



**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN *Pichia pastoris* DE LOS
FACTORES TRANSCRIPCIONALES PcYap1, RsmA y AtfB DE *Penicillium
chrysogenum***

TESIS

Para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

PRESENTA

I.B.I. Wylma Dolores Pérez Pérez

DIRECTOR:

Dr. Francisco Fierro Fierro¹

ASESORES:

Dr. Javier Barrios González¹

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz²

¹Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa

²Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-Iztapalapa

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

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Mejoramiento Genético de Microorganismos Industriales del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección del Dr. Francisco Fierro Fierro. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de SEP-CONACyT No. 105628.

México D.F. a 18 de Julio del 2013

El H. Jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN *Pichia pastoris* DE LOS
FACTORES TRANSCRIPCIONALES PcYap1, RsmA y AtfB DE *Penicillium
chrysogenum*

Que presentó

I.B.I. Wylma Dolores Pérez Pérez

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Fierro Fierro.

Asesor: Dr. Javier Barrios González.

Asesora: Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz.

Jurado:

Presidente: Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz.

Secretario: Dr. Javier Barrios González.

Vocal: Dr. Francisco José Fernández Perrino.

Vocal: Dr. Ángel Eduardo Absalón Constantino.

The image shows four handwritten signatures in black ink. The top signature is the most prominent, followed by three others below it, each enclosed in a hand-drawn oval. The signatures are written in a cursive, somewhat stylized script.

DEDICATORIA

CUANDO QUIERES ALGO,
TODO EL UNIVERSO CONSPIRA PARA QUE REALICES TU DESEO

A mi familia:

La de sangre, la de corazón, la de vocación
Y a la que ahora solo es espíritu pero que me sigue visitando en sueños

AGRADECIMIENTOS

Espero no olvidar a nadie ahora que tengo la oportunidad de agradecer y si lo hago no fue intencional y me justifico con mi habilidad para ser una persona distraída.

Al Dr. Francisco Fierro por dirigir esta tesis, por la confianza en mi trabajo y mis capacidades, por los conocimientos transmitidos, por la disponibilidad y paciencia para sacar adelante este proyecto que he disfrutado en todo momento.

A los Doctores Javier Barrios y Concepción Gutiérrez por su asesoría en este proyecto, por siempre mostrar interés en el trabajo que realice, por su asistencia a todos los seminarios y por la dedicación en la revisión de esta tesis.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Ary, Corelly, Angie, Jessie, Lalo, Hugo, Mary, Vicky, Cristian, Ailed, Toño, Tere y Axel que hacen siempre más ligeras y divertidas las muchas horas en el laboratorio, por todas las comidas, cafés, dulces, platicas y porras, por los desvelos, frustraciones y éxitos compartidos, por hacerme reír y siempre mejorar mi ánimo cuando todo parecía y estaba mal. A mi "hermanito" Ulises sin el cual mucho de lo que está escrito en esta tesis no hubiera sucedido, gracias por la paciencia y por compartir un poco de lo mucho que sabes, espero seguir aprendiendo de ti y ese genial cerebro que tienes.

A Facundo mi gran amigo y confidente que ha estado en todo momento y a pesar de tantas cosas incondicionalmente conmigo, gracias por escuchar, apoyar, aconsejar y querer en esta vida. A mis amigos Normita, Oscar, Luis, Reyna, Holly, Nestor, Mimi, Conny, Isa, America, Arianna, Ivan y Mine que científicos o no me han apoyado y compartido momentos especiales y divertidos.

A mi familia por todo el apoyo y cariño brindado, a Lala y tía Lucy por ser mis mamás postizas y cuidarme con todo su corazón y amor por que con ustedes siempre me siento en casa, protegida y querida; a Santiago y Sofía (mis bebés) porque aunque no lo noten me enseñan el significado del amor incondicional, por sus sonrisas y besos que siempre me vuelven una mejor persona.

A mis hermanos por todas las locuras regaladas y las risas compartidas, por ser los mejores compañeros de vida; a mi mamá por su fortaleza, respaldo y apoyo, por ser la persona que es, porque por ti conozco el sentido de la constancia, la responsabilidad, la dedicación y el concepto de que no importa a lo que te dediques si lo haces bien puedes ser el mejor, a mi papá que es el centro de mi alma gracias por enseñarme a vivir, a sonreír, a querer, a confiar, a respirar (sabes bien de que hablo) y no importa la distancia ni el tiempo porque de corazón y por amor estamos siempre en el mismo lugar.

A la vida por permitirme vivir esta aventura, por tener la oportunidad de dedicarme a mi gran pasión, por la certeza de que nací para esto y por demostrarme una vez más que siempre acabamos llegando únicamente al lugar donde nos esperan.

RESUMEN

Los factores transcripcionales AP-1 son proteínas de unión a ADN del tipo bZIP (cremallera de leucina), que activan la transcripción en respuesta a diferentes estímulos, y están conservados en organismos eucariotas desde hongos a humanos. En *Sacharomyces cerevisiae* se han descrito varias proteínas del tipo AP-1, como las proteínas Yap, un grupo de 8 factores transcripcionales, y entre ellas Yap1, que participa en la resistencia a varios compuestos tóxicos y al peróxido de hidrógeno. En hongos filamentosos se han identificado proteínas homólogas a las proteínas Yap, como por ejemplo AfYAP1 de *Aspergillus fumigatus*, principal regulador en la respuesta de defensa contra especies reactivas de oxígeno en este hongo, o RsmA de *Aspergillus nidulans*, que posee sitios de unión específicos en el promotor del regulador de los genes de esterigmatocistina. En *Aspergillus parasiticus* se ha identificado el factor transcripcional AtfB, no perteneciente al tipo AP-1, que regula la tolerancia conidial al estrés oxidativo y se une a los promotores de siete genes del cluster de biosíntesis de aflatoxina. Existe cada vez mayor evidencia de que hay una relación estrecha entre la respuesta al estrés oxidativo y el metabolismo secundario

En *Penicillium chrysogenum*, el factor transcripcional Pta1 se une a la secuencia TTAGTAA en el promotor del gen de biosíntesis de penicilina *pcbAB*. Esta secuencia es idéntica o muy similar a las secuencias de unión de factores de transcripción de tipo Yap. Mediante una búsqueda en la base de datos GenBank hemos encontrado en el genoma de *P. chrysogenum* genes presuntamente homólogos de los genes que codifican AfYap1, RsmA y AtfB en especies de *Aspergillus*. El objetivo de este proyecto es expresar los genes codificantes de los factores transcripcionales PcYap1, RsmA y AtfB de *Penicillium chrysogenum* en *Pichia pastoris* como proteínas de fusión a His-tag, y purificarlos para su utilización posterior en análisis de unión a secuencias reguladoras del promotor *pcbAB*.

A partir de ADN genómico de *P. chrysogenum* se amplificaron mediante PCR los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB*, y a partir de ellos se obtuvieron sus secuencias codificantes (CDS), mediante PCR recombinante en el caso de *RsmA*, RT-PCR en el caso de *PcYap1*, y PCR convencional para *AtfB*. Las CDS de estos genes se clonaron en el vector de expresión pPICZ, obteniéndose los plásmidos pPICZ-A/PcYap1, pPICZ-B/RsmA y pPICZ-B/AtfB, los cuales fueron transformados por electroporación en *Pichia pastoris*. Para la obtención de las proteínas recombinantes heterólogas se cultivaron los transformantes de *P. pastoris*, seleccionados por fleomicina, que portaban cada uno de los plásmidos, utilizando metanol como inductor. La extracción de proteínas heterólogas

intracelulares se realizó después de 72 horas de incubación, y se purificaron por cromatografía de afinidad usando un gradiente de imidazol. Finalmente se analizaron las fracciones eluidas en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

En el caso de la proteína PcYap1, fusionada al epítipo *c-myc* y la cola de 6 histidinas, se esperaba un peso molecular de 66 kDa de acuerdo a la secuencia aminoacídica de la proteína de fusión, tamaño que se observó en los geles SDS-PAGE en una banda parcialmente purificada en la fracción correspondiente a la elución con 500 mM de imidazol. Para RsmA se esperaba una proteína de fusión de 35 kDa, la cual se detectó en los geles desde la fracción de la elución con 200 mM de imidazol, y purificada en la fracción eluida con 500 mM. En el caso de AtfB se esperaba una proteína de fusión de 38 kDa, que fue detectable en gel desde la elución con 200 mM de imidazol, y purificada en la elución con 500 mM de imidazol. Estas proteínas purificadas se utilizarán para realizar ensayos mediante la técnica EMSA, donde se analizará la unión de estas proteínas a secuencias reguladoras del promotor *pcbAB*.

ABSTRACT

Transcriptional factors AP-1 are bZIP (leucine zipper) DNA binding proteins that activate transcription in response to different stimuli, and are conserved in eukaryotes from fungi to humans. In *Saccharomyces cerevisiae* several types of AP-1 proteins have been described, such as Yap proteins, a group of 8 transcription factors, and among them Yap1, which participates in resistance to various toxic compounds and hydrogen peroxide. In filamentous fungi, proteins homologous to *S. cerevisiae* Yap proteins have been identified, such as *Aspergillus fumigatus* AfYap1, the main regulator in defense response against reactive oxygen species in this fungus, or RsmA from *Aspergillus nidulans*, which has specific binding sites in the promoter of the sterigmatocystin cluster regulator. In *Aspergillus parasiticus*, transcriptional factor AtfB, which does not belong to type AP-1, was identified as a regulator of conidial oxidative stress tolerance and it binds to seven gene promoters in the aflatoxin biosynthesis cluster. There is a growing body of evidence about a close relationship between oxidative stress response and secondary metabolism in fungi.

In *Penicillium chrysogenum*, transcription factor Pta1 binds to a TTAGTAA sequence in the *pcbAB* penicillin biosynthesis gene promoter. This sequence is identical or very similar to the binding sequences for transcription factors of the Yap type. By searching

the GenBank database we found in the *P. chrysogenum* genome putative orthologs to genes encoding AfYap1, RsmA and AtfB in *Aspergillus* species. The aim of this project was the expression of the genes encoding the transcription factors PcYap1, AtfB and RsmA of *Penicillium chrysogenum* in *Pichia pastoris* as fusion proteins to His-tag, and their purification for subsequent use in binding assays to *pcbAB* promoter regulatory sequences.

From genomic DNA of *P. chrysogenum*, the *PcYap1*, *RsmA* and *AtfB* genes were amplified by PCR. The coding sequences (CDS) of the genes were obtained by different methods: recombinant PCR for *RsmA*, RT-PCR for *PcYap1*, and conventional PCR for *AtfB*. The CDS of each gene was cloned into the expression vector pPICZ, yielding plasmids pPICZ-A/*PcYap1*, pPICZ-B/*RsmA* and pPICZ-B/*AtfB*, which were transformed into *Pichia pastoris* by electroporation. For heterologous recombinant protein production, *P. pastoris* transformants carrying each of the plasmids were cultured and selected by phleomycin, using methanol as inductor. Extraction of intracellular heterologous proteins was performed after 72 hours of incubation, and purification was performed by affinity chromatography using an imidazole gradient. Finally, the eluted fractions were analyzed on polyacrylamide gels under denaturing conditions (SDS-PAGE).

In the case of the PcYap1 protein fused to the *c-myc* epitope and 6-histidine tail, a molecular weight of 66 kDa was expected according to the amino acid sequence of the fusion protein; a band of this size was observed partially purified in the fraction corresponding to the elution with 500 mM imidazole in SDS-PAGE gels. For RsmA, a fusion protein of 35 kDa was expected; a protein of this molecular weight was detected in the gels from the fraction eluted with 200 mM imidazole, and purified in the fraction eluted with 500 mM. In case of AtfB, a fusion protein of 38 kDa was expected, which was detected in the gel from the fraction eluted with 200 mM imidazole, and purified with 500 mM imidazole elution. These purified proteins will be used for EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), in which the binding of these proteins to *pcbAB* promoter regulatory sequences will be analyzed.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Regulación de la biosíntesis de penicilina	3
1.2. <i>Pichia pastoris</i> : levadura metilotrófica para expresión de proteínas heterólogas	5
1.3. Promotor AOX1	6
1.4. Producción de proteínas heterólogas	7
2. ANTECEDENTES	8
2.1. El factor transcripcional Pta1	8
2.2. Factores transcripcionales Yap1 de levaduras y hongos filamentosos	9
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVO	12
5.1. Objetivos particulares	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS	13
6.1. Mantenimiento de la cepa de <i>Penicillium chrysogenum</i>	13
6.2. Vectores de clonación	14
6.2.1. pBLUESCRIPT KS+	14
6.2.2. pPICZ	15
6.3. Extracción de ADN genómico de <i>Penicillium chrysogenum</i>	15
6.4. Amplificación y clonación de los genes <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i>	17
6.4.1. Megapreparación para ADN plasmidico de pBLUESCRIPT KS+	17
6.4.2. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	19
6.4.3. Digestiones dobles para ligación	21
6.4.4. Ligación de <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i> en pBLUESCRIPT KS+	22
6.4.5. Transformación de <i>E. coli</i> por resistencia a ampicilina	22
6.4.6. Minipreparaciones para la extracción de ADN plasmidico de <i>E. coli</i>	23
6.5. Acondicionamiento de <i>Pichia pastoris</i> y el vector pPICZ	23
6.5.1. Mantenimiento de la levadura <i>P. pastoris</i>	23
6.5.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de fleomicina en <i>P. pastoris</i>	24
6.5.3. Transformación del vector pPICZ en <i>E. coli</i> y selección por resistencia a fleomicina	25
6.5.4. Transformación de <i>P. pastoris</i> con el vector pPICZ	25

6.6.	PCR recombinante (fusión de exones)	27
6.6.1.	Diseño de oligonucleótidos para PCR recombinante	27
6.6.2.	Fusión de exones por PCR recombinante	28
6.7.	RT-PCR para la obtención de la CDS del gen <i>PcYap1</i>	31
6.7.1.	Extracción de ARN total de <i>P. chrysogenum</i>	31
6.7.2.	Obtención de ADNc total	34
6.7.3.	Amplificación por PCR de la CDS del gen <i>PcYap1</i>	35
6.8.	Construcción de los vectores de expresión para los genes <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i>	36
6.8.1.	Digestiones dobles de los fragmentos con la secuencia CDS de los genes	36
6.8.2.	Ligación de las CDS de los genes con los vectores pPICZ	37
6.9.	Expresión y purificación de proteínas heterólogas en <i>P. pastoris</i>	38
6.9.1.	Expresión de proteínas heterólogas.	38
6.9.2.	Extracción de proteína y purificación	39
6.9.3.	Cromatografía de afinidad por medio de iones metálicos inmovilizados (IMAC)	40
6.9.4.	Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	41
6.9.4.1.	Tinción con azul de coomassie	43
6.9.4.2.	Tinción con plata	43
7.	RESULTADOS Y DISCUSION	45
7.1.	Amplificación y clonación en pBKS+ de los genes <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i> de <i>P. chrysogenum</i>	45
7.1.1.	Extracción de ADN genómico de <i>Penicillium chrysogenum</i>	45
7.1.2.	Megapreparación para ADN plasmídico de pBKS+	45
7.1.3.	Amplificación de los genes <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i> por PCR	46
7.1.4.	Clonación de los genes <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i> en pBKS+	48
7.2.	Acondicionamiento de <i>Pichia pastoris</i> y del vector pPICZ	50
7.2.1.	Concentración mínima inhibitoria para <i>P. pastoris</i>	50
7.2.2.	Obtención de ADN plasmidico de los vectores pPICZ-A y B	52
7.3.	Obtención de la secuencia codificante (CDS) de los genes <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i>	53
7.3.1.	Fusión de exones por PCR recombinante para la obtención de la CDS de <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i>	53

7.3.2. Obtención de la CDS del gen <i>PcYap1</i> mediante RT-PCR	56
7.4. Obtención de transformantes de <i>P. pastoris</i> para la expresión de los genes <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i>	57
7.4.1. Construcción de los plásmidos pPICZ-A/ <i>PcYap1</i> , pPICZ-B/ <i>RsmA</i> y pPICZ-B/ <i>AtfB</i>	57
7.4.2. Transformación de <i>P. pastoris</i> con los plásmidos pPICZ-A/ <i>PcYap1</i> , pPICZ-B/ <i>RsmA</i> y pPICZ-B/ <i>AtfB</i>	60
7.5. Extracción, purificación y detección de las proteínas <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i> expresadas en <i>Pichia pastoris</i>	61
7.5.1. Purificación de <i>PcYap1</i>	62
7.5.2. Purificación de <i>RsmA</i>	63
7.5.3. Purificación de <i>AtfB</i>	65
8. CONCLUSIONES	67
9. PERSPECTIVAS	67
10. REFERENCIAS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta biosintética de penicilina	2
Figura 2. Organización de los genes responsables de la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos en organismos procariotas y en hongos	2
Figura 3. Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas	5
Figura 4. Promotor del gen <i>pcbAB</i>	9
Figura 5. Vector pBLUESCRIPT KS+	14
Figura 6. Vector de expresión pPICZ	15
Figura 7. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i>	19
Figura 8. Diagrama de diseño de oligonucleótidos para PCR recombinante	27
Figura 9. Extracción ADN genómico de <i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	45
Figura 10. Vector pBKS+ obtenido mediante megapreparación	46
Figura 11. Genes <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i> amplificado por PCR	47
Figura 12. Esquema de los fragmentos amplificados por PCR	48
Figura 13. Digestiones dobles del vector pBKS+	49
Figura 14. Digestión doble de fragmentos amplificados correspondientes a los genes <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i>	49
Figura 15. Minipreparaciones de <i>E. coli</i> con los genes <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i> en el vector pBKS+ linearizando dichas construcciones con la enzima <i>Bam</i> HI	50
Figura 16. PCR recombinante para obtener "in vitro" la CDS del gen <i>RsmA</i> a partir de ADN genómico. I-1 e I-2 indican las posiciones de los dos intrones. E-1, E-2 y E-3 las posiciones de los exones. Los fragmentos obtenidos se fusionan por medio de PCRs	53
Figura 17. Exones E-1 y E-3 del gen <i>PcYap1</i>	54
Figura 18. Exones E-1, E-2 y E-3 del gen <i>RsmA</i>	54
Figura 19. CDS del gen <i>AtfB</i> .	54
Figura 20. Exón E-2 del gen <i>PcYap1</i>	54
Figura 21. Exones purificados I	55
Figura 22. Exones purificados II	55

Figura 23. Fusión de los exones E-1 y E-2 de <i>RsmA</i> , en una PCR usando los oligonucleótidos RsmA-1 y -4	56
Figura 24. Fusión de los tres exones de <i>RsmA</i> tras la última PCR usando los oligonucleótidos RsmA-1 y -6	56
Figura 25. Gel de agarosa con ARN	57
Figura 26. CDS del gen <i>PcYap1</i> obtenida mediante PCR usando ADNc y los oligonucleótidos PcYap1 -1 y -6	57
Figura 27. Digestión doble del fragmento de CDS de <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i>	58
Figura 28. Digestión doble del fragmento CDS de <i>PcYap1</i>	58
Figura 29. Digestión doble del vector pPICZ	58
Figura 30. Megapreparaciones de plásmidos pPICZ-A/ <i>PcYap1</i> , pPICZ-B/ <i>RsmA</i> y pPICZ-B/ <i>AtfB</i> linearizados con <i>SacI</i>	60
Figura 31. Gel SDS-PAGE de las fracciones del gradiente de imidazol para la purificación de la proteína PcYap1 teñido con azul de coomassie	63
Figura 32. Gel SDS-PAGE de las fracciones del gradiente de imidazol para la purificación de la proteína RsmA teñido con azul de coomassie	64
Figura 33. Gel SDS-PAGE de las fracciones del gradiente de imidazol para la purificación de la proteína RsmA, tinción con plata	64
Figura 34. Gel SDS-PAGE de las fracciones del gradiente de imidazol para la purificación de la proteína AtfB teñido con azul de coomassie	65
Figura 35. Gel SDS-PAGE de las fracciones del gradiente de imidazol para la purificación de la proteína AtfB, tinción con plata	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición medio Power para el mantenimiento de la cepa Wisconsin 54-1255 de <i>Penicillium chrysogenum</i>	13
Tabla 2. Sales Power para suplementar el medio Power	13
Tabla 3. Composición medio PMY para obtención de biomasa de <i>Penicillium chrysogenum</i>	14
Tabla 4. Composición tampón A para lavado de biomasa de <i>Penicillium chrysogenum</i>	16
Tabla 5. Composición solución de lisis para rotura de micelio de <i>Penicillium chrysogenum</i>	16
Tabla 6. Composición medio LB (Miller, 1972), para crecimiento de células de <i>E. coli</i>	17
Tabla 7. Composición de STET para lisis alcalina de <i>E. coli</i>	18
Tabla 8. Perfil de PCR con gradiente de temperatura de alineamiento para la amplificación de <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i>	20
Tabla 9. Mezcla de reacción de PCR para la amplificación de <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i> con la polimerasa <i>pfu</i> ultra II	20
Tabla 10. Mezclas para digestiones dobles de pBKS+ con las enzimas de restricción seleccionadas del sitio múltiple de clonación	21
Tabla 11. Mezclas para digestiones dobles de los fragmentos <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i> para su inserción en el vector pBKS+	21
Tabla 12. Reacción de ligación para obtener las construcciones pBKS+/ <i>PcYap1</i> , pBKS+/ <i>RsmA</i> y pBKS+/ <i>AtfB</i>	22
Tabla 13. Mezcla A medio YPD para crecimiento de la levadura <i>P. pastoris</i>	23
Tabla 14. Mezcla B medio YPD para crecimiento de la levadura <i>P. pastoris</i>	24
Tabla 15. Medio LB bajo en sales para crecimiento de <i>E.coli</i> transformada con el vector pPICZ	25
Tabla 16. HEPES 1 M para obtención de células electrocompetentes de <i>P. pastoris</i>	26
Tabla 17. YPD/HEPES para obtención de células electrocompetentes de <i>P. pastoris</i>	26
Tabla 18. Sorbitol 1 M para obtención de células electrocompetentes de <i>P. pastoris</i>	26
Tabla 19. DTT 1 M para obtención de células electrocompetentes de <i>P. pastoris</i>	26
Tabla 20. Oligonucleótidos para PCR recombinante	28

Tabla 21. Perfil de PCR para amplificación de los exones de los genes <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i>	29
Tabla 22. Mezcla de reacción de PCR para amplificación de los exones de los genes <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i>	29
Tabla 23. Perfil para fusión <i>RsmA</i> exones 1-2	30
Tabla 24. Mezcla de reacción para fusionar los exones 1 y 2 de <i>RsmA</i>	30
Tabla 25. Perfil fusión <i>RsmA</i> exones 1-2-3	31
Tabla 26. Mezcla de reacción para fusionar el fragmento con los exones 1-2 al exón 3 del gen <i>RsmA</i>	31
Tabla 27. Preparación de amortiguador MAE 10x para electroforesis en gel de agarosa de ARN	33
Tabla 28. Preparación de amortiguador de carga para muestras de ARN para electroforesis en gel de agarosa	33
Tabla 29. Primer mezcla ADNc siguiendo las especificaciones del kit SuperScript III First-Strand de Invitrogen	34
Tabla 30. Mezcla de síntesis de ADNc para <i>P. chrysogenum</i>	34
Tabla 31 Perfil de PCR para amplificación de la CDS del gen <i>PcYap1</i>	35
Tabla 32. Mezcla de reacción para la amplificación de la CDS del gen <i>PcYap1</i>	35
Tabla 33. Reacciones de digestión doble con enzimas de restricción de pPICZ-A y B, y CDS de <i>PcYap1</i> , <i>RsmA</i> y <i>AtfB</i>	36
Tabla 34. Reacciones de ligación para obtener las construcciones pPICZ-A/ <i>PcYap1</i> , pPICZ-B/ <i>RsmA</i> y pPICZ-B/ <i>AtfB</i>	37
Tabla 35. Mezcla A del medio YPD con 2% de glicerol para etapa <i>batch</i> del cultivo de <i>P. pastoris</i> en la expresión de proteínas heterólogas	38
Tabla 36. Mezcla B medio YPD para etapa <i>batch</i> del cultivo de <i>P. pastoris</i> en la expresión de proteínas heterólogas	39
Tabla 37. Composición medio YP para la etapa de expresión con metanol en un cultivo de <i>P. pastoris</i>	39
Tabla 38. Composición amortiguador de rotura para lisis de células de <i>P. pastoris</i>	40
Tabla 39. Composición amortiguador de unión para ultrafiltración y purificación de proteínas heterólogas extraídas de <i>P. pastoris</i>	40

Tabla 40. Gel de resolución 12% para detección de proteínas por peso molecular en SDS-PAGE	41
Tabla 41. Gel concentrador 5% para detección de proteínas por peso molecular en SDS-PAGE	42
Tabla 42. Amortiguador de carga para extracto crudo de proteína y gradiente de imidazol en SDS-PAGE	42
Tabla 43. Composición solución fijadora para tinción con azul de coomassie de geles de acrilamida SDS-PAGE	43
Tabla 44. Solución fijadora para tinción con plata de geles de acrilamida SDS-PAGE del kit Silver Stain Plus de BIO-RAD	43
Tabla 45. Solución de tinción para tinción con plata de geles de acrilamida SDS-PAGE del kit Silver Stain Plus de BIO-RAD	44

LISTA DE FOTOGRAFIAS

- Fotografías 1, 2, 3, 4 y 5.** Medio YPD agar con diferentes concentraciones de fleomicina y estria cruzada de *P. pastoris* para gradiente de concentración mínima inhibitoria 51
- Fotografías 6, 7 y 8.** Medio LB agar con 100 µL de células de *E. coli* DH5α electrocompetentes con pPICZ-A, pPICZ-B y control negativo. Marcador de selección 25 µg/mL de fleomicina 52
- Fotografías 9, 10, 11 y 12.** Medio LB agar con 100 µL de células de *E. coli* DH5α electrocompetentes transformadas con las ligaciones del vector pPICZ con los fragmentos CDS de los genes *RsmA*, *AtfB* y *PcYap1*, y control negativo, seleccionadas con 25 µg/mL de fleomicina. 59
- Fotografías 13, 14, 15 y 16.** Medio YPD agar con 100 µL de células de *P. pastoris* electrocompetentes transformadas con los plásmidos pPICZ-B/*RsmA*, pPICZ-B/*AtfB*, pPICZ-A/*PcYap1* y control negativo. Marcador de selección 75 µg/mL de fleomicina 60

1. INTRODUCCIÓN

Penicillium chrysogenum es un hongo filamentoso del grupo de los ascomicetos, usado a nivel industrial en la producción de penicilina, un antibiótico de la familia de los β -lactámicos. La ruta biosintética de la penicilina está hoy totalmente establecida (Liras y Martín, 2006), y se conocen muchos de los circuitos reguladores de la biosíntesis de este compuesto, tanto en *Penicillium chrysogenum* como en *Aspergillus nidulans*, otra especie fúngica productora de penicilina (Brakhage *et al.* 2004).

La ruta biosintética de la penicilina (Fig. 1) tiene como precursores directos tres aminoácidos: L-aaa (ácido L- α -aminoadípico), L-cisteína y L-valina. Los dos primeros pasos de la vía biosintética son comunes a todas las β -lactamas. El primero de ellos consiste en la condensación de los tres aminoácidos para formar el tripéptido ACV (L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina), reacción llevada a cabo por la enzima ACV sintetasa, que pertenece a la familia de las péptido sintetasas, y está codificada por el gen *pcbAB*. El segundo paso de la vía biosintética es la ciclación oxidativa del tripéptido ACV para dar isopenicilina N, compuesto que consiste en un núcleo de ácido 6-amino penicilánico (6-APA) y una cadena lateral de ácido L- α -aminoadípico. Esta reacción es llevada a cabo por la enzima isopenicilina N sintasa, codificada por el gen *pcbC*. En el último paso de la vía se intercambia la cadena lateral de ácido α -aminoadípico de la isopenicilina N por un ácido aromático activado en forma de acil-CoA, reacción llevada a cabo por la enzima isopenicilina N aciltransferasa, codificada por el gen *penDE*.

Los tres genes responsables de la biosíntesis de penicilina se encuentran agrupados en un *cluster* (Diez *et al.* 1990) (Fig. 2), en el cual los genes *pcbC* y *pcbAB* están situados en orientación invertida. Estos dos genes se cree que tienen un origen procariótico, y que fueron transferidos a hongos productores de antibióticos β -lactámicos mediante un mecanismo de transferencia horizontal de genes (Peñalva *et al.* 1990). De hecho, la ruta biosintética de penicilina, al igual que la ruta de cefalosporina, otro antibiótico β -lactámico producido el hongo *Acremonium chrysogenum*, son versiones truncadas y ligeramente modificadas de la ruta de cefamicina presente en bacterias del género *Streptomyces*.

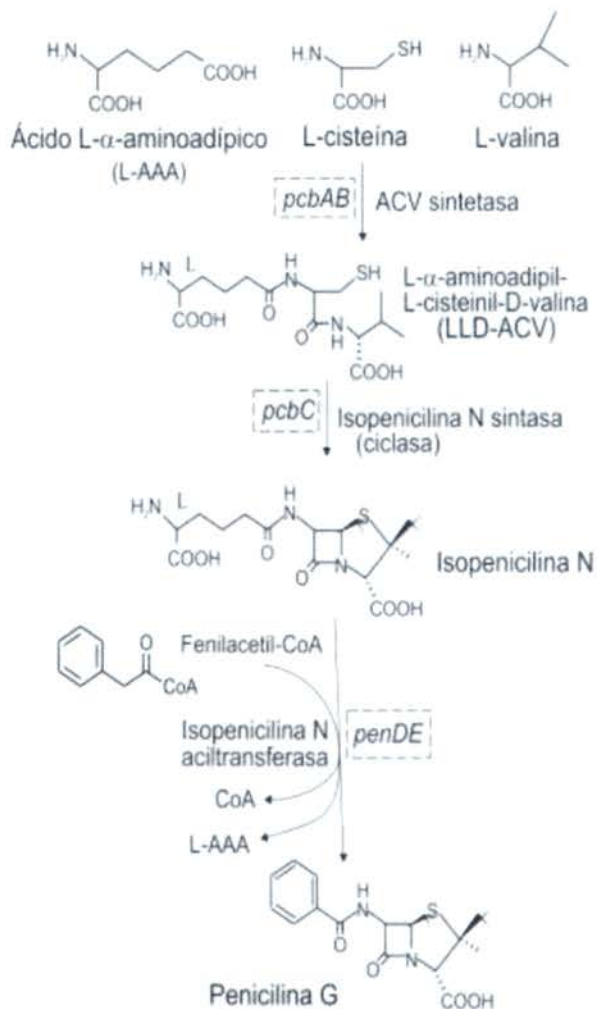


Figura 1. Ruta biosintética de penicilina. El nombre del gen que codifica la enzima correspondiente en cada paso enzimático se indica en un cuadro con línea discontinua

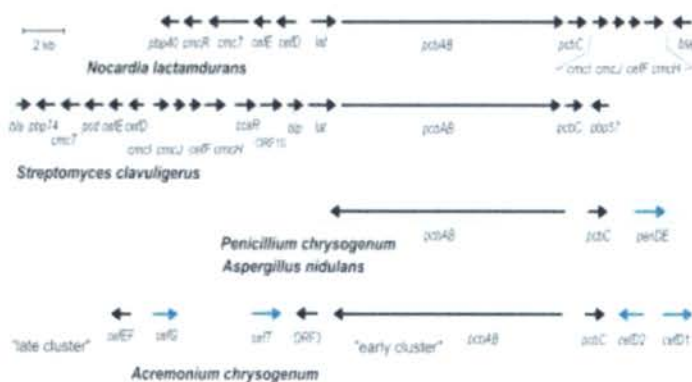


Figura 2. Organización de los genes responsables de la biosíntesis de antibióticos β-lactámicos en organismos procariontes y en hongos. Los genes indicados en color negro son genes de origen procarionte, y los de color azul de origen eucariótico.

1.1. Regulación de la biosíntesis de penicilina

La regulación de la biosíntesis de penicilina se ha estudiado con gran profundidad, principalmente en *Aspergillus nidulans* (Brakhage *et al.* 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** (Fierro *et al.*, resultados no publicados), mientras que en *A. nidulans* se ha demostrado que este regulador no juega un papel importante en la regulación por fuente de carbono (Espeso *et al.* 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 *et al.* 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 ADN 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 *et al.* 1997) como en *A. nidulans* (Espeso *et al.* 1993). La regulación por pH en *Aspergillus nidulans* es llevada a cabo por el regulador global **PacC** (Tilburn *et al.* 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* (Suarez y Peñalva, 1996).

- Regulación por el factor transcripcional AnCF. En *A. nidulans* se ha descrito 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** se une a estas cajas para activar la transcripción de estos genes (Litzka *et al.* 1998). Varias cajas CCAAT están también presentes en la región intergénica *pcbAB-pcbC* y en el promotor *penDE* en *Penicillium chrysogenum*.
- Regulación por el factor transcripcional Pta1. En *P. chrysogenum* se identificó una secuencia de ADN en la región intergénica *pcbAB-pcbC* que era reconocida por una proteína de unión a ADN y cuya mutación causaba una importante disminución de la expresión del promotor *pcbAB* (Kosalkova *et al.* 2000). 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 *et al.* 2009). **LaeA** es una proteína con actividad metiltransferasa que forma parte del complejo **Velvet**, formado por las proteínas **VeA**, **velB** y **LaeA**, el cual regula procesos como la diferenciación sexual y asexual en respuesta a estímulos de luz en *A. nidulans* (Bayram *et al.* 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 clusters del metabolismo secundario próximos a regiones teloméricas en *A. nidulans*, como ocurre con el cluster de penicilina (Shwab *et al.* 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 *et al.* 2000) y la subunidad α **Pga1** de *P. chrysogenum* (García-Rico *et al.* 2008) regulan positivamente la biosíntesis de penicilina.

1.2. *Pichia pastoris*: levadura metilotrófica para expresión de proteínas heterólogas

La levadura metilotrófica facultativa *Pichia pastoris* pertenece también al grupo de los ascomicetos y es uno de los organismos huésped más utilizado en la producción de proteínas heterólogas recombinantes. Entre las principales razones de su éxito, se destaca el hecho de que cuenta con un promotor fuerte y altamente regulable que es el promotor de la alcohol oxidasa P_{AOX1} (Cregg; *et al*, 2000).

Al ser un organismo con un metabolismo preferentemente respiratorio se evita la formación de subproductos indeseables que son comunes en procesos fermentativos, por ejemplo el etanol, por lo que es más fácil su cultivo a elevadas densidades celulares. Esto es conveniente ya que la expresión de proteínas está relacionada con el crecimiento celular y la producción de altas cantidades de biomasa. Además las modificaciones post-traduccionales que tienen lugar en *P. pastoris* se asemejan mucho a las de organismos eucariotas superiores permitiendo la obtención de proteínas funcionales (Macauley-Patrick; *et al*, 2005).

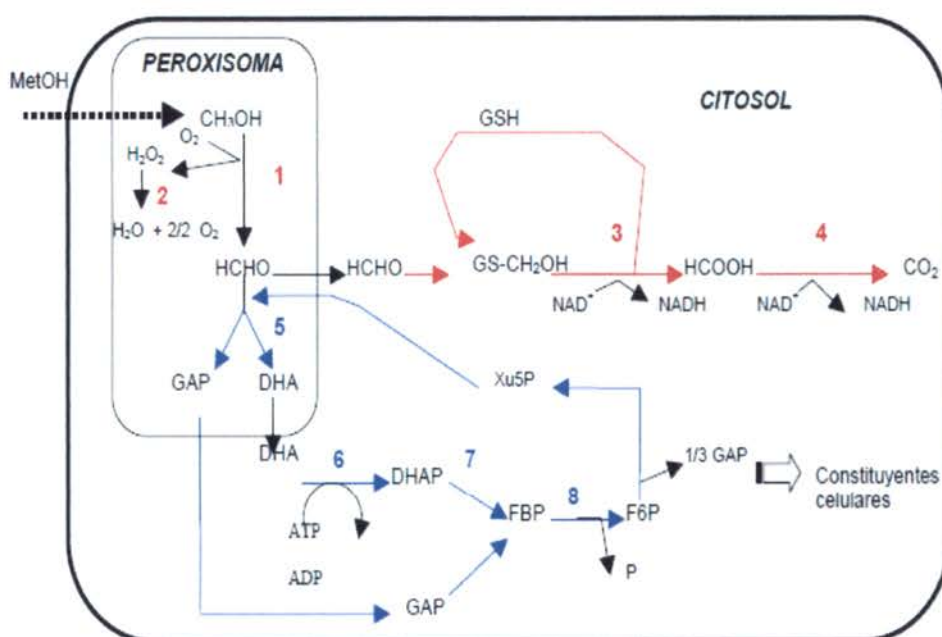


Figura 3. Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas. En rojo, vía desasimilatoria y las enzimas involucradas; en azul, vía asimilatoria y vías involucradas. 1: AOX, 2: catalasa, 3: FLD, 4: FMD, 5: DAS, 6: dihidroxiacetona kinasa, 7: fructosa-1,6-bifosfato aldolasa, 8: fructosa-1,6-bifosfato fosfatasa

El sistema de expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* está principalmente basado en la utilización del promotor de la enzima alcohol oxidasa (P_{AOX1}), que está fuertemente regulado e inducido por metanol. La oxidación completa de metanol a CO_2 y H_2O engloba vías desasimilatorias (generando energía) y vías asimilatorias (biosíntesis de material celular) reacciones que además se realizan de forma compartimentalizada como se muestra en la figura 3 (Daly, *et al.* 2005).

En *P. pastoris*, la primera reacción de oxidación del metanol esta catalizada por la enzima alcohol oxidasa (AOX), la cual está ubicada en el interior del peroxisoma y su síntesis puede alcanzar hasta un 30% de la proteína soluble total de la célula. La AOX necesita la presencia del metanol y de oxígeno molecular como aceptor final de electrones sin generar energía para la célula y generando como productos formaldehído y peróxido de hidrógeno (que deben de ser eliminados ya que son tóxicos para la célula). Aquí es donde entra en acción la enzima catalasa sintetizada paralelamente a la AOX en niveles elevados la cual se encarga de la eliminación del peróxido de hidrógeno.

1.3. Promotor AOX1

La enzima alcohol oxidasa (AOX) es la responsable de la primera de las reacciones de oxidación del metanol en *P. pastoris* y su síntesis la regula el promotor P_{AOX1} . Cabe señalar que existen dos isoformas de la enzima codificadas por dos genes diferentes, AOX1 y AOX2, que presentan un 92% de identidad y que están regulados de forma similar a nivel transcripcional. Sin embargo, el nivel de transcripción alcanzado por cada uno de estos genes es muy diferente: mientras el 90% de la alcohol oxidasa formada en la célula proviene de la expresión del gen AOX1, el gen AOX2 es responsable sólo del 10% restante (Cregg *et al.* 2000); esta diferencia entre los niveles de transcripción se debe a las diferencias existentes en las regiones reguladoras de los promotores de ambos genes.

El P_{AOX1} es el promotor mayoritariamente usado para la expresión de proteínas heterólogas principalmente por su elevada tasa de transcripción y en segundo lugar porque cuenta con un sistema de regulación muy estricto mediante dos diferentes mecanismos, un sistema de represión/desrepresión por catabolito y un sistema de inducción específica por sustrato como por ejemplo el metanol. En *P. pastoris* las condiciones de desrepresión no son suficientes para que se dé una transcripción

significativa del gen AOX1, se requiere además de la presencia del sustrato inductor. Así se establece que no se requiere la presencia de concentraciones elevadas de una fuente de carbono represora (glicerol) durante la primera etapa del cultivo, sino tan solo la suficiente como para satisfacer los requerimientos nutricionales de la célula y una vez consumida esta fuente de carbono la inducción de la expresión se consigue mediante la adición de metanol al medio de cultivo (Lin Cereghino, *et al.* y Cregg 2000).

1.4. Producción de proteínas heterólogas

El proceso de expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris*; usando el promotor P_{AOX1} , requiere de una primer etapa, denominada etapa *batch*, de crecimiento celular, donde se busca obtener grandes cantidades de biomasa usando una fuente de carbono que proporcione un alto rendimiento biomasa/sustrato como el glicerol, que a su vez reprime muy poco el promotor P_{AOX1} en comparación a otras fuentes de carbono. En una segunda etapa se induce la expresión de la proteína heterólogas mediante el cambio de fuente de carbono a metanol activando así el P_{AOX1} para elevar los niveles de expresión de la proteína alcohol oxidasa y del gen heterólogo clonado y expresado desde el mismo promotor (Lin Cereghino, *et al.* 2002).

Esta segunda etapa es la de mayor importancia y de ella depende el éxito del proceso, pues se debe de considerar que se generan subproductos tóxicos para la célula, como lo son el formaldehído y el formato, además de la propia toxicidad del metanol en elevadas concentraciones; por esto es preciso determinar la velocidad de adición de metanol de manera que no se perjudique la viabilidad celular y al mismo tiempo se asegure la expresión óptima de la proteína heterólogas en cuestión. A esto hay que añadir la posible toxicidad que la propia proteína heteróloga que se está formando pueda tener sobre *P. pastoris*.

El fenotipo Mut es la principal característica a considerar para determinar la capacidad de asimilación del metanol en células de *P. pastoris*. Así, en el fenotipo Mut⁺ se recomienda una adición de metanol del 1% en relación al volumen total del medio, con un máximo de adición del 3%, compensando cada 24 horas el metanol consumido y el evaporado para mantener el porcentaje presente de metanol constante (Krainer, *et al.* 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1. El factor transcripcional Pta1

Como se mencionó con anterioridad, en la región intergénica *pcbAB-pcbC* de *P. chrysogenum* ha sido identificada una secuencia de ADN a la cual se une de forma específica un posible factor de transcripción que se denominó **Pta1**. Dicha secuencia de unión se determinó mediante ensayo de interferencia de uracilo (UIA, *Uracil Interference Assay*), obteniéndose la secuencia TTAGTAA. En ensayos de retardo en gel (EMSA, *Electrophoretic Mobility Shift Assays*) se observó que Pta1 se unía con alta especificidad a esta secuencia, y que mutaciones en cualquiera de sus nucleótidos ocasionaban la pérdida de la capacidad de unión del factor de transcripción (Kosalkova *et al.* 2000).

La secuencia de unión TTAGTAA se encuentra ubicada entre las posiciones -766 a -760 corriente arriba del codón ATG de inicio del gen *pcbAB*. En la figura 4 se muestra la posición de dicha secuencia así como de otras cajas reguladoras hipotéticas con secuencias iguales o similares a secuencias consenso de unión de varios factores de transcripción: cajas CCAAT (factor de transcripción AnCF), cajas GCCARG (PacC), cajas SYGGRG (CreA) y cajas GATA (NRE), además de dos hipotéticas cajas TATA.

La función *in vivo* de la caja TTAGTAA se estudió fusionando el promotor *pcbAB* al gen reportero *lacZ* de *E. coli*, e integrando dicha fusión de forma dirigida en el locus *pyrG* de la cepa *P. chrysogenum npe10 pyrG*, cepa que carece de todo el cluster de genes de penicilina (Kosalkova *et al.* 2000). Se observó que la delección de dicha caja suprimía por completo la expresión del gen, tanto en células incubadas en medio con lactosa como en medio con glucosa, mientras que una mutación puntual en la primera T y una mutación doble en la primera y quinta T (en ambos casos cambiándolas por C) disminuían la expresión aproximadamente un 35% y un 50% respectivamente, aunque este efecto sólo era observado en células incubadas en medio con glucosa.

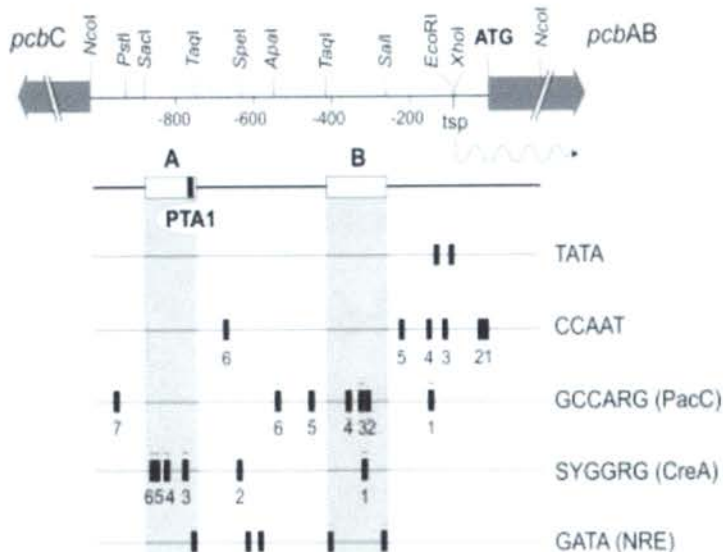


Figura 4. Promotor del gen *pcbAB*. Se indican los siguientes elementos: codón de inicio ATG, sitio de inicio de la transcripción (tsp), posición de la secuencia de unión de Pta1 (TTAGTAA), regiones A y B (importantes en la regulación del promotor), cajas TATA, cajas CCAAT, e hipotéticas cajas de unión de los factores transcripcionales PacC, CreA y NRE.

2.2. Factores transcripcionales Yap1 de levaduras y hongos filamentosos

Los factores transcripcionales AP-1 son proteínas de unión a ADN del tipo bZIP (cremallera de leucina), conservados en organismos eucariotas desde hongos a humanos, y que activan la transcripción en respuesta a diferentes estímulos. Contienen una cremallera de leucina implicada en la dimerización y una región básica adyacente de unión a ADN. Su secuencia preferida de unión es TGACTCA.

En *Saccharomyces cerevisiae* se han descrito varias proteínas del tipo AP-1. Entre ellas se encuentran las proteínas **Yap**, un grupo de 8 factores transcripcionales definidos por su unión específica a la secuencia de ADN: TTAATA (Fernández *et al.* 1997). El factor transcripcional **Yap1** participa en la resistencia a varios compuestos tóxicos, metales y al peróxido de hidrógeno.

En la levadura *Schizosaccharomyces pombe* se ha identificado un factor de transcripción homólogo a Yap1, denominado **Pap1**, que participa igualmente en resistencia a múltiples fármacos y a condiciones de estrés oxidativo (Toone *et al.* 1998). Las secuencias preferidas de unión de Pap1 son TTAGTAA y TTACGTAA (Toda *et al.* 1992; Fujii *et al.* 2000).

En hongos filamentosos se han identificado proteínas homólogas a Yap1 y Pap1, las cuales no muestran una identidad de secuencia elevada a lo largo de toda la proteína, pero sí conservan los dominios funcionales propios de ellas y son funcionalmente equivalentes, promoviendo la expresión de genes en respuesta a condiciones de estrés oxidativo y otros

tipos de estrés. En *Aspergillus fumigatus*, **AfYap1** es el principal regulador en la respuesta de defensa contra especies reactivas de oxígeno, aunque no participa en el proceso infeccioso en un modelo de ratón (Lessing *et al.* 2007).

Recientemente se ha vinculado la respuesta al estrés oxidativo con el metabolismo secundario en hongos. En *Aspergillus parasiticus*, el factor transcripcional **AtfB**, del tipo bZIP, regula la tolerancia conidial al estrés oxidativo, y tiene la capacidad de unirse a los promotores de siete genes del cluster de biosíntesis de la micotoxina aflatoxina (Roze *et al.* 2011). Su sitio de unión consiste en una secuencia compuesta de un sitio de tipo AP-1 más un sitio CRE1 adyacente.

En *Aspergillus nidulans*, **RsmA** es un regulador positivo de la biosíntesis de esterigmatocistina, y se une a dos sitios en el promotor del regulador de los genes de esterigmatocistina, *AflR* (Yin *et al.* 2012). RsmA también es un factor transcripcional de tipo bZIP, y tiene su mayor similitud con Yap3 de *S. cerevisiae*, cuya función se desconoce. En el promotor del gen *aflR* están presentes dos secuencias a las que RsmA se une con elevada especificidad: TGACACA y TTAGTAA.

La secuencia de unión de **Pta1** en *P. chrysogenum*, TTAGTAA, es idéntica o muy similar a las secuencias de unión de factores de transcripción de tipo Yap de diversos hongos y levaduras. Este hecho, conjuntamente con los recientes hallazgos de la regulación del metabolismo secundario en *Aspergillus* spp. por factores transcripcionales tipo Yap y por estrés oxidativo, nos induce a pensar que un factor de este tipo está regulando la expresión del gen *pcbAB*, y por tanto la producción de penicilina, en *P. chrysogenum*.

Mediante una búsqueda en la base de datos GenBank del NCBI, se encontró en el genoma de *P. chrysogenum* un gen presuntamente homólogo a Yap1 y Pap1. Este gen está anotado con el nombre **Pc20g15280**, posee un tamaño de 1884 pb y contiene dos intrones. La proteína hipotética a la que da lugar tiene un tamaño de 583 aa, y muestra un elevado grado de identidad con AfYap1 de *A. fumigatus* (59% a lo largo de toda la secuencia polipeptídica) y con proteínas similares de otras especies de *Aspergillus*. Pc20g15280 presenta una identidad de 42% y 49% en dos regiones conservadas de 102 y 57 aminoácidos, situadas en los extremos amino y carboxilo terminal respectivamente, del regulador Yap1 de *S. cerevisiae*. También presenta una identidad importante con Pap1 de *S. pombe*, 56% en la región conservada del extremo amino (70 aa) y 25% en la mitad carboxilo terminal de la proteína (283 aa).

En el genoma de *P. chrysogenum* también están presentes otros dos genes posibles homólogos de los genes que codifican a RsmA y AtfB en otros hongos. El gen anotado con

el nombre **Pc12g16510** codifica una proteína hipotética de 300 aminoácidos con un dominio bZip1 en la parte central. Esta proteína deducida presenta una identidad de un 28%, con un 48% de aminoácidos conservados, con la proteína Yap3 de *S. cerevisiae* a lo largo de una región de 187 aminoácidos, y una identidad de 55% a lo largo de toda la proteína con RsmA (AN4562.2) de *Aspergillus nidulans* (Shaaban *et al.* 2010).

Finalmente, el gen anotado con el nombre **Pc21g08330** codifica una proteína hipotética de 319 aminoácidos, también con un dominio bZip1 conservado en su región central, y que presenta una identidad de un 42% con el factor transcripcional AtfB de *Aspergillus parasiticus* descrito por Roze *et al.* (2011).

Nuestra hipótesis es que la proteína codificada por Pc20g15280, a la que denominaremos **PcYap1**, o bien la proteína codificada por el gen Pc12g16510, a la que denominaremos **RsmA** al igual que la de *A. nidulans*, regulan la expresión del gen *pcbAB* mediante unión al sitio TTAGTAA ubicado en su promotor. Igualmente proponemos que la proteína codificada por el gen Pc21g08330, a la que denominaremos **AtfB** como en *A. parasiticus*, puede ser también un regulador de los genes de penicilina; AtfB se une a secuencias que contienen un sitio de tipo AP-1 más un sitio CRE1 adyacente, situación que también se da en la región intergénica *pcbAB-pcbC* de *P. chrysogenum*. El objetivo del proyecto es clonar estos tres genes, expresarlos en *Pichia pastoris* y purificar las proteínas correspondientes, para en una etapa posterior analizar mediante ensayos de retardo en gel (EMSA) la unión de las mismas con la secuencia TTAGTAA y otras posibles secuencias de unión en la región intergénica *pcbAB-pcbC*.

3. JUSTIFICACIÓN

La clonación de los genes codificantes de los factores transcripcionales PcYap1, RsmA y AtfB de *Penicillium chrysogenum*, su expresión y purificación en *Pichia pastoris*, nos permitirá analizar su posible unión a secuencias reguladoras en la región promotora del gen *pcbAB*, aumentando de esta forma los conocimientos sobre la regulación de la transcripción de los genes biosintéticos de penicilina.

4. HIPÓTESIS

Los genes Pc20g15280, Pc12g16510 y Pc21g08330 de *Penicillium chrysogenum* que codifican respectivamente los factores transcripcionales PcYap1, RsmA y AtfB, se expresaran en *Pichia pastoris* como proteínas de fusión a una cola de poli-histidina lo que permitirá su purificación por cromatografía de afinidad para utilizarlos posteriormente en ensayos de unión a secuencias específicas de ADN.

5. OBJETIVO

Clonar los genes codificantes de los factores transcripcionales PcYap1, RsmA y AtfB de *Penicillium chrysogenum*, expresarlos en *Pichia pastoris* como proteínas de fusión a His-tag, y purificarlos para su utilización posterior en análisis de unión a secuencias reguladoras del promotor *pcbAB*.

5.1. Objetivos particulares

- Amplificación mediante PCR de los genes codificantes de PcYap1, RsmA y AtfB de *Penicillium chrysogenum*.
- Obtención de la secuencia CDS de cada uno de los genes mediante PCR recombinante o RT-PCR y clonación en el vector pPICZ.
- Expresión en *Pichia pastoris* de las proteínas fusionadas a His-tag, y purificación mediante cromatografía de afinidad.
- Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas purificadas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Mantenimiento de la cepa de *Penicillium chrysogenum*

En una primer etapa se propagaron 300 µL de un concentrado de esporas de la cepa *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 en placas de Petri con medio Power (Tabla 1), este medio consiste en una fusión de los medio PM1 (López-Nieto *et al.* 1985) y Czapek-KCl 0.7 M; y se utiliza para esporulación y mantenimiento de la cepa.

COMPONENTE	g/L
Sacarosa	25
Lactosa	5
Peptona de caseína	2.5
Sólidos de maceración de maíz	0.5
KCl	26.1
NaCl	2
NaNO ₃	1.5
K ₂ HPO ₄	0.25
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.25
Sales PW (Tabla 2)	1 mL

Se añade agar bacteriológico en una concentración 2% (P/V) y se verifica el pH de 6.75 ± 0.2

Tabla 1. Medio Power

COMPONENTE	g/200mL
KH ₂ PO ₄	6
FeSO ₄ *7H ₂ O	1
FeCl ₃ *6H ₂ O	0.4
CuSO ₄ *7H ₂ O	0.2

Tabla 2. Sales medio Power

Por otro lado para obtener micelio suficiente para extracción de ADN se inocularon 300 µL de un concentrado de esporas de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 en 100 mL de medio PMY estéril (Tabla 3) y se incubaron a 150 rpm y 25°C durante 72 horas.

COMPONENTE	g/L
NaNO ₃	3
Extracto de levadura	2
NaCl	0.5
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.05
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.01
Glucosa	40

Tabla 3. Medio PMY

6.2. Vectores de clonación

6.2.1. pBLUESCRIPT KS+

pBLUESCRIPT KS+ (que denominaremos pBKS+) es un vector de aproximadamente 2.9 kb derivado del pUC; este vector es utilizado para transformación de células bacterianas con genes de interés insertados dentro de su sitio múltiple de clonación.

En la figura 5 se muestran las principales características de este vector.

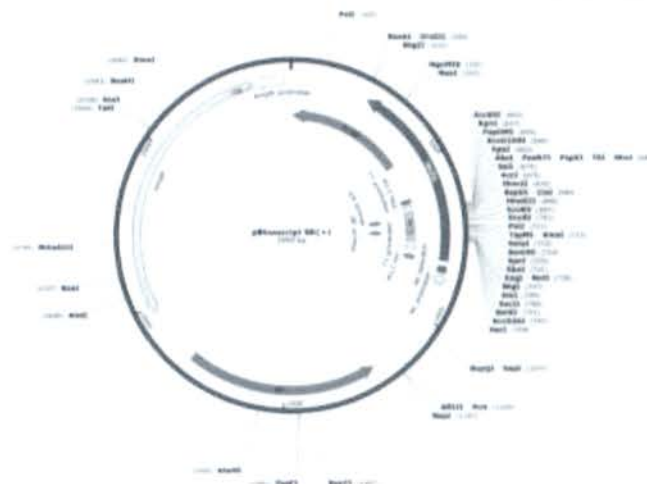


Figura 5. Vector pBLUESCRIPT KS+. Este vector contiene: 1. Fragmento del gen *lacZ*; 2. Gen de resistencia para selección por ampicilina; 3. Origen de replicación *colE1* para *E. coli* y 4. Sitio múltiple de clonación.

6.2.2. pPICZ

pPICZ-A, B o C es un vector de expresión de 3.3 kb utilizado para expresar proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. Las proteínas se expresan como fusiones a un péptido C-terminal que contiene el epítipo *c-myc* y una cola de poli-histidinas (6xHis) también denominada His-tag.

Este vector permite un alto nivel en la expresión del gen de interés gracias a la presencia del promotor AOX1, inducible por metanol. En la siguiente figura se indican los principales componentes del vector pPICZ:

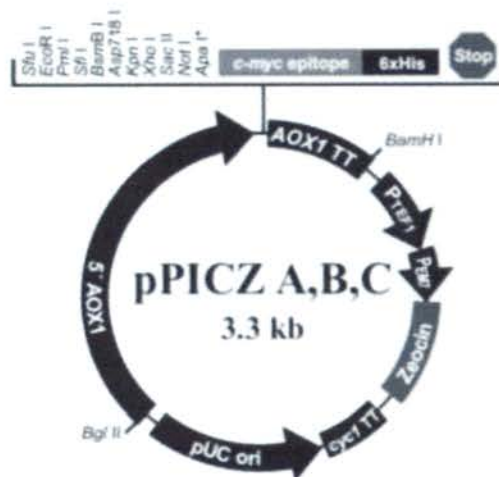


Figura 6. Vector de expresión pPICZ. Este vector contiene: 1. Promotor 5'AOX1 inducible por metanol; 2. Gen de resistencia para selección por zeocina (fleomicina); 3. Secuencias que codifican el epítipo *c-myc* unido a una cola de 6 histidinas (His-tag); 4. Tres versiones diferentes (A, B y C), con un sitio múltiple de clonación diferente cada una de ellas, lo que facilita la clonación en el marco de lectura correcto para la fusión del epítipo *c-myc* y la cola His-tag en el extremo C-terminal de la proteína expresada.

6.3. Extracción de ADN genómico de *Penicillium chrysogenum*

Para la extracción de ADN genómico de *P. chrysogenum* se siguió el método de Fenol:ClA; una vez terminado el periodo de incubación en medio PMY el micelio se filtró a través de un filtro Nylal estéril y se lavó con 100 mL de solución de NaCl 0.9% (p/v), seguido por 100 mL de tampón A (Tabla 4). Se transfirió el micelio a un mortero estéril donde se le añadió nitrógeno líquido y se pulverizó, conservándose el polvo a -20°C hasta su utilización.

COMPONENTE	CONCENTRACION
EDTA	100 mM, pH 8
NaCl	150 mM
Tris-HCl	50 mM, pH 8

Tabla 4. Tampón A

La extracción de ADN genómico a pequeña escala se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Fernández (1997), y se empleó para la obtención de ADN necesario para las reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

El micelio pulverizado se colocó en un microtubo estéril (100 mg de micelio) y se añadieron 500 µL de amortiguador de lisis (Tabla 5), homogeneizándose la mezcla por inversión. A continuación, se añadieron 500 µL de fenol y 500 µL de CIA (cloroformo:alcohol isoamílico; 24:1), se mezcló cuidadosamente y se incubó a 50°C durante 20 minutos (mezclando por inversión cada 5 minutos).

COMPONENTE	VOLUMEN
Tris-HCl 1M	10 mL
EDTA 0.5 M	20 mL
SDS 10%	5 mL
Agua estéril	15 mL

Tabla 5. Solución de lisis

Transcurrido este tiempo, se centrifugó la mezcla a 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la fase superior; la eliminación de proteínas se realizó mediante extracciones sucesivas con fenol-CIA hasta obtener una interfase limpia. Se realizó una extracción con un volumen de CIA, y el ADN se precipitó con 1/10 de volumen de acetato sódico 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, dejándolo a -20° C toda la noche.

Transcurrido el tiempo se centrifugó el ADN precipitado a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µL de etanol 70% (v/v); se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante, y se dejó secar el precipitado; por último, se resuspendió el ADN en 30 µL de agua estéril y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Una vez extraído el ADN se realizó un tratamiento con ARNasa para eliminar ARN y desproteinizar la muestra, añadiendo ARNasa (concentración final 100 µg/mL) incubándose a 37°C durante 90 minutos. Terminado este periodo se agregó un volumen de fenol neutro mezclando por inversión y centrifugando a 14,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se mezcló por inversión con un volumen Fenol:CIA para enseguida centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, este paso se repitió tantas veces fue necesario para obtener una interfase limpia, finalmente se realizó una última extracción con un volumen de CIA centrifugando a 14,000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente y la fase acuosa se precipitó con 1/10 de volumen de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µL de etanol 70% (v/v), se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante para el secado del precipitado, resuspendiendo el ADN en 30 µL de agua estéril y se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

6.4. Amplificación y clonación de los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB*

6.4.1. Megapreparación para ADN plasmidico de pBLUESCRIPT KS+

Se realizó una megapreparación para obtener ADN plasmidico de *Escherichia coli* que contiene el vector pBKS+ (pBLUESCRIPT KS+) que se usó para clonar y mantener los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB* estables y disponibles para futuros experimentos.

Se partió de un glicerol de *E. coli* con el vector pBKS+, que se atemperó y se homogeneizó, se tomó una alícuota de 100 µL y se plaqueó en una caja Petri con medio LB (Tabla 6) suplementado con ampicilina (100 µg/mL) incubándose 24 horas a 37°C. Transcurridas las 24 horas se tomó una asada con la que se inocularon 100 mL de medio LB caldo con 100 µg/mL de ampicilina incubando a 150 rpm por 16 horas a 37°C.

COMPONENTE	g/L
Bacto-triptona	10
NaCl	10
Extracto de levadura	5
Agar	20

Ajustar pH a 7.5
con NaOH

Tabla 6. Medio LB (Miller, 1972)

Terminado el periodo de incubación se recuperaron las células centrifugando a 5,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en tubos tipo Falcón estériles, el precipitado obtenido se resuspendió en 6 mL de STET (Tabla 7) homogeneizando con vórtex y este volumen se distribuyó en alícuotas de 350 µL en microtubos.

COMPONENTE	CONCENTRACION
EDTA	50 mM, pH 8
Sacarosa	8% (p/v)
Tris-HCl	10 mM, pH 8
Tritón X-100	0.5 % (v/v)

Tabla 7. STET

Se añadieron 20 µL de solución de lisozima con una concentración 10 mg/mL en agua y se mezcló durante 30 segundos hirviendo las muestras durante 1 minuto en un baño de agua. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitaron centrifugando a 14 000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente y los precipitados se eliminaron con palillos estériles.

El ADN plasmídico se precipitó tras añadir 40 µL de acetato sódico 3M pH 5.2 y 600 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente; se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente decantando la fase acuosa para posteriormente lavar con 700 µL de etanol al 70% y nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se decantó la fase acuosa y se dejaron secar los precipitados, finalmente las muestras se rehidrataron con 100 µL de agua estéril y se colectaron todas las muestras en un mismo microtubo.

Una vez extraído el ADN plasmídico se le realizó un tratamiento con ARNasa para eliminar ARN y desproteinizar la muestra. Para ello se añadió ARNasa (concentración final 100 µg/mL) y se incubó durante 90 minutos a 37°C, terminado este periodo se agregó un volumen de fenol neutro mezclando por inversión y centrifugando a 14,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se mezcló por inversión con un volumen Fenol:CIA para enseguida centrifugar a 14,000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente, este paso anterior se repitió tantas veces como fue necesario para obtener una interfase limpia.

Se realizó un último lavado con un volumen de CIA centrifugando a 14,000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente y se precipitó con 1/10 de volumen de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, centrifugando a 14,000 rpm, 20 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µL de etanol 70% (v/v), se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante, y se dejaron unos minutos los microtubos abiertos para el secado del precipitado. Por último, se resuspendió el ADN en 30 µL de agua estéril y se mantuvo a -20°C.

6.4.2. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los genes de interés a partir del ADN genómico se diseñaron los oligonucleótidos requeridos para la técnica de PCR; para este diseño se tomó como base la secuencia de los genes Pc20g15280 (*PcYap1*), Pc12g16510 (*RsmA*) y Pc21g08330 (*AtfB*) de *P. chrysogenum* que se encuentran en la base de datos del NCBI.

Como parte del diseño a cada oligonucleótido se le adicionaron colas que corresponden a secuencias que reconocen enzimas de restricción: *Bam*HI, *Xba*I, *Hind*III y *Eco*RI (Fig. 7), para poder realizar digestiones de estos fragmentos y así realizar ligaciones con extremos cohesivos dentro del sitio múltiple de clonación del vector pBLUESCRIPT KS+ lo que evita que durante la reacción el vector se religue.

<i>PcYap1</i>		
PcYap1-F:	TAGGATCC CATAGACCTGCGATAAGCACACCC	(<i>Bam</i> HI)
PcYap1-R:	AATCTAGACCCTTACAGCTTTCTTCTGGAGT	(<i>Xba</i> I)
<i>RsmA</i>		
RsmA-F:	ACGGATCCT ATGACGTTTCGGATTCTGTACC	(<i>Bam</i> HI)
RsmA-R:	CATAAGCTTGACGAGGACGACTACAAGAAAGA	(<i>Hind</i> III)
<i>AtfB</i>		
AtfB-F:	TCGGATCC ATCTGTTTCGGTATTTGGGCTACT	(<i>Bam</i> HI)
AtfB-R:	AGAATTCGGAGTTTCTCAACCCCGTATATC	(<i>Eco</i> RI)

Figura 7. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB*. En negrita se muestran las secuencias de corte para enzimas de restricción añadidas en el extremo 5' de los primers para facilitar la clonación de los fragmentos amplificados en pBKS+

Los tamaños de los fragmentos esperados eran:

PcYap1 = 3648 pb

RsmA = 2632 pb

AtfB = 2585 pb

Se probó un gradiente de temperaturas de hibridación para encontrar las condiciones óptimas de amplificación para lo que se siguió el perfil de la tabla 8.

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	No. DE CICLOS
Inicio	94°C	5 min.	1
Desnaturalización	94°C	30 seg.	30
Hibridación	52°C – 62°C	45 seg.	
Elongación	72°C	3 min.	
Elongación final	72°C	10 min.	1
Conservación	4°C	∞	1

Tabla 8. Perfil de PCR.

También se diseñó la mezcla de reacción (Tabla 9) para la PCR y se eligió la polimerasa que funcionara de forma más eficiente para amplificar los fragmentos de interés, que resultó ser la polimerasa de alta fidelidad *Pfu Ultra II* Fusion HS de Agilent Technologies.

COMPONENTE	VOLUMEN (μL)
Agua estéril	33
Amortiguador	5
ADN (50 ng)	5
dNTP's	1
Oligonucleótido F	2.5
Oligonucleótido R	2.5
<i>pfu</i> ultra II	1

Tabla 9. Mezcla de reacción de PCR.

6.4.3. Digestiones dobles para ligación

Para poder realizar las ligaciones de cada uno de los genes amplificados con el vector pBKS+ se realizaron digestiones dobles utilizando las enzimas que reconocen tantos los sitios de restricción del sitio múltiple de clonación como los incorporados en los extremos de los fragmentos amplificados. Para ello se prepararon las mezclas de reacción indicadas en las tablas 10 y 11.

COMPONENTE	pBKS+/PcYap1	pBKS+/RsmA	pBKS+/AtfB
Agua estéril	15.5 µL	13 µL	13 µL
Amortiguador Tango	2.5 µL (1x)	-	5 µL (2x)
Amortiguador R	-	5 µL	-
pBKS+	5 µL	5 µL	5 µL
<i>Bam</i> HI	1 µL	1 µL	1 µL
<i>Xba</i> I	1 µL	-	-
<i>Hind</i> III	-	1 µL	-
<i>Eco</i> RI	-	-	1 µL

Tabla 10. Mezclas para digestiones dobles de pBKS+.

COMPONENTE	PcYap1	RsmA	AtfB
Agua estéril	15.5 µL	13 µL	13 µL
Amortiguador Tango	2.5 µL (1x)	-	5 µL (2x)
Amortiguador R	-	5 µL	-
Fragmento	5 µL	5 µL	5 µL
<i>Bam</i> HI	1 µL	1 µL	1 µL
<i>Xba</i> I	1 µL	-	-
<i>Hind</i> III	-	1 µL	-
<i>Eco</i> RI	-	-	1 µL

Tabla 11. Mezclas para digestiones dobles de los genes.

Estas preparaciones se incubaron a 37 °C en baño María por 2 horas.

El volumen total de estas digestiones se cargó en un gel de agarosa para electroforesis y así poder purificar las bandas correspondientes para lo que se usó el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

6.4.4. Ligación de *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB* en pBLUESCRIPT KS+

Para la ligación de los genes de interés, con el propósito de conservarlos estables y disponibles, se realizó la siguiente reacción de ligación (Tabla 12), que se incubó a 13°C durante 12 horas.

COMPONENTE	VOLUMEN
Agua estéril	3.5 µL
Amortiguador 5X ligasa	2 µL
Inserto (<i>Yap1</i> , <i>RsmA</i> o <i>AtfB</i>)	3 µL
pBKS+	0.5 µL
ADN Ligasa	1 µL

Tabla 12. Reacción de ligación. Volumen final: 10 µL

6.4.5. Transformación de *E. coli* por resistencia a ampicilina

Transcurrido este tiempo se realizó la transformación en células de *E. coli* DH5α electrocompetentes siguiendo el siguiente procedimiento:

Se mezcló todo el volumen de cada reacción de ligación con 50 µL de células electrocompetentes, se transfirió a una cubeta GenePulser de BIO-RAD de 0.2 cm previamente enfriada y se aplicaron dos pulsos eléctricos de 1500 V en el electroporador GenePulser Xcell (BIO-RAD). Se añadieron a continuación 800 µL de medio LB (Tabla 6) homogeneizando la mezcla por inversión y se incubaron las muestras a 150 rpm por 1 hora a 37°C; de esta suspensión se tomaron 50 µL y se extendieron en una placa con LB agar suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL.

Se incubaron las placas toda la noche a 37°C; las colonias formadas se picaron con un palillo estéril y se inocularon placas nuevas de LB agar con ampicilina 100 µg/mL, incubándose a 37°C toda la noche.

6.4.6. Minipreparaciones para la extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Se inocularon microtubos con 1 mL de caldo LB con 100 µg/mL de ampicilina, incubándose a 37 °C, 200 rpm durante toda la noche. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se recogieron las células por centrifugación a 5,000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se desechó el sobrenadante; el precipitado se resuspendió con 350 µL de STET (Tabla 7) más 10 µL de lisozima a una concentración de 10 mg/mL y se hirvió durante 1 minuto, las proteínas y el ADN cromosómico se precipitaron por centrifugación a 14,000 rpm, 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado formado se eliminó con un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipitó con 40 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 más 600 µL de isopropanol, el contenido del tubo se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos para posteriormente centrifugar a 14,000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente.

El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 600 µL de etanol al 70% centrifugando a 14,000 rpm por 5 minutos, eliminando el sobrenadante; los precipitados se dejaron secar por 15 minutos después de los cuales se resuspendieron con 25 µL de agua estéril y con estas muestras se corrió una electroforesis en gel de agarosa para confirmar la presencia de las construcciones: pBKS+/PcYap1, pBKS+/RsmA pBKS+/AtfB.

6.5. Acondicionamiento de *Pichia pastoris* y el vector pPICZ

6.5.1. Mantenimiento de la levadura *P. pastoris*

Para la expresión de la proteína heteróloga se requirió de la cepa de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* por lo que se realizó su mantenimiento partiendo de un glicerol del cual se tomaron 50 µL para inocular 50 mL de medio YPD (Tabla 13 y 14), el medio se incubó a 200 rpm, 30°C por 60 horas.

COMPONENTE	CANTIDAD
Extracto de levadura	10 g
Bactopeptona	20 g
Agua	900 ML
Esterilizar en autoclave	

Una vez estériles A y B se mezclan para su uso

Tabla 13. Mezcla A del medio YPD.

COMPONENTE	CANTIDAD
Dextrosa	2 g
Agua	100 mL
Esterilizar con filtro de 0.22 μ m	

Tabla 14. Mezcla B del medio YPD.

Transcurrido el tiempo de incubación el medio se centrifugó a 4 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, se decantó hasta dejar un volumen final de 5 mL y se volvió a resuspender en el medio; esta mezcla se aforó a 10 mL con glicerol al 80% estéril homogeneizando suavemente para repartir en alícuotas que se conservaron a -70 °C.

Para confirmar el crecimiento de *P. pastoris* se tomó una azada de uno de los gliceroleros preparados y se inoculó por estría cruzada una placa de YPD con 20 g/L de agar, incubándose a 30 °C durante 60 horas.

6.5.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de fleomicina en *P. pastoris*

Para determinar a qué concentración del antibiótico fleomicina es sensible *P. pastoris* en su crecimiento y de esta forma evitar falsos positivos en posteriores experimentos se realizó la siguiente metodología:

Partiendo de un stock de fleomicina a una concentración de 20 mg/mL se prepararon por triplicado placas de medio YPD (Tablas 13 y 14) con 20 g/L de agar con las siguientes concentraciones de fleomicina.

- 0 μ g/mL
- 2 μ g/mL
- 4 μ g/mL
- 6 μ g/mL
- 8 μ g/mL
- 10 μ g/mL
- 20 μ g/mL
- 30 μ g/mL
- 40 μ g/mL
- 50 μ g/mL

Una vez preparadas las placas se inocularon con una asada de glicerol de *P. pastoris* por estría cruzada incubando las placas de forma invertida a 30°C por 72 horas aproximadamente observándose entonces el crecimiento de las colonias.

6.5.3. Transformación del vector pPICZ en *E. coli* y selección por resistencia a fleomicina

El vector pPICZ en sus versiones A y B se utilizó para la introducción de los genes de interés (*PcYap1*, *RsmA* y *AtfB*) en la levadura *P. pastoris*. Para obtener una concentración alta de estos vectores se realizó previamente la transformación de células electrocompetentes de la cepa *E. coli* DH5 α . Se mezclaron 2 μ L de cada vector (A y B) con 50 μ L de células electrocompetentes, esta mezcla se electroporó a 2500 kV en el electroporador GenePulser Xcell (BIO-RAD) y se homogeneizó posteriormente con 800 μ L de medio LB bajo en sales (Tabla 15) incubándose a 700 rpm 37 °C por 1 hora.

COMPONENTE	CANTIDAD
Bactotripton	10 g
NaCl	5 g
Extracto de levadura	5 g
Agua	1000 ml
Esterilizar en autoclave	
Para medio solido complementar con 15 g/L de agar bacteriológico	

Tabla 15. Medio LB bajo en sales

Se plaquearon 100 μ L de la mezcla en medio LB bajo en sales con agar y 25 μ g/mL de fleomicina incubando a 37°C toda la noche, para obtener colonias viables que tengan integrado los vectores pPICZ A y B. Una vez elegidas las colonias viables se pasaron a nuevas placas de LB bajo en sales con agar y fleomicina 25 μ g/mL así como a microtubos con el mismo medio para realizar la técnica de minipreparaciones (y posteriormente megapreparaciones) y poder elaborar glicerol como se describió anteriormente.

6.5.4. Transformación de *P. pastoris* con el vector pPICZ

- Preparación de células electrocompetentes:

Se inocularon 50 mL de medio YPD (Tablas 13 y 14) con una alícuota de un cultivo fresco de toda la noche de *P. pastoris* y se incubó a 300 rpm, 30°C, toda la noche hasta alcanzar una DO₆₀₀ (1:10 dilución) = 0.24 – 0.3. Una vez alcanzada la densidad deseada

se centrifugó el medio a 5,000 rpm, 5 minutos y 4°C, se desechó el sobrenadante y se adicionaron 10 mL de YPD/HEPES (Tabla 17) estéril resuspendiendo el sedimento con vórtex. Posteriormente se adicionaron 250 µL de ditioneitol (DTT) 1 M (Tabla 19), se mezcló suavemente y se incubó por 15 minutos a 30°C.

COMPONENTE	CANTIDAD
HEPES	23.8 g
Agua	100 mL
Disolver y ajustar a pH 8	
Esterilizar el filtro de 0.22 µm	

Tabla 16. Preparación de HEPES 1 M

COMPONENTE	CANTIDAD
YPD medio líquido estéril	100 mL
HEPES 1 M (Tabla 16)	20 mL
Disolver y ajustar a pH 8	

Tabla 17. Preparación de YPD/HEPES

COMPONENTE	CANTIDAD
Sorbitol	182.2 g
Agua	1000 mL
Mezclar y esterilizar en autoclave	

Tabla 18. Preparación de Sorbitol 1 M

COMPONENTE	CANTIDAD
DTT	3.85 g
Agua	22 mL
Disolver y esterilizar en filtro de 0.22 µm	

Tabla 19. Preparación de DTT 1 M

Terminada la incubación se aforó a un volumen de 50 mL con sorbitol 1 M frío (Tabla 18) y se centrifugó a 5,000 rpm, 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante para enseguida resuspender con 25 mL de sorbitol 1 M frío y volver a centrifugar a 5,000 rpm, 5 minutos a 4°C desechando nuevamente el sobrenadante. Finalmente se resuspendió en 0.5 mL de sorbitol 1 M frío y este volumen se repartió en alícuotas de 40 µL que se conservaron a -70°C para utilizarlas en la electroporación.

- Transformación de *P. pastoris*

Se mezcló 1 µL de cada uno de los siguientes vectores: pPICZ-A y pPICZ-B, con 40 µL células electrocompetentes de *P. pastoris* en cubetas Gene-Pulser (BIO-RAD) de 0.2 cm, además de un control negativo con solo células electrocompetentes. Se incubaron 5 minutos en hielo, y a continuación se dio un solo pulso de 1500 kV de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante para células de *P. pastoris*. Inmediatamente después se adicionó 1 mL de sorbitol 1 M frío y se incubó a 30°C por una hora sin agitación. Una alícuota de 200 µL se sembró en placas con agar YPD con una concentración de 50

µg/mL de fleomicina, las cuales se incubaron a 30°C por espacio de 72 a 96 horas hasta ver colonias seleccionables para posteriores análisis.

6.6. PCR recombinante (fusión de exones)

6.6.1. Diseño de oligonucleótidos para PCR recombinante

Para poder obtener una proteína heteróloga funcional fue necesario insertar en el vector pPICZ solo la secuencia codificante (CDS) de cada uno de los genes, es decir eliminar los intrones y las regiones del promotor y terminador, de cada uno de los genes estudiados.

En base a las secuencias de los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB* clonados previamente en el vector pBKS+ se diseñaron oligonucleótidos para poder hacer una PCR recombinante que nos permitirá fusionar los exones de los genes. Estos nuevos fragmentos comienzan en el codón ATG de inicio (oligonucleótido 1) y terminaran un codón antes del codón de fin (oligonucleótido 6).

Además se diseñaron oligonucleótidos que corresponden a las regiones límites entre exones e intrones (oligonucleótidos 2-5), los cuales contienen en su mitad 3' secuencias correspondientes al exón donde van a hibridar, y en su región 5' (cola) secuencias correspondientes al exón que está al otro lado del intrón que se quiere eliminar (Fig. 8).

En una primera PCR se amplifican solo los exones de cada uno de los genes de interés (en reacciones separadas usando los oligonucleótidos 1 y 2; 3 y 4; 5 y 6); partiendo de estos productos de PCR (exones) como molde se harán PCR's subsecuentes que permitirán fusionar el exón 1 con el 2 (usando los oligonucleótidos 1 y 4). Después de la primera fusión, en una última PCR se integrará el fragmento correspondiente al exón 3 usando los oligonucleótidos 1 y 6, para obtener un fragmento que incluya toda la región codificante o CDS, que será insertado en pPICZ-A o B y a su vez utilizado para transformar *P. pastoris*.

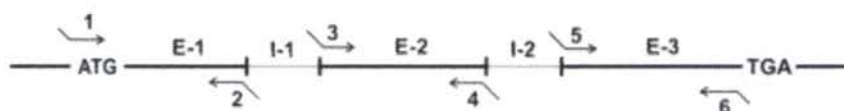


Figura 8. Diagrama de diseño de oligonucleótidos para PCR recombinante. I-1 e I-2 indican las posiciones de los dos intrones. E-1, E-2 y E-3 las posiciones de los exones. Los fragmentos obtenidos se fusionan por medio de PCR's

El diseño de los juegos de oligonucleótidos para PCR recombinante fue el siguiente:

OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA
PcYap1 1	AAGGT ACC ACAATGGGTGATTACGAACGGATAC
PcYap1 2	GATTTTGGGCCTTGCCTTCGTAGTAGGCTCTGAAGTCAGTGG
PcYap1 3	CCACTGACTTCAGAGCCTACTACGAAGCGCAAGGCCCAAAATC
PcYap1 4	ACCTTTCCATAGATTGAAGACGATCCCAAATTTTCGTGCATGACAGCATCT
PcYap1 5	AGATGCTGTCATGCACGAAAATTTGGGATCGTCTTCAATCTATGGAAAGGT
PcYap1 6	TCGGG CCC CTTGGCTCGCCCCATAATGTCGTC
RsmA 1	TCGA ATT CCGTAATGGATTACTCTTTCTATGATCCC
RsmA 2	AGCCAGGGAGGTTTTGGTAATTCTTCAAAGGGGCGAATGTATCTGGTT
RsmA 3	AACCAGATACATTGCCCCCTTTGAAGAATTACCAAAACCTCCCTGGCT
RsmA 4	CTCCCGGAACGCTCGTTGAGCTGCTCGGTTCTGTGCCTT
RsmA 5	AAGGCACAGAACCGAGCAGCTCAACGAGCGTTCCGGGAG
RsmA 6	AGTCTAG A ATCAACTCATCAGACCAGCAGC
AtfB 1	TCGA ATT CTGACATGTCTACCAACCTCAAATC
AtfB 2	TCTCTAG ATT GATCAAGTCATCAAAGGATGC

Tabla 20. Oligonucleótidos para PCR recombinante. En negrita se indica la secuencia de las enzimas de restricción que se utilizaron para clonar cada gen (su CDS) en pPICZ (*KpnI* y *Apal* para *PcYap1*; *EcoRI* y *XbaI* para *RsmA* y *AtfB*)

6.6.2. Fusión de exones por PCR recombinante

Considerando las T_M de los pares de oligonucleótidos y la longitud de los exones se diseñaron los ciclos de PCR que se llevarían a cabo así como las mezclas de reacción (Tabla 21) quedando el primer perfil de PCR como se muestra en la tabla 22 donde la finalidad es amplificar los exones correspondientes a cada gen para usarlos posteriormente como molde para las subsecuentes PCR's, se utilizó el equipo T100 Thermal Cycler de BIO-RAD.

PcYap1

- Exón 1: 449 pb
- Exón 2: 1147 pb
- Exón 3: 150 pb

RsmA

- Exón 1: 114 pb
- Exón 2: 253 pb
- Exón 3: 531 pb

AtfB

- Exón 1: 960 pb

ETAPA	<i>PcYap1</i>	<i>RsmA</i>	<i>AtfB</i>	No. DE CICLOS
Inicio	95°C; 4 minutos	95°C; 4 minutos	95°C; 4 minutos	1
Desnaturalización	95°C; 30 segundos	95°C; 30 segundos	95°C; 30 segundos	30
Hibridación	53°C; 30 segundos	54°C; 30 segundos	50°C; 30 segundos	
Elongación	72°C; 2 minutos	72°C; 1 minutos	72°C; 1 minutos	
Elongación final	72°C, 4 minutos	72°C, 4 minutos	72°C, 4 minutos	1
Conservación	4°C; ∞	4°C; ∞	4°C; ∞	1

Tabla 21. Perfil de PCR para amplificación de los exones de los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB*

COMPONENTE	VOLUMEN (VOLUMEN FINAL: 50 µL)
Agua estéril	33 µL
Amortiguador	5 µL
ADN (50 ng)	5 µL
dNTP's	1 µL
Oligonucleótido F	2.5 µL
Oligonucleótido R	2.5 µL
<i>Pfu</i> ultra II	1 µL

Tabla 22. Mezcla de reacción de PCR

Las reacciones de PCR se corrieron en un gel de electroforesis con agarosa al 0.8% para los exones de menos de 600 pb y de 1% para los mayores a 600 pb, para poder cortar las bandas correspondientes y purificarlos con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega y así utilizarlos como molde en la segunda etapa donde se inició la fusión de los exones.

En un segundo ciclo de PCR se fusionaron los exones 1 y 2 del gen *RsmA* bajo las siguientes condiciones:

Fusión: *RsmA* (exón 1) – *RsmA* (exón 2) (114 pb + 253 pb = 367 pb); utilizando los oligonucleótidos *RsmA* 1 y 4.

ETAPA	<i>RsmA</i> E-1 – <i>RsmA</i> E-2	No. DE CICLOS
Inicio	95°C; 4 minutos	1
Desnaturalización	95°C; 30 segundos	30
Hibridación	56°C; 30 segundos	
Elongación	72°C; 1 minutos	
Elongación final	72°C, 5 minutos	1
Conservación	4°C; ∞	1

Tabla 23. Perfil fusión *RsmA* exones 1-2

COMPONENTE	VOLUMEN (VOLUMEN FINAL: 50 µL)
Agua estéril	36 µL
Amortiguador	5 µL
<i>RsmA</i> E-1	1 µL
<i>RsmA</i> E-2	1 µL
dNTP's	1 µL
Oligonucleótido <i>RsmA</i> 1	2.5 µL
Oligonucleótido <i>RsmA</i> 4	2.5 µL
<i>Pfu</i> ultra II	1 µL

Tabla 24. Mezcla de reacción para fusionar los exones 1 y 2 de *RsmA*

Esta reacción de PCR se cargó en un gel de agarosa con una concentración de 1.8% para poder cortar la banda correspondiente y purificarla con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Este fragmento purificado se usaría como molde para el último perfil de PCR bajo las siguientes condiciones:

Fusión *RsmA* (exones 1-2) – *RsmA* (exón 3) (367 pb + 531 pb = 898 pb); con los oligonucleótidos *RsmA* 1 y 6.

ETAPA	<i>RsmA</i> (E1-2) – <i>RsmA</i> E-3	Nº CICLOS
Inicio	95°C; 4 minutos	1
Desnaturalización	95°C; 30 segundos	30
Hibridación	54°C; 1 minuto	
Elongación	72°C; 1 minuto	
Elongación final	72°C, 5 minutos	1
Conservación	4°C; ∞	1

Tabla 25. Perfil fusión *RsmA* 1-2-3

COMPONENTE	VOLUMEN (VOLUMEN FINAL: 50 µL)
Agua estéril	36 µL
Amortiguador	5 µL
<i>RsmA</i> E 1-2	1 µL
<i>RsmA</i> E-3	1 µL
dNTP's	1 µL
Oligonucleótido <i>RsmA</i> 1	2.5 µL
Oligonucleótido <i>RsmA</i> 6	2.5 µL
<i>Pfu</i> ultra II	1 µL

Tabla 26. Mezcla de reacción para fusionar el fragmento con los exones 1-2 al exón 3 del gen *RsmA*

6.7. RT-PCR para la obtención de la CDS del gen *PcYap1*

6.7.1. Extracción de ARN total de *P. chrysogenum*

En el caso del gen *PcYap1* no fue posible realizar la fusión de exones así que se decidió seguir una segunda estrategia que consistió en la extracción de ARN total para poder obtener este gen con solo la secuencia codificante (CDS) mediante RT-PCR.

Para ello se inocularon tres matraces con 100 mL de medio PMY (Tabla 3) estéril se inocularon con 200 µl de un concentrado de esporas de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y se incubaron a 150 rpm, 36 horas a 25°C.

Ya que *PcYap1* es un gen relacionado con el estrés oxidativo se utilizó una concentración 1 mM de H₂O₂ adicionada a diferentes tiempos para inducir esta condición en el cultivo y así lograr la expresión del gen por lo que se usó un matraz para el control sin peróxido de hidrógeno, un matraz con una concentración de 1 mM de peróxido de hidrógeno en el tiempo 0 horas y un último matraz con la misma concentración de peróxido de hidrógeno pero adicionado a las 33 horas.

transcurrido el tiempo de incubación se realizó la extracción de ARN utilizando la técnica de Trizol Reagent® de Invitrogen (Sambrook y Rusell; 2009) como se describe a continuación:

Se recogió el micelio por filtración a través de filtros de nylon estériles de 30 µm de diámetro de poro y se lavó con un volumen de NaCl 0.9 % (P/V) estéril; el micelio se congeló con nitrógeno líquido y se maceró, se tomaron aproximadamente 50 µg de cada macerado y se depositaron en microtubos estériles congelados.

A cada microtubo con macerado se le adicionó 1 mL de Trizol® y se homogeneizó vigorosamente en vórtex para posteriormente dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente después de lo cual se adicionaron 200 µL de cloroformo y se mezcló vigorosamente por 15 segundos en vórtex incubando 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14,000 rpm, 15 minutos a 4°C después de lo cual se transfirió la fase acuosa a microtubos limpios. El ARN presente en la fase acuosa se precipitó con 500 µL de isopropanol, mezclando por inversión y almacenando a -20°C toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm, 30 minutos a 4°C descartando el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70% (V/V) y se centrifugo a 8,000 rpm, 5 minutos a 4°C para desechar el sobrenadante y el precipitado se dejó secar de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.

El ARN se resuspendió en 20 µL de agua DEPC estéril (libre de ARNasa) y se colocó en un baño de hielo durante 10 minutos y a continuación se incubó a 65°C por 10 minutos con agitación constante, conservándose a -70°C hasta su uso.

Para verificar la integridad del ARN total extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa donde se consideró el asegurar que la movilidad electroforética del ARN sea

dependiente únicamente del tamaño, evitando la formación estructuras secundarias con formaldehído al 37% (12.3 M), ello impide usar en la electroforesis tampones con grupos amino como el Tris por lo que para ARN se usó tampón MOPS para el amortiguador MAE 10x (Tabla 27).

COMPONENTE	CONCENTRACION
MOPS	0.2 M
Acetato sódico	50 Mm
EDTA	10 mM
Ajustar a pH 7 con NaOH, esterilizar por filtro y conservar en refrigeración protegido de la luz	

Tabla 27. Preparación del amortiguador MAE 10x

También se preparó amortiguador de carga para ARN 1.25x de la siguiente forma:

COMPONENTE	VOLUMEN
Formamida	2.2 mL
Formaldehído	0.8 mL
MAE 10 x	0.5 mL
Glicerol 80%	0.4 mL
Azul de bromofenol 2%	0.1 mL
Bromuro de etidio 10 mg/mL	20 µL

Tabla 28. Amortiguador de carga para muestras de ARN

Para la electroforesis por cada 100 mL de solución de agarosa se necesitaron 1.2 gr de agarosa más 87 mL de agua DEPC estéril, la mezcla se fundió y cuando llegó aproximadamente a 50-55°C se adicionaron 10 mL de MAE 10x.

Antes de verter a la cubeta, y en la campana de extracción, se añadieron 3 mL de formaldehído. Tras la gelificación se adicionó dentro del tanque de electroforesis tampón MAE 1x. El gel se corrió a 150 V por 60 minutos después de lo cual se visualizaron las bandas con luz ultravioleta.

6.7.2. Obtención de ADNc total

Una vez verificada la integridad del ARN así como su concentración se diseñó una reacción de retrotranscripción para obtener ADNc total siguiendo las especificaciones del kit SuperScript III First-Strand (Invitrogen) para lo cual se preparó una primera mezcla como se muestra a continuación:

COMPONENTE	ARN (H ₂ O ₂ tiempo 0 y sin H ₂ O ₂)	ARN (H ₂ O ₂ tiempo 33 horas)
ARN	0.5 µL	1 µL
Oligo(DT) ₂₀ 50 mM	1 µL	1 µL
dNTP mix 10 mM	1 µL	1 µL
Agua DEPC	7.5 µL	7 µL

Tabla 29. Primera mezcla ADNc

Esta mezcla se incubó a 65°C por 5 minutos y a continuación se colocó en hielo durante 1 minuto; además se preparó una segunda mezcla para la síntesis de ADNc como se indica a continuación:

COMPONENTE	VOLUMEN PARA 1 REACCION
Amortiguador RT 10x	2 µL
MgCl ₂ 25 mM	4 µL
DTT 0.1 M	2 µL
ARNasaOUT 40 U/ µL	1 µL
SuperScript III RT 200 U/ µL	1 µL

Tabla 30. Mezcla de síntesis de ADNc

Se mezclaron 10 µL de la segunda mezcla de síntesis de ADNc (Tabla 30) con la primera mezcla (Tabla 29) incubando durante 50 minutos a 50°C y después 5 minutos a 85°C. a continuación se colocaron los tubos de reacción en hielo adicionando a cada tubo 1 µL de ARNasa H. Finalmente se incubó 20 minutos a 37°C obteniendo así ADNc total.

6.7.3. Amplificación por PCR de la CDS del gen *PcYap1*

Para obtener la secuencia codificante (CDS) del gen *PcYap1* (1746 pares de bases) se tomaron 2 μL de la reacción de retrotranscripción como molde para una PCR bajo las siguientes condiciones (Tablas 31 y 32) considerando las T_M del par de oligonucleótidos *PcYap1* 1 y 6 (Tabla 20) así como la longitud del gen:

ETAPA	<i>PcYap1</i>	Nº CICLOS
Inicio	95°C; 4 minutos	1
Desnaturalización	95°C; 30 segundos	30
Hibridación	54°C; 1 minuto	
Elongación	72°C; 2 minutos	
Elongación final	72°C, 5 minutos	1

Tabla 31. Perfil de PCR con 30 ciclos

COMPONENTE	VOLUMEN (VOLUMEN FINAL: 50 μL)
Agua estéril	36 μL
Amortiguador	5 μL
ADNc	2 μL
DNTP's	1 μL
Oligonucleótido <i>PcYap1</i> 1	2.5 μL
Oligonucleótido <i>PcYap1</i> 6	2.5 μL
<i>Pfu</i> ultra II	1 μL

Tabla 32. Mezcla de reacción para la amplificación de la CDS del gen *PcYap1*

Una vez finalizados los ciclos de PCR estas reacciones se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa para cortar la banda correspondiente al gen *PcYap1* y purificarlo con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, lo que nos permitió poder utilizarlo posteriormente para una ligación en el vector de expresión pPICZ.

6.8. Construcción de los vectores de expresión para los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB*

6.8.1. Digestiones dobles de los fragmentos con la secuencia CDS de los genes

Una vez realizada la fusión de exones (*RsmA*) o la RT-PCR (*PcYap1*) fue necesario integrarlos a un vector de expresión para poder obtener las proteínas recombinantes correspondientes para lo cual se utilizaron los vectores pPICZ A y B por su capacidad para expresar proteínas recombinantes, debido a la presencia de un promotor AOX1 inducible por metanol, y a las secuencias correspondientes a un epítipo *c-myc* y una cola de histidinas que facilita el proceso de identificación y purificación de las mismas.

Para realizar las construcciones que permitieran la expresión de cada uno de los genes se diseñaron los oligonucleótidos de los extremos 5' y 3' con colas que contenían secuencias de corte para diferentes enzimas de restricción (Fig. 6), de manera que cada fragmento se introdujera en el vector correspondiente (pPICZ-A para *PcYap1*; pPICZ-B en el caso de *RsmA* y *AtfB*) en el marco de lectura adecuado para que se genere una proteína recombinante que contenga en su extremo carboxilo terminal el epítipo *c-myc* y la cola de poli-histidina. Así mismo, en el extremo 5' debe considerarse que el codón ATG de inicio se encuentre dentro de una secuencia Kozak reconocible en *Pichia pastoris*, tal y como se describe en las instrucciones del fabricante (Invitrogene/Life Sciences).

Para cumplir con este objetivo se digirieron los fragmentos de los genes a clonar y los vectores pPICZ correspondientes con las enzimas de restricción específicas que permitirían la inserción de los genes en los vectores, utilizando las siguientes mezclas de reacción (Tablas 33 y 34).

COMPONENTE	pPICZ-A	pPICZ-B	<i>PcYap1</i>	<i>RsmA</i>	<i>AtfB</i>
Agua estéril	11 µL	11 µL	8 µL	8 µL	8 µL
amortiguador 2X	10 µL	10 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Muestra	25 µL	25 µL	10 µL	10 µL	10 µL
EcoRI	-	2 µL	-	1 µL	1 µL
XbaI	-	2 µL	-	1 µL	1 µL
Apal	2 µL	.	1 µL	-	-
KpnI	2 µL	.	1 µL	-	-

Tabla 33. Reacciones de digestión

Dichas mezclas se incubaron por 3 horas a la temperatura correspondiente a la actividad óptima de cada enzima (entre 30 y 37°C), y se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa para cortar y purificar las bandas de cada fragmento con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega.

6.8.2. Ligación de las CDS de los genes con los vectores pPICZ

Se determinaron entonces en otro gel de agarosa las cantidades a utilizar en la reacción de ligación (Tabla 34).

COMPONENTE	pPICZ-A/ <i>PcYap1</i>	pPICZ-B/ <i>RsmA</i>	pPICZ-B/ <i>AtfB</i>
Agua estéril	1 µL	1 µL	1 µL
Amortiguador ligasa	2 µL	2 µL	2 µL
Inserto	10 µL	10 µL	10 µL
Vector	5 µL	5 µL	5 µL
Ligasa	2 µL	2 µL	2 µL

Tabla 34. Reacciones de ligación

Las reacciones de ligación se incubaron a 13°C por 12 horas; una vez terminado este periodo se electroporaron en células electrocompetentes de *E. coli* DH5α en el equipo T100 Thermal Cycler de BIO-RAD para posteriormente plaquear 100 µL en medio LB bajo en sal con agar (Tabla 15) y suplementado con 25 µg/mL de fleomicina.

Las placas de medio LB bajo en sal con agar se incubaron por 12 horas a 37°C, después de este tiempo se seleccionaron las colonias que aparecieron y se inocularon para realizar una minipreparación en medio LB bajo en sal caldo suplementado con 25 µg/mL de fleomicina, incubándose a 37°C por 12 horas, y realizando a continuación una lisis para poder extraer la construcción y confirmar la integración del vector con cada uno de los genes dentro de las células de *E. coli* para ello las muestras se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Las construcciones para la expresión de las proteínas en *P. pastoris* se denominaron pPICZ- A/*PcYap1*, pPICZ- B/*RsmA* y pPICZ- B/*AtfB*.

Una vez confirmado por minipreparación que las construcciones eran las correctas se inoculó LB bajo en sal caldo suplementado con 25 µg/mL de fleomicina para poder obtener glicerol que se conservaron a -70°C, además de realizar lisis alcalina para recuperar una cantidad mayor de dichas construcciones por la metodología de megapreparación y estas usarlas para la posterior transformación de células de *Pichia pastoris* (sección 6.5.4.).

6.9. Expresión y purificación de proteínas heterólogas en *P. pastoris*

6.9.1. Expresión de proteínas heterólogas.

Para la obtención de las proteínas recombinantes heterólogas se cultivaron los transformantes de *Pichia pastoris* que portaban cada uno de los vectores pPICZ con el gen correspondiente. Se utilizó metanol como inductor de la expresión, siendo una levadura metilotrófica capaz de metabolizarlo como única fuente de carbono, de manera que el promotor AOX1 se indujera por la presencia de metanol, lo que desencadenaría la transcripción de los genes incorporados al vector para así sintetizar las proteínas correspondientes.

Se partió de una única colonia transformante obtenida de la electroporación de células electrocompetentes de *Pichia pastoris* con cada una de las construcciones pPICZ-AIPcYap1, pPICZ-B/RsmA y pPICZ-B/AtfB y plaqueadas en medio YPD agar (Tabla 13) suplementado con 75 µg/mL de fleomicina, incubadas por 72 horas a 30°C.

La colonia seleccionada se utilizó de inóculo para 25 mL de medio YPD con 2% de glicerol (Tablas 35 y 36) en un matraz de 250 mL cubierto únicamente con dos capas de gasa estéril para garantizar la disponibilidad de oxígeno.

COMPONENTE	CANTIDAD
Extracto de levadura	1 g
Bactopeptona	2 g
Glicerol	2 mL
Agua	90 mL
Esterilización por autoclave	

Una vez estériles A y B se mezclan para su uso

Tabla 35. Mezcla A para medio YPD

COMPONENTE	CANTIDAD
Dextrosa	1 g
Agua	10 mL
Esterilización por filtro de 0.22 μ	

Tabla 36. Mezcla B para medio YPD

Se usó un matraz por cada construcción (pPICZ-A/*PcYap1*, pPICZ-B/*RsmA* y pPICZ-B/*AtfB*) suplementado cada uno con 75 μ g/mL de fleomicina.

Se incubaron a 200 rpm y 30°C hasta alcanzar una $DO_{600} = 2 - 6$ (fase logarítmica, aproximadamente 16 a 18 horas), una vez alcanzada la densidad deseada se centrifugó a 5,000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y el sedimento celular se resuspendió en aproximadamente 100 mL de medio YP con 1% de metanol (Tabla 37) para la inducción de la expresión.

COMPONENTE	CANTIDAD
Extracto de levadura	10 g
Bactopeptona	20 g
Metanol	10 mL
Agua	1 000 mL

Tabla 37. Medio YP

Una vez resuspendidas las células se incubaron en matraces de 1 L a 200 rpm por 72 horas a 30°C cubiertos únicamente con 2 capas de gasa estéril; cada 24 horas se añadió 1% de metanol en relación al volumen total de medio para compensar el metanol evaporado y el consumo manteniéndose así la fuente de carbono siempre disponible sin llegar a niveles tóxicos para la célula.

6.9.2. Extracción de proteína y purificación

Después del periodo de incubación de 72 horas fue necesario extraer la proteína intracelular de *Pichia pastoris* para lo cual se siguió el siguiente procedimiento:

El medio de cultivo se centrifugó a 10,000 rpm, 5 minutos a 4°C desechando el sobrenadante y resuspendiendo las células en 15 mL de amortiguador de rotura pH 7.4

(Tabla 38) más 50 μ L de inhibidor de proteasas (Sigma P9599) y perlas de vidrio usando vórtex para favorecer la lisis celular durante aproximadamente 3 horas con 2 periodos intermedios de sonicación de 20 minutos cada uno. Se trabajó siempre en hielo de manera que se mantuvieron frías todas las muestras para evitar la hidrólisis de las proteínas.

COMPONENTE	CONCENTRACION
Fosfato de sodio	50 mM
EDTA	1 mM
Glicerol	5 %

Tabla 38. Amortiguador de rotura

Se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se transfirió a unidades de ultrafiltración de 50 mL de Millipore conservando 1 mL a -70°C para su posterior análisis como extracto crudo.

La unidad de ultrafiltración se centrifugó a 10,000 rpm, 10 minutos a 4°C, desechando el filtrado y lavando por lo menos 2 veces con amortiguador de unión pH 8 (Tabla 39) hasta concentrar las muestras a un volumen final de aproximadamente 1.5 mL.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
NaCl	500 mM
Na ₂ HPO ₄	50 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM

Tabla 39. Amortiguador de unión para ultrafiltración

6.9.3. Cromatografía de afinidad por medio de iones metálicos inmovilizados (IMAC)

Para la purificación de las proteínas heterólogas por cromatografía en columnas de níquel se usó el kit Ni-NTA Spin Kit (50) (Qiagen). Se amaron las columnas y se adicionaron a cada una 600 μ L de Ni-NTA agarosa, centrifugando a 14,000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente; se añadieron 600 μ L de amortiguador de unión pH 8 (Tabla 39) para equilibrar y dejar cargadas las columnas; se incubaron a temperatura ambiente 10

minutos para enseguida centrifugar a 14,000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente, desechando el filtrado, este paso se repitió 3 veces. Finalmente se adicionaron 600 μ L del ultrafiltrado con proteínas incubándose a 13°C toda la noche.

Terminado el periodo de incubación las columnas se lavaron con 600 μ L de amortiguador de unión pH 8 suplementado con diferentes concentraciones de imidazol (10 mM, 20 mM, 50 mM, 200 mM, 300 mM y 500 mM) esto se realizó para poder eluir la proteína del soporte de agarosa al competir por carga con el imidazol, recuperando cada elución por centrifugación a 10,000 rpm, 5 minutos y 4°C y conservando los eluidos a -20°C para su análisis en geles de acrilamida SDS-PAGE.

6.9.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se preparó en un matraz de 150 mL el primer gel (gel de resolución al 12%) con la siguiente composición:

COMPONENTE	VOLUMEN
Agua miliQ	3.4 mL
Acrilamida/BIS 30%	4 mL
Amortiguador Tris-HCl pH 8.8	2.5 mL
SDS 10% (w/v)	0.1 mL

Tabla 40. Gel de resolución 12%

Se mezcló y desgasificó durante 10 minutos.

En 1 mL de agua miliQ se disolvió 0.1 g de APS (persulfato de amonio), que se conservó en refrigeración hasta su uso. Una vez desgasificado el gel se añadieron 50 μ L de APS 10% mas 5 μ L de TEMED, se mezcló y se colocó entre los vidrios a una altura 1 cm por debajo del peine rellenando el espacio sobrante con agua miliQ y dejando gelificar por 30 minutos aproximadamente a temperatura ambiente.

Se preparó el segundo gel (gel concentrador al 5%) de la siguiente forma:

COMPONENTE	VOLUMEN
Agua miliQ	5.7 mL
Acrilamida/BIS 30%	1.7 mL
Amortiguador Tris-HCl pH 6.8	2.5 mL
SDS 10% (w/v)	0.1 mL

Tabla 41. Gel concentrador 5%

Se mezcló y desgasificó durante 10 minutos para enseguida añadir 50 μ L de APS 10% mas 10 μ L de TEMED. El agua en el espacio superior del vidrio se eliminó con ayuda de papel filtro y se colocó el segundo gel hasta el tope del vidrio, colocando a continuación el peine y dejando gelificar por 30 minutos aproximadamente.

Se preparó el amortiguador de carga de la siguiente forma:

COMPONENTE	VOLUMEN
Agua miliQ	3.55 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.25 mL
Glicerol	2.5 mL
SDS 10 %	2 mL
Azul de bromofenol 0.5 %	0.2 mL

Tabla 42. Amortiguador de carga

Se tomaron 950 μ L de amortiguador de carga y se mezclaron con 50 μ L de β -mercaptoetanol. Para cargar el gel se mezclaron 20 μ L de cada muestra más 20 μ L de amortiguador de carga, se incubó a 90°C por 5 minutos para posteriormente colocar las muestras en los pocillos del gel y correr la electroforesis en la cámara Mini-Protean Tetra System de BIO-RAD. Una vez finalizada la electroforesis se usaron dos técnicas diferentes de tinción para ver las bandas de proteína en los geles las cuales se describen a continuación.

6.9.4.1. Tinción con azul de coomassie

El gel se separó del vidrio y se colocó en un recipiente limpio donde se lavó 2 veces con agua miliQ. A continuación se añadieron 50 mL de solución fijadora.

COMPONENTE	CONCENTRACION
Ácido acético glacial	10 %
Etanol absoluto	40 %
Agua miliQ	50 %

Tabla 43. Solución fijadora

El gel se dejó 1 hora en agitación para después desechar la solución fijadora y hacer lavados con agua miliQ hasta eliminar el olor a ácido acético. Se añadieron 50 mL de azul de coomassie y se dejó el gel en agitación toda la noche; después se lavó el colorante con agua miliQ hasta poder ver de forma clara las bandas tanto del marcador como de las proteínas a estudiar y finalmente se fotodocumentaron los geles en el equipo Gel-Doc EZ Imager de BIO-RAD.

6.9.4.2. Tinción con plata

Una vez que se separó el gel del vidrio se lavó una vez con agua miliQ, y se añadieron 50 mL de solución fijadora (Tabla 44) del kit Silver Stain Plus de BIO-RAD.

COMPONENTE	VOLUMEN
Metanol	25 mL
Ácido acético	5 mL
Fijador (Potenciador)	5 mL
Agua miliQ	15 mL

Tabla 44. Solución fijadora, tinción con plata

Se dejó en agitación constante por 12 horas después de lo cual se desechó la solución fijadora y se lavó 3 veces con agua miliQ. Se agregaron 50 mL de solución de tinción (Tabla 45) añadiendo el acelerador justo antes de adicionarlo al gel.

COMPONENTE	VOLUMEN
Agua miliQ	17.5 mL
Solución de complejo de plata	2.5 mL
Solución de reducción	2.5 mL
Reactivo desarrollador de imagen	2.5 mL
Acelerador	25 mL

Tabla 45. Solución de tinción

Se mantuvo el gel en agitación por aproximadamente 5 minutos hasta observar el revelado de las bandas de proteína y se detuvo la reacción desechando la solución de tinción y adicionando 50 mL de ácido acético al 5%. Se dejó en agitación por 30 minutos después de los cuales se hicieron lavados con agua miliQ hasta eliminar el olor a ácido acético del gel, para finalmente fotodocumentar en el equipo Gel-Doc EZ Imager de BIO-RAD.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Amplificación y clonación en pBKS+ de los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB* de *Penicillium chrysogenum*

7.1.1. Extracción de ADN genómico de *Penicillium chrysogenum*

Se utilizó el método descrito en la sección 6.3. de Materiales y Métodos para la extracción de ADN total de *Penicillium chrysogenum*. Para verificar la calidad y concentración del ADN obtenido se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (Fig. 9). En el gel se observó un ADN total íntegro y en una concentración suficiente para poder utilizarlo como molde para reacciones de PCR.

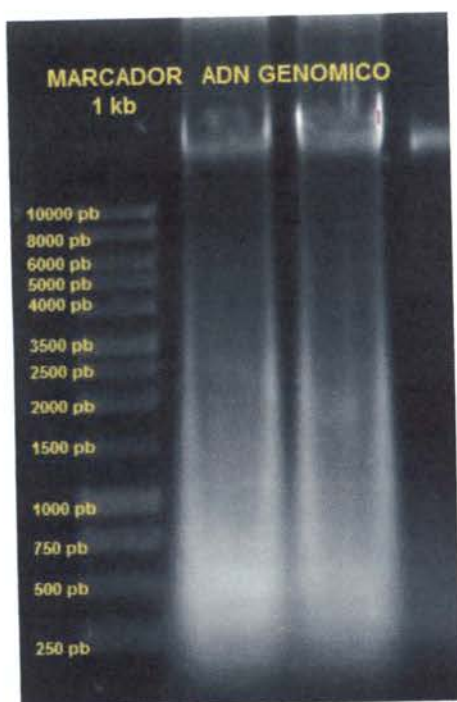


Figura 9. Extracción de ADN genómico de *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1), y 1 μ L de muestra mezclada con 2 μ L de amortiguador de carga 10x más 10 μ L de agua estéril (carriles 2 y 3). El gel se corrió con un voltaje de 80 V durante 45 minutos, y se tiñó con Bromuro de etidio por 15 minutos.

7.1.2. Megapreparación para ADN plasmídico de pBKS+

Se obtuvo ADN plasmídico del vector pBLUESCRIPT KS+ (pBKS+) según el método descrito en la sección 6.4.1. de Materiales y Métodos. Se realizó a continuación una electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, para comprobar la cantidad e integridad del mismo (Fig. 10).

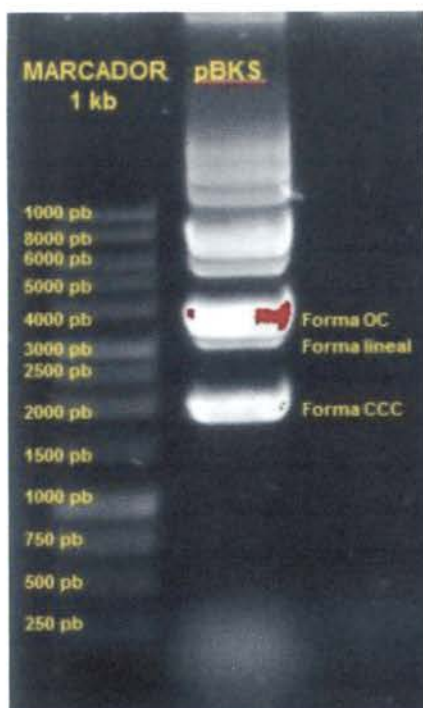


Figura 10. Vector pBKS+ obtenido mediante megapreparación. Se señala la posición de las formas ccc (superenrollada), lineal y OC (relajada). Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1), y 1 μ L de vector pBKS+ mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x más 10 μ L de agua (carril 2).

En la figura 10 se pueden observar las 3 bandas características de un vector, las cuales corren a diferentes velocidades en una electroforesis, representando los 2 niveles de enrollamiento del ADN plasmidico: circular relajado y superenrollado, más la forma lineal con el tamaño correspondiente al plásmido pBKS+, que es de aproximadamente 2.9 kb.

Este plásmido se utilizó para insertar los fragmentos de los 3 genes amplificados por PCR y así mantener estos fragmentos estables y disponibles para todos los experimentos subsecuentes.

7.1.3. Amplificación de los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB* por PCR

El objetivo de la técnica de PCR es la obtención de un gran número de copias de un fragmento de ADN, partiendo de una concentración mínima y aprovechando la propiedad natural de la ADN polimerasa para replicar la hebras de ADN; con lo que se obtiene material suficiente de regiones específicas de interés para estudios posteriores de forma eficiente y rápida además de que los productos obtenidos son fáciles de purificar.

En la amplificación de los 3 fragmentos deseados utilizando un gradiente de temperatura de alineamiento los resultados óptimos se obtuvieron con una temperatura de 62°C y

usando la polimerasa *pfu Ultra II Fusion HS* de Agilent Technologies, una polimerasa de alta fidelidad y muy eficiente.

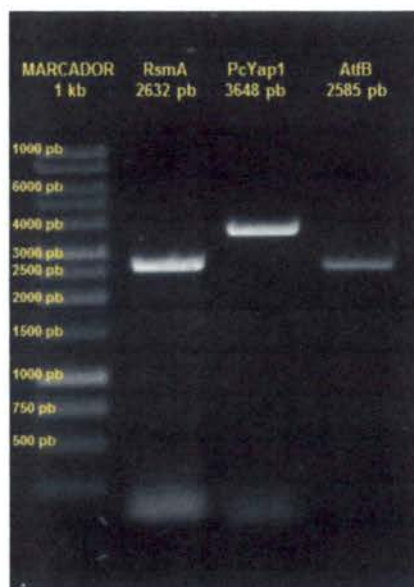


Figura 11. Genes amplificado por PCR. Se cargaron 2 μ L de marcador Lader de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L de producto de PCR mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x más 10 μ L de agua (carril 2: *RsmA*, carril 3: *PcYap1* y carril 4: *AtfB*)

Para comprobar la presencia de los fragmentos amplificados se corrió un gel de agarosa al 0.7% (Fig. 11).

Se observa en la figura 11 que se obtuvieron los tamaños esperados para los genes *RsmA*, *PcYap1* y *AtfB* de 2632 pb, 3648 pb y 2585 pb respectivamente con una concentración tal que permitió purificar los fragmentos y posteriormente digerirlos para su inserción en pBKS+.

Estos fragmentos amplificados contienen las regiones indicadas en la figura 12, comprendiendo la región codificante (con sus intrones), una región de aproximadamente 1 kb corriente arriba que incluye el promotor, y una región de varios cientos de pares de bases en la parte 3' que incluye el terminador.

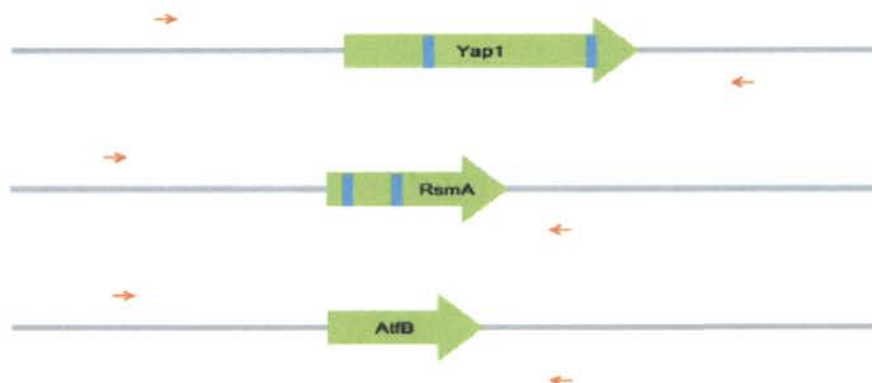


Figura 12. Esquema de los fragmentos amplificados por PCR.

Las líneas grises representan ADN cromosómico.

Las flechas naranjas indican los oligonucleótidos Forward y Reverso respectivamente.

Las flechas verdes son la región correspondiente a la ORF del gen dentro de cada fragmento. Y las franjas azules corresponden a los intrones.

7.1.4. Clonación de los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB* en pBKS+

Se llevaron a cabo digestiones dobles con enzimas de restricción de los fragmentos de los genes amplificados y del vector pBKS+, para proceder a continuación a la ligación e inserción de los mismos en el vector. Se utilizaron las enzimas *Bam*HI y *Xba*I para *PcYap1*, *Bam*HI y *Hind*III para *RsmA* y *Bam*HI y *Eco*RI para *AtfB*.

Los geles de agarosa correspondientes a la confirmación de las digestiones dobles tanto del vector pBKS+ como de cada uno de los genes (*PcYap1*, *RsmA* y *AtfB*) se muestran en las figuras 13 y 14.

En estos geles también se corrieron controles que permitieron comprobar la eficiencia de los pares de enzimas de restricción utilizadas y así asegurar los cortes de ambas enzimas en el vector.



Figura 13. Digestiones dobles pBKS+. Se cargaron 2 μ L de marcador Lader de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L de reacción de digestión mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x más 10 μ L de agua (carril 2: pBKS+ con *Bam*HI-*Eco*RI, carril 3: control *Eco*RI, carril 4: pBKS+ con *Bam*HI-*Xba*I, carril 5: control *Xba*I, carril 6: pBKS+ con *Bam*HI-*Hind*III, carril 7: control *Hind*III y carril 8: pBKS+ con *Bam*HI)

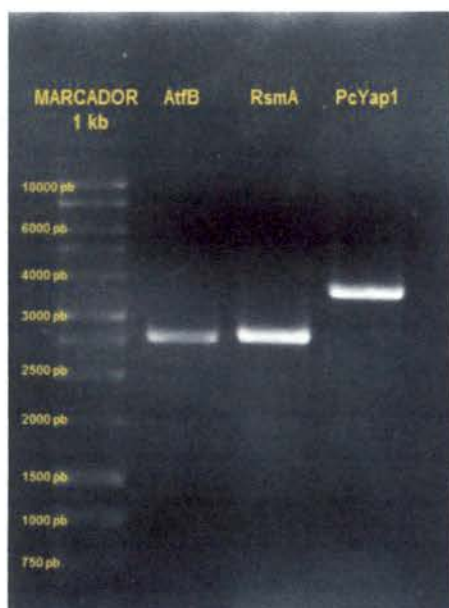


Figura 14. Digestión doble de fragmentos amplificados correspondientes a los genes. Se cargaron 2 μ L de marcador Lader de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L de reacción de digestión mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x más 10 μ L de agua (carril 2: *AtfB* con *Bam*HI-*Eco*RI, carril 3: *RsmA* con *Bam*HI-*Hind*III y carril 4: *PcYap1* con *Bam*HI-*Xba*I)

Una vez confirmadas las digestiones dobles por electroforesis en gel de agarosa (Figuras 13 y 14) se ligaron cada uno de los genes con el vector pBKS+. A continuación se transformó *E. coli* usando como marcador de selección 25 μ g/mL de ampicilina; con las colonias crecidas se realizaron minipreparaciones para correr una electroforesis en gel de agarosa y así corroborar la presencia de los fragmentos correspondientes a los genes

PcYap1, *RsmA* y *AtfB* en el vector pBKS+ linearizando dichas construcciones con la enzima *Bam*HI como se indica en la figura 15.

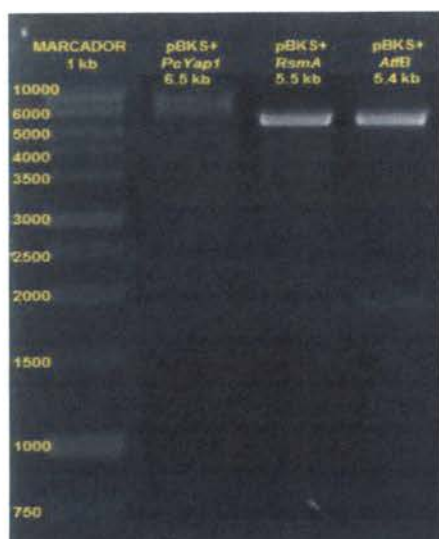


Figura 15. Minipreparaciones de *E. coli* con los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB* en el vector pBKS+ linearizando dichas construcciones con la enzima *Bam*HI. Se cargaron 2 μ L de marcador Lader de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L de reacción de minipreparación mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x más 10 μ L de agua (carril 2: pBKS+-*PcYap1*, carril 3: pBKS+-*RsmA* y carril 4: pBKS+-*AtfB*)

7.2. Acondicionamiento de *Pichia pastoris* y del vector pPICZ

7.2.1. Concentración mínima inhibitoria para *P. pastoris*

La levadura *Pichia pastoris* es utilizada como sistema de expresión de proteínas heterólogas debido a un gran número de propiedades que la hacen adecuada para esta tarea, como lo es una alta tasa de crecimiento, capacidad para crecer en un medio simple, su adaptación tanto en cultivos de pequeña como de gran escala para la producción y su fácil manejo a nivel laboratorio.

Al ser la primera vez que se trabajaba en nuestro laboratorio con esta levadura fue de vital importancia determinar todas las condiciones de crecimiento y mantenimiento adecuadas para poder tener un control total sobre los cultivos y así tener la certeza de que todas las colonias obtenidas fueran realmente transformantes con el ADN recombinante de nuestro interés.

En primer lugar se determinó la sensibilidad de *Pichia pastoris* al antibiótico fleomicina así como las condiciones de crecimiento de esta levadura. Se realizó un gradiente probando distintas concentraciones de fleomicina en medio YPD obteniéndose crecimiento de un gran número de colonias en concentraciones por debajo de 50 μ g/mL, mientras que en esta concentración y superiores ya no se obtuvieron colonias (Fotografías 1-5), por lo que se determinó esa concentración como la necesaria para la selección de células de *P.*

pastoris transformadas que tengan incorporado el vector pPICZ, lo que nos permitirá evitar el crecimiento de células no transformadas como falsos positivos reduciendo así el número de colonias a analizar.



Fotografía 2. Medio YPD sin fleomicina



Fotografía 1. Medio YPD con 10 µg/mL de fleomicina



Fotografía 3. Medio YPD con 20 µg/mL de fleomicina



Fotografía 4. Medio YPD con 30 µg/mL de fleomicina



Fotografía 5. Medio YPD con 50 µg/mL de fleomicina

7.2.2. Obtención de ADN plasmídico de los vectores pPICZ-A y B

pPICZ, en sus diversas formas (A, B y C), es un vector de expresión de 3.3 kb utilizado para expresar proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*; dichas proteínas se sintetizan como proteínas de fusión (proteínas recombinantes) con un péptido C-terminal que contiene el epítipo *c-myc* junto a una etiqueta de poli-histidina (6xHis) que es de gran utilidad para la detección y purificación de proteínas de fusión recombinantes. Esta característica fue importante para elegir este vector como sistema de expresión para nuestras proteínas.

Para realizar las megapreparaciones de ADN plasmídico de los vectores pPICZ, con la finalidad de obtener por medio de lisis alcalina suficiente cantidad de vector para los experimentos de ligación, se transformaron por electroporación células competentes de *E. coli* con los vectores pPICZ-A y pPICZ-B, utilizando como marcador de selección el antibiótico fleomicina, y se seleccionaron las colonias resistentes a dicho antibiótico (fotografías 6, 7 y 8).



Fotografía 6. *E. coli* DH5α transformada con pPICZ-A



Fotografía 7. *E. coli* DH5α transformada con pPICZ-B



Fotografía 8. Control negativo

7.3. Obtención de la secuencia codificante (CDS) de los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB*

7.3.1. Fusión de exones por PCR recombinante para la obtención de la CDS de *RsmA* y *AtfB*

Esta estrategia se utilizó para poder obtener una CDS "in vitro", con los exones fusionados tras haberse eliminado los intrones del gen correspondiente. El punto crítico de esta técnica es el diseño del juego de oligonucleótidos a utilizar de tal forma que solo se amplifiquen los exones excluyendo los intrones presentes en el ADN molde y que estos se fusionen mediante la estrategia indicada en la figura 16.

El oligonucleótido 1 se diseña en el codón de inicio ATG, y el 6 un codón antes del codón de fin, ambos contienen en sus extremos 5' secuencias de corte para enzimas de restricción que permitirán la ligación del fragmento CDS final amplificado con el vector pPICZ en el marco de lectura correcto. Por su parte los oligonucleótidos 2 y 3 son reversos complementarios, y contienen secuencias del exón donde anillan y del exón contiguo; lo mismo sucede con los oligonucleótidos 4 y 5. Esto permite la fusión de los exones E-1 y E-2 en un primer paso, y la fusión de ambos con el E-3 en el paso final.

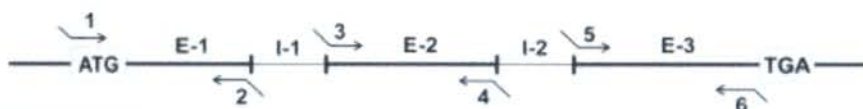


Figura 16. PCR recombinante para obtener "in vitro" la CDS del gen *RsmA* a partir de ADN genómico. I-1 y I-2 indican las posiciones de los dos intrones. E-1, E-2 y E-3 las posiciones de los exones. Los fragmentos obtenidos se fusionan por medio de PCRs

Este diseño permite la obtención de la CDS, y mediante la elección de las enzimas de los extremos 5' y 3' permite que al integrarse en el vector pPICZ-A o B quede en el marco de lectura correcto para la expresión de la fusionada al epítipo *c-myc* y a His-tag. Al no incluirse los intrones se evita la posibilidad de que estos no se procesen correctamente en *P. pastoris*, lo que resultaría en la obtención de una proteína no funcional o en la no expresión de la misma.

Una vez realizadas las PCRs para obtener los exones de los diferentes genes se confirmó la amplificación mediante geles de agarosa; para los exones de menor tamaño (*PcYap1* E-1, *PcYap1* E-3, *RsmA* E-1, E-2 y E-3) se corrió un gel de agarosa de 1.8% de concentración (Fig. 17 y 18), mientras que para los exones de mayor tamaño (*PcYap1* E-2 y *AtfB*) se corrió un gel de 1% de concentración (Fig. 19 y 20).

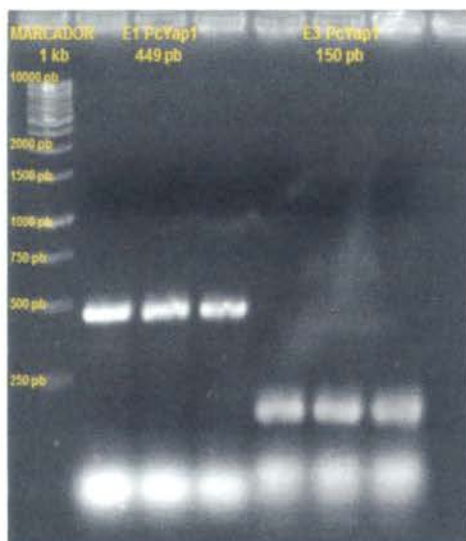


Figura 17. Exones E-1 y E-3 del gen *PcYap1*. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L del producto de PCR mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x (carriles 2, 3 y 4: *PcYap1* E-1; carriles 5, 6 y 7: *PcYap1* E-3)

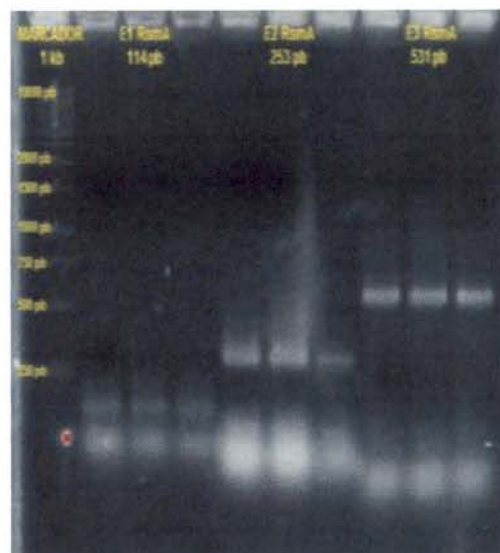


Figura 18. Exones E-1, E-2 y E-3 del gen *RsmA*. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L del producto de PCR mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x (carriles 2, 3 y 4: *RsmA* E-1; carril 5, 6 y 7: *RsmA* E-2 y carriles 8, 9 y 10: *RsmA* E-3)

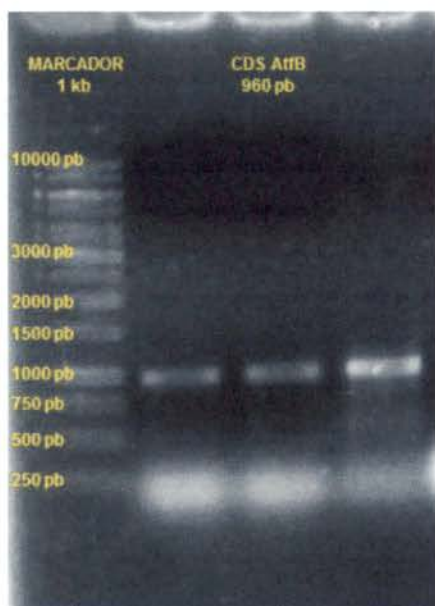


Figura 19. CDS del gen *AtfB*. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L del producto de PCR mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x (carriles 2, 3 y 4: CDS *AtfB*)

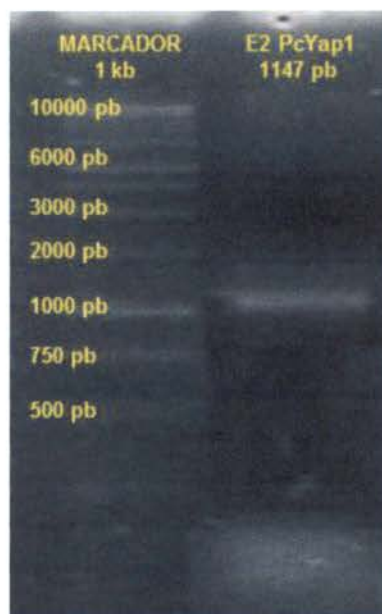


Figura 20. Exón E-2 del gen *PcYap1*. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L del producto de PCR mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x (carril 2: *PcYap1* E-2)

Una vez confirmada la amplificación de todos los exones se purificaron y se determinó su concentración en un gel de agarosa de 1% para los exones de mayor tamaño y de 1.8% para los exones de menos de 600 pb (Fig. 21 y 22), esto con la finalidad de determinar la proporción de exones a utilizar en las mezclas de reacción de las subsecuentes PCR's.

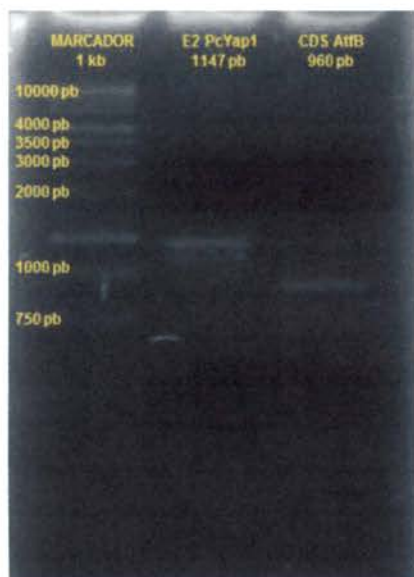


Figura 21. Exones purificados. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1) 2 μ L del producto de PCR mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x (carril 2: *PcYap1* E-2y carril 3: CDS *AtfB*)



Figura 22. Exones purificados. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L del producto de PCR mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x (carril 2: *RsmA* E-1, Carril 3: *RsmA* E-2, Carril 4: *RsmA* E-3, carril 5: *PcYap1* E-1 y carril 6: *PcYap1* E-3)

En el caso del gen *AtfB* al no contar con intrones en su secuencia con esta primera PCR fue suficiente para obtener su secuencia codificante (CDS), por lo que después de la purificación del producto de PCR este fragmento estuvo listo para la digestión e incorporación al plásmido pPICZ-B.

A continuación se decidió realizar la fusión de los exones 1 y 2 del gen *RsmA* por ser los de menor tamaño. En el perfil de PCR se consideró la longitud del fragmento esperado así como las temperaturas de alineamiento del par de oligonucleótidos a utilizar; el fragmento obtenido se usó como molde para la subsecuente PCR fusionándolo al tercer exón (Fig. 23 y 24).



Figura 23. Fusión de los exones E-1 y E-2 de *RsmA*, en una PCR usando los oligonucleótidos *RsmA*-1 y -4. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L del producto de PCR mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x (carriles 2 y 3: *RsmA* E1-2)

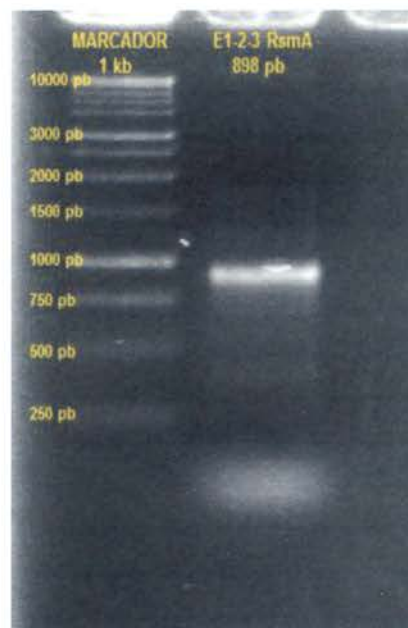


Figura 24. Fusión de los tres exones de *RsmA* tras la última PCR usando los oligonucleótidos *RsmA*-1 y -6. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L del producto de PCR mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x (carril 2: *RsmA* E1-2-3)

7.3.2. Obtención de la CDS del gen *PcYap1* mediante RT-PCR

En el caso del gen *PcYap1* no resultó eficaz la estrategia de la PCR recombinante para obtener la secuencia codificante CDS. Creemos que esto se debió a la diferencia tan grande en los tamaños de cada uno de los exones, lo que dificultó el establecer las condiciones óptimas de fusión por PCR. Por tanto se planteó una segunda estrategia que fue la de llevar a cabo una RT-PCR que nos permitiera la amplificación del gen *PcYap1* sin la presencia de intrones.

Para la extracción de ARN se obtuvo biomasa suficiente de *Penicillium chrysogenum*, y se llevó a cabo la extracción tal y como se detalla en la sección 6.7.1. de Materiales y Métodos. Se confirmó la integridad del ARN corriendo un gel de agarosa con formaldehído (Fig. 25), verificándose en este gel las estructuras características del ARN total, con la presencia de los ARN ribosomales.

Usando este ARN como molde se realizó una reacción con la transcriptasa reversa para obtener ADNc total, seguida de una PCR convencional utilizando los

oligonucleótidos PcYap1-1 y PcYap1-6, donde se obtuvo amplificada la secuencia codificante del gen *PcYap1*. Esto se confirmó corriendo un gel de agarosa al 1% de concentración (Fig. 26).

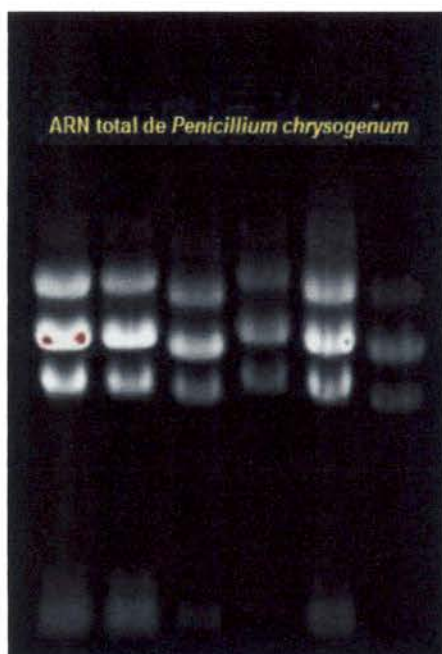


Figura 25. Gel de agarosa con ARN total de *P. chrysogenum*. Se cargaron 2 μ L de cada vial del ARN extraído mezclados con 3 μ L de amortiguador de carga mas 5 μ L de agua DEPC (libre de ARNasas)

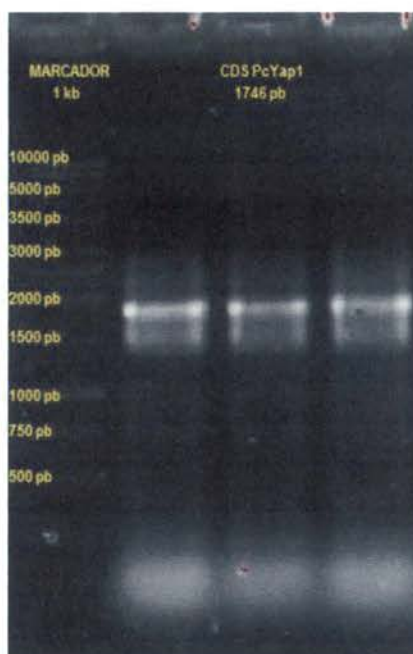


Figura 26. CDS del gen *PcYap1*, obtenida mediante PCR usando ADNc y los oligonucleótidos PcYap1 1 y 6. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L del producto de PCR mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x (carril 2, 3 y 4: CDS *PcYap1*)

7.4. Obtención de transformantes de *P. pastoris* para la expresión de los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB*

7.4.1. Construcción de los plásmidos pPICZ-A/*PcYap1*, pPICZ-B/*RsmA* y pPICZ-B/*AtfB*

Para poder realizar las ligaciones con el vector pPICZ que permitirán la expresión de los genes en la levadura *Pichia pastoris* se realizaron digestiones con enzimas de restricción de cada uno de los fragmentos CDS de los genes y de los vectores pPICZ-A y pPICZ-B. Una vez hechas dichas reacciones se confirmó la concentración de los fragmentos y vectores en geles de agarosa al 0.8 % (Fig. 27, 28 y 29) y así se determinaron las proporciones de los fragmentos y el vector en las reacciones de ligación.

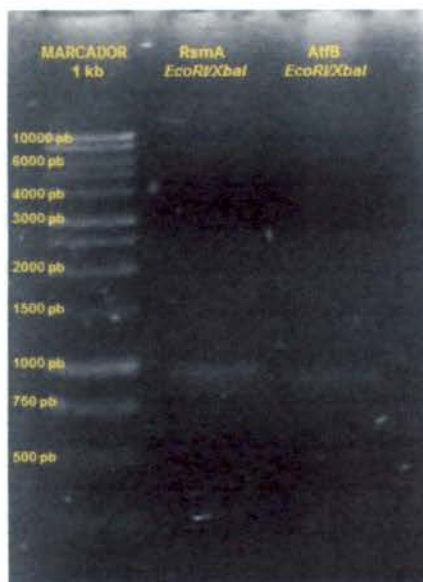


Figura 27. Digestión doble del fragmento CDS de *RsmA* y *AtfB*. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L de la reacción de digestión mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x (carril 2: *RsmA* digerido con EcoRI/XbaI, carril 3: *AtfB* digerido con EcoRI/XbaI)

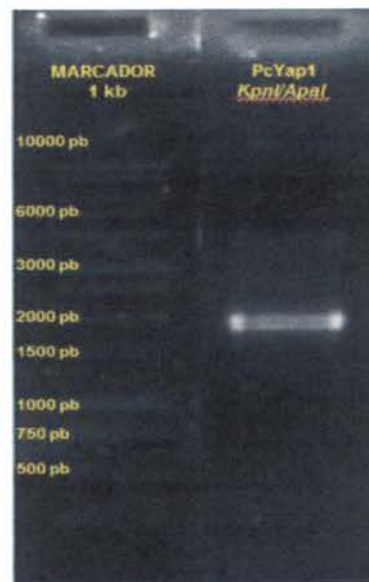


Figura 28. Digestión doble del fragmento CDS de *PcYap1*. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L de la reacción de digestión mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x (carril 2: *PcYap1* digerido con *KpnI/ApaI*)

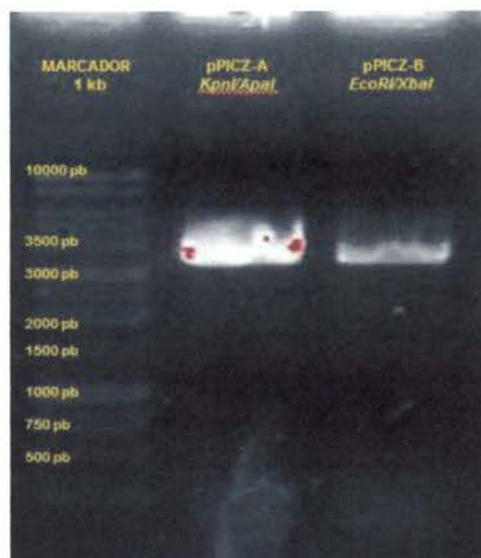


Figura 29. Digestión doble del vector pPICZ. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L de la reacción de digestión mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x (carril 2: pPICZ-A digerido con *KpnI/ApaI* y carril 3: pPICZ-B digerido con EcoRI/XbaI)

Una vez hechas las ligaciones éstas se transformaron en células electrocompetentes de *E. coli*, y se plaquearon en cajas Petri con medio LB agar bajo en sales suplementado fleomicina, para poder seleccionar las colonias que incorporaron los

plásmidos (Fotografías 9, 10 y 11), además se realizó un control negativo con células electrocompetentes de *E. coli* sin transformar (Fotografía 12) para asegurar que todas las colonias crecidas lo fueran porque integraron las construcciones realizadas.



Fotografía 9. Colonias transformantes con la ligación pPICZ-B - CDS *RsmA*



Fotografía 10. Colonias transformantes con la ligación pPICZ-B - CDS *AtfB*



Fotografía 11. Colonias transformantes con la ligación pPICZ-A - CDS *PcYap1*



Fotografía 12. Control negativo de la transformación de *E. coli*

Con las colonias positivas de la transformación en *E. coli* se hicieron megapreparaciones para obtener mediante lisis alcalina mayores concentraciones de cada una de las construcciones, las cuales se usaron para transformar células electrocompetentes de *Pichia pastoris*.

De estas megapreparaciones se tomaron muestras para linearizar las construcciones pPICZ-A/*PcYap1*, pPICZ-B/*RsmA* y pPICZ-B/*AtfB* con la enzima de restricción *SacI* y confirmar por electroforesis en gel de agarosa la formación de los plásmidos como se muestra en la figura 30.

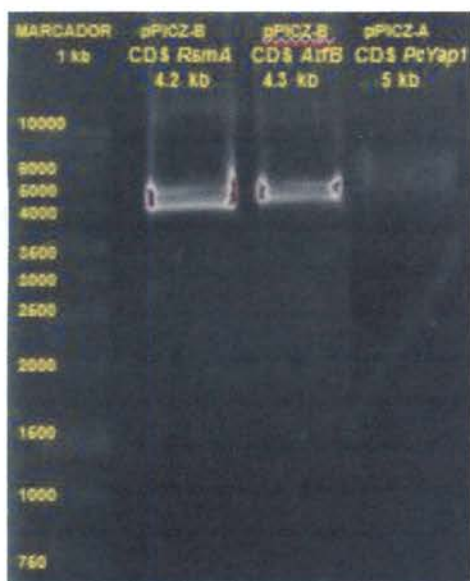


Figura 30. Megapreparaciones de plásmidos pPICZ-A/*PcYap1*, pPICZ-B/*RsmA* y pPICZ-B/*AtfB* linealizados con *SacI*. Se cargaron 2 μ L de marcador Ladder de 1 kb como referencia (carril 1) y 2 μ L de reacción de minipreparación mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga 10x más 10 μ L de agua (carril 2: pPICZ-B/*RsmA*, carril 3: pPICZ-B/*AtfB* y carril 4: pPICZ-A/*PcYap1*)

7.4.2. Transformación de *P. pastoris* con los plásmidos pPICZ-A/*PcYap1*, pPICZ-B/*RsmA* y pPICZ-B/*AtfB*

Se llevó a cabo la transformación de *Pichia pastoris* tal y como se detalla en el apartado 6.5.4. de Materiales y Métodos. Los productos de la electroporación de *P. pastoris* (Fotografías 13, 14 y 15) se plaquearon en cajas de Petri con medio YPD agar suplementado con fleomicina, para poder seleccionar las colonias que se utilizarían como inóculo en medio líquido YPD para la inducción de la expresión de las proteínas deseadas.

También se realizó un control negativo (Fotografía 16) con células sin transformar de *Pichia pastoris* y confirmar así que no resisten el antibiótico sin la presencia de los plásmidos.



Fotografía 13. Colonias de *P. pastoris* transformantes con el plásmido pPICZ-B/*RsmA*



Fotografía 14. Colonias de *P. pastoris* transformantes con el plásmido pPICZ-B/*AtfB*



Fotografía 15. Colonias de *P. pastoris* transformantes con el plásmido pPICZ-A/PcYap1



Fotografía 16. Control negativo

7.5. Extracción, purificación y detección de las proteínas PcYap1, RsmA y AtfB expresadas en *Pichia pastoris*

Los fragmentos con la CDS correspondientes a los tres genes que fueron insertados en el vector pPICZ carecen de un codón de fin, lo que posibilita la síntesis de una proteína de fusión con el epítipo *c-myc* y la cola de poli-histidina (His-tag) en el extremo C-terminal de la proteína expresada.

Esta cola de histidina es uno de los sistemas de etiquetado de proteínas más usados, y funciona como sistema de purificación debido a la afinidad de la histidina con iones metálicos inmovilizados como por ejemplo el Ni^{+2} . Los metales son retenidos por agentes quelantes (en este caso es usado el ácido nitrotriácético Ni-TA) con grupos reactivos, unidos covalentemente a un soporte sólido; la etiqueta de histidinas fusionada a la proteína de interés se une a los cationes divalentes del ion, inmovilizados en la resina de la columna de afinidad. Las proteínas que no se unen se eluyen y la proteína de interés es recuperada posteriormente por elución con imidazol.

Una vez realizada la extracción de la proteína intracelular (Materiales y Métodos apartado 6.9.2.), se cargaron columnas de níquel con el extracto crudo y se realizaron lavados con distintas concentraciones de imidazol en amortiguador de fosfatos para poder eluir las proteínas de la columna, ya que el imidazol compite por carga con las proteínas retenidas en la columna. Con el incremento de la concentración las proteínas se van desprendiendo paulatinamente, esperando recuperarse las proteínas

expresadas con la etiqueta His-tag en su extremo C-terminal en los lavados correspondientes a entre 300 y 500 mM de imidazol.

Por cada proteína se corrió un gel SDS-PAGE con el extracto crudo más el gradiente de imidazol. Se usó tinción con azul de coomassie y tinción de plata para la detección de las proteínas por peso molecular, usando como referencia un marcador de peso molecular de proteínas de 250 a 10 kDa Precision Plus Protein Standards Dual Color de BIO-RAD. Los resultados obtenidos se detallan en las siguientes secciones.

7.5.1. Purificación de PcYap1

En el caso del gen *PcYap1* se esperaba una proteína de 64 kDa de acuerdo a la secuencia aminoacídica, y fusionada al epítipo *c-myc* y la cola de 6 histidinas daría un total de 66 kDa.

A pesar de que se obtuvo un extracto crudo poco concentrado se logra distinguir el gradiente de purificación con la tinción de azul de coomassie, aunque en la concentración de 500 mM de imidazol, donde debería ya de encontrarse la proteína purificada todavía se detectan dos bandas como posibles candidatas a ser la proteína recombinante (Fig. 31). Quizá se deba realizar un lavado intermedio de 250 mM de imidazol para garantizar la elución de todas aquellas proteínas del extracto crudo muy afines al soporte de agarosa y que no sean la proteína PcYap1.

Es probable que la poca concentración de proteína obtenida se deba principalmente a la poca solubilidad de ésta en el amortiguador de fosfatos, o a una técnica poco adecuada de extracción para este caso en particular, por lo que se espera obtener mayor cantidad de proteína intracelular partiendo de una mayor cantidad de cultivo o haciendo algunas modificaciones al método de extracción sobre todo en la selección del amortiguador de rotura.

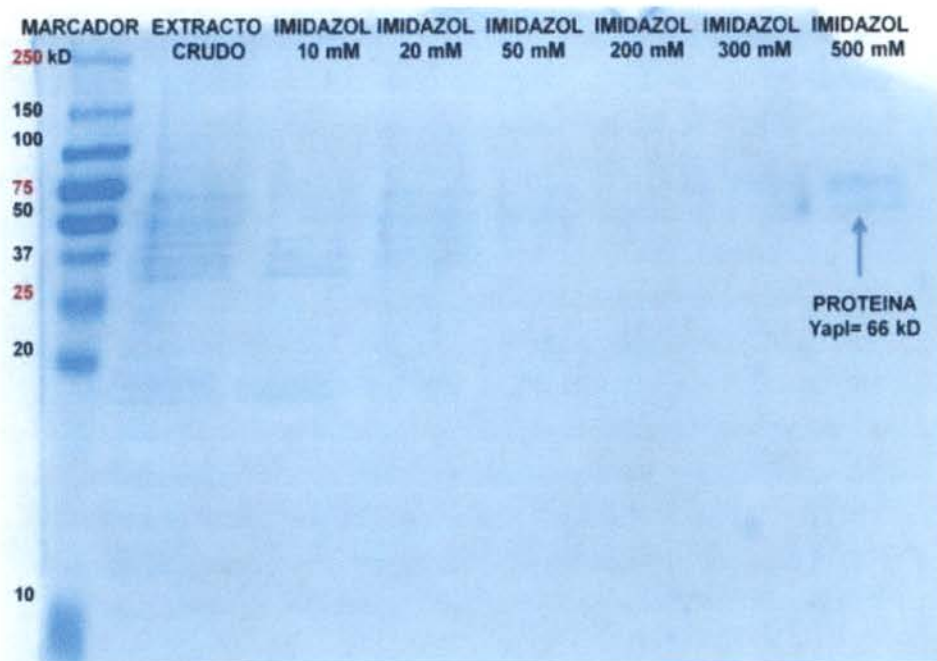


Figura 31. Gel SDS-PAGE de las fracciones del gradiente de imidazol para la purificación de la proteína PcYap1, teñido con azul de coomassie; como referencia se cargaron 3 μ L de marcador de 250 a 10 kDa (carril 1)

7.5.2. Purificación de RsmA

Para la proteína RsmA la extracción de proteína intracelular fue exitosa, ya que se obtuvo suficiente extracto crudo para su análisis y para el gradiente de purificación con imidazol.

Se esperaba una proteína de 33 kDa de acuerdo a su secuencia aminoacídica, y con la fusión al epítipo *c-myc* y a la cola de 6 histidinas daría un total de 35 kDa. En el SDS-PAGE, tanto en tinción con azul de coomassie como con tinción de plata (Fig. 32 y 33) se detecta la banda correspondiente a esta proteína de fusión desde el lavado con 200 mM de imidazol, y totalmente purificada en la concentración 500 mM de imidazol, por lo tanto esta elución se puede utilizar tanto para análisis de huella peptídica como para montar la técnica EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) y así determinar si esta proteína efectivamente es capaz de unirse a la secuencia de unión descrita para el factor transcripcional Pta1: TTAGTAA.

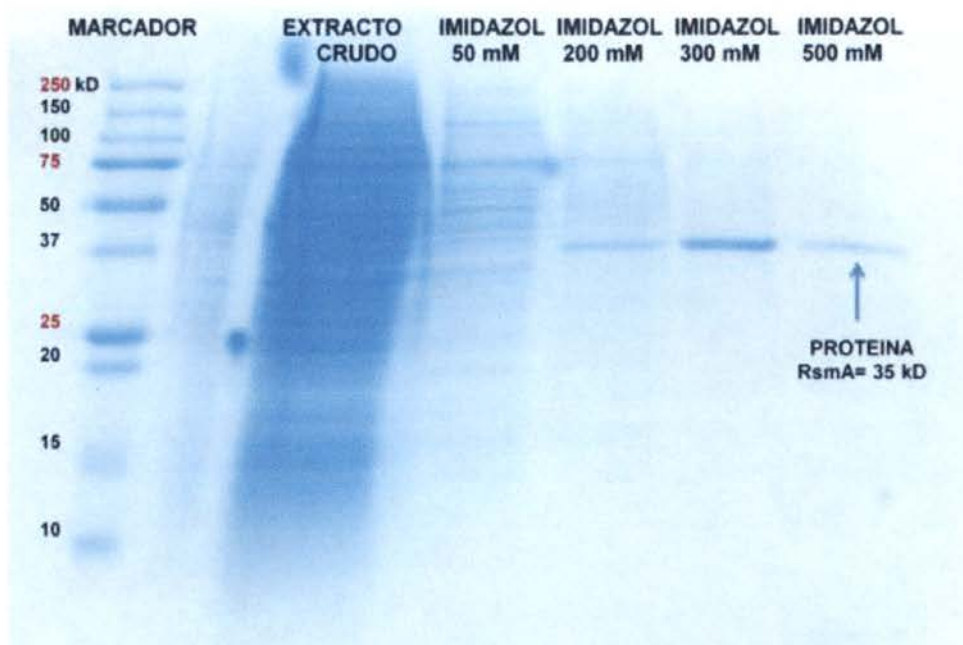


Figura 32. Gel SDS-PAGE de las fracciones del gradiente de imidazol para la purificación de la proteína RsmA, teñido con azul de coomassie; como referencia se cargaron 3 μ L de marcador de 250 a 10 kDa (carril 1)



Figura 33. Gel SDS-PAGE de las fracciones del gradiente de imidazol para la purificación de la proteína RsmA, tinción con plata; como referencia se cargaron 3 μ L de marcador de 250 a 10 kDa (carril 1)

7.5.3. Purificación de AtfB

La extracción de la proteína AtfB tampoco representó ningún problema obteniéndose extracto crudo en alta concentración para montar las columnas de níquel y así realizar los pasos de purificación.

Se espera una proteína de 36 kDa de acuerdo a su secuencia aminoacídica, y fusionada al epítipo *c-myc* y la cola de 6 histidinas, el tamaño total sería de 38 kDa. En el SDS-PAGE, tanto en tinción con azul de coomassie como con tinción de plata (Fig. 34 y 35), se observa la banda del tamaño esperado para esta proteína de fusión desde el lavado de 200 mM de imidazol, sin embargo, es hasta el lavado de 500 mM de imidazol donde ya se detecta totalmente purificada aunque en una menor concentración, pero se considera que es suficiente para su análisis de huella peptídica, y ya que está totalmente purificada puede iniciarse el montaje de la técnica EMSA también para esta proteína.

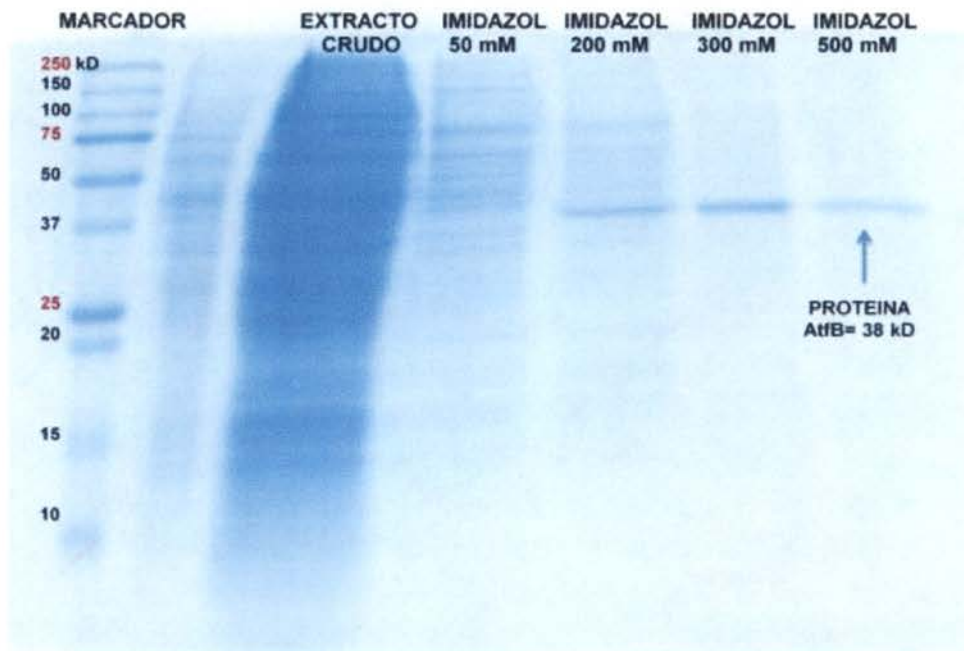


Figura 34. Gel SDS-PAGE de las fracciones del gradiente de imidazol para la purificación de la proteína AtfB, teñido con azul de coomassie; como referencia se cargaron 3 μ L de marcador de 250 a 10 kDa (carril 1)

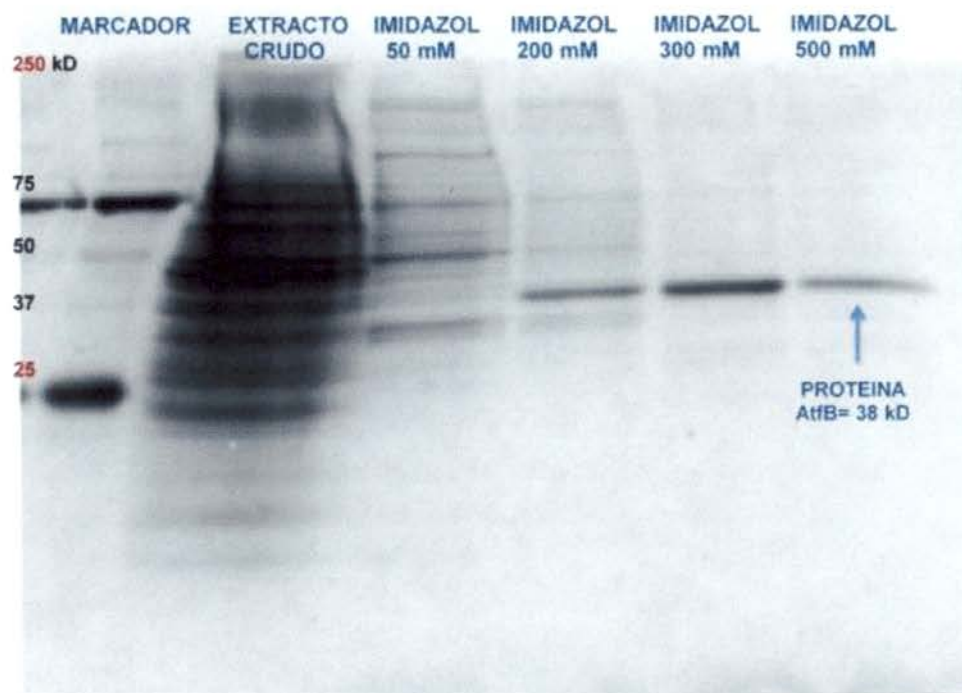


Figura 35. Gel SDS-PAGE de las fracciones del gradiente de imidazol para la purificación de la proteína AtfB, tinción con plata; como referencia se cargaron 3 μ L de marcador de 250 a 10 kDa (carril 1)

8. CONCLUSIONES

Se amplificaron por PCR los genes *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB* de *Penicillium chrysogenum*, y se subclonaron en el vector pBLUESCRIPT KS+.

Se obtuvo la secuencia codificante CDS de los tres genes, mediante PCR recombinante en el caso del gen *RsmA* y por RT-PCR en el caso del gen *PcYap1*.

Se establecieron las condiciones óptimas de crecimiento y conservación de la levadura metilotrófica *P. pastoris*, así como su transformación con el vector de expresión pPICZ, implementando así un sistema de expresión de proteínas heterólogas útil para la obtención de proteínas de interés.

Se llevó a cabo la expresión de los factores transcripcionales *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB* de *Penicillium chrysogenum* como proteínas de fusión a His-tag en *Pichia pastoris*, y se purificaron mediante cromatografía de afinidad.

Detección de las proteínas por peso molecular en SDS-PAGE usando como referencia un marcador de peso molecular de 250 a 10 kDa, encontrando las bandas para *PcYap1* de 66 kDa, *RsmA* de 35 kDa y *AtfB* de 38 kDa.

9. PERSPECTIVAS

Inmunodetección mediante anticuerpos anti-*c-myc* para confirmar la correcta expresión de las proteínas de fusión.

Identificación por huella peptídica de las proteínas *PcYap1*, *RsmA* y *AtfB* expresadas como proteínas de fusión a *c-myc* e His-tag en *Pichia pastoris*.

Realización de ensayos EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) con las proteínas purificadas para confirmar su función de proteínas de unión a ADN y en particular a la secuencia TTAGTAA en el promotor del gen *pcbAB* de *P. chrysogenum*.

10. REFERENCIAS

- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N.J., Keller, N.P., Yu, J.H., Braus, G.H., 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320: 1504-1506.
- Bok, J.W. y Keller, N.P. 2004. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* 3: 527-535.
- Brakhage AA, Spröte P, Al-Abdallah Q, Gehrke A, Plattner H y Tüncher A. 2004. Regulation of Penicillin Biosynthesis in Filamentous Fungi. *Adv. Biochem. Engin. /Biotechnol.* 88: 45-90.
- Brakhage AA, Thön M, Spröte P, Scharf DH, Al-Abdallah Q, Wolke SM y Hortschansky P. 2009. Aspects on evolution of fungal β -lactam biosynthesis gene clusters and recruitment of trans-acting factors. *Phytochemistry* 70:1801-1811.
- Chu Y-W, Renno D, Saunders G. 1997. Extracellular pH affects regulation of the *pcbAB* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 250-254
- Cregg J M, Lin Cereghino I, Shi J y Higgins D. 2000. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology.* 16: 23-52.
- Daly Rachel and T. W. Hearn Milton. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18: 119 -138.
- Díez BS, Gutierrez S, Barredo JL, van Solingen P, van der Voort LHM, Martin JF. 1990. The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the α -aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. *J. Biol. Chem.* 265: 16358-16365.
- Espeso E.A.; Tilburn J.; Arst H.N.Jr. and Peñalva M.A. 1993. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* 12: 3947-3956.
- Feng B, Friedlin E, Marzluf GA. 1994. A reporter gene analysis of penicillin biosynthesis gene expression in *Penicillium chrysogenum* and its regulation by nitrogen and glucose catabolite repression. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4432-4439.
- Fernandes L, Rodrigues-Pousada C y Struhl K. 1997. Yap, a novel family of eight bZIP

- proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell. Biol.* 17: 6982-6993.
- Fernández, F.J., 1997 Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina. Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (penDE) de la ruta de biosíntesis de penicilina. Tesis Doctoral. Universidad de León, España.
- Fujii Y, Shimizu T, Toda T, Yanagida M y Hakoshima T. 2000. Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. *Nat. Struct. Biol.* 7: 889-893.
- García-Rico, R., Fierro, F. Mauriz, E., Gómez, A., Fernández Bodega, M.A. y Martín, J. F. 2008. The heterotrimeric Gα protein Pga1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology* 154: 3567-3578.
- Gellissen G. 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 54: 741 – 750.
- Haas H, Marzluf GA. 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. *Curr. Genet.* 28: 177-183.
- Kosalková K, Marcos AT, Fierro F, Hernando-Rico V, Gutiérrez S y Martín JF. 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*. *J. Biol. Chem.* 275: 2423-2430.
- Kosalková K, García-Estrada C, Ullán RV, Godio RP, Feltre R, Teixeira F, Mauriz E, Martín JF. 2009. The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie* 91: 214-225.
- Krainer F. W, Dietzsch C, Hajek T, Herwig C, Spadiut O y Glieder A. 2012. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microbial Cell Factories.* 11: 22.
- Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, Loeffler J, Kurzai O, Haertl A y Brakhage AA. 2007. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major

- regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot. Cell* 7: 2290-2302.
- Lin Cereghino J, Cregg J M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 45 – 66.
- Lin Cereghino G. P, Lin Cereghino J, Christine Ilgen C y Cregg J M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Elsevier Science Ltd. 13: 329-332.
- Liras P. y Martín JF. 2006. Gene clusters for β -lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate?. *Int. Microbiol.* 9: 9-19.
- Litzka O, Papagiannopoulos P, Davis MA, Hynes MJ, Brakhage AA. 1998. The penicillin regulator PENR1 of *Aspergillus nidulans* is a HAP-like transcriptional complex. *Eur. J. Biochem.* 251: 758-767.
- Lopez-Nieto, M.J., Ramos, F.R., Luengo, J.M. y Martin, J.F. (1985). Characterization of the biosynthesis in vivo of α -amino adipyl-L-cysteinil-D-valine in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 343 -351.
- Macauley-Patrick S, Fazenda M. L, McNeil B y Harvey L. M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. 22: 249-270.
- Miller. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Peñalva MA, Moya A, Dopazo J, Ramon D. 1990. Sequences of isopenicillin N synthetase genes suggest horizontal gene transfer from prokaryotes to eukaryotes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 241: 164-169.
- Roze, L.V., Chanda, A., Wee, J., Awad, D., and Linz, J.E. 2011. Stress-related transcription factor AtfB integrates secondary metabolism with the oxidative stress response in *Aspergilli*. *J. Biol. Chem.* 286: 35137-35148.
- Sambrook y Russell. 2009. The condensed protocols. From molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; N. Y. 269-271.
- Shaaban, M.I., Bok, J.W., Lauer, C., y Keller, N.P. 2010. Suppressor mutagenesis identifies a Velvet complex mediator of *Aspergillus nidulans* secondary metabolism. *Eukaryot Cell* 9: 1816–1824.

- Shwab, 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: 1656-1664.
- Suárez T. y Peñalba MA. 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. *Mol. Microbiol.* 20: 529-540.
- Tag, A., Hicks, J., Garifullina, G., Ake, C. Jr., Phillips, T. D., Beremand, M. y Keller, N. 2000. G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Mol Microbiol* 38: 658-665
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Peñalba MA, Arst HN Jr. 1995. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acidic- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14: 779-790.
- Toda T, Shimanuki M, Saka Y, Yamano H, Adachi Y, Shirakawa M, Kyogoku Y, y Yanagida M. 1992. Fission yeast pap1-dependent transcription is negatively regulated by an essential nuclear protein, crml. *Mol. Cell. Biol.* 12: 5474-5484.
- Toone WM, Kuge S, Samuels M, Morgan BA, Toda T, y Jones N. 1998. Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev.* 12: 1453-1463.
- Yin W-B, Amaike S, Wohlbach DJ, Gasch AP, Chiang Y-M, Wang CCC, Bok JW, Rohlf M y Keller NP. 2012. An *Aspergillus nidulans* bZIP response pathway hardwired for defensive secondary metabolism operates through aflR. *Mol. Microbiol.* 83: 1024-1034.