LEON

SECRETARIO

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO