



**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**  
**Unidad Iztapalapa**

**“Estudio de la función de la subunidad  $\alpha$  Aga1 sobre la biosíntesis de cefalosporina en *Acremonium chrysogenum*”**

Tesis para obtener el grado de:

**Maestro en Biotecnología**

*Presenta:*

ROMEL AXEL ALTAMIRANO FLORES

*Comité tutorial:*

Dr. Francisco Fierro Fierro	Director
Dr. Francisco José Fernández Perrino	Asesor
Dr. Lino Mayorga Reyes	Asesor

México D.F.

Septiembre, 2014



La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el programa nacional de posgrados de calidad (PNPC) del CONACYT con nivel internacional.

Esta beca corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro **252470**.



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios del departamento de Biotecnología que pertenece a la división de Ciencias Biológicas y de la salud (CBS) de la Universidad Autónoma Metropolitana, plantel Iztapalapa.

México, D. F., a 05 de septiembre del 2014



El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas de la Salud de la UAM-I aprobó la tesis:

**“Estudio de la función de la subunidad  $\alpha$  Aga1 sobre la biosíntesis de cefalosporina en *Acremonium chrysogenum*”**

Que presentó:

I.B.Q. ROMEL AXEL ALTAMIRANO FLORES

**Comité tutorial:**

Director: Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Dr. Lino Mayorga Reyes

**Jurado:**

Presidente: Dr. Lino Mayorga Reyes

Secretario: Dra. María Angélica Gutiérrez Nava

Vocal: Dr. Javier Barrios González

Vocal: Dr. Francisco José Fernández Perrino



*"Dos sendas se separaban en un bosque dorado;  
apenado por no poder recorrer las dos  
al ser el único viajero, largo tiempo estuve  
mirando a una tan lejos como alcanzaba mi vista,  
hasta el recodo donde en la maleza se adentraba.*

*Después tome la otra, igualmente buena,  
por el atractivo que a mis ojos le daba  
la abundante maleza y la falta de uso,  
aunque desde donde me encontraba era cierto  
que no era mucho lo que las diferenciaba.*

*Que en aquella mañana igualmente intactas se posaban  
las hojas que ambas sendas cubrían.  
¡Así pues, guarde la primera para el otro día!  
Y sin embargo, sabiendo que una senda a otra conduce,  
dude si alguna vez debería volver.*

*Algún día, en algún lugar lejano,  
sin duda diré con un suspiro de alivio:  
"Dos sendas separaban en un bosque, y yo  
tome la menos usada".  
En eso estará la diferencia. Robert Frost (1874-1963)*

*El camino más transitado es el que te permitirá encajar,  
sentirte seguro e incluso integrado, pero jamás te dejara destacar.  
Es el verdadero amor de lo que anhelas quien te hace elegir hacia donde iras.*

A mi familia.



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino por abrirme las puertas en este laboratorio.

Al Dr. Francisco Fierro Fierro por estar siempre pendiente de este proyecto.

A los Doctores: Lino Mayorga Reyes, María Angélica Gutiérrez Nava, Javier Barrios González, Francisco José Fernández Perrino por haber dedicado su tiempo a la revisión de esta tesis.

Al Dr. Alberto Cristian López Calleja por haberme enseñado técnicas de biología molecular y estar siempre pendiente de este proyecto.

Al Dr. Ulises Carrasco por esas conversaciones analíticas del proyecto, pláticas amenas sobre los temas de la biotecnología y sus consejos.

Y a mis amigos compañeros del laboratorio Mari, Tere, Ari, Wyl, Jessi, Kore, Angie, Pao, Vicki, Omar, Toño, Hugo y Eduardo por esas ocasiones las cuales nos reuníamos y comíamos pastel, o se hacía la carne asada : D. Todos ellos excelentes profesionistas y dedicados a sus proyectos.

A Diana Ethel Nuñez Reyes por apoyarme siempre incondicionalmente y alentarme a terminar la tesis siempre.

Gracias a todos ustedes que forman parte mi vida.



## Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	vi
Índice de figuras .....	xi
Índice de tablas.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT .....	xv
ABREVIATURAS .....	xviii
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Historia de los antibióticos .....	1
1.2 Los antibióticos beta-lactámicos.....	2
1.2.1 Clasificación y estructura química de los antibióticos beta-lactámicos .....	3
1.2.2 Mecanismo de acción de los antibióticos beta-lactámicos.....	6
1.3 La cefalosporina C. Historia y su importancia.....	6
1.4 <i>Acremonium chrysogenum</i> .....	9
1.5 Biosíntesis de cefalosporina C en <i>Acremonium chrysogenum</i> .....	11
1.5.1 Organización estructural de los genes de biosíntesis de CPC en <i>A. chrysogenum</i> .....	13
1.6 Compartimentalización de la biosíntesis de cefalosporina C .....	13
1.6.1 Papel de los peroxisomas y las vacuolas en la ruta de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas.....	15
1.7 Niveles de control de la regulación de la biosíntesis de CPC en <i>A. chrysogenum</i> ..	16
1.7.1 Influencia de la metionina, el fosfato y el oxígeno en la producción de CPC ....	16
1.7.2 Regulación a nivel transcripcional.....	17
1.7.2.1 Regulador transcripcional CPCR .....	17
1.7.2.2 Regulación por fuente de carbono, factor transcripcional Cre1 .....	18
1.7.2.3 Regulador transcripcional PacC. Regulación por pH .....	19
1.7.3 Regulación a nivel de la estructura de la cromatina. Regulador global LaeA ...	20
1.7.4 Regulación por proteínas G heterotriméricas .....	21
2. OBJETIVOS .....	25
2.1 Objetivo general .....	25
2.2 Objetivos particulares.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. HIPÓTESIS .....	26
5. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN .....	27



6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
6.1 Cepas.....	29
6.2 Medios de cultivo.....	29
6.2.1 Medios de cultivo para bacterias.....	29
6.2.2 Medios de cultivo para hongos.....	30
6.3 Crecimiento de los microorganismos.....	31
6.3.1 Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> .....	31
6.3.2 Crecimiento de <i>Acremonium chrysogenum</i> .....	31
6.3.3 Mantenimiento de microorganismos.....	32
6.4 Bioensayo de producción de cefalosporina.....	32
6.4.1 Bioensayo medio sólido.....	32
6.4.2 Cultivos en medio líquido para producción de antibióticos por <i>Acremonium chrysogenum</i> .....	34
6.4.3 Bioensayo de cultivos en medio líquido.....	34
6.4.4 Preparación de estándares de cefalosporina C.....	35
6.5 Extracción de ADN total de <i>A. chrysogenum</i> .....	36
6.5.1 Pasos generales de la extracción.....	36
6.5.2 Extracción de ADN con el kit Wizard® de PROMEGA.....	37
6.5.3 Obtención de ADN total de <i>A. chrysogenum</i> con FENOL-CIA.....	37
6.5.3.1 Extracción con fenol.....	39
6.5.3.2 Precipitación del ADN.....	39
6.5.3.3 Tratamiento con RNasa.....	40
6.6 Extracción de ARN de <i>Acremonium chrysogenum</i> .....	40
6.6.1 Consideraciones generales en el manejo del ARN.....	40
6.6.2 Extracción de ARN con TRIzol®.....	41
6.6.3 Tratamiento con DNasa.....	41
6.7 Electroforesis de ácidos nucleicos.....	42
6.8 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	44
6.8.1 Determinación de la pureza de ácidos nucleicos.....	46
6.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	46
6.9.1 Nucleótidos.....	46
6.9.2 ADN molde.....	47
6.9.3 Primers.....	47



6.9.3.1	Diseño de primers .....	47
6.9.4	Enzimas polimerasas.....	49
6.9.5	Composición del buffer de PCR y cómo afecta a la misma .....	50
6.9.5.1	Inhibidores de la PCR.....	51
6.9.6	Condiciones típicas de la PCR.....	51
6.10	RT-PCR.....	52
6.10.1	Comprobación de ARN libre de ADN .....	53
6.11	RT-qPCR en tiempo real o PCR cuantitativa .....	54
6.11.1	Fundamento.....	54
6.11.2	Métodos de detección .....	56
6.11.2.1	SYBR® Green.....	56
6.11.2.2	Sondas TaqMan® .....	58
6.11.3	Referencia pasiva ROX (5-carboxi-x-rodolina succidimidil éster) .....	59
6.11.4	Consideraciones generales para ensayos de RT-qPCR .....	60
6.11.5	Métodos de análisis de RT-qPCR .....	62
6.11.6	Condiciones de termociclado y mezcla de reacción .....	64
6.11.7	Diseño experimental .....	65
6.12	Transformación de <i>Acremonium chrysogenum</i> .....	66
6.12.1	Crecimiento del micelio .....	66
6.12.2	Obtención de Protoplastos.....	67
6.12.3	Transformación de Protoplastos .....	68
6.12.4	Plaqueo .....	69
6.13	Secuenciación.....	69
6.13.1	Método de secuenciación automática de ADN .....	70
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	72
7.1	Producción de cefalosporina C en transformantes <i>laeA</i> .....	72
7.1.1	Bioensayo 1 <i>laeA</i> .....	72
7.1.2	Bioensayo 2 <i>laeA</i> .....	74
7.1.3	Bioensayo 3 <i>laeA</i> .....	77
7.1.4	Bioensayo 4 <i>laeA</i> .....	79
7.2	Análisis genético de transformantes <i>laeA</i> .....	81
7.2.1	Extracción y cuantificación del ARN de transformantes <i>laeA</i> .....	82
7.2.1.1	Integridad del ARN del bioensayo 4 de <i>laeA</i> .....	83



7.2.2 Extracción del ADN de transformantes <i>laeA</i> .....	83
7.2.3 Análisis de PCR de transformantes <i>laeA</i> .....	84
7.2.4 Análisis por RT-PCR de transformantes <i>laeA</i> .....	86
7.3 Búsqueda <i>in silico</i> del gen <i>laeA</i> de <i>Acremonium chrysogenum</i> .....	87
7.4 Producción de cefalosporina C en cepas mutantes de Aga1 .....	89
7.4.1 Bioensayo en medio solido de cepas mutantes de Aga1 .....	89
7.4.2 Producción de CPC en medio líquido de las cepas mutantes de Aga1. ....	91
7.4.3 Producción de CPC en medio líquido tamponado de las cepas mutantes de Aga1 .....	94
7.4.3.1 Experimento para controlar el pH de la fermentación .....	94
7.4.3.2 Cultivos para producción de CPC en medio líquido tamponado de las cepas mutantes de Aga1 .....	97
7.5 Características fenotípicas de las cepas mutantes de Aga1 .....	101
7.6 Análisis de expresión de los genes relacionados con la producción de CPC en cepas mutantes de Aga1 mediante RT-qPCR.....	109
7.6.1 Diseño de los primers para RT-qPCR de los genes <i>gpd</i> , <i>cefD1</i> y <i>cefG</i> .....	109
7.6.2 Análisis de expresión relativa de <i>cefD1</i> a las 24 h de cultivo .....	113
7.6.2.1 Análisis de las curvas <i>melting</i> de la RT-qPCR en el ensayo <i>cefD1</i> 24 hrs .....	118
7.6.3 Análisis de expresión relativa de <i>cefD1</i> de las 48 hrs. ....	119
7.6.3.1 Análisis de curvas <i>melting</i> de la RT-qPCR en el ensayo <i>cefD1</i> 48 hrs ....	122
7.7 Transformación de la cepa WT ATCC11550 de <i>Acremonium chrysogenum</i> para obtener los diferentes fondos genéticos <i>aga1</i> <sup>G42R</sup> y <i>aga1</i> <sup>G203R</sup> .....	124
7.8 Secuenciación del fragmento de ADN con el gen <i>aga1</i> .....	126
8. CONCLUSIONES .....	128
PERSPECTIVAS .....	129
BIBLIOGRAFÍA.....	130
Apéndice 1. Alineamiento de la secuencia codificante del gen <i>laeA</i> .....	138
Apéndice 2. Alineamiento de la secuencia proteica deducida del gen <i>laeA</i> .....	144
Apéndice 3. Placas del bioensayo 2 de transformantes Aga1 .....	146
Apéndice 4. Amplificación del gen <i>cefD1</i> en muestras tomadas a las 24 h de cultivo mediante PCR de tiempo real .....	148
Apéndice 5. Organización del Plato de reacción de <i>cefD1</i> a las 24 hrs y resultados.....	148
Apéndice 6. Amplificación del gen <i>cefD1</i> en muestras tomadas a las 48 h de cultivo mediante PCR de tiempo real .....	151



Apéndice 7. Resultado del plato de reacción de <i>cefD1</i> a las 48 hrs.....	151
---	-----

## Índice de figuras

Figura 1. Principales grupos de antibióticos beta-lactámicos.....	5
Figura 2. Estructura del 7-ACA (a) y el 7-ADCA (b).....	8
Figura 3. Morfología de <i>Acremonium</i> spp. ....	9
Figura 4. Variedad silvestre de <i>Acremonium chrysogenum</i> vista al microscopio óptico a 40x y 100x. .....	10
Figura 5. Morfología del micelio de <i>Acremonium chrysogenum</i> . ....	10
Figura 6. Ruta de biosíntesis de cefalosporina C en <i>Acremonium chrysogenum</i> .. ....	12
Figura 7. Organización de los genes biosintéticos de cefalosporina C. ....	14
Figura 8. Compartimentalización celular de la ruta biosintética de cpc en <i>A. chrysogenum</i> . ....	15
Figura 9. Procesamiento proteolítico de PacC.....	19
Figura 10. Sistema de regulación por LaeA en <i>Aspergillus</i> ssp. ....	20
Figura 11. Complejo heterotrimérico <i>velvet</i> . ....	21
Figura 12. Ciclo de activación/inactivación de las proteínas G heterotriméricas.....	22
Figura 13. Respuesta a detección de nutrientes y feromonas de las proteínas G heterotriméricas en los hongos .....	23
Figura 14. Diagrama de flujo del diseño de investigación. ....	28
Figura 15. Bioensayo en medio sólido. ....	33
Figura 16. Diagrama de flujo extracción de ADN con FENOL-CIA.....	38
Figura 17. ARN intacto vs degradado. ....	45
Figura 18. Fases de reacción de la PCR.. ....	55
Figura 19. Comparación en la precisión en cuantificación lograda por qPCR y PCR de punto final 56	
Figura 20. Colorante SYBR® green unido al ADN de doble cadena.....	57
Figura 21. Curvas de disociación.. ....	57
Figura 22. Detección de la amplificación del ADN por sondas Taqman® y principio FRET (Life Technologies, 2012). ....	59
Figura 23. Estrategia de diseño de primers para ARN (eurogentec, 2013).....	60
Figura 24. Gráfica de amplificación de diluciones seriales 10x usando SYBR® .....	63
Figura 25. Diagrama de flujo para transformación de <i>A. chrysogenum</i> .....	66
Figura 26. Protoplastos de <i>Acremonium chrysogenum</i> vistos al microscopio.....	67
Figura 27. Bioensayo 1 <i>laeA</i> . ....	73
Figura 28. Curva patrón bioensayo 1 .....	73



Figura 29. Producción de $\beta$ -lactámicos totales de las cepas en estudio correspondiente al primer bioensayo..	74
Figura 30. pH del bioensayo 2 de <i>laeA</i> .	75
Figura 31. Producción de $\beta$ -lactámicos totales bioensayo 2.	75
Figura 32. Peso seco de la biomasa en el medio de producción MCFA.	76
Figura 33. Producción específica de $\beta$ -lactámicos totales bioensayo 2.	76
Figura 34. Producción de $\beta$ -lactámicos totales bioensayo 3 <i>laeA</i> .	77
Figura 35. Peso seco de la biomasa en el medio de producción MCFA	78
Figura 36. Producción específica de $\beta$ -lactámicos totales bioensayo 3 <i>laeA</i> .	78
Figura 37. pH bioensayo 3 <i>laeA</i> .	79
Figura 38. pH del bioensayo 4 de <i>laeA</i> .	80
Figura 39. Producción de $\beta$ -lactámicos totales del bioensayo 4 de <i>laeA</i> .	80
Figura 40. Producción específica de $\beta$ -lactámicos totales bioensayo 4 <i>laeA</i> .	81
Figura 41. Peso seco de medio MCFA.	81
Figura 42. Resultado del tratamiento con DNasa en ARN del bioensayo 4 de <i>laeA</i> .	82
Figura 43. Integridad ARN extraído del bioensayo 4 de <i>laeA</i> .	83
Figura 44. Integridad del ADN extraído con el primer tratamiento con RNasa.	84
Figura 45. Integridad del ADN extraído con el segundo tratamiento con RNasa.	84
Figura 46. Producto amplificado de gen <i>laea</i> con primers específicos.	85
Figura 47. Producto de PCR del gen <i>laeA</i> y <i>18s</i> .	85
Figura 48. producto de RT-PDR con los primers <i>18s</i> y <i>laeA</i> .	86
Figura 49. Arbol filogenético de <i>gibberlla fujikyroi</i> .	88
Figura 50. Cepas Aga1.	89
Figura 51. Bioensayo medio sólido	90
Figura 52. Curva patrón del bioensayo solido Aga1.	90
Figura 53. Producción de $\beta$ -lactámicos totales en medio sólido de las cepas con diferentes fondos genéticos de Aga1.	91
Figura 54. Curva patrón del bioensayo 1 liquido de Aga1.	92
Figura 55. Producción de $\beta$ -lactámicos totales del bioensayo 1 en medio liquido de Aga1.	92
Figura 56. Peso seco de biomasa del bioensayo 1 en medio liquido de Aga1.	93
Figura 57. pH del bioensayo 1 en medio liquido de Aga1	93
Figura 58. Valor de pH en cultivos de medio MCFA adicionado con MOPS al 0.1 M	94
Figura 59. Valor de pH en cultivos de medio MCFA adicionado con MOPS al 0.5 M	94
Figura 60. Valor de pH en cultivos de medio MCFA adicionado con MOPS al 1.0 M.	95
Figura 61. Efecto de la concentración de MOPS al 0.1 M en la producción de $\beta$ - lactámicos totales.	95
Figura 62. Efecto de la concentración de MOPS al 0.5 M en la producción de $\beta$ - lactámicos totales	96



Figura 63. Efecto de la concentración de MOPS al 1.0 M en la producción de $\beta$ - lactámicos totales. ....	96
Figura 64. Curva patrón del bioensayo 2 liquido de <i>Aga1</i> .....	97
Figura 65. Curva patrón del bioensayo 2 liquido de <i>Aga1</i> en forma lineal. ....	98
Figura 66. Producción de $\beta$ -lactámicos totales en cultivo de las cepas <i>Aga1</i> a pH controlado.. ....	98
Figura 67. pH de los cultivos en medio tamponado de las cepas mutantes de <i>Aga1</i> . ....	99
Figura 68. Peso seco del cultivo en medio líquido tamponado de las cepas mutantes de <i>Aga1</i> . ....	99
Figura 69. Peso seco del nuevo cultivo en medio líquido tamponado de las cepas mutantes de <i>Aga1</i> . ....	100
Figura 70. Producción específica de $\beta$ -lactámicos totales del cultivo en medio líquido de las cepas <i>Aga1</i> . ....	100
Figura 71. Observación al microscopio cepa WT. ....	102
Figura 72. Observación al microscopio cepa PC43 .....	103
Figura 73. Observación al microscopio cepa G42R1.....	104
Figura 74. Observación al microscopio cepa G42R1.....	105
Figura 75. Observación al microscopio cepas G203R.....	106
Figura 76. Observación al microscopio cepas G203R.....	107
Figura 77. <i>Aspergillus terreus</i> . ....	108
Figura 78. Secuencia <i>gpd</i> en el primer intrón en MEGA 5.2.. ....	110
Figura 79. Primers <i>gpd</i> diseñados con primer 3. ....	110
Figura 80. Primer <i>gpd</i> diseñado entre exón y exón. ....	110
Figura 81. Eficiencia <i>in silico</i> de primers <i>gpd</i> . ....	111
Figura 82. Temperatura de disociación $T_m$ del amplicón de los primers <i>gpd</i> . ....	111
Figura 83. Eficiencia <i>in silico</i> de primers <i>cefG</i> . ....	112
Figura 84. Integridad de ARN cepas <i>Aga1</i> sin tratamiento con DNasa.....	113
Figura 85. Integridad de ARN cepas <i>Aga1</i> con tratamiento con DNasa.. ....	114
Figura 86. Curvas estándar del ensayo <i>cefD1</i> a las 24 hrs. ....	116
Figura 87. Expresión relativa de <i>cefD1</i> a las 24 hrs. ....	117
Figura 88. Curvas <i>melting</i> de los productos amplificados con los primers <i>gpd</i> y <i>cefD1</i> .....	119
Figura 89. Curvas estándar del ensayo <i>cefD1</i> a las 48 h. ....	120
Figura 90. Curvas estándar del ensayo <i>cefD1</i> a las 48 h modificada.....	120
Figura 91. Expresión relativa de <i>cefD1</i> a las 48 h con el software stepone™ .....	121
Figura 92. Expresión relativa de <i>cefD1</i> con la extracción de los datos. ....	122
Figura 93. Curvas <i>melting</i> de los productos amplificados con los primers <i>gpd</i> y <i>cefD1</i> del ensayo de las 48 h. ....	123
Figura 94. Cepa WT después de 3.5 hrs. con enzimas líticas para <i>Trichoderma harzianum</i> . ....	124
Figura 95. Tratamiento con enzimas líticas.. ....	125
Figura 96. Cepas transformadas G203R. ....	125



Figura 97. Cepas transformantes G42R.. .....	126
Figura 98. Resultados del BLAST de la secuencia Reverse.. .....	127
Figura 99. Resultados del BLAST de la secuencia Forward. ....	127

## Índice de tablas

Tabla 1. Medio LB. ....	29
Tabla 2. Medio CCM. ....	30
Tabla 3. Medio MSMA. ....	30
Tabla 4. Medio MCFA. ....	31
Tabla 5. Medio TSB. ....	31
Tabla 6. Condiciones utilizadas por muestra tratamiento dnasa kit promega® RQ1 RNase-free....	42
Tabla 7. Criterios principales para el diseño de primers. ....	47
Tabla 8. Características de algunas polimerasas termoestables de ADN. ....	50
Tabla 9. Inhibidores de la PCR. ....	51
Tabla 10. Condiciones de termociclado RT-PCR. ....	53
Tabla 11. Condiciones de termociclado para comprobación de ARN libre de ADN. ....	54
Tabla 12. Condiciones de termociclado RT-qPCR. ....	64
Tabla 13. Mezcla de reacción RT-qPCR. ....	64
Tabla 14. Diseño experimental de RT-qPCR. ....	65
Tabla 15. Condiciones de termociclado secuenciación gen <i>aga1</i> . ....	71
Tabla 16. Condiciones de PCR para <i>laeA</i> . ....	84
Tabla 17. Estandarización de las muestras de ARN de las cepas Aga1. ....	115



## RESUMEN

*Acremonium chrysogenum* es un hongo filamentoso del grupo de los Ascomicetos, usado a nivel industrial en la producción de cefalosporina C, un antibiótico de la familia de los beta-lactámicos. La cefalosporina C ha demostrado ser activa frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y se sintetizan a partir de la misma derivados semisintéticos que se utilizan principalmente como antibióticos de amplio espectro.

En el presente trabajo se estudiaron dos aspectos relacionados con la producción de cefalosporina en *A. chrysogenum*: 1) cómo afecta la expresión heteróloga del regulador global del metabolismo secundario LaeA la producción de cefalosporina C, y 2) el papel de la vía de transducción de señales de las proteínas G heterotriméricas en la biosíntesis de cefalosporina C.

El regulador LaeA forma parte del complejo *velvet* de los hongos filamentosos, que regula procesos como la esporulación. La función específica de LaeA es la regulación global del metabolismo secundario, actuando probablemente mediante remodelación de la cromatina. Se obtuvieron transformantes de *Acremonium chrysogenum* con el gen *laeA* de *Aspergillus terreus*, y se analizó la producción de cefalosporina en los mismos. En varios de los transformantes se obtuvieron aumentos significativos de los niveles de producción, si bien no pudo corroborarse la presencia del gen en los transformantes mediante PCR.

Las proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y su ciclo de activación/inactivación está regulado por la subunidad  $G\alpha$ , la cual es una GTPasa. Cuando  $G\alpha$  se encuentra unida a GDP las tres subunidades están unidas y la vía está inactiva. El intercambio de GDP por GTP separa la subunidad  $G\alpha$  del dímero  $G\beta\gamma$  para activar la vía, que vuelve a quedar inactiva por la hidrólisis de GTP a GDP causada por la actividad GTPasa de  $G\alpha$ , uniéndose entonces nuevamente las tres subunidades para formar el trímero inactivo. En hongos filamentosos esta vía regula procesos como el desarrollo, conidiación, virulencia en especies patógenas, y el metabolismo secundario (pigmentos, toxinas, antibióticos). Recientemente en nuestro laboratorio se ha clonado el gen codificante de una subunidad  $G\alpha$  de *Acremonium chrysogenum*, al que se ha dado el nombre de *aga1*. En este trabajo se realizaron ensayos de producción de cefalosporina de cepas de *A. chrysogenum* que expresan un alelo mutado de *aga1*, el cual codifica una



subunidad  $G\alpha$  constitutivamente activa ( $Aga1^{G42R}$ ), y en cepas que expresan un alelo mutado que codifica una subunidad  $G\alpha$  constitutivamente inactiva ( $Aga1^{G203}$ ). Se realizaron así mismo análisis de PCR tiempo real (RT-qPCR) del gen *cefD1*, perteneciente a la ruta de biosíntesis de cefalosporina C, con el propósito de analizar la expresión relativa de dicho gen en las cepas G42R y G203R respecto a la cepa control WT. Tanto en los bioensayos de producción de cefalosporina como en el análisis de expresión de *cefD1* se observó que las cepas G203R no expresaban el gen y por tanto no produjeron antibiótico. Las cepas G42R presentaron una expresión relativa del gen *cefD1* ligeramente menor que el control WT, y la producción de beta-lactámicos también fue ligeramente menor en los bioensayos. Las cepas control (WT y PC43) y las cepas G42R presentaron mayor producción a las 48 h, y en medio de cultivo tamponado a pH 7.0-7.5 se logró prolongar la producción hasta las 120 h. Las cepas G203R presentaron una morfología micelial muy diferente al control y la cepa G42R, presentando una elevada esporulación en medio sólido.

## ABSTRACT

*Acremonium chrysogenum* is a filamentous fungus belonging to the group of Ascomycetes. It is used in the industry for cephalosporin C (CPC) production, an antibiotic of the  $\beta$ -lactam family. CPC is active against both gram-positive and gram-negative bacteria, and semisynthetic derivatives are obtained from it which are clinically used mainly as broad spectrum antibiotics.

In this work, two aspects related to the CPC production in *A. chrysogenum* were studied: 1) how CPC production is affected by the heterologous expression of the secondary metabolism global regulator *LaeA*, and 2) the role of the heterotrimeric G protein signal transduction pathway in CPC biosynthesis.

*LaeA* is part of the *velvet* complex of filamentous fungi, which regulates processes such as sporulation. The specific function of *LaeA* is the regulation of the secondary metabolism, probably acting through a chromatin remodeling mechanism. *A. chrysogenum* transformants were obtained which contained the *Aspergillus terreus laeA* gene. Some of the transformants showed a significant increase in CPC production level, however,



integration of the *laeA* gene in the genome of the transformants could not be confirmed by PCR.

Heterotrimeric G proteins consist of three subunits:  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , and their activation/inactivation cycle is regulated by the  $G\alpha$  subunit, a GTPase. When  $G\alpha$  is bound to GDP the three subunits are bound together and inactive. Upon exchange of GDP by GTP the  $G\alpha$  subunit is separated from the  $G\beta\gamma$  dimer, activating G protein signaling. The signaling pathway is inactivated when GTP is hydrolyzed to GDP by the GTPase activity of the  $G\alpha$  subunit, which causes binding of the three subunits to form again the inactive trimer. In filamentous fungi this pathway regulates several important processes, including development, conidiation, virulence in pathogenic species, and secondary metabolism (pigments, toxins, antibiotics). Recently, we have cloned the gene encoding a  $G\alpha$  subunit of *A. chrysogenum*, which was named *aga1*. In this work, CPC production was analyzed in *A. chrysogenum* strains expressing a mutated allele of *aga1*, encoding a constitutively active  $G\alpha$  subunit ( $Aga1^{G42R}$ ), and in strains expressing a mutated allele encoding a constitutively inactive  $G\alpha$  subunit ( $Aga1^{G203}$ ). Also, real time qPCR analyses were performed to study expression of the *cefD1* gene, belonging to the CPC biosynthesis pathway, in the strains with different *aga1* genetic background. In both the CPC production studies and the *cefD1* expression analyses it was observed that the  $G203R$  strains did not expressed the gene and therefore did not produce antibiotic. The  $G42R$  strains showed a *cefD1* expression slightly lower than the wild type, and their CPC production was accordingly lower. The control strains (WT and PC43) and the  $G42R$  strains showed higher CPC production at 48 h of cultivation. In media buffered at a pH of 7.0-7.5 CPC production was extended to 120 h. The  $G203R$  strains showed a mycelial morphology very different to the control strains and  $G42R$ , being highly sporulated in solid medium.



## ABREVIATURAS

<b>A<sub>230</sub></b> : absorbancia a 230 nm	<b>FRET</b> : Fluorescence Resonance Energy Transfer
<b>A<sub>260</sub></b> : absorbancia a 260 nm	<b>G42R</b> : Subunidad Aga1 constitutivamente activa
<b>ACV</b> : α-aminoadipil-cisteinil-valina	<b>G2303R</b> : Subunidad Aga1 constitutivamente inactiva
<b>ACVS</b> : ACV sintetasa	<b>g</b> : gramo
<b>Aga1</b> : Subunidad α de las proteínas G heterotrimericas de <i>A. chrysogenum</i>	<b>g</b> : gravedades
<b>AMPc</b> : adenosín monofosfato cíclico	<b>GPCR</b> : Receptor de membrana de las proteínas G (G protein-coupled receptor)
<b>ARN</b> : ácido ribonucleico	<b>gpd</b> : gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
<b>ARN</b> : ARN mensajero	<b>h</b> : hora
<b>ADN</b> : Ácido desoxirribonucleico	<b>IPN</b> : isopenicilina N
<b>CDS</b> : Secuencia codificante	<b>IPNS</b> : isopenicilina N sintasa
<b>cefD1</b> : gen codificante a isopenicinil-CoA acil-CoA-sintetasa	<b>kb</b> : kilo base
<b>cefG</b> : gen codificante a desacetilcefalosporina C acetiltransferasa	<b>KDa</b> : kilo Dalton
<b>Cre1</b> : factor de trascrición por fuente de carbono	<b>L</b> : litro
<b>CPCR1</b> : factor de trascrición de la familia RFX	<b>LaeA</b> : proteína nuclear con dominio metiltransferasa
<b>BLAST</b> : Basic Local Alignment Search Tool (programa bioinformatico)	<b>LB</b> : medio Luria-Bertani
<b>Medio CCM</b> : Medio completo	<b>NCBI</b> : Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
<b>col</b> : colaboradores	<b>NTC</b> : mezcla de reacción sin ARN
<b>CoA</b> : coenzima A	<b>M</b> : molar
<b>CPC</b> : cefalosporina C	<b>min</b> : minuto
<b>DAC</b> : desacetilcefalosporina C	<b>mL</b> : mililitros
<b>DAOC</b> : desacetoxicefalosporina C	<b>μL</b> : microlitros
<b>DEPC</b> : dietilpirocarbonato	<b>nM</b> : nanomolar
<b>dNTPs</b> : mezcla de desoxiribonucleótidos trisfosfato	<b>mm</b> : milímetros
<b>EDTA</b> : ácido etilendiaminotetraacético	<b>mM.</b> : milimolar
	<b>mg</b> : miligramo



**MSMA:** medio semilla modificado,

Adinarayana y *col.*, 2003.

**MCFA:** medio complejo de fermentación

para *A. chrysogenum*, Caltrider y *col.*,

1966.

**MAPK:** proteína cinasa activada por

mitógeno

**MOPS:** 3 (N-morfolino) propanosulfónico

**µg:** microgramo

**RGS:** Regulador señalizador de las

proteínas G (Regulator of G Protein

Signaling)

**ROX:** 5-carboxi-x-rodolina succidimidil

éster

**O.D.:** unidad de densidad óptica

**RTK:** receptor tirosina cinasa

**RFX:** regulador del factor X

**rpm:** revoluciones por minuto

**TSB:** caldo de soya y triptocaseína

**PacC:** factor de transcripción por pH

**pb:** pares de bases

**PBP:** proteínas de unión a penicilina

**PEG:** polietilenglicol

**PC43:** cepas transformadas con el vector

sin inserto

**WT:** cepa silvestre



## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Historia de los antibióticos

Los antibióticos (del griego *anti*, "en contra"; *bios*, "vida") son compuestos químicos que se utilizan para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. Originalmente, el término *antibiótico* se refiere sólo a compuestos orgánicos, producidos por bacterias u hongos, que son tóxicos para otros microorganismos. Todos los antibióticos comparten la característica de toxicidad selectiva; algunos son más tóxicos para un organismo invasor de lo que son a un huésped animal o humano (García *et al.*, 1997).

Los mecanismos de acción de los antibióticos a nivel molecular se dilucidaron durante las últimas décadas del siglo XX, aunque la utilización de compuestos orgánicos para combatir las infecciones se conocía desde la antigüedad. La primera observación de lo que ahora se llamaría un efecto antibiótico fue realizada en el siglo XIX por el químico francés Louis Pasteur, que descubrió que ciertas bacterias saprófitas pueden matar el bacilo del ántrax. En la primera década del siglo XX, el médico y químico alemán Paul Ehrlich comenzó a experimentar con la síntesis de compuestos orgánicos que atacan selectivamente un organismo infeccioso sin dañar el organismo hospedador.

El primer antibiótico fue descubierto en 1897 por Ernest Duchesne, en Francia, donde se describe el hongo de la especie *Penicillium* con dichas propiedades, aunque su trabajo pasó sin mucha atención por la comunidad científica. Debido a que el hongo era del género *Penicillium* el producto se le llamó penicilina (García-Rodríguez, 1997). En la década de 1920 el bacteriólogo británico Alexander Fleming, a quien más tarde se le atribuyó el descubrimiento de la penicilina, pudo hacer una interpretación correcta cuando accidentalmente fue contaminada una placa de medio de cultivo para bacterias (*Staphylococcus aureus*) por un hongo que estaba secretando algún tipo de sustancia que inhibía el crecimiento de las bacterias (Fleming, 1929).

Más de 10 años después, Ernst Chain y Howard Florey se interesaron en el trabajo de Fleming y produjeron una forma purificada de la penicilina. Fueron los primeros en



utilizar la penicilina en seres humanos por lo que los dos investigadores, junto con A. Fleming, recibieron el Premio Nobel de Medicina en 1945.

Debido a la gran necesidad de tratar infecciones provocadas por heridas durante la Segunda Guerra Mundial, se invirtieron muchos recursos en investigación para purificar penicilina, y el equipo liderado por Howard Florey tuvo éxito en producir grandes cantidades del ingrediente activo puro en 1940. Los antibióticos pronto llegaron a ser ampliamente utilizado desde 1943 (García *et al.*, 1997).

Con la llegada de la segunda guerra mundial, el ejército americano planteó la necesidad de contar con nuevos medicamentos para tratar las infecciones de sus heridos. Mientras que la penicilina resultaba ser un excelente fármaco contra bacterias Gram-positivas, era necesario hallar alternativas eficaces de combatir microorganismos Gram-negativos.

En 1943, Albert Schatz, Elizabeth Bugie y Selman Waksman obtuvieron un nuevo antibiótico, la estreptomina, con ayuda de técnicas de irradiación y mutación en cepas de *Streptomyces griseus* aisladas de la garganta de un pollo. Su actividad resultó ser altamente eficaz sobre *Mycobacterium tuberculosis*, por lo cual Waksman recibió en 1952 el premio Nobel de Medicina. La estreptomina fue el primer antibiótico descubierto del grupo de los **aminoglicósidos** (Schatz *et al.*, 1944). En 1957, Umezawa y colaboradores aislaron otro aminoglicósido a partir de *Streptomyces kanamyceticus*: la kanamicina que resultó ser de amplio espectro, eficaz contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y *Mycobacterium* (Umezawa *et al.*, 1957). Durante los siguientes años continuó el descubrimiento de aminoglicósidos, tales como paromomicina (1959), gentamicina (1963), nebramicina (1967), sisomicina (1970), dibekacina, amikacina (1972) y netilmicina.

## 1.2 Los antibióticos beta-lactámicos

Después de casi 70 años de uso clínico, los antibióticos beta-lactámicos son los antimicrobianos más prescritos en la actualidad y los más potentes y menos tóxicos de todos los antibióticos conocidos (Lofty, 2006). Además, son los más importantes desde el punto de vista económico.



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

En 1961 apareció comercialmente la ampicilina, pero carecía de actividad frente a *Pseudomonas* y algún otro bacilo Gram-negativo oportunista. La carbenicilina, descubierta en 1967, resolvió alguno de estos problemas. La amoxicilina, descubierta por Nayler y Smith en 1964 y comercializada en 1972, aportaba ventajas farmacocinéticas y pronto se convirtió en el antibiótico más utilizado.

En 1973, G. Brown detectó un potente efecto inhibitor en un caldo de *Streptomyces clavuligerus*, aislando el ácido clavulánico. A mediados de los años 80 del pasado siglo se introdujo en clínica la asociación de ácido clavulánico con amoxicilina para su administración por vía intravenosa y por vía oral (Brown, 1986).

A principios de la década de los 80 se descubrieron los monobactámicos (*Monocyclic bacterially produced beta-lactam*). Su hallazgo se debió a R. Sykes y colaboradores (1982). Este tipo de antibióticos derivan de eubacterias, la obtención del ácido 3-aminobactámico (3-AMA) facilitó la preparación de un gran número de derivados. El monobactámico natural más abundante fue la sulfazecina, aislado de cepas de *Gluconobacter* y de *Pseudomonas acidophila*. El Aztreonam, obtenido por síntesis química, es por el momento el mejor antimicrobiano del grupo, con una potente acción frente a bacilos gram-negativos, incluyendo *Pseudomonas* (García-Rodríguez, 1997).

### 1.2.1 Clasificación y estructura química de los antibióticos beta-lactámicos

Estructuralmente, los antibióticos beta-lactámicos son esencialmente péptidos no ribosomales modificados que tienen rutas biosintéticas cuyos pasos iniciales son comunes. El grupo se define básicamente por la presencia de un anillo beta-lactámico de cuatro átomos y, a excepción de unos cuantos antibióticos de tipo monolactama, contienen en su estructura un sistema bicíclico (Figura 1) (Marín y Gudiol 2003).

Las **penicilinas**, poseen un anillo beta-lactámico unido a un anillo de tiazolidina, lo cual da origen al ácido 6-aminopenicilánico (6-APA). Además tienen una cadena lateral,



que varía de una penicilina a otra, en la posición 6 del anillo beta-lactámico, la cual define muchas de las propiedades de estos antibióticos (Marín y Gudiol 2003).

Las **cefalosporinas** son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo **cefem**, que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiazínico (en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas) y un anillo beta-lactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas (Marín y Gudiol 2003).

Las **cefamicinas** son antibióticos beta-lactámicos similares estructuralmente a las cefalosporinas, diferenciándose de éstas por la presencia de un grupo metoxi (-OCH<sub>3</sub>) en lugar del átomo de hidrógeno de la posición 7 del anillo beta-lactámico. Son producidas por bacterias del grupo de los actinomicetos, género *Streptomyces*. El grupo 3-carbamoilo les concede una gran estabilidad ante las enzimas hidrolíticas presentes en los tejidos. A partir de la cefamicina C obtenida de *Streptomyces lactamdurans* se sintetizaron las primeras cefamicinas de uso clínico (Stapley *et al*, 1972).

El **ácido clavulánico** (producido por *Streptomyces clavuligerus*), un inhibidor de las beta-lactamasas, tiene un núcleo similar al ácido penicilánico de las penicilinas, con la sustitución del átomo de azufre en posición 3 por un átomo de oxígeno que incrementa la reactividad de la molécula y proporciona una afinidad mayor por las beta-lactamasas. Le falta la cadena lateral acilamino en posición 6 que tienen las penicilinas. El sulbactam y el tazobactam son ejemplos de sulfonas semisintéticas del ácido penicilánico (Marín y Gudiol 2003).

La estructura básica de las **carbapenemas** consiste en un anillo beta-lactámico fusionado a uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno. Esta modificación y las cadenas laterales, así como la posición espacial de éstas, proporcionan mayor afinidad por las proteínas de unión a penicilina (PBP), con un incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las beta-lactamasas, siendo los beta-lactámicos de más amplio espectro y actividad (Marín y Gudiol 2003). Se obtienen a partir de *Streptomyces clavuligerus*, *S. olivaceus*, *Erwinia carotovora* y *Setia sp.* (O'Sullivan and Sykes 1989).

Los **monobactámicos** tienen una estructura beta-lactámica sencilla con una estructura monocíclica en la que el anillo beta-lactámico no está fusionado a otro secundario (Marín y Gudiol 2003). Algunos microorganismos productores de



monobactamas son *Nocardia uniformis*, *Agrobacterium radiobacter* y *Pseudomonas acidophila* (O'Sullivan and Sykes 1989).

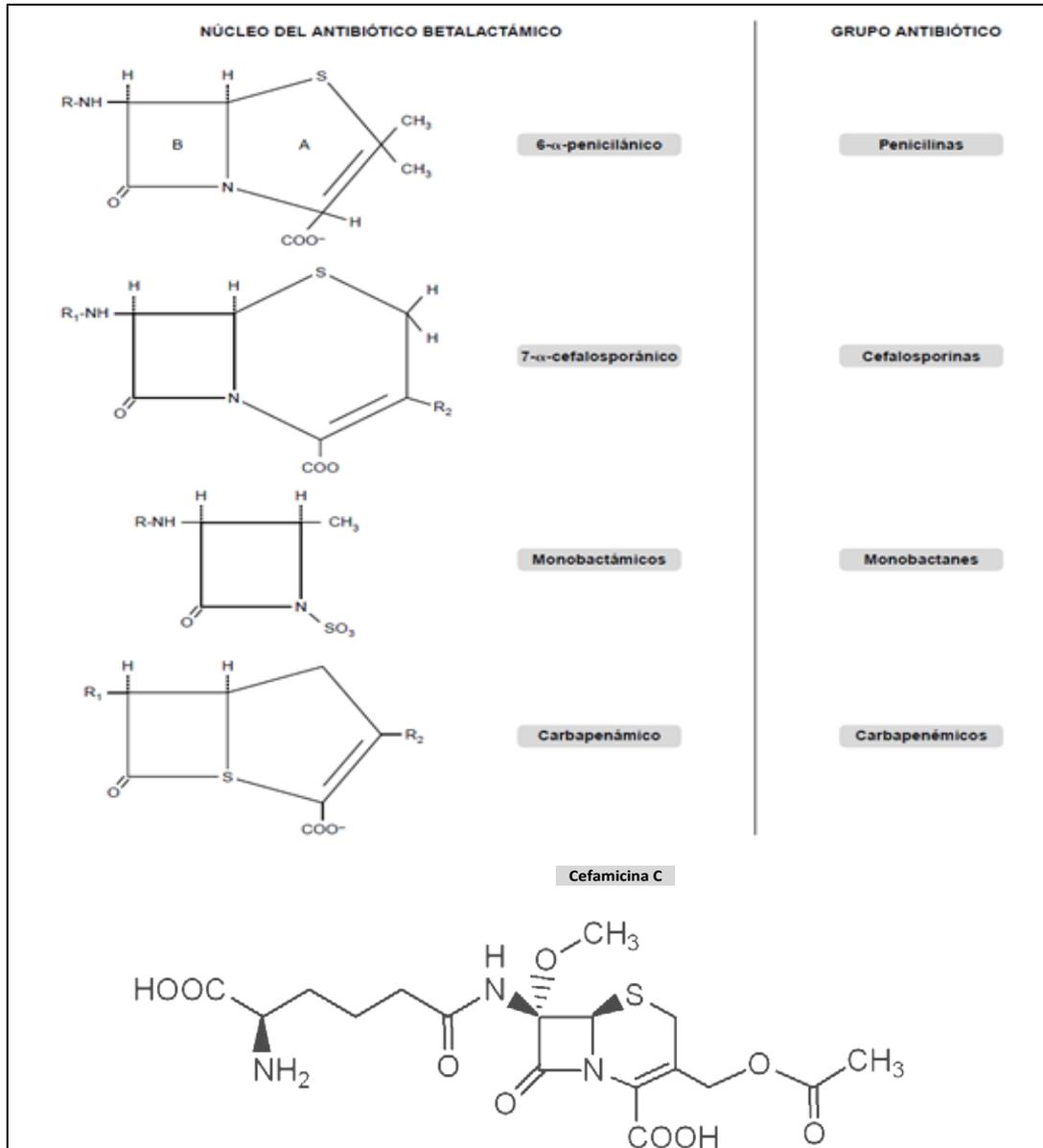


Figura 1. Principales grupos de antibióticos beta-lactámicos. Se muestran los principales grupos de compuestos beta-lactámicos (Marín y Gudíol, 2003).



### 1.2.2 Mecanismo de acción de los antibióticos beta-lactámicos

Los antibióticos funcionan inhibiendo la síntesis de diferentes macromoléculas, bloqueando así procesos esenciales en la célula como la replicación del ADN, la transcripción, la síntesis de proteínas o la síntesis de la pared celular bacteriana,.

En el caso de los antibióticos **beta-lactámicos**, su modo de acción es la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglicano de la pared celular bacteriana, induciendo un efecto autolítico.

El peptidoglicano está constituido por largas cadenas de glúcidos (-glucano), formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí para formar una malla, bien directamente (Gram-negativos) o mediante un pentapéptido de glicina (Gram-positivos). Los beta-lactámicos inhiben precisamente esta unión o transpeptidación, última etapa de la síntesis de la pared celular. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que actúen los beta-lactámicos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular. En el espacio periplásmico existen enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas encargadas de formar los tetrapéptidos unidos. Estas enzimas fijan a las penicilinas y otros beta-lactámicos, por lo que se las denomina proteínas de unión a penicilina (PBP). La función de las PBP es alargar, dar forma y dividir la bacteria. Los anillos de los beta-lactámicos poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina) y eso permite una unión covalente en el lugar activo de la transpeptidasa. También pueden inhibir a las carboxipeptidasas y algunas endopeptidasas. Los beta-lactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano. La lisis se produce con concentraciones que superan entre 4 y 10 veces la CIM (concentración inhibitoria mínima) de un determinado microorganismo. Las bacterias que carecen de autolisina son inhibidas pero no destruidas, por lo que se dice que son tolerantes. Se define el fenómeno de tolerancia como la necesidad de una concentración al menos 32 veces mayor a la CIM para que un antimicrobiano destruya una cepa bacteriana (Marín y Gudiol 2003).



### 1.3 La cefalosporina C. Historia y su importancia

Giuseppe Brotzu (Profesor de la Universidad de Cagliari, Italia) se percató de que la incidencia de tifus en la ciudad de Cagliari era inferior a otras zonas, incluso entre los bañistas que acudían a una bahía donde se vertían las aguas residuales de la ciudad. Precisamente a partir de muestras tomadas de esas aguas G. Brotzu aisló un hongo capaz de inhibir en cultivos el crecimiento de *Salmonella typhi* y otras bacterias Gram-negativas (Brotzu, 1949; Paracchini, 1992). Le dio a este hongo el nombre de *Cephalosporium acremonium* (rebautizado posteriormente como *Acremonium chrysogenum*), pero no pudo continuar sus estudios sobre el nuevo antibiótico en Italia, y envió una muestra del mismo y copia de sus resultados a la escuela William Dunn de Patología de la Universidad de Oxford. Aquí se descubrió que este hongo podía producir al menos cinco diferentes antibióticos. El primero que se encontró fue un antibiótico que puede ser extraído al igual que la penicilina (en un disolvente orgánico) y fue llamado cefalosporina P. Este compuesto no fue el descrito originalmente por Brotzu, ya que sólo mostró actividad frente a ciertas bacterias Gram-positivas. En 1949, un segundo antibiótico se encontró en los cultivos líquidos de *Acremonium*, el cual permanecía en la fase acuosa y era activo frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Se le llamó cefalosporina N, y su actividad de tipo beta-lactámica se confirmó cuando se eliminó después del tratamiento con una penicilasa obtenida a partir de *Bacillus subtilis* (Burton y Abraham, 1951).

Guy Newton y Abraham Edward encontraron un segundo antibiótico hidrofílico en los caldos de cultivo de *A. chrysogenum* que fue nombrado **cefalosporina C** (Newton y Abraham, 1954). El nuevo compuesto se obtuvo con facilidad en su forma de sal de sodio y mostró actividad antibiótica frente a *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*. Aunque su actividad específica contra estos microorganismos correspondió sólo al 10% de la obtenida con la cefalosporina N (actualmente conocida como penicilina N), tenía algunas propiedades que la hacían interesante. Su estabilidad en un medio ácido diluido y su resistencia a la acción penicilinasas de *B. subtilis* sugirió que la estructura química de la cefalosporina C difería de la postulada para la penicilina. Posteriormente, estudios de resonancia magnética nuclear y análisis espectroscópicos de rayos X (Hodgkin y Maslen, 1961) confirmaron la estructura de la cefalosporina como un sistema beta-lactámico dihidrotiazínico heterocíclico, mientras que la penicilina posee un anillo beta-lactámico tiazolidínico heterocíclico (Abraham y Newton, 1961).



En 1955 se demostró que la cefalosporina C posee un amplio espectro de actividad, incluyendo muchas cepas de *Staphylococcus aureus*. El antibiótico demostró ser inocuo cuando se administraba por vía intravenosa en dosis altas, y se observó que protegía a los ratones contra la infección causada por estreptococos. Posteriormente se demostró también que podía proteger a los ratones de las infecciones por estafilococos resistentes a penicilina (Florey *et al.*, 1956).

La investigación y desarrollo para la producción industrial de cefalosporina difirió del caso de la penicilina. Las patentes se emitieron con respecto a su núcleo, y empresas farmacéuticas como Glaxo del Reino Unido y Ely Lilly de Estados Unidos se interesaron en las primeras etapas de la investigación.

Actualmente, la cefalosporina C (CPC) es la base de las cefalosporinas de uso médico, las cuales son todas semi-sintéticas. A partir de la CPC se obtiene el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), que posteriormente es modificado con diferentes cadenas laterales, dando lugar a las cuatro generaciones de cefalosporinas de las que se dispone en la actualidad. Las variaciones introducidas en el carbono 7 del 7-ACA modifican su actividad antibacteriana y sus características farmacocinéticas (Mediavilla y García-Lobo, 2005). Otro intermediario derivado de la CPC que también se utiliza para la elaboración de cefalosporinas semi-sintéticas es el ácido 7-amino desacetoxicefalosporánico (7-ADCA). Tanto la CPC como los precursores 7-ACA y 7-ADCA se obtienen a partir de procesos de fermentación que utilizan *Acremonium chrysogenum* como productor (Nijland *et al.*, 2008). En la figura 2 se muestran sus estructuras.

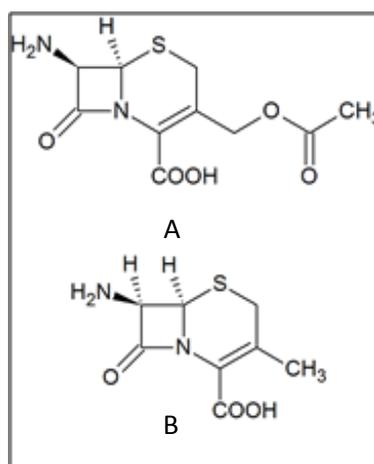


Figura 2. Estructura del 7-ACA (A) y el 7-ADCA (B), precursores usados para sintetizar cefalosporinas desde la primera hasta la quinta generación de estas.



## 1.4 *Acremonium chrysogenum*

El género *Acremonium* contiene actualmente entre 20 y 200 especies reconocidas según los diferentes autores (Robert, *et al.* 2005). La base de datos taxonómica de hongos administrada por la Asociación Internacional de Micología tiene 205 variedades registradas, de las cuales 197 son especies con nombre.

*Acremonium chrysogenum* es un hongo filamentoso, perteneciente al grupo de los Ascomicetos, clase Euascomicetos, orden Hypocreales. Se reproduce asexualmente por haber perdido su capacidad de reproducirse sexualmente o bien ésta es desconocida (Schmitt *et al.* 2004b).

Fisiológicamente, *Acremonium* requiere condiciones muy húmedas (una actividad de agua: AW = 0.90-0.98). La mayoría de las especies no crecen a 37°C (EMLAB, 2007). *Acremonium* crece bien en medios generales de hongos, esporulando dentro de los 5 días. Las colonias pueden crecer lentas cuando se cultivan a 25°C; suelen ser compactas, alcanzando menos de 2.5 cm de diámetro en 5 a 10 días (Germain y summerbell, 1996).

La textura de las colonia es de tipo glabrosa, compacta, plana o plegada. Con la edad se recubre con hifas sueltas: en esta etapa, las colonias tienen una textura tipo gamuza o flocosa (delicadamente algodonosa). En la morfología microscópica las hifas son septadas, filamentosas, aglomeradas y muy delicadas. Las hifas conidiógenas son alargadas y rectas, solitarias, en su mayoría en forma de lezna, simple, erecta, y se levanta de entre el micelio (INSPQ. 2011) (Figura 3).

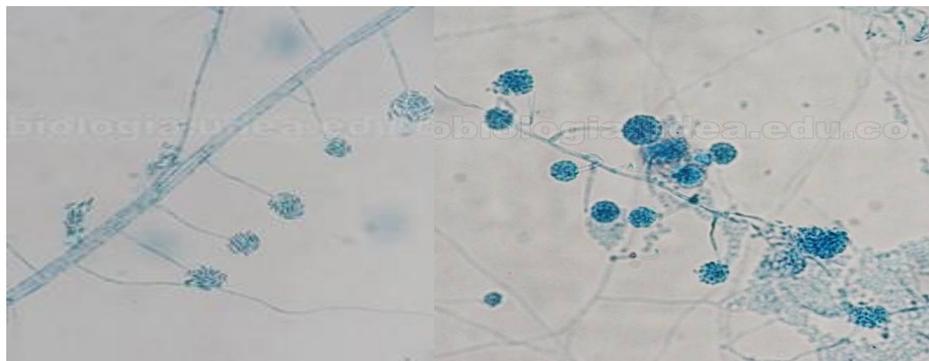


Figura 3. Morfología de *Acremonium* spp. Se muestra la morfología del genero *Acremonium* spp. Hifas hialinas septadas, delgadas. Conidios fusiformes, agrupados rodeados de un material gelatinoso (falsas cabezas). Tangarife, 2011.

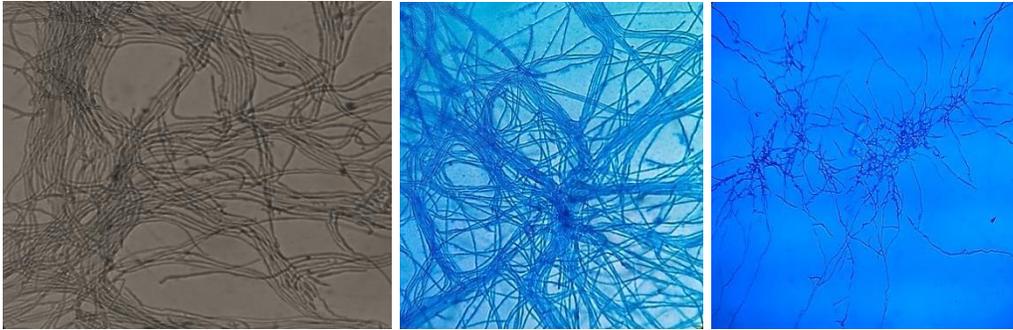


Figura 4. Variedad silvestre de *Acremonium chrysogenum* vista al microscopio óptico a 40X y 100X.

La morfología micelial se ve influenciada por factores nutricionales, efectos de esfuerzo de corte (en cultivo líquidos por agitación), calidad del inóculo y tasa de dilución. Entre estos factores, la calidad del inóculo (es decir, tamaño, edad y tipo) es de primordial importancia en la determinación de las características de la fermentación de cultivos sumergidos (Lee et al. 2001). Considerando la edad del inóculo, la morfología de *Acremonium chrysogenum* en cultivos sumergidos se clasifica en tres tipos; hifas hinchadas, fragmentos de hifas y artrosporas (ver figura 5). Se ha reportado que la diferenciación morfológica de las hifas en fragmentos muy hinchados ocurre antes del inicio de la producción de CPC, y que los fragmentos de hifas muy hinchados poco a poco van diferenciándose en artrosporas durante la producción de CPC (Matsumura et al., 1980).

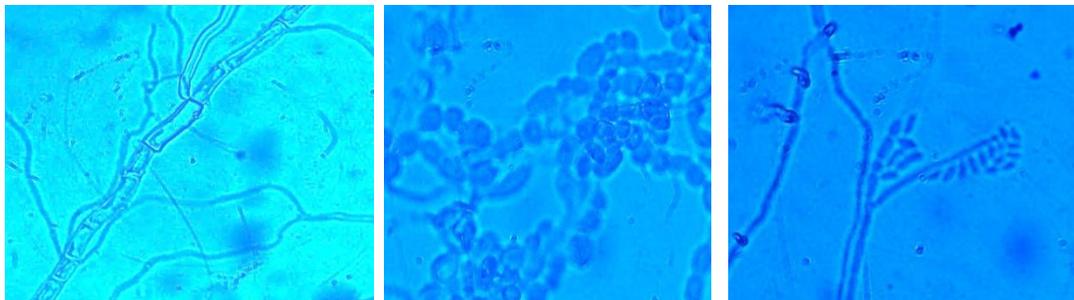


Figura 5. Morfología del micelio de *Acremonium chrysogenum*. Se muestra de izquierda a derecha: fragmentos de hifas, hifas hinchadas y artrosporas.



## 1.5 Biosíntesis de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum*

### 1.5.1 Ruta biosintética de la cefalosporina C

La ruta biosintética de la cefalosporina se conoce hoy en día en su totalidad (Figura 6) (Liras y Martín, 2006). Además se ha identificado un transportador involucrado en la secreción del antibiótico (Ullán *et al.* 2002a) y dos en el transporte intracelular de intermediarios (Teijeira *et al.* 2009; 2010), así como varios factores que regulan transcripcionalmente a los genes biosintéticos (Jekosch *et al.* 2000; Schmitt *et al.* 2001 Schmitt *et al.* 2004a).

Los dos primeros pasos de la ruta son comunes en todos los microorganismos productores de beta-lactamas. La ruta inicia con la formación del tripéptido  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV) a partir de tres aminoácidos precursores: L- $\alpha$ -aminoadípico (un aminoácido no proteinogénico cuyo precursor es la L-lisina), L-cisteína y L-valina, reacción catalizada por la ACV sintetasa, una enzima multimodular perteneciente a la familia de las péptido sintetasas y codificada por el gen *pcbAB*.

El tripéptido ACV es ciclado para formar la isopenicilina N (IPN) por la enzima isopenicilina N sintasa, codificada por el gen *pcbC*. La isopenicilina N es transformada a penicilina N (PN) mediante la actividad de dos enzimas (Ullán *et al.* 2002b); una acil-CoA sintetasa de cadena larga codificada por el gen *cefD1*, y una acil-CoA racemasa codificada por el gen *cefD2*.

La penicilina N es transformada en desacetoxicefalosporina C (DAOC) por la enzima DAOC sintasa (o expandasa), que convierte el anillo tiazolidínico característico de las penicilinas en un anillo dihidrotiazínico de seis miembros típico de cefalosporinas y cefamicinas. La DAOC es hidrolizada por la acción de la misma enzima (DAOC sintasa/DAC hidroxilasa), codificada por el gen *cefEF*, formándose desacetilcefalosporina C (DAC). El último paso de la ruta es la acetilación de la DAC a cefalosporina C (CPC), catalizado por la enzima acetyl-CoA DAC acetiltransferasa, codificada por el gen *cefG*.

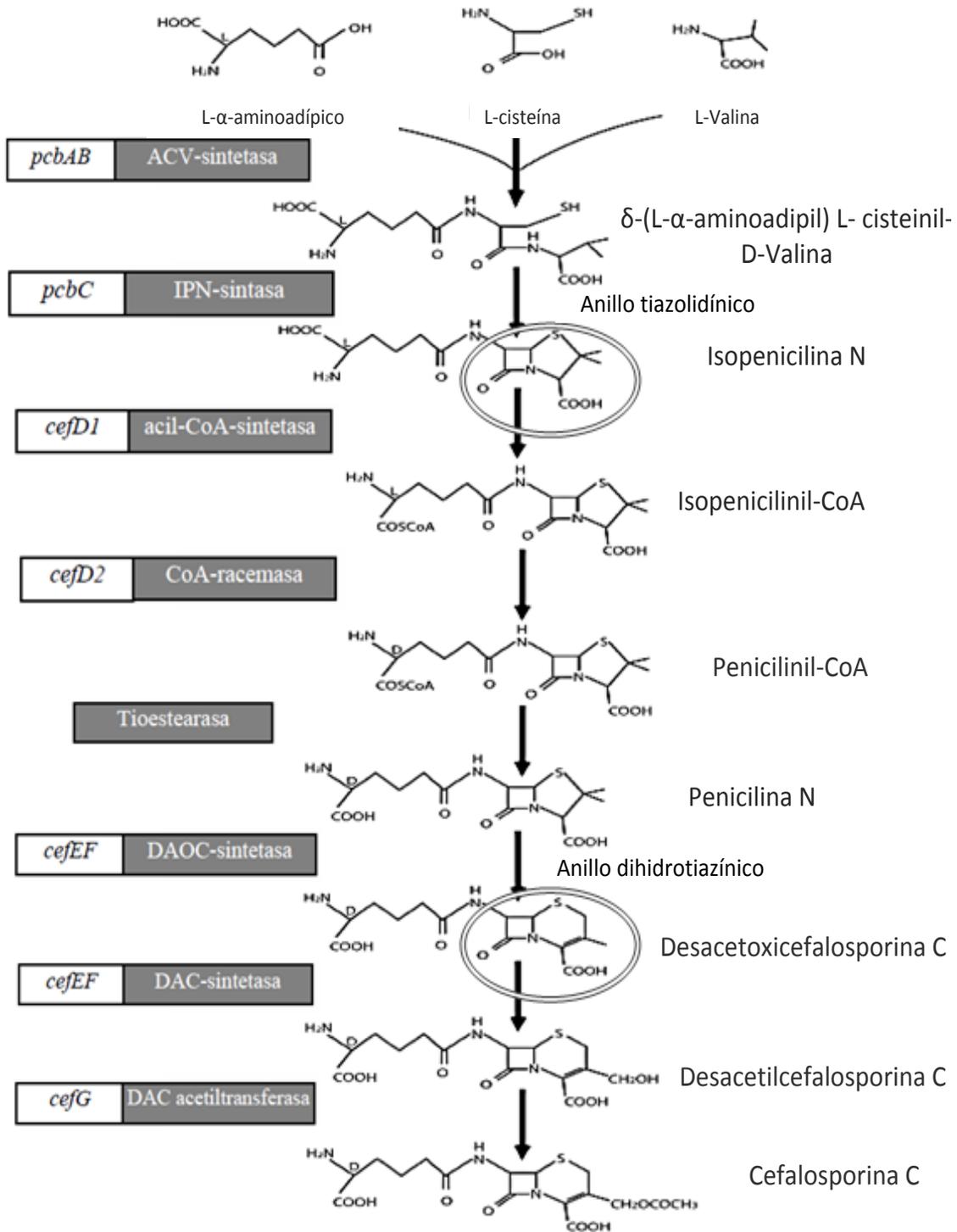


Figura 6. Ruta de biosíntesis de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum*. Se muestran los compuestos (a la derecha), genes participantes (recuadro blanco) y enzimas implicadas en la ruta (recuadro gris). También los anillos característicos de la penicilinas y la cefalosporina (Schmitt et al. 2004b).



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

Al igual que otros genes del metabolismo secundario en hongos, los genes de cefalosporina están agrupados, pero en dos *clúster* diferentes: el “*cluster* temprano” que agrupa los genes de las primeras etapas de la biosíntesis y genes de proteínas transmembranales de transporte de CPC, y el “*cluster* tardío” que contiene los genes de los pasos finales: *cefEF* y *cefG*. Estos *clusters* se ubican en cromosomas diferentes, respectivamente en el VII y el I (Gutiérrez *et al.* 1999) como se puede ver en la figura 7.

A diferencia de lo observado en el mejoramiento genético de *Penicillium chrysogenum* para la producción de penicilina (Fierro y col., 1995, Newert y col., 1997), no hay reportes disponibles que establezcan que el número de copias de los genes biosintéticos se haya incrementado en las cepas de *Acremonium chrysogenum* con alta producción de cefalosporina. Sin embargo, varias investigaciones han mostrado que los niveles de transcripción de los genes de biosíntesis de estas cepas son mayores (Walz y Kück, 1993; Velasco y col., 1994; Jekosch y Kück, 2000a; Schmitt y col., 2001), de tal forma que los cambios deben haberse producido preferentemente a nivel de la regulación transcripcional de los genes estructurales (Schmitt y col., 2004c; Cuadra Tania, 2008).

## 1.6 Compartimentalización de la biosíntesis de cefalosporina C

La mayoría de los pasos de la ruta biosintética de CPC en *A. chrysogenum* tienen lugar en el citoplasma (Van de Kamp *et al.*, 1999; Evers *et al.*, 2004). Sin embargo, es probable que la epimerización de la cadena lateral de la IPN a PenN (Ullán, 2002), catalizada por la acción conjunta de las enzimas CefD1 y CefD2, tenga lugar en los peroxisomas o microcuerpos. La proteína CefD1 presenta similitud con acil-coenzima A sintetasas de ácidos grasos y posee la señal PTS-1 “PRL”, mientras que la proteína CefD2 es similar a  $\alpha$ -metilacil-coenzima A racemasas y tiene tanto la señal PTS-1 “EKL” como la señal peroxisomal PTS-2, que es un nonapéptido de la región amino terminal cuya secuencia consenso es (RK) (LVI) X<sub>5</sub>(HQ) (LAF) (Reumann, 2004) “<sup>12</sup>KLVVELAGL”. El hecho de que ambas proteínas presenten señales de localización peroxisomal, junto con su similitud con enzimas del metabolismo de ácidos grasos, sugiere la posible



localización peroxisomal o en microcuerpos de este paso limitante de la ruta (Vacacerezo, 2008; Teijeira 2009).

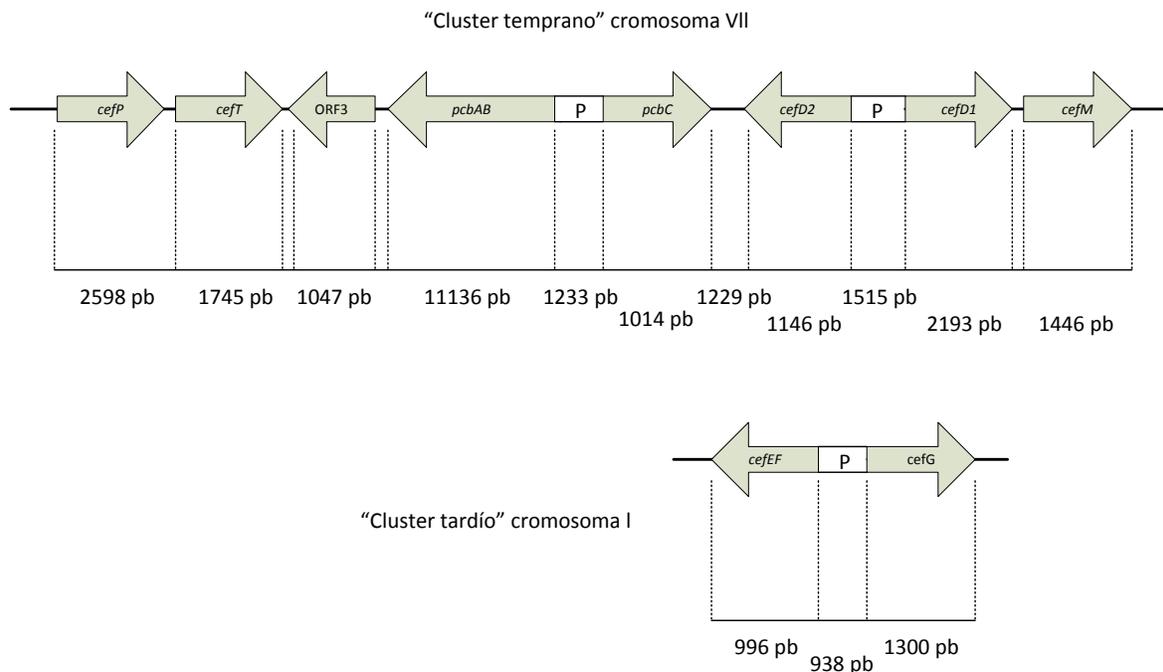


Figura 7. Organización de los genes biosintéticos de cefalosporina C. Se muestran los dos *clusters* ubicados en los cromosomas VII y I, con los genes que contiene cada uno de ellos, indicándose el número de pares de bases de cada gen implicado en la síntesis y transporte de CPC ubicados (Schmitt *et al.* 2004b; Teijeira *et al.* 2010). La letra P señala regiones intergénicas donde se ubican los promotores de dos genes orientados en direcciones opuestas.

Agrupados con los genes biosintéticos en el "clúster temprano" se encuentran tres genes: *cefT*, *cefM* y *cefP*, cuyos productos corresponden a proteínas transmembranales, y cuya función se ha establecido como de transporte. El producto del gen *cefT* sería un transportador de cefalosporina C al exterior de la célula (Ullán *et al.* 2002a), y los productos de los genes *cefP* y *cefM* serían transportadores de intermediarios; de isopenicilina N hacia el interior de microcuerpos y de penicilina N desde los microcuerpos al citoplasma, respectivamente, tal y como se muestra en la figura 8.

La disrupción del gen *cefM* bloquea la producción de cefalosporina y provoca la acumulación del intermediario penicilina N (Teijeira *et al.* 2009), mientras que la disrupción del gen *cefP* también bloquea la producción de cefalosporina y provoca una acumulación y secreción de isopenicilina N (Teijeira *et al.* 2010).

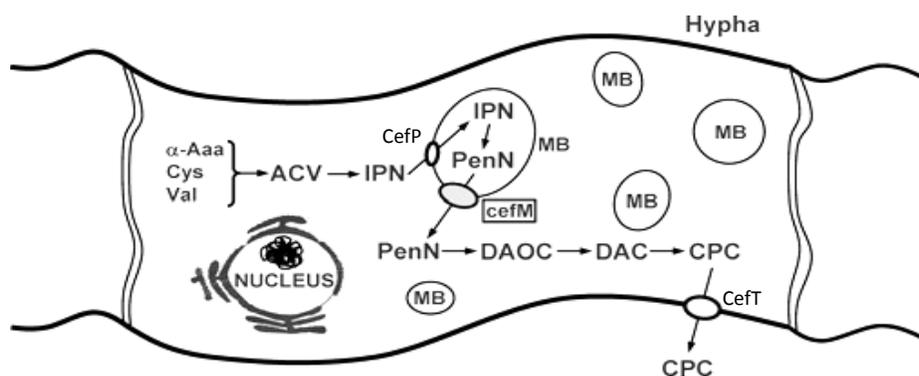


Figura 8. Compartimentalización celular de la ruta biosintética de CPC en *A. chrysogenum*. Se muestra la ubicación de las proteínas de transporte de intermediarios entre el citoplasma y microcuerpos, así como de transporte de CPC al exterior celular (Teijeira et al. 2009).

### 1.6.1 Papel de los peroxisomas y las vacuolas en la ruta de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas

Los microcuerpos (glicosomas, glioxisomas y peroxisomas) son orgánulos importantes que están presentes en las células eucariotas que cumplen diversas funciones en rutas específicas tanto del metabolismo primario como del secundario (Parsons et al. 2001).

Los microcuerpos están formados por una matriz proteica envuelta por una membrana simple que tiene un bajo contenido en ergosterol (Heiland y Erdmann, 2005). En hongos filamentosos los microcuerpos participan en funciones como la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y el desarrollo sexual (van der Lende et al., 2002). En la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* los microcuerpos parece que albergan el paso final de la síntesis de penicilina G (Müller et al., 1991), y en la biosíntesis de cefalosporina C por *A. chrysogenum* probablemente la epimerización de IPN a PenN, proporcionando un microambiente propicio para que ocurran dichas reacciones (Vaca-Cerezo, 2008). Por último, cabe indicar que existe una correlación positiva entre el número de peroxisomas y la producción de penicilinas en *P. chrysogenum* (Kiel et al., 2005).



## **1.7 Niveles de control de la regulación de la biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum***

La biosíntesis de antibióticos está muy regulada, principalmente a nivel de la transcripción de los genes responsables de la biosíntesis, que se activan sólo en determinadas condiciones y están sujetos a un estricto control por parte de circuitos reguladores generales (regulación por fuente de carbono, fuente de nitrógeno, por pH, etc.) y frecuentemente también por factores transcripcionales específicos de la vía. A continuación se señalan los principales mecanismos reguladores descritos en la biosíntesis de cefalosporina por *A. chrysogenum*.

### **1.7.1 Influencia de la metionina, el fosfato y el oxígeno en la producción de CPC**

Los niveles altos de metionina, en particular del isómero D, estimulan significativamente la síntesis de antibióticos beta-lactámicos en *A. chrysogenum*. En cultivos suplementados con metionina se obtuvieron incrementos del 200 a 300% de la producción de cefalosporina C (Velasco *et al.*, 1994). Asimismo, un aumento en el *pool* endógeno de metionina previo a la formación de cefalosporina C y la producción específica, parecen ser proporcional a la concentración de D-metionina intracelular (Gygax *et al.*, 1980)

Se ha observado que un exceso de fosfato tiene un efecto negativo sobre la producción de CPC en *A. chrysogenum*, posiblemente debido a que el fosfato incrementa la tasa de consumo de glucosa, acelerando por lo tanto la represión catabólica por fuente de carbono. También se ha sugerido que el fosfato podría actuar sobre las enzimas IPN y DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa formando complejos con hierro requerido para la actividad enzimática (Lübbe *et al.*, 1984). La cepa C-10 (sobreproductora de CPC) ve reducida su producción con concentraciones de fosfato de 100 a 215 mM, siendo la concentración óptima para la producción de antibiótico por esta cepa de alrededor de 25 mM. Las enzimas IPN y DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa están sujetas a represión e inhibición por fosfato (Jinyou *et al.*, 1988).

La disponibilidad de oxígeno es muy importante para la producción de antibióticos beta-lactámicos. Una buena aireación es importante para la ruta probablemente debido a



que las enzimas IPN y DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa requieren también de oxígeno para llevar a cabo su actividad (Hilgendorf et al., 1987).

## 1.7.2 Regulación a nivel transcripcional

Tanto en organismos eucariotas como en procariontes, la regulación de la expresión génica se produce principalmente a nivel transcripcional, ya que es la transcripción la primera etapa del proceso de expresión génica.

La biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum* está regulada por diversos circuitos nutricionales, como la regulación catabólica por fuente de carbono, nitrógeno y fósforo, así como por pH, y los genes biosintéticos de penicilina están sujetos al control de diferentes factores transcripcionales generales como PENR1, Pta1, PacC y CreA (Martín y col., 1999, Chang *et al.* 1990; Aharonowitz *et al.* 1992; Feng *et al.* 1994; Brakhage, 1998, Martín, 2000b; Brakhage *et al.* 2004; Cepeda-García *et al.* 2014). Ni en *P. chrysogenum* ni en *A. chrysogenum* parecen existir factores transcripcionales específicos que regulen de manera exclusiva los genes de penicilina y cefalosporina respectivamente (Brakhage *et al.* 2004)

Se han descrito varios **factores de transcripción** implicados en la regulación de los genes de biosíntesis de cefalosporina en *A. chrysogenum*. Dos de estos factores son reguladores de amplio dominio, y controlan múltiples genes en la célula; son el factor **Cre1**, responsable de la represión por fuente de carbono (Jekosch *et al.* 2000), y el factor **PacC**, responsable de la regulación por pH (Schmitt *et al.* 2001). Otro factor transcripcional que ha sido descrito es **CPCR1** (Schmitt y Kück, 2000), el cual posiblemente está dentro también de la categoría de reguladores de amplio dominio.

### 1.7.2.1 Regulador transcripcional CPCR

CPCR1 pertenece a la familia de los factores de transcripcionales RFX de humanos (Schmitt y Kück, 2000). CPCR1 se une a secuencias reguladoras en la región promotora intergénica *pcbAB-pcbC*, e interacciona con la proteína **AcFKH1**, un factor transcripcional de la familia *Forkhead* (*cabeza de horquilla*) (Schmitt *et al.* 2004c). La localización del sitio



de unión del factor transcripcional es aproximadamente 350 pb corriente arriba del lugar de inicio de la transcripción del gen *pcbC*. La disrupción del gen *cpcR1* provoca una fuerte reducción de la expresión del gen *pcbC* y de la acumulación del intermediario penicilina N (Schmitt *et al.* 2004c), así como la eliminación de la producción de artrosporas (Hoff *et al.* 2005).

### 1.7.2.2 Regulación por fuente de carbono, factor transcripcional Cre1

La regulación por la fuente de carbono es un mecanismo general conocido en bacterias y hongos que impide la síntesis y/o la actividad de enzimas necesarias para la asimilación de las diversas fuentes de carbono cuando esté presente una fuente de carbono fácilmente utilizada, como puede ser la glucosa. Desde el punto de vista fisiológico, este tipo de regulación es beneficioso para el microorganismo ya que se utiliza la fuente de carbono más energética y no se desperdicia energía en la síntesis de otros sistemas catabólicos para fuentes de carbono alternativas. Los genes sujetos a represión por fuente de carbono pueden dividirse en tres grupos: los que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de fuentes de carbono menos favorables, los que codifican enzimas implicadas en la gluconeogénesis y en el ciclo del glioxilato y los relacionados con el metabolismo secundario.

En *P. chrysogenum*, Gutiérrez y colaboradores (1999b) demostraron que los niveles de ARN mensajero de los genes *pcbAB*, *pcbC* y *penDE* están drásticamente reducidos en presencia de glucosa. Esta regulación se ha demostrado recientemente que está mediada por el factor transcripcional de tipo dedo de zinc CreA (Cepeda-García *et al.* 2014), homólogo a otros factores similares responsables de la represión catabólica por carbono en hongos y levaduras.

En *A. chrysogenum*, un factor transcripcional homólogo de CreA, denominado Cre1, es el responsable de la regulación por fuente de carbono. Cre1 regula negativamente la biosíntesis de cefalosporina C y la expresión de los genes *cefEF* y *pcbC* de la ruta biosintética (Jekosch K. y Kück U., 2000).



### 1.7.2.3 Regulador transcripcional PacC. Regulación por pH

Muchos hongos filamentosos son capaces de sobrevivir y crecer en un amplio intervalo de pH ambiental, el cual puede ser tan ácido como 2 o tan alcalino como 10. Aparte de su capacidad homeostática, estos organismos tienen que adaptar la secreción de enzimas y de metabolitos secundarios en respuesta al pH ambiental. Tanto las penicilinas como las cefalosporinas se producen en cantidades elevadas siempre a pH ambiental alcalino (Schmitt *et al.* 2004b).

PacC es un factor de transcripción importante en la expresión génica en respuesta al pH ambiental en los hongos filamentosos. Contiene tres dedos de zinc Cys2-Hys2, de los cuales solamente dos hacen contacto con el sitio de unión al ADN. PacC se une a sitios consenso de unión 5'GCCAAG-3' en las regiones promotoras de los genes que regula (Espeso *et al.* 1993). En condiciones ácidas predomina la forma PacC<sup>72</sup>, el producto de traducción de 72 KDa, que está conformado por 674 aminoácidos. Con el cambio de pH a neutro y/o alcalino, PacC<sup>72</sup> experimenta dos roturas proteolíticas sucesivas. La primera es dependiente de la señal de transducción por pH, en la que una proteasa señalizadora rompe PacC<sup>72</sup> eliminando aproximadamente 180 aminoácidos del extremo C-terminal, para formar un producto conocido como el intermediario PacC<sup>53</sup> (Díez *et al.* 2002). La siguiente rotura es independiente del pH ambiental y es catalizada por el proteasoma, que elimina aproximadamente otros 245 residuos del extremo C-terminal, dejando intacta la región de los dedos de zinc (dominio de unión al ADN) y dando lugar a la forma funcional PacC<sup>27</sup>, de alrededor de 250 residuos.

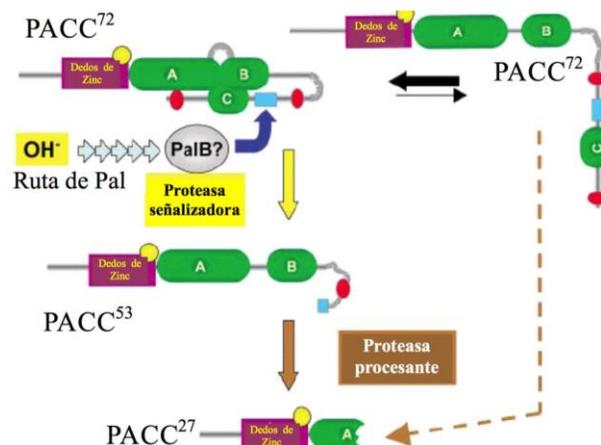


Figura 9. Procesamiento proteolítico de PacC. El procesamiento proteolítico de PacC se lleva a cabo en dos pasos, el primero es en respuesta al pH mediante una proteasa señalizadora y el segundo independiente del pH pudiendo ocurrir solo cuando el segmento A de PacC está libre (Peñalva *et al.* 2008).



PacC<sup>27</sup> se une entonces al sitio blanco de los promotores de genes expresados preferencialmente a pH alcalino para activar su expresión, y etiqueta sitios en los promotores de los genes expresados preferentemente a pH ácido para prevenir su expresión. La activación del factor de transcripción PacC mediada por la señalización de pH ambiental se resume en la figura 9.

### 1.7.3 Regulación a nivel de la estructura de la cromatina. Regulador global LaeA

La biosíntesis de antibióticos beta-lactámicos es controlada también por reguladores globales del metabolismo secundario. El gen *laeA*, que codifica una proteína nuclear con dominio metiltransferasa, regula de forma positiva la producción metabolitos secundarios, la pigmentación y la esporulación en *P. chrysogenum* (Kosalková *et al.*, 2008).

LaeA se describió inicialmente en *Aspergillus nidulans*. LaeA controla la síntesis de esterigmatocistina (una micotoxina carcinogénica), lovastatina (un antihipercolesterolémico), penicilina y pigmentos de las hifas (Keller *et al.*, 2005), como se muestra en la figura 10.

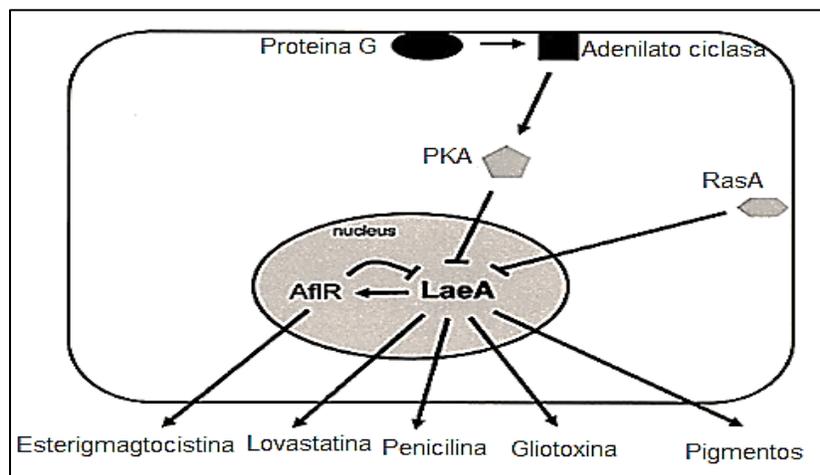


Figura 10. Sistema de regulación por LaeA en *Aspergillus* ssp. Se muestra como las proteínas quinasas tipo A (PKA) y RasA regulan, a nivel transcripcional, de forma negativa a LaeA, mientras que LaeA regula de forma positiva la biosíntesis de esterigmatocistina, lovastatina, penicilina, gliotoxina (solo en *A. fumigatus*) y pigmentos. Además las Proteínas G heterotriméricas están relacionadas con LaeA actuando corriente arriba en la transducción de señales, activando a la adenilato ciclasa para aumentar los niveles de AMP cíclico, el cual activa a PKA (Keller *et al.*, 2005).



La proteína LaeA no actúa sola sino junto a otras dos proteínas, VelB y VeA, formando un complejo heterotrimérico llamado *velvet* como se muestra en figura 11. Se sabe que, en *Aspergillus nidulans*, *velvet* regula el desarrollo y el metabolismo secundario del hongo (Bayram, et al., 2008). VeA es un regulador dependiente de luz que controla el desarrollo sexual y asexual en *A. nidulans*. Este regulador VeA se ha demostrado que está involucrado en la regulación de la biosíntesis de  $\beta$ -lactámicos en *A. chrysogenum* (Dreyer et al., 2007). El complejo *velvet* al parecer actúa remodelando la heterocromatina a eucromatina, proceso en el cual posiblemente juega un papel la actividad metiltransferasa de LaeA (Keller et al., 2005).

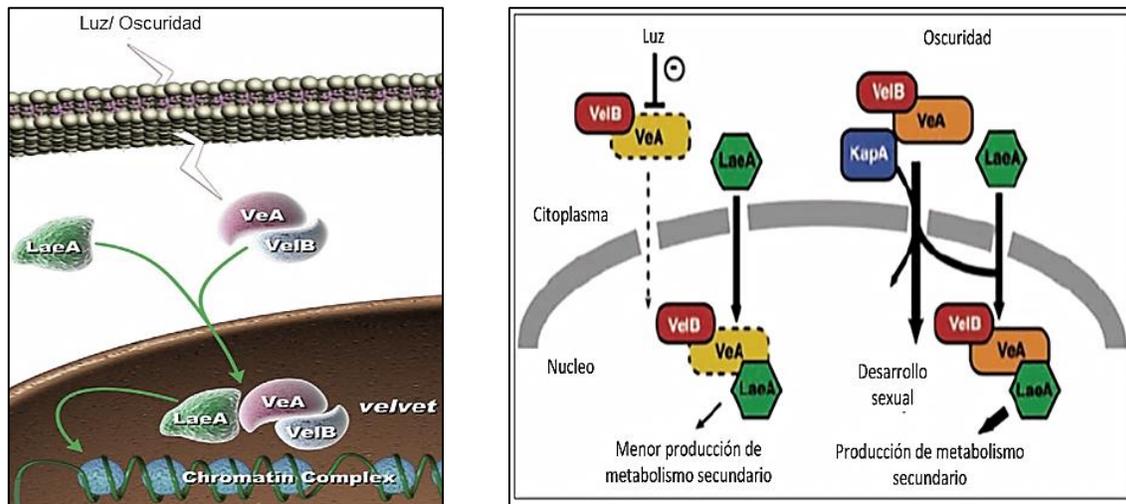


Figura 11. Complejo heterotrimérico *velvet*. En presencia de luz la proteína VeA es retenida en el citoplasma en una conformación inactiva unida a VelB, LaeA muestra una baja actividad. En la oscuridad aumenta la cantidad de VeA que se importa al núcleo por una proteína que se une denominada KapA y compatible con la proteína VelB. VeA/VelB controlan el desarrollo, mientras que LaeA controla la actividad por formación del complejo *velvet* que afecta la expresión de genes del metabolismo secundario (Bayram, et al., 2008).

T. Pérez, del grupo del Dr. J. Barrios clonó el gen *laeA* de *A. terreus completo* (con promotor y terminador), construyendo el vector pUAMTPlaeA. Al transformar este hongo con dicha construcción, se obtuvieron transformantes con incrementos en la producción de lovastatina de hasta 111% (Pérez-Aguirre 2009 y manuscrito en preparación). El vector pUAMTPlaeA fue amablemente proporcionado por el Dr. Barrios, de manera que J. Cruz lo transformó en *A. chrysogenum* (Cruz 2009). El gen homólogo a *laeA* de *A. chrysogenum* no ha sido clonado aún.



### 1.7.4 Regulación por proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas son un componente central en las vías de transducción de señales que controlan varias respuestas celulares a estímulos ambientales en organismos eucariotas. Estas proteínas transmiten la señal que se origina en un receptor de membrana (*G Protein-Coupled Receptor*) a una variedad de efectores intracelulares (Neer, 1995), entre ellos la adenilato ciclasa, modificando así las concentraciones de AMP cíclico. Las proteínas G heterotriméricas se componen de tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . En su estado inactivo la proteína se encuentra formando un trímero, asociada a la membrana plasmática, y la subunidad  $\alpha$  tiene una molécula de GDP. Cuando el receptor de membrana es activado por la señal, la subunidad  $\alpha$  sufre un cambio conformacional que provoca su separación del dímero  $\beta\gamma$  y el intercambio de GDP por GTP (Hamm, 2001). La subunidad  $\alpha$  y el dímero  $\beta\gamma$  por separado son entonces activos y pueden interactuar con sus efectores correspondientes. Pero esta activación es temporal, la subunidad  $\alpha$  posee una actividad GTPasa endógena que hidroliza GTP produciendo GDP, cuando esto sucede la subunidad vuelve a unirse al dímero  $\beta\gamma$  para formar el trímero inactivo. En la figura 12 se muestra el ciclo completo de activación y desactivación de las proteínas G heterotriméricas.

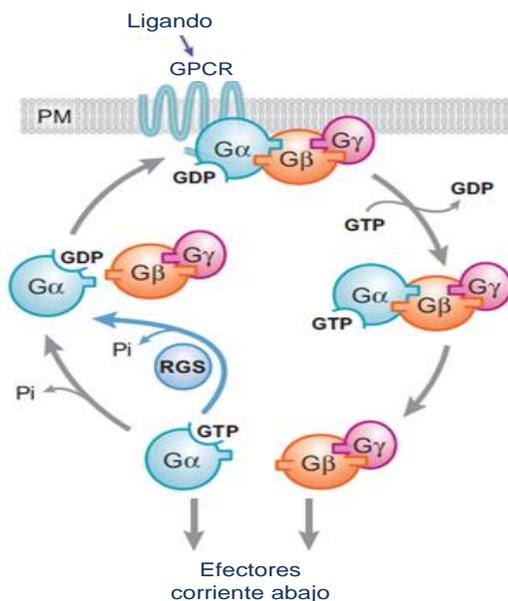
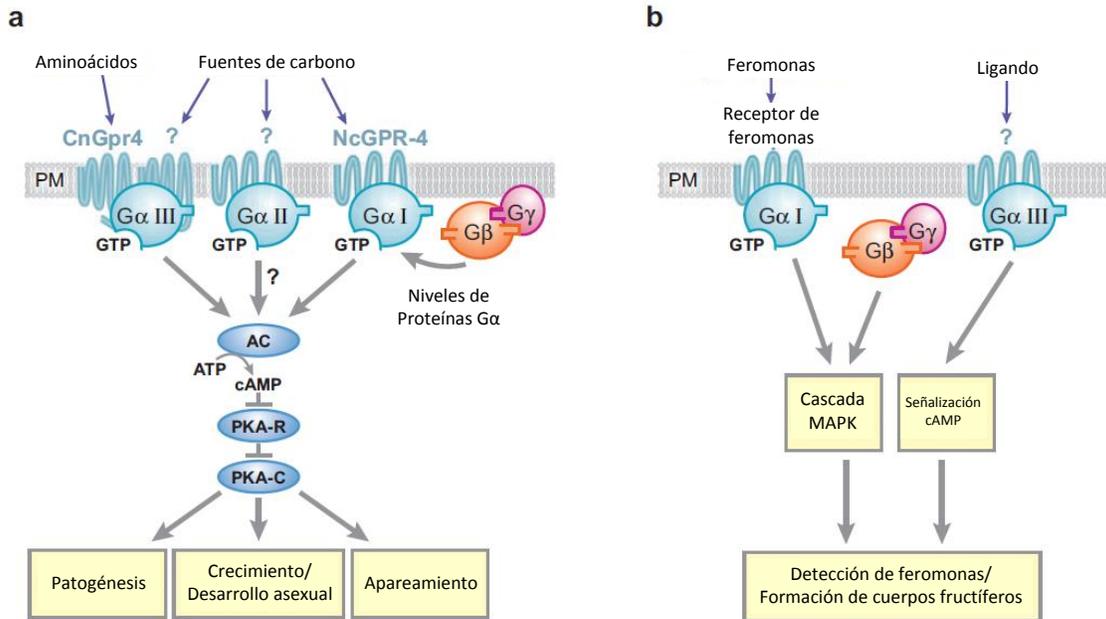


Figura 12. Ciclo de activación/inactivación de las proteínas G heterotriméricas. La unión del ligando con el receptor de membrana (GPCR: *G Protein-Coupled Receptor*) provoca un cambio conformacional en la subunidad  $\alpha$ , la cual intercambia GDP por GTP y se separa del dímero  $\beta\gamma$ , quedando entonces ambos activos para interactuar con efectores corriente abajo (*downstream*). La inactivación se produce mediante hidrólisis de GTP por una actividad GTPasa intrínseca. Las proteínas RGS (*Regulator of G Protein Signaling*) son estimuladoras de la actividad GTPasa de las subunidades  $\alpha$ . Una vez que la subunidad  $\alpha$  está unida nuevamente a GDP vuelve a asociarse con el dímero  $\beta\gamma$  para formar el trímero inactivo (reproducido de Li et al. 2007).

Una vez que la subunidad  $G\alpha$  se disocia del dímero  $\beta\gamma$  interactúa con la enzima adenilato ciclasa (AC), la cual cataliza la síntesis de AMPc a partir de ATP. El AMPc se



une a la subunidad reguladora de la proteína kinasa A (PKA-R), resultando en la liberación de la subunidad catalítica (PKA-C), que a su vez fosforila proteínas blanco para continuar con la transducción de señal. El resultado final es la activación o represión de la transcripción de ciertos genes y otros efectos regulatorios en la actividad de enzimas, provocando así una respuesta celular (figura 13a).



**Figura 13.** Respuesta a detección de nutrientes y feromonas de las proteínas G heterotriméricas en los hongos. (a) Detección de nutrientes mediante las proteínas G heterotriméricas de tipo I, tipo II y tipo III. AC (adenilato ciclasa) cataliza la producción de AMP<sub>c</sub> a partir de ATP. El AMP<sub>c</sub> se une a PKA-R dando como resultado la liberación de la subunidad catalítica de la proteína kinasa A (PKA-C), la cual puede fosforilar proteínas corriente abajo. (b) Respuesta a feromonas. La feromona se une a GPCRs, tanto la subunidad G $\alpha$  tipo I como el dímero G $\beta\gamma$  activan la cascada de las MAP kinasas, provocando la respuesta celular de formación de cuerpos fructíferos. La subunidad G $\alpha$  tipo III regula los niveles de AMP<sub>c</sub> y actúa en la regulación de los genes que tienen que ver con el apareamiento del hongo (Li *et al.* 2007).

Las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas se clasifican en tres grupos denominados I, II y III. Las proteínas G $\alpha$  I están altamente conservadas entre hongos filamentosos y hay evidencia suficiente que sugiere que este grupo de proteínas regulan múltiples rutas metabólicas como patogénesis, crecimiento y desarrollo sexual, formación de cuerpos fructíferos, etc.. El grupo de proteínas G $\alpha$  II no son tan conservadas como las del grupo I o III y sus funciones no han sido tan claras. El grupo de la proteínas G $\alpha$  III son altamente conservadas y se han designado como proteínas G $\alpha_s$  (grupo análogo) porque muchas de estas influyen positivamente en los niveles de AMP<sub>c</sub> (Li *et al.* 2007).

Mutaciones en los genes de las subunidades G $\alpha$  de los grupos I o III pueden conducir a cambios en la concentración intracelular de AMP<sub>c</sub>; se ha observado que



adicionando AMPc al medio a menudo se corrigen los defectos observados en los mutantes, de lo que se deduce que el AMPc es un mediador en la ruta de transducción de señal de las proteínas G heterotriméricas. La pérdida del dímero G $\beta\gamma$  puede dar como resultado niveles bajos de las subunidades G $\alpha$ , ocasionando un descenso en los niveles de AMPc (Li *et al.* 2007).

El dímero G $\beta\gamma$ , cuando esta disociado de la subunidad G $\alpha$ , también interactúa con ciertas proteínas de señalización denominadas quinasas activadas por mitógenos, o MAP quinasas, como se muestra en la figura 13b. La señalización en cascada de las MAP quinasas consiste en tres quinasas que se fosforilan consecutivamente, comenzando con MAPKKK, seguido de MAPKK y finalmente MAPK. MAPK entonces fosforila una serie de efectores finales (enzimas, factores de transcripción y otras proteínas reguladoras). La vía de las MAP quinasas también puede ser activada por receptores de membrana tipo RTK (Receptor Tirosina Kinasa), que transducen la señal a través de proteínas RAS en hongos filamentosos. La vía de señalización de las MAP quinasas está involucrada en la respuesta a feromonas, osmorregulación e integridad celular (Li *et al.* 2007).

Se han descrito mutaciones en el gen que codifica la subunidad  $\alpha$  de tipo I de los hongos que alteran el ciclo de actividad de la proteína G heterotrimérica. El cambio del residuo Gly en la posición 42 por una Arg (G42R) en la subunidad  $\alpha$  de *A. nidulans* (FadA) tiene como consecuencia la pérdida de la actividad GTPasa, generándose así una subunidad  $\alpha$  constitutivamente activa (FadA<sup>G42R</sup>) (Yu *et al.* 1996). De manera inversa, una mutación que cambia el residuo Gly de la posición 203 por una Arg (G203R) impide los cambios conformacionales que se producen por la unión del GTP, evitando la disociación de la subunidad  $\alpha$  del dímero  $\beta\gamma$ , lo que resulta en una proteína G heterotrimérica constitutivamente inactiva (Kurjan, 1991). Los alelos G42R y G203R son dominantes, se denominan respectivamente alelo de activación constitutiva (o dominante activador) y de inactivación constitutiva (o dominante inactivador), y han sido utilizados en varios hongos para estudiar la función de las subunidades  $\alpha$ , entre ellos *P. chrysogenum* (García-Rico *et al.* 2007; 2008a; 2008b, 2011).

En hongos filamentosos, las subunidades  $\alpha$  de tipo I regulan la producción de **metabolitos secundarios** (Calvo *et al.* 2002; Li *et al.* 2007). En *Aspergillus nidulans* la subunidad  $\alpha$  FadA regula negativamente la producción de esterigmatocistina; la expresión de un alelo de activación constitutiva del gen *fadA* (*fadA*<sup>G42R</sup>) bloquea tanto la conidiación como la producción de la micotoxina (Hicks *et al.* 1997). Sin embargo otros metabolitos



secundarios se regulan de forma diferente; Tag y col. (2000) encontraron que el alelo de activación constitutiva *fadA*<sup>G42R</sup> estimula la producción de penicilina y la expresión del gen *pcbC* en *A. nidulans*.

En *Penicillium chrysogenum*, la subunidad  $\alpha$  Pga1 regula positivamente le biosíntesis de 3 compuestos diferentes: penicilina, roquefortina y crisogenina (García-Rico *et al.* 2008b). Pga1 regula la biosíntesis de penicilina mediante el control de la transcripción de los genes biosintéticos: *pcbAB*, *pcbC*, y *penDE*.

En *Acremonium chrysogenum*, nuestro grupo investigador ha clonado el gen *aga1*, que codifica la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica homóloga de FadA y Pga1. Se han llevado a cabo mutaciones de dicho gen para obtener un alelo de activación constitutiva (*aga1*<sup>G42R</sup>) y un alelo de inactivación constitutiva (*aga1*<sup>G203R</sup>), los cuales han sido transformados en *Acremonium chrysogenum* para obtener cepas que expresan una subunidad  $\alpha$  constitutivamente activa y constitutivamente inactiva respectivamente. El efecto de estas mutaciones sobre la producción de cefalosporina C y la expresión de genes implicados en la biosíntesis de cefalosporina será objeto de estudio en este proyecto.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Estudiar la regulación de la biosíntesis de cefalosporina C por la ruta de transducción de señales de la proteína G heterotrimérica que contiene la subunidad  $\alpha$  Aga1 de *Acremonium chrysogenum*, así como el efecto de la expresión heteróloga del gen *laeA* de *Aspergillus terreus* en *Acremonium chrysogenum*.

### 2.2 Objetivos particulares

1. Analizar la producción de cefalosporina C en transformantes de *Acremonium chrysogenum* con el gen *laeA* de *Aspergillus terreus*.
2. Determinar el papel de la subunidad  $\alpha$  Aga1 de *Acremonium chrysogenum* en la regulación de la producción de cefalosporina C.



3. Estudiar la expresión de los genes *cefD1* y *cefG* en cepas de *Acremonium chrysogenum* que expresan subunidades  $\alpha$  Aga1 mutantes (constitutivamente activa e inactiva).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La regulación global de genes del metabolismo secundario no ha sido descrita completamente en hongos filamentosos, y en particular en *Acremonium chrysogenum*.

Las rutas de transducción de señales que controlan la expresión de los genes de cefalosporina C, y en última instancia su biosíntesis, son casi totalmente desconocidas en *Acremonium chrysogenum*. La vía de las proteínas G heterotriméricas no ha sido caracterizada aún en *Acremonium chrysogenum*. Teniendo en cuenta que esta vía se ha descrito en otros hongos como reguladora del metabolismo secundario, y en particular como reguladora de la biosíntesis del antibiótico  $\beta$ -lactámico penicilina en *Penicillium chrysogenum*, resulta de gran interés su estudio en *Acremonium chrysogenum* y su relación con la biosíntesis de cefalosporina C.

Por otra parte, el regulador global del metabolismo secundario LaeA, caracterizado entre otros en los hongos productores de penicilina *Aspergillus nidulans* y *Penicillium chrysogenum*, no ha sido estudiado aún en *Acremonium chrysogenum*. Existe la posibilidad de que LaeA sea un regulador del metabolismo secundario también en este hongo, y por tanto un posible regulador de la biosíntesis de cefalosporina C.



## 4. HIPÓTESIS

1. La expresión heteróloga de la proteína reguladora *LaeA* de *Aspergillus terreus* en *Acremonium chrysogenum* tendrá como consecuencia un aumento en los niveles de producción de cefalosporina C en este hongo.
2. La subunidad  $\alpha$  Aga1 de *Acremonium chrysogenum*, perteneciente a una proteína G heterotrimérica, regula la biosíntesis de cefalosporina C. Por tanto, la expresión de alelos mutantes (constitutivamente activo e inactivo) de Aga1 puede resultar en un incremento en la producción de cefalosporina C.

## 5. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

1. Determinar el papel de el gen *laeA* (de *Aspergillus terreus*) como posible regulador global de CPC en *A. chrysogenum*.
  - 1.2 Transformar *Acremonium chrysogenum* con el gen *laeA* homólogo de *Aspergillus terreus* (Cruz R. 2009).
  - 1.3 Realización de bioensayos en medio líquido de la cepa silvestre de *Acremonium chrysogenum* (ATCC 11550) y transformantes resultantes.
  - 1.4 Análisis e la expresión mediante RT-PCR punto final de *laeA*, *cefD1* y *cefG*.
2. Determinar el papel de la subunidad  $\alpha$  Aga1 de *Acremonium chrysogenum* en la regulación de la producción de cefalosporina.
  - 2.1 Transformar *Acremonium chrysogenum* (ATCC 11550) con los diferentes fondos genéticos *aga1*<sup>G42R</sup> y *aga1*<sup>G203R</sup>.



2.2 Realización de bioensayos en medio solido de la cepa silvestre de *Acremonium chrysogenum* (ATCC 11550), y de las cepas con el alelo *aga1* de acción constitutiva (*aga1*<sup>G42R</sup>) e inactivación constitutiva (*aga1*<sup>G203R</sup>).

2.3 Estudiar la expresión relativa del gen *cefD1* y *cefG* en las cepas de *Acremonium chrysogenum* con diferentes fondos genéticos de *aga1* y la ATCC 11550 mediante RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) utilizando el gen *gpd* como control de normalización.

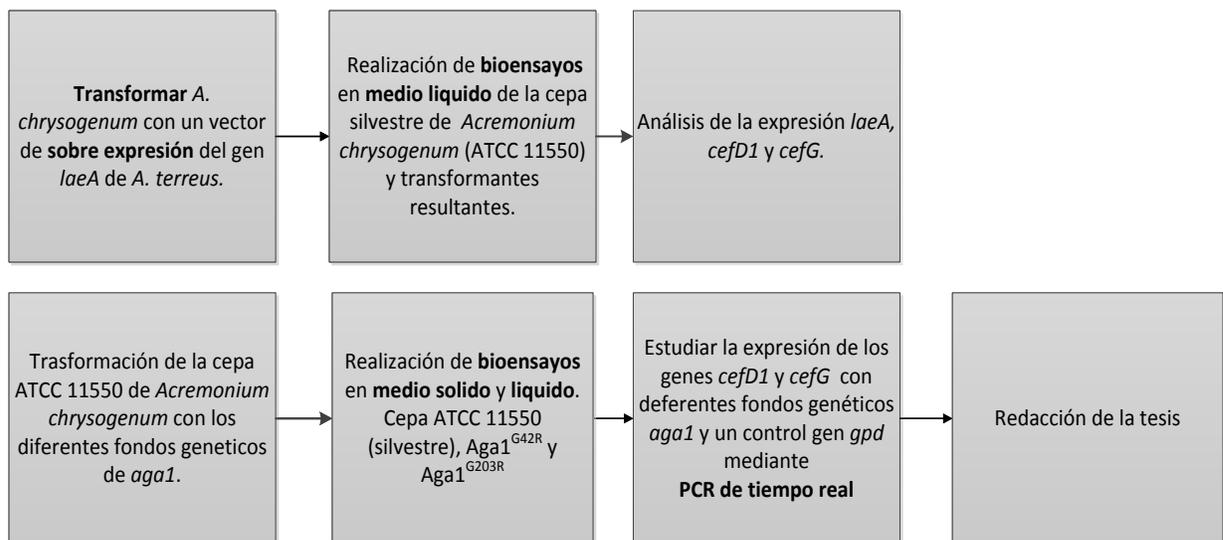


Figura 14. Diagrama de flujo del diseño de investigación.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas

*Acremonium chrysogenum* ATCC 11550: Cepa silvestre, productora de cefalosporina C, desacetoxicefalosporina C y penicilina N [CBS 779.69, DSM 880, IMI 49137].

Cepas transformadas:

- *Acremonium chrysogenum laeA*.
- *Acremonium chrysogenum* PC43.
- *Acremonium chrysogenum aga1<sup>G42R</sup>*.
- *Acremonium chrysogenum aga1<sup>G203R</sup>*.

*Escherichia coli* ESS 22-31. Cepa sensible a antibiótico  $\beta$ -lactámicos, utilizada para la cuantificación de cefalosporina C por bioensayo.

### 6.2 Medios de cultivo

#### 6.2.1 Medios de cultivo para bacterias

**Medio LB** o Luria-Bertani (Medio de cultivo para *E. coli*, Miller, 1972). El medio de cultivo LB (Luria Bertani) es el medio utilizado para el mantenimiento de las cepas de *E.coli*

**Tabla 1. Medio LB. Composición en g/L**

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



## 6.2.2 Medios de cultivo para hongos

**Medio CCM** (Medio completo, Minuth *et al*, 1982) (g/L). Medio de enriquecimiento para crecer el hongo.

Tabla 2. Medio CCM. Composición en g/L. En medio solido se usa 2% de agar.

Caldo de triptocaseína de soya	5
Sacarosa	3
Extracto de levadura	11
Extracto de carne	1
Glucosa	15
NaCl	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub>	0.01
Ajustar pH a 7.0	

**Medio MSMA** (Medio semilla modificado de *Acremonium chrysogenum*, Adinarayana *et al*, 2003). Medio rico en azúcares para activar el metabolismo aerobio del hongo.

Tabla 3. Medio MSMA. Composición en g/L

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

**Medio MCFA** (Medio complejo de fermentación de *Acremonium chrysogenum*, Caltrider y Niss, 1966). Medio diseñado con alto contenido de nitrógeno y melaza de caña.



Tabla 4. Medio MCFA. Composición en g/L

CaCO <sub>3</sub>	1.5
Sólidos de maceración de maíz	5
Melaza de caña	30
Extracto de carne	30
Ajustar pH a 6.8	

**Medio TSB** (caldo de soya y triptocaseína). También conocido como *Soybean-Casein digest medium*, el medio TSB esta formulado para enriquecimiento de varios microorganismos como son bacterias y hongos.

Tabla 5. Medio TSB. Composición en g/L

Peptona de caseína	16
Peptona de soya	3
Glucosa	2.5
NaCl	6
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5
Agar	20
Ajustar pH a 7.0	

## 6.3 Crecimiento de los microorganismos

### 6.3.1 Crecimiento de *Escherichia coli*

Se utilizó medio LB o TSB en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 60 mL de medio, el cual se inoculó con 50  $\mu$ L de glicerol de *E. coli* ESS 22-31. Las condiciones de cultivo fueron: agitación orbital a 250 rpm, a 37°C aproximadamente y 14 h, para alcanzar una OD<sub>600nm</sub> = 1.

### 6.3.2 Crecimiento de *Acremonium chrysogenum*

Para el crecimiento en medio sólido, en placas con aproximadamente 25 mL de medio CCM se inocularon 100  $\mu$ L de las cepas de *A. chrysogenum* crecidas previamente en matraces con medio CCM líquido.



Para el crecimiento en medio líquido, se inocularon 100  $\mu$ L de gliceroles de las cepas de *A. chrysogenum* en medio CCM líquido, y se incubaron a 27°C durante una semana.

### **6.3.3 Mantenimiento de microorganismos**

Las cepas de *E. coli* se conservaron en placas de Petri selladas a 4°C durante un periodo máximo de un mes, o en glicerol al 40% a -20°C durante varios meses. Es necesario reactivar las cepas cada 3 a 6 meses, resembrando en medio LB y preparar nuevos stocks de glicerol.

Las cepas de *A. chrysogenum* se conservaron de manera similar pero utilizando medio CCM.

## **6.4 Bioensayo de producción de cefalosporina**

### **6.4.1 Bioensayo medio sólido**

1. Una vez crecidas las cepas en medio CCM se agregó 1 mL de solución salina de NaCl al 0.9% y se recuperó por raspado todo el micelio de las cajas para colocarlo en tubos Falcon con perlas de vidrio (previamente tarados), se tomó como peso estándar el peso de la cepa que pesó menos (0.74 g), la cual fue la cepa G42R-6, y se ajustaron a éste los pesos del resto de las cepas. Después se agregaron 5 mL de solución salina de NaCl al 0.9% y 50 mL de glicerol al 80%, y se maceró el micelio en vórtex hasta que se consideró que ya estaba homogéneo. En el caso de las cepas G203R no se pudo romper demasiado el micelio debido a las características que presentaron estas cepas. Las suspensiones así obtenidas se almacenaron a 4°C, y se utilizarían para inocular los cilindros de agar.
2. Se sacaron con un sacabocados cilindros de aproximadamente 6 mm de diámetro de placas con medio MCFA (medio complejo de fermentación de *Acremonium*). Esto se hizo una vez por día durante 6 días, comenzando con



- los cilindros que se incubarían por un tiempo de 120 h y terminando con los de 24 h.
3. En placas Petri de 50 mm de diámetro se colocaron por triplicado los cilindros de medio MCFA y se inocularon con 2  $\mu$ L de suspensión de *Acremonium*. Se sellaron las placas con parafilm® y se incubaron durante 24-120 h a 25°C. (ver figura 15).
  4. En una placa de bioensayo se agregaron aproximadamente 220 ml de medio TSB al 1% de agar. Una vez fundido el medio se esperó hasta que su temperatura alcanzó 45°C, se inoculó con 15 ml de suspensión de *E. coli* 2231 (ver crecimiento de *E. coli*) y se vertió sobre las placas
  5. Los cilindros incubados según lo descrito en el punto 3 se colocaron sobre las placas de bioensayo. Se pusieron también controles de cefalosporina C de concentraciones conocidas (2.5, 5, 10, 15, 25  $\mu$ g/ml), de los cuales se agregó un volumen de 60  $\mu$ L en pozos previamente hechos en la placa de bioensayo.
  6. Las placas de bioensayo se incubaron durante 12 y 15 hrs. a 37°C. Se midió el halo de inhibición producido por lo cilindros y por los controles de CPC.
  7. Se construyó una curva estándar con los diámetros de inhibición vs concentración conocida de los estándares, y se interpolaron los diámetros de inhibición de los cilindros para hacer una estimación de la concentración de beta-lactámicos totales producidos por *Acremonium chrysogenum*.



Figura 15. Bioensayo en medio sólido. En las cajas Petri chicas se dispusieron tres cilindros de agar de medio MCFA inoculados con 2  $\mu$ L de suspensión del homogeneizado cada uno. Se comenzó con el tiempo de 120 h y así cada 24 h hasta llegar a las 0 horas, momento en que se hizo el bioensayo.



#### 6.4.2 Cultivos en medio líquido para producción de antibióticos por *Acremonium chrysogenum*

Debido a las dificultades que presenta el determinar el número de esporas en cultivos crecidos en medio sólido, se optó por estandarizar la cantidad de inóculo a partir de micelio crecido en placas con medio CCM. Se rasparon las placas y se tomaron aproximadamente 0.7 g de micelio que se transfirieron a tubos Falcon, cada uno con 15 perlas de vidrio en su interior, previamente tarados. El micelio se maceró en vórtex con medio semilla MSMA estéril en un volumen de 20 mL, con el fin de obtener una suspensión homogénea para inocular con esos 20 mL matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 30 mL de medio líquido MSMA. El tiempo de vórtex utilizado en cada uno de los tubos fue variable, y solo se determinó por aspecto de la emulsión. Se incubó el micelio inoculado en el medio MSMA durante 36 h a 27°C y una agitación orbital de 250 rpm.

El medio de cultivo para producción de cefalosporina, **MCFA**, se distribuyó en matraces indentados Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, añadiéndose un volumen de 50 mL de MCFA por matraz. Se inocularon en cada matraz 5 mL del cultivo en medio semilla MSMA, y se mantuvieron en un agitador orbital a 27°C y 250 rpm. Se usaron tres matraces para cada tiempo, cada cepa y replica biológica, para determinar la producción de CPC, biomasa (peso seco de micelio) y para realizar las extracciones de ADN y ARN. Debido a que el pH varía a lo largo del cultivo, se usó el agente amortiguador MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico) en los últimos cultivos realizados, y se determinó la concentración adecuada como se describe en los resultados.

#### 6.4.3 Bioensayo de cultivos en medio líquido

1. Se realizaron cultivos de *Acremonium chrysogenum* como los descritos en el apartado 6.4.2.
2. Cada 24 hrs. se tomaron matraces y se filtró la biomasa. Se tomó del líquido filtrado una alícuota de 2 mL como muestra para cada pozo de la placa de bioensayo. Las muestras se conservaron a -20°C hasta terminar los 6 días de cultivo.



3. La caja de bioensayo se preparó igual que el punto 4 para el bioensayo en medio sólido. Se hicieron pozos con la ayuda de un sacabocado para agregar las concentraciones conocidas de cefalosporina C y las muestras del líquido filtrado.
4. Se construyó una curva estándar similar a la del bioensayo en medio sólido.
5. Una vez cargadas con los estándares y muestras las placas de bioensayo, se incubaron a 4°C durante al menos una hora, tiempo en el que el antibiótico difundió a través del medio.
6. Después las placas de bioensayo se incubaron 12-15 horas a 37°C. El antibiótico presente en el medio inhibió el crecimiento del microorganismo inoculado, dando lugar a halos de inhibición de crecimiento. Los halos de inhibición obtenidos se encuentran entre 15 y 28 mm.

#### **6.4.4 Preparación de estándares de cefalosporina C.**

Se pesó exactamente una cantidad de estándar equivalente a 100 mg de cefalosporina C sal de zinc (base seca). Se colocó en un matraz aforado de 100 mL, disolviendo con solución EDTA 0.01 M hasta llevar al volumen.

De la solución anterior se tomó una alícuota de 25 mL, se colocó en un matraz aforado de 50 mL y se llevó a volumen con agua destilada. Esta solución stock tenía una concentración de 500 µg de cefalosporina C sal de zinc/mL.

De la solución stock se tomaron alícuotas de 0.5 ml hasta 5 ml que se aforaron con agua destilada en matraces volumétricos para obtener las concentraciones estándares de 5, 10, 20, 35 y 50 µg de cefalosporina C sal de zinc/mL. Se usa la fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$ .

Los controles con diferentes concentraciones de cefalosporina C sal de zinc nos permitieron realizar una curva patrón que relacionaba directamente el logaritmo de la concentración de cefalosporina C con el diámetro del halo de inhibición de crecimiento en el bioensayo. La interpolación en esta curva de los diámetros de los halos de inhibición de las muestras problema permitió determinar la concentración de antibiótico en los caldos de cultivo (Cruz J., 2009). Una alternativa es usar una correlación que mejor ajuste los resultados de dicha curva patrón. La hoja de cálculo Excel de OFFICE tiene varias herramientas.



## 6.5 Extracción de ADN total de *A. chrysogenum*

### 6.5.1 Pasos generales de la extracción

Todos los métodos de extracción pueden dividirse en una serie de pasos generales, de tal forma que la necesidad de cada paso depende del microorganismo y del tipo de muestra (Cultek, 2006). En general estos pasos consisten en:

1. **Liberación de los ácidos nucleicos.** Hay una gran variedad de métodos para la liberación de los ácidos nucleicos de diferentes microorganismos, entre los que se encuentran el hervir en agua destilada o tampón de PCR, el uso de detergentes con o sin calor, hidróxido sódico con calor, ciclos de congelación-descongelación, SDS-proteínasa K, ácido perclórico, enzimas (lisozima), sonicación, etc.
2. **Protección** (evitar rotura física) **y estabilización** de los ácidos nucleicos frente a la degradación (uso de EDTA)
3. Eliminación de inhibidores de la amplificación.
4. Extracción con solventes y desproteinizado del ADN (fenol-cloroformo o CIA, acetato de potasio)
5. Concentración de la muestra: mediante precipitación (isopropanol o etanol).
6. Almacenamiento en condiciones adecuadas el ADN (buffer TE).

Algunos métodos de extracción ácidos nucleicos que pueden usarse son:

1. Cromatografías de afinidad, intercambio iónico o exclusión molecular.
2. Ultrafiltración
3. Bolas magnéticas
4. Extracción por solventes (Fenol-CIA)
5. Extracción mediante un kits comerciales (Cultek, 2006).

Se utilizaron dos métodos de extracción de ADN en el presente trabajo. El primero mediante un *kit* de una marca comercial y el segundo mediante Fenol-CIA descrito por Speacht *et al.* (1982), modificado por Fernández (1997).



### 6.5.2 Extracción de ADN con el kit Wizard® de PROMEGA

Se agregaron 40 mg de micelio pulverizado en tubos eppendorf. Se añadieron 600 µL de solución de lisis y se agitó en vórtex 1-3 seg. Se incubó a 65°C por 15 min. Se añadieron 3 µL de solución RNasa y se mezcló por inversión 2-5 min. Después se incubó a 37°C por 15 min y se dejó la muestra que se enfriara a temperatura ambiente por 5 min. Se añadieron 200 µL de solución de precipitación de proteína (*precipitation protein*). Se agitó en vórtex vigorosamente por 20 seg. y se centrifugó por 3 min a 13,000-16,000xg. Se recuperó en sobrenadante y se transfirió a otro tubo. Se añadieron 600 µL de isopropanol y se mezcló suavemente por inversión, después se centrifugó a 1300-1600 x g un minuto a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 600 µL de etanol al 70%. Se invirtió el tubo varias veces para lavar el ADN y nuevamente se centrifugó a 13,000-16,000 x g un minuto. Con cuidado se retiró el etanol, y se dejó secar en papel absorbente por 15 min. Se añadieron 100 µL de solución hidratante de ADN y se incubó a 65°C por 1 hora. Periódicamente se mezcló la solución golpeando suavemente el tubo y se volvió a incubar toda la noche a temperatura ambiente o a 4°C (opcional). Se añadieron finalmente 50 µL de H<sub>2</sub>O estéril y se dejó a 4°C toda la noche para almacenarse posteriormente a -20°C.

### 6.5.3 Obtención de ADN total de *A. chrysogenum* con FENOL-CIA

Se recogió micelio resultante de 100 mL de medio MCFA a través de papel filtro, el cual fue lavado con solución estéril de NaCl al 0.9% (p/V). Se filtró y posteriormente se congeló inmediatamente a -70°C con nitrógeno líquido. En un mortero estéril se pulverizó y parte del polvo se recogió en tubos eppendorf de 1.5 mL la cantidad aproximada de 25 mg.

A continuación se le añadieron 0.5 mL de amortiguador de lisis I<sup>1</sup> y se homogeneizó suavemente. Posteriormente se le añadieron 0.5 mL de fenol neutro<sup>2</sup> y 0.5

---

<sup>1</sup> **Amortiguador de lisis I:** EDTA 100 mM pH8, SDS 1% (p/V), Tris-HCl 0.2 M; se ajusta a 8.2 con HCl. Solución de lisis= (10 ml Tris-HCl 1M + 10 ml EDTA 0.5M + 5 mL SDS 10% + H<sub>2</sub>O cbp 50ml).

<sup>2</sup> **Fenol neutro:** se mezcla por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con un volumen de Tris-HCl 1 M pH 8. Posteriormente se deja reposar hasta que se separen claramente las fases. Los lavados se repiten hasta



mL de CIA<sup>3</sup>. Se mezcló lentamente por inversión y se incubó a 50°C durante 20 minutos (con mezclas por inversión cada 5 minutos). Trascurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa, la cual contiene el ADN total extraído. Posteriormente se eliminaron las proteínas por tratamiento con fenol y el ARN por tratamiento con RNasa. La figura 16 muestra el diagrama de flujo de la extracción del ADN con FENOL-CIA.

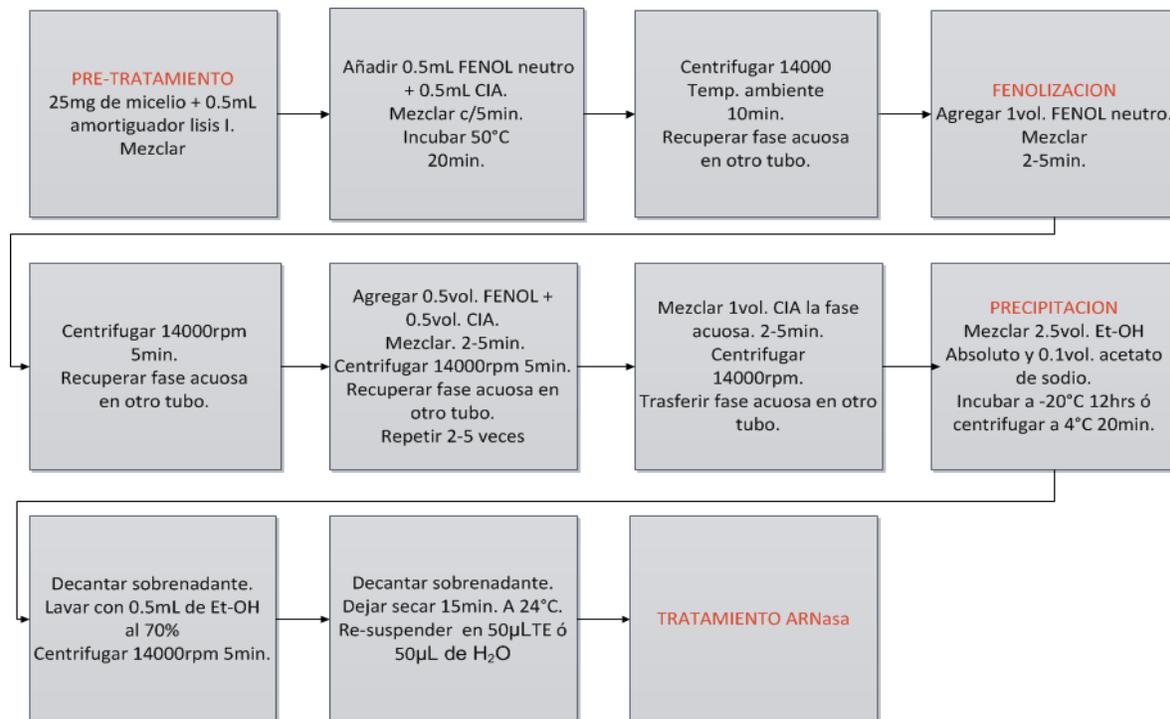


Figura 16. Diagrama de flujo extracción de ADN con FENOL-CIA.

que el fenol alcance un pH neutro (El fenol ácido se prepara con 1 volumen de fenol en cristales fundido a 65°C con 1 volumen de H<sub>2</sub>O, se agita y se deja reposar, luego se retira la fase acuosa).

<sup>3</sup> CIA: Se mezclan 24 volúmenes de cloroformo con 1 volumen de alcohol isoamílico.

Tris-HCl 1 M (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub> HCl): Pesar 39.4 g y disolver en 250 ml H<sub>2</sub>O pH 8.2. No tratar con agua DEPC.

Fenol ácido: se mezclan 500 mL de fenol sólido con 500 mL de H<sub>2</sub>O a 65°C, se agita y se deja reposar. Posteriormente se retira la fase acuosa.



### 6.5.3.1 Extracción con fenol

La fase acuosa con el ADN extraído se homogeneizó con 1 volumen de fenol neutro, se mezcló suavemente por inversión durante 2-5 minutos y después se centrifugó a 14,000 rpm durante otros 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo eppendorf estéril; donde se le agregó 1/2 volumen de fenol neutro y 1/2 volumen de CIA, se mezcló suavemente por inversión 2-5 minutos y se centrifugó en las mismas condiciones del paso anterior. Se repitió la extracción con Fenol-CIA hasta que se obtuvo una interface limpia (no fueron necesarias más de cinco extracciones). La fase acuosa se recuperó y se homogeneizó solamente con un volumen de CIA; se mezcló por inversión 2-5 minutos y se centrifugó en las condiciones antes descritas.

Existen reactivos de marcas comerciales que contienen los componentes en la proporción adecuada para la extracción, por ejemplo de SIGMA.

### 6.5.3.2 Precipitación del ADN

Se transfirió la fase acuosa a otro tubo estéril para precipitar el ADN, agregando 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2. Se dejó precipitar toda la noche a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C; se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 0.5 mL de etanol al 70 % (v/v); se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El precipitado se dejó secar durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente (con la tapa abierta). El ADN, obtenido como un precipitado blanco, se resuspendió en 50 µL de TE<sup>4</sup> o en 50 µL de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se conservó a 4°C.

---

<sup>4</sup> TE: EDTA 1 mM pH 8.0 y Tris-HCl 10 mM pH 8.0.



### 6.5.3.3 Tratamiento con RNasa

A cada muestra de ADN se le agregó RNasa<sup>5</sup>. La mezcla se incubó a 37°C durante 90 minutos. Pasado el tiempo de incubación se eliminó la RNasa con una extracción de FENOL-CIA y otra de CIA. El ADN se precipitó como en el apartado anterior, y el resultado se visualizó en un gel de agarosa al 0.7%, cuantificándose posteriormente.

## 6.6 Extracción de ARN de *Acremonium chrysogenum*

### 6.6.1 Consideraciones generales en el manejo del ARN

Se deben mantener en todo momento condiciones asépticas y el uso de material exclusivo para trabajar con ARN. Las micropipetas debe ser limpiadas con solución DEPC<sup>6</sup> 0.1% (v/v). La mesa de trabajo se limpia con etanol y cloroformo o bien etanol y solución DEPC 0.1%. Debe usarse material nuevo y libre de RNasa. Se usan guantes de nitrilo. Se debe almacenar en agua libre de RNasas (con 0.1 M EDTA) o TE a -80°C cuando es por corto tiempo. El EDTA, que es un agente quelante, evitará que el ARN se degrade cuando se calienta en presencia de iones divalentes como Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup>. Para mantener el ARN almacenado por periodos largos de debe de conservar precipitado con etanol absoluto a -20°C. Las bajas temperaturas y la presencia de alcohol inhiben toda actividad enzimática

---

<sup>5</sup> **RNasa:** Se disuelve RNasa en Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y NaCl 15 mM a una concentración de 10 mg/mL. Hervir durante 15 minutos, se enfría lentamente, se reparte en alícuotas y se conserva a -20°C o -70°C.) en una concentración final de 100 µg/mL.

<sup>6</sup> **DEPC (dietilpirocarbonato):** Se prepara una solución al 0.1% (v/v), la cual se deja en agitación toda la noche tapada. Debido a que es carcinógeno se deben usar guantes. Esterilizar en auto clave 2 veces a 15 Lb/Plg<sup>2</sup>/15min. Esta solución se puede emplear para las muestras de ARN. El DEPC elimina la actividad enzimática modificando -NH, -SH y -OH de RNAsas y otras proteínas.



### 6.6.2 Extracción de ARN con TRIZOL®

Se utilizó la técnica de extracción del ARN total del TRIZOL® debido a que es una técnica que da alto grado de pureza en el ARN y es muy sencilla de utilizar. Los pasos de la técnica se describen a continuación:

1. **Homogeneizado:** se adicionó 1 mL de TRIZOL® por cada 50-100 mg de micelio liofilizado.
2. **Separación:** Se incubó el homogeneizado por 5 min a 15-30°C y se añadieron 0.2 mL de cloroformo, se agitó en vórtex 15 segundos. Se incubó 3 min y se centrifugó a 1200 g, 15 min a 2-8°C. El ARN se encuentra en la fase acuosa.
3. **Precipitación del ARN:** Se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipitó el ARN con 0.5 mL de alcohol isopropílico. Se incubó entre 15-30°C 10 min. Se Centrifugó a 12,000 g, 10 min entre 2-8°C. Se formó un precipitado gelatinoso de ARN.
4. **Lavado del ARN:** Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 75%, se mezcló con ayuda del vórtex y se centrifugó a 7500 g, 5 min, entre 2-8°C.
5. **Resuspensión del ARN:** Se retiró el etanol y se dejó secar el ARN al aire libre 10 min, posteriormente se disolvió en 150 µL agua libre de RNasa (agua inyectable). También se puede redissolver en 100% de formamida y ser almacenado a -70°C.

### 6.6.3 Tratamiento con DNasa

Se realizó con el *kit* de la casa comercial PROMEGA® RQ1 RNase-free. La cual es una DNasa tipo I que degrada ADN de doble cadena y de cadena sencilla.

Se preparó primero una mezcla de DNasa y buffer considerando el error de pipeteo. Después se adicionó a cada tubo la cantidad calculada y se incubó a 37°C durante 30 min. Finalmente se agregaron 2.7 µL de la solución RQ1 DNase Stop y se incubó a 65°C por 10 min.

Condiciones utilizadas por muestra:



Tabla 6. Condiciones utilizadas por muestra tratamiento DNasa kit PROMEGA® RQ1 RNase-free.

Reactivo	Cantidad	Observaciones
ARN	15 $\mu$ L	Conc.: 646 ng/ $\mu$ L
DNasa I 10x	10 $\mu$ L	(15*646)= 9690 ng; entonces: 1 $\mu$ L $\rightarrow$ 1000 ng como; 9690 ng $\rightarrow$ X = 9.69 $\mu$ L
Buffer 10x	2.75 $\mu$ L	1 $\mu$ L $\rightarrow$ 10 $\mu$ L como; 25 $\mu$ L(10+15) $\rightarrow$ X= 2.5
RQ1 DNase Stop	2.75 $\mu$ L	Mismo cálculo que Buffer 10x

## 6.7 Electroforesis de ácidos nucleicos

Los tamaños de fragmentos o ácidos nucleicos totales pueden ser determinados por electroforesis en gel de poliacrilamida o de agarosa. Debido a la estructura de la subunidad del nucleótido del ADN, con un grupo fosfato por nucleótido, el ADN tiene una carga esencialmente constante por unidad de masa. De este modo, las velocidades de migración de fragmentos de ADN durante una electroforesis proporcionan estimaciones precisas de sus longitudes, con la velocidad de migración siendo inversamente proporcional a la longitud. El gel de poliacrilamida o de agarosa simplemente actúa como un tamiz molecular, con los fragmentos más pequeños capaces de pasar por el tamiz más rápidamente que las moléculas grandes. La agarosa trabaja algo mejor que la poliacrilamida para los fragmentos grandes ya que tiene tamaño de poro ligeramente superior; los geles de poliacrilamida proporcionan una mejor resolución para fragmentos cortos.

Un gel con alto porcentaje de agarosa tiene mejores cualidades para separar pequeños fragmentos de ADN. Para separar grandes fragmentos de ADN es mejor utilizar porcentajes más bajos de agarosa (por ejemplo para el ADN total se utiliza 0.8%).

Para correr el gel de agarosa<sup>7</sup>, se sumerge en una solución tampón de TAE 1x<sup>8</sup>. Las muestras se cargan en pequeñas depresiones del gel denominados pozos junto con un buffer de carga<sup>9</sup>, el cual le da densidad a la muestra y color.

<sup>7</sup> Gel de agarosa al 0.8, 1.5 y 2 %: Disolver 0.8, 1.5 y 2 gr respectivamente en 98 mL de H<sub>2</sub>O y 2 mL de TAE 50x (concentración final TAE 1x).



A continuación se aplica una corriente eléctrica entre los electrodos situados en los extremos opuestos del gel.

El eje azúcar fosfato produce ADN cargado negativamente por lo que el ADN migra hacia el ánodo (el polo positivo) y es repelido por el cátodo (polo negativo) cuando se le aplica un campo eléctrico.

Al acabar el tiempo deseado de electroforesis, el ADN que hay en el gel se tiñe utilizando colorantes como bromuro de etidio<sup>10</sup>, que se intercala entre las pares de bases del ADN. Este colorante se vuelve fluorescente cuando se exponen a la luz ultravioleta, entonces se obtiene un registro permanente del gel fotografiándolo mientras está expuesto a la luz ultravioleta (Gardner J., 2005).

El bromuro de etidio tiene una absorbancia a 302 y 366 y emisión a 590 nm. Detecta hasta 10 ng de DNA.

La metodología que se empleó fue la siguiente (Revisada en Sambrook y Russell, 2001):

1. Se prepararon geles de agarosa de 0.8%-1.0% y Buffer TAE 1x.
2. Se dejó solidificar el gel en el molde 10 minutos aproximadamente
3. Se agregó buffer TAE 1x a la cámara de electroforesis y una vez que se incorporó el gel en esta se quitó el peine del molde de los pozos.
4. Se cargaron 2  $\mu$ L del buffer de carga<sup>9</sup> en parafilm y se mezcló con 5  $\mu$ L de muestra.

---

<sup>8</sup> **TAE 50x:** 57.1 mL Ac. Acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, 242 g de Tris base y agua destilada hasta completar un litro (57.1%:0.05 M:1.9 M).

<sup>9</sup> **Buffer de carga 6X:** 25 mg azul de bromofenol, 25 mg xilenocianol, 4 g de sacarosa y TAE 1x cbp 10 mL (0.25:0.25:40%). Se esteriliza y se conserva a 4°C.

<sup>10</sup> **Solución stock bromuro de etidio (10 mg/mL):** Pesar 100 mg de bromuro de etidio y disolver en 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Para ARN tratar el agua con DPCE.

**Solución de trabajo bromuro de etidio (1  $\mu$ g/mL).** Tomar 10  $\mu$ L del stock y disolver en 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada.



5. Se adicionaron 2.5  $\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular (*ladder* PROMEGA<sup>®</sup>) en el primer pozo de la cámara de electroforesis.
6. Se adicionaron en los otros pozos las muestras.
7. Se corrió el gel. Los Volts a los que se corre es aprox. 8 Volts/ cm largo.
8. Se dejaron correr aproximadamente 1 h. El tiempo varía de acuerdo al tamaño y concentración de agarosa en el gel.
9. Después los geles se colocaron en bromuro de etidio (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se dejaron teñir durante aproximadamente 10 minutos.
10. Se pasaron a una charola de agua para quitar restos de bromuro de etidio.
11. En un fotodocumentador finalmente se colocó el gel y se visualizaron las bandas. Se utilizó un equipo Gel Doc II (Bio-Rad<sup>®</sup>).

## 6.8 Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácidos nucleicos puede ser realizada por espectrometría y puede verificarse la pureza, de acuerdo con Sambrook y Russell (2001).

Se preparan diluciones en agua y se miden sus absorbancias y longitudes de onda de 203, 260 y 280nm, utilizando agua como blanco (o agua tratada con DPCE para ARN). Después se realizan los cálculos pertinentes. Es importante tener íntegros los ácidos nucleicos ya que el método absorbe las bases nitrogenadas del material genético pero no indica si este está degradado o no. Para determinar la integridad del ARN se corre un gel de agarosa en el cual deben verse dos bandas bien definidas las cuales corresponden a los ARNs ribosomales, 18S (1.9 kb) y 28S (4.7 kb). Si se ve una mancha al final del gel muy marcada y no se aprecian las del 18S y 28S el ARN indica que se ha degradado, como se muestra en la figura 17. Por otra parte deben hacerse las diluciones adecuadas para que puedan cumplir la ley de Lambert y Beer ( $A=abc$ ), así entonces una lectura de  $A_{260}=1$  indica que hay 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ARN o 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ADN basado en el coeficiente de absorptividad del ARN o ADN en agua. Las absorbancias medidas no discriminan entre ADN y ARN por lo que es muy importante usar un método de extracción que sea lo más eficiente para evitar contaminaciones (QUIAGEN, 2008).

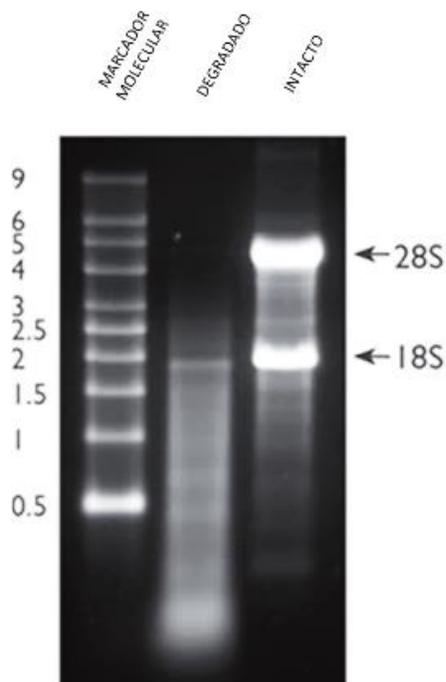


Figura 17. ARN intacto vs degradado. Gel de agarosa al 1.5% desnaturalizante. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, el segundo carril un ARN degradado y el tercer carril un ARN intacto.

Para determinar la cantidad de ARN inicial cuando este se resuspende en 150  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas. Se toma una alícuota de 40  $\mu\text{L}$  y se diluye en 500  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5. Se trasfiere a una celda de 1  $\text{cm}^3$ . Se determina la  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  en el espectrómetro calibrándolo previamente con Tris-HCl, pH 7.5 como blanco. La cantidad de ARN se calcula usando la siguiente fórmula:

Ejemplo:

Sea:  $\text{OD}_{260\text{nm}} = 0.188$ ; Factor de dilución  $500/40 = 12.5$ ; Vol. total de la muestra = 0.15 mL. Entonces:

Total ARN ( $\mu\text{g}$ ) =  $0.188 \times [40\mu\text{g} / (1 \text{OD}_{260\text{nm}} \times 1\text{mL})] \times 12.5 \times 0.15 = 14.1\mu\text{g}$  (Invitrogen, 2010).

En el presente trabajo se determinó la concentración de ARN mediante el sistema de retención de muestras de Nanodrop 2000c, el cual tiene como fundamento lo descrito anteriormente, usando la tensión superficial de los líquidos para mantener y medir muestras entre dos pedestales ópticos sin el uso de cubetas o capilares. Se coloca 1  $\mu\text{L}$  de muestra en la superficie óptica inferior, el cual es unido por tensión superficial con el otro pedestal formando una columna óptica vertical. Debido a que la altura de esta



columna es muy corta permite cuantificar ácidos nucleicos sin la necesidad de hacer diluciones (Desjardins y Conklin, 2010).

### **6.8.1 Determinación de la pureza de ácidos nucleicos**

La relación entre absorbancias a las longitudes de onda mencionadas anteriormente da una estimación en la pureza de los ácidos nucleicos (López A, 2010).

El cociente  $A_{260}/A_{280}$  debe estar próximo a 1.8 (ADN) y 2.0 (ARN) si están libres de impurezas. Cocientes menores se debe a contaminación por proteínas, fenol o materiales insolubles.

El cociente  $A_{260}/A_{230}$  debe ser mayor que 2 y menor que 2.4 tanto para ADN y ARN. Cocientes menores se deben a contaminaciones de una sal de guanidina o por beta-mercaptoetanol.

## **6.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR Fue inventada por Kary Mullis a mediados de los años 80, y consiste en la amplificación de un fragmento de ADN flanqueado por dos primers mediante una serie de ciclos, basándose en el proceso de replicación del ADN y el uso de ADN polimerasas. Los componentes de la PCR son (Cortázar y Silva, 2004): nucleótidos, ADN molde, primers, enzima Polimerasa, concentración de  $Mg^{+2}$ , un buffer para PCR, concentraciones de NaCl o KCl, gelatina o albumina bovina y detergentes iónicos.

### **6.9.1 Nucleótidos**

Se diluyen en una solución amortiguadora<sup>11</sup> ya que un pH ácido promoverá la hidrólisis del dNTP en dNDP y dNMP. Los stocks son diluidos a 10 mM, alicuotados y

---

<sup>11</sup> Solución amortiguadora stock 10mM de Tris a pH 7.7-8.0, concentración final.



almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Es recomendado usar un stock de trabajo que contenga  $1\text{ mM}$  de cada dNTP.

Concentraciones entre  $20$  y  $200\text{ }\mu\text{M}$  resultan en un balance óptimo entre rendimiento, especificidad y fidelidad. Por ejemplo,  $20\text{ }\mu\text{M}$  de cada dNTP en una reacción de  $100\text{ }\mu\text{L}$  es suficiente para sintetizar  $2.6\text{ }\mu\text{g}$  de DNA o  $100\text{ pM}$  de una secuencia de  $400\text{ pb}$  (Cortázar y Silva, 2004).

## **6.9.2 ADN molde**

El criterio esencial es que la muestra contenga al menos una cadena de ADN intacta que abarque la región que va a ser amplificada (Cortázar y Silva, 2004).

## **6.9.3 Primers**

### **6.9.3.1 Diseño de primers**

Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN. La selección de oligonucleótidos iniciadores es muy importante en la reacción en cadena de la polimerasa. En la tabla 7 se muestran los criterios principales a considerar para la selección adecuada de los primers (Cortázar y Silva, 2004). Un residuo de G o de C en el extremo  $3'$  de los primers ayuda a asegurar el correcto enlace en el extremo terminal  $3'$ . La temperatura de asociación de los primers es uno de los factores más determinantes de la reacción. La secuencia de los primers debe ser elegida de tal forma que no haya regiones de poliG o de poliC que pueden promover el reconocimiento no específico. Los primers necesitan ser diseñados con menos de 3 pares de bases de homología entre ellos para evitar autocomplementariedad. La especificidad de los primers es en parte dependiente de su longitud. Los primers deben ser elegidos de modo que tengan una secuencia única dentro del DNA que será amplificado (Cortázar y Silva, 2004).



Tabla 7. Criterios principales para el diseño de primers.

<b>Tamaño</b>	Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud generalmente: 18-30 nucleótidos de longitud
<b>Base en el extremo 3'</b>	Debe ser una G o una C
<b>Temperaturas de fusión (Tm)</b>	50-65 °C
<b>contenido GC</b>	40-60%
<b>auto-complementariedad</b>	Debe ser evitada Para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de primer
<b>Similaridad</b>	Debe tener un 100% de apareamiento con el molde

Las concentraciones óptimas de los primers son generalmente entre 0.1 y 0.5  $\mu$ M.

Existen muchos métodos para estimar el valor de la temperatura de fusión. Para secuencias de 20 pb o menos, existen las siguientes aproximaciones:

(1)  $T_m = 2^{\circ}\text{C} (A + T) + 4^{\circ}\text{C} (G + C)$ ; con una concentración de sal 0.9 M.

(2)  $T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 500/L + 16.6 \log [M]$ ; donde L= longitud oligo., y [M]=concentración de cationes monovalentes.

En RT-PCR cuando se usa como método de detección SYBR<sup>®</sup> Green se deben diseñar primers que se extiendan como un puente sobre un intrón y/o flanquee a un intrón (Eurogentec, 2013).

Existen programas disponibles en la red que ayudan al diseño de primers. El programa **Primer 3 v0.4.0** se utilizó como herramienta para el diseño de primers para ADN y ARN. Primer 3 funciona pegando la secuencia la cual se quiere amplificar y se seleccionan los parámetros que mejor convengan para el diseño de primers. Primer 3 da una serie de opciones de pares de primers que se ajustan a los parámetros establecidos. <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

Para verificar la eficiencia de amplificación del par de primers que genera Primer 3 se utiliza otra herramienta en línea que permite predecir la eficiencia de amplificación (**PCR efficiency Calculator**). Es importante que el valor que nos indique el programa sea  $>2$  para que sean aceptados los primers. En PCR en tiempo real un criterio que debe cumplirse es que la eficiencia de amplificación debe estar entre 90-100% cuando se usa el método  $\Delta\Delta C_t$ , ya que usa fórmulas matemáticas para normalizar y calcular las concentraciones de las muestras con el gen endógeno. Además los amplicones no deben



ser muy grandes, siendo estos alrededor de 100 pb. En general se pueden generar primers que generen amplicones de entre 100-300pb dependiendo su uso. Amplicones muy grandes disminuyen la eficiencia de amplificación.

Cuando no se sabe la secuencia del gen que se quiere amplificar del microorganismo en estudio se puede usar la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con algún gen de otros organismos que tenga gran similitud con el gen que se desea clonar o amplificar. Existen bases de datos en línea como NCBI, EBI, Esembl, OMIM, ACT (Artemis Comparison Tool), etc. que tienen la herramienta BLAST. Cuando se obtienen las secuencias, se seleccionan las que tengan mayor similitud, se guardan en un tipo de formato FASTA y con ayuda de un programa como **MEGA 5.2** (software libre), Lasergene 7, etc. se alinean las secuencias para seleccionar sitios conservados de estas y así poder diseñar primers degenerados que permitan la amplificación del gen de interés en el microorganismo en estudio.

Los primers degenerados son primers que tienen un número de opciones en varias posiciones en la secuencia para permitir el alineamiento y la amplificación de una variedad de secuencias relacionadas (Cortázar y Silva, 2004). Por ejemplo:

5'-TCG AAT TCI CCY AAY TGR CCN T-3'

Donde: Y = pirimidina = C / T (degeneración = 2X)

R = purina = A / G (degeneración = 2X)

I = inosina

N = nucleótido = C / G / A / T (degeneración = 4X)

#### **6.9.4 Enzimas polimerasas**

Cuando se optimiza un PCR, se recomienda probar rangos de concentración de enzima de 0.5 a 5 unidades/100µl. Si la concentración de la enzima es muy alta se acumulan productos no específicos, y si es muy baja se formará una cantidad insuficiente del producto deseado. En la tabla 8 se muestran algunas características importantes en la selección de enzimas para PCR (Cortázar y Silva, 2004).



Tabla 8. Características de algunas polimerasas termoestables de DNA. a es el porcentaje de conversión de templado a producto por ciclo, b es la frecuencia de error por pares de bases incorporadas, c es el número promedio de nucleótidos adicionados antes de la disociación y d es el número promedio de nucleótidos adicionados por segundo. n.d. = no determinado.

Enzima	Eficiencia Relativa <sup>a</sup>	Tasa de error <sup>b</sup>	Procesividad <sup>c</sup>	Tasa de Extensión <sup>d</sup>	3' a 5' exo	5' a 3' exo
<i>Taq</i> Pol	88	$2 \times 10^{-4}$	55	75	no	si
<i>Tli</i> Pol (Vent)	70	$4 \times 10^{-5}$	7	67	si	no
<i>Pfu</i> Pol	60	$7 \times 10^{-7}$	n.d.	n.d.	si	no
<i>Ruth</i>	n.d.	n.d.	30	60	no	si

### 6.9.5 Composición del buffer de PCR y cómo afecta a la misma

El buffer recomendado para PCR es de 10-50 mM de Tris-HCl (pH entre 8.3-8.8). El Tris es un buffer iónico bipolar que tiene un pKa de 8.3 a 20°C. Sin embargo el verdadero pH de una buffer 20 mM de Tris (pH 8.3 a 20 °C) varía entre 7.8 y 6.0 durante las condiciones típicas del termociclador (Cortázar y Silva, 2004).

La enzima *Taq* polimerasa requiere magnesio libre en la unión con el templado, los primers y los dNTPs. Los PCR deben contener 0.5 a 2.5 mM de  $Mg^{2+}$  sobre el total de la concentración de dNTP. La presencia de EDTA u otros quelantes en el stock del primer o del templado puede alterar la concentración óptima aparente de  $Mg^{2+}$  (Cortázar y Silva, 2004).

El buffer recomendado para PCR es de 10-50 mM de Tris-HCl (pH entre 8.3 -8.8). El Tris es un buffer iónico bipolar que tiene un pKa de 8.3 a 20°C. Sin embargo el verdadero pH de una buffer 20 mM de Tris (pH 8.3 a 20°C) varía entre 7.8 y 6.0 durante las condiciones típicas del termociclador (Cortázar y Silva, 2004).

Hasta 50 mM de KCl puede ser incluido en la mezcla de reacción para facilitar el alineamiento de los primers. NaCl a 50 mM o KCl arriba de 50 mM inhibe la actividad de la *Taq* polimerasa (Cortázar y Silva, 2004).

La gelatina o la albúmina bovina (100 µg/ml) y detergentes no iónicos como el tween 20 o laureth 12 (0.05 a 0.1%) pueden ser incluidos para ayudar a estabilizar la enzima, sin embargo muchos protocolos trabajan bien sin estos componentes (Cortázar y Silva, 2004).



### 6.9.5.1 Inhibidores de la PCR

Los inhibidores de la PCR son contaminantes orgánicos e inorgánicos incluidos en la muestra de ADN que interfieren atenuando o inhibiendo completamente la reacción de amplificación por PCR. Debido a que muchos de ellos exhiben una solubilidad similar al ADN no son removidos eficientemente durante el proceso de extracción Fenol-Cloroformo. Los inhibidores pueden actuar directamente inhibiendo la acción de la *Taq* polimerasa o como en el caso de las proteínas y carbohidratos pueden unirse los iones de magnesio no dejándolos disponibles para la polimerasa. Afortunadamente, existe una amplia gama de métodos y Kits comerciales que permiten deshacerse de los distintos inhibidores de la PCR. Algunos inhibidores de la PCR se muestran en la tabla 9 (Moreira, 1998).

Tabla 9. Inhibidores de la PCR. Los compuestos que comúnmente se presentan en la purificación del ADN pueden inhibir a la PCR (Cortázar A. y Silva E., 2004).

Compuesto	Conc. de inhibición
SDS	>0.005%
Fenol	>0.2%
Etanol	>1%
Acetato de sodio	>5mM
NaCl	>25mM
EDTA	>0.5mM
Hemoglobina	>1GM/ml
Heparina	>0.15 Ui/ml
Urea	>20mM
Mezcla de reacción	>15%

### 6.9.6 Condiciones típicas de la PCR

Todos los protocolos de PCR están determinados con base a la actividad de las polimerasas empleadas, diseño de primers y a los fragmentos que se quieren amplificar. Esto a su vez es considerado en el diseño experimental por lo que puede tomarse los siguientes parámetros de operación como punto de partida:

1. Desnaturalización; 95°C, 30 seg o 97°C 15 seg.
2. Hibridación; 5°C por debajo de la  $T_m$  de los primers.



3. Extensión; 72°C, 1min.
4. Ciclos 2<sup>n</sup>; donde n es igual al número de ciclos, que como máximo es de en torno a 35.

## 6.10 RT-PCR

En la técnica de RT-PCR el ARN mensajero es copiado a ADN complementario por la transcriptasa reversa usando primers selectivos o dTs. Se adiciona una mezcla de PCR que incluya una polimerasa termoestable, los primers específicos para el gen de interés, los desoxinucleótidos y un buffer conveniente (Cortázar y Silva, 2004). Los pasos de la RT-PCR son:

1. Transcripción reversa: Unión del primer a la secuencia de ARN objetivo.
2. Transcripción reversa: La polimerasa *rTth* cataliza la extensión del primer mediante la incorporación de nucleótidos complementarios.
3. Fin de transcripción reversa, se obtiene la hebra del cDNA complementario al ARN.
4. PCR.

El ADN complementario llamado cDNA es estable al calor y puede resistir las condiciones de la metodología PCR (Cortázar y Silva, 2004). El cDNA se desnaturaliza a más de 90°C (~94°C), las dos hebras se separan. A 50 o 60°C los primers específicos se alinean con el sitio complementario en cada cadena. Los sitios de unión a los primers deben estar separados 400 bases, pero generalmente se encuentran a 100 bases de distancia especialmente cuando se usa el PCR en tiempo real. A 72°C la polimerasa extiende el ADN desde los primers. Se obtienen 4 cadenas de cDNA.

Después de 30 o 40 ciclos de síntesis de cDNA, los productos de reacción son analizados usualmente por electroforesis en gel de agarosa. Los geles de agarosa para analizar los productos de cDNA de la RT-PCR no permiten hacer un análisis cuantitativo ya que el bromuro de etidio es muy insensible y cuando una banda es perceptible sobrepasa la etapa logarítmica de amplificación.



Para poder hacerse un análisis semicuantitativo con RT-PCR debe estandarizarse la técnica de PCR para poderse comparar la expresión génica. La estandarización consiste en encontrar las condiciones óptimas de amplificación del gen problema y el gen de expresión constitutiva con el cual se van a normalizar las muestras (gen 18S o *gpd* por ejemplo). Pero a menudo presenta baja reproducibilidad (Cortázar y Silva, 2004; Rodríguez y Rodríguez, 2006).

En el presente trabajo las condiciones iniciales en esta técnica fueron:

Tabla 10. Condiciones de termociclado RT-PCR.

Ciclos	Proceso	Temperatura	Tiempo
1	Transcripción reversa	50°C	30´
1	Activación PCR	95°C	15´
35	Desnaturalización	94°C	30´´
	Hibridación (Tm)	55°C	45´´
	Polimerización	72°C	1´
1	Polimerización	72°C	10´

### 6.10.1 Comprobación de ARN libre de ADN

Fue necesario comprobar que el ARN estuviera libre de ADN para realizar el análisis de RT-PCR de las cepas con los fondos genéticos de los genes *laeA* y *aga1*. Se verificó en un gel de agarosa la integridad y pureza del ARN, y a continuación se realizó una RT-PCR usando ARN como molde y primers diseñados para unirse en un intrón del gen *gpd*. Como el ARN no contiene intrones, si se produce amplificación nos está indicando la presencia de ADN contaminante. Se utilizó el kit Taq PCR Master Mix de la marca QIAGEN®. Las condiciones de termociclado fueron las siguientes:



Tabla 11. Condiciones de termociclado para comprobación de ARN libre de ADN.

Ciclos	Proceso	Temperatura	Tiempo
1	desnaturalización	95°C	5'
30	Desnaturalización	95°C	30''
	Hibridación (Tm)	59.1°C	45''
	Polimerización	72°C	1'20''
1	Polimerización	72°C	8'

## 6.11 RT-qPCR en tiempo real o PCR cuantitativa

### 6.11.1 Fundamento

La PCR en tiempo real permite cuantificar reacciones de amplificación a medida que ocurre la reacción. Hay varias maneras de realizar las reacciones de PCR en tiempo real, pero el procedimiento básico implica el uso de termocicladores especializados que utilizan un rayo láser que escanea la parte inferior de cada tubo de PCR. Cada tubo de reacción contiene una sonda marcada con fluorocromo o un colorante que se une al ADN y emite luz fluorescente cuando es iluminado por el láser. La luz emitida por estos colorantes se correlaciona con la cantidad de producto amplificado por la PCR. Un detector captura la luz y suministra la información a un computador que proporciona la lectura sobre la cantidad de fluorescencia que hay después de cada ciclo, la cual se puede graficar y analizar para cuantificar la cantidad de productos de la PCR producidos después de cada ciclo (Rodríguez y Rodríguez, 2006).

Para que la PCR en tiempo real sea un método de cuantificación necesita tener las siguientes características básicas (Life technologies, 2012):

- ❖ Específico: La especificidad está dada por los primers y sonda que reconoce un sitio específico de secuencia.
- ❖ Exacto: Veracidad del valor medido en una muestra.
- ❖ Preciso: Presentar poca dispersión en los datos obtenidos, es decir, ser reproducible, "muestras de igual concentración darán siempre el mismo valor".



- ❖ **Sensible:** una sola molécula de ADN puede ser detectada por PCR en tiempo real. La señal fluorescente obtenida es significativamente mayor al ruido de fondo o background.
- ❖ **Amplio rango dinámico:** Amplio rango de cantidades en la que el blanco puede ser medido con exactitud y precisión.

Al observar el proceso de amplificación se distinguen tres fases: geométrica, lineal y estacionaria (ver figura 18) (Life technologies, 2012):

- ❖ **Fase Geométrica:** Durante esta fase todos los reactivos de la reacción se encuentran en abundancia; en esta etapa la eficiencia de amplificación bajo las condiciones experimentales es muy cercana al 100%, en esta fase la eficiencia de amplificación tiene un comportamiento  $2^n$ .
- ❖ **Fase Lineal:** los primers, dNTP's y/o la enzima comienzan a ser factores limitantes además de la generación de pirofosfato y decaimiento de la actividad enzimática que afecta la eficiencia de amplificación de manera constante, por lo que no es posible llevar a cabo un ensayo cuantitativo en esta parte.
- ❖ **Fase Estacionaria o Plateau:** en este punto se detiene la amplificación, la cantidad de producto obtenida es constante sin importar cuantos ciclos más se prolongue la reacción.

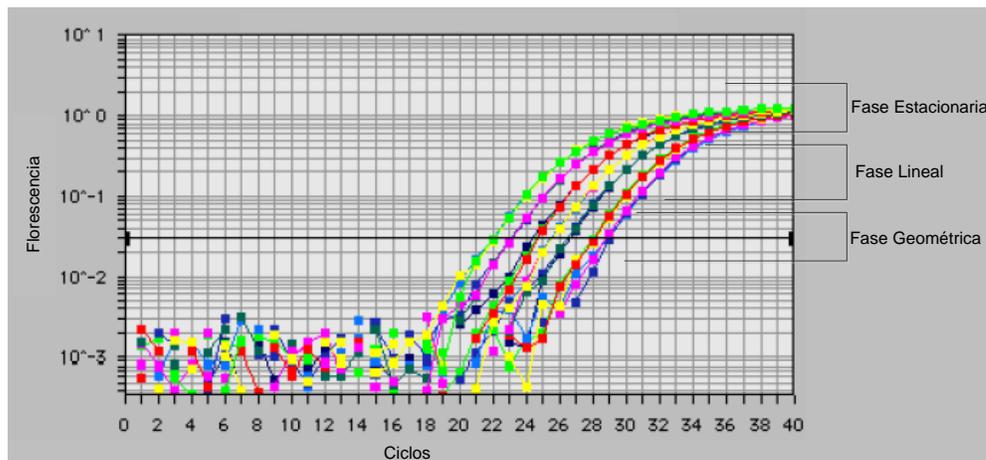


Figura 18. Fases de reacción de la PCR. Se observa la fase geométrica, que nos da una línea recta en la escala logarítmica, donde la eficiencia de amplificación es cercana al 100%, la fase lineal donde se va perdiendo la eficiencia, y la fase estacionaria donde se detiene la amplificación (Life technologies, 2012).

Utilizando la técnica de qPCR es posible calcular la concentración inicial de templado incluso en muestras que analizadas por PCR de punto final aparentan tener la misma concentración (ver figura 19A). De igual forma mediante qPCR se pueden



discriminar con precisión muestras que en PCR de punto final se observan de igual concentración, pero que al analizar la región geométrica de la reacción se ve indiscutiblemente de la misma concentración (Figura 19B) (Life technologies, 2012).

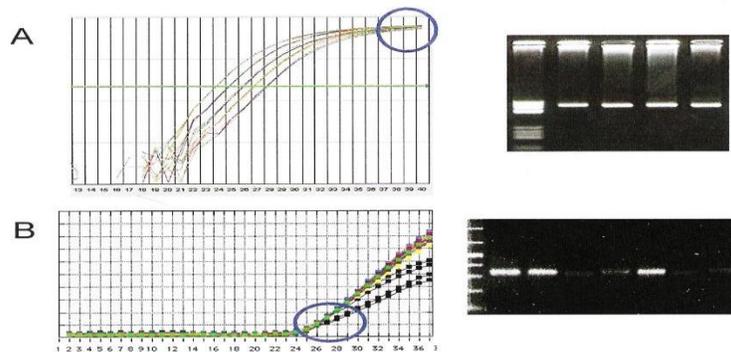


Figura 19. Comparación en la precisión en cuantificación lograda por qPCR y PCR de punto final. A) Muestras de concentración inicial diferente alcanzan la misma cantidad de producto amplificado en la fase estacionaria (circulo azul), por lo que al analizarse en el gel de agarosa se ven de la misma concentración. B) En el caso opuesto, muestras que en la fase geométrica (circulo azul) se ven de igual concentración, en el gel de agarosa aparentan ser de diferente concentración (Life technologies, 2012).

### 6.11.2 Métodos de detección

Dos de los métodos que más se utilizan en tiempo real implican el uso de un colorante llamado SYBR<sup>®</sup> Green y sondas TaqMan<sup>®</sup>.

#### 6.11.2.1 SYBR<sup>®</sup> Green

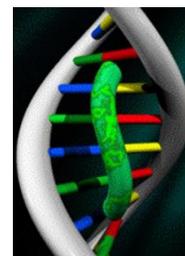
SYBR<sup>®</sup> Green es un colorante no específico que se une a cualquier molécula de doble cadena que encuentre como en la figura 20, y a medida que lo hace aumenta proporcionalmente la cantidad de luz fluorescente. SYBR<sup>®</sup> Green emite fluorescencia a una longitud de onda de 520 nm y puede ser relacionada con la cantidad de muestra de ADN o ARN que se tiene.

El inconveniente de esta técnica es que SYBR<sup>®</sup> Green se une a cualquier ADN de doble cadena amplificado. En consecuencia, los dímeros de primers o productos inespecíficos introducen un error en la cuantificación. Sin embargo, es posible comprobar



la especificidad del sistema mediante la ejecución de una curva de disociación (curvas *melting*) al final de la corrida de PCR donde se incrementa la temperatura gradualmente hasta los 96°C registrando la intensidad de fluorescencia durante este proceso (Rodríguez y Rodríguez, 2006; Life technologies, 2012).

Figura 20. Colorante SYBR® Green unido al ADN de doble cadena. SYBR® Green es un colorante no específico que se une a dímeros de primers y ADN de doble cadena por lo que se debe hacer un buen diseño de primers y evitar contaminaciones por ADN genómico cuando se hacen ensayos de análisis de expresión génica.



Al incrementar la temperatura, las cadenas de ADN se desnaturalizan gradualmente, disminuyendo la intensidad de fluorescencia registrada, al llegar a la  $T_m$  del amplicón, la velocidad de disociación se incrementa drásticamente dado que el 50% del producto de amplificación se encuentra desnaturalizado, la curva de disociación presentara un punto de inflexión a esta temperatura como se muestra en la figura 21. El principio es que cada producto tiene una temperatura de disociación diferente dependiendo del tamaño y contenido de bases. Para validar los ensayos con SYBR® Green se debe producir un único y bien definido pico en las curvas *melting* (Life technologies, 2012).

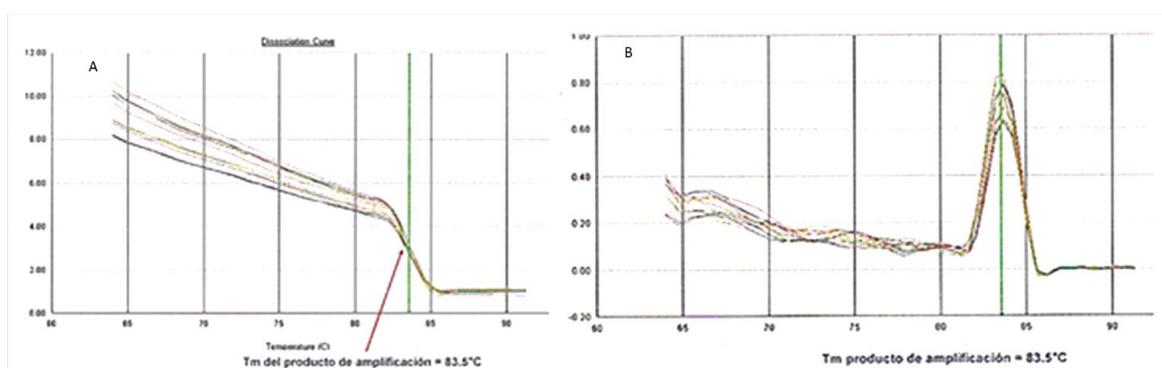


Figura 21. Curvas de disociación. También conocida como curva *melt*. En ambos gráficos se muestra el punto de inflexión cuando el producto de amplificación llega a su  $T_m$ . El eje de las X representa la temperatura y el eje Y la fluorescencia. Aplicando la derivada negativa ( $dF/dT$ ) resulta un pico que corresponde precisamente a la  $T_m$  del producto de amplificación (grafico B). Picos antes del producto específico normalmente son dímeros de primers. Dos picos distintos co-amplificados indican la presencia de ADN genómico y ADN complementario (cDNA) o a productos no específicos (Life technologies, 2012).



En el presente trabajo se utilizó SYBR<sup>®</sup> Green como método de detección para los ensayos de análisis de expresión de los genes *cefD1* y *cefG* de la ruta de biosíntesis de CPC.

Para validar el amplicón que se estaba formando experimentalmente en el RT-qPCR se realizó un ensayo *in silico* mediante HRM (*high resolution melting*) con el software en línea **POLAND**, el cual predice la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de ARN de doble cadena, ADN o productos de amplificación (Poland, 2013). Las principales aplicaciones de HRM incluyen el escaneo de genes (búsqueda de la presencia de variantes desconocidas en amplicones de PCR), SNP genotipificación, análisis de la metilación del ADN, mapeo de ADN y huellas dactilares de ADN (fingerprinting) (Eurogentec, 2013).

#### 6.11.2.2 Sondas TaqMan<sup>®</sup>

Las sondas TaqMan<sup>®</sup> son sondas complementarias a regiones específicas del ADN diana situadas entre las posiciones donde se unen los primers directo y reverso para la PCR. Las sondas TaqMan<sup>®</sup> contienen un fluoróforo reportero localizado en el extremo 5' de la sonda que emite luz fluorescente cuando el rayo de láser lo excita. En el extremo 3' de la sonda se encuentra el *quencher*, que es un inhibidor de la fluorescencia emitida por el fluoróforo. Cuando el fluoróforo y el *quencher* están cerca uno del otro, el *quencher* interfiere con la luz fluorescente emitida por el fluoróforo vía FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). A menudo el par FRET es el fluoróforo FAM y el *quencher* TAMRA. En un buen diseño de una sonda TaqMan<sup>®</sup>, FAM no emite fluorescencia a medida que pasa su energía a TAMRA. Como la fluorescencia de TAMRA es detectada a una longitud de onda diferente (aprox. 580 nm) a la de FAM (aprox. 520 nm) el nivel de fondo de FAM es bajo (nivel background). Cuando la Taq ADN polimerasa extiende un primer para sintetizar una cadena de ADN separa el fluorocromo de la sonda debido a su actividad exonucleasa 5'-3' intrínseca permitiendo que emita fluorescencia. Cada ciclo de PCR subsiguiente libera más moléculas de fluorocromo, de modo que un computador puede capturar más luz emitida para producir una lectura de intensidad de fluorescencia de cada ciclo como se muestra en la figura 22 (Thieman, 2010; Life technologies, 2012; Eurogentec, 2013).

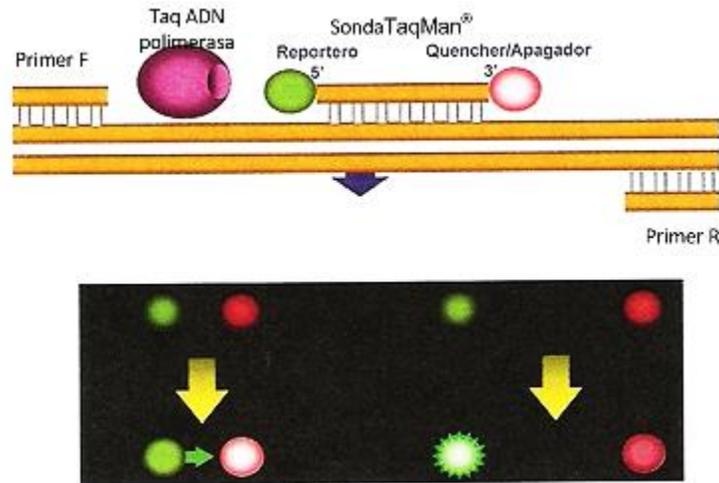


Figura 22. Detección de la amplificación del ADN por sondas TaqMan<sup>®</sup> y principio FRET (Life technologies, 2012).

### 6.11.3 Referencia pasiva ROX (5-carboxi-x-rodolina succidimidil éster)

ROX es un colorante fluorescente que se utiliza como una referencia pasiva para algunos termocicladores (Eppendorf, ABI Prism<sup>®</sup>, Stratagene, StepOnePlus<sup>™</sup>). Este colorante por lo general se adiciona en la mezcla maestra y la fluorescencia reportada es normaliza a la señal de ROX.

La señal reportada normalizada llamada Rn se calcula dividiendo la señal de fluorescencia reportada por la señal de ROX. Esta señal corrige errores de pipeteo, variación en el volumen de la muestra, las burbujas en la muestra, etc. Cuando se requiere corregir las variaciones de fondo (background), se utiliza el  $\Delta Rn$  (normalización contra el ruido de fondo). El  $\Delta Rn$  se calcula restando la línea de base normalizada de la señal reportada normalizada.

$\Delta Rn = Rn - Bn$  donde:

$$Rn = (\text{señal reportada} / \text{señal de referencia pasiva ROX})$$

$$Bn = (\text{señal de base (baseline)} / \text{señal de referencia pasiva ROX})$$

Una variación menor en la referencia pasiva ROX causará un cambio en el flujo de Rn, Bn,  $\Delta Rn$ , umbral de detección de fluorescencia (threshold) y el valor Ct. Por lo cual se recomienda el uso de mezclas maestras que contengan referencia pasiva ROX.



#### 6.11.4 Consideraciones generales para ensayos de RT-qPCR

Se ha descrito que el diseño de primers es uno de los puntos importantes para un buen ensayo de PCR y por lo tanto también lo es para RT-qPCR.

Es conveniente diseñar primers que se extiendan como un puente sobre un intrón y/o flanqueen a un intrón (Eurogentec, 2013). Para primers que se extienden sobre un intrón, la primera mitad del primer debe hibridar al final del primer exón y la otra mitad al inicio del segundo exón como se ve en la figura 23. Con esta estrategia se evita que se amplifique el ADN genómico que pueda estar contaminado en las muestras de ARN a analizar.

Para primers que flanquean a un intrón, cada primer deberá estar en un exón para que pueda determinarse por diferencias de bases en un gel de agarosa la posible contaminación por ADN genómico, o mediante análisis de curvas de disociación *melting*.

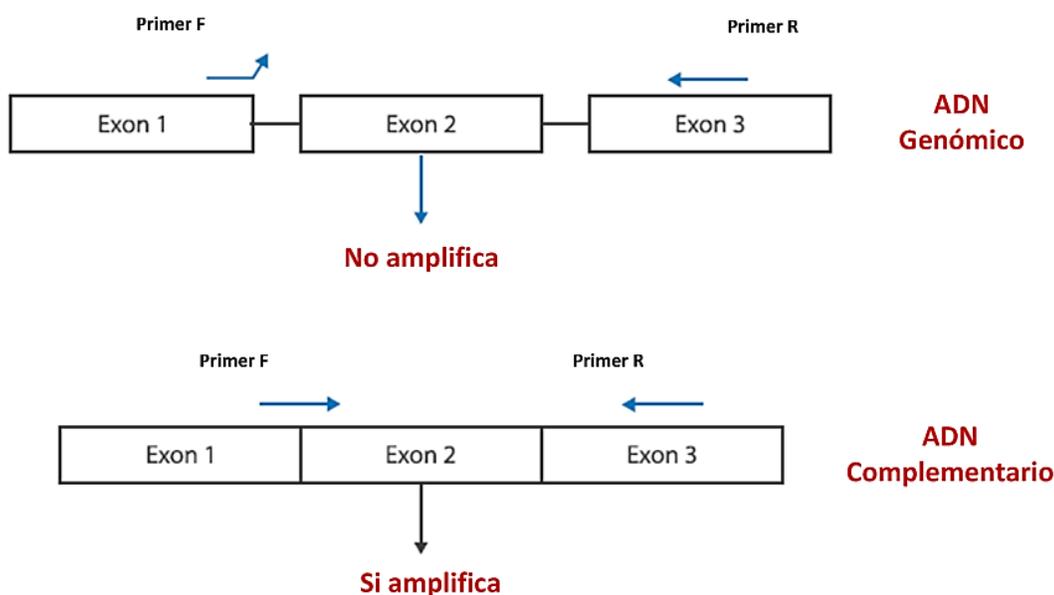


Figura 23. Estrategia de diseño de primers para ARN (Eurogentec, 2013).



Existen otras consideraciones que debe tomarse en cuenta, las cuales se describen a continuación (Eurogentec, 2013):

1. Temperatura de la transcripción reversa: entre 46-50°C.
2. Temperatura de hibridación: 58-62°C.
3. Cantidad de ARN para las muestras: 0.01- 10ng.
4. Cantidad de ARN para curva estándar: <500ng.
5. Amplicones <150pb, la eficiencia disminuye si son mayores.
6. Hacer una buena extracción de ARN.
7. Cuantificar la concentración: Importante que esté íntegro el ARN para tomar lecturas verdaderas.
8. Checar la integridad: antes de cuantificar y después del tratamiento con DNasa.
9. Tratamiento con DNasa (si es requerido).
10. Estandarizar concentración de ARN (stock).
11. Las diluciones de ARN se hacen en fresco, nunca se debe congelar/descongelar las diluciones. Se deben hacer diluciones seriales para evitar variaciones.
12. Descongelar el stock de ARN en hielo y no por choque térmico.
13. Mantener siempre en hielo las muestras, diluciones y la mezcla de reacción.
14. Usar primers específicos para RT-qPCR en un solo paso.
15. Concentración final de primers: 100-300 nM para SYBR<sup>®</sup> y 100-900 nM para sondas Taqman.
16. Volúmenes finales de reacción de 10-25 µL.
17. Usar un gen *housekeeping* (gen de expresión constitutiva) para normalizar la expresión del gen problema: puede ser el *18S*, *28S*, *ACTB*, *GAPD* (*gpd*), *UBC*, *B2M*, etc. Debe tener una expresión constante en todas las condiciones.
18. Usar controles negativos (NTC: mezcla de reacción sin ARN) y positivos (mezcla de reacción sin enzima)
19. Usar la referencia pasiva ROX para ensayos cuantitativos.
20. Tomar en cuenta las consideraciones del apartado “Consideraciones generales en el manejo del ARN” del presente trabajo.



### 6.11.5 Métodos de análisis de RT-qPCR

Existen dos métodos de análisis de datos en un ensayo de RT-qPCR:

1. Análisis de datos mediante curva estándar.
2. Análisis de datos mediante  $\Delta\Delta C_t$ .

En el presente trabajo los datos se analizarán mediante curva estándar, la cual nos permite interpolar las concentraciones problema de ARN en dos curvas estándar, una para el gen problema (*cefD1* o *cefG*) y otra para un gen endógeno o calibrador (*gpd*) con la finalidad de normalizar los datos y finalmente obtener la expresión relativa. La desventaja que tiene este método es que en cada ensayo se deben meter las dos curvas estándar para que puedan analizarse los datos lo cual lleva más gasto de reactivos y tiempo, sin embargo, la ventaja que tiene es que puede dar resultados aceptables (de alta precisión) si la RT-qPCR no ha sido optimizada, esto es cuando la eficiencia de amplificación no está entre 90-110% y las pendientes de las dos curvas estándar no están en -3.3 con variación de  $\pm 10\%$ . Estos criterios son importantes ya que garantizan una buena amplificación de los genes tratados.

Las variaciones en los dos parámetros antes mencionados puede deberse a diversas variaciones como son:

1. Errores de pipeteo y pipetas descalibradas.
2. Calidad de templado (ADN o ARN extraído).
3. Mal diseño de primers ( $T_m$ 's, estructuras secundarias).
4. Concentraciones de primers no adecuadas.
5. Condiciones de termociclado.
6. Tamaño del amplicón (a menor tamaño mayor eficiencia).
7. Concentración de reactivos.

Una pendiente  $> -3.32$  por ejemplo puede deberse a la formación de estructuras secundarias y/o a un mal diseño de primers.

En el caso de análisis por  $\Delta\Delta C_t$  los cálculos de la expresión relativa se realiza mediante cálculos matemáticos aritméticos de las dos curvas estándar, pero implica que el gen blanco y el control endógeno tengan eficiencias de amplificación del 100% ( $\pm 10$ ). Es



muy importante validar las ampliaciones antes de comenzar a cuantificar muestras reales.

La ventaja que tiene es que una vez validada la amplificación no se requieren más curvas estándar en cada ensayo, lo cual implica ahorro de reactivos, tiempo y espacio dentro de la placa de reacción. Es útil se quieren cuantificar muchos genes blanco de forma simultánea.

Los resultados se obtienen empleando la siguiente fórmula: (Kenneth J., 2001)

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

En los ensayos de expresión relativa que se llevaron a cabo en este trabajo se consideró a la cepa WT (silvestre) como calibrador o muestra de referencia, a las cepas G42R y G203R como muestras problema, se usó como control endógeno (*housekeeping*) el gen *gpd*, y los genes blanco (*target*) fueron *cefG* y *cefD1*. Se realizaron dos curvas estándar por cada experimento o plato de reacción, una para un gen blanco y otra para el gen endógeno, con el fin de interpolar y normalizar los resultados obtenidos en el ensayo. Para hacer las curvas estándar se utilizó el ARN de la cepa WT y se hicieron diluciones seriadas 10x (1:10). Un Ct es el ciclo en el cual una muestra consigue llegar al umbral de detección (Threshold). En la figura 24 se muestran los detalles (Eurogentec, 2013).

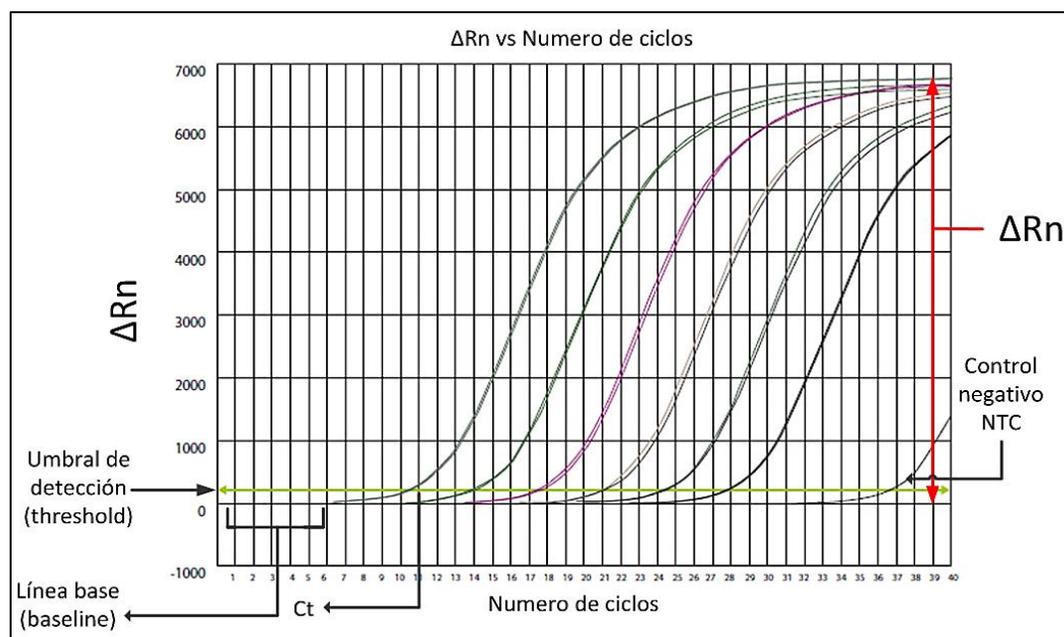


Figura 24. Gráfica de amplificación de diluciones seriadas 10x usando SYBR<sup>®</sup>. El eje vertical representa la cantidad de fluorescencia normalizada, y el eje horizontal el número de ciclos. La *Baseline* o línea base se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia, y sólo se detecta la fluorescencia



basal. *Threshold* es el umbral en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia, y el corte entre el *Threshold* y la curva de amplificación determina el Ct o ciclo umbral que se emplea para la cuantificación. El cálculo del Ct siempre se realiza en la fase exponencial de la curva. El control negativo NTC amplifica después del ciclo 30 debido a que en ese tiempo es posible que se hayan formado dímeros de primers. Diluciones seriadas 10x (1:10) dan  $\Delta$ Cts cada 3.2 ciclos entre dilución y dilución. (Eurogentec, 2013).

### 6.11.6 Condiciones de termociclado y mezcla de reacción

Se utilizó el equipo de detección de tiempo real StepOnePlus™ de life technologies. Las condiciones de termociclado iniciales fueron las que se indican en la tabla 12:

Tabla 12. Condiciones de termociclado RT-qPCR.

Ciclos	Proceso	Temperatura	Tiempo
1	Transcripción reversa (RT)	50°C	5'
	Activación PCR	95°C	2'
40	Desnaturalización	94°C	15''
	Hibridación (Tm)	60°C	30''
1	Curva <i>melting</i>	95°C	15''
		60°C	15''
		95°C	15''

Se usó el *kit* comercial One-Step® SYBR® de Invitrogen™ para RT-qPCR. La mezcla de reacción fue la indicada en la tabla 13:

Tabla 13. Mezcla de reacción RT-qPCR. Se hace una mezcla maestra de los componentes en común dependiendo del número de reacciones que se van a hacer considerando el error experimental. Al final se agrega el ARN.

Componente	Vol. para 20 µL de rxn
SuperMix Universal	10 µL
ROX	0.4 µL
Super script	0.5 µL
H <sub>2</sub> O inyectable	3.7 µL
Primer F 10 µM (concentración final 100 nM)	0.2 µL
Primer R 10 µM (concentración final 100 nM)	0.2 µL
ARN ( 0.1 ng/µL equivalente a 0.5 ng de ARN)	5 µL



### 6.11.7 Diseño experimental

Se preparó una mezcla maestra para 100 reacciones de las cuales 42+42 fueron para el gen problema y el gen endógeno, 3+3 para los controles sin ARN (NTC) y el resto se repartió 5+5 considerando el error por pipeteo. Se consideraron 42 reacciones de acuerdo al siguiente diseño experimental:

Tabla 14. Diseño experimental de RT-qPCR.

Muestra	Replicas Biológicas	Replicas técnicas
Muestra de <b>referencia WT</b> para gen problema ( <i>cefD1</i> )	3	3
Muestra problema <b>G42R</b> para gen problema ( <i>cefD1</i> )	3	3
Muestra problema <b>G203R</b> para gen problema ( <i>cefD1</i> )	3	3
Muestra de referencia <b>WT</b> para gen endógeno ( <i>gpd</i> )	3	3
Muestra problema <b>G42R</b> para gen endógeno ( <i>gpd</i> )	3	3
Muestra problema <b>G203R</b> para gen endógeno ( <i>gpd</i> )	3	3
Muestra de <b>referencia WT</b> para curva patrón para gen problema ( <i>cefD1</i> ) (concentraciones 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 ng/μL)	0	3 x 5
Muestra de <b>referencia WT</b> para curva patrón para gen endógeno (houseKeeping) ( <i>gpd</i> ) (concentraciones 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 ng/μL)	0	3 x 5
Control negativo para gen problema ( <i>cefD1</i> ) NTC	0	3
Control negativo para gen endógeno (houseKeeping) ( <i>gpd</i> ) NTC	0	3
Total de reacciones en el plato	90 reacciones	



En el análisis estadístico se tomaron replicas técnicas y replicas biológicas, todas por triplicado. En cada ensayo de RT-qPCR se obtuvieron las desviaciones estándar para cada grupo de muestras.

## 6.12 Transformación de *Acremonium chrysogenum*

En la figura 25 se muestra un diagrama de flujo con la metodología para llevar a cabo la transformación de *Acremonium chrysogenum*.

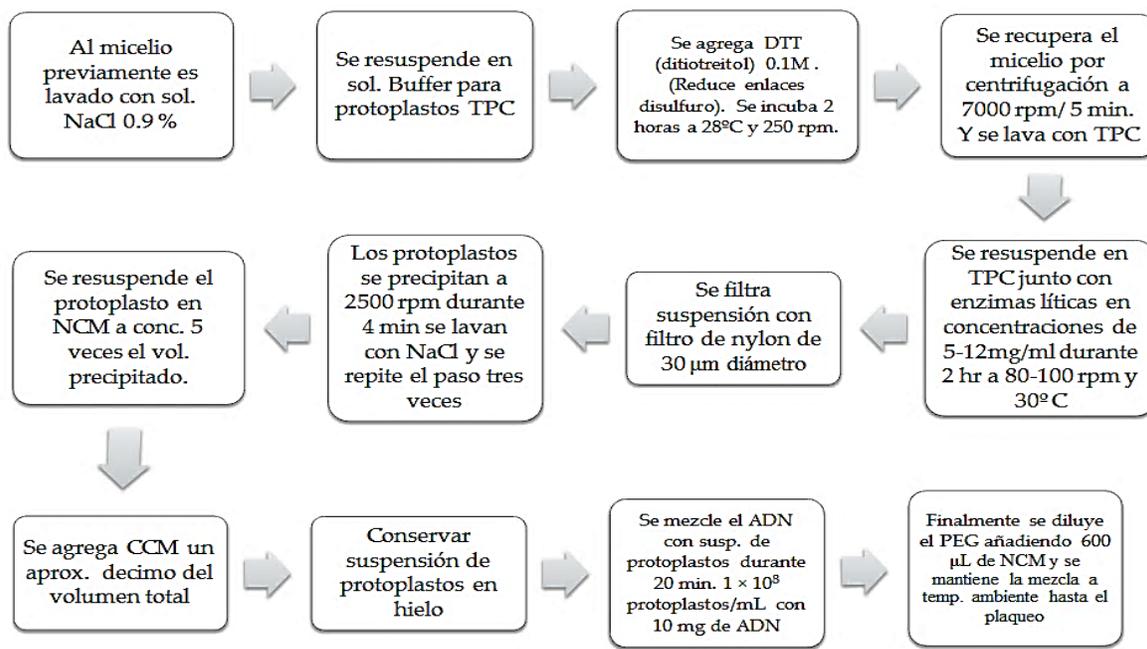


Figura 25. Diagrama de flujo para transformación de *A. chrysogenum*. TPC (NaCl 0.8 M, tampón fosfato potásico 50 mM pH 7, MgSO<sub>4</sub> 0.02 M) NCM (NaCl 0.8 M, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, MOPS 10 mM pH 7). CCM (CaCl<sub>2</sub> 50 mM, MOPS 10 mM pH 7, PEG 8000 18% (p/v))

### 6.12.1 Crecimiento del micelio

Se inocularon 100 mL de medio CCM con micelio procedente de seis placas de medio LPE que habían sido incubadas durante seis días a 28°C, y se incubó el cultivo 20 horas, a 25°C y 200 rpm.



Se centrifugó el micelio durante 8 minutos a 4000 rpm ( $\approx 1300 \times g$ ) y se decantó el sobrenadante. Se añadió 100 mL de NaCl 0.9% y se recogió el micelio bajo las mismas condiciones.

### 6.12.2 Obtención de Protoplastos

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Skatrud *et al.* 1987. Se resuspende el micelio en 100 mL de TPC<sup>12</sup> suplementado con DTT (Ditiotreitol) 0.1 M, se incubó 2 hrs. a 28°C, con agitación fuerte (250 rpm). Esta incubación con DTT se realizó para reducir las uniones disulfuro de la pared del hongo y de esta forma facilitar el proceso de liberación de los protoplastos.

Se recogió el micelio correspondiente a 15 mL de cultivo, centrifugando igual que en el apartado anterior, y se resuspendió en 4 mL de TPC.

En otros 4 mL de TPC se disolvieron 160 mg (concentración final 20 mg/mL) de Driselase® (se pueden usar enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*), y se centrifugó 1 minuto a 4000 rpm ( $\approx 1300 \times g$ ). Se recogió el sobrenadante, el cual se adicionó al micelio resuspendido en TPC. La mezcla se incubó en un matraz de 100 mL durante el tiempo necesario para la obtención de protoplastos (no más de 5 horas), a 28°C con agitación orbital de 100 rpm. Se observó al microscopio cada hora la liberación de protoplastos como se muestra en la figura 26.

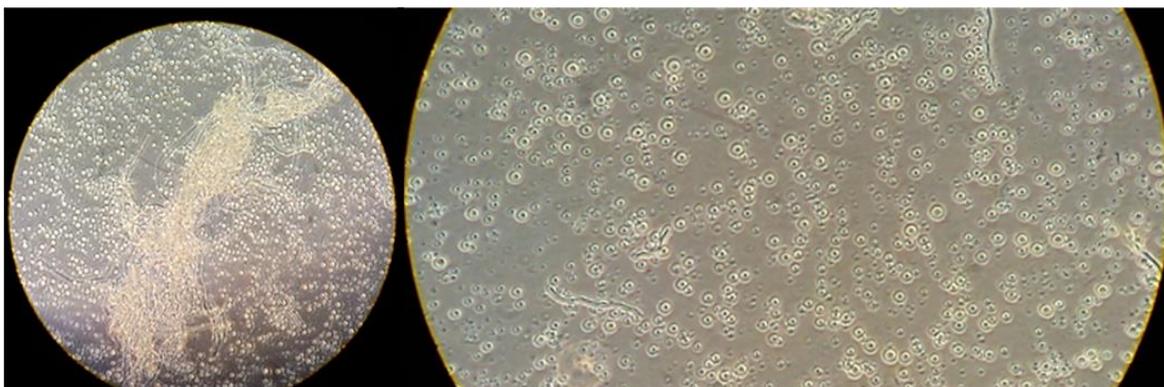


Figura 26. Protoplastos de *Acremonium chrysogenum* vistos al microscopio. Se observan los protoplastos liberados a partir del micelio a las 3.5 y 5.8 h.

<sup>12</sup> **TPC:** NaCl 0.8 M, amortiguador fosfato potásico 50 mM pH 7, después de esterilizar, añadir MgSO<sub>4</sub> 0.02 M



Posteriormente se filtró la suspensión protoplastos/restos de micelio a través de un filtro de nylon (Nytal, Suiza) de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, convenientemente colocado sobre un embudo y esterilizado, con el fin de separar los restos de micelio de los protoplastos. Se precipitaron los protoplastos por centrifugación a temperatura ambiente durante 4 minutos y 2500 rpm ( $\approx 1000 \times g$ ). Se lavó el precipitado obtenido con 5 mL de NaCl 0.8 M y se sedimentaron los protoplastos como en el paso anterior. Se repitió este lavado con agitación lenta con NaCl tres veces consecutivas.

Se lavó el precipitado obtenido de la última centrifugación con 5 mL de tampón NCM<sup>13</sup> y se centrifugó nuevamente, bajo las mismas condiciones. Se resuspendieron los protoplastos en NCM a un concentración de  $1 \times 10^8$  protoplastos/mL (aproximadamente 5 veces el volumen del precipitado) y se añadió 1/10 del volumen total de tampón CCM<sup>14</sup>. Se mantuvieron en esta suspensión los protoplastos en hielo hasta que se realizó la transformación.

### 6.12.3 Transformación de Protoplastos

Se mezcló en el fondo de un tubo de 10 mL los siguientes componentes:

Suspensión de protoplastos	100 $\mu\text{L}$
ADN plasmídico	1-10 $\mu\text{L}$ (1-10 $\mu\text{g}$ )

Se mezcló suavemente y se mantuvo en hielo 20 min. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de amortiguador CCM, se mantuvieron a temperatura ambiente otros 20 min. Antes del plaqueo se le agregó 600  $\mu\text{L}$  de NCM. Se mantuvo esta mezcla de transformación a temperatura ambiente hasta el momento del plaqueo.

---

<sup>13</sup> **Amortiguador NCM:** NaCl 0.8 M, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, MOPS 10 mM pH 7.

<sup>14</sup> **Amortiguador CCM:** CaCl<sub>2</sub> 50 mM, MOPS 10 mM pH 7, PEG (polietilen glicol) 8000 18% (p/v).



#### 6.12.4 Plaqueo

En primer lugar se preparó la base de las placas de transformación (60 mm de diámetro) extendiendo 5 mL de medio CCMS<sup>15</sup> con 5 µL de fleomicina a una concentración final de 20 µg/mL. Una vez que el medio base solidificó se plaqueó la transformación en forma de cobertera mezclando en un tubo estéril de 10 mL lo siguiente:

Mezcla de transformación	300 µL
Fleomicina stock (20 mg/mL en agua)	Variable
Medio TSAS/CCMS mantenido a 48°C	5 mL

Se extendió la mezcla sobre la base anteriormente preparada. Se dejó solidificar y se incubaron las placas a 27-28°C durante 7 días (Cruz J., 2009).

Para la segunda selección de transformantes se preparó medio CCM (sin sacarosa) con 2% de agar y el doble de fleomicina (40 µg/ml). Se debe poner la fleomicina una vez que el medio no este demasiado caliente ya que es sensible al calor. Se dejó solidificar y se inocularon estas placas con palillos estériles picando las colonias que crecieron en las primeras placas. Se incubaron 7 días.

En la tercera selección se tomaron nuevamente las transformantes que crecieron en la primera y segunda selección. Y se repitió igual que en la segunda selección. Se prepararon 100 ml de medio CCM con 80 µL de fleomicina, que se tomó de un stock de 50 mg/ml para tener una concentración de 40 µg/mL.

Finalmente se seleccionaron las cepas que tenían similar apariencia y se crecieron en medio CCM sólido.

#### 6.13 Secuenciación

Hoy en día hay disponibles muchos métodos diferentes para la **secuenciación del ADN**, incluyendo técnicas para secuenciar los <ciclos> de la PCR y técnicas de secuenciación automática. El método más utilizado tradicionalmente en secuenciación es el método por terminación de cadena, un método manual desarrollado en 1977 por

---

<sup>15</sup> **CCMS:** Medio CCM con 103 g de sacarosa por litro.



Frederick Sanger y a menudo conocido como método Sanger. En esta técnica un primer hibrida con un ADN desnaturalizado molde, y se utiliza una pequeña cantidad de nucleótidos modificados llamados **didesoxirribonucleotido (ddNTP)**, que se mezclan con los componentes de reacción. Un ddNTP se diferencia de un dNTP en que tiene un grupo hidrógeno en lugar de un grupo hidroxilo en el carbono 3' del azúcar desoxirribosa. Cuando se incorpora un ddNTP en una cadena de ADN, la cadena no puede alargarse porque la ausencia de un 3'-OH evita la formación de un enlace fosfodiéster con un nucleótido nuevo; de ahí se dice que la cadena está terminada (Thieman, 2010).

Posteriormente se disponen cuatro tubos de ensayo por separado. Cada tubo contiene una muestra del ADN que se va a secuenciar, un cebador, los cuatro dNTP, y una pequeña cantidad de uno de los ddNTP (en un tubo ddATP, en otro ddGTP, otro con ddCTP y el último con ddTTP). En cuanto comienza la síntesis de una nueva cadena de ADN a partir del cebador, la ADN polimerasa inserta aleatoriamente un ddNTP en la secuencia en lugar de un dNTP, evitando que se sintetice una cadena complementaria. Con el tiempo, habrá un ddNTP incorporado en todas las posiciones en las cadenas de nueva síntesis creando una serie de fragmentos de longitudes variadas que terminan en residuos didesoxi. El método de Sanger solo puede ser utilizado para secuenciar de 300 a 500 nucleótidos debido a la dificultad de correr un gel de secuenciación muy grande.

### **6.13.1 Método de secuenciación automática de ADN**

Este método es capaz de secuenciar largos fragmentos de ADN (más de 500 pares de bases en una sola reacción). Las reacciones de secuenciación así realizadas utilizan ddNTP, cada uno marcado con un fluorocromo diferente. Se usa un solo tubo de ensayo y el enfoque original utilizando geles de poliacrilamida seguido de la autorradiografía se ha sustituido por la separación de las reacciones en un gel de tubo de diámetro ultrafino denominado gel capilar. A medida que los fragmentos de ADN se mueven por el gel, son escaneados con un rayo láser. El láser estimula el fluorocromo de cada fragmento de ADN, que emite distintas longitudes de onda de luz para cada ddNTP. Un detector recoge la luz emitida amplificándola y suministra esta información a un computador para que la procese y, convirtiendo los patrones de luz, pueda revelar la secuencia de ADN.



La secuenciación de el gen *aga1* se llevó a cabo en un **secuenciador ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer**, por electroforesis capilar con el método **BIG DYE** (Terminator fluorescence based sequencing) en el laboratorio de biología molecular de la UAM-Iztapalapa.

Purificación: Se purificó la banda obtenida del gel de agarosa con el **kit Montage™ Genomic**.

1. Se agregó a un tubo de microcentrifuga con filtro milipore una mezcla de 380  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  + 20  $\mu\text{L}$  de muestra.
2. Se centrifugó a 1000 g (equivalente a 1000 ref) por 15 min.
3. Se lavó con 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ .
4. Se centrifugó durante 2 min a 1000 G.

Secuenciación:

Se llevó a cabo la reacción de PCR con los  $_{dd}\text{NTPs}$  y  $_{d}\text{NTPs}$  y la enzima ADN polimerasa contenidos en el kit BigDye® Terminator v3.1 con las siguientes condiciones: 2  $\mu\text{L}$  de Big Dye, 2  $\mu\text{L}$  de Buffer 2x, 1  $\mu\text{L}$  de primer (F y R), 3  $\mu\text{L}$  de muestra de ADN y 2  $\mu\text{L}$  de agua.

Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

Tabla 15. Condiciones de termociclado secuenciación gen *aga1*.

Ciclos	Proceso	Temperatura	Tiempo
25	Desnaturalización	95°C	10''
	Hibridación (Tm)	50°C	5''
	Polimerización	60°C	4'

1. A la muestra de ADN se le agregaron 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril para completar 20  $\mu\text{L}$  de solución.
2. Se agregó a una columna *Centri-sep™* un volumen de 800  $\mu\text{L}$  de Sephadex<sup>16</sup>. Se quitó la tapa inferior de la columna *Centri-sep™* y se colocó en tubo colector hasta que drenó el agua sobrante del Sephadex.

<sup>16</sup> **Sephadex:** Se prepara con 2.6 g de Sephadex g50 y 400 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  dejando hidratar durante 2 h.



3. Se centrifugó a 2800 rpm/ 3 min.
4. Se agregó la muestra de ADN de 20  $\mu$ l cuidando de no partir la columna de Sephadex.
5. Se pasó tubo *Centri-sep*<sup>TM</sup> a tubo de microcentrifuga. Se centrifugó la muestra a 2800 rpm/ 3 min.
6. Se protegió de la luz a la muestra y se pusieron 10  $\mu$ l de formamida.
7. Se colocó la muestra en la placa de secuenciación y se llevó al secuenciador 3100 Genetic Analyzer.
8. Las secuencias obtenidas se analizaron en el programa CHROMAS LITE (v.2.01).
9. Se llevó a cabo un Blast (en la página de NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para determinar la amplificación secuenciada.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Producción de cefalosporina C en transformantes *laeA*

Se realizaron 4 bioensayos para analizar la producción de  $\beta$ -lactámicos totales de cepas de *Acremonium chrysogenum* transformadas con el gen *laeA* de *Aspergillus terreus*, insertado previamente en el vector pC43 (Cruz J, 2009), utilizando como controles la propia cepa silvestre sin transformar (ATCC 11550) y transformantes con el vector pC43 sin inserto, el cual contiene el gen de resistencia al antibiótico fleomicina como marcador de selección.

#### 7.1.1 Bioensayo 1 *laeA*

El primer cultivo para analizar la producción de cefalosporina C en cepas transformantes *LaeA* se realizó tal y como se describe en la sección 6.4.2 de Materiales y Métodos, dejando crecer el micelio en el medio semilla MSMA durante 38 h previo a la inoculación del medio de producción MCFA. Se pusieron 3 matraces de cada una de las



cepas en estudio. Cada una de las muestras tomadas durante el cultivo (cada 24 h hasta un total de 120 h) se inocularon por triplicado en placas de bioensayo, junto con los estándares de cefalosporina C. En la figura 27 se muestran los halos de inhibición obtenidos.

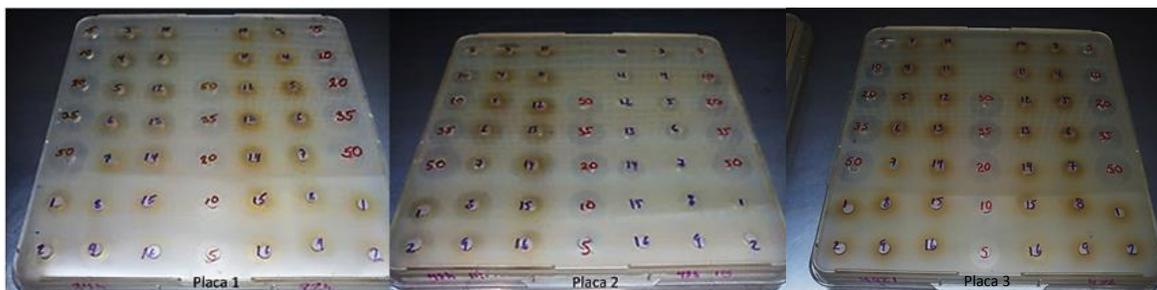


Figura 27. Bioensayo 1 *laeA*. Placa 1. Muestras de 24 h y 72 h. Las claves son: 1-6 *LaeA*, 7 es control sin inserto y 8 WT, del 9-16 son duplicados de las mismas muestras. Los números 5, 10, 20, 35 y 50 son las concentraciones conocidas de cefalosporina C para elaborar la curva patrón. Placa 2. Muestras de 48 h sin diluir y diluidas 1:5 (centro). Placa 3. Muestras de 120 y 96 h respectivamente.

Las concentraciones de  $\beta$ -lactámicos totales se obtuvieron mediante interpolación del diámetro del halo de inhibición producido por cada muestra en una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de cefalosporina C como se muestra en la figura 28.

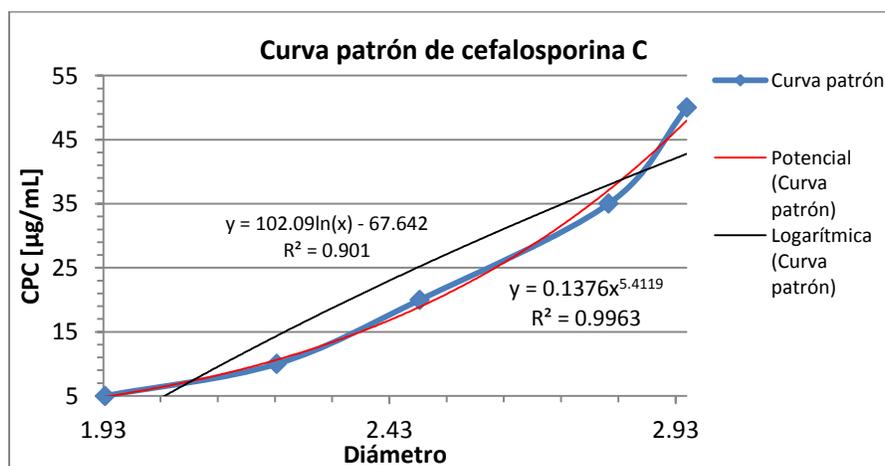


Figura 28. Curva patrón bioensayo 1. Se muestra el resultado con una correlación lineal logarítmica y tipo potencial. Con esta última se determinó la concentración de  $\beta$ -lactámicos totales, ya que una  $R^2$  de 0.99 predice más el comportamiento de la fermentación bajo esas condiciones.



Los resultados del primer bioensayo muestran una mayor producción de  $\beta$ -lactámicos totales a las 48 horas, siendo las cepas con mayor producción respecto a los controles las *laeA* 3 y 6. En la figura 29 se muestra el resultado.

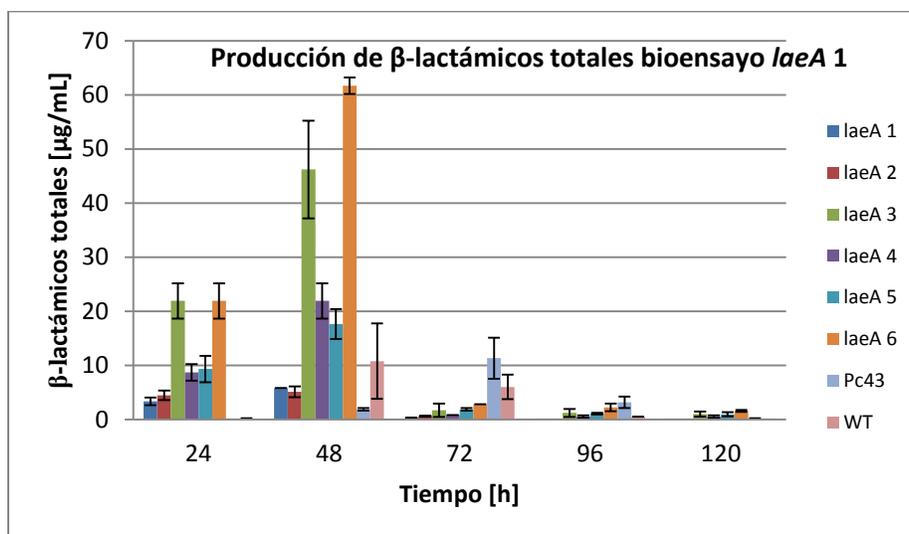


Figura 29. Producción de  $\beta$ -lactámicos totales de las cepas en estudio correspondiente al primer bioensayo. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 repeticiones en el bioensayo de cada muestra de un duplicado en el cultivo.

### 7.1.2 Bioensayo 2 *laeA*

En el segundo cultivo de producción de  $\beta$ -lactámicos se descartaron las cepas transformantes 1 y 5 debido a que su producción en el primero de los bioensayos fue similar a la de las cepas 2 y 4. Así mismo se redujo el tiempo de cultivo hasta las 96 horas, ya que a partir de este punto la actividad antibiótica prácticamente desaparece del medio, y también se tomó el tiempo cero. Además se midió el pH del medio a lo largo del cultivo (figura 30).

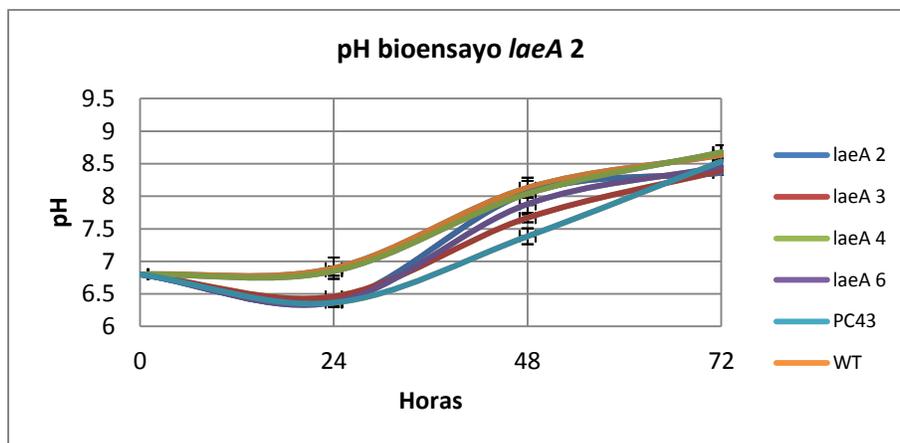


Figura 30. pH del bioensayo 2 de *laeA*. Se muestra una tendencia hacia pH alcalino en todas las muestras del caldo de fermentación MCFA.

Para conocer las concentraciones de  $\beta$ -lactámicos producidos por cada cepa se procedió igual que en el bioensayo 1, utilizándose una curva exponencial ( $Y = 0.0883e^{2.1466X}$ ,  $R^2 = 0.9773$ ) realizada a partir de concentraciones estándar de cefalosporina C e interpolando los diámetros producidos por las muestras.

Los resultados de producción obtenidos se muestran en la figura 31, en la que se observa una tendencia similar del comportamiento de las cepas con respecto al bioensayo 1, aunque con mayor productividad en general en los tiempos de 72 y 96 h. Es importante notar que los controles Pc43 y WT tienen su producción más alta a las 72 h, mientras en las cepas transformantes ésta se da a las 48 h.

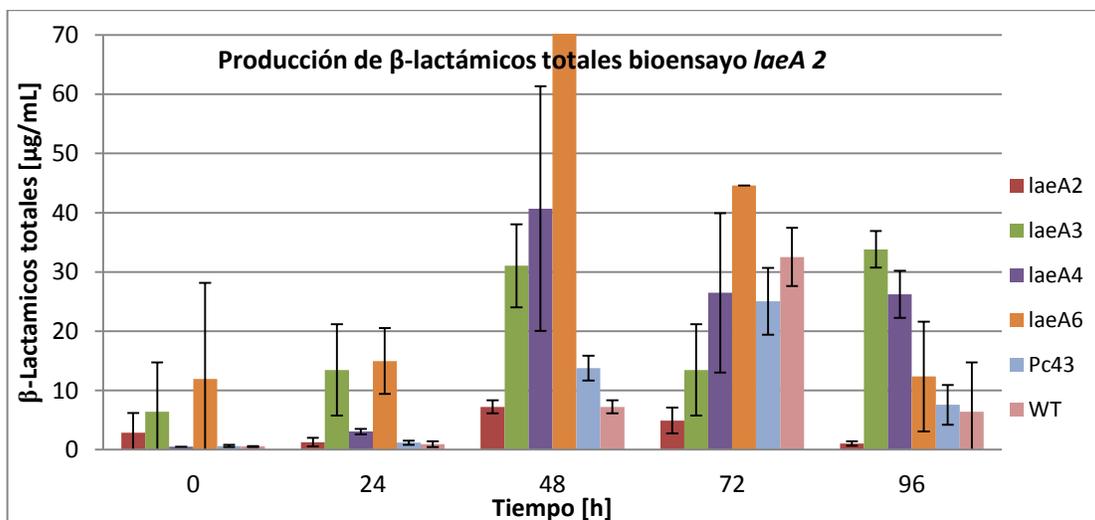


Figura 31. Producción de  $\beta$ -lactámicos totales bioensayo 2. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 repeticiones en el bioensayo de cada muestra de un duplicado en el cultivo.



Se midió el peso seco de la biomasa de las cepas para obtener la producción específica de  $\beta$ -lactámicos totales. En la figura 32 se muestra el peso seco obtenido en cada cepa cada 24 h.

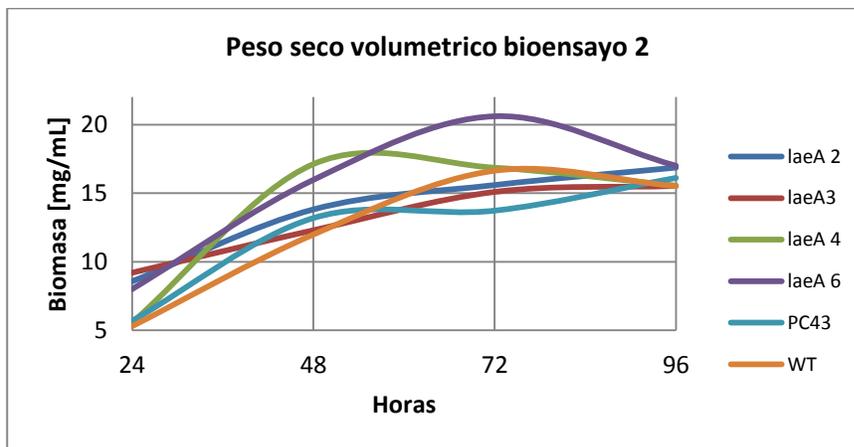


Figura 32. Peso seco de la biomasa en el medio de producción MCFA.

La biomasa obtenida varió en un intervalo de 5-20 mg/mL. Obteniéndose mayor biomasa en la cepa *laeA 6* a las 72 h. Los resultados de producción específica de  $\beta$ -lactámicos pueden observarse en la figura 33. En general se observa un patrón de producción específica similar a la producción absoluta que se muestra en la figura 31; con la cepa *laeA 6* como mayor productora, que alcanza su pico de producción a las 48 h, mientras las cepas control pC43 y WT alcanzan su mayor nivel de producción a las 72 h.

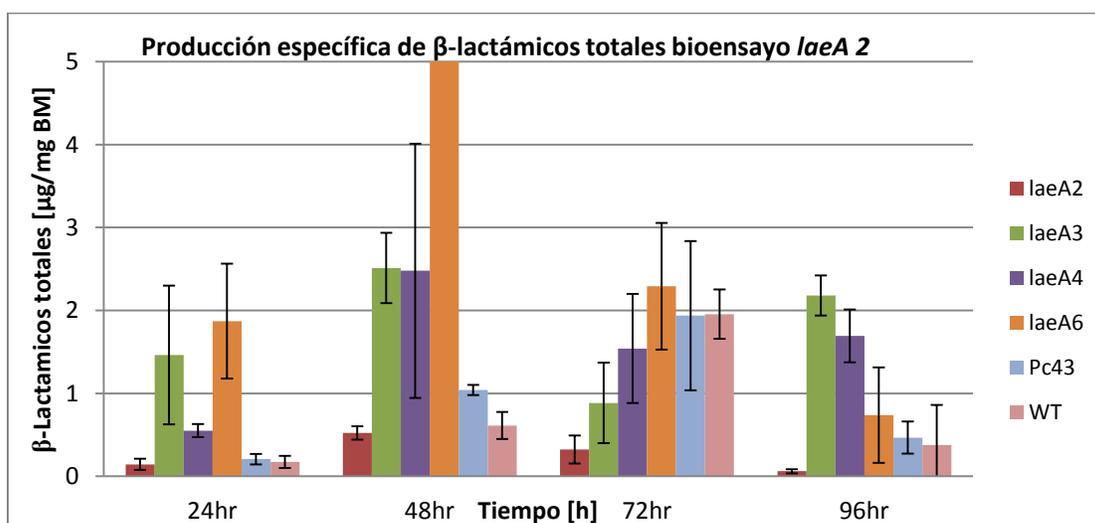


Figura 33. Producción específica de  $\beta$ -lactámicos totales bioensayo 2.



### 7.1.3 Bioensayo 3 *laeA*

Para este cultivo se descartó la cepa silvestre ya que se comportó de forma similar al control sin inserto en los experimentos anteriores. El tiempo de crecimiento de las cepas en el medio semilla MSMA se aumentó a 50 h.

Como se observa en la figura 34, se obtiene ya una producción apreciable de  $\beta$ -lactámicos totales a las 0 y 24 h de cultivo, lo cual no sucedía en los dos primeros bioensayos. Esto puede ser debido a que un mantenimiento por más tiempo en el medio MSMA, que fue de 50 h, indujo la producción de antibiótico. El medio MSMA es un medio complejo con abundante fuente de carbono que activa el metabolismo del hongo y su crecimiento, sin embargo si se mantiene el crecimiento en este medio durante 50 h parece estarse iniciando el metabolismo secundario del hongo.

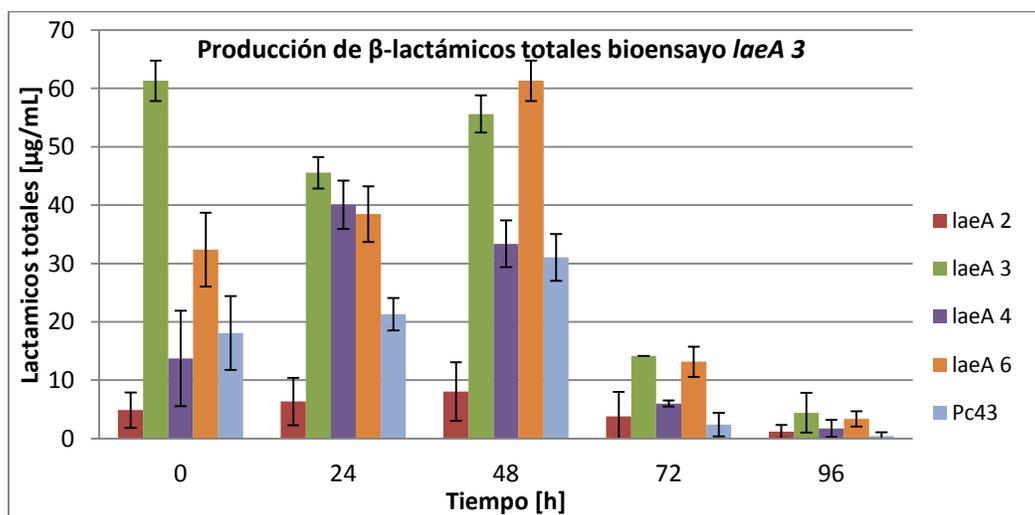


Figura 34. Producción de  $\beta$ -lactámicos totales bioensayo 3 *laeA*. Se observa como las cepas *laeA* 3 y 6 son las de mayor tasa de producción de  $\beta$ -lactámicos totales, así como una mayor producción a las 48 horas.

La biomasa de las La biomasa de las cepas *laeA* 2, 3, 4, 6 y Pc43, como se muestra en la figura 35, comenzó más alta que en el cultivo del bioensayo 2, siendo las 48 horas el tiempo donde se registró la mayor producción tanto de biomasa como de  $\beta$ -lactámicos totales. La diferencia en producción de  $\beta$ -lactámicos totales de las cepas *laeA* 3 y 6 respecto al control Pc43 sigue siendo notoria.

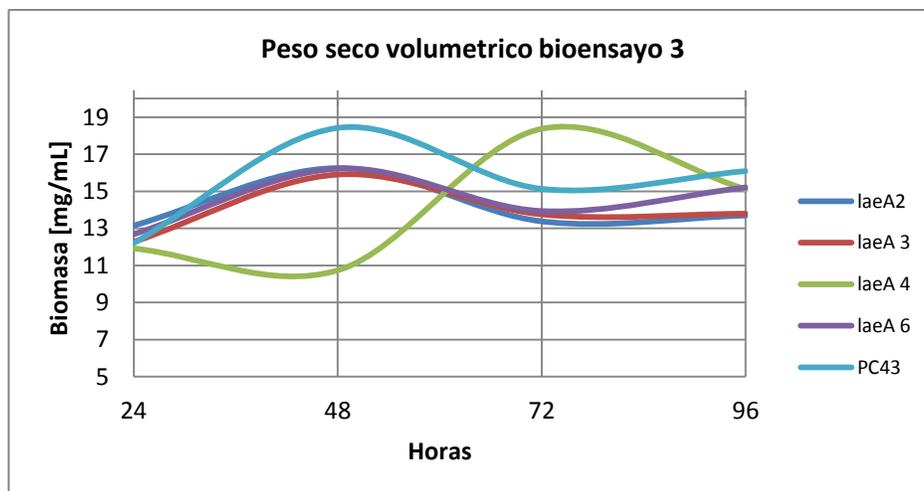


Figura 35. Peso seco de la biomasa en el medio de producción MCFA. El comportamiento del peso seco a las 48 h. del transformante *laeA 4* se sugiere que fue atípico ya que a las 48 horas la biomasa es menor y posteriormente se recupera a las 72 horas, sin embargo la producción de  $\beta$ -lactámicos no fue mayor.

Por lo tanto el mayor tiempo que permaneció el micelio creciendo en medio MSMA provocó un aumento significativo de la biomasa.

La figura 36 muestra la producción específica de  $\beta$ -lactámicos en este tercer cultivo, donde se observa la mayor producción a las 24 y 48 h, y una mayor producción en los transformantes *laeA 3*, 4 y 6 respecto al control Pc43.

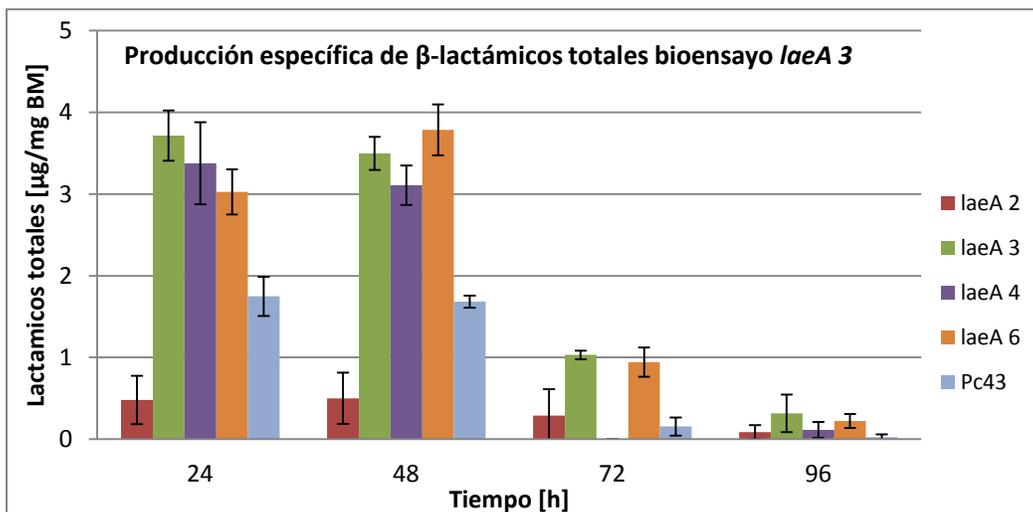


Figura 36. Producción específica de  $\beta$ -lactámicos totales bioensayo 3 *laeA*.



En este bioensayo el pH estuvo en un intervalo de 7.6-9.0 (figura 37).

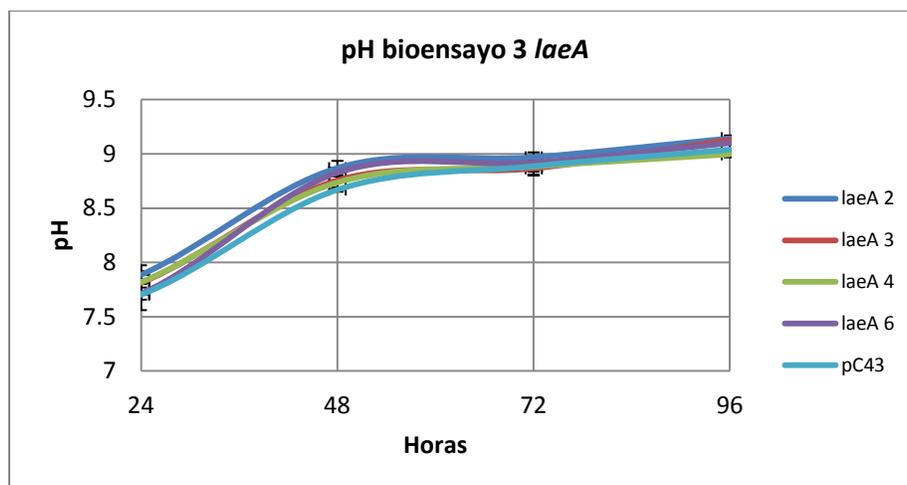


Figura 37. pH bioensayo 3 *laeA*.

#### 7.1.4 Bioensayo 4 *laeA*

Puesto que el pH tiene un efecto sobre la producción de  $\beta$ -lactámicos (Schmitt *et al.* 2004b), se usó en este último cultivo de las cepas *laeA* el amortiguador MOPS a una concentración de 0.1 M, con el fin de retardar el aumento del pH durante el cultivo en el medio MCFA. El tiempo de crecimiento de las cepas en el medio semilla MSMA se aumentó a 38 h.

El sistema amortiguador MOPS retrasó poco (0.5 unidades) el incremento del pH entre las 24 y 48, si comparamos la producción de  $\beta$ -lactámicos totales del bioensayo 4 con el 3 hay poca diferencia. En la figura 38 se muestra la cinética de pH.

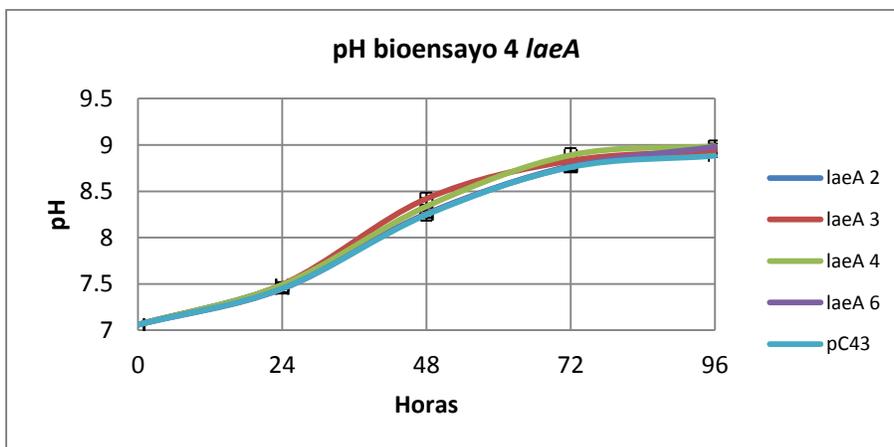


Figura 38. pH del bioensayo 4 de *laeA*. Se observa que una concentración de MOPS de 0.1 M para amortiguar el pH no fue suficiente.

En la figura 39 se observa que las cepas de mayor producción de  $\beta$ -lactámicos fueron *laeA* 3 y 6, al igual que en los anteriores cultivos, obteniéndose una mayor tasa de producción a las 24 y 48 horas. En la figura 40 se muestra la producción específica, que se corresponde esencialmente a la producción absoluta de la figura 39.

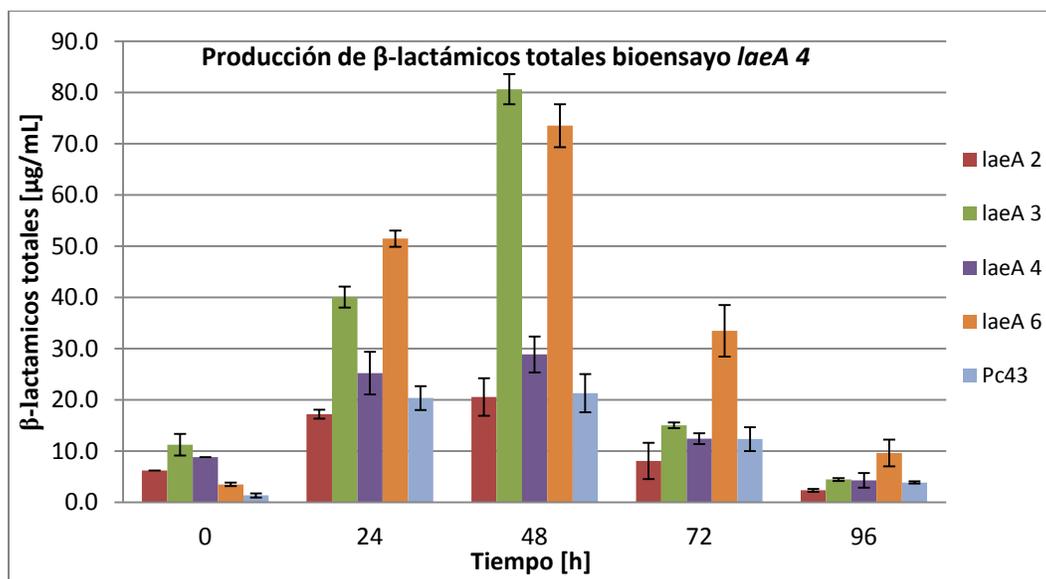


Figura 39. Producción de  $\beta$ -lactámicos totales del bioensayo 4 de *laeA*.

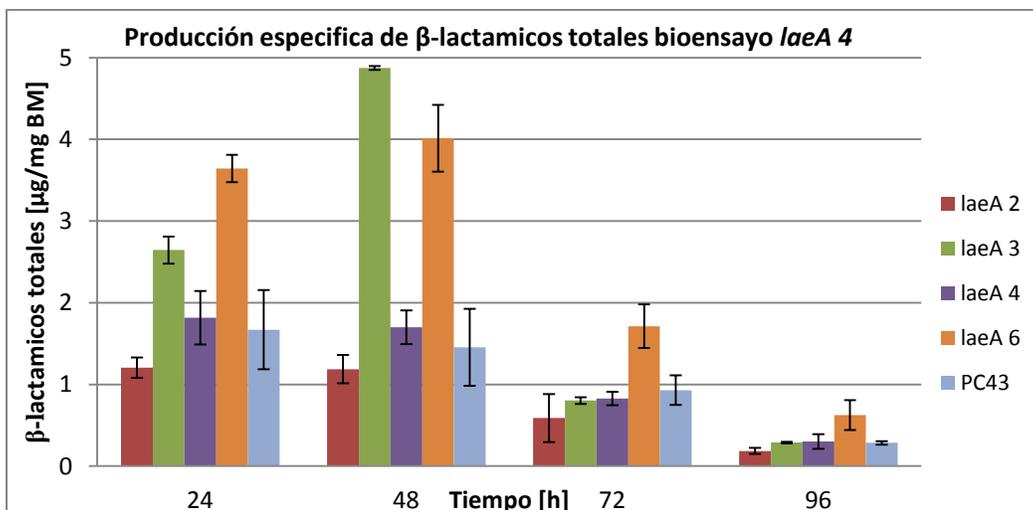


Figura 40. Producción específica de  $\beta$ -lactámicos totales bioensayo 4 *laeA*. Se observa una mayor producción también a las 24 y 48 hrs.

En la figura 41 se muestra la biomasa de las cepas *laeA* y el control Pc43, con un perfil similar, excepto las cepas *laeA* 3 y 6, que presentan mayor biomasa a las 72 h, sin embargo la producción absoluta más alta fue a la 48 h en estas cepas. La cinética se mantuvo relativamente más estable en general.

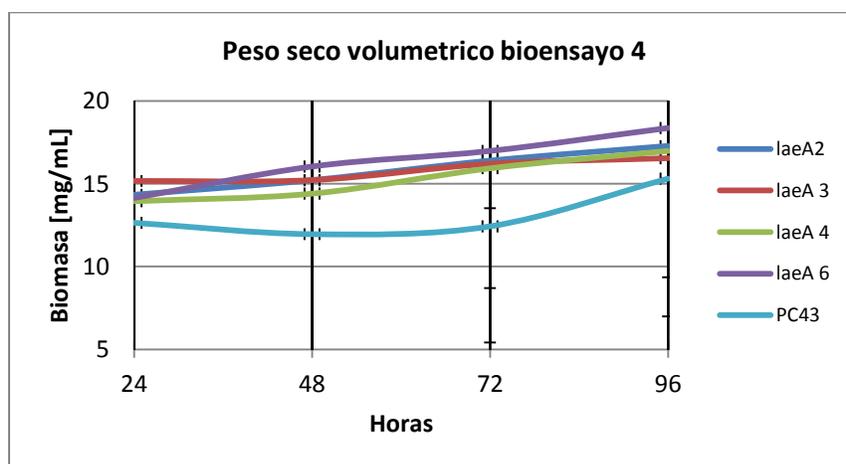


Figura 41. Peso seco de medio MCFA.

Como conclusión de los experimentos de producción de CPC por las cepas transformantes *laeA* de *A. chrysogenum* puede decirse que varias de las cepas mostraron incrementos significativos tanto en la producción total como en la producción específica de CPC con respecto a las cepas control PC43 y WT, lo que apunta a un efecto positivo del gen *laeA* de *A. terreus* en la biosíntesis del antibiótico. Se describen a continuación los análisis genéticos de las cepas *laeA*.



## 7.2 Análisis genético de transformantes *laeA*

### 7.2.1 Extracción y cuantificación del ARN de transformantes *laeA*

Se extrajo ARN de los micelios del último cultivo de producción de las cepas *laeA*, en el que se usó MOPS como agente amortiguador, y se cuantificó en un equipo NanoDrop. Las concentraciones obtenidas oscilaron entre 645.9 y 4484.9 ng/ $\mu$ L, y su relación de absorbancia entre las longitudes de onda a 260/280 nm estuvo entre 1.84 y 2.10, lo que indica una pureza adecuada para realizar los experimentos de RT-PCR.

Las muestras de ARN fueron tratadas con DNasa, y a continuación se realizó un PCR para comprobar que estuvieran libres de ADN, utilizando primers del gen *gpd* diseñados en un intrón.

El resultado se visualizó en un gel de electroforesis (figura 42), donde se observa que en las muestras de ARN de los transformantes *laeA* 3 y 4 de 48 h se amplificó un fragmento correspondiente a un intrón, lo que indica una contaminación por ADN, por lo cual estas muestras se volvieron a tratar con DNasa.

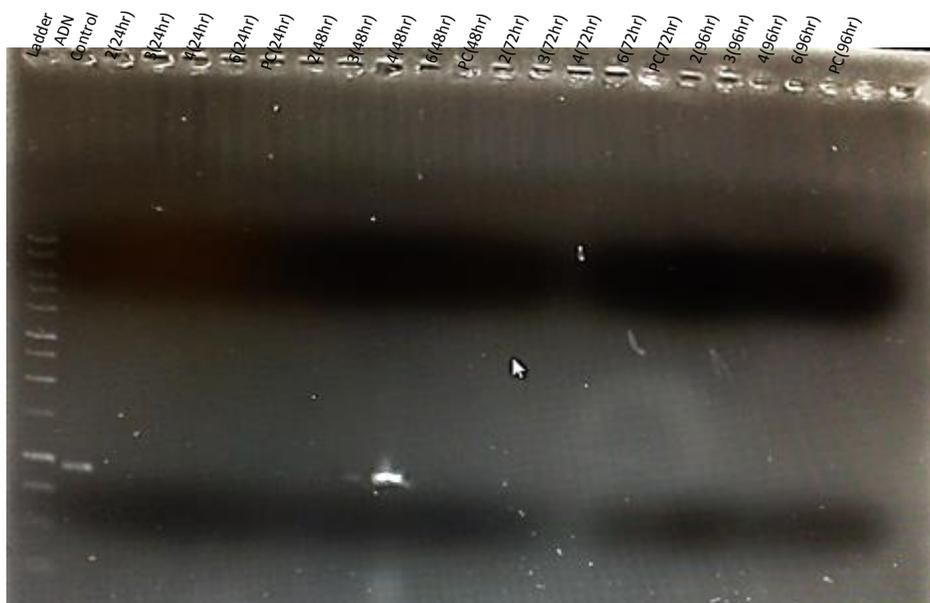


Figura 42. Resultado del tratamiento con DNasa en ARN del bioensayo 4 de *laeA*. Se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular, carril 2 ADN control de *A. chrysogenum*, los demás carriles son las muestras *laeA* 2, 3, 4 6 y PC para las 24, 48, 72 y 96 hrs. respectivamente. Se observa una banda en *laeA* 3 y 4 de 48 hrs.



### 7.2.1.1 Integridad del ARN del bioensayo 4 de *laeA*

Se comprobó la integridad del ARN de las muestras tratadas con DNasa mediante una electroforesis en gel de agarosa. En la figura 43 muestra el resultado.

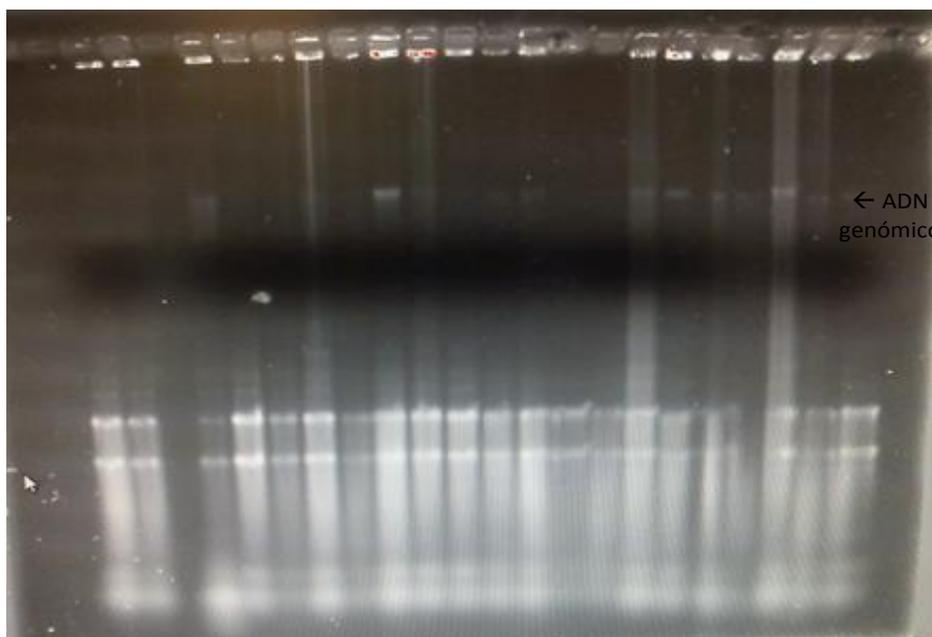


Figura 43. Integridad ARN extraído del bioensayo 4 de *laeA*. Se observa ligeramente contaminado de ADN. También se observan las dos bandas de ARN ribosomal 28 y 18s en buenas condiciones y un barrido de ARN que ha sido degradado.

### 7.2.2 Extracción del ADN de transformantes *laeA*

Se extrajo ADN de las cepas *laeA* del bioensayo 4 para verificar que amplificaran con los primers diseñados para el gen *laeA* de *A. terreus*, con que fueron transformadas. En la figura 44 se muestra un gel de integridad del ADN extraído. Se hizo otro tratamiento con RNasa para eliminar el ARN que tenían las muestras. En la figura 45 se muestra el resultado.

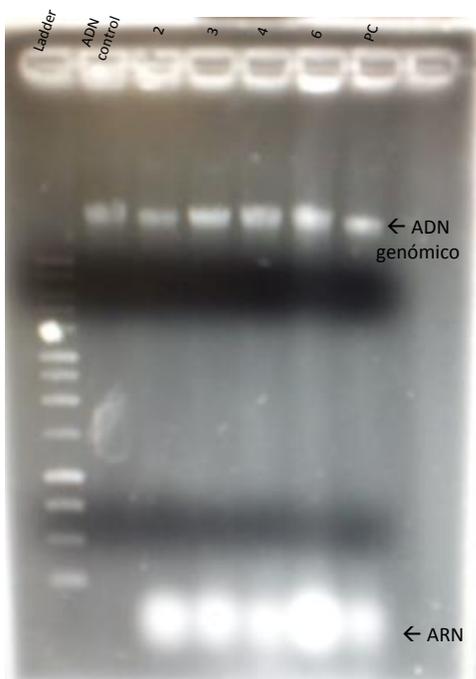


Figura 44. Integridad del ADN extraído con el primer tratamiento con RNAsa.



Figura 45. Integridad del ADN extraído con el segundo tratamiento con RNasa.

### 7.2.3 Análisis de PCR de transformantes *laeA*

Se realizaron las pruebas moleculares para verificar que el gen *laeA* de *A. terreus* efectivamente estuviera insertado en las cepas de *A. chrysogenum*. Las condiciones de PCR se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 16. Condiciones de PCR para *laeA*. La temperatura de hibridación fue sacando el promedio de las dos  $T_m$  de cada primer restando 5°. (F 63.3° R 64.9°).

Ciclos	Proceso	Temperatura	Tiempo
1	desnaturalización	95°C	5'
30	Desnaturalización	95°C	30''
	Hibridación ( $T_m$ )	59.1°C	45''
	Polimerización	72°C	45''
1	Polimerización	72°C	8'



El resultado se visualizó en un gel de agarosa. En la figura 46 se muestra el resultado. Se muestra en el Carril 1 *ladder*, carril 2 producto amplificado del gen *laeA* en al ADN de *A. terreus* (control positivo), carril 3-7 no se observa producto de amplificación del gen *laeA* en el ADN de las cepas *laeA* 2, 3, 4, 6 y PC (control negativo) de *A. crhysogenum*. El Carril 8 muestra a PC tratado con agua Q; también no se observa ningún producto de amplificación. Por otro lado la temperatura óptima fue la calculada de 59.1°C ya que el control muestra una sola banda.

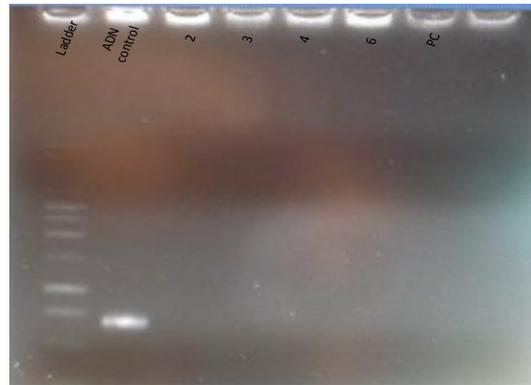


Figura 46. Producto amplificado de gen *laeA* con primers específicos.

Debido a que no se observó ningún producto de amplificación de las cepas de *laeA* 2, 3, 4 y 6, se realizó otro PCR con primers del gen *18S*, gen que se expresa constitutivamente y *laeA* nuevamente, para descartar que el ADN estuviera dañado de las cepas *laeA*. El resultado se muestra en la figura 47. No se observa ninguna banda nuevamente para los primers *laeA*.

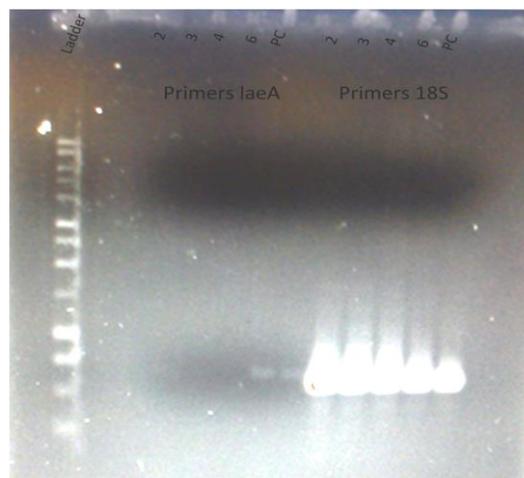


Figura 47. Producto de PCR del gen *laeA* y *18S*. Se muestra el carril 1 *ladder* (100pb), carril 3-7 PCR de *laeA*; carriles 8-12 PCR del *18S*, todos amplificados con el ADN extraído de las cepas *laeA* 2, 3, 4, 6 y PC. No se observa ninguna banda nuevamente para los primers *laeA*.



Con los resultados obtenidos no pudo confirmarse la presencia del gen *laeA* en el genoma de los transformantes de *A. chrysogenum*. Este hecho pudo deberse a que cuando se extrajo el ADN y el ARN de los transformantes estos hubieran sido resembrados sucesivas veces y hubieran revertido total o parcialmente, siendo en este último caso heterocariones para este gen. Sería conveniente hacer nuevos análisis partiendo de stocks originales de los transformantes, así como utilizar la técnica de Southern blot, que nos daría una información más precisa sobre el genotipo de los transformantes con respecto al gen *laeA*.

#### 7.2.4 Análisis por RT-PCR de transformantes *laeA*

En la figura 47 se demostró que los primers *laeA* no amplificaron en ADN. Para asegurar que las cepas efectivamente no tuvieran el inserto se realizó un RT-PCR con el ARN extraído. Se tomaron las muestras de ARN de *laeA* 6(72 hrs.), 2(48 hrs.), 4(72 hrs.) y 6(48 hrs.) y se corrió un RT-PCR con los primers 18S y *laeA*. El resultado se muestra en la figura 48, donde nuevamente los primers *laeA* no amplificaron.



Figura 48. Producto de RT-PCR con los primers *18S* y *laeA*. Con Ladder de 100pb. Muestras: 6(72), 2(48), 4(72\*), 6(48hrs). Nuevamente los primers no amplificaron.



Nuevamente no se pudo corroborar la presencia y expresión del gen *laeA* en los transformantes. Sería conveniente utilizar la técnica de Northern blot con ARN extraído a partir de cultivos nuevos de los stocks originales. Aparentemente las cepas transformantes fueron inestables, y por lo tanto se puede concluir que es conveniente siempre monitorear mediante análisis genéticos a lo largo del tiempo que los transformantes de *A. chrysogenum* mantienen el genotipo deseado y conservan el gen de interés.

### **7.3 Búsqueda *in silico* del gen *laeA* de *Acremonium chrysogenum*.**

El gen *laeA* de *Acremonium chrysogenum* no ha sido clonado aún, y de hecho no se sabe si este gen está presente en su genoma. Por el interés que el gen *laeA* puede tener en la producción de cefalosporina se llevó a cabo una búsqueda *in silico* con el fin de recabar información que pudiera ser utilizada posteriormente para clonar dicho gen.

Se partió del gen *laeA* de *Gibberella fujikuroi*, hongo filogenéticamente más próximo a *Acremonium* que *Aspergillus*, género en el cual el gen *laeA* fue descrito por primera vez (Bok y Keller, 2004). Se llevó a cabo una búsqueda con la herramienta BLAST en la base de datos del NCBI para encontrar genes *laeA* con una secuencia similar a la del gen de *G. fujikuroi*. La secuencia codificante (CDS) de estos genes se alineó utilizando la herramienta Clustal W del programa de análisis de secuencias DNASTar (Apéndice 1), y con los resultados de este alineamiento se construyó el árbol filogenético que se muestra en la figura 49.

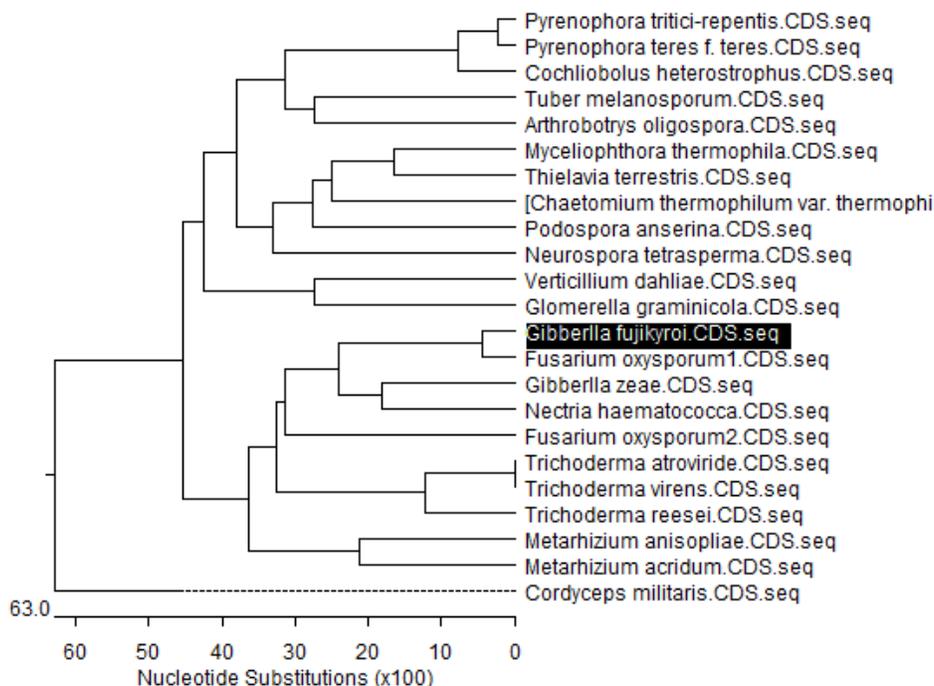


Figura 49. Árbol filogenético de *Gibberella fujikyroi*. Se muestra la similitud del gen *laeA* de *Gibberella fujikyroi* respecto al gen *laeA* de otros hongos.

Igualmente se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las CDS de los genes ortólogos del *laeA* de *Gibberella fujikyroi*, en el Apéndice 2 se muestra el resultado.

Con la información obtenida en este análisis *in silico* se espera poder llevar a cabo la clonación del gen *laeA* de *Acremonium chrysogenum*, mediante el diseño de primers degenerados basados en las secuencias más conservadas. La clonación del gen *laeA* abrirá un nuevo campo de investigación sobre la regulación del metabolismo secundario de *A. chrysogenum*.



## 7.4 Producción de cefalosporina C en cepas mutantes de Aga1

### 7.4.1 Bioensayo en medio solido de cepas mutantes de Aga1

Se realizó en primer lugar un bioensayo en medio sólido con cepas transformantes obtenidas por Cruz J., (2009) que presentan diferentes fondos genéticos del gen *aga1*, codificante de la subunidad  $\alpha$  de una proteína G heterotrimérica. Seis de las cepas contienen el alelo *aga1*<sup>G42R</sup>, y expresan por tanto una subunidad G $\alpha$  constitutivamente activa, se nombran como G42R-1 al -6. Cuatro cepas contienen el alelo *aga1*<sup>G203R</sup>, y expresan una subunidad G $\alpha$  constitutivamente inactiva, se nombran G203R-1 al -4. Además se utilizaron dos cepas control, PC43 (que contiene el vector pC43 sin inserto), y WT (cepa silvestre ATCC 11550). En la figura 50 se muestran las cepas crecidas en placas con medio CCM.

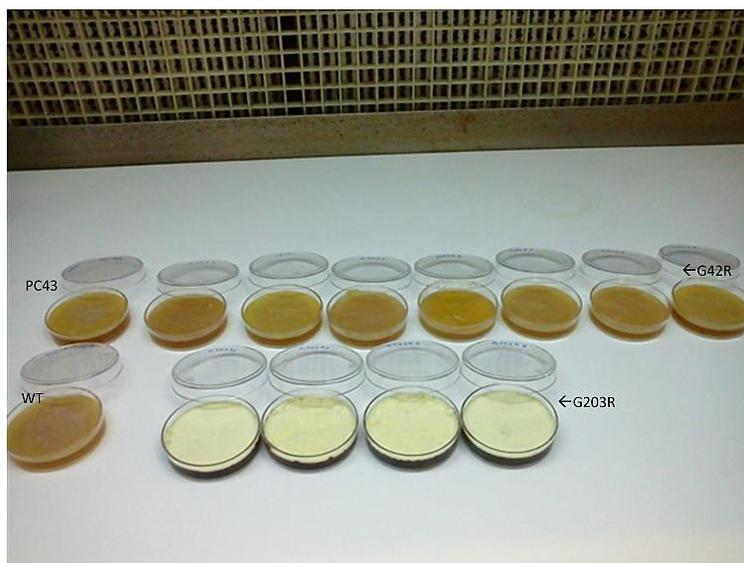


Figura 50. Cepas mutantes de Aga1. Se muestran cepas transformadas con alelos mutantes del gen *aga1*, que presentan los fondos genéticos G42R y G203R, y las cepas control PC43 y WT. Las cepas G203R presentan máxima esporulación.

En la figura 51 se muestran placas del bioensayo en medio sólido, con muestras correspondientes a 120 h de crecimiento (ver Materiales y Métodos sección 6.4.1).

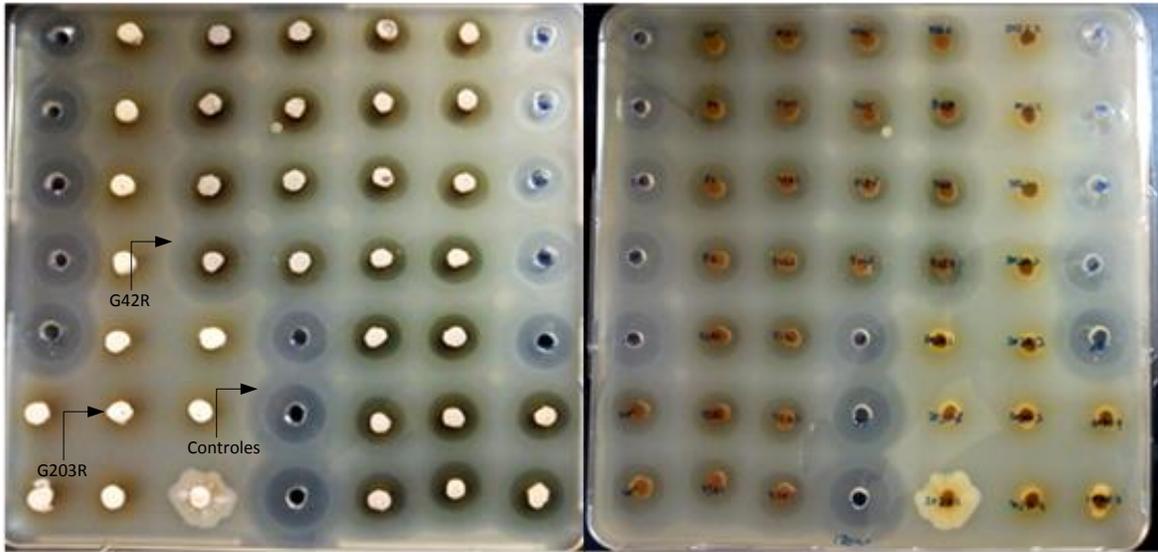


Figura 51. Bioensayo medio sólido. Se muestra el resultado del bioensayo en medio sólido de las muestras crecidas durante 120 h. Nótese que las cepas G203R no presentaron halos de inhibición. La mancha blanca extendida se debe al crecimiento de bacterias.

En la figura 52 se muestra la curva patrón con que se realizaron los cálculos para obtener una estimación de la producción de  $\beta$ -lactámicos totales de las cepas en estudio en medio sólido.

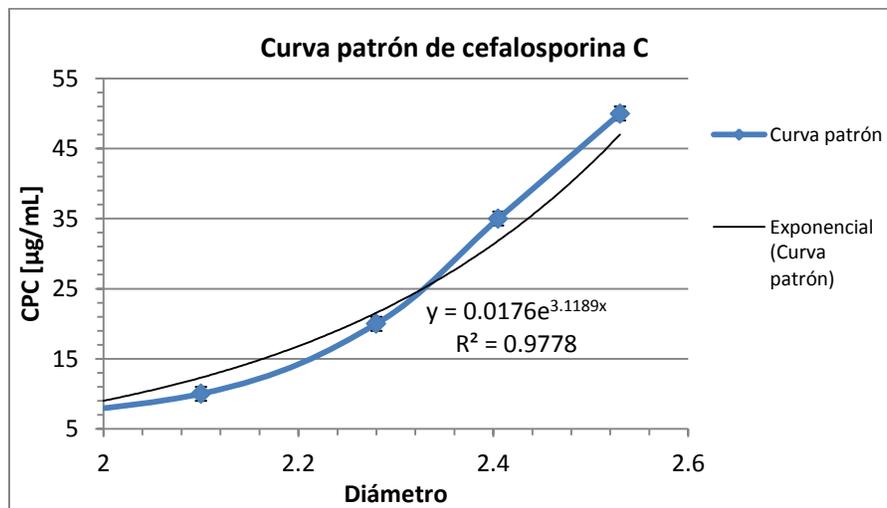


Figura 52. Curva patrón del bioensayo sólido Aga1.

En la figura 53 se muestra la producción de  $\beta$ -lactámicos totales de las cepas con diferentes fondos genéticos de *aga1*. Se observa que no hay producción en las cepas G203R.

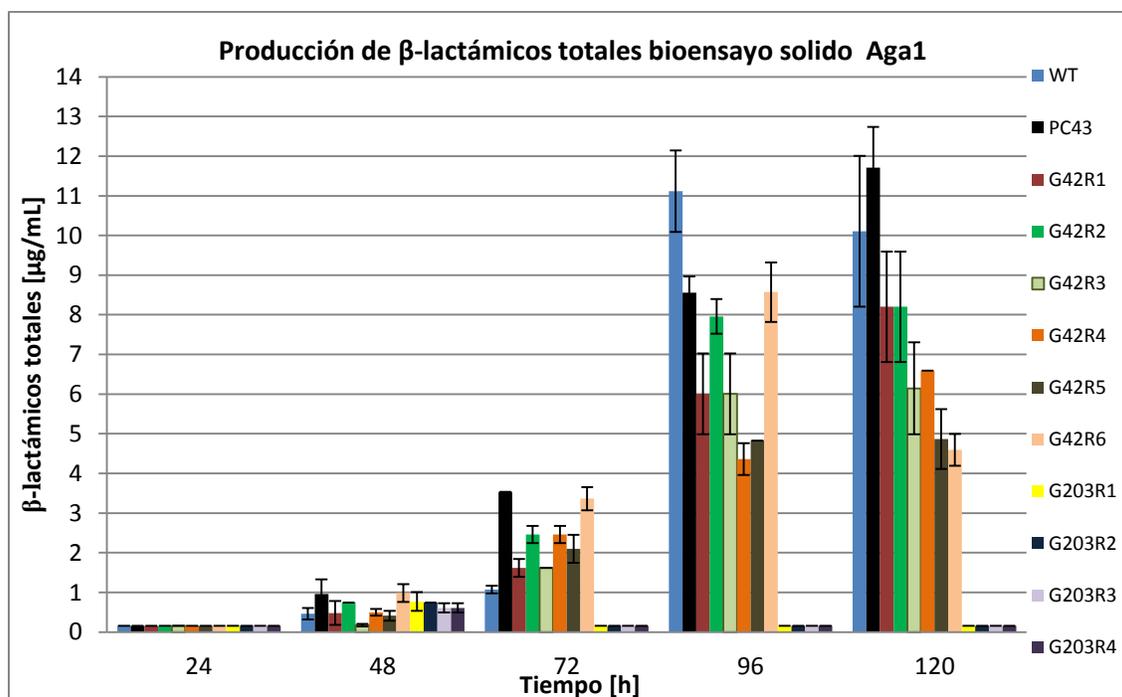


Figura 53. . Producción de  $\beta$ -lactámicos totales en medio sólido de las cepas con diferentes fondos genéticos de *aga1*. En las cepas G42R se observa un retraso en la producción de  $\beta$ -lactámicos totales y una producción ligeramente menor con respecto a las cepas control, mientras que en las cepas G203R no hubo producción. La producción más alta fue entre las 96 y 120 h. Las barras de error son las desviaciones estándar de cada una de las cepas por triplicado.

#### 7.4.2 Producción de CPC en medio líquido de las cepas mutantes de *Aga1*.

Se realizó un cultivo en los medios MSMA y MCFA, tal y como se describe en la sección 6.4.3 de Materiales y Métodos, con las cepas G42R, G203R, y las cepas control PC43 y WT. Se tomaron muestras cada 24 h desde 0 h hasta 120 h de cultivo. No se controló el pH. Se estandarizó el peso de inóculo de las placas CCM a medio MSMA, el cual fue de 0.4556 g por matraz.

Se extrajo la biomasa de cada matraz para determinar el peso seco y extraer ARN y ADN a partir del micelio. En las cepas G203R el micelio no permaneció en suspensión, como en los controles y las cepas G42R, más bien se pegó al matraz como si creciera en forma de pellets en el fondo del mismo. Se congeló la biomasa con nitrógeno líquido para la posterior extracción de ADN y ARN.

En el figura 54 se muestra la curva patrón con que se realizaron los cálculos para saber la producción de  $\beta$ -lactámicos totales.

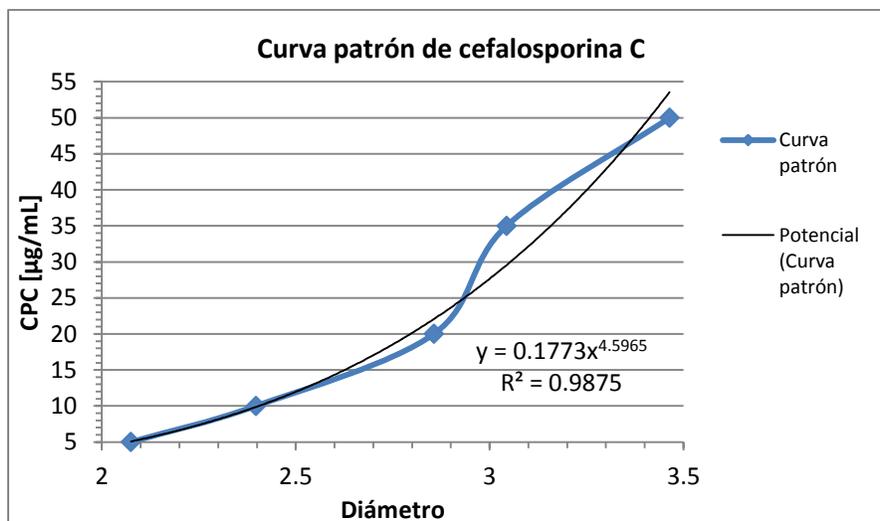


Figura 54. Curva patrón del bioensayo 1 líquido de Aga1.

En la figura 55 se muestran los niveles de producción de  $\beta$ -lactámicos de las cepas en estudio. Los controles y las cepas G42R producen cefalosporina hasta las 48 h de cultivo, sin embargo las cepas G203R no producen en ninguno de los tiempos.

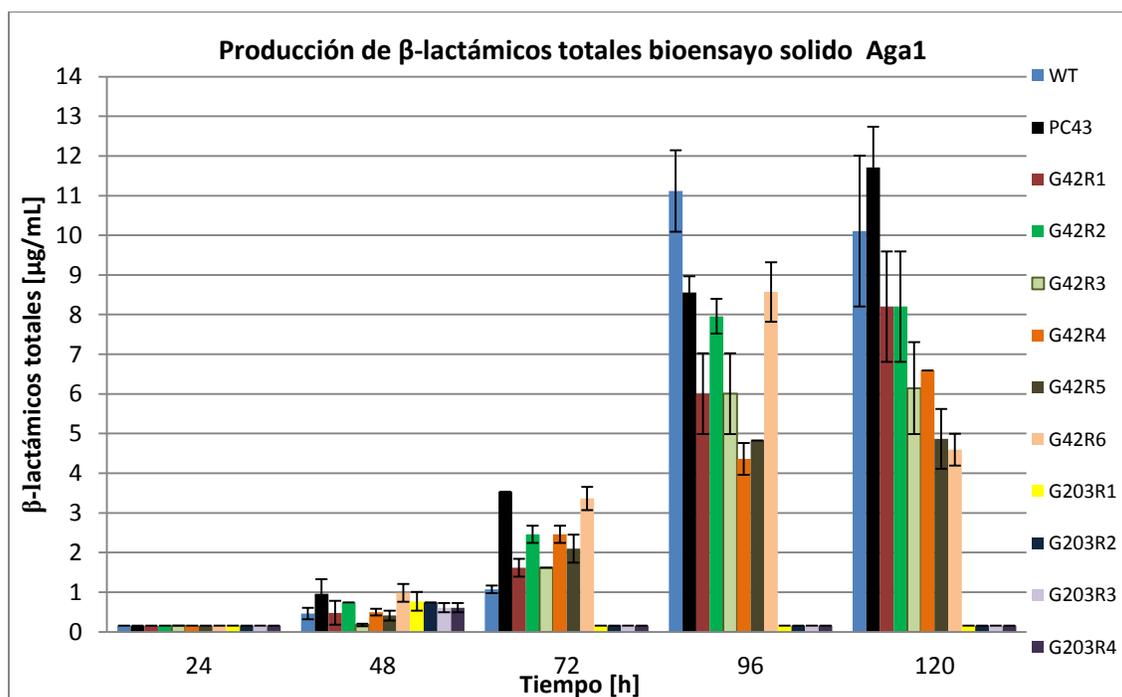


Figura 55. Producción de  $\beta$ -lactámicos totales en medio líquido de las cepas mutantes de Aga1. Se observa una producción temprana en los controles y cepas G42R, sin embargo las G203R no produjeron en toda la fermentación. Las barras de error son las desviaciones estándar de cada una de las cepas por triplicado.

Debido a que el crecimiento de las cepas G203R fue muy diferente al de los controles y las cepas G42R, no se tomó el micelio que creció alrededor del matraz, por lo



que el peso de la biomasa obtenido en estas cepas fue inferior a las otras, como se muestra en la figura 56.

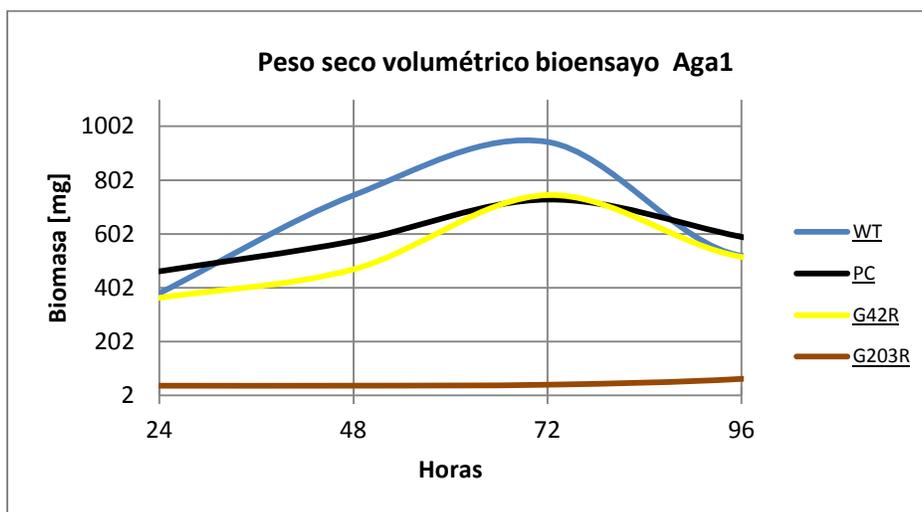


Figura 56. Peso seco de la biomasa del cultivo en medio líquido de los mutantes de Aga1. Se observa muy poca biomasa en las cepas G203R.

En la figura 57 se muestra el comportamiento del pH durante el cultivo, observándose una tendencia a un pH inferior a lo largo de todo el cultivo en las cepas G203R.

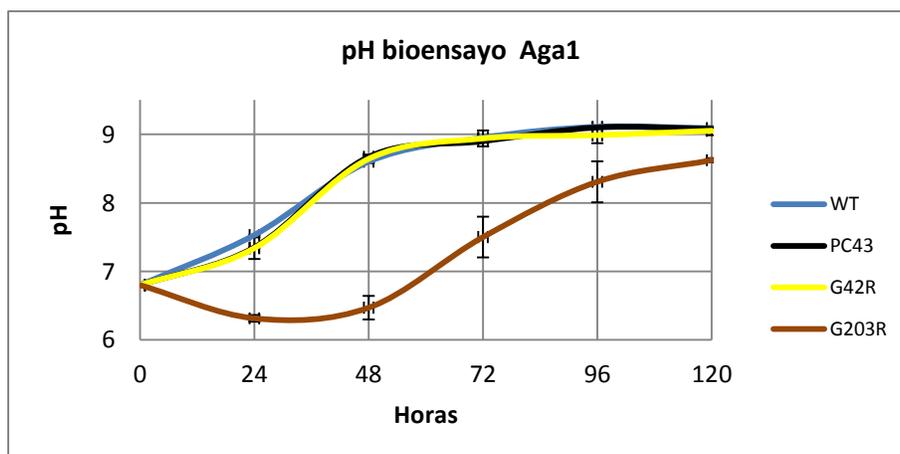


Figura 57. pH del bioensayo 1 en medio líquido de Aga1. Se observa un comportamiento diferente en el caso de las cepas G203R.



### 7.4.3 Producción de CPC en medio líquido tamponado de las cepas mutantes de Aga1

#### 7.4.3.1 Experimento para controlar el pH de la fermentación

Para comprobar a qué concentración de MOPS se lograba amortiguar el pH del cultivo se diseñó un experimento con tres concentraciones diferentes de MOPS: 0.1, 0.5 y 1 M. en las siguientes figuras se muestran los resultados obtenidos.

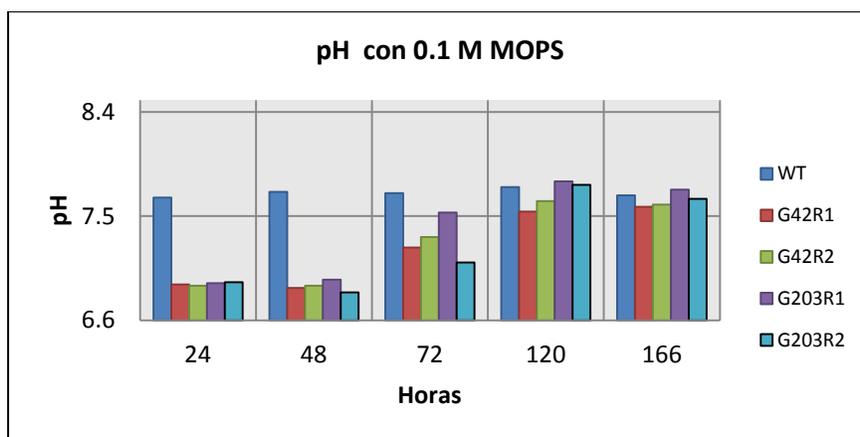


Figura 58. Valor de pH en cultivos de medio MCFA adicionado con MOPS al 0.1 M. Se observa más variación en el pH.

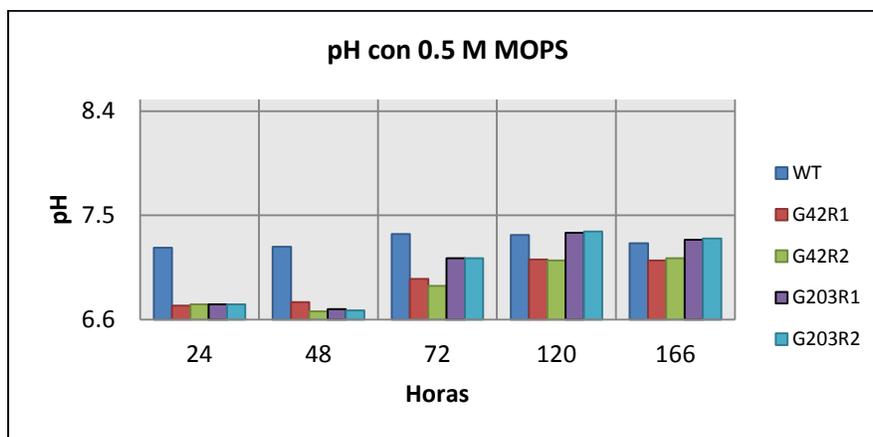


Figura 59. Valor de pH en cultivos de medio MCFA adicionado con MOPS al 0.5 M. Se observa menos variación en el pH.

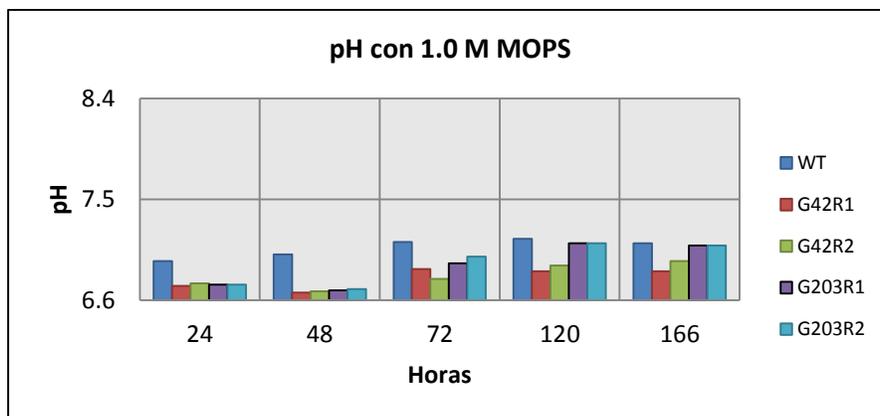


Figura 60. Valor de pH en cultivos de medio MCFA adicionado con MOPS al 1.0 M. Se observa una estabilidad mayor en el pH.

Se obtuvieron mejores resultados con las concentraciones de MOPS al 0.5 y 1.0 M respectivamente, sin embargo no se consideró la concentración de 1.0 M, ya que esta concentración tan elevada puede afectar la producción de  $\beta$ -lactámicos totales. A continuación se muestran los resultados del efecto de MOPS en la producción (figs.61, 62 y 63).

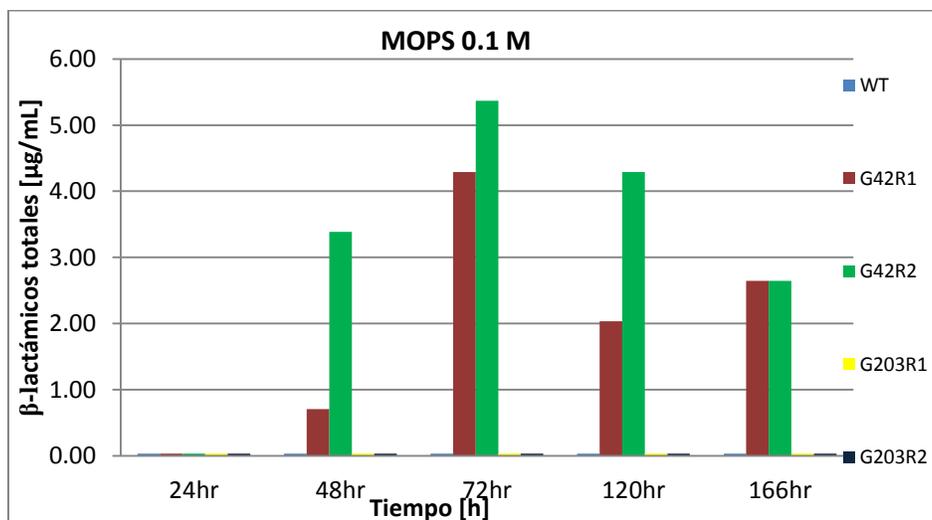


Figura 61. Efecto de la concentración de MOPS al 0.1 M en la producción de  $\beta$ -lactámicos totales. No hay efecto sobre la producción, pero no se controla el pH como se vio en el resultado de la figura 63.

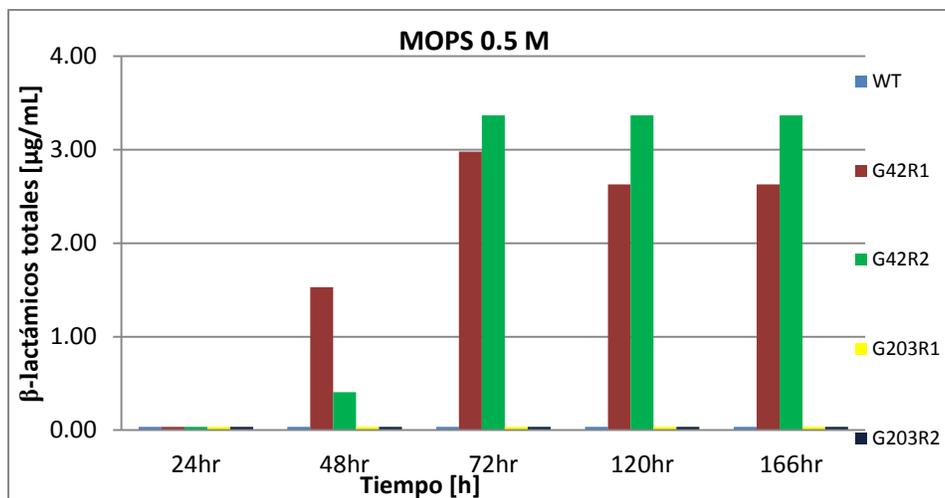


Figura 62. Efecto de la concentración de MOPS al 0.5 M en la producción de  $\beta$ -lactámicos totales. Se observa que una concentración de MOPS al 0.5 M no afecta significativamente la producción, sin embargo si controla el pH.

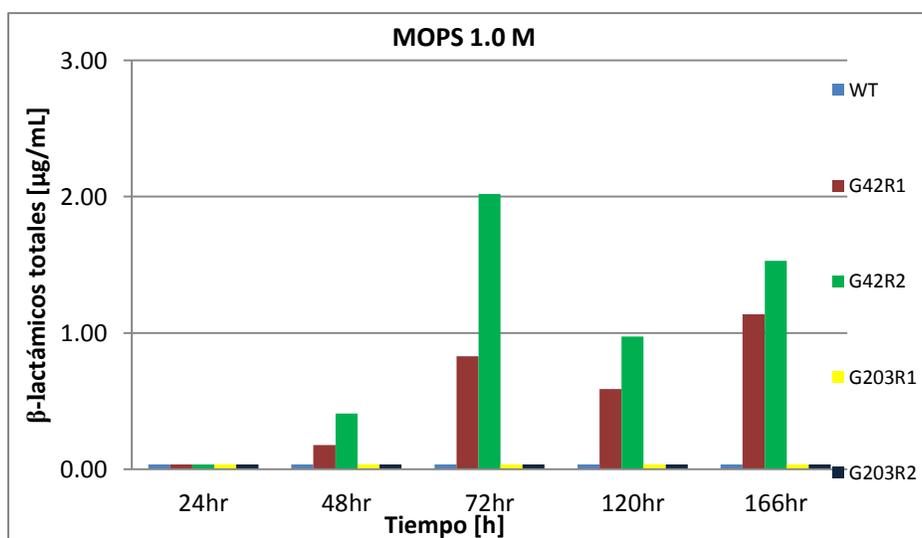


Figura 63. Efecto de la concentración de MOPS al 1.0 M en la producción de  $\beta$ -lactámicos totales. Se observa que una concentración de MOPS al 1.0 M si afecta la producción.

Teniendo en cuenta estos resultados, se realizó un nuevo cultivo de producción de CPC de los transformantes de Aga1 con el medio tamponado con MOPS a una concentración de 0.5 M.



### 7.4.3.2 Cultivos para producción de CPC en medio líquido tamponado de las cepas mutantes de Aga1

Una vez establecida la mejor concentración de MOPS para controlar el pH sin afectar la producción de antibiótico se llevó a cabo un nuevo cultivo de las cepas mutantes de Aga1, a pH controlado, para descartar el factor pH en la producción, ya que se ha reportado que el pH afecta la expresión de los genes de cefalosporina y la producción de la misma (Schmitt et al. 2001).

Con las muestras obtenidas de estos cultivos se realizaron bioensayos, teniéndose en cuenta las réplicas biológicas y técnicas para realizar los cálculos de producción de  $\beta$ -lactámicos totales. En el apéndice 3 se muestran los halos de inhibición de las placas del bioensayo.

En las siguientes figuras se muestran las curvas estándar en dos modalidades, solo con fines ilustrativos, la primera de forma exponencial y la segunda en forma lineal, la cual fue obtenida con el logaritmo natural y ajustando a una recta. Los dos modelos matemáticos que se muestran en las figuras 64 y 65 dan el mismo resultado ya que una deriva de otra. En el caso del modelo lineal debe usarse el antilogaritmo para obtener las concentraciones.

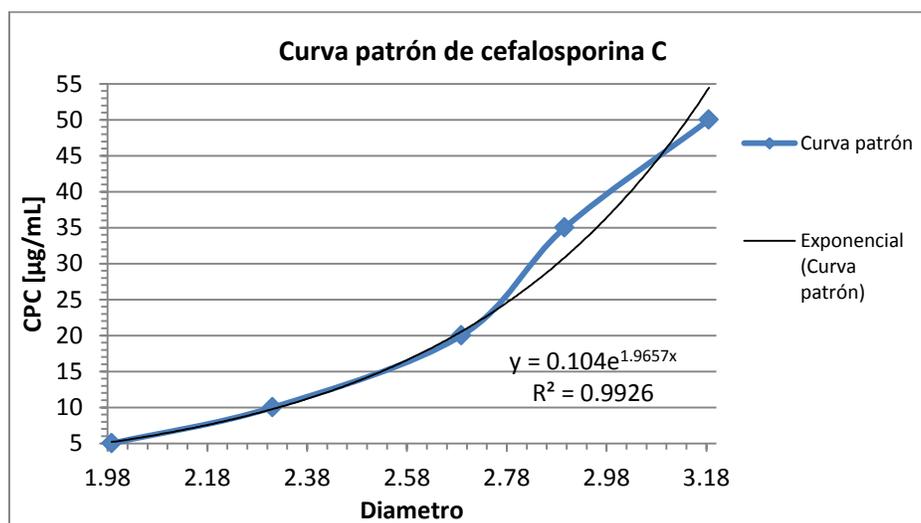


Figura 64. Curva patrón del bioensayo 2 líquido de Aga1.

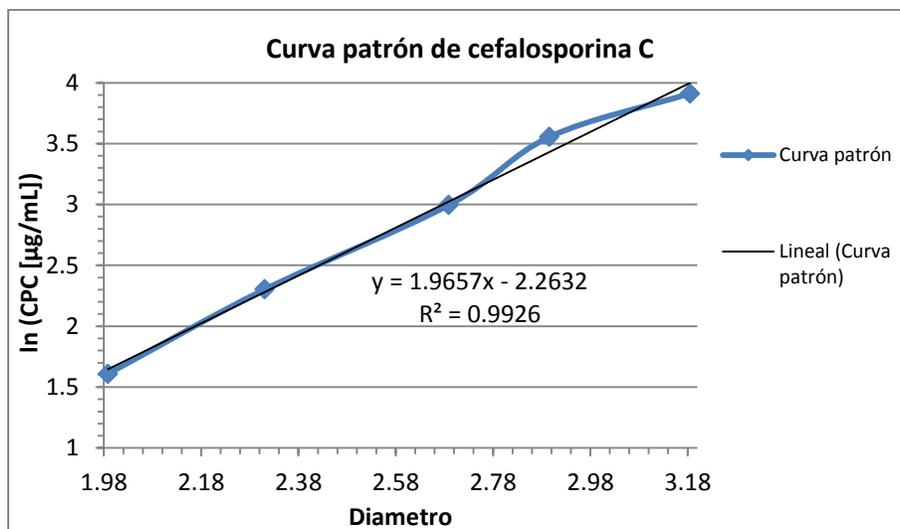


Figura 65. Curva patrón del bioensayo 2 liquido de Aga1 en forma lineal.

Los resultados del bioensayo permitieron elaborar la gráfica que se muestra en la figura 66. Se observa que la producción de  $\beta$ -lactámicos totales se mantuvo por más tiempo en este cultivo, probablemente debido al control del pH. Como se puede observar en la gráfica, las cepas control y G42R produjeron  $\beta$ -lactámicos totales, pero no hubo producción en las cepas G203R.

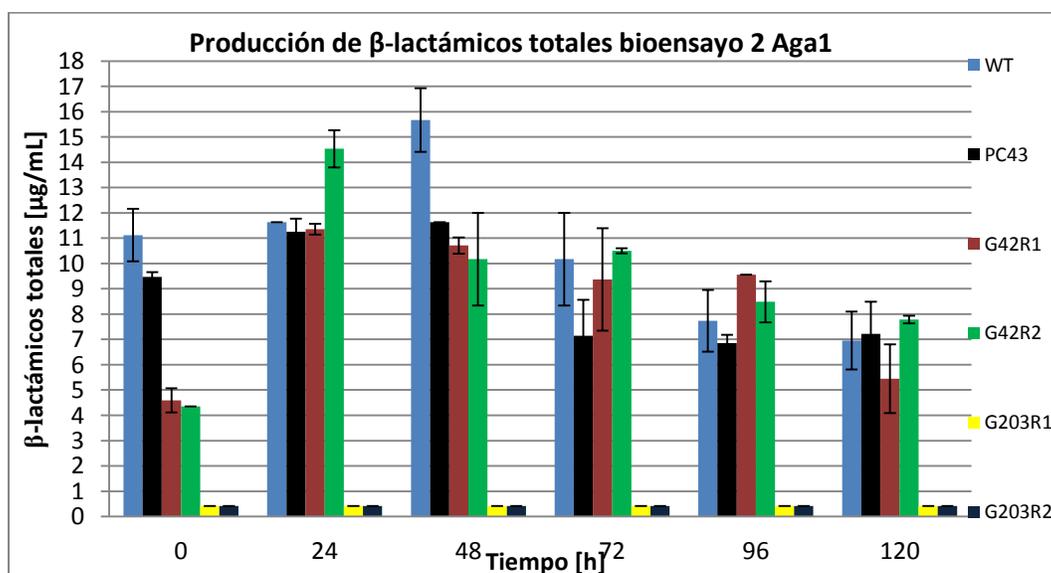


Figura 66. Producción de  $\beta$ -lactámicos totales en cultivo de las cepas Aga1 a pH controlado. Se observa una producción de  $\beta$ -lactámicos por más tiempo en los controles y cepas G42R, sin embargo las cepas G203R no produjeron antibiótico a lo largo del cultivo.



La figura 67 muestra el comportamiento de pH durante toda la fermentación manteniéndose alrededor de 7.5.

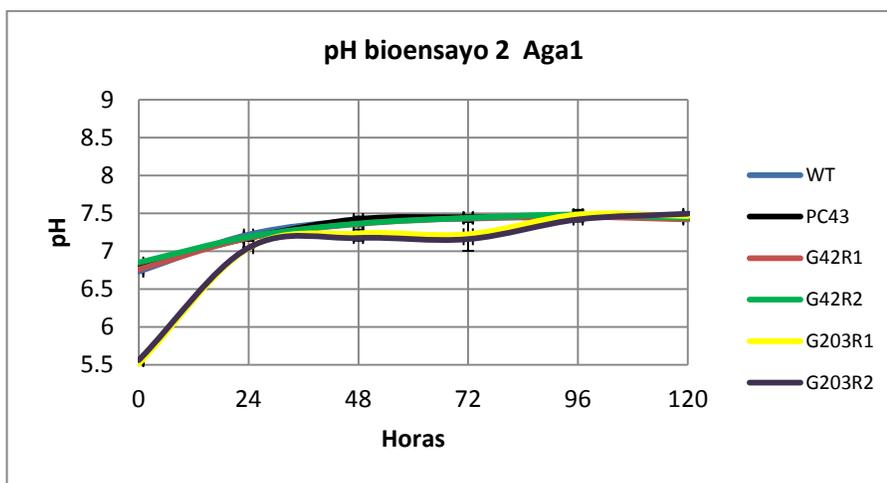


Figura 67. pH de los cultivos en medio tamponado de las cepas mutantes de Aga1. Se observa que en el tiempo cero, cuando las cepas están en medio MSMA, las G203R acidifican el medio mientras que las demás lo mantienen. Posteriormente, ya en medio MCFA con MOPS 0.5 M el pH se mantiene alrededor de 7.5.

En la figura 68 se muestra el peso seco obtenido en este cultivo en medio sólido. Se observaron variaciones no esperadas en las cepas WT, G42R 1 y 2, por lo cual se repitieron los cultivos de estas cepas.

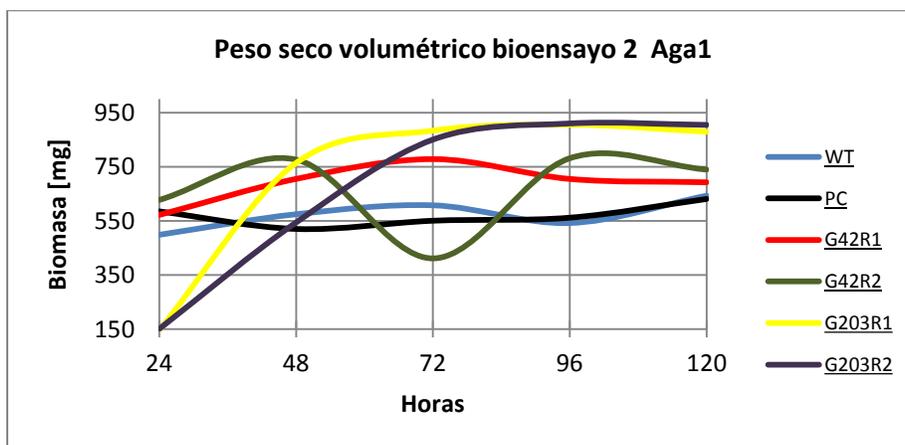


Figura 68. Peso seco del cultivo en medio líquido tamponado de las cepas mutantes de Aga1. Se presentaron variaciones en las cepas WT, G42R 1 y 2, por lo cual fue necesario repetir las fermentaciones de estas cepas.

En la figura 69 se muestra el peso seco de las cepas que se repitieron junto con los pesos secos de las otras cepas (ya mostrados en la figura 68).

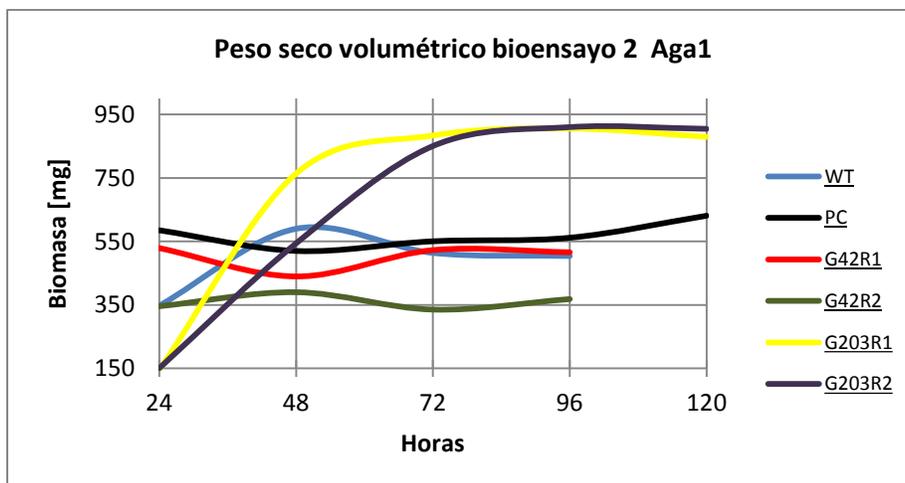


Figura 69. Peso seco del nuevo cultivo en medio líquido tamponado de las cepas mutantes de Aga1.

Con los resultados de peso seco se obtuvo la producción específica de  $\beta$ -lactámicos totales de los cultivos en medio líquido de las cepas Aga1, la cual se muestra en la figura 70.

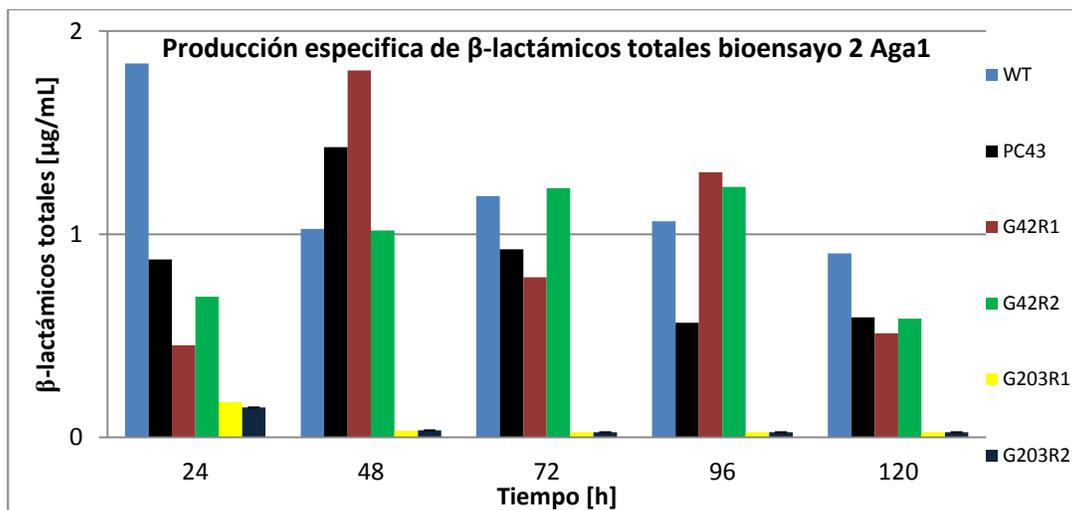


Figura 70. Producción específica de  $\beta$ -lactámicos totales del cultivo en medio líquido de las cepas Aga1. Se observa que la producción se mantiene por más tiempo con respecto a los cultivos a pH libre (figura 60). Las cepas control produjeron cantidades similares o ligeramente más elevadas que las cepas G42R. Las cepas G203R no dieron producción, a pesar de que se observe a las 24 h, pero esto es debido a un error cuando se toma el diámetro del boquete en la caja del bioensayo y a que se toma la biomasa para hacer el cálculo.



Tanto en el cultivo a pH libre como a pH tamponado con MOPS, las cepas G203R no produjeron antibiótico, y las cepas G42R produjeron una cantidad ligeramente menor que las cepas control. Se puede por tanto concluir que es necesaria la actividad de la subunidad  $\alpha$  Aga1 para la producción de cefalosporina, sin embargo la activación constitutiva de Aga1, y por tanto la señalización constitutiva de la proteína G heterotrimérica de la que forma parte, no resulta en un aumento de la producción. En contraste, en *Penicillium chrysogenum*, productor del antibiótico  $\beta$ -lactámico penicilina, la activación constitutiva de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, Pga1, sí provoca un aumento en la producción del antibiótico (García-Rico et al. 2008b).

### **7.5 Características fenotípicas de las cepas mutantes de Aga1**

Se realizaron microcultivos de las cepas control y las transformantes de Aga1 obtenidas por Cruz J. (2009), ya que al parecer las cepas G203R presentaron un fenotipo diferente a los controles y las G42R.

Se observaron al microscopio óptico a 40x y 100x microcultivos crecidos durante 48, 96 y 170 h. En las figuras 71-76 las observaciones al microscopio de los mismos.

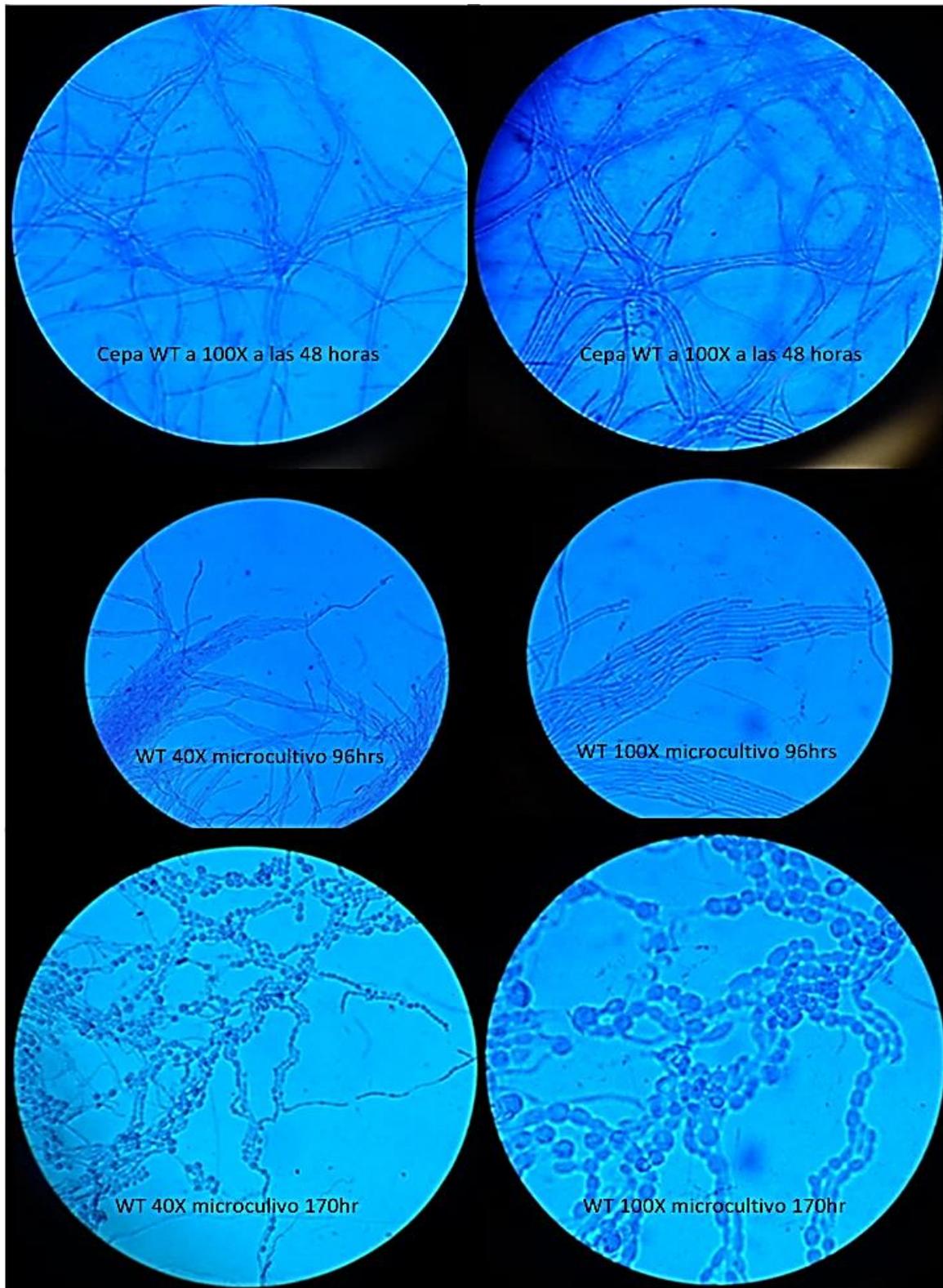


Figura 71. Observación al microscopio cepa WT. Se muestra la cepa WT vista al microscopio a 40 y 100x a las 48, 96 y 170 hrs. Se observa que a las 170 hrs. las hifas están hinchadas y próximas a la fragmentación.

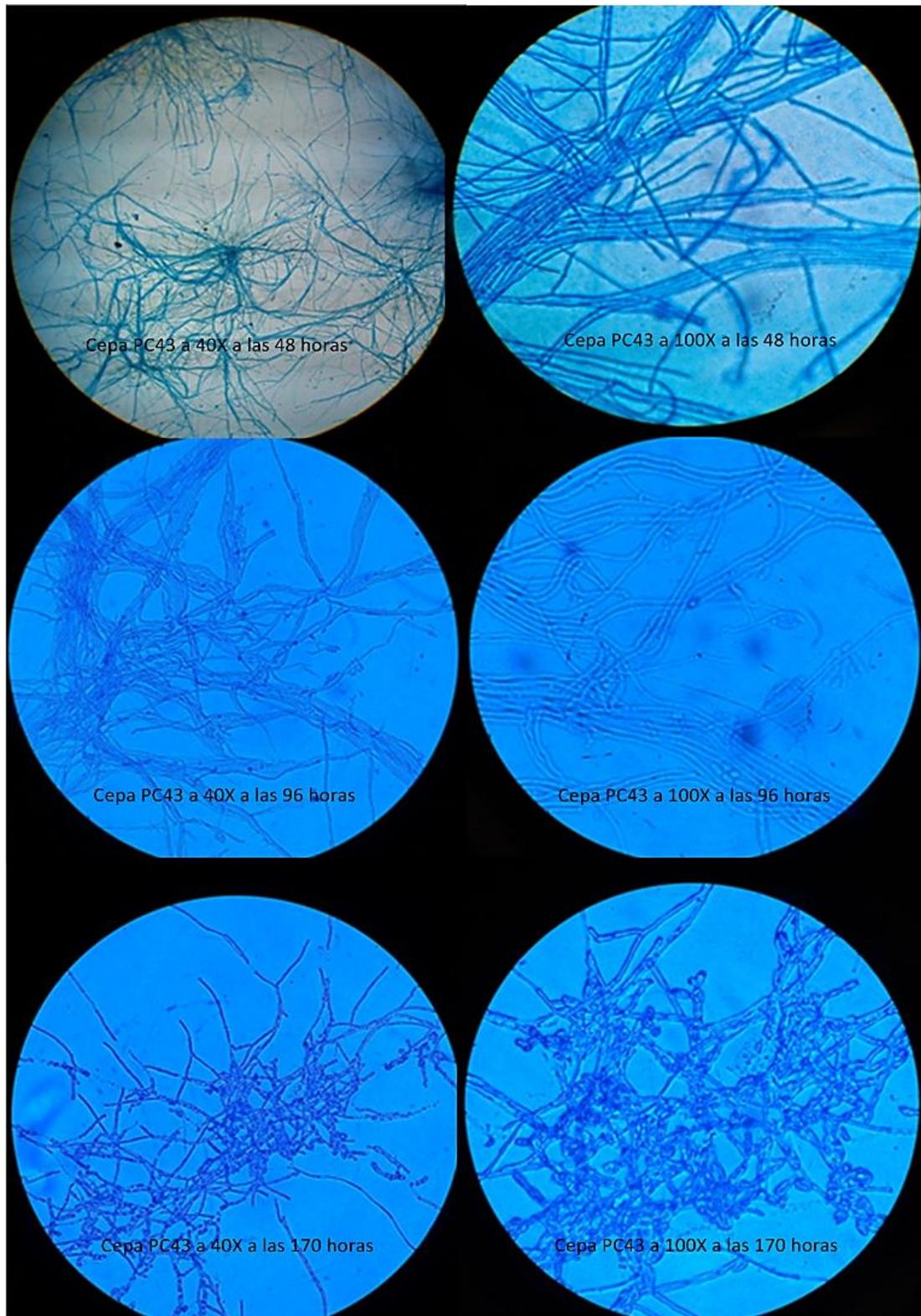


Figura 72. Observación al microscopio cepa PC43. Se muestra la cepa PC43 vista al microscopio a 40 y 100x a las 48, 96 y 170 hrs. Se observa que a las 170 hrs. las hifas están hinchadas y próximas a la fragmentación. También se observa la similitud morfológica respecto a la cepa WT ya que es el control negativo de las transformantes.



Las cepas transformadas con el vector sin inserto (control negativo) mostraron similitud morfológica respecto a la cepa WT. Sin embargo en este trabajo no se hicieron pases con fleomicina para determinar si realmente contenían este marcador molecular a la hora que fueron transformadas.

En las figuras 73 y 74 se muestran las imágenes de la cepas G42R1. La morfología de las cepas G42R fue muy similar a los controles (WT y PC43). En algunas imágenes se observan los septos del micelio, al parecer es indicativo de la fragmentación. También se muestran artrosporas a las 120 hrs.

En las figuras 75 y 76 se muestran las imágenes de la cepas G203R.

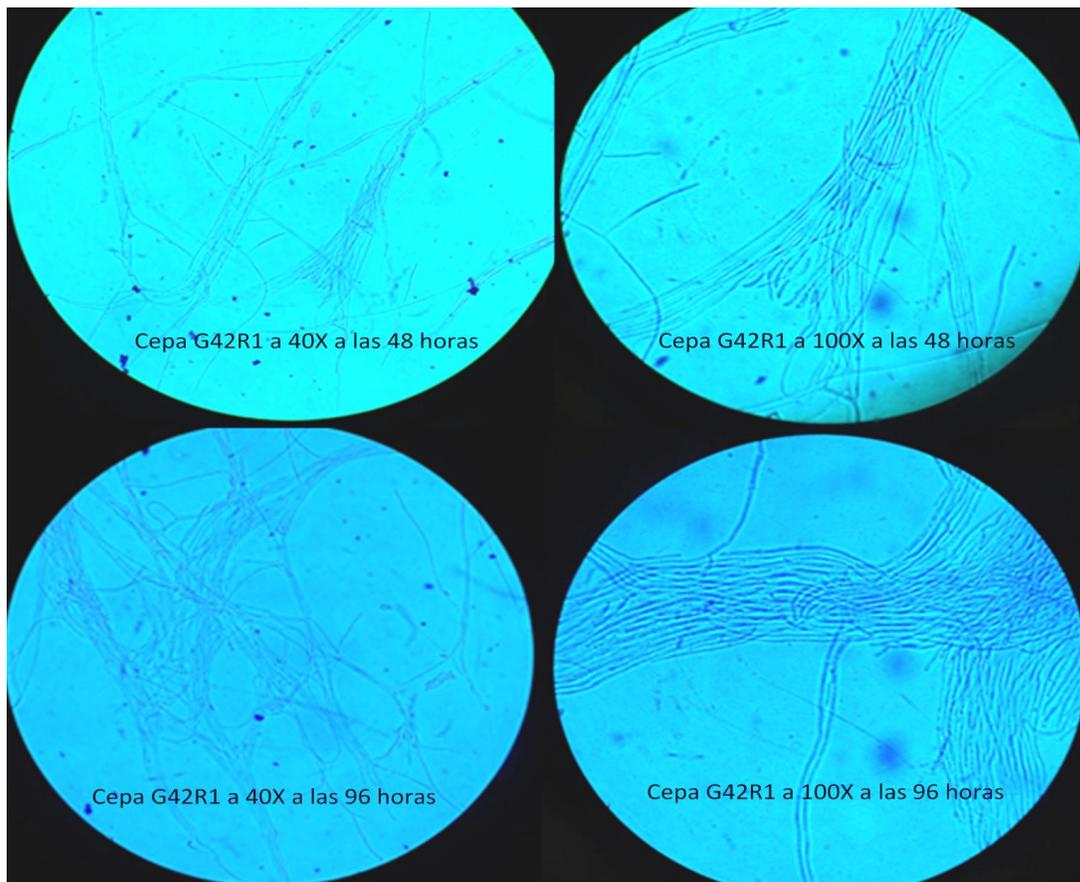


Figura 73. Observación al microscopio cepa G42R1. Se muestra la cepa G42R1 vista al microscopio a 40 y 100x a las 48, 96 y 170 hrs. Se observa que a las 96 hrs. las hifas están hinchadas y próximas a la fragmentación.

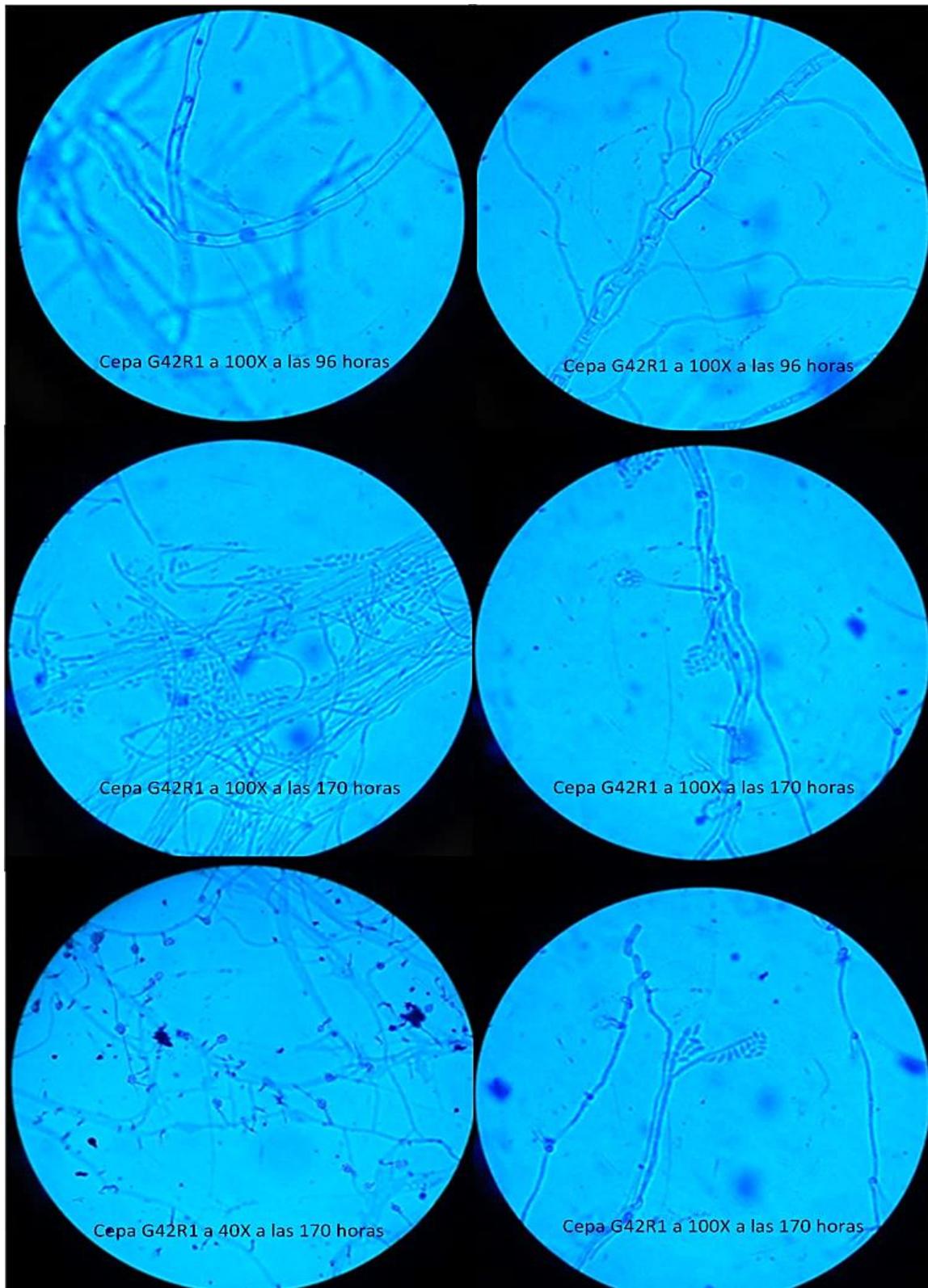


Figura 74. Observación al microscopio cepa G42R1. Se muestra la cepa G42R1 vista al microscopio a 40 y 100x a las 48, 96 y 170 hrs. Se observa que a las 96 hrs. las hifas están hinchadas y próximas a la fragmentación. También se observa artrosporas a las 170 hrs. La cepa G42R1 también presenta mucha similitud respecto a los controles.

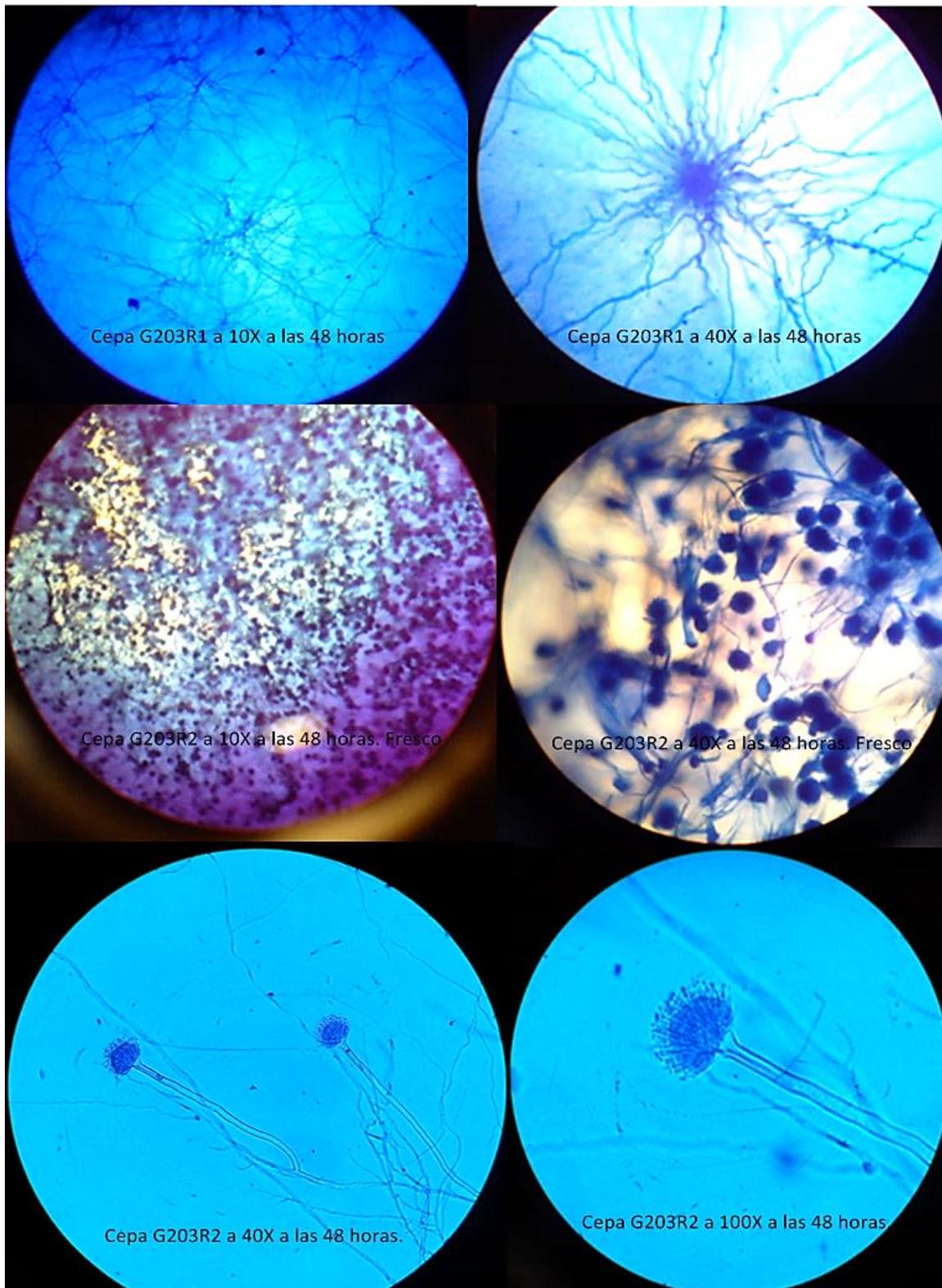


Figura 75. Observación al microscopio cepas G203R. Se muestran las cepas G203R vista al microscopio a 40 y 100x a las 48, 96 y 170 hrs. Se observa un crecimiento morfológico muy diferente respecto a los controles y la G42R1, presentando muchas esporas con cuerpos fructíferos en forma de conidios. Algunas presentaron un micelio raquíutico.

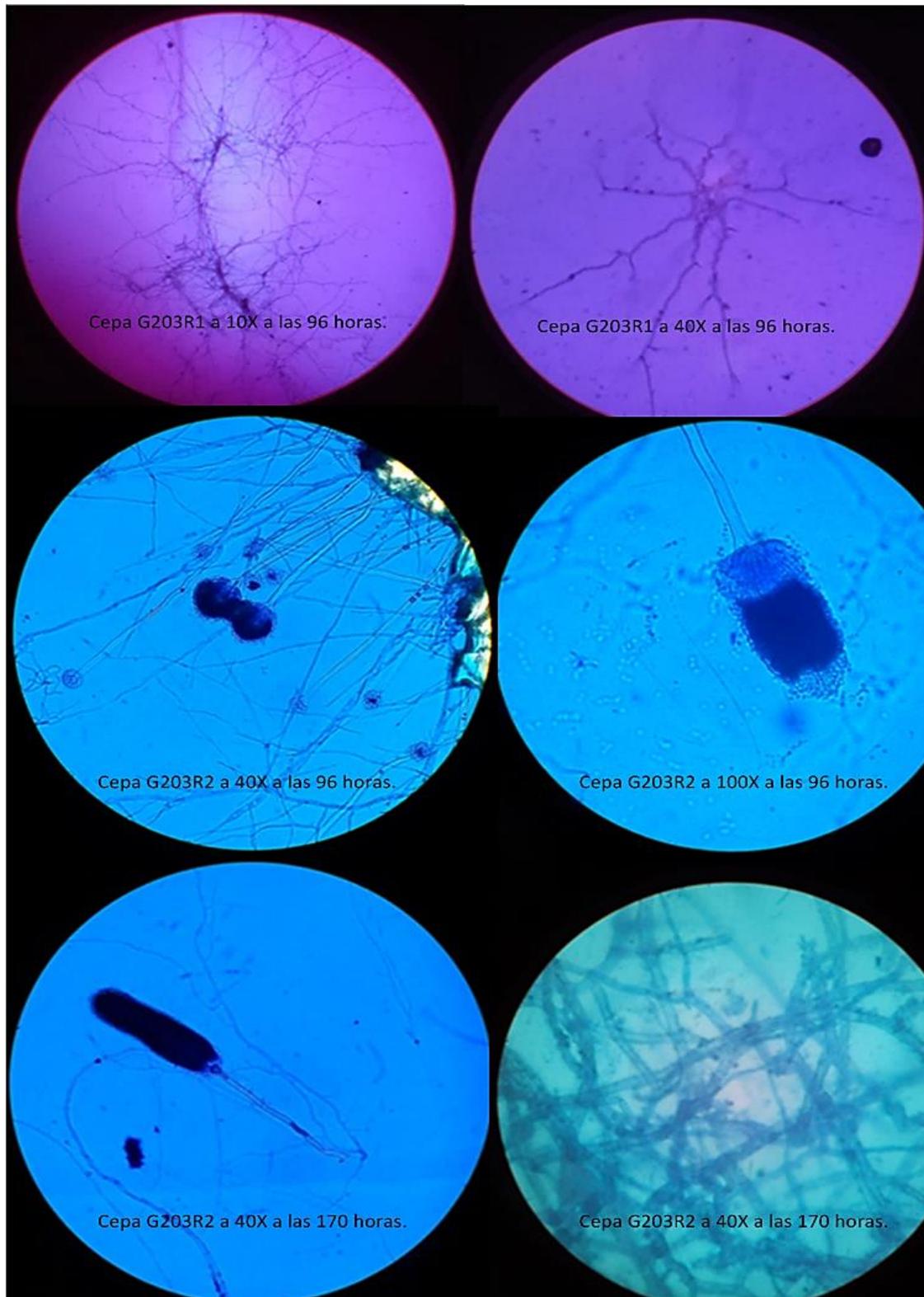


Figura 76. Observación al microscopio cepas G203R. Se muestran las cepas G203R vista al microscopio a 40 y 100x a las 48, 96 y 170 hrs. Se observa un crecimiento morfológico muy diferente respecto a los controles y la G42R1, presentando muchas esporas con cuerpos fructíferos en forma de conidios. Algunas presentaron un micelio raquítrico.



En las figuras 71-76 se muestran algunas características fenotípicas de las cepas WT, PC43, G42R y G203R, para compararlas entre sí, encontrándose diferencias muy importantes de las cepas G203R con respecto al resto. Estas cepas mostraron una morfología diferente a lo que está reportado en la bibliografía, ya que presentaron una esporulación muy fuerte de color blanco y muy hidrofóbica. Vista al microscopio se pudieron observar conidiosporas de forma redondeada y sus cuerpos fructíferos. En la bibliografía (INSPQ, 2011; Tangarife, 2011) se describe que las variedades de *Acremonium ssp.* no presentan un tipo de reproducción semejante, sin embargo se utilizaron estas cepas para hacer el análisis de expresión génica mediante tiempo real. No se analizaron molecularmente para poder determinar si se trataba de otro microorganismo.

Existe la posibilidad de que las cepas transformantes G203R que se han utilizado en este trabajo no sean *Acremonium chrysogenum*, sino una contaminación por otro hongo filamentoso de los utilizados en el laboratorio. A continuación se muestra la morfología de *Aspergillus terreus*, uno de los hongos de los que pueda tratarse.



Figura 77. *Aspergillus terreus*. Se muestra una imagen al microscopio óptico en 40x de *Aspergillus terreus*. La morfología es muy parecida a las cepas G203R.  
<http://microfungi.truman.edu/showGallery.php?div=Anamorphic&gen=Aspergillus&spec=terreus&id=157>



## 7.6 Análisis de expresión de los genes relacionados con la producción de CPC en cepas mutantes de Aga1 mediante RT-qPCR

### 7.6.1 Diseño de los primers para RT-qPCR de los genes *gpd*, *cefD1* y *cefG*

Los primers se diseñaron bajo las consideraciones del apartado 6.9.3.1 Diseño de primers, tanto para el control endógeno (*gpd*), como para dos genes de la ruta de Cefalosporina C, los cuales fueron *cefD1* y *cefG*. Se analizaron dos genes para obtener más datos de cómo se está regulando la biosíntesis de CPC en las cepas con los fondos genéticos de *aga1*<sup>G42R</sup> y *aga1*<sup>G203R</sup>. Cada uno de estos genes pertenece a uno de los *clusters* de biosíntesis de cefalosporina; el gen *cefD1* al *cluster* temprano, y el gen *cefG* al *cluster* tardío, y el análisis de los dos genes aportaría información sobre la regulación en ambos.

A continuación muestro como se diseñó los primers *gpd*. Se buscó la secuencia nucleotídica del gen ***gpd*** en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/2171592>), la cual se descargó en formato .fasta, y se abrió con el programa MEGA 5.2. Con ayuda de la base de datos NCBI, se pudo saber en qué nucleótido se encuentra el primer intrón, entonces en MEGA 5.2, se pegó otra secuencia pero recortando el segmento del primer intrón. En diferentes casos NCBI da la opción de obtener la secuencia nucleotídica en forma de ARNm o CDS (secuencia codificante) la cual es de mucha utilidad ya que no tiene los intrones, o facilita el recorte de estos. En la figura 78 se muestra en la primera fila (de colores) la secuencia donde se encuentra el intrón, en la segunda fila (de color amarillo) se muestra la secuencia ya sin el intrón, y las dos últimas filas amarillas las secuencias con ausencia de los nucleótidos de primer intrón.

Posteriormente se tomó un segmento de la segunda fila de color amarillo de 120 nucleótidos aproximadamente (ver figura 78) con el fin de diseñar un par de primers, y con ayuda del programa Primer 3 se buscó el par de primers que hibridaran mejor entre el exón 1 y el exón 2, dando los siguientes grupos de primers como se muestra en la figura 79.

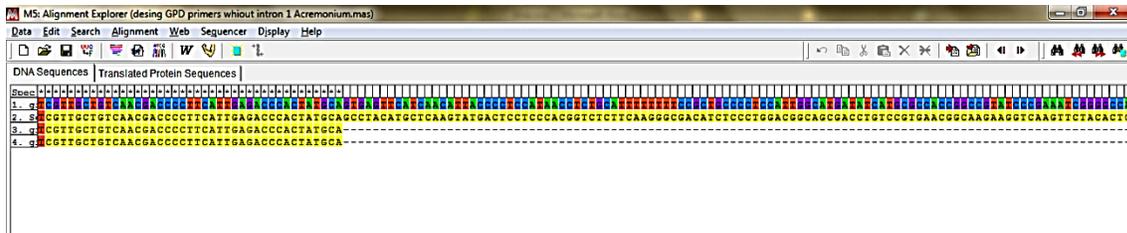


Figura 78. Secuencia *gpd* en el primer intrón en MEGA 5.2. Se muestra la primera hilera de colores, la secuencia donde se encuentra el intrón, en la segunda hilera se muestra la secuencia ya sin el intrón ya unida con el segundo exón y las dos últimas hileras amarillas las secuencias con ausencia de los nucleótidos de primer intrón.

En la figura 80 se muestra que el primer izquierdo de la figura 79 seleccionado, el cual tiene la mitad de nucleótidos del primer exón y la otra mitad del segundo exón lo cual llevó a escogerlos como posibles primers, sin embargo, es necesario saber la eficiencia del par de primers (*in-silico*) cuando se utilizan en análisis de expresión génica mediante RT-qPCR, lo cual se logró con ayuda de la herramienta PCR efficiency Calculator. La eficiencia *in-silico* fue mayor de dos lo que indica que el par de primers seleccionado van a amplificar bien en los ensayos de RT-qPCR tal como se muestra en la figura 81.

ADDITIONAL OLIGOS

	start	len	tm	gc%	any	3' seq
1 LEFT PRIMER	11	20	58.99	50.00	5.00	1.00 AACGACCCCTTCATTGAGAC
RIGHT PRIMER	92	20	59.95	50.00	5.00	3.00 AGATGTCGCCCTTGAAGAGA
PRODUCT SIZE: 82, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 3.00						
2 LEFT PRIMER	34	21	59.10	47.62	7.00	2.00 CTATGCAGCCTACATGCTCAA
RIGHT PRIMER	137	20	59.33	50.00	2.00	0.00 ACTTGACCTTCTTGCCGTTT
PRODUCT SIZE: 104, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00						
3 LEFT PRIMER	33	22	59.93	45.45	7.00	2.00 ACTATGCAGCCTACATGCTCAA
RIGHT PRIMER	137	20	59.33	50.00	2.00	0.00 ACTTGACCTTCTTGCCGTTT
PRODUCT SIZE: 105, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00						
4 LEFT PRIMER	20	22	60.13	45.45	5.00	2.00 TTCATGAGACCCACTATGCAG
RIGHT PRIMER	137	20	59.33	50.00	2.00	0.00 ACTTGACCTTCTTGCCGTTT
PRODUCT SIZE: 118, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00						

Statistics

Figura 79. Primers *gpd* diseñados con el programa Primer 3. Se muestran diferentes opciones de primers que da el programa Primer 3. Se tomó la opción 3 para evaluar la eficiencia del par de primers.

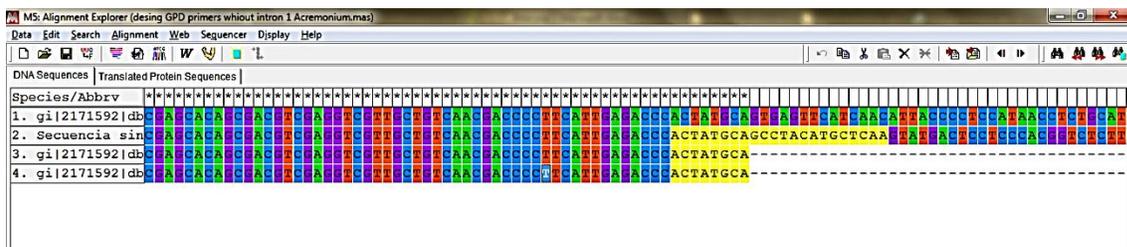


Figura 80. Primer *gpd* diseñado en la región de unión de los dos exones. Se muestra en la segunda fila como el primer izquierdo (left) contiene secuencias pertenecientes al exón 1 y al exón 2.



Please fill out this form: 'Amplicon sequence' field is mandatory.

Sequence name:

Forward sequence:

Reverse sequence:

Amplicon sequence:

Optimum product size:

Optimum primer Tm:

Optimum primer length:

Salt concentration:

Number of primer pairs to return:

Max Tm difference between primers:

Number of GCs flanking primer sequence:

Optimum primers GC content:

DNA concentration:



### Tool description

Primer Efficiency is an open source tool which allows PCR efficiency estimation. Documentation is available.

### Efficiency calculator output

Forward: ACTATGCAGCCTACATGCTCAA (GC content: 0.454545454545, length: 22)  
 Reverse: ACTTGACCTTCTTGCCGTTTC (GC content: 0.5, length: 20)  
 Expected efficiency: >2  
 Amplicon:  
 ACTATGCAGCCTACATGCTCAAAGTATGACTCCTCCACGGTCTCTTCAAGGGCGACATCTCCCTGGACGGCAAGGTCGCGTGAACGGCAAGAAGGTCAAGT

### Categories:

- License
- Documentation
- Examples
- Lab's main page
- Other tools
- Feedback



Figura 81. Eficiencia *in silico* de primers *gpd*. Se muestra el input y output de PCR Efficiency Calculator para calcular la eficiencia del par de primers seleccionados. <http://srvgen.upct.es/index.html>.

A continuación se realizó otro análisis *in-silico* con ayuda del programa Poland para saber a qué temperatura (Tm) el amplicón de los primers obtenidos se disocia, con el fin de predecir en los ensayos de RT-qPCR si hay presencia de dímeros de primers o productos no específicos que pudieran interferir en los resultados o alterarlos. La figura 82 muestra el resultado obtenido con este programa.

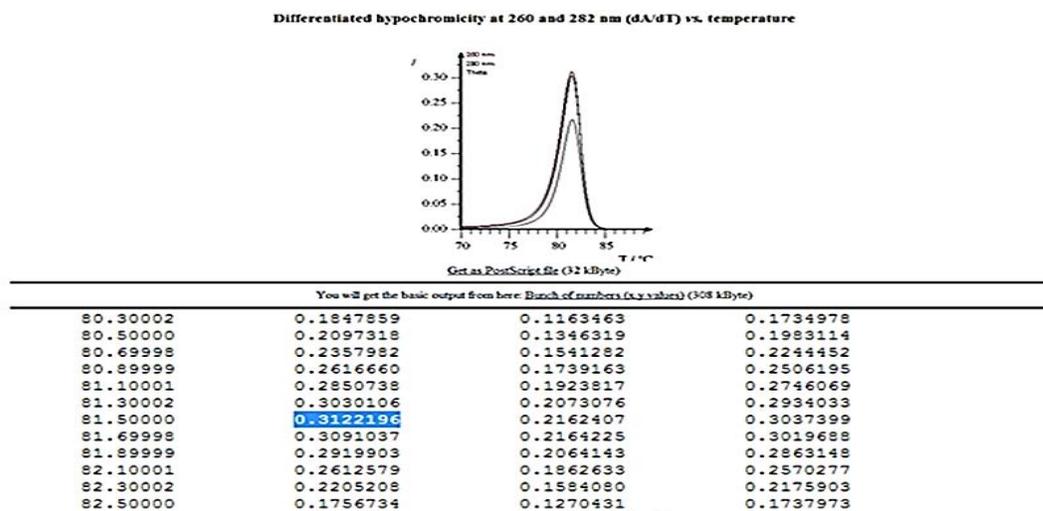


Figura 82. Temperatura de disociación Tm del amplicón de los primers *gpd*. Se muestra la hipocromicidad 260 y 282 nm. a diferentes temperaturas siendo 0.31221 el valor más alto lo cual corresponde a una Tm de 81.5° C.



Los resultados obtenidos de las curvas *melting* de RT-qPCR deben tener correlación con los resultados de la figura 82.

Para los primers ***cefD1***, la secuencia del gen fue obtenida de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AJ507632.2>). Una vez diseñados se comprobó su eficiencia y la  $T_m$  del amplicón. La eficiencia fue  $>2$ , lo que indicaba que podían usarse para análisis por PCR de tiempo real. La  $T_m$  del amplicón generado estaba alrededor de  $80^\circ\text{C}$ , según lo calculado por el programa POLAND.

Los primers diseñados para el gen ***cefG*** presentaron problemas de hibridación tal y como muestra la figura 83.

### Tool description

Primer Efficiency is an open source tool which allows PCR efficiency estimation. Documentation is available.

### Efficiency calculator output

The primers you provided do not hybridize within your sequence. The tool assumes they flank the sequence you entered.

```
Forward: TTATCTCGGGAGCCCCTTT (GC content: 0.526315789474, length: 19)
Reverse: GGCGATGAATACGAACATCA (GC content: 0.45, length: 20)
Expected efficiency:  $>2$ 
Amplicon:
TTATCTCGGGAGCCCCTTTGCGATGAATACGAACATCACTCGAATCGTCGTGCGAGGAA
ACTTGGCCCCGTACGGGCGCTGGCCTTCTGCATCGGGGTCGGGTGAACATGGTCCAGCAC
TCCCAAAGGGGCTCCCGAGATAATTTAGGCAGATGATGAAGTAGCGAGAGGTATCGAAAT GATGTTTCGTATTTCATCGCC
```

Figura 83. Eficiencia *in silico* de primers *cefG*. Se muestra el output de PCR Efficiency Calculator para calcular la eficiencia del par de primers seleccionados. Los primers diseñados no hibridan en el amplicón tal como lo muestra la leyenda de color azul.

Los primers *cefG* analizados con la herramienta Efficiency Calculator mostraron no hibridar a pesar de tener una eficiencia  $>2$ , esto puede deberse a haber escogido un par de primers de los obtenidos con el programa Primer 3 que no fueran el mejor de los casos, o que estuvieran flanqueando la secuencia introducida por lo cual no estuvieran hibridando a falta de estos nucleótidos. Por lo tanto los ensayos de RT-qPCR para *cefG* de las cepas de AGA1 no fueron representativos y se omitieron en el presente trabajo.



### 7.6.2 Análisis de expresión relativa de *cefD1* a las 24 h de cultivo

Se realizaron los ensayos de RT-qPCR para dos genes de la ruta de CPC de *A. chrysogenum*, los genes *cefD1* y *cefG*, en dos tiempos de cultivo diferentes: 24 y 48 h. El efecto de los alelos mutantes *aga1*<sup>G42R</sup> y *aga1*<sup>G203R</sup> sobre la expresión de estos genes estuvo en correlación con los resultados de los bioensayos de las cepas Aga1.

El ARN para los análisis de expresión por RT-qPCR se obtuvo a partir de micelio de los cultivos en medio líquido con el amortiguador de pH MOPS (apartado 7.4.3.2). En la figura 84 se muestra la integridad del ARN extraído en un gel de agarosa al 1% sin tratamiento con DNasa.

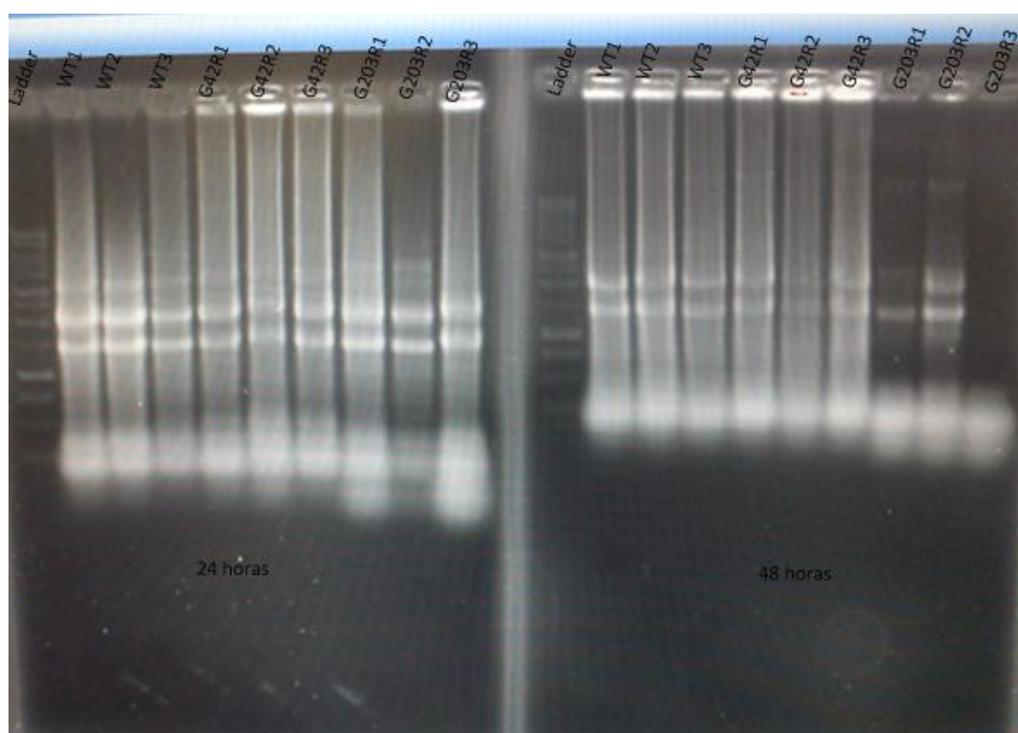


Figura 84. Integridad del ARN de las cepas mutantes de Aga1 sin tratamiento con DNasa. Se muestra la integridad después de la extracción del ARN de las cepas WT, G42R y G203R por replica biológica de las 24 y 48 h. A las 48 h fue necesario hacer una segunda extracción de las cepas G203R ya que no se había obtenido suficiente ARN, como se ve en el gel de la derecha.

El ARN se cuantificó por Nanodrop 2000c, y se estandarizó la concentración de ARN de las muestras antes de ser tratadas con DNasa. En la figura 85 se muestra el resultado después del tratamiento con DNasa, correspondiente a las muestras de 24 h.



Cuando el ARN presenta poca contaminación de ADN, en la práctica no es necesario utilizar estrictamente la cantidad de DNasa que indica el protocolo del fabricante, ya que una pequeña cantidad es suficiente para eliminar este ADN y un buen diseño de primers evita que se unan al ADN.

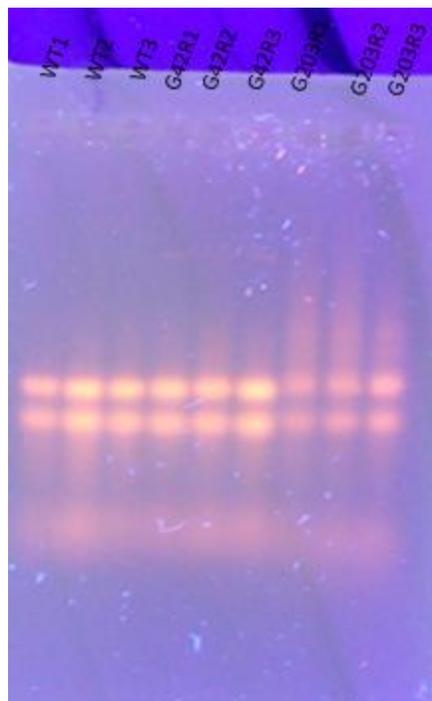


Figura 85. Integridad de ARN cepas AGA1 con tratamiento con DNasa. Se muestra la integridad del ARN de las cepas WT, G42R y G203R por replica biológica de las 24 hrs.

Las muestras de ARN se cuantificaron con Nanodrop. Se midió cada muestra biológica por triplicado y se sacó el promedio para determinar la concentración final de cada una de ellas. De estas concentraciones se tomó como referencia la de menor concentración para hacer las diluciones y estandarizar todas las muestras. Posteriormente se separaron en dos alícuotas, las cuales se consideraron stock para los ensayos de RT-qPCR. Los stocks fueron los únicos que se congelaron y descongelaron, pero aun así hubo pérdida por degradación, nunca se deben descongelar por choque térmico. Cada vez que se descongeló un stock se hizo en hielo, lo cual es más seguro para no degradar mucho el ARN.

Para las muestras de las 48 h también se llevó a cabo cuantificación con Nanodrop.



La tabla 17 muestra la estandarización de las muestras de ARN, de las cuales la de menor concentración fue la muestra WT1.

Después de haber estandarizado la concentración del stock se llevaron a cabo diluciones seriales 1:10 previas al ensayo (inicial: 100 ng/μL, 10 ng/μL, 1.0 ng/μL, 0.1 ng/μL, 0.01 ng/μL y 0.001 ng/μL) equivalentes a: 500,000 pg, 50,000 pg, 5000 pg, 500 pg, 50 pg y 5 pg. A partir de la segunda dilución solo fue necesario tomar 10 μL de la anterior y aforar a 100 μL.

						STOCK
24hrs	Co[ng/uL]	V1 RNA [uL]	C2 [ng/uL]	V2 [uL]	Vol H2O [uL]	cant RNA en [ng]
wt1	7836.1	51.7975	4058.9	100	48.2025	405890
wt2	4058.9	100	4058.9	100	0.0000	405890
wt3	8699.4	47	4058.9	100	53.3428	405890
42 1	8435.3	48	4058.9	100	51.8820	405890
42 2	8263.5	49	4058.9	100	50.8816	405890
42 3	9750.1	42	4058.9	100	58.3707	405890
203 1	8896.1	46	4058.9	100	54.3744	405890
203 2	8021.7	51	4058.9	100	49.4010	405890
203 3	11696	35	4058.9	100	65.2967	405890
48hrs						
wt1	2757.2	18.13	500	100	81.8657	50000
wt2	4056	12.33	500	100	87.6726	50000
wt3	3471.6	14.40	500	100	85.5974	50000
42 1	3621.3	13.81	500	100	86.1928	50000
42 2	3111.3	16.07	500	100	83.9295	50000
42 3	3374.5	14.82	500	100	85.1830	50000
203 1	3204	15.61	500	100	84.3945	50000
203 2	3190.4	15.67	500	100	84.3280	50000
203 3	3602.7	13.88	500	100	86.1215	50000

Tabla 17. Estandarización de las muestras de ARN de las cepas Aga1.

Los primers utilizados para estos ensayos fueron los del apartado anterior.

Los primers utilizados para estos ensayos fueron los mencionados en el apartado anterior.

Los ensayos y resultados fueron analizados con el equipo StepOnePlus y software StepOne™ v2.3, tal como se muestran a continuación.

En el apéndice 4 se muestra la amplificación obtenida de *cefD1* y *gpd* de las muestras de 24 h.



Sin embargo hubo algunos pozos que presentaron banderas (flags) que indicaron que pasó algo que no fue normal. En el apéndice 5 se muestra cómo fueron ordenadas las muestras y el resultado en el plato de reacción.

Para un análisis de expresión relativa, es necesario obtener las curvas estándar de los dos genes (*cefD1* y *gpd*) para poder interpolar las concentraciones de las muestras problema (WT1, 2,3, G43R1, 2,3 y G203R1, 2,3).

La desventaja de la técnica de cuantificación absoluta para el cálculo de la expresión relativa es que se deben meter al plato de reacción las concentraciones estándar cada vez que se realice un ensayo, ya que entre uno y otro ensayo pueden variar las concentraciones y diferentes factores de error, como pueden ser las mezclas de reacción. Sin embargo este método presenta la ventaja de que la eficiencia de amplificación no estrictamente debe ser cercana al 100% como es el caso del análisis por  $\Delta\Delta Ct$ , que utiliza fórmulas matemáticas para determinar los niveles de expresión. En la figura 86 se muestran las curvas estándar del ensayo *cefD1* de las muestras de 24 h.

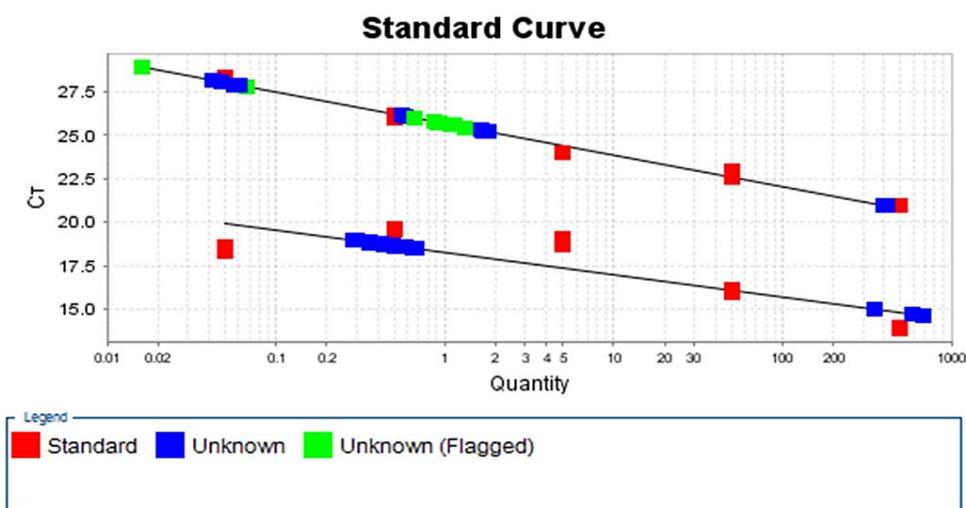


Figura 86. Curvas estándar del ensayo *cefD1* a las 24 hrs. Se muestran las curvas de *cefD1* (arriba) y *gpd* (abajo) con  $R^2$  de 0.989 y 0.722 respectivamente. La desviación de la curva de *gpd* es probablemente a las concentraciones 5 y 0.5 ng que aparecen en medio. Los primeros puntos (de izquierda a derecha) representan concentraciones más bajas a más altas. Las concentraciones estándar se tomaron del ARN de la cepa WT1.

La figura 87 muestra el resultado de la expresión relativa de *cefD1* usando como muestra de referencia a WT2, es decir con quien se comparan todas las muestras problema (el calibrador).

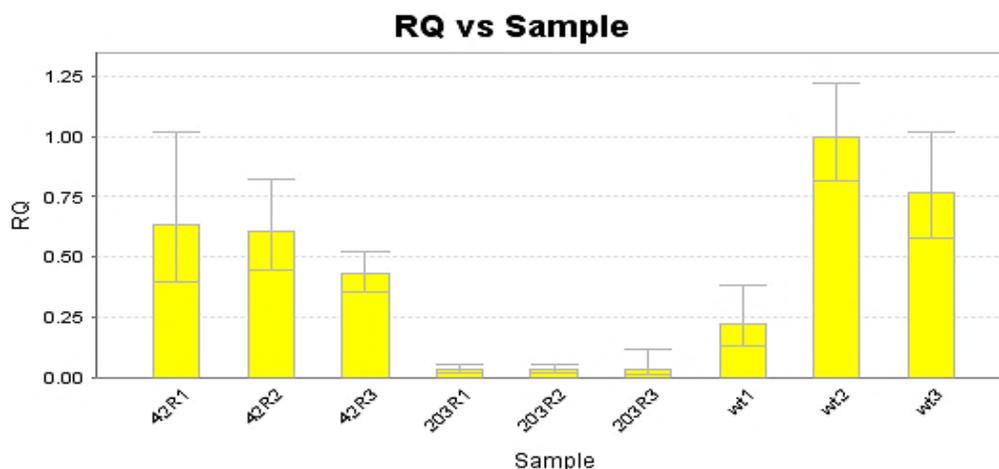


Figura 87. Expresión relativa de *cefD1* a las 24 hrs. Se muestra la expresión relativa respecto a WT2 donde 1.0 de RQ representa el 100% de la relación con esta. Se puede observar como las cepas G203R no expresan el gen *cefD1*.

Los resultados de la figura 87 están en correlación con los resultados de producción de CPC que se obtuvieron en los cultivos en medio líquido (figura 66); mientras que las cepas G42R producían cantidades de CPC similares o relativamente menores al control WT (variaciones poco significativas), las cepas G203R no mostraban producción. En la expresión de *cefD1* se observan igualmente niveles similares o ligeramente inferiores en las cepas G42R con respecto a la WT, mientras que no hay expresión de *cefD1* en las cepas G203R. Cabe mencionar que las réplicas biológicas para el ensayo de RT-qPCR se tomaron de las cepas G42R2 y G203R1.

Este resultado concuerda con los datos obtenidos sobre baja/nula producción de CPC por parte de las cepas G203R, lo que unido a los resultados del análisis de la morfología micelial pone en duda que se trate de cepas transformantes de *Acremonium chrysogenum*.



### 7.6.2.1 Análisis de las curvas *melting* de la RT-qPCR en el ensayo *cefD1* 24 hrs

Una manera de saber la calidad de los primers (la especificidad), es decir, para saber si se están formando dímeros de primers o productos no específicos es mediante el análisis de las  $T_m$ 's (temperatura promedio donde la mitad del amplicón se ha disociado) de los productos amplificados.

Los picos extras en las curvas *melting* muestran que los primers se están uniendo a secuencias incorrectas (que haya productos no específicos), que existe contaminación de ADN genómico o que se estén formando dímeros de primers.

El análisis de HRM (*in silico*) que se hizo en el apartado 7.6 Análisis de expresión de los genes relacionados con la producción de CPC en cepas mutantes de Aga1 mediante RT-qPCR sirve para saber a qué temperatura, la mitad del amplicón generado por los primers escogidos tiene su  $T_m$ . Con esta referencia podemos determinar si experimentalmente en las curvas *melting* del el ensayo de RT-qPCR se trata del amplicón que generamos *in silico*. Esto es de gran ayuda para optimizar los ensayos de RT-qPCR.

Los picos que se encuentran antes del pico principal indican que existen dímeros de primers, y los picos que se presentan después del pico principal indican que se están generando productos no específicos o contaminación de ADN genómico. Si los primers no son específicos para ARN, las curvas *melting* presentaran picos extras hacia la derecha debido a que los amplicones contienen exones e intrones dando productos más largos.

A continuación se muestran en la figura 88 los resultados de las curvas *melting* para los amplicones generados con los primers *gpd* y *cefD1*.

La figura 88 muestra que existen diferencias entre las  $T_m$ 's calculadas *in silico* y las obtenidas experimentalmente, sin embargo es una buena aproximación y sirve de orientación para identificar el pico principal de los amplicones generados. En el gráfico de la izquierda se observa que la mayoría de las muestras tienen un solo pico, lo cual indica que no existen productos no específicos o dímeros de primers, mientras que el gráfico de la derecha mostró picos antes del pico principal lo que indica posibles dímeros de primers debido a una contaminación de uno o más componentes de la reacción, una mezcla de reacción inestable, un mal diseño de primers o una PCR no optimizada.

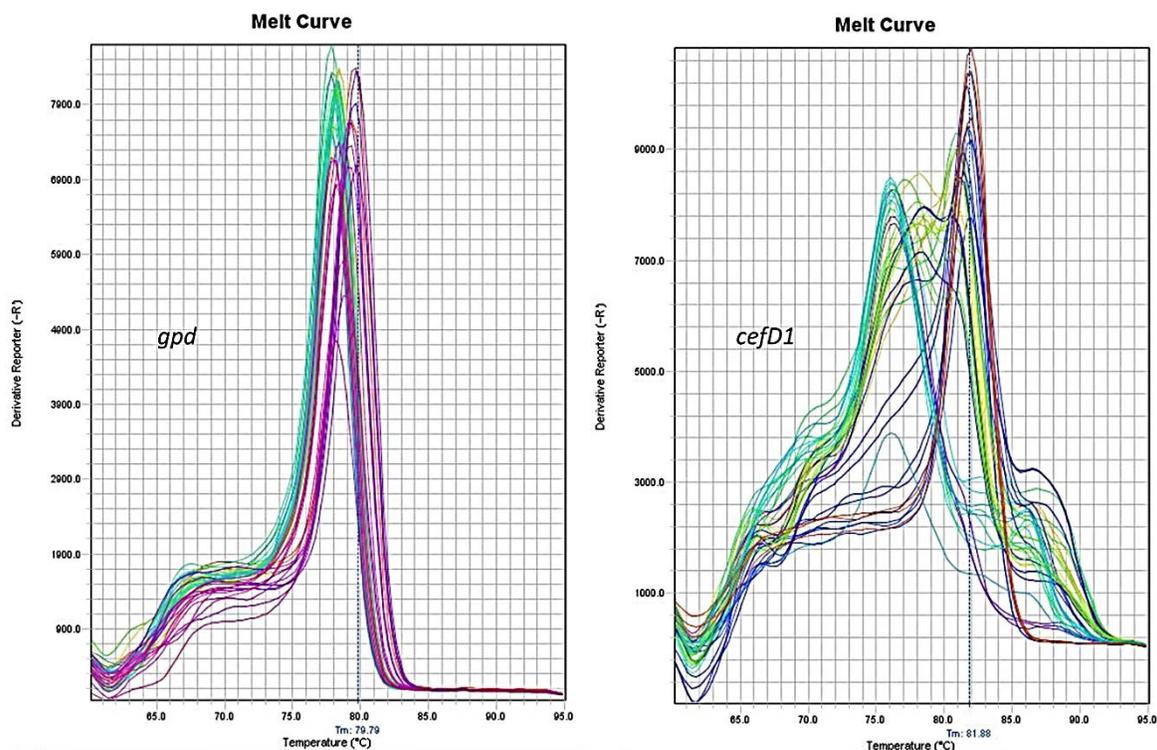


Figura 88. Curvas *melting* de los productos amplificados con los primers *gpd* y *cefD1*. A la izquierda se muestra el gráfico de *gpd* registrando una  $T_m$  promedio de todas las muestras de 79.79°C. A la derecha se muestra el gráfico de *cefD1* registrando una  $T_m$  promedio de todas las muestras de 81.88°C. Las  $T_m$ 's calculadas *in silico* para *gpd* y *cefD1* fueron de 81.6 y 80.25 °C respectivamente, lo cual muestra un error de 1.81 y 1.63 °C respecto a las obtenidas experimentalmente.

### 7.6.3 Análisis de expresión relativa de *cefD1* de las 48 hrs.

En el apéndice 6 se muestra la amplificación obtenida en tiempo real para el gen *cefD1* a las 48 h el cual presentó un buen comportamiento.

Los resultados en el plato de reacción se muestran en el apéndice 7 presentando banderas los controles y algunas muestras.

En la figura 89 se muestran las curvas estándar del ensayo. Debido a que la curva estándar de *gpd* no salió, se tomaron los datos de la curva estándar del ensayo de las 24 h, se extrajeron los datos de ensayo a las 48 h para hacer los gráficos de manera manual como se muestra en la figura 90.

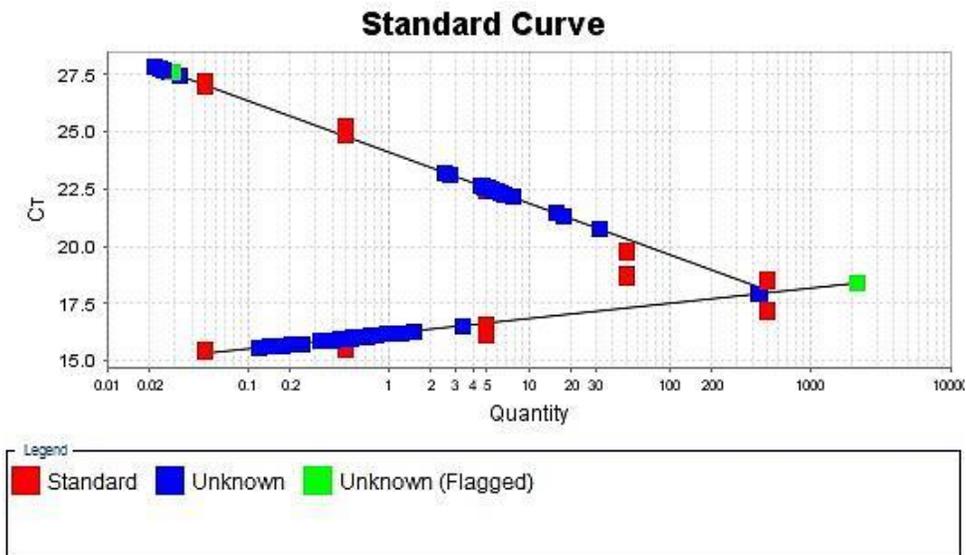


Figura 89. Curvas estándar del ensayo *cefD1* a las 48 hrs. Se muestran las curvas de *cefD1* (arriba) y *gpd* (abajo) con  $R^2$  de 0.9886 y 0.596 respectivamente. La desviación de la curva de *gpd* es probablemente a las concentraciones 0.05 y 0.5 ng que aparecen al inicio, ya que son concentraciones muy bajas que posiblemente hubiera degradación. Los primeros puntos (de izquierda a derecha) representan concentraciones más bajas a más altas. Las concentraciones estándar se tomaron del ARN de la cepa WT1.

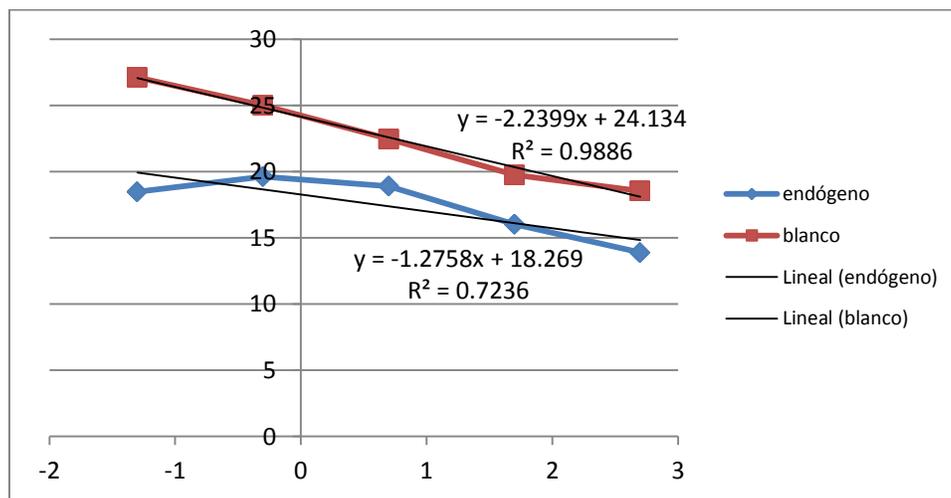


Figura 90. Curvas estándar del ensayo *cefD1* a las 48 hrs. modificada. Se muestra la curva estándar de *cefD1* obtenida del ensayo de las 48 hrs. junto con la curva estándar de *gpd* del ensayo de las 24 hrs.

Los resultados de expresión relativa obtenidos mediante el software StepOne™ y la extracción de los datos para hacerlo manual se compararon, como se muestra en las figuras 91 y 92 con los siguientes gráficos.

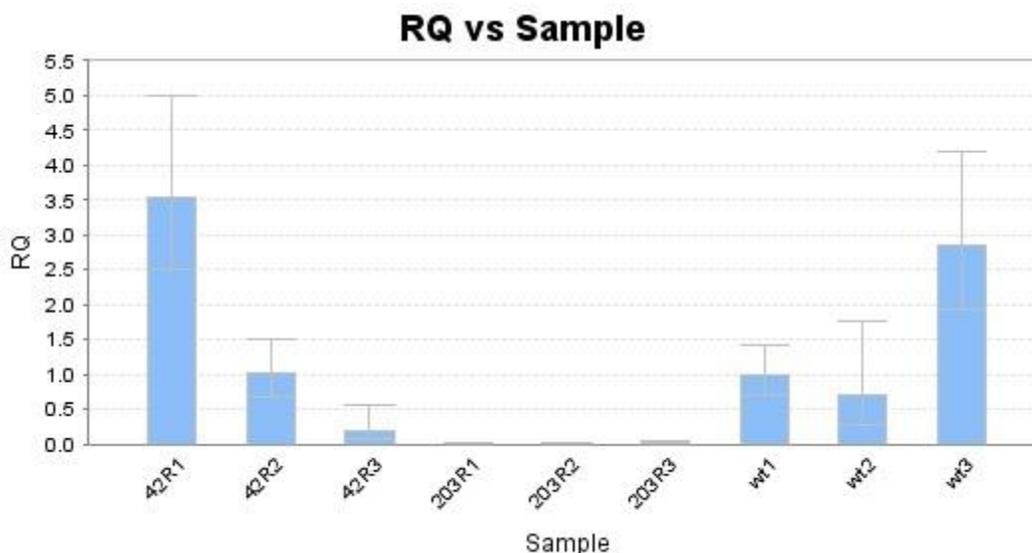


Figura 91. Expresión relativa de *cefD1* a las 48 hrs. con el software StepOne™. Se muestra la expresión relativa respecto a WT1, donde 1.0 de RQ representa el 100% de relación con esta. Se puede observar como las cepas G20R no expresan el gen *cefD1*. El error por la curva estándar de *gpd* de la figura 89, se observa con una expresión desbalanceada respecto a WT1 de las réplicas biológicas de WT y G42R.

Para **normalizar** de manera manual los datos que se obtuvieron del ensayo de RT-qPCR, se interpolaron los valores de Ct obtenidos en las curvas estándar de la figura 90 de la siguiente manera:

$$\text{Blanco normalizado (muestra X)} = \frac{(\text{Log cantidad de } cefD1 \text{ en muestra X})}{(\text{Log cantidad de } gpd \text{ en muestra X})}$$

Donde X es: WT2, WT3, G42R1, 2, 3, G203R1, 2, 3.

Es decir que para cada muestra se analizó con ambos genes (*cefD1* y *gpd*) e interpoló en su respectiva curva estándar para obtener el Log de la cantidad de cada una.

Lo mismo se hizo para la muestra de referencia WT1 (el calibrador), es decir con quien se compararon todas las muestras:

$$\text{Blanco normalizado (calibrador WT1)} = \frac{(\text{Log cantidad de } cefD1 \text{ en WT1})}{(\text{Log cantidad de } gpd \text{ en WT1})}$$

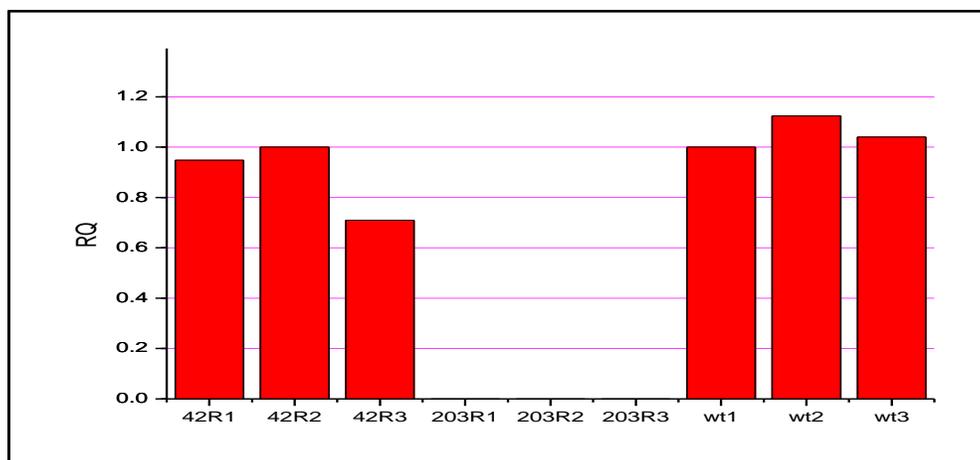


Figura 92. Expresión relativa de *cefD1* con la extracción de los datos. Se muestra la expresión relativa respecto a WT1, donde 1.0 de RQ representa el 100% de relación con ésta. Se puede observar como las cepas G20R no expresan el gen *cefD1*. La normalización usando la curva estándar de *gpd* del ensayo a las 24 hrs. corrige el error obtenido de la figura 126.

La diferencia de la expresión de cada blanco (expresión relativa) de la figura 92 se obtuvo como se muestra a continuación:

$$\text{Expresión relativa de la muestra X} = \frac{\text{Blanco normalizado (muestra X)}}{\text{Blanco normalizado calibrador (WT1)}}$$

El calibrador o muestra de referencia es normalmente aquella sin tratamiento, es decir cuál sea de las muestras WT1, 2 o 3. En este caso fue WT1, por tal razón en el en la figura 92 el RQ de WT1 es 1.

El resultado de la figura 92 mostró que no hubo expresión de *cefD1* en las cepas G203R, y que en la cepa WT *cefD1* se expresó de manera similar o en niveles ligeramente superiores que en las cepas G42R. Nuevamente la extracción del ARN que se obtuvo a las 48 h mostró que las cepas G203R no expresan el gen *cefD1* por lo que puede que estas cepas no se traten de *A. chrysogenum*.

### 7.6.3.1 Análisis de curvas *melting* de la RT-qPCR en el ensayo *cefD1* 48 hrs

La figura 93 muestra la comparación de las curvas *melting* del ensayo de las 48 hrs de *cefD1*. Se observan nuevamente picos antes del principal en el gráfico de la derecha que corresponde a *cefD1*, lo cual indicó nuevamente que los primers pudieron no ser



totalmente específicos para ARN o se formaron dímeros de primers, pero sin descartar las condiciones de termociclado para los dos juegos de primers, ya que esto pudo ser bueno para un juego de primers, pero no para el otro. Por tal motivo es necesario, antes de hacer los ensayos definitivos, hacer pruebas con diferentes juegos de primers, diferentes controles endógenos (genes *housekeeping*), concentraciones de primers o enzima en la reacción, temperaturas y ciclos de termociclado, y concentraciones de templado de ARN.

Las sondas TaqMan presentan ventajas respecto al uso de Sybergreen, como tener menos requerimientos a la hora del diseño y análisis previo de los primers y no necesitarse las curvas *melting*. Las sondas Taqman están diseñadas para que detecten específicamente el amplicón correspondiente, lo que hace que los ensayos tengan menos error cuando se analizan.

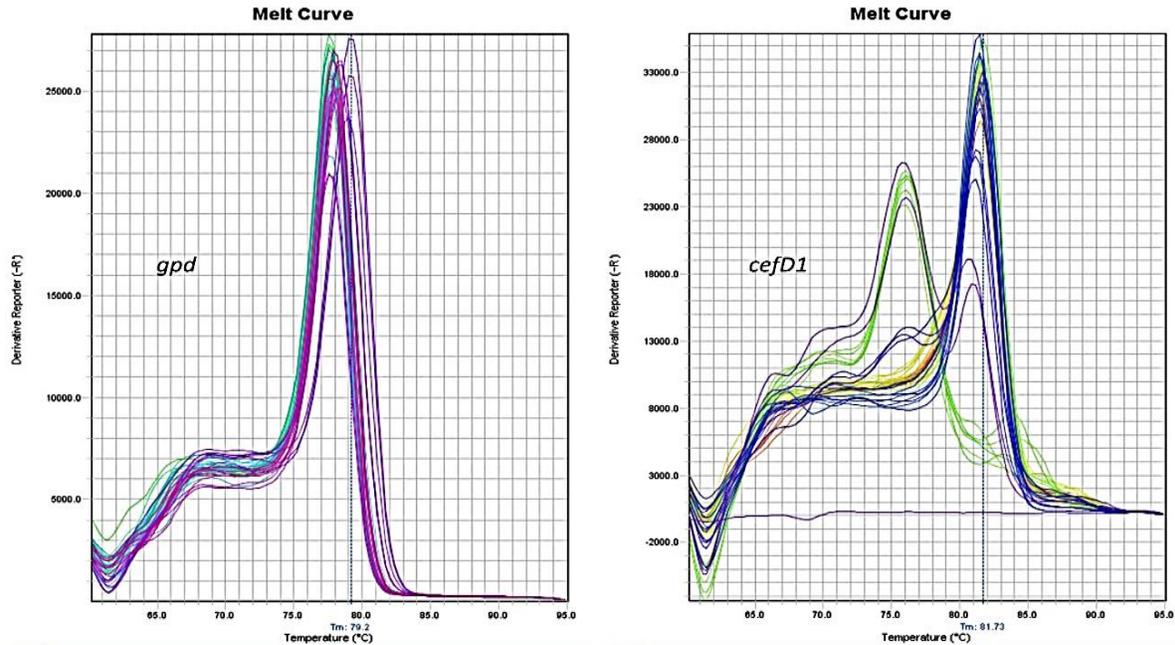


Figura 93. Curvas *melting* de los productos amplificados con los primers *gpd* y *cefD1* del ensayo de las 48 hrs. A la izquierda se muestra el grafico de *gpd* registrando una Tm promedio de todas las muestras de 79.2°C. A la derecha se muestra el grafico de *cefD1* registrando una Tm promedio de todas las muestras de 81.73°C. Las Tm's calculadas *in silico* para *gpd* y *cefD1* fueron de 81.25 y 80.25 °C respectivamente.

Si bien los primers *cefD1* presentaron problemas de diseño, o bien una falta de optimización del método, se obtuvieron resultados satisfactorios y comparables con los resultados de producción obtenidos. Las cepas G203R no expresaron el gen *cefD1* y su morfología del micelio no tuvo relación con la cepa WT, el PC43, y las G42R. Los análisis moleculares para asegurar que fueran transformantes no se llevaron a cabo.



### 7.7 Transformación de la cepa WT ATCC11550 de *Acremonium chrysogenum* para obtener los diferentes fondos genéticos *aga1*<sup>G42R</sup> y *aga1*<sup>G203R</sup>.

Debido a los problemas encontrados con las cepas transformantes obtenidas previamente, se transformó nuevamente la cepa WT (ATCC 11550) de *Acremonium chrysogenum* con vectores que contenían los alelos mutantes de activación (*aga1*<sup>G42R</sup>) e inactivación (*aga1*<sup>G203R</sup>) constitutiva del gen de la subunidad G $\alpha$  *aga1*.

Se obtuvieron los protoplastos y fueron transformados como se indica en el apartado 6.12.2 de Materiales y Métodos.

Se usaron dos tipos de enzimas líticas para generar los protoplastos: *driselasa* y enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*. En la figura 94 se muestra la cepa WT después de ser tratadas con las enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*.

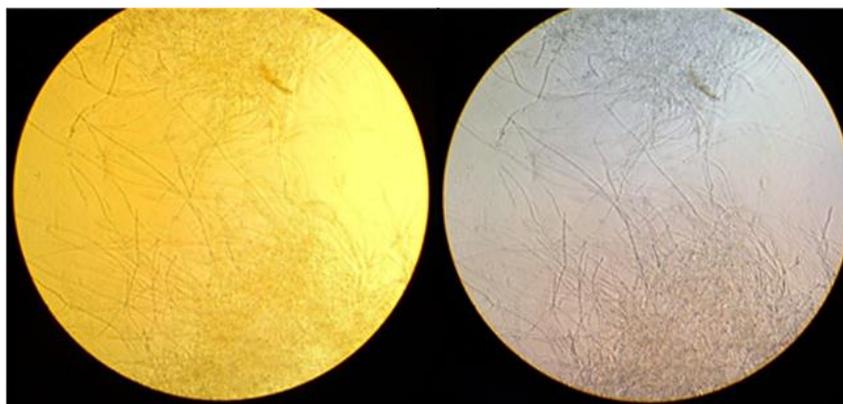


Figura 94. Cepa WT después de 3.5 h con enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*. Se observa el micelio muy denso y sin protoplastos aún.

El tratamiento con dos tipos de enzimas se realizó para ver cuál de las dos lo hacía en menor tiempo, y así acelerar el proceso de transformación, ya que la obtención de protoplastos es lo que retarda la transformación. En la figura 95 se muestra el resultado con estas dos enzimas.

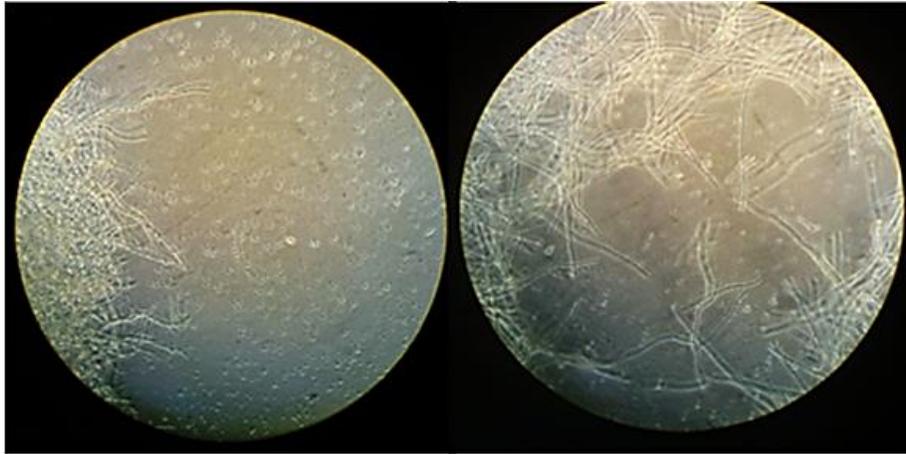
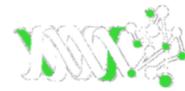


Figura 95. Tratamiento con enzimas líticas. Izquierda, WT con tratamiento *driselasa* después de 5.8 h. Imagen derecha, WT con tratamiento enzimas líticas para *Trichoderma harzianum* después de 8 horas. No se observan muchos protoplastos. Salieron mejor los protoplastos con el tratamiento de driselasa.

Las cepas transformadas se seleccionaron en un medio que contenía fleomicina, siendo la primera selección con una concentración de 20 µg/mL, después se continuó con concentraciones de 40 µg/mL en otras cuatro selecciones.

Después de hacer varias selecciones con fleomicina se obtuvieron 15 cepas transformadas G203R y 13 G42R. Las figuras 96 y 97 muestran los resultados.



Figura 96. Cepas transformadas G203R. Se muestran las cepas transformadas G203R y duplicado después de 14 días incubados a 25 ° C. Son la tercera selección de transformantes.



Figura 97. Transformantes de *A. chrysogenum* con el alelo *aga1*<sup>G42R</sup>. Se muestran las cepas transformantes G42R y duplicado después de 14 días incubadas a 25°C. Es la tercera selección en medio con fleomicina de las transformantes.

Las cepas transformadas no han sido analizadas molecularmente para asegurar que tengan el inserto aún.

## 7.8 Secuenciación del fragmento de ADN con el gen *aga1*

La secuenciación del ADN con el primer Forward dio el siguiente fragmento con longitud de 700 bases:

```
GGCTTTCCTATGCGGGATAATTCTAGTGCATTATGGAGTCGCTCGAGCTTCTCTCGAGGACCAGCGCATGGAGTACCA  
CGTCCAGACCATCTTCATGCAGCCCGCTCAGATCGAGGGTGACGTTCTGCCACCCGAGGTTGGCAGCGCCATCGAGG  
CTCTGTGGAAGGACCGCGGTGTGCAGGAGTGCTTCAAGCGCTCCCGCGAATACCAGCTGAACGACTCCGCGAGATAGT  
AGGTATCAGATGAGCCCAACCCTAAAAACAGTCCCTAACCCAAACGCGAGCTACTTCGACAACATTGCGCGCATCGCCG  
CCCCTGACTACATGCCCAACGACCAGGACGTCCTGCGGTGCGGTGTCAAGACGACTGGTATCACCGAAACCACCTTCA  
TTATTGGTGACCTCACGTACCGCATGTTTCGATGTCGGTGGTCAGCGATCCGAGCGGAAGAAGTGATACACTGCTTCGA  
GAACGTCACCACCATCCTTCTCGTCGCCATCTCGGAAATACGGATCAGCCTTCTGTTTGAAGAATGGAGACGGG  
TCCAACCCGATGCAGGGAGGGTCTCCACCCTGGTTCCAACCTCATCCGCCAACTCAGGGTGGGTTATTCAAGACCATC  
GAACCTTCTGGTTCTGAAACAAGATTGATACGCTTCAAGGAAAAAGTTGCCTGTAGCCCCTGGAAAAACTATTTAA  
G
```

La secuenciación del ADN con el primer Reverse dio el siguiente fragmento con longitud de 684 bases:

```
GCCGCTTTTCTCGAGCTGATCGATCTTGTTGAGGACAGGATGATCGATGTCTTGATGAACCACCTCGAGTTGCAGATG  
GAGTCGAACAGGGTGAGAGCCTCCTGCATACGGTTGACCGTCTCATCTTGAACAGAAGCTGATCGTATTCCGAGATG  
GCGACGAGGAAGAGGATGGTGGTGACGTTCTCGAAGCAGTGTATCCACTTCTTCCGCTCGGATCGCTGACCACCGACA  
TCGAACATGCGGTACGTGAGGTCACCAATAATGAAGGTGGTTTCGGTGATACCAGTCGTCTTGACACGCGACCCGAGG  
ACGTCCTGGTTCGTTGGGCATGTAGTCAGGGGCGCGCATGCGCGCAATGTTGTCGAAGTAGCTGCGTTTGGGTTAGGGA  
CTGTTTTAGGGTTGGGCTCATCTGATGACCTACTATCTCGCGGAGTCGTTTCAGCTGGTATTGCGGGAGCGCTTGAAG  
CACTCCTGCACACCGCGGCTTCCACAGAGCCTCGATGGCGCTGCCAACCTCGGGTGGCAGAACGTCACCCCTCGATC  
TGAGCGGGCTGCATGAAGATGGTCTGGACGTGGTACTCCATGCGCTGGTCTCGAGAGGAAGCTCGAGCGACTCCAT  
GGCTCGAGAATCACCCGCATCGACTGGACGGTGTGCTGAAAATGATTCTTCTTTGA
```



La figura 98 muestra los resultados del BLAST de la secuencia Reverse.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">GU358701.1</a>	Colletotrichum hanau isolate col-68 guanine nucleotide-binding prote	695	695	96%	0.0	85%
<a href="#">EU589331.1</a>	Glomerella graminicola strain M1.001 heterotrimeric G protein (CGG) c	651	651	95%	0.0	84%
<a href="#">AF068248.1</a>	Sporothrix schenckii G protein alpha subunit gene, partial cds	649	649	96%	0.0	84%
<a href="#">FM200411.1</a> →	Acremonium chrysogenum partial mRNA for alpha subunit of G-protein	647	1102	89%	0.0	99%
<a href="#">AB239917.1</a>	Alternaria alternata AGA1 gene for G protein alpha subunit AGA1, cor	595	595	97%	1e-166	83%
<a href="#">GQ499184.1</a>	Alternaria alternata G protein alpha subunit (AGA) gene, complete cc	590	590	97%	5e-165	83%
<a href="#">AJ421531.1</a>	Leptosphaeria maculans Tox+/A group qa1 gene for G protein alpha :	577	577	96%	4e-161	82%
<a href="#">AM920428.1</a>	Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255 complete genome, contig	573	573	95%	5e-160	82%
<a href="#">DQ886590.1</a>	Penicillium chrysogenum heterotrimeric G-protein alpha subunit (pqa1	573	573	95%	5e-160	82%
<a href="#">DQ848852.1</a>	Penicillium chrysogenum strain NRRL 1951 hetrotrimeric G protein alp	573	573	95%	5e-160	82%

Figura 98. Resultados del blast de la secuencia reverse. La alineación más significativa fue la de un gen de *Acremonium chrysogenum* con un *E. value* de 0.0 y un *Max. Ident* de 99%.

La figura 99 muestra los resultados del BLAST de la secuencia Forward.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">FM200411.1</a> →	Acremonium chrysogenum partial mRNA for alpha subunit of G-protein	521	901	85%	3e-147	100%
<a href="#">GU358701.1</a>	Colletotrichum hanau isolate col-68 guanine nucleotide-binding prote	505	505	92%	2e-139	81%
<a href="#">AF068248.1</a>	Sporothrix schenckii G protein alpha subunit gene, partial cds	475	475	91%	2e-130	80%
<a href="#">EU589331.1</a>	Glomerella graminicola strain M1.001 heterotrimeric G protein (CGG) c	473	473	94%	5e-130	80%
<a href="#">AB239917.1</a>	Alternaria alternata AGA1 gene for G protein alpha subunit AGA1, cor	431	431	92%	3e-117	79%
<a href="#">GQ499184.1</a>	Alternaria alternata G protein alpha subunit (AGA) gene, complete cc	419	416	92%	9e-113	79%
<a href="#">AF070446.1</a>	Cochliobolus heterostrophus G protein alpha subunit CGA1 (CGA1) ge	399	399	90%	9e-108	78%
<a href="#">CU633900.1</a>	Podospora anserina S mat+ genomic DNA chromosome 7, supercontig	387	387	88%	7e-104	78%
<a href="#">AM920428.1</a>	Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255 complete genome, contig	381	381	90%	3e-102	78%
<a href="#">DQ886590.1</a>	Penicillium chrysogenum heterotrimeric G-protein alpha subunit (pqa1	381	381	90%	3e-102	78%
<a href="#">DQ848852.1</a>	Penicillium chrysogenum strain NRRL 1951 hetrotrimeric G protein alp	381	381	90%	3e-102	78%

Figura 99. Resultados del blast de la secuencia Forward. La alineación más significativa fue la de un gen de *Acremonium chrysogenum* con un *E. value* de 3e-147 y un *Max. Ident* de 100%.

Los criterios para decidir cuál/cuáles de los alineamientos obtenidos en un análisis BLAST tiene mayor significancia son: 1) un *Query coverage* bajo, 2) un *E. value* muy chico o cero y 3) Un *Max. Ident.* elevado. Con base a los resultados obtenidos en el análisis BLAST que muestran las figuras 98 y 99, se concluyó que el fragmento secuenciado corresponde al gen denominado *aga1* de *Acremonium chrysogenum*, codificante de la subunidad G $\alpha$  de tipo I de una proteína G heterotrimérica.



## 8. CONCLUSIONES

1. Se analizó la producción de cefalosporina C en cepas de *Acremonium chrysogenum* transformadas con el gen *laeA* de *Aspergillus terreus*. Tres de las cepas analizadas mostraron mayor producción de cefalosporina C en los diferentes cultivos en medio líquido realizados, alcanzándose la mayor concentración en los caldos de cultivo a las 48 h, y disminuyendo posteriormente una vez que los cultivos rebasaron el nivel de pH de 8. No pudo corroborarse la presencia del gen en los transformantes mediante PCR.
2. Se analizó la producción de cefalosporina C en medio sólido en cepas que expresan formas mutantes de la subunidad  $G\alpha$  Aga1 de una proteína G heterotrimérica de *A. chrysogenum* (Aga1<sup>G42R</sup>: constitutivamente activa; Aga1<sup>G203R</sup>: constitutivamente inactiva). Se observó una mayor producción en las cepas control (WT y PC43) respecto a las cepas G42R, mientras que las cepas G203R no produjeron cefalosporina C.
3. En cultivo sumergido, las cepas control WT y PC43 produjeron cantidades ligeramente mayores de cefalosporina C que las cepas G42R, tanto en medio tamponado como sin tamponar. En ninguno de los medios hubo producción en las cepas G203R.
4. En medio sin tamponar se produjo un aumento constante del pH a lo largo del cultivo, obteniéndose las concentraciones más altas de cefalosporina C en los caldos a las 48 h. En medio tamponado con MOPS 0.5 M el pH a lo largo de la fermentación se mantuvo en 7.0-7.5, y la producción de cefalosporina C se mantuvo por más tiempo, hasta las 120 h.
5. Se analizó la expresión del gen *cefD1* en las cepas G42R y G203R mediante RT-qPCR. Se observó una tasa de expresión ligeramente mayor en la cepa control WT respecto a la cepa G42R, mientras que no se observó expresión en las cepas G203R. Las cepas G203R presentaron diferencias morfológicas importantes respecto al resto de cepas.
6. La subunidad  $G\alpha$  Aga1 es un regulador de la biosíntesis de cefalosporina C y de la expresión del gen *cefD1* en *Acremonium chrysogenum*.



## PERSPECTIVAS

En lo referente a la caracterización de la función del gen *laeA* en *A. chrysogenum* y su utilización para mejorar la producción de CPC, se propone analizar nuevamente las cepas transformantes *laeA* mediante PCR y RT-PCR, extrayendo de nuevo ARN a partir de micelio de los transformantes originales (conservados en glicerol) crecidos una sola vez en placa para inocular el medio líquido, y utilizando una nueva Taq polimerasa con actividad *hot start*, como la Platinum Taq de Invitrogen. Los aumentos de producción de beta-lactámicos observados en los bioensayos de varios de los transformantes *aga1* (Figs. 33, 36, 40) sugieren que el gen *aga1* de *A. terreus* sí debe de estar presente y expresándose en al menos estos transformantes. Así mismo resulta también de gran interés continuar con la búsqueda del gen *laeA* de *A. chrysogenum*, con el fin de analizar su función en el hongo y utilizarlo para tratar de aumentar la producción de cefalosporina C.

Por otra parte, respecto a la caracterización del gen *aga1*, se deberá transformar nuevamente *A. chrysogenum* con el alelo mutante *aga1*<sup>G203R</sup>, y deberán hacerse pruebas moleculares (análisis de PCR) de los transformantes (tanto G42R como G203R) para validar los resultados del efecto de la subunidad  $\alpha$  Aga1 sobre la biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum*.

Los resultados obtenidos podrían ayudar a entender mejor las vías de transducción que controlan la expresión de genes del metabolismo secundario de *A. chrysogenum*, con la finalidad de integrarlas, asumiendo que se conozcan las reacciones bioquímicas, tasas de expresión de genes y un estado estacionario poder generar una red de flujo metabólico *in silico* mediante una serie de ecuaciones lineales que puedan resolverse simultáneamente. Un ejemplo serían los trabajos realizados por Baltazar *et al.* (1999, 2004).



## BIBLIOGRAFÍA

Abraham, E. P. & G. G. F. Newton. 1961. The structure of cephalosporin C. *Biochemical Journal* 79: 377-393.

Adinarayana K, Prabhakar T, Srinivasulu V, Anitha V, Jhansi Lakshmi P. 2003. Optimization of process parameters of cephalosporin C production under solid state fermentation of *Acremonium chrysogenum*. *Process Biochem.* 39: 171-177.

Aguirre P, Teresa. 2009. Clonación y sobreexpresión del gen regulador *laeA* en *Aspergillus terreus* TUB-514: Efecto sobre la producción de lovastatina en FS y FL. Tesis Maestría en Biotecnología, UAM-I.

Aharonowitz, Y., Cohen, G. y Martin, J.F. 1992. Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 46: 461-95.

Ambion®. 2012. Working with RNA: the basics. Avoiding, detecting, and inhibiting RNase.

Baltazar D. Aguda. 1999. A quantitative analysis of the kinetics of the G2 DNA damage checkpoint system. *Cell Biology.* 96: 11352-11357.

Baltazar D. Aguda and Herbert M. 2004. Computer Simulation of MAPK Signal Transduction. *Methods in Molecular Biology.* 250: 167-175.

Bayram Özgür, Sven Krappmann, Min Ni, Jin Woo Bok, Kerstin Helmstaedt, Oliver Valerius, Susanna Braus-Stromeyer, Nak-Jung Kwon, Nancy P. Keller, Jae-Hyuk Yu, Gerhard H. Braus. 2008. VeIB/VeA/LaeA Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism. *Science* 320: 1504

Berdy, J. 1980. Bleomycin type antibiotics. En: Berdy J. (ed.) Amino acid and peptide antibiotics. Handbook of antibiotic compounds, vol. IV. CRC press pp. 459-491.

Bok, J.W. y Keller, N.P. 2004. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp.* *Eukaryot. Cell* 3: 527-535.

Brakhage A. 1998. Molecular regulation of  $\beta$ -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 547-585.

Brakhage, A.A., Spröte, P., Al-Abdallah, Q., Gehrke, A., Plattner, H. y Tüncher, A. (2004). Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 88: 45-90.

Brown AG. 1986. Clavulanic acid, a novel beta-lactamase inhibitor--a case study in drug discovery and development. *Drug Des Deliv.* 1(1):1-21.

Burton, H. S & E. P. Abraham. 1951. Isolation of antibiotics from a species of *Cephalosporium*. Cephalosporins P1, P2, P3, P4 and P5. *Biochemical Journal* 50:164-174.

Bush K., Jacoby G. y Medeiros A. 1995. A functional classifications scheme for  $\beta$  lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:1211-33.

Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W. y Keller, N. P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Rev.* 66: 447-459.



- Caltrider NP, Niss HF. 1966. Role of methionine in cephalosporin synthesis. *Appl Microbiol* 14:746
- Chang, L.T., McGrory, E.L y Elander, R.P. (1990). Penicillin production by glucosederepressed mutants of *Penicillium chrysogenum*. *J. Ind. Microbiol.* 6: 165-9.
- Cherest H, Surdin-Kerjan Y. 1992. Genetic analysis of a new mutation conferring cystine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: updating of the sulfur metabolism pathway. *Genetics* 130:51
- Cruz R. Jessica. 2009. Efecto de la activación constitutiva de la subunidad alfa de una proteína G heterotrimerica heterologa sobre la esporulación y la producción de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum*. Tesis de maestría UAM-I. 40-43, 73, 74.
- Cortázar A. y Silva E. 2004. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS EN BIOTECNOLOGÍA: PCR. pp. 1-8, 28. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf> .
- Cuadra Tania. 2008. Estudios moleculares de la regulación por pH en la producción de cefalosporina C por *Acremonium chrysogenum*. Tesis de maestría UAM-I. 1.
- Cultek. 2006. Soluciones QPCR; Protocolo y técnicas. <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>
- Drew SW, Demain AL. 1975. Antimicrob Agents Chemother 8: 5
- Dreyer, J., Eichhorn, H., Friedlin, E., Kurnsteiner, H., Kuck, U. 2007. A homologue of the *Aspergillus* velvet gene regulates both cephalosporin C biosynthesis and hyphal fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3412-3422.
- Docuort, D., Camels, T., Reynes, J. P., Baron, M. y Tiraby, G. 1990. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukariotes. *Nucl. Acid Res.* 18: 4009.
- Desjardins P, and Conklin D. 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments.* <http://www.jove.com/video/2565/>
- EMLAB. (2007). Environmental Microbiology Laboratory, Inc. (EMLab): An index of some commonly encountered fungal genera.
- Esmahan C, Álvarez E, Montenegro E, Martín JF (1994). Catabolism of lysine in *Penicillium chrysogenum* leads to formation of 2-aminoadipic acid, a precursor of penicillin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 60:1705.
- Espeso EA, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 1993. pH regulation is a major determinant in expression of fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* 12: 3947-3956.
- Eurogentec. 2013. <http://www.eurogentec.com/uploads/qPCR-guide.pdf>
- Evers ME, Trip H, van den Berg MA, Bovenberg RA, Driessen AJ (2004). Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotics biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 88:111-35.
- Feng, B., Friedlin, E. y Marzluf, G.A. (1994). A reporter gene analysis of penicillin biosynthesis gene expression in *Penicillium chrysogenum* and its regulation by nitrogen and glucose catabolite repression. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4432-4439.



Fernández F. Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de la penicilina, tesis doctoral. 1997. Pag.76-77.

Fierro F, Barredo JL, Díez B, Fernández FJ y Martín JF. 1995. The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6200-6204.

Florey, H. W., E. P. Abraham, G. G. F. Newton, H. S. Burton, B. K. Kelly, C. W. Hale & G. A. Miller. 1956. Improvements relating to the production of an antibiotic substance by a *Cephalosporium* species. British Patent 745208.

Gajiwala, K.S., Chen, H., Cornille, F., Roques, B.P., Reith, W., Mach, B. y Burley S.K. (2000). Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. Nature. 24; 403: 916-21.

García-Rico, R. O., Martín, J. F. y Fierro, F. 2007. The Pga1 gene of *Penicillium chrysogenum* encodes a heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development. Res. Microbiol. 158: 437-446.

García-Rico, R. O., Fierro, F. y Martín, J. F. 2008a. Heterotrimeric G $\alpha$  protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum* controls conidiation mainly by a cAMP-independent mechanism. Biochem. Cell Biol. 86: 57-69.

García-Rico, R., Fierro, F. Mauriz, E., Gómez, A., Fernández Bodega, M.A. y Martín, J. F. 2008b. The heterotrimeric G $\alpha$  protein Pga1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. Microbiology 154: 3567-3578.

García R., JA, Gomis M., González J., Prieto J. 1997. Historia de la antibioterapia. Ediciones Doyma. S.A. Madrid, España, p.p. 1-96.

Germain, G and Summerbell, R. (1996). Champignons filamenteux d'intérêt médical. Caractéristiques et idenfication. Belmont, Star Publishing Company. -314 p.

Gardner John, 2005. Principios de genética. Edit. Limusa, 4ª edición. México. Páginas 359-361.

Goodman L. y Gilman A. 2003. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial McGrawHill, Vol. 1: 1095-1265.

González JM. 2010. "Un autoinductor de la biosíntesis de penicilina en *Penicillium chrysogenum*: Caracterización molecular y estudio de la respuesta del proteoma a la adición de inductor". Tesis doctoral

Gutiérrez S. Fierro F. Casqueiro J. y Martín J. F. 1999. Gene organization and plasticity of the  $\beta$  lactam genes in different filamentous fungi. Antonie van Leewenhoek 75: 81-94.

Gyax D, Döbeli N., Nüesch J.1980. A revised chromosome map of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Experientia 36: 487

Hamm, H.E. 2001. How activated receptors couple to G proteins. Proc Natl Acad Sci USA 98: 4819-4821.

Heiland I, Erdmann R (2005). Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. FEBS J. 272(10):2362-72.



Hervás-Aguilar A, Rodríguez JM, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2007. Evidence for the direct involvement of proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. *J. Biol. Chem.* 283:34735-34747.

Hicks, J. K., Yu, J. H., Keller, N. P. y Adams, T. H. 1997. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *EMBO J.* 16: 4916-4923.

Hilgendorf P., V. Heiser, H. Diekmann, M. Thoma. 1987. Constant dissolved oxygen concentrations in cephalosporin C fermentation: applicability of different controllers and effect on fermentation parameters. *Vol. 27* :247-251.

INSPQ. 2011. Institut national de santé publique Québec. <http://www.inspq.qc.ca/english/mould-compendium/acremonium-spp>.

Invitrogen. 2010. Express One-Step SYBR<sup>®</sup> GreenER<sup>™</sup> kits. [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/express\\_onestep\\_sybrgreener\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/express_onestep_sybrgreener_man.pdf)

Jekosch K y Kück U. 2000. Loss of glucose repression in an *Acremonium chrysogenum* beta-lactam producer strain and its restoration by multiple copies of the *cre1* gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 556-563.

Jinyou Zhang , Saúl Wolfe , Arnold L. Demain. 1988. Phosphate repressible and inhibitable  $\beta$ -lactam synthetases in *Cephalosporium acremonium* strain C-10. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 29: 242-247.

Keller, N.P., Turner, G. y Bennett, J. W. 2005. Fungal secondary metabolism- from biochemistry to genomics *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 937-947.

Kiel JA, van der Klei IJ, van den Berg MA, Bovenberg RA, Veenhuis M (2005). Overproduction of a single protein, Pc-Pex11p, results in 2-fold enhanced penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet. Biol.* 42: 154-164.

Kosalková, K., García-Estrada, C. Ullán, R.V. Godio, R.P., Feltrer, R., Tejeira, F., Mauriz, E. y Martín, J. F. 2009. The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie* 91: 214-225.

Kenneth J., Livak y Thomas D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *METHODS* 25: 402–408.

Kurjan, J., Hirsch, J. P. y Dietzel. C. 1991. Mutations in the guanine nucleotide-binding domains of a yeast G $\alpha$  protein confer a constitutive or uninducible state to the pheromone response pathway. *Genes Dev.* 5: 475-483.

Lee, M. S., J. S. Lim, C. H. Kim, K. K. Oh, S. I. Hong, and S. W. Kim. 2001. Effects of nutrients and culture conditions on morphology in the seed culture of *Cephalosporium acremonium* ATCC 20339. *Biotechnol Bioeng.* 6: 156.

Li, L., Wright, S. J., Krystofova, S., Park, G. y Borkovich, K.A. 2007. Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 423-452.

Life technologies. 2012. Curso teórico-práctico de PCR en tiempo real y sus aplicaciones. [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms\\_053238.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_053238.pdf)



- Liras P. y Martín J.F. 2006. Gene clusters of  $\beta$ -lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate. *Int. Microbiol.* 9: 9-19.
- Liu G, Casqueiro J, Bañuelos O, Cardoza RE, Gutiérrez S, Martín JF. 2001. Targeted inactivation of the *mecB* gene encoding cystathionine- $\gamma$ -lyase shows that the transsulfuration pathway is required for high level cephalosporin biosynthesis in *Acremonium*. *J Bacteriol* 183: 1765
- Lofty WA. 2007. The utilization of beet molasses as a novel carbon source for cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum*: Optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Biores. Technol.* 98: 3491-3498.
- López A. 2010. Efecto de una mutación de mimetismo alcalino en el factor de transcripción PacC de *Acremonium chrysogenum* sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos. Tesis de maestría.
- Lübbe C, Jensen SE, Demain AL. 1984. Prevention of phosphate inhibition of cephalosporin synthetases by ferrous ion. *FEMS Microbiol. Lett.* 25: 75-79.
- Martín, J.F. (2000). Molecular control of expression of penicillin biosynthesis genes in fungi: regulatory proteins interact with a bidirectional promoter region. *J. Bacteriol.* 182: 2355–2362.
- Marín M., Gudiol F. 2003. Antibióticos beta-lactámicos. *Enferm. Infec. Microbiol. Clín.* 21: 42-46.
- Martín J.F, Aharonowitz Y. 1983. In: Demain AL, Solomon NA (eds) *Antibiotics containing the  $\beta$ -lactam structure*. Springer, Berlin Heidelberg New York, Vol. 1, pp. 229.
- Matsumura, M., T. Imanaka, T. Yoshida, and H. Taguchi. 1980. Morphological differentiation in relation to cephalosporin C synthesis by *Cephalosporium acremonium*, *J. Ferment. Technol.* 58: 197.
- MEGA 5.2. 2013. <http://www.megasoftware.net/>
- Mehta RJ, Speth JL, Nash CH 1979. Lysine stimulation of cephalosporin C synthesis in *Cephalosporium chrysogenum*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 8: 177
- Miller J. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. P352-355.
- Minuth W, Tudzynski P, Esser K. 1982. Extrachromosomal genetics of *Cephalosporium acremonium*. *Curr. Genet.* 5: 227-231.
- Moreira D, 1998. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations, *Nucleic Acids Res* 26: 3309-3310.
- Müller WH, van der Krift TP, Krouwer AJ, Wosten HA, van der Voort LH, Smaal EB, Verkleij AJ (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.* 10: 489-495.
- Navarro F, Miró E, Mirelis B. 2002. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infec. Microbiol. Clín.* 20: 225-234
- Neer, E. J. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-257.



Newert RW, Barton B, Greaves P, Harper J y Turner G 1997. Analysis of a commercially improved *Penicillium chrysogenum* strain series: involvement of recombinogenic regions in amplification and deletion of the penicillin biosynthesis gene cluster. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19: 18-27.

Newton, G. G. F. & E. P. Abraham. 1954. Degradation, structure and some derivatives of cephalosporin N. *Biochemical Journal* 58: 103-111.

Nijland JG, Kovalchuk A., Van den Verg M., Bovenberg R., Driessen A. 2008. Expression of the transporter encoded by the *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* increases cephalosporin production in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Gen. Biol.* 45: 1415-1421.

Nishida H, Nishiyama M. 2000. Disruption analysis of DR1420 and/or DR1758 in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Mol Evol* 51: 299

Paracchini, R. 1992. Il signore delle cefalosporine. Ed. Demos, Cagliari, Italia.

PCR efficiency Calculator. 2010. <http://srvgen.upct.es/web.html> .

Peñalva MA, Tilburn J, Bignell E, Arst HN Jr. 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol.* 16: 291-300.

Primer 3 v0.4.0. 2012. <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

Promega® Corporation. 2013. [www.promega.com](http://www.promega.com)

QIAGEN. 2008. OneStep RT-PCR Kit Handbook.

[http://www.csub.edu/~kszick\\_miranda/QIAGEN\\_OneStep\\_RT-PCR\\_Kit\\_Handbook%5B2%5D.pdf](http://www.csub.edu/~kszick_miranda/QIAGEN_OneStep_RT-PCR_Kit_Handbook%5B2%5D.pdf)

Reumann S (2004). Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. *Plant Physiol.* 135: 783-800.

Reverse Complement. 2013. [http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)

Revilla, G., López-Nieto, M.J., Luengo, J.M. y Martín, J.F. (1984). Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *J. Antibiot.* 37: 781-789.

Rodríguez Mabel, Rodríguez William. 2006. PCR en tiempo real. Métodos físico-químicos en Biotecnología. IBT- UNAM.

Robert, V., Stegehuis, G., and Stalpers, J. (2005). The MycoBank engine and related databases. International Mycological Association . International Mycological Association. 9-9-2009.

Sambroock J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schatz A., Bugie E., Waksman S. 1944. Streptomycin: a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental and Biological Medicine.* 55:66-69.

Schmitt, E. K., Kück, U., 2000. The fungal CPC1 protein, which binds specifically to  $\beta$ -lactam biosynthesis genes, is related to human RFX transcription factors. *J. Biol. Chem.* 275: 9348-9357.



- Schmitt, E. K., Kempken R y Kück U. 2001. Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and Characterization of the transcription factor PACC. *Mol. Genet. Genomics*. 256: 508-518.
- Schmitt, E.K., Bunse A., Janus D, Hoff B, Friedlin E., Kürnsteiner H, y Kück U. 2004a. Winged helix transcription factor CPCR1 is involved in regulation of beta-lactam biosynthesis in the fungus *Acremonium chrysogenum*. *Eukaryot. Cell*. 3: 121-134.
- Schmitt, E. K., Hoff, Birgit y Kück U. 2004b. Regulation of cephalosporin biosynthesis. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol*. 88: 1-43.
- Schmitt, E. K., Hoff, Birgit y Kück U. 2004c. AcFKH1, a novel member of the forkhead family, associates with RFX transcription factor CPCR1 in the cephalosporin C producing fungus *Acremonium chrysogenum*. *Gene* 342: 269-281.
- Sykes, RB., O'Sullivan J, Gillum AM, Aklonis CA, Souser ML. 1982. Biosynthesis of monobactam compounds: origin of the carbon atoms in the beta-lactam ring. *Antimicrob Agents Chemother*. 21: 558-564.
- Smith A., Klugman K., Coffey T. y Spratt B. 1993. Genetic diversity of penicillin binding protein 2B and 2X genes from *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother*. 37: 1938-1944.
- Speech C.A., DiRusso, C.C., Novotny, C.P. y Ulrich, R. C. 1982. A method for extracting high-molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal. Biochem*. 119: 158-163.
- Skatrud PL, Queener SW, Carr LG, Fisher DL. 1987. Efficient integrative transformation of *Cephalosporium acremonium*. *Curr Genet*. 12: 337-348
- 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.
- Tangarife Verónica C. 2011. Escuela de Microbiología Universidad de Antioquia *Acremonium spp.* <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?inpopup=true&id=100831>. Revisada 12/06/2013.
- Teijeira F (2009). "Compartimentalización de la biosíntesis de beta-lactamas y regulación de su secreción en *Acremonium chrysogenum*". Tesis doctoral.
- Teijeira F, Ullán R. V., Guerra S. M., García-Estrada C, Vaca I., y Martín J. F. 2009. The transporter CefM involved in translocation of biosynthetic intermediates is essential for cephalosporin production. *Biochem. J*. 418: 113-124.
- Teijeira F, Ullán R., Guerra S. M., Vaca I., y Martín J. F. 2010. Characterization of a novel peroxisome membrane protein essential for conversion of isopenicillin N into cephalosporin C. *Biochem. J*. 432: 227-236.
- Thieman W. y Palladio M. 2010. Introducción a la biotecnología. Pearson. España. 65, 66, 75-77; 81-84.



Torres C. 2002. Lectura interpretada del antibiograma de cocos Gram positivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 20: 354-364.

O'Sullivan, J., R. C. Bleaney, J. A. Huddleston, and E. P. Abraham. 1979. Incorporation of 3H from  $\delta$ -(L- $\alpha$ -amino[4,5-3H]adipyl)-L-cysteiny-D-[4,4-3H]valine into isopenicillin N. *Biochem. J.* 184: 421-426.

Parsons M, Furuya T, Pal S, Kessler P (2001). Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115: 19-28.

Poland. 2013. <http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/html/local/POLAND/poland.html>

QIAGEN®. 2008. OneStep RT-PCR. Handbook.

QIAGEN®. 2010. Taq PCR. Handbook.

Umezawa H., Ueda M., Maeda K., Yagishita K., Kondo S., Okami Y., Utahara R., Osato Y., Nitta K., Takeuchi T. 1957. Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. *J antibiot.* 10: 181-188.

Ullán RV (2002). "Caracterización bioquímica y molecular de la conversión de isopenicilina N en penicilina N en *Acremonium chrysogenum*. Descripción de un nuevo sistema de epimerización en la biosíntesis de antibióticos", Tesis doctoral.

Ullán, R., Liu, G., Casqueiro, J. Gutiérrez, S., Bañuelos, O. y Martín, J. F. 2002a. The *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a putative multidrug efflux pump protein that significantly increases cephalosporin C production. *Mol. Genet. Genomics* 267: 673-683.

Ullán, R. V., Luis, G., casqueiro J, Bañuelos O, Fernández, F. J., Gutiérrez, S., y Martín, J. F. 2002b. A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in *Acremonium chrysogenum*. *J. Biol. Chem.* 277: 46216-46225.

Vaca-Cerezo I (2008). "Desarrollo de un sistema de purificación de isopenicilina N. Caracterización del transporte de éste y otros intermediarios de la ruta biosintética de  $\beta$ -lactamas en los hongos productores *Acremonium chrysogenum* y *Penicillium chrysogenum*", Tesis doctoral.

Van de Kamp M, Driessen AJ, Konings WN (1999). Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. *Antonie van Leeuwenhoek.* 75: 41-78

Van der Lende TR, van de Kamp M, Berg M, Sjollem K, Bovenberg RA, Veenhuis M, Konings WN, Driessen AJ (2002). delta-(L-alpha- Amino adipyl)-L-cysteiny-D valine synthetase, that mediates the first committed step in penicillin biosynthesis, is a cytosolic enzyme. *Fungal Genet. Biol.* 37: 49-55.

Velasco J, Gutiérrez S, Fernández FJ, Marcos AT, Arenos C y Martín JF. 1994. Exogenous methionine increases levels of mRNAs transcribed from *pcbAB*, *pcbC* y *cefEF* genes, encoding enzymes of the cephalosporin biosynthetic pathway, in *Acremonium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* 176: 985-991

Walz M y Kück U. 1993. Targeted integration into the *Acremonium chrysogenum* genome: disruption of the *pcbC* gene. *Curr . Genet.* 24: 421-427

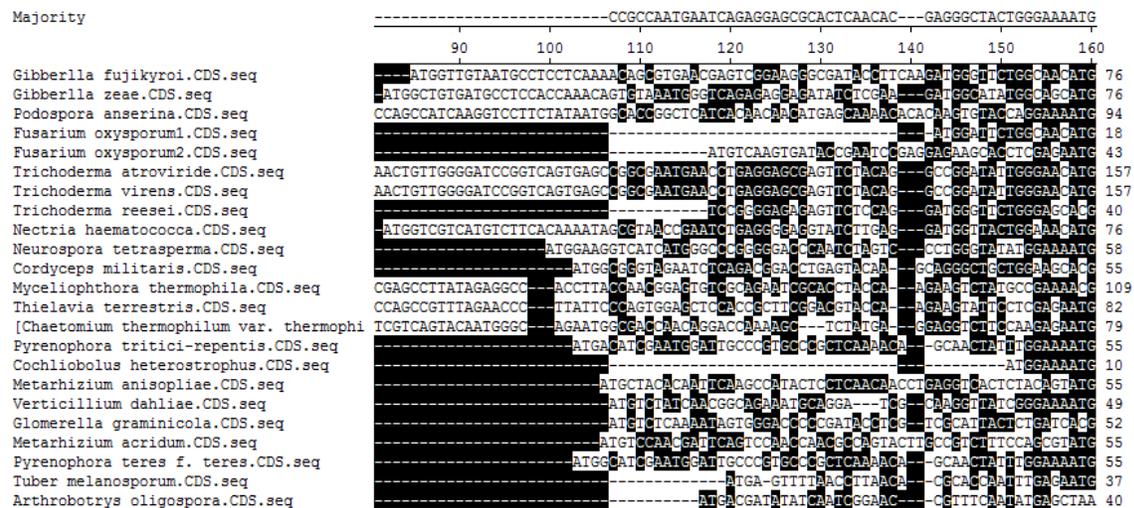
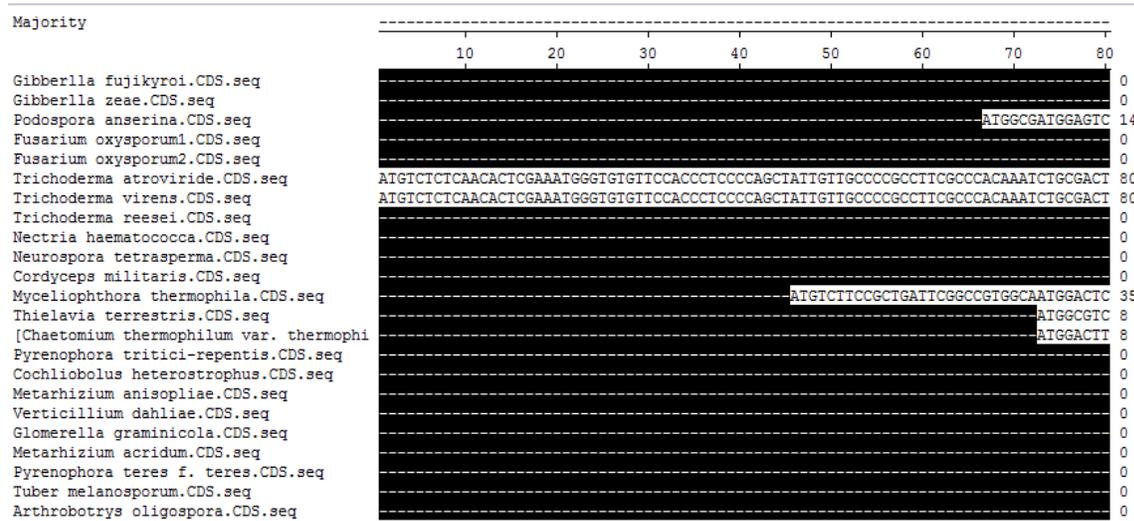
Waksman S., Lechvalier H. 1949. Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms. *Science.* 109: 305-307.



Yu, J. H. Wieser, J. Adams, T. H. 1996. The *Aspergillus* F1bA RGS domain protein antagonize G protein signaling to block proliferation and allow development. EMBO J. 15: 5184-5190.

## Apéndice 1. Alineamiento de la secuencia codificante del gen *laeA*

Alineamiento de la secuencia codificante del gen *laeA* de *Gibberlla fujikyroi*. Las zonas sombreadas son los sitios más conservados. El alineamiento se hizo con ayuda de la herramienta MegAlign del programa Lasergene de DNASTAR.





Majority GTCGCTTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC

170 180 190 200 210 220 230 240

Gibberlla fujikyroi.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 153  
 Gibberlla zeae.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 153  
 Podospora anserina.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 174  
 Fusarium oxysporum1.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 67  
 Fusarium oxysporum2.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 105  
 Trichoderma atroviride.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 234  
 Trichoderma virens.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 234  
 Trichoderma reesei.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 117  
 Nectria haematococca.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 153  
 Neurospora tetrasperma.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 135  
 Cordyceps militaris.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 132  
 Myceliophthora thermophila.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 186  
 Thielavia terrestris.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 159  
 [Chaetomium thermophilum var. thermophi GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 156  
 Pyrenophora tritici-repentis.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 132  
 Cochliobolus heterostrophus.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 87  
 Metarhizium anisopliae.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 132  
 Verticillium dahliae.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 126  
 Glomerella graminicola.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 129  
 Metarhizium acridum.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 132  
 Pyrenophora teres f. teres.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 132  
 Tuber melanosporum.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 114  
 Arthrotrix oligospora.CDS.seq GCGCTTTATGGCTCTTGGAAAGCTGGGAAATACCTGTTTCCCATCGACG---AGGAAGAGCTAGATCGGCTGGATATC 117

Majority TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG

250 260 270 280 290 300 310 320

Gibberlla fujikyroi.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 224  
 Gibberlla zeae.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 224  
 Podospora anserina.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 245  
 Fusarium oxysporum1.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 86  
 Fusarium oxysporum2.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 173  
 Trichoderma atroviride.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 308  
 Trichoderma virens.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 308  
 Trichoderma reesei.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 191  
 Nectria haematococca.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 224  
 Neurospora tetrasperma.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 209  
 Cordyceps militaris.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 203  
 Myceliophthora thermophila.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 260  
 Thielavia terrestris.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 233  
 [Chaetomium thermophilum var. thermophi TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 227  
 Pyrenophora tritici-repentis.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 212  
 Cochliobolus heterostrophus.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 167  
 Metarhizium anisopliae.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 206  
 Verticillium dahliae.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 194  
 Glomerella graminicola.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 197  
 Metarhizium acridum.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 206  
 Pyrenophora teres f. teres.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 212  
 Tuber melanosporum.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 191  
 Arthrotrix oligospora.CDS.seq TITCACAAGTCTTTCTGGTTCGACGAAAGATCAGCTTTCATCAAGCTCCCATCCCAAAAAG-----ACCGCCCG 197

Majority AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG

330 340 350 360 370 380 390 400

Gibberlla fujikyroi.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 297  
 Gibberlla zeae.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 279  
 Podospora anserina.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 313  
 Fusarium oxysporum1.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 140  
 Fusarium oxysporum2.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 246  
 Trichoderma atroviride.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 363  
 Trichoderma virens.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 363  
 Trichoderma reesei.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 246  
 Nectria haematococca.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 279  
 Neurospora tetrasperma.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 277  
 Cordyceps militaris.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 271  
 Myceliophthora thermophila.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 328  
 Thielavia terrestris.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 301  
 [Chaetomium thermophilum var. thermophi AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 295  
 Pyrenophora tritici-repentis.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 282  
 Cochliobolus heterostrophus.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 237  
 Metarhizium anisopliae.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 261  
 Verticillium dahliae.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 274  
 Glomerella graminicola.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 277  
 Metarhizium acridum.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 260  
 Pyrenophora teres f. teres.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 282  
 Tuber melanosporum.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 261  
 Arthrotrix oligospora.CDS.seq AATCTGGATCTGGACATGGCCACAGGCACTTGGGCCATTGACGTGGCAGAA-----AAATACC---A-G--GAG 267



Majority

GTGAT----TGGCATAGATCTG--C-AGATCCAGCCCGAATT-ATCCCCC-AACCTGGG-TTC---ATGCA--GCGAT

	410	420	430	440	450	460	470	480	
Gibberlla fujikyroi.CDS.seq	ATCAT	GGCC	STAGAC	CTG	AT	CA	CCG	CA	369
Gibberlla zeae.CDS.seq	T---	G---	TT	CA	---	---	---	GAC	291
Podospora anserina.CDS.seq	GCACG	TGGCAT	GGATCTG	AACT	GATCC	ACCCG	AATT	387	
Fusarium oxysporum1.CDS.seq	GCAT	CGGC	---	AT	STAG	ATAG	---	195	
Fusarium oxysporum2.CDS.seq	ATAT	GGCCATAG	ACT	GAAC	CGAGT	TCAG	CCG	318	
Trichoderma atroviride.CDS.seq	T---	T---	---	---	---	---	---	375	
Trichoderma virens.CDS.seq	T---	T---	---	---	---	---	---	375	
Trichoderma reesei.CDS.seq	T---	A---	---	---	---	---	---	258	
Nectria haematococca.CDS.seq	T---	G---	---	---	---	---	---	291	
Neurospora tetrasperma.CDS.seq	GTCA	AGTCA	CTGG	CGG	ATCT	GTCT	GATCC	354	
Cordyceps militaris.CDS.seq	CACAT	GTATG	CTGT	CGAT	CTGAA	CAATCC	ACCC	348	
Myceliophthora thermophila.CDS.seq	TCCAT	GT---	TGGC	TTG	ACT	CAAC	TCAG	402	
Thielavia terrestris.CDS.seq	TGCAT	GT---	GGC	CT	GAT	CTGA	ATTC	375	
[Chaetomium thermophilum var. thermophi	CTCAC	CT---	TGG	ACT	AG	CT	TC	369	
Pyrenophora tritici-repentis.CDS.seq	GT---	TTT---	AGG	AT	TAG	ATCT	GT	357	
Cochliobolus heterostrophus.CDS.seq	GTCT	---	AGG	AT	TAG	ATCT	GT	312	
Metarhizium anisopliae.CDS.seq	TTGTA	---	GG	---	---	---	---	285	
Verticillium dahliae.CDS.seq	GTCT	GTAC	ATGG	ACT	TGCT	TATAT	CA	351	
Glomerella graminicola.CDS.seq	GTGCG	TACT	AGG	CTG	CACT	GTCT	CA	354	
Metarhizium acridum.CDS.seq	C---	---	---	---	---	---	---	276	
Pyrenophora teres f. teres.CDS.seq	GTCT	---	AGG	AT	TAG	ATCT	GT	357	
Tuber melanosporum.CDS.seq	GTGAT	---	CGG	CA	TG	AT	CA	333	
Arthrotritys oligospora.CDS.seq	GTAT	---	TGG	CA	TAG	CTG	CC	339	

Majority

GTTGAAGA-CCATGGC-----GCTGGGAGAGGATGCTGGGATCTGATCCATATGCG-ATGTC-ITGGCAGCATCAG

	490	500	510	520	530	540	550	560	
Gibberlla fujikyroi.CDS.seq	ATTGAAGA	CCCT	CTTG	---	GGG	CCCT	CT	GG	446
Gibberlla zeae.CDS.seq	CCCGA	---	---	---	---	---	---	GC	331
Podospora anserina.CDS.seq	ATTGAAT	CAGAG	TGGG	CC	CA	AG	AG	272	
Fusarium oxysporum1.CDS.seq	ATTGAAGA	CCCT	CTTG	---	GGG	CCCT	CT	467	
Fusarium oxysporum2.CDS.seq	ATTGAAGA	CCCA	TATG	---	GG	ATTC	CT	395	
Trichoderma atroviride.CDS.seq	CCCGAAG	---	---	---	---	---	---	415	
Trichoderma virens.CDS.seq	CCCGAAG	---	---	---	---	---	---	415	
Trichoderma reesei.CDS.seq	CCCGAAG	---	---	---	---	---	---	398	
Nectria haematococca.CDS.seq	CCCGAAG	---	---	---	---	---	---	331	
Neurospora tetrasperma.CDS.seq	ATTGAAGA	CCCT	CTTG	---	GGG	CCCT	CT	431	
Cordyceps militaris.CDS.seq	ATCGAAG	AGG	CTG	GG	CC	CT	GG	425	
Myceliophthora thermophila.CDS.seq	ATCGAAG	AGG	CTG	GG	CC	CT	GG	479	
Thielavia terrestris.CDS.seq	ATCGAAG	AGG	CTG	GG	CC	CT	GG	452	
[Chaetomium thermophilum var. thermophi	ATCGAAG	AGG	CTG	GG	CC	CT	GG	446	
Pyrenophora tritici-repentis.CDS.seq	TATGAG	AGC	CTG	GG	CC	CT	GG	431	
Cochliobolus heterostrophus.CDS.seq	TACGAG	AGC	CTG	GG	CC	CT	GG	326	
Metarhizium anisopliae.CDS.seq	CTTG	---	---	---	---	---	---	385	
Verticillium dahliae.CDS.seq	ATTGAAGA	CCCT	CTTG	---	GGG	CCCT	CT	425	
Glomerella graminicola.CDS.seq	ATTGAAGA	CCCT	CTTG	---	GGG	CCCT	CT	428	
Metarhizium acridum.CDS.seq	CCGAGA	---	---	---	---	---	---	316	
Pyrenophora teres f. teres.CDS.seq	TATGAG	AGC	CTG	GG	CC	CT	GG	431	
Tuber melanosporum.CDS.seq	TATGAG	AGC	CTG	GG	CC	CT	GG	407	
Arthrotritys oligospora.CDS.seq	TATGAG	AGC	CTG	GG	CC	CT	GG	413	

Majority

CACT-----TGGCC--AA-TCTACC-CAAGGT-TTCAGGCACCTGAACCCAGGCTATGGCTATAATCGACGACGTTGAGA

	570	580	590	600	610	620	630	640	
Gibberlla fujikyroi.CDS.seq	GAGSG	ACT	TGG	CC	TGA	ACT	CC	AGG	526
Gibberlla zeae.CDS.seq	CAAT	---	---	---	---	---	---	376	
Podospora anserina.CDS.seq	AAGC	---	---	---	---	---	---	541	
Fusarium oxysporum1.CDS.seq	AAGSG	ACT	TGG	CC	TGA	ACT	CC	352	
Fusarium oxysporum2.CDS.seq	GAGSG	ACT	TGG	CC	TGA	ACT	CC	475	
Trichoderma atroviride.CDS.seq	CTCT	---	---	---	---	---	---	457	
Trichoderma virens.CDS.seq	CTCT	---	---	---	---	---	---	457	
Trichoderma reesei.CDS.seq	CTCT	---	---	---	---	---	---	343	
Nectria haematococca.CDS.seq	CTCT	---	---	---	---	---	---	376	
Neurospora tetrasperma.CDS.seq	CGAC	---	---	---	---	---	---	505	
Cordyceps militaris.CDS.seq	CAACAC	ATTG	GGCC	AG	AT	CTAT	GG	502	
Myceliophthora thermophila.CDS.seq	CAAT	---	---	---	---	---	---	553	
Thielavia terrestris.CDS.seq	CGAT	---	---	---	---	---	---	526	
[Chaetomium thermophilum var. thermophi	CAAC	---	---	---	---	---	---	517	
Pyrenophora tritici-repentis.CDS.seq	ATCT	---	---	---	---	---	---	505	
Cochliobolus heterostrophus.CDS.seq	GAAC	---	---	---	---	---	---	460	
Metarhizium anisopliae.CDS.seq	GGTT	---	---	---	---	---	---	370	
Verticillium dahliae.CDS.seq	GGAT	---	---	---	---	---	---	496	
Glomerella graminicola.CDS.seq	AGAC	---	---	---	---	---	---	499	
Metarhizium acridum.CDS.seq	AGAA	---	---	---	---	---	---	361	
Pyrenophora teres f. teres.CDS.seq	AGCT	---	---	---	---	---	---	505	
Tuber melanosporum.CDS.seq	TAGC	---	---	---	---	---	---	481	
Arthrotritys oligospora.CDS.seq	AAGC	---	---	---	---	---	---	487	



Majority

TCGACTGGATGCCCCGGTGTGACGATG-----ACAAACTCCCAACGAATTCGGCTTTGTGCAGT-----GGG

	650	660	670	680	690	700	710	720	
Gibberlla fujikyroi.CDS.seq	TTCAGTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	ATGAACGCCAGCAAAATTCGGCTTTGTGCAGT	-----	GGG	589			
Gibberlla zeae.CDS.seq	TTCAGTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	ATGAGTGTCTGCGAATTCGGCTTTGTGCAGT	-----	GGG	439			
Podospora anserina.CDS.seq	TCGACTGCAGCCCGTGTGACGATG	-----	CCGGACTGTCTATGGCTTCTGTGATTCGAGT	-----	GGG	604			
Fusarium oxysporum1.CDS.seq	TTCAGTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	ATGAACGCCAGCAAAATTCGGCTTTGTGCAGT	-----	GGG	415			
Fusarium oxysporum2.CDS.seq	TTCAGTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	ATGAGTGTCTGCGAATTCGGCTTTGTGCAGT	-----	GGT	538			
Trichoderma atroviride.CDS.seq	TTCAGTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	AAATAATCCCAACGAATTCGGCTTTGTGCAGT	-----	GGG	520			
Trichoderma virens.CDS.seq	TTCAGTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	AAATAATCCCAACGAATTCGGCTTTGTGCAGT	-----	GGG	520			
Trichoderma reesei.CDS.seq	TTCAGTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	AGATCTCCCGAGCAATTCGGCTTTGTGCAGT	-----	GGG	406			
Nectria haematococca.CDS.seq	TCGACTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	ACGAGAGGCTTCGAATTCGTATTCACCGAT	-----	GGG	439			
Neurospora tetrasperma.CDS.seq	TCGACTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	GGAGTCTCCACCGGATTCGATTCCTTACGAT	-----	GGG	569			
Cordyceps militaris.CDS.seq	TTCAGTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	TCCAGCTCAGGATTCGATTCCTTACGAT	-----	GGG	562			
Myceliophthora thermophila.CDS.seq	TCGACTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	CTCCGCTCCGCGAGCGGTACCTGTGCAGT	-----	GGG	616			
Thielavia terrestris.CDS.seq	TTCAGTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	GTCCCTCCGCGAGCGGTACCTGTGCAGT	-----	GGG	589			
[Chaetomium thermophilum var. thermophi	TTCAGTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	GGACCTTCCGAGCAATTCGATTCCTTACGAT	-----	GGG	580			
Pyrenophora tritici-repentis.CDS.seq	TCGACTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	GTCCGCTCCGCGAGCGGTACCTGTGCAGT	-----	GGG	567			
Cochliobolus heterostrophus.CDS.seq	TCGACTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	ACAGCTTCCGAGCAATTCGATTCCTTACGAT	-----	GGG	522			
Metarhizium anisopliae.CDS.seq	TCGACTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	ATACATGCTCCAGTCCGTCCTTACGAT	-----	GGT	433			
Verticillium dahliae.CDS.seq	TCGACTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	ACACACTCACTCCGAGCAATTCGATTCCTTACGAT	-----	GGG	560			
Glomerella graminicola.CDS.seq	TCGACTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	ACACCTTCCAGCGGATTCGATTCCTTACGAT	-----	GGG	563			
Metarhizium acridum.CDS.seq	TCGACTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	GGGATGGAGGCGGATTCGATTCCTTACGAT	-----	GGT	433			
Pyrenophora teres f. teres.CDS.seq	TCGACTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	ACAGCTTCCGAGCAATTCGATTCCTTACGAT	-----	GGG	567			
Tuber melanosporum.CDS.seq	TCGACTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	GTACACTTCCAGCGGATTCGATTCCTTACGAT	-----	AGT	543			
Arthrotrichia oligospora.CDS.seq	TCGACTGGATGCCCCGGTGTGACGATG	-----	GACAAATGTCTTCAAAATTCGATTCCTTACGAT	-----	GGG	558			

Majority

CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT--ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG

	730	740	750	760	770	780	790	800	
Gibberlla fujikyroi.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	667			
Gibberlla zeae.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	517			
Podospora anserina.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	682			
Fusarium oxysporum1.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	493			
Fusarium oxysporum2.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	616			
Trichoderma atroviride.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	598			
Trichoderma virens.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	598			
Trichoderma reesei.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	484			
Nectria haematococca.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	517			
Neurospora tetrasperma.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	646			
Cordyceps militaris.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	640			
Myceliophthora thermophila.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	694			
Thielavia terrestris.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	667			
[Chaetomium thermophilum var. thermophi	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	658			
Pyrenophora tritici-repentis.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	643			
Cochliobolus heterostrophus.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	598			
Metarhizium anisopliae.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	511			
Verticillium dahliae.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	634			
Glomerella graminicola.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	634			
Metarhizium acridum.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	511			
Pyrenophora teres f. teres.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	643			
Tuber melanosporum.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	619			
Arthrotrichia oligospora.CDS.seq	CAGAGCT-TTTCCTGGATGCCATGGACCGCAITTGACCGACCCTGACAGT	---	ACAGCGATGGCA-CCGACAGATGCTGG	---	GGG	634			

Majority

AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA

	810	820	830	840	850	860	870	880	
Gibberlla fujikyroi.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	747					
Gibberlla zeae.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	597					
Podospora anserina.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	762					
Fusarium oxysporum1.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	573					
Fusarium oxysporum2.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	696					
Trichoderma atroviride.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	678					
Trichoderma virens.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	678					
Trichoderma reesei.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	564					
Nectria haematococca.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	597					
Neurospora tetrasperma.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	726					
Cordyceps militaris.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	720					
Myceliophthora thermophila.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	774					
Thielavia terrestris.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	747					
[Chaetomium thermophilum var. thermophi	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	738					
Pyrenophora tritici-repentis.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	723					
Cochliobolus heterostrophus.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	678					
Metarhizium anisopliae.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	591					
Verticillium dahliae.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	714					
Glomerella graminicola.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	714					
Metarhizium acridum.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	591					
Pyrenophora teres f. teres.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	723					
Tuber melanosporum.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	699					
Arthrotrichia oligospora.CDS.seq	AGGCTGCTGGTTTCCAGCGATATCAAGAGGAGGATATCCGGGTCCTGTCAACCCCTGGCCTACTGACCCCATGAGCAA	---	GGG	714					



Majority

GAGATTGCCGATGGTTCAACCTTGGCCCTGACTCAGGGTCTCGAGGCCCTGAGCTTGGCACCCTGATTGGGAAACTTGG

	890	900	910	920	930	940	950	960	
Gibberlla fujikyroi.CDS.seq	GAAATCGCTCGATGGTTCAACATCGGACTGTTCTCATAGTCTGAGGCCCTGAGCTTAAACCCCTTATCAGAAACTCGG								827
Gibberlla zeae.CDS.seq	GAGATTGCAAGTGGTTCAATATGGACTATCTCACAGCTTSENATCTTGAGCTGAAACCACTGCTGGAGAAACTTGG								877
Podospora anserina.CDS.seq	GCATTGGCCGTTGGTTTAACTTCTGAGGAGCAGGGATTCAGACTCTGTGCTGTGGGCCCTTTGGCGAGGACTCAA								842
Fusarium oxysporum1.CDS.seq	GAAATCGCTCGATGGTTCAACATCGGACTGTTCTCATAGTCTGAGGCCCTGAGCTTAAACCCCTTATCAGAAACTCGG								653
Fusarium oxysporum2.CDS.seq	GACCTCGCTCGTGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACAGG								776
Trichoderma atroviride.CDS.seq	GAGTCTGCTCGTGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								758
Trichoderma virens.CDS.seq	GAGTCTGCTCGTGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								758
Trichoderma reesei.CDS.seq	GAGTCTGCTCGTGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								644
Nectria haematococca.CDS.seq	GAGATTGCAAGTGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								677
Neurospora tetrasperma.CDS.seq	GAGATTGCAAGTGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								806
Cordyceps militaris.CDS.seq	AGGTTGCTCATGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								800
Myceliophthora thermophila.CDS.seq	CCCTTGGTGGTGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								854
Thielavia terrestris.CDS.seq	CACTCGCCGATGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								827
[Chaetomium thermophilum var. thermophi	GAATTAGGCGATGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								818
Pyrenophora tritici-repentis.CDS.seq	GACATGGCCAGTGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								803
Cochliobolus heterostrophus.CDS.seq	GAATTAGGCGATGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								758
Metarhizium anisopliae.CDS.seq	GACCTTCGAATGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								671
Verticillium dahliae.CDS.seq	GAGTGGTGGTGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								794
Glomerella graminicola.CDS.seq	GAGATTGGCCGATGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								794
Metarhizium acridum.CDS.seq	ATTGCTCAAAATGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								671
Pyrenophora teres f. teres.CDS.seq	GACATGGCCAGTGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								803
Tuber melanosporum.CDS.seq	GACTCGGCGATGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								779
Arthrotrichy oligospora.CDS.seq	AAGATTGGCTCTGGTTCAACCTTGGCTTACAGCCCACTTTGAAACCTGAGGCTGATGCCCCTGATATAAGAAACTGG								794

Majority

CTGGACCCTCGA---CGATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT

	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	
Gibberlla fujikyroi.CDS.seq	ATTCGAGGCCGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								904
Gibberlla zeae.CDS.seq	CTGGAGCCCGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								753
Podospora anserina.CDS.seq	GAATGCTTTC---CGATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								919
Fusarium oxysporum1.CDS.seq	ATTCGAGGCCGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								730
Fusarium oxysporum2.CDS.seq	ACTGACCTACGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								853
Trichoderma atroviride.CDS.seq	TATGACCAAGGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								835
Trichoderma virens.CDS.seq	TATGACCAAGGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								835
Trichoderma reesei.CDS.seq	CATGACCAAGGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								663
Nectria haematococca.CDS.seq	CCTGGCCCTGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								732
Neurospora tetrasperma.CDS.seq	TATGACCCCGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								883
Cordyceps militaris.CDS.seq	GAATGCTTTC---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								877
Myceliophthora thermophila.CDS.seq	CGGACCCGAG---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								931
Thielavia terrestris.CDS.seq	CGGACCCGAG---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								904
[Chaetomium thermophilum var. thermophi	GGCTCGCTGAG---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								895
Pyrenophora tritici-repentis.CDS.seq	ATGGGATCTCAAGCCACATGTCACACCTGCTGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								883
Cochliobolus heterostrophus.CDS.seq	TGGGACCTCATGCTCGAGTGGCCGAGTGGAGAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								838
Metarhizium acridum.CDS.seq	CATGACCAAGGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								748
Verticillium dahliae.CDS.seq	TGGCCGCTGGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								871
Glomerella graminicola.CDS.seq	TGGCCGCTGGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								871
Metarhizium acridum.CDS.seq	CATGACCAAGGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								748
Pyrenophora teres f. teres.CDS.seq	GTGGGATATCGGACCACTGACAGCAATGCTGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								883
Tuber melanosporum.CDS.seq	ATGGTGGCCGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								856
Arthrotrichy oligospora.CDS.seq	CTGGGATCTGA---GATGTCCTGACCTGTTTGGAGAAAGTGAAGAAGGAGATCTGCAAGCTGGCCATTATGCGTACT								871

Majority

GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX

	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	
Gibberlla fujikyroi.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								951
Gibberlla zeae.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								833
Podospora anserina.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								999
Fusarium oxysporum1.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								806
Fusarium oxysporum2.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								933
Trichoderma atroviride.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								846
Trichoderma virens.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								846
Trichoderma reesei.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								663
Nectria haematococca.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								732
Neurospora tetrasperma.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								921
Cordyceps militaris.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								888
Myceliophthora thermophila.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								969
Thielavia terrestris.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								984
[Chaetomium thermophilum var. thermophi	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								906
Pyrenophora tritici-repentis.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								924
Cochliobolus heterostrophus.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								879
Metarhizium anisopliae.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								759
Verticillium dahliae.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								951
Glomerella graminicola.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								882
Metarhizium acridum.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								774
Pyrenophora teres f. teres.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								894
Tuber melanosporum.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								935
Arthrotrichy oligospora.CDS.seq	GCAACATGTACTXTXXACXGXXXXXXGXX								906





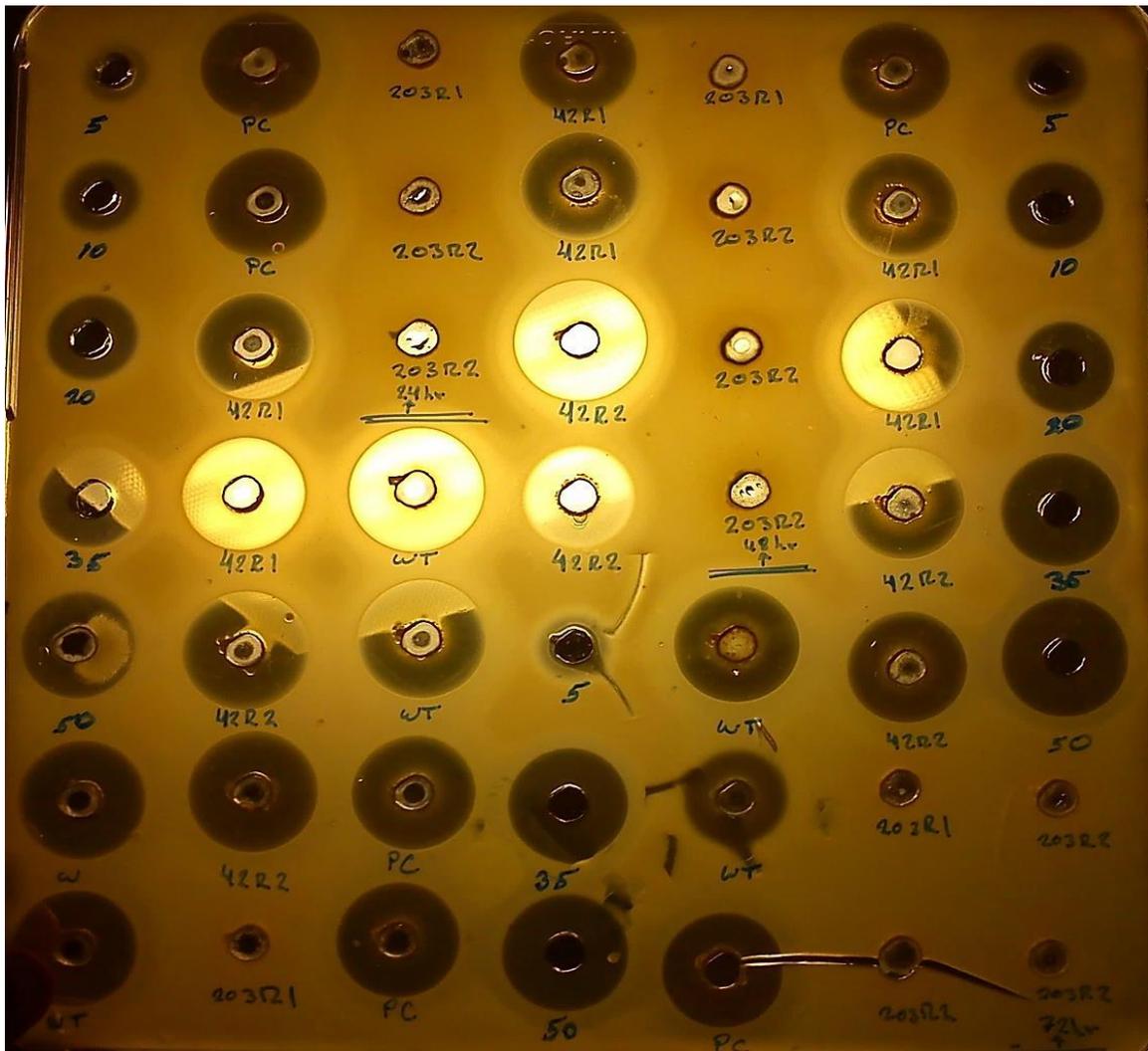


Majority	LGWTPEDVV--L---V-RELCSRKIHAYCN-H--L---P-----RVHAYC-----	
	330      340      350      360      370      380      390      400	
Gibberlla fujikyroi.PRO	LGFEAEIV-----RELCRRAKRETCV-----P-----RVHAYCNIHV-----	306
Fusarium oxysporum2.PRO	QLLNYEIVG-----ELGARAREEITCV-----P-----QNHAEFCNIYVWTARKPEGCLSN--	302
Arthrobotrys oligospora.PRO	YGDLE-QITGFLG-PVKKEMISRRVHANNMHIWIARRP	301
Botryotinia fuckelianaPRO.pro	YGWT-RQDVTREIT-EVRRDHCRRKIRAYNNLHWIARRP	367
Chaetomium thermophilum var. thermophil	NRRSV-ADLYDMAE-KARREVESTCVHAYCNL	301
Cochliobolus heterostrophus.PRO	YHMDLNARVPIVE-GVRRRELCNRKIHAYNNIHWIARRPQ	291
Cordyceps militaris CM01.PRO	LRKSHSEVDKLGNV-----KQECCL-----P-----RVHAYCVM	295
Fusarium oxysporum1.PRO	LGFEAEIV-----RELCRRAKRETCV-----P-----RVHAYCNIHV-----	262
Verticillium dahliae.PRO	LGWPEV-CVQSSP-PVKKNLKLSIHAYCRLNRTDQITL--NWTAKQHRL--GH-RAESSLCLPLSSPPLPYIITL	335
Gibberlla zeae.PRO	LGWPEVDEVTFAAMSGCQSSIAHRSKATLAQKR-----P-----PTQDINSGH-	270
Glomerella graminicola.PRO	LGWPRH-QDRIVE-DLRMDHGRHVHAYCRM	293
Metarhizium acridum.PRO	LGEMMGVSR-----DGRVVKELQ-----P-----RSHFENVCSLVF	257
Metarhizium anisopliae.PRO	LGMSOSKQD-----DGRVVKELQ-----P-----RSHFENVCSLVF	252
Myceliophthora thermophila.PRO	LRRTI-AEIQEAE-NIKHEVPSNSVRYCITLHFTARRP	322
Nectria haematococca.PRO	RLGSD-----ETCI-----P-----RVHAYCVM	243
Neurospora tetrasperma.PRO	LGYTE-BAARHIS-HVKEIIRSRKIRAYCITLHFTARRP	305
Podospora anserina.PRO	LKSF-SEINDVE-EKGFVSKKRVKQIMHFTARRPQGDN-----PASSQT--	328
Pyrenophora teres f.PRO	YGDIDAHIRPLE-NVRRRELCNRKIHAYNNIHWIARRPQ	297
Pyrenophora tritici-repentis.PRO	YGMDLNARVPIVE-GVRRRELCNRKIHAYNNIHWIARRPQ	306
Thielavia terrestris.PRO	NCFTE-AEISEMTD-KIRAEIYSNSVRYCITLHFTARRP	333
Trichoderma atroviride.PRO	LGWPEV-----DLGRVVKELQ-----P-----RVHAYCFTLHWIATKPPASP--	347
Trichoderma reesei.PRO	LGWPRDI-----DLGRVVKELQ-----P-----RVHAYCFTL	221
Trichoderma virens.PRO	LGWPRDI-----DLGRVVKELQ-----P-----RVHAYCFTL	281
Tuber melanosporum Mel28.PRO	LGWSAD-NVKNLGL-PVKKDINNRKIHAYSDMHWIARRPQD--WGVED-----	302
Majority		
	-----	
	410      420      430      440      450	
Gibberlla fujikyroi.PRO	-----WTARKP-----GPQQ	316
Fusarium oxysporum2.PRO	-----HIGQETIVDRT-----FDAEIN	319
Arthrobotrys oligospora.PRO	-----KRSNGLHEALVKLRGAARHEPDNSWIACY-----RIW	301
Botryotinia fuckelianaPRO.pro	-----Q	400
Chaetomium thermophilum var. thermophil	-----Q	301
Cochliobolus heterostrophus.PRO	-----Q	292
Cordyceps militaris CM01.PRO	INWQ-----IQIGLVNQQGFKR-----WRQRFRAQLHRDDP	295
Fusarium oxysporum1.PRO	--FTNISSSLEYILVAFASRP-----AWGSTLASEFAIVKNTLVQRNRGL	293
Verticillium dahliae.PRO	-----SMKL-----ISTI	378
Gibberlla zeae.PRO	-----SMKL-----ISTI	278
Glomerella graminicola.PRO	-----A	293
Metarhizium acridum.PRO	-----S-----RSRARQH	257
Metarhizium anisopliae.PRO	-----S-----RSRARQH	252
Myceliophthora thermophila.PRO	-----Q	322
Nectria haematococca.PRO	-----P-----RARPRQA	243
Neurospora tetrasperma.PRO	-----A	306
Podospora anserina.PRO	-----S-----RSRARQH	336
Pyrenophora teres f.PRO	-----Q	297
Pyrenophora tritici-repentis.PRO	-----Q	307
Thielavia terrestris.PRO	-----P-----RARPRQA	341
Trichoderma atroviride.PRO	-----PQ	349
Trichoderma reesei.PRO	-----PQ	221
Trichoderma virens.PRO	-----PQ	281
Tuber melanosporum Mel28.PRO	-----KKVSSIKRAITK	314



### Apéndice 3. Placas del bioensayo 2 de transformantes Aga1

Placa de bioensayo 2 de las 24, 48 y 72 horas de Aga1. Se muestran los halos de inhibición característicos, con replicas biológicas, sin embargo las cepas G203R nuevamente no presentaron producción de  $\beta$ - lactámicos. 5 ,10 20,35 y 50 representan las concentraciones conocidas ( $\mu\text{g/mL}$ ) para la curva estándar.





Placa de bioensayo 2 de las 96, 120 y cero horas de Aga1. Se muestran los halos de inhibición característicos, con replicas biológicas, sin embargo las cepas G203R nuevamente no presentaron producción de  $\beta$ - lactámicos. 5 ,10 20,35 y 50 representan las concentraciones conocidas ( $\mu\text{g/mL}$ ) para la curva estándar.

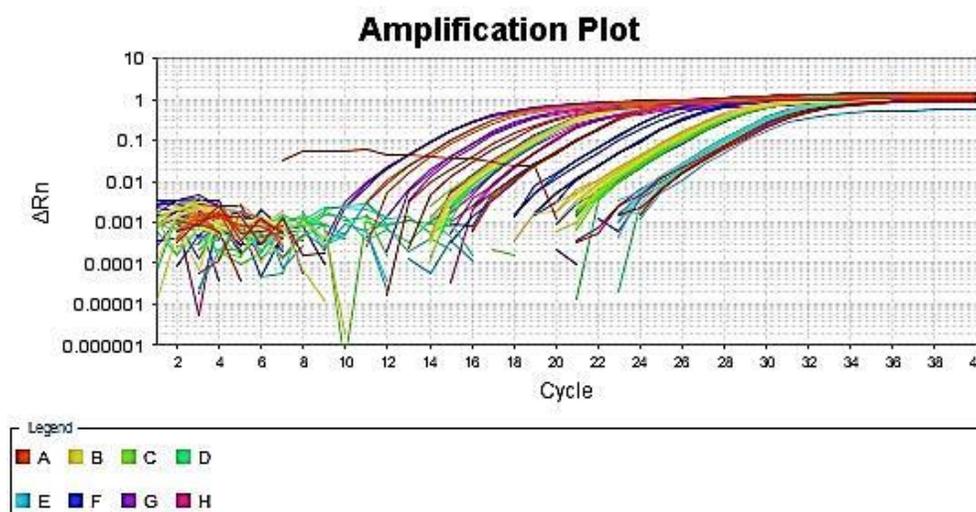




## Apéndice 4. Amplificación del gen *cefD1* en muestras tomadas a las 24 h de cultivo mediante PCR de tiempo real

Amplificación de *cefD1* a las 24 hrs., mediante RT-qPCR. Se muestra la amplificación en tiempo real de *cefD1* a las 24 hrs. El threshold de *cefD1* corresponde a 0.097579 y el de *gpd* 0.083769, es decir donde existe un incremento significativo de fluorescencia para comenzar a cuantificar. Las leyendas A, B,... se refieren a la posición de la muestra en el plato de reacción.

El grafico presentó un comportamiento adecuado característico de amplificación, lo cual es un buen indicativo de que el ensayo fue satisfactorio.



## Apéndice 5. Organización del Plato de reacción de *cefD1* a las 24 hrs y resultados

Se muestran al inicio los controles para ambos genes. Posteriormente las muestras de concentración desconocida para ambos genes de las réplicas biológicas por triplicado y finalmente los concentraciones de los estándares para ambos genes.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												



En la siguiente tabla se muestra el resultado del plato de reacción de *cefD1* a las 24 hrs. Se muestran algunas banderas (flags) que indican lo siguiente: (AMPNC) Amplification in negative control: A1, A2, A3, A4, A5, (HIGHSD) High standard deviation in replicate group: E7, E8, E9, (MTP) Multiple Tm peaks A6, B7, B8, B9, C1, C2, C3, C7, C8, C9, F7, F10, F11.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CefD1 SYBR-None Tm1: 76.07	CefD1 SYBR-None Tm1: 76.07	CefD1 SYBR-None Tm1: 76.36	gpd SYBR-None Tm1: 78.3	gpd SYBR-None Tm1: 78.59	gpd SYBR-None Tm1: 81.58	CefD1 414.53 SYBR-None Tm1: 81.88	CefD1 395.3 SYBR-None Tm1: 81.88	CefD1 398.68 SYBR-None Tm1: 81.88	gpd 682.99 SYBR-None Tm1: 79.49	gpd 354.89 SYBR-None Tm1: 79.34	gpd 585.63 SYBR-None Tm1: 79.34
B	CefD1 1.64 SYBR-None Tm1: 80.99	CefD1 1.83 SYBR-None Tm1: 80.99	CefD1 1.67 SYBR-None Tm1: 81.13	gpd 0.44 SYBR-None Tm1: 78.15	gpd 0.5 SYBR-None Tm1: 78.44	gpd 0.54 SYBR-None Tm1: 78.44	CefD1 1.09 Tm1: 80.98	CefD1 1.12 Tm1: 78.15	CefD1 1.33 Tm1: 80.83	gpd 0.5 SYBR-None Tm1: 78.15	gpd 0.44 SYBR-None Tm1: 78	gpd 0.38 SYBR-None Tm1: 78
C	CefD1 0.94 Tm1: 78.01	CefD1 1.32 Tm1: 80.69	CefD1 1.15 Tm1: 78.3	gpd 0.4 SYBR-None Tm1: 78.15	gpd 0.65 SYBR-None Tm1: 78.44	gpd 0.5 SYBR-None Tm1: 78.29	CefD1 0.67 Tm1: 77.11	CefD1 0.88 Tm1: 77.11	CefD1 0.92 Tm1: 77.11	gpd 0.38 SYBR-None Tm1: 78.15	gpd 0.36 SYBR-None Tm1: 78	gpd 0.42 SYBR-None Tm1: 78
D	CefD1 0.56 SYBR-None Tm1: 80.99	CefD1 0.66 SYBR-None Tm1: 80.99	CefD1 0.59 SYBR-None Tm1: 81.13	gpd 0.36 SYBR-None Tm1: 78.15	gpd 0.41 SYBR-None Tm1: 78.29	gpd 0.42 SYBR-None Tm1: 78.29	CefD1 0.04 SYBR-None Tm1: 76.21	CefD1 0.04 SYBR-None Tm1: 76.21	CefD1 0.05 SYBR-None Tm1: 76.21	gpd 0.46 SYBR-None Tm1: 78	gpd 0.48 SYBR-None Tm1: 77.85	gpd 0.29 SYBR-None Tm1: 77.85
E	CefD1 0.06 SYBR-None Tm1: 76.07	CefD1 0.06 SYBR-None Tm1: 76.07	CefD1 0.06 SYBR-None Tm1: 76.21	gpd 0.36 SYBR-None Tm1: 78	gpd 0.58 SYBR-None Tm1: 78.29	gpd 0.68 SYBR-None Tm1: 78.29	CefD1 0.06 Tm1: 76.06	CefD1 0.02 Tm1: 76.06	CefD1 0.07 Tm1: 76.06	gpd 0.41 SYBR-None Tm1: 78	gpd 0.41 SYBR-None Tm1: 77.85	gpd 0.3 SYBR-None Tm1: 77.85
F	CefD1 500 SYBR-None Tm1: 81.73	CefD1 500 SYBR-None Tm1: 81.58	CefD1 500 SYBR-None Tm1: 81.87	CefD1 50 SYBR-None Tm1: 81.73	CefD1 50 SYBR-None Tm1: 81.87	CefD1 50 SYBR-None Tm1: 81.87	CefD1 5 Tm1: 81.13	CefD1 5 SYBR-None Tm1: 81.43	CefD1 5 SYBR-None Tm1: 81.43	CefD1 0.5 Tm1: 78.45	CefD1 0.5 Tm1: 78.45	CefD1 0.5 SYBR-None Tm1: 78.3
G	CefD1 0.05 SYBR-None Tm1: 76.22	CefD1 0.05 SYBR-None Tm1: 76.22	CefD1 0.05 SYBR-None Tm1: 76.21	gpd 500 SYBR-None Tm1: 79.49	gpd 500 SYBR-None Tm1: 79.79	gpd 500 SYBR-None Tm1: 79.64	gpd 50 SYBR-None Tm1: 79.19	gpd 50 SYBR-None Tm1: 79.19	gpd 50 SYBR-None Tm1: 79.2	gpd 5 SYBR-None Tm1: 78.9	gpd 5 SYBR-None Tm1: 78.75	gpd 5 SYBR-None Tm1: 78.75
H	gpd 0.5 SYBR-None Tm1: 78.01	gpd 0.5 SYBR-None Tm1: 78.01	gpd 0.5 SYBR-None Tm1: 78.15	gpd 0.05 SYBR-None Tm1: 78.15	gpd 0.05 SYBR-None Tm1: 78.44	gpd 0.05 SYBR-None Tm1: 78.29						

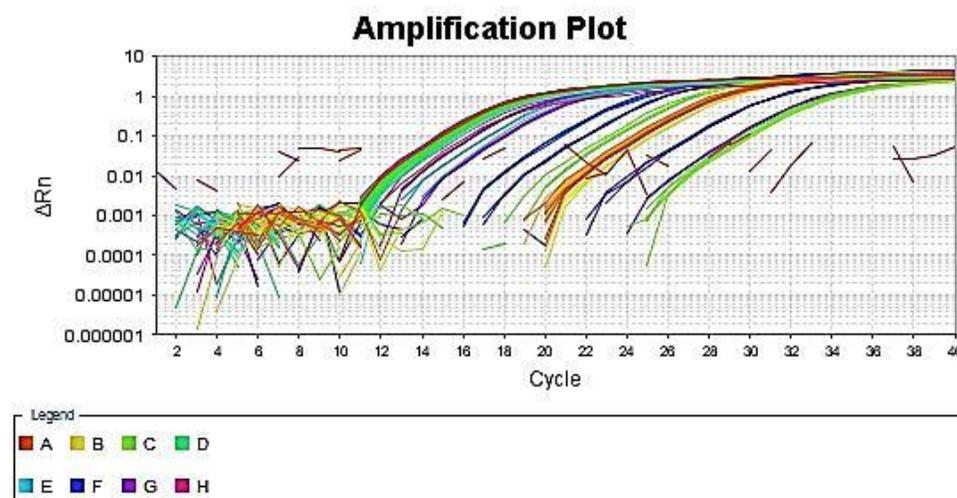
Las banderas que aparecen en el plato de reacción hacen referencia a AMPNC (amplificación del control negativo) que pudo haber sido a un mal diseño de primers, contaminación de uno a mas componentes de la muestra de reacción o una mezcla de reacción inestable, cuando es el caso de no usar una enzima hot-star. En el caso de HIGHSD (desviación estándar alta entre replicas), se puede deber a haber burbujas en el interior del pozo, un sellado inapropiado de la placa, lo cual lleva a una condensación e inconsistentes volúmenes, también por a un error de pipeteo, perdida de un componente de reacción o una mala mezcla de reacción y, finalmente, a un escasa cantidad de



templado ADN. En el caso de MTP (múltiples picos  $T_m$ ), puede deberse a la contaminación de uno o más componentes de la reacción, una mezcla de reacción inestable, un mal diseño de primers o una PCR no optimizada.

## Apéndice 6. Amplificación del gen *cefD1* en muestras tomadas a las 48 h de cultivo mediante PCR de tiempo real

Amplificación de *cefD1* a las 48 hrs. mediante RT-qPCR. Se muestra la amplificación en tiempo real de *cefD1* a las 48 hrs. El threshold de *cefD1* corresponde a 0.017878y el de *gpd* 0.168966, es decir donde existe un incremento significativo de fluorescencia para comenzar a cuantificar. Las leyendas se refieren a la posición de la muestra en el plato de reacción.



## Apéndice 7. Resultado del plato de reacción de *cefD1* a las 48 hrs

Algunas de las posibles causas de los flags se mencionaron en el ensayo de *cefD1* de las 24 hrs. Otros como BADROX y NOISE es probable por presentar gotas a los lados de pozo, mal sellado de la placa, o errores de pipeteo. NOSIGNAL es por no presentar mezcla de reacción el pozo. OUTLIERRG es probable por contaminación, mal sellado de la placa o errores de pipeteo.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CeID SYBR-None Tm1: 67.73	CeID SYBR-None Tm1: 62.51	CeID SYBR-None Tm1: 73.68	gpd SYBR-None Tm1: 77.41	gpd SYBR-None Tm1: 78.15	gpd SYBR-None Tm1: 78.15	CeID 4.77 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 4.9 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 5.24 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 4.53 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 7.7 SYBR-None Tm1: 81.44	CeID 4.67 SYBR-None Tm1: 81.44
B	CeID 6.33 SYBR-None Tm1: 81.29	CeID 5.9 SYBR-None Tm1: 81.29	CeID 6.68 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 5.93 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 5.66 SYBR-None Tm1: 81.73	CeID 5.5 SYBR-None Tm1: 81.73	CeID 5.06 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 5.02 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 4.84 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 2.76 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 2.53 SYBR-None Tm1: 81.29	CeID 2.73 SYBR-None Tm1: 81.29
C	CeID 0.03 SYBR-None Tm1: 75.92	CeID 0.02 SYBR-None Tm1: 76.07	CeID 0.02 SYBR-None Tm1: 76.07	CeID 31.59 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 17.6 SYBR-None Tm1: 81.73	CeID 15.68 SYBR-None Tm1: 81.73	CeID 0.03 SYBR-None Tm1: 76.07	CeID 0.03 SYBR-None Tm1: 76.07	CeID 0.03 SYBR-None Tm1: 76.07	gpd 0.71 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 0.57 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 0.47 SYBR-None Tm1: 77.71
D	gpd 1.54 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 0.58 SYBR-None Tm1: 77.56	gpd 0.82 SYBR-None Tm1: 77.86	gpd 0.33 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 0.21 SYBR-None Tm1: 78	gpd 0.25 SYBR-None Tm1: 78	gpd 0.24 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 0.15 SYBR-None Tm1: 77.86	gpd 0.18 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 0.75 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 0.55 SYBR-None Tm1: 77.56	gpd 0.46 SYBR-None Tm1: 77.71
E	gpd 3.43 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 1.25 SYBR-None Tm1: 77.56	gpd 0.97 SYBR-None Tm1: 77.86	gpd 0.51 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 0.37 SYBR-None Tm1: 78	gpd 0.4 SYBR-None Tm1: 78	gpd 2.16E3 SYBR-None Tm1: 78.01	gpd 431.98 SYBR-None Tm1: 78.01	gpd 437.37 SYBR-None Tm1: 77.86	gpd 0.35 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 0.15 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 0.12 SYBR-None Tm1: 77.71
F	CeID 500 SYBR-None Tm1: 81.44	CeID 500 SYBR-None Tm1: 81.29	CeID 500 SYBR-None Tm1: 81.58	CeID 50 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 50 SYBR-None Tm1: 81.73	CeID 50 SYBR-None Tm1: 81.73	CeID 5 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 5 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 5 SYBR-None Tm1: 81.43	CeID 0.5 SYBR-None Tm1: 81.29	CeID 0.5 SYBR-None Tm1: 81.14	CeID 0.5 SYBR-None Tm1: 80.99
G	CeID 0.05 SYBR-None Tm1: 75.92	CeID 0.05 SYBR-None Tm1: 76.07	CeID 0.05 SYBR-None Tm1: 71.3	gpd 500 SYBR-None Tm1: 78.9	gpd 500 SYBR-None Tm1: 79.2	gpd 500 SYBR-None Tm1: 79.2	gpd 50 SYBR-None Tm1: 78.3	gpd 50 SYBR-None Tm1: 78.3	gpd 50 SYBR-None Tm1: 78.3	gpd 5 SYBR-None Tm1: 77.86	gpd 5 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 5 SYBR-None Tm1: 77.56
H	gpd 0.5 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 0.5 SYBR-None Tm1: 77.71	gpd 0.5 SYBR-None Tm1: 78.01	gpd 0.05 SYBR-None Tm1: 77.86	gpd 0.05 SYBR-None Tm1: 78.15	gpd 0.05 SYBR-None Tm1: 78.15						

Los resultados de estas banderas se muestran en la siguiente tabla, donde se señala la descripción, la frecuencia y el pozo que la presenta.

Bandera	Descripción	Frecuencia	Pozos
AMPNC	Amplification in negative control	5	A2, A3, A4, A5, A6
BADROX	Bad passive reference signal	4	A1, A2, A3, G3
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	0	
NOAMP	No amplification	0	
NOISE	Noise higher than others in plate	4	A1, A2, A3, G3
SPIKE	Noise spikes	0	
NOSIGNAL	No signal in well	4	A1, A2, A3, G3
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	1	E7
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	0	
BLFAIL	Baseline algorithm failed	0	
THOLDFAIL	Thresholding algorithm failed	0	
CTFAIL	Ct algorithm failed	0	
MTP	Multiple Tm peaks	5	A1, A2, C7, G1, G2



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00184

Matrícula: 210389296

ESTUDIO DE LA FUNCION DE LA SUBUNIDAD  $\alpha$  AGA1 SOBRE LA BIOSINTESIS DE CEFALOSPORINA EN *Acremonium chrysogenum*

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 5 del mes de septiembre del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ  
DR. LINO MAYORGA REYES  
DRA. MARIA ANGELICA GUTIERREZ NAVA  
DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA

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

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: ROMEL AXEL ALTAMIRANO FLORES

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

APROBAR

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



ROMEL AXEL ALTAMIRANO FLORES  
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

VOCAL

DR. LINO MAYORGA REYES

VOCAL

DRA. MARIA ANGELICA GUTIERREZ NAVA

SECRETARIO

DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA