

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**EFFECTO DE LA ACTIVACIÓN CONSTITUTIVA DE LA
SUBUNIDAD ALFA DE UNA PROTEÍNA G
HETEROTRIMÉRICA HETERÓLOGA SOBRE LA
ESPORULACIÓN Y LA PRODUCCIÓN DE
CEFALOSPORINA C EN *Acremonium chrysogenum***

TESIS

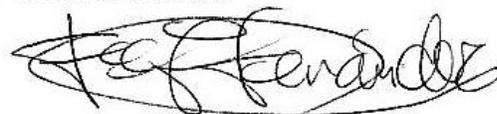
para obtener el grado de:
Maestra en Biotecnología

PRESENTA

Jessica Yazmín Cruz Ramón

Director

Dr. Francisco José Fernández Perrino



MARZO 2009

**La Maestría en Biotecnología de la
Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al
Padrón Nacional de Posgrados de Excelencia de CONACYT.**

**Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca
otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con
número de registro 203440.**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario del Departamento de Biotecnología, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

México, D.F., a 9 de marzo de 2009.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa aprobó la tesis
**Efecto de la activación constitutiva de la subunidad alfa de una proteína G
heterotrimérica heteróloga sobre la esporulación y la producción de
cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum***

que presentó
Jessica Yazmín Cruz Ramón

Comité Tutorial:

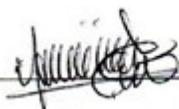
Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesor: Dr. Armando Mejía Álvarez

Jurado:

Presidente Dr. Octavio Loera



Secretario Dr. Armando Mejía Álvarez



Vocal A Dra. Lourdes Villa Tanaka



Vocal B Dr. Francisco Fierro Fierro



A Dios

A mis padres Jacquelin y Germán

A mi hermana Elaine y mi tía Georgina

A mi mejor amiga Maggie

“..... realmente, mi familia es la primera célula esencial de mi existencia, todo lo que soy o espero ser, se lo debo a mi familia” (Theodor Schwann).

Agradecimientos

Al Dr. Armando Mejía Álvarez, por ser la persona que me abrió las puertas de este laboratorio, por la detallada revisión de este trabajo, por su amabilidad, por todas sus atenciones, por su comprensión, por siempre tratar de tranquilizarme, por sus consejos y su valiosa amistad.

A los doctores Lourdes Villa Tanaka y Octavio Loera Corral, por su amabilidad, por la exhaustiva revisión de esta tesis, por sus valiosas sugerencias y acertados comentarios.

A la Dra. Araceli Tomasini Campocosio, por ser tan amable, atenta y por siempre estar pendiente del lab.

A la Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya (simplemente Tany), por brindarme su experiencia, amistad y sobre todo por el tiempo que tan amablemente me dedicó cuando estuvimos juntas en el lab.

A mis amigas Bk, Gis, Kari y Vicky, le agradezco a la vida por haberlas puesto en mi camino, gracias por estar conmigo cuando más lo he necesitado.

A mis amigos del lab, Jimmy (por tu buen humor, siempre hay alegría cuando estás tú, eres único), Tere (por escucharme en todo momento), Naye (por siempre tener una sonrisa para mí), Maura (por apoyarme cuando lo necesité), Rox (por ser tan amable, agradable y ser ejemplo de una persona eficiente), Paty (por todas las alegrías y buenos momentos), Pao (por todas las risas, apoyo y los dulces jijiji), Criss (por tu buen humor y por siempre tratar de inyectarme optimismo), Karlita (por ser tan linda), Marielita (por ser tan buena onda), Ara (por siempre tener ánimo de colaborar y ser ejemplo de una persona trabajadora), Hugo (por ser tan atento, agradable y la buena compañía), Gaby (por ser tan optimista y amable), Omar (porque siempre eres cordial) y Octavio (por la gran oportunidad de conocerlo), gracias por ser parte de esta gran experiencia, de todos ustedes he aprendido muchísimo, hacen que todo el lab sea un lugar único, irremplazable y muy agradable.

Finalmente a los doctores Francisco José Fernández Perrino y Francisco Fierro Fierro.... creo que ese comienzo no me gustó, lo volveré a intentar, aquí voy... Finalmente a los más importantes, a los que realmente compete el mérito de este trabajo, a mis muy queridos y apreciados Paco Pepe y Paco Fierro por brindarme la oportunidad de trabajar con ellos, por siempre saber cómo sacar a flote este proyecto y a mí, porque pasara lo que pasara siempre confiaron en mí, por todo su apoyo, por saber estar en las buenas y en las malas, por siempre tratar de hacerme sentir mejor cuando las cosas iban mal, por su infinita paciencia, por todos los buenos momentos, por su amistad, por ser únicos e inigualables, por todo lo que me han dado, por ser simplemente como son. Nunca tendré suficientes palabras para expresar todo lo que significan para mí.

RESUMEN

El hongo *Acremonium chrysogenum* es el único microorganismo productor de cefalosporina C, un antibiótico β -lactámico, que es de gran interés biotecnológico a nivel mundial. A pesar de su gran importancia en la industria, el conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que regulan la biosíntesis de cefalosporina aun es limitado. Tal es el caso de las proteínas G heterotriméricas, las cuales regulan los procesos morfogénicos de los hongos, como el crecimiento de la colonia y la esporulación asexual, éste último es el principal mecanismo de propagación de los hongos filamentosos. También se ha observado que las proteínas G están involucradas en la regulación de la producción de metabolitos secundarios.

En el presente trabajo se estudió el papel de una subunidad α de proteína G heterotrimérica en la conidiogénesis y biosíntesis de cefalosporina en *A. chrysogenum*. Para lo anterior, se utilizó el plásmido pG42Rb (García-Rico *et al.*, 2007), el cual posee el gen de la subunidad α Pga1 de *Penicillium chrysogenum* con una mutación para que esta sea constitutivamente activa (*pga1*^{G42R}). Transformantes de *A. chrysogenum* con el plásmido pG42Rb mostraron un fenotipo caracterizado por una disminución en su crecimiento radial en comparación con la cepa silvestre (ATCC 11550), y la biosíntesis precoz de un metabolito secundario de tipo pigmento. La expresión del alelo *pga1*^{G42R} provocó una drástica reducción de la formación de esporas en medio líquido así como de la biosíntesis de cefalosporina, indicando que niveles elevados de la forma activada G $_{\alpha}$ -GTP regulan negativamente ambos procesos en *A. chrysogenum*.

Mediante PCR se clonó el hipotético gen *aga1* de *A. chrysogenum*, ortólogo de *pga1* de *P. chrysogenum*, y se obtuvo una secuencia parcial de la ORF clonada, la cual presentó un alto grado de similitud con la secuencia de otras subunidades α pertenecientes al grupo I de los hongos filamentosos. Podemos concluir, a falta de estudios posteriores, que la secuencia obtenida es la de la subunidad α de una proteína G heterotrimérica de *A. chrysogenum*.

ABSTRACT

The filamentous fungus *Acremonium chrysogenum* is the natural producer of cephalosporin C, a β -lactam antibiotic of great importance in the treatment of various infectious conditions caused by bacteria. Albeit its profound industrial importance, the understanding of the molecular mechanisms regulating cephalosporin biosynthesis is still limited. This is the case of the fungal heterotrimeric G proteins, which regulate different processes related to development, such as colony growth and asexual sporulation, the main mechanism of propagation in filamentous fungi. It has also been reported that heterotrimeric G proteins are involved in the control of secondary metabolites biosynthesis.

We have investigated the role of a heterotrimeric G protein α subunit in conidiogenesis and cephalosporin biosynthesis of *A. chrysogenum*. For the above, we used plasmid pG42R (García-Rico *et al.*, 2007) to transform *A. chrysogenum*. This plasmid contains a mutated allele of the *pga1* gene of *Penicillium chrysogenum* (*pga1*^{G42R}), which results in a constitutively activated Pga1 alpha subunit. The phenotype of transformants showed a reduction in colony diameter with respect to the wild type strain (ATCC 11550) and early pigment biosynthesis. The *pga1*^{G42R} allele expression clearly reduced conidiogenesis in submerged cultures as well as cephalosporin biosynthesis, indicating that high levels of the activated G $_{\alpha}$ -GTP form negatively regulate both processes in *A. chrysogenum*.

We cloned by PCR the putative *aga1* gene of *A. chrysogenum*, ortholog of *P. chrysogenum pga1*, and obtained a partial sequence from its ORF, which showed a very high degree of identity to Group I alpha subunits of fungal heterotrimeric G proteins. Therefore we can conclude, in absence of further studies, that the obtained sequence belongs to a heterotrimeric G protein alpha subunit of *A. chrysogenum*.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Biosíntesis de cefalosporina.....	2
1.1.1. Precursores.....	2
1.1.2. Etapas comunes en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos.....	6
1.1.3. Etapas específicas de la biosíntesis de cefalosporina.....	8
1.2. Genes estructurales para la biosíntesis de cefalosporina.....	9
1.2.1. Genes del <i>cluster</i> temprano de cefalosporina.....	10
1.2.2. Genes del <i>cluster</i> tardío de cefalosporina.....	12
1.3. Niveles de control de la regulación de la biosíntesis de cefalosporina C en <i>Acremonium chrysogenum</i>	13
1.3.1. Nivel transcripcional.....	13
1.3.2. Factores de transcripción como activadores y represores de la biosíntesis de cefalosporina.....	14
1.3.3. Actividad enzimática.....	15
1.4. Proteínas G heterotriméricas.....	16
1.4.1. Proteínas G heterotriméricas en hongos.....	17
1.4.2. Regulación del metabolismo secundario y la morfogénesis en hongos por proteínas G heterotriméricas.....	18
1.5. Morfogénesis en <i>Acremonium chrysogenum</i>	21
1.6. Justificación.....	23
1.7. Hipótesis.....	24
1.8. Objetivos.....	24
1.8.1. Objetivo general.....	24
1.8.2. Objetivos particulares.....	24
2. Materiales y métodos.....	25
2.1. Microorganismos utilizados.....	25
2.1.1. Cepas fúngicas.....	25
2.1.2. Cepas bacterianas.....	25
2.2. Vectores.....	26
2.2.1. Vectores plasmídicos.....	26
2.3. Reactivos químicos y bioquímicos.....	27
2.3.1. Oligonucleótidos.....	27
2.4. Medios de cultivo.....	28
2.4.1. Medios de cultivo para bacterias.....	28
2.4.2. Medio de cultivo para hongos.....	28
2.4.3. Aditivos para los medios de cultivo.....	30
2.5. Crecimiento de los microorganismos.....	31
2.5.1. Crecimiento de las cepas bacterianas.....	31
2.5.2. Crecimiento de las cepas fúngicas.....	31
2.6. Mantenimiento de los microorganismos.....	31
2.7. Obtención de ADN total de <i>Acremonium chrysogenum</i>	32
2.8. Reacción en cadena de la ADN polimerasa.....	33
2.8.1. Condiciones de PCR.....	34
2.9. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	35
2.10. Extracción de ADN a partir de geles de agarosa.....	36
2.11. Clonación de los productos de PCR en el vector pGEM-T Easy.....	36
2.11.1. Ligación de los productos de PCR con el vector pGEM-T Easy.....	37

2.11.2. Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	38
2.11.3. Procedimiento de transformación de <i>E. coli</i>	38
2.12. Digestión del ADN.....	40
2.12.1. Esquema general de la digestión de ADN con una endonucleasa de restricción.....	40
2.13. Transformación de <i>Acremonium chrysogenum</i>	40
2.13.1. Crecimiento del micelio.....	41
2.13.2. Obtención de protoplastos.....	41
2.13.3. Transformación.....	42
2.13.4. Plaqueo.....	43
2.14. Caracterización de las cepas ATCC 14553 y ATCC 48272 (C10) de <i>Acremonium chrysogenum</i>	43
3. Resultados y Discusión.....	45
3.1. Transformación de <i>A. chrysogenum</i> con el plásmido pG42Rb y análisis de los transformantes.....	45
3.1.1. Producción de protoplastos de la cepa ATCC 11550 de <i>A. chrysogenum</i>	46
3.1.2. Evaluación de la resistencia a fleomicina de los protoplastos de la cepa ATCC 11550 de <i>A. chrysogenum</i>	47
3.1.3. Transformación de <i>A. chrysogenum</i> ATCC 11550 y selección de las transformantes.....	47
3.2. Caracterización fenotípica de las cepas ATCC 48272 (C10), ATCC 14553, ATCC 11550 y Pga1G42R de <i>A. chrysogenum</i>	50
3.3. Efecto del alelo <i>pga1</i> ^{G42R} sobre la conidiación y producción de cefalosporina C en <i>Acremonium chrysogenum</i>	54
3.3.1. Efecto del alelo <i>pga1</i> ^{G42R} sobre la conidiación.....	54
3.3.2. Efecto del alelo <i>pga1</i> ^{G42R} sobre la biosíntesis de cefalosporina (medio sólido).57	
3.3.3. Efecto del alelo <i>pga1</i> ^{G42R} sobre la biosíntesis de cefalosporina (fermentación líquida).....	59
3.4. Amplificación y clonación del gen <i>aga1</i> mediante el uso de oligonucleótidos degenerados.....	62
Conclusiones.....	65
Bibliografía.....	66
Anexo.....	73

1. Introducción

En 1945 el profesor Giuseppe Brotzu aisló por primera vez un hongo productor de cefalosporina, al que denominó inicialmente *Cephalosporium acremonium*, en una zona marítima próxima a una salida de aguas residuales del mar de Cagliari, isla de Cerdeña (Brotzu, 1948). Brotzu describió el efecto antibiótico de los extractos obtenidos a partir de este hongo sobre un amplio rango de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, lo que despertó el interés de Howard W. Florey, premio Nobel por su contribución en el desarrollo de la penicilina, y cuyo grupo de la Universidad de Oxford logró determinar algunos años después la estructura del compuesto activo, la cefalosporina C. Hoy en día, *Acremonium chrysogenum* es utilizado en todo el mundo para producir aproximadamente 17,000 toneladas de derivados de cefalosporina (Swartz, 2007).

La cefalosporina C (CPC) y sus derivados semisintéticos son antibióticos β -lactámicos ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas. Sin embargo, el conocimiento que se posee acerca de la regulación molecular de la síntesis este metabolito secundario es limitado, aun cuando ya se conocen en su totalidad los genes involucrados en su biosíntesis. La cefalosporina C es sintetizada únicamente por *Acremonium chrysogenum* (sin. *Cephalosporium acremonium*), un hongo cuya manipulación genética es mucho más complicada que la de otros hongos filamentosos empleados más comúnmente: *A. chrysogenum* se ha clasificado dentro del grupo de los Deuteromicetos, en los cuales no se ha descrito la existencia de un ciclo sexual, por lo que los análisis genéticos convencionales no son aplicables a este hongo. Además, *A. chrysogenum* presenta una escasa producción de conidiosporas, que a menudo son los estados celulares utilizados en otros hongos de interés biotecnológico para realizar los protocolos de transformación. En términos filogenéticos, *A. chrysogenum* pertenece al orden Hypocreales, el cual se caracteriza por sus colores brillantes (amarillo, rojo o naranja) y por la presencia de peritecio u otras estructuras productoras de esporas.

Los programas de mejoramiento biotecnológico han permitido, sin embargo, la obtención de cepas que poseen un rendimiento significativamente mayor en la producción del antibiótico que las cepas silvestres (Elander, 2003). La comparación de las cepas silvestres con las cepas productoras es de gran interés, tanto desde el punto de vista de la investigación básica como de la aplicada, y las diferencias en los mecanismos de

regulación de la biosíntesis de cefalosporina son uno de los puntos de interés. Un conocimiento más profundo acerca de los cambios en los mecanismos de regulación que se ocasionan durante el proceso de mejoramiento de las cepas productoras de cefalosporina puede ser de gran utilidad para el desarrollo de un “mejoramiento dirigido” o para la optimización de la producción del antibiótico.

Biosíntesis de cefalosporina

Las cefalosporinas pertenecen al grupo de antibióticos β -lactámicos, producidos por una amplia variedad de microorganismos, incluyendo los hongos filamentosos *A. chrysogenum*, *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus nidulans*, algunos estreptomicetos y un pequeño número de bacterias Gram-negativas. Todos ellos utilizan esencialmente la misma ruta biosintética, la cual se ha caracterizado en detalle, tanto química como cinéticamente, debido al considerable potencial industrial de estos antibióticos (Elander, 2003).

1.1.1. Precursores

La biosíntesis de todos los compuestos β -lactámicos se da a partir de la condensación de tres aminoácidos precursores: ácido L- α -aminoadípico (L- α -AAA), L-cisteína y L-valina para formar el tripéptido L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (ACV). Estos tres aminoácidos también juegan un papel importante en la regulación de la biosíntesis de cefalosporina C. La L-cisteína y la L-valina son aminoácidos ubicuos. En los hongos, el aminoácido no proteínogénico L- α -AAA es sintetizado como intermediario de una vía alternativa para la formación de L-lisina, mientras que en bacterias productoras de compuestos β -lactámicos se ha identificado una vía específica para la formación de L- α -AAA (Brakhage, 1998).

El L- α -AAA, punto de ramificación en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos

La ruta biosintética de L-lisina en hongos superiores (incluyendo a *A. chrysogenum*) comienza con la condensación de α -cetoglutarato y acetil-CoA para formar homocitrato, el cual pasa por un proceso de isomerización y descarboxilación oxidativa

hasta formarse el L- α -AAA. A continuación, este precursor de aminoácidos y antibióticos β -lactámicos es convertido en α -AA- δ -semialdehído por acción de la α -aminoadipato reductasa, para finalmente dar lugar a la L-lisina (Nishida y Nishiyama, 2000). Se ha descrito que el L- α -AAA también puede estar disponible para la biosíntesis de compuestos β -lactámicos por el carácter reversible de las últimas reacciones de la ruta de biosíntesis de lisina; sin embargo, la influencia de esta vía catabólica sobre la producción de cefalosporina aún no se ha definido (Esmahan *et al.*, 1994).

El L- α -AAA representa el punto de ramificación entre la formación de cefalosporina y la ruta biosintética de L-lisina, por lo que la disponibilidad intracelular del L- α -AAA es un parámetro importante en la regulación de la biosíntesis de cefalosporina. Mehta *et al.* (1979), demostraron que las concentraciones elevadas de L-lisina reducen la síntesis de cefalosporina en *A. chrysogenum* y que la inhibición continúa hasta que se añade L- α -AAA al medio. Además, otros estudios han demostrado que determinadas concentraciones de L-lisina inhiben la actividad de la α -aminoadipato reductasa pero no reprimen su síntesis (Hijarrubia *et al.*, 2002). Estos resultados, y el hecho de que la L-lisina provoca la inhibición de la homocitrato sintasa en *Penicillium chrysogenum*, indican que el *pool* de L- α -AAA disponible para la producción de compuestos β -lactámicos es disminuido por la L-lisina, a través de una inhibición por retroalimentación o mediante la represión de varios genes y enzimas involucrados en la biosíntesis de L-lisina (Luengo *et al.*, 1980).

La formación del tripéptido ACV depende no sólo de la disponibilidad de L- α -AAA sino también de la afinidad de dos enzimas por este intermediario. La α -aminoadipato reductasa (α -AAR), codificada por el gen *lys2* de *A. chrysogenum*, actúa como enzima clave en la ruta ramificada para la biosíntesis de tanto lisina como cefalosporina C. Esta enzima compite con la ACV sintetasa por el L- α -AAA, un sustrato común para las dos enzimas. La α -AAR cataliza la activación y la reducción del L- α -AAA para formar α -AA- δ -semialdehído, utilizando NADPH como cofactor (Hijarrubia *et al.*, 2001). Hijarrubia *et al.* (2002), detectaron una baja actividad de la α -AAR en las cepas de *A. chrysogenum* de alta producción de cefalosporina, baja actividad que podría explicar que el L- α -AAA se canalice preferentemente hacia la formación de cefalosporina. Estos resultados se reforzarían con el incremento observado en la disponibilidad del aminoácido precursor, el

ácido L- α -AAA, favoreciéndose la aportación del mismo desde el metabolismo primario (formación de lisina) para sustentar la elevada producción del antibiótico. Además, se ha descrito que la actividad más alta de la α -AAR es detectada durante la fase de crecimiento que precede al comienzo de la producción de cefalosporina, disminuyendo después drásticamente. Al final de la fase de crecimiento se observa un cambio metabólico, mediante el cual se incrementaría la disponibilidad de L- α -AAA, utilizable para la producción de cefalosporina. Este cambio también coincide con el inicio de la fragmentación del micelio en artrosporas en *A. chrysogenum* (Hijarrubia *et al.*, 2002).

Biosíntesis de la L-valina

Otro factor crucial para la formación del tripéptido ACV es la disponibilidad del aminoácido L-valina, cuya ruta biosintética se encuentra estrechamente relacionada con la de la leucina. La biosíntesis de valina comprende cuatro reacciones enzimáticas, que parten del piruvato como precursor. Dos moles de piruvato son convertidos en el intermediario α -acetolactato, el cual es posteriormente reducido a α,β -dihidroxisoalerato y cetoisovalerato, para finalmente originar la L-valina. En *A. chrysogenum*, niveles altos de L-valina provocan la inhibición por retroalimentación de la primera reacción enzimática de la ruta.

Biosíntesis de L-cisteína

El tercer paso limitante para la biosíntesis de cefalosporina C es la disponibilidad del aminoácido L-cisteína, el cual puede ser producido por cuatro rutas biosintéticas diferentes (Martín y Aharonowitz, 1983). La primera de éstas es la vía directa de la sulfidrilación, en la que el azufre reducido es incorporado en el intermediario O-acetil-L-serina para dar lugar a la L-cisteína. En la vía de la trans-sulfuración, la incorporación del grupo sulfuro es catalizada por la O-acetilhomoserina sulfidrilasa. La tercera posibilidad es la vía de la trans-sulfuración inversa, en la cual el azufre de la L-metionina es transferido a la L-cisteína, pasando por cuatro intermediarios (Cherest y Surdin-Kerjan, 1992); se sabe que el azufre incorporado es el precursor del átomo de azufre presente en la cefalosporina C (Caltrider y Niss, 1966). Por último, la L-cisteína puede ser sintetizada también por la llamada vía autotrófica, que está dirigida a la asimilación de los

compuestos inorgánicos de azufre mediante la vía de la O-acetiltransferasa y la O-acetilserina sulfidrilasa. Al parecer, todas estas rutas están presentes en *A. chrysogenum*. Sin embargo, resultados de los análisis realizados con mutantes muestran que este hongo sintetiza preferentemente la L-cisteína por medio de la vía de trans-sulfuración inversa (Drew y Demain, 1975a y b) y, en cierta medida, a través de la vía autotrófica. La contribución de las otras dos vías para la biosíntesis de cefalosporina C aun no se ha determinado (Liu *et al.*, 2001).

Se ha observado que niveles altos de metionina, particularmente de su isómero D, favorecen significativamente la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos. En cultivos de *A. chrysogenum* suplementados con metionina se obtuvieron incrementos del 200 al 300% en la producción de cefalosporina C (Velasco *et al.*, 1994). Asimismo, se ha observado un aumento en el *pool* endógeno de metionina previo a la formación de cefalosporina C, y que la biosíntesis del antibiótico parece ser proporcional a la concentración intracelular de D-metionina (Gygax *et al.*, 1980).

Algunos análisis han demostrado que la enzima cistationina- γ -liasa, que cataliza la conversión de cistationina a L-cisteína en la vía de trans-sulfuración inversa, es crucial para aumentar el efecto inducido por la metionina. En estudios recientes, el gen *mecB*, que codifica para la cistationina- γ -liasa de *A. chrysogenum*, fue clonado (Marcos *et al.*, 2001). La expresión del gen *mecB* no está regulada por la adición de DL-metionina. La inactivación del gen *mecB* indicó que la formación de L-cisteína a través de la ruta de trans-sulfuración inversa es requerida para la producción elevada de cefalosporina C, pero no para sostener niveles biosintéticos bajos, probando de esta manera que la L-cisteína es obtenida tanto de la vía autotrófica como de la trans-sulfuración inversa (Liu *et al.*, 2001). Si se suministra metionina al hongo se provoca la represión total de la asimilación de sulfatos. La interrupción del gen *mecB* no interfiere con la inducción de la expresión de los genes biosintéticos de cefalosporina C mediada por la metionina. De esta forma, puede descartarse un posible mecanismo regulatorio ejercido por la cistationina- γ -liasa sobre la expresión de los genes de biosíntesis del antibiótico, aunque la inducción podría ser desencadenada por la misma metionina, o bien por un catabolito derivado de la metionina. La amplificación del gen *mecB* y la sobreproducción resultante de la cistationina- γ -liasa en dosis moderadas provocó un incremento en la producción de cefalosporina C, mientras que una actividad elevada de la cistationina- γ -liasa

probablemente produzca altos niveles de L-cisteína, que se sabe puede ser tóxica e inhibir las enzimas que sintetizan los compuestos β -lactámicos (Kosalková *et al.*, 2001).

En conjunto, la metionina probablemente posee un doble efecto sobre la biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum*. Por un lado, este aminoácido parece ser el principal proveedor de la vía de L-cisteína, mediante la trans-sulfuración inversa, y por otro lado la metionina parece inducir la expresión de los genes biosintéticos de cefalosporina C (Velasco *et al.*, 1994; Martín y Demain, 2002).

Etapas comunes en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos

Las rutas biosintéticas de penicilinas y cefalosporinas han sido estudiadas en detalle en los últimos 25 años, habiéndose conseguido conocer todos los pasos implicados en las mismas. En la Figura 1 se detalla la ruta de biosíntesis de la cefalosporina C.

La ruta biosintética de todos los antibióticos β -lactámicos es común hasta la isopenicilina N, comenzando con la condensación de L-cisteína y L- α -AAA para formar el dipéptido L- α -aminoadipil-L-cisteína (AC). La L-valina es epimerizada a la forma D durante su activación/adición para formar el tripéptido L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (ACV). El tripéptido ACV es el primer intermediario en la biosíntesis de todos los β -lactámicos, tanto en microorganismos eucariontes como en procariontes. La síntesis del tripéptido la lleva a cabo la enzima ACV sintetasa, perteneciente a la familia de las péptido sintetasa.

La segunda reacción es un paso clave en la biosíntesis de cefalosporina, que consiste en la ciclación del tripéptido lineal ACV para formar el primer intermediario bioactivo: la isopenicilina N (IPN). Esta reacción es catalizada por la isopenicilina N sintasa (IPNS). En una única reacción enzimática, la IPNS cataliza la transferencia de cuatro átomos de hidrógeno del tripéptido ACV al dióxígeno asociado con el anillo no saturado, para formar dos moléculas de agua (Brakhage y Turner, 1995).

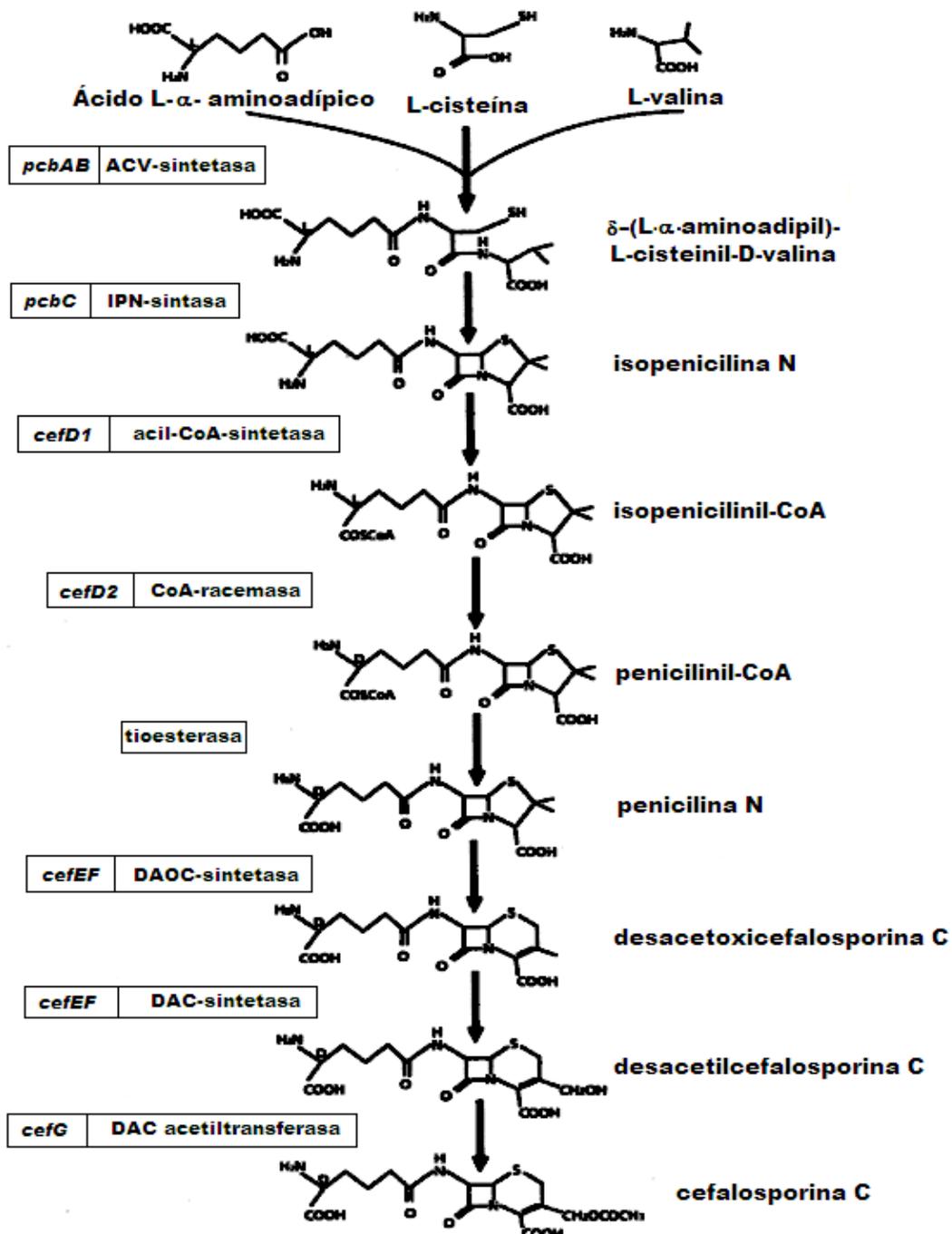


Figura 1. Ruta de biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum*. Detalle de los compuestos, genes participantes y productos de los mismos (Schmitt *et al.*, 2004a).

Etapas específicas de la biosíntesis de cefalosporina

A partir de la isopenicilina N la ruta de la penicilina y de la cefalosporina divergen. En la ruta de cefalosporina se lleva a cabo un proceso de epimerización, que se muestra en la Figura 1, encargado de convertir la isopenicilina N en penicilina N.

Los genes biosintéticos de la cefalosporina de *A. chrysogenum* están agrupados en dos *cluster* separados, algo que se explicará con detalle posteriormente. Ullán *et al.* (2002a) sugirieron que el gen que codifica para la enzima involucrada en el paso de epimerización (desconocido hasta ese momento) podría encontrarse ubicado en uno de los dos *cluster*. Un análisis transcripcional de una región de 9 kb ubicada corriente abajo del gen *pcbC* reveló la presencia de dos marcos de lectura abiertos. El ORF1 corresponde al gen denominado *cefD1* que codifica para una proteína con peso molecular cercano a los 71 kDa, ésta muestra un alto grado de similitud con la cadena larga de las acil-CoA sintetasas, la proteína posee todos los motivos característicos de las acil-CoA ligasas involucradas en la activación del extremo carboxilo de los ácidos grasos o aminoácidos. El segundo gen identificado se denominó *cefD2*, que codifica para una proteína de 41.4 kDa, similar a la α -metil-acil-CoA racemasa de *Homo sapiens* (42.1 % de identidad) o *Mus musculus* (39.4% de identidad) (Schmitz *et al.*, 1995 y 1997).

Basados en la similitud observada en las proteínas CEFD1 y CEFD2 con enzimas eucarióticas conocidas, es factible tratar de establecer un mecanismo bajo el que opera un sistema de epimerización de dos componentes en *A. chrysogenum*, sistema diferente al que realiza esta actividad en procariontes. Se ha descrito que estos sistemas están involucrados en la inversión de ácidos 2-arilpropiónicos (p.ej. ibuprofeno), el cual es un grupo importante de drogas antiinflamatorias no esteroideas en humanos (Shieh y Chen, 1993). Además, se ha observado que la reacción de epimerización durante la biosíntesis de cefalosporina comienza con la activación del sustrato isopenicilina N a su CoA-tioéster, reacción mediada por la acil-CoA-sintetasa. El producto del gen *cefD2*, la α -metil acil-CoA racemasa, cataliza la epimerización de las moléculas de isopenicilil-CoA al D-enantiómero penicilil-CoA. La transformación final a penicilina N requiere también de una hidrólisis del CoA-tioéster, la cual ocurre en forma no estereoespecífica por medio de diferentes tioesterasas. El producto final es la penicilina N, un precursor directo de todas las cefalosporinas y cefamicinas.

La siguiente reacción en la biosíntesis de cefalosporina es la conversión de la penicilina N a desacetoxicefalosporina C (DAOC), que ocurre por la expansión del anillo tiazolidínico de cinco miembros característico de las penicilinas a un anillo dihidrotiazínico de seis miembros (típico de cefalosporinas y cefamicinas). La desacetoxicefalosporina C es posteriormente hidroxilada, formándose desacetilcefalosporina C. En *A. chrysogenum*, las actividades de expansión del anillo y la posterior hidroxilación se encuentran asociadas en una única proteína: la DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa, codificada por el gen *cefEF*. El último paso de la ruta de biosíntesis de cefalosporina es la acetilación de la desacetilcefalosporina C para formar cefalosporina C, un paso catalizado por la acetil-CoA DAC acetiltransferasa. La acetil-CoA DAC acetiltransferasa se comporta como una enzima citosólica soluble, sin señalización conocida u otras indicaciones para compartimentalización (van de Kamp *et al.*, 1999). La reacción de acetilación desde DAC a cefalosporina C es muy ineficiente en la mayoría de las cepas de *A. chrysogenum*. El gen *cefG* se expresa muy poco, en comparación con otros genes de la ruta (Gutiérrez *et al.*, 1992) y se sabe que se presentan altos niveles de DAC acumulada en muchas cepas productoras de cefalosporina C, por lo que la conversión de DAC a cefalosporina C parece ser un paso limitante en la ruta biosintética de esta última.

Genes estructurales para la biosíntesis de cefalosporina

Como se muestra en la Figura 2, los genes involucrados en la biosíntesis de cefalosporina están organizados en dos *cluster* en *A. chrysogenum*. Los genes *pcbAB* y *pcbC*, así como los genes *cefD1* y *cefD2*, se ubican en el denominado *cluster* temprano. El *cluster* tardío contiene los genes *cefEF* y *cefG*, que catalizan las dos últimas reacciones de esta ruta biosintética. En la mayoría de cepas, el *cluster* temprano puede ser mapeado en el cromosoma VI y el *cluster* tardío en el cromosoma II (Bennett y Lasure, 1992). En cepas de alta producción de cefalosporina, tales como la cepa C10, se ha descrito una ubicación diferente de los *cluster* biosintéticos, en los cromosomas I y VII, lo que indica que existe un rearrreglo cromosómico significativo durante el proceso de mejoramiento de cepas (Gutiérrez *et al.*, 1999). Los dos *clusters* biosintéticos se encuentran en una sola copia en el genoma de todas las cepas analizadas de *A. chrysogenum* (Schmitt *et al.*, 2004a).

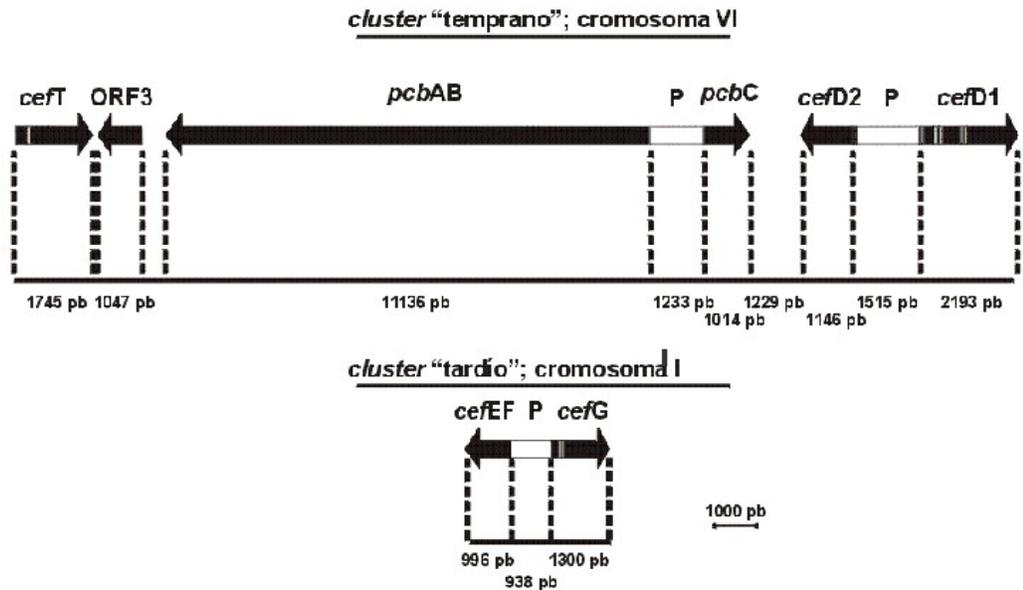


Figura 2. Organización de los genes biosintéticos de cefalosporina en *A. chrysogenum*. Las secuencias correspondientes a intrones se indican en color gris. Las flechas indican la dirección de la transcripción (Schmitt *et al.*, 2004a).

Genes del *cluster* temprano de cefalosporina

La ACVS es la primera enzima que actúa en la biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum*. Es codificada por el gen *pcbAB*, cuyo tamaño aproximado es de 11 kb y no contiene intrones. Se encuentra localizado corriente arriba del gen *pcbC* y en orientación opuesta a éste, separados por una región intergénica de 1233 pb.

Se ha clonado y secuenciado el gen *pcbAB* de diferentes procariontes y eucariontes productores de antibióticos β -lactámicos. Un estudio comparativo de estas secuencias nucleotídicas demostró que los genes codifican tres dominios repetidos con alta identidad de secuencia entre ellos, uno por cada aminoácido que forma parte del tripéptido. Existe una alta similitud entre los genes *pcbAB* de bacterias y hongos; los dominios fúngicos mostraron un 71% de identidad entre ellos, mientras que entre los dominios fúngicos y bacterianos se observó un 48% de identidad (Martín, 1991).

El segundo gen estructural del *cluster* temprano de cefalosporina en *A. chrysogenum* es el gen *pcbC*, que codifica para la enzima IPNS. El gen *pcbC* de *A. chrysogenum* fue el primer gen de una ruta de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos clonado y secuenciado (Samson *et al.* 1985). Su clonación se llevó a cabo mediante el rastreo de una biblioteca genómica de *A. chrysogenum* con oligonucleótidos degenerados, diseñados a partir de la secuencia amino terminal de la enzima IPNS purificada. Se identificó una ORF de 1014 pb, con capacidad para codificar una proteína de 338 aminoácidos. El gen *pcbC* no contiene intrones y produce un transcrito de un tamaño de entre 1.15 y 1.5 kb.

En el *cluster* temprano de cefalosporina se encuentran también los genes *cefD1* y *cefD2*, que codifican para dos enzimas que participan en la formación de penicilina N. La ORF correspondiente al gen *cefD1* presenta una longitud de 2193 nucleótidos y se encuentra interrumpida por cinco intrones, cuya longitud varía entre 28 y 150 pb. El transcrito correspondiente posee una longitud de 2 kb. El gen *cefD2* consiste en una ORF de 1146 nucleótidos y se encuentra interrumpido por un solo intrón. Los genes *cefD1* y *cefD2* se localizan corriente arriba del gen *pcbC* y son expresados en sentido contrario, a partir de una región promotora bidireccional de un tamaño de 1515 pb (Ullán *et al.*, 2002a).

Corriente abajo del gen *pcbAB* se localiza el gen *cefT*, que codifica una proteína transportadora tipo bomba de eflujo perteneciente a la familia MFS (Major Facilitator Superfamily) (Ullán *et al.*, 2002b). Se ha visto que la proteína CefT confiere resistencia a algunos ácidos orgánicos tóxicos, incluyendo el ácido isovalérico y el ácido fenilacético. La sobreexpresión del gene *cefT* en *A. chrysogenum* da como resultado un incremento del doble en la producción de cefalosporina. Sin embargo, la inactivación de *cefT* revela que este gen no es esencial para la biosíntesis de cefalosporina y sugiere la presencia de otros sistemas para la secreción de cefalosporina (Liu *et al.*, 2001; Ullán *et al.*, 2002b). La expresión del gen *cefT* en *Penicillium chrysogenum* y el análisis de los transformantes indicaron que el transportador está involucrado en la secreción de β -lactamas hidrofílicas, como la cefalosporina (Ullán *et al.* 2008).

Hasta hace poco tiempo se pensaba que todos los pasos de la ruta biosintética en *A. chrysogenum* tenían lugar en el citosol (van de Kamp *et al.*, 1999; Evers *et al.*, 2004).

Sin embargo, evidencias recientes sugieren que las enzimas responsables de la epimerización de la isopenicilina N a penicilina N (CEFD1 y CEFD2) se ubican en el peroxisoma (Ullán *et al.*, 2008). Esta compartimentalización requiere de un transporte específico de intermediarios a través de la membrana peroxisomal. Se sabe muy poco acerca del transporte peroxisómico en este hongo. Recientemente se ha identificado dentro del *cluster* temprano, corriente abajo del gen *cefD1*, el gen *cefM*, que codifica una proteína de la familia MFS con 12 dominios transmembranales (Teijeira *et al.*, 2008), diferentes a los que posee *cefT*. La inactivación de *cefM* por reemplazamiento génico demostró que este gen es esencial para la biosíntesis de cefalosporina. Se reportó que las cepas con este gen interrumpido acumularon concentraciones significativas de penicilina N, son incapaces de sintetizar deacetoxicefalosporina, deacetylcefalosporina y cefalosporina C y no forman artrosporas. La proteína CefM puede estar involucrada en el transporte de penicilina N desde el lumen del peroxisoma al citosol donde es convertida a cefalosporina C (Teijeira *et al.*, 2008).

Genes del *cluster* tardío de cefalosporina

El gen *cefEF* de *A. chrysogenum* codifica la enzima DAOC/DAC sintetasa y es uno de los dos genes que se encuentran en el *cluster* tardío de cefalosporina. Su ORF tiene un tamaño de 996 pb y codifica una proteína de 332 aminoácidos. El gen *cefEF* no presenta intrones, lo que sugiere un posible origen procariótico (Samson *et al.*, 1987).

El otro gen en el *cluster* tardío es el *cefG*, que se transcribe en sentido opuesto al gen *cefEF*; están separados por una región intergénica de 938 pb que contiene el promotor de ambos genes. El gen *cefG* de *A. chrysogenum* codifica la DAC acetiltransferasa, tiene una longitud de 1300 pb y presenta dos intrones (Matsuda *et al.*, 1992; Mathison *et al.*, 1993).

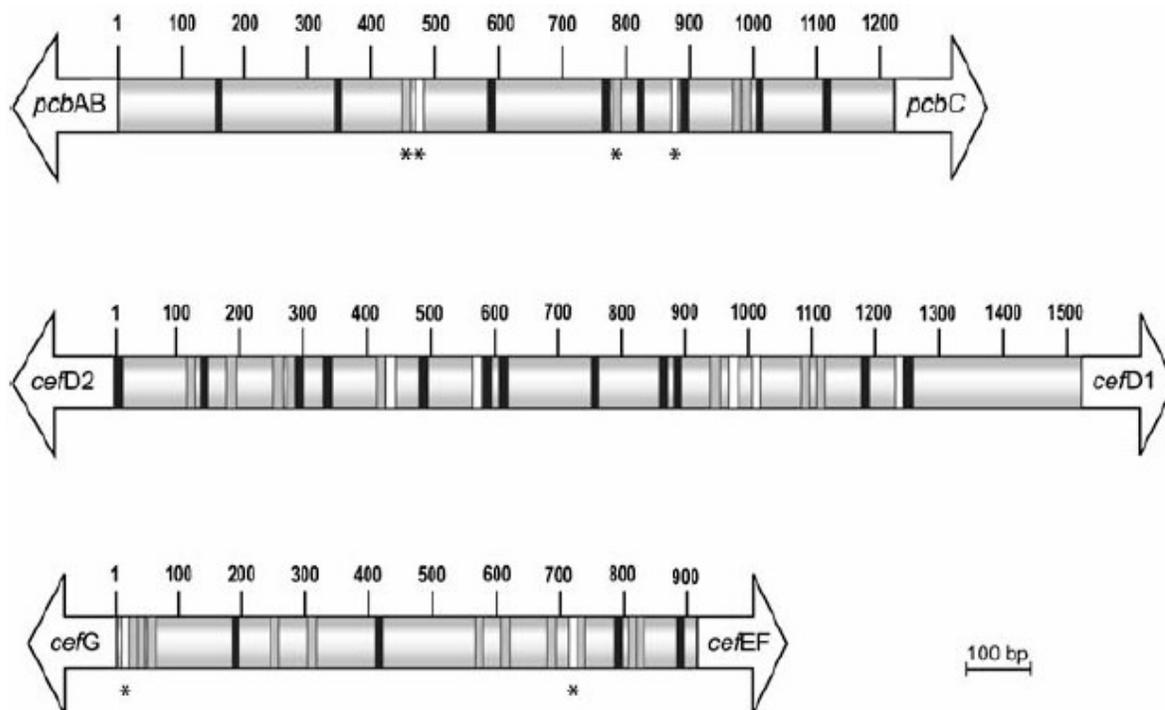


Figura 3. Sitios de unión de los factores de transcripción en la secuencias promotoras de los genes de biosíntesis de cefalosporina orientados divergentemente *pcbAB-pcbC*, *cefD1-cefD2* y *cefEF-cefG* (Schmitt *et al.*, 2004a). Las barras indican los sitios de reconocimientos para cada uno de los factores de transcripción: CPR1 (gris), CRE1 (negro) y PACC (blanco). Los sitios de reconocimiento que han sido probados experimentalmente aparecen marcados con un asterisco.

1.3. Niveles de control de la regulación de la biosíntesis de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum*

La complejidad de la biosíntesis de la cefalosporina C y sus precursores implica diferentes niveles de control para su regulación. Existe evidencia de que los mecanismos reguladores de la expresión de los genes biosintéticos se dan tanto a nivel transcripcional como sobre la actividad de las enzimas involucradas. Además, investigaciones a nivel celular sugieren que existe una correlación entre la biosíntesis de cefalosporina C, la morfología micelial y la diferenciación.

1.3.1. Nivel transcripcional

Hasta principios de la década de 1990, el conocimiento que se tenía de la regulación de la biosíntesis de cefalosporina C se derivaba de las mediciones de dicho producto y sus intermediarios. Smith *et al.* (1990) mapearon los sitios de inicio de la

transcripción del gen *pcbC* y analizó la transcripción de dicho gen durante siete días de fermentación. Los niveles del transcrito no fueron constitutivos, y se encontraron los niveles más altos entre los días dos y cuatro. Estos resultados sugieren la existencia de regulación de la expresión de gen *pcbC* a nivel transcripcional. Mediante la fusión del promotor bidireccional *pcbC-pcbAB* con genes reporteros se pudo comprobar también que la expresión del gen *pcbAB* era claramente más débil que la del *pcbC* (Menne *et al.*, 1994).

Velasco *et al.* (1994) utilizaron una cepa silvestre y dos cepas industriales de *A. chrysogenum*, para establecer la influencia de la metionina a nivel transcripcional de cuatro genes biosintéticos (*pcbAB*, *pcbC*, *cefEF* y *cefG*), ya que en reportes previos se había indicado que la metionina tenía un efecto estimulante sobre la biosíntesis de cefalosporina C (Zhang *et al.*, 1987). Sus resultados concluyeron que la metionina no sólo estimula la actividad enzimática, sino que también actúa a nivel transcripcional. En la cepa silvestre, la transcripción de los genes *pcbAB* y *pcbC* se incrementó en presencia de metionina. En las cepas industriales C10 y CW19, los niveles de transcripción del gen *cefEF* también aumentaron cuando en el medio había metionina (Velasco *et al.*, 1994).

1.3.2. Factores de transcripción como activadores y represores de la biosíntesis de cefalosporina

En relación con los mecanismos de regulación de la transcripción de los genes biosintéticos de cefalosporina, se han caracterizado hasta la fecha tres factores de transcripción de *A. chrysogenum*:

a) La proteína represora CRE1, que está involucrada en la regulación por fuente de carbono de al menos dos genes de la ruta de biosíntesis de cefalosporina. En presencia de suficiente glucosa se promueve el crecimiento, y la transcripción de los genes *pcbC* y *cefEF* está reprimida en la cepa silvestre. Sin embargo, en una cepa semiproductora solamente el gen *cefEF* está sujeto a represión por glucosa (Jekosh y Kück, 2000). Cuando la cepa semiproductora fue transformada con el gen *cre1* se restauró la regulación del gen *pcbC* por glucosa.

b) El factor de transcripción PACC, mediador en la expresión génica en respuesta al pH externo y que se une al menos a cuatro sitios independientes en los promotores de

los genes de biosíntesis de cefalosporina: dos en las secuencias promotoras de los genes *pcbAB* y *pcbC* y dos en la secuencias promotoras de los genes *cefEF* y *cefG* (Schmitt et al., 2001).

c) Finalmente, el factor CPCR1, identificado por su capacidad para unirse a regiones específicas en la región promotora entre los genes *pcbAB* y *pcbC* (Schmitt y Kück, 2000). En cepas en las que se ha inactivado el gen que lo codifica se ha observado que se produce una drástica reducción en la expresión del gen *pcbC*, y que el nivel de biosíntesis de penicilina N se reduce a menos del 20%, lo que indica que este factor podría estar involucrado más en la regulación de los primeros genes de biosíntesis que en la de los últimos (Schmitt y Kück, 2004c). También se ha descrito la interacción entre CPCR1 y el extremo carboxilo terminal de AcFKH1, un nuevo factor de transcripción en *A. chrysogenum* del tipo “forkhead” (cabeza de horquilla). Usando análisis con geles de retardo, FKH1 reconoció dos sitios consenso del motivo cabeza de horquilla dentro del promotor *pcbAB-pcbC* de *A. chrysogenum* (Schmitt et al., 2004b).

De forma adicional, se ha sugerido que un miembro de las proteínas bHLH (basic-helix-loop-helix) podría mediar los efectos observados de inducción por la metionina (Velasco et al., 1994), debido a que se detectaron varias secuencias consenso CANNTG en la región intergénica entre los genes *pcbAB* y *pcbC*. Estas secuencias son reconocidas por los miembros de esta familia de proteínas, algunas de las cuales son conocidas como elementos reguladores involucrados en el control transcripcional de la ruta de asimilación azufre en *Saccharomyces cerevisiae* (Thomas et al., 1989; Cai y Davis, 1990).

En la Figura 3 se muestran las secuencias consenso de unión de los tres factores transcripcionales caracterizados en *A. chrysogenum* en cada uno de los promotores bidireccionales de los genes de biosíntesis de cefalosporina C conocidos hasta el momento.

1.3.3. Actividad enzimática

Como se mencionó previamente, la glucosa tiene un efecto significativo sobre los niveles de transcripción de diferentes genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos

secundarios, como por ejemplo los genes *pcbC* y *cefEF*. Sin embargo no hay un efecto negativo sobre la actividad de la isopenicilina N sintasa purificada. Por el contrario, la actividad de la ACV sintetasa, la primera enzima de la biosíntesis de cefalosporina, es inhibida directamente por gliceraldehido 3 fosfato (Zhang y Demain, 1992).

Otra enzima relevante para la biosíntesis de cefalosporina C que es inhibida bajo ciertas circunstancias es la α -aminoadipato reductasa, codificada por el gen *lys2* de *A. chrysogenum*. Esta enzima se encuentra involucrada en la biosíntesis de lisina y compite con la ACV sintetasa por el precursor α -aminoadípico. La actividad de la α -aminoadipato reductasa se ha cuantificado bajo concentraciones de lisina de 0 a 10 mmol/L. La α -aminoadipato reductasa de la cepa silvestre de *A. chrysogenum* muestra una inhibición del 80% con una concentración de 1 mmol/L de lisina (Hijarrubia *et al.*, 2002). La inhibición de esta enzima es de gran importancia para la biosíntesis de cefalosporina C, porque se requieren altos niveles intracelulares de α -ácido aminoadípico para una producción eficiente del antibiótico.

1.4. Proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G forman una familia de proteínas caracterizadas por la fijación de GTP (trifosfato de guanosina) y su posterior hidrólisis a GDP (bifosfato de guanosina) durante su ciclo funcional, hecho por el cual obtienen su nombre. Las proteínas G heterotriméricas constituyen elementos clave para las vías de transducción de señales que controlan varias respuestas celulares a estímulos ambientales en organismos eucariontes. La actividad de la proteína G está determinada por el nucleótido de guanina que está unido a la subunidad α : cuando está unido GDP el heterotrímico ($\alpha\beta\gamma$) es inactivo, mientras que la unión de GTP provoca la separación de la subunidad α del dímero $\beta\gamma$, activándose ambos.

La tasa de desprendimiento de GDP y de hidrólisis de GTP se encuentra en niveles mínimos durante el estado basal. La interacción de un ligando al receptor específico (*G-protein coupled receptor*) provoca un cambio conformacional del receptor, permitiendo la interacción de éste con la correspondiente proteína G (hasta ese momento inactiva). Esta interacción induce, a su vez, un cambio en la conformación de la subunidad α de la proteína G, cambio que hace que la afinidad de la subunidad alfa por el GDP disminuya

drásticamente y se dé la disociación de la molécula de GDP (Hamm, 1998; Neves *et al.*, 2002). En el interior de la célula, la concentración de GTP es normalmente mucho mayor que la de GDP, por lo que el sitio de unión para el nucleótido es rápidamente ocupado por el GTP. De esta forma, se constituye una subunidad alfa activada (α -GTP), que cambia su conformación y se disocia tanto del receptor como del dímero $\beta\gamma$ (Grishina y Berlot, 1998).

Tanto el monómero α como el dímero $\beta\gamma$, son capaces entonces de interactuar con efectores *downstream*, separada o conjuntamente (Clapham y Neer, 1997; Ford *et al.*, 1998). En algunos casos, ambas subunidades se unen a los mismos efectores, generando efectos opuestos o sinérgicos (Ford *et al.*, 1998). Estos efectores suelen encontrarse ligados a la membrana, y a su vez pueden reaccionar con otras proteínas del citosol.

Todas las subunidades alfa poseen actividad de GTPasa e hidrolizan el GTP con una velocidad relativamente baja (Hamm, 1998). Cuando el GTP es hidrolizado a GDP, la subunidad alfa se asocia nuevamente con el dímero $\beta\gamma$, con lo que la proteína G regresa a su estado inactivo inicial. La duración del estado de activación de una proteína G está, pues, controlada por la subunidad alfa (Neer, 1994; Neves *et al.*, 2002).

Cuando el receptor activado se ha disociado de una proteína G se une a otro trímero inactivo, originando un nuevo ciclo. Mientras el ligando siga unido al receptor, éste sigue activando proteínas G. Un complejo ligando-receptor puede activar un número significativo de proteínas G en un corto periodo de tiempo, amplificando de este modo la señal inicial.

1.4.1. Proteínas G heterotriméricas en hongos

En mamíferos, las proteínas G heterotriméricas se han clasificado atendiendo a la diversidad estructural y el papel que desempeña la subunidad α , estableciéndose cuatro grupos diferenciados: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o/t}$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$ (Rens-Domiano & Hamm 1995; Wess, 1998). En los hongos, el análisis de las secuencias de subunidades α de diferentes especies reveló que no existe una correspondencia clara con los grupos establecidos en mamíferos, por lo que Bölker (1998) propuso una clasificación nueva que agrupa las subunidades α fúngicas en tres subgrupos diferentes: I, II y III. Los hongos presentan en sus genomas genes que codifican cada uno de estos tres tipos de subunidades α , mientras que existe

únicamente un gen que codifica la subunidad β y otro la subunidad γ . En el hongo *Ustilago maydis* está presente un cuarto tipo de subunidad α , denominada Gpa4, la cual presenta características inusuales al resto.

Las subunidades α pertenecientes al subgrupo I han sido las más estudiadas. Poseen una elevada similitud entre especies, y la presencia de ciertos motivos conservados en su secuencia las relaciona con el grupo $G_{\alpha_{i/o/t}}$ de mamíferos. Las subunidades α de este grupo en mamíferos actúan sobre la adenilato ciclasa, disminuyendo su actividad y por tanto reduciendo la concentración de AMPc intracelular, sin embargo en hongos se ha visto que su efecto sobre los niveles de AMPc es habitualmente el contrario (García-Rico *et al.*, 2008a; Yang y Borkovich, 1999; Jain *et al.*, 2002). Las subunidades α del subgrupo I han sido relacionadas con el control de diferentes procesos en hongos, como el crecimiento, conidiación, patogenicidad, formación del apresorio y producción de metabolitos secundarios.

Es posible manipular la actividad de las proteínas G heterotriméricas pertenecientes al subgrupo I mediante mutaciones del gen codificante de la subunidad α . Ciertos cambios de aminoácidos en la región “switch” de la subunidad α producen subunidades mutantes que no son capaces de separarse del dímero $\beta\gamma$, resultando en una proteína G constitutivamente inactivada, tal y como ocurre con la subunidad α Fad^{G203R} de *A. nidulans*. La inactivación de FadA ocasiona la biosíntesis precoz de esterigmatocistina y la desregulación del proceso de conidiación, que ocurre entonces de forma temprana (Hicks *et al.*, 1997). Por otro lado, mutaciones que eliminan la actividad GTPasa de la subunidad α originan proteínas G constitutivamente activas, como por ejemplo la mutación *fadA*^{G42R}, la cual tiene como resultado el bloqueo de la conidiación y de la producción de la toxina.

1.4.2. Regulación del metabolismo secundario y la morfogénesis en hongos por proteínas G heterotriméricas

Las vías de señalización mediadas por proteínas G heterotriméricas han sido implicadas en la regulación del crecimiento y la diferenciación en hongos filamentosos. La influencia de la señalización mediada por las subunidades α del subgrupo I sobre la conidiogénesis ha sido demostrada en diferentes especies fúngicas, en las que se ha

sobreexpresado o se ha obtenido una activación constitutiva de la subunidad. En estos casos se ha observado un efecto negativo sobre la conidiación, disminuyendo en algunos casos el número de conidios (Yang y Borkovich, 1999; Tag *et al.*, 2000; García-Rico *et al.*, 2007) y eliminándose por completo la formación de conidióforos en otros (Yu *et al.*, 1996; Segers y Nuss, 2003; Zuber *et al.*, 2002). Este efecto regulador negativo de las subunidades α sobre la conidiación se ha visto con gran claridad en especies fúngicas como *Aspergillus nidulans*, *Penicillium marneffeii* y *Penicillium chrysogenum*, en las cuales el proceso de conidiogénesis se desregula al inactivar constitutivamente la subunidad α , y se llegan a producir conidióforos y conidios en cultivos sumergidos, en los que normalmente las condiciones de crecimiento son represoras para la formación de esporas asexuales (Yu *et al.*, 1996; Zuber *et al.* 2002; García-Rico *et al.*, 2008a). Asimismo, transformantes antisentido del gen que codifica para la subunidad Tga1 en *Trichoderma atroviride* presentan un patrón hiperconidiante (Rocha-Ramírez *et al.*, 2002).

La excepción a este patrón de comportamiento la constituyen los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Phaeosphaeria nodorum*, en los cuales la ausencia de la subunidad α tiene un efecto negativo sobre la conidiación (Jain *et al.*, 2002; Solomon *et al.*, 2005). En estos hongos filamentosos no se ha descrito el efecto de la sobreexpresión o activación constitutiva de este subgrupo de subunidades α .

Uno de los aspectos más relevantes de la señalización mediada por subunidades α del subgrupo I es su efecto sobre la producción de metabolitos secundarios, confirmando la hipótesis de la conexión existente entre el proceso de esporulación y la producción de metabolitos microbianos (Adams *et al.*, 1998; Calvo *et al.*, 2002). El ejemplo mejor caracterizado del vínculo genético entre el desarrollo morfológico y la producción de antibióticos se encuentra en la bacteria filamentososa *Streptomyces* spp., en la cual se han descrito elementos comunes que regulan la esporulación y la producción de metabolitos secundarios (Fernández-Moreno *et al.*, 1991). En hongos filamentosos micotoxigénicos, como *A. nidulans* y *Aspergillus parasiticus*, la activación constitutiva de la subunidad α ocasiona una disminución en la producción de esterigmatocistina, un precursor de las aflatoxinas (Hicks *et al.*, 1997). En *A. nidulans* se ha establecido el mecanismo mediante el cual FadA regula la biosíntesis de esterigmatocistina (Shimizu y Keller, 2001; Calvo *et al.*, 2002), el cual consiste en la regulación indirecta del gen *affR* (regulador transcripcional específico de la ruta biosintética de esterigmatocistina) a través de la proteína cinasa A

dependiente de AMP cíclico. Este efecto regulador negativo observado en *A. nidulans* y *A. parasiticus* también se presenta en *Aspergillus flavus*, microorganismo productor de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico, afectándose en este caso la producción de las dos micotoxinas (Calvo *et al.*, 2002) (Figura 4).

Sin embargo, la regulación que las subunidades α ejercen sobre el metabolismo secundario no siempre es de tipo negativo. *A. nidulans* posee completo, y en la misma disposición que *Penicillium chrysogenum*, el *cluster* de genes responsables de la biosíntesis de penicilina. Tag *et al.*, (2000) describieron que la activación constitutiva de la subunidad FadA estimula la producción del antibiótico β -lactámico penicilina y activa la expresión del gen *pcbC*, además de regular de forma negativa la conidiación. Un efecto similar se observó al introducir el alelo de activación constitutiva *fadA*^{G42R} de *A. nidulans* en *Fusarium sporotrichoides*, produciéndose un incremento en la producción de la micotoxina trichoteceno (Tag *et al.*, 2000). En *Penicillium chrysogenum* la producción de penicilina también es regulada positivamente por la subunidad α Pga1, homóloga de FadA; esta regulación se lleva a cabo a nivel de la transcripción de los tres genes biosintéticos de penicilina (*pcbAB*, *pcbC* y *penDE*) (García-Rico *et al.*, 2008b). La activación constitutiva de la subunidad α Pga1 también provoca un aumento en la producción de otros metabolitos secundarios de *P. chrysogenum*, como la crisogenina y la roquefortina (García-Rico *et al.*, 2008b), y la introducción del alelo *pga1*^{G42R} en *Penicillium roqueforti* tiene como consecuencia así mismo un aumento en la biosíntesis de roquefortina (García-Rico *et al.*, resultados no publicados). En la actualidad aun se desconoce el mecanismo por el que las subunidades α regulan diferencialmente el metabolismo secundario.

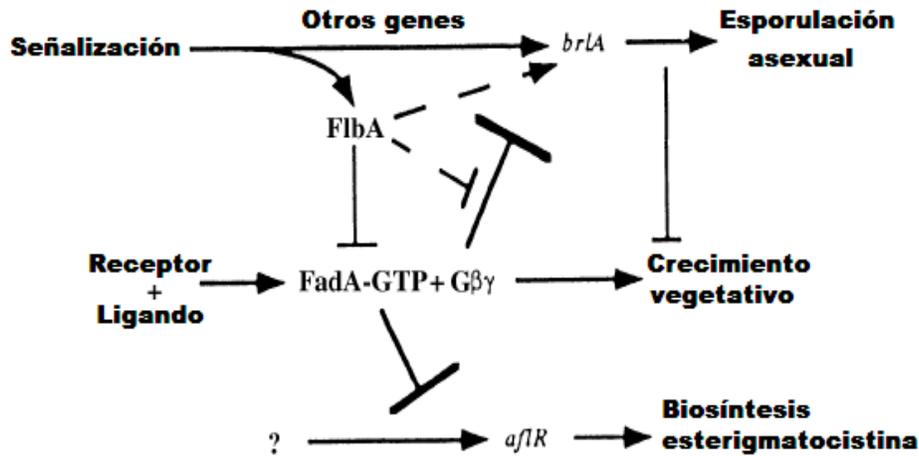


Figura 4. Modelo propuesto para la regulación del crecimiento, desarrollo y metabolismo secundario de *A. nidulans* mediado por *flbA* y *fadA*. Se propone que ambas vías de señalización son antagónicas y regulan el desarrollo y metabolismo secundario. Cuando *FadA* se une al GTP regula los efectores que inducen el crecimiento vegetativo y reprime tanto la esporulación como la biosíntesis de esterigmatocistina. (Reproducido de Hicks *et al.* 1997).

La producción de pigmentos también es regulada por este tipo de subunidades α . En *Neurospora crassa* la activación constitutiva de Gna1 conlleva una disminución en la producción de los pigmentos carotenoides característicos de esta especie (Yang y Borkovich, 1999). Este efecto represor se evidencia también en *Phaeosphaeria nodorum*, en la cual la ausencia de la subunidad α genera un aumento en la secreción de pigmentos de color marrón al medio de cultivo (Solomon *et al.*, 2005). Por el contrario, en *P. marneffe* la eliminación de la subunidad GasA disminuye la secreción de un pigmento rojo propio de esta cepa (Zuber *et al.*, 2002).

1.5. Morfogénesis en *Acremonium chrysogenum*

Acremonium chrysogenum posee algunas características fisiológicas que lo hacen un objeto de estudio interesante. Este hongo carece de ciclo sexual. Las hifas se organizan en compartimentos uninucleados, en contraste con lo que ocurre en especies como *Penicillium chrysogenum* o *Aspergillus nidulans*, donde los compartimentos son mayoritariamente multinucleados. Dos tipos diferentes de desarrollo morfogénico se dan en *Acremonium chrysogenum*; por un lado se forman conidios hialinos de forma ovoide en la punta de hifas conidiogénicas, los cuales se mantienen unidos formando pequeñas cabezas mucilaginosas. Este proceso de conidiación, o esporulación asexual, se da tanto

en medio sólido como en líquido, siendo éste un hecho significativo y distintivo respecto a otros hongos productores de beta-lactamas como *P. chrysogenum* o *A. nidulans*, en los cuales la conidiación sólo se da en medio sólido en condiciones estándar. Por otro lado las hifas pueden también diferenciarse formando artrosporas en un proceso conocido como fragmentación de la hifa. La fragmentación ha sido asociada a la producción de cefalosporina (Bartoshevich *et al.*, 1990), y recientemente se han caracterizado dos genes relacionados con la biosíntesis de cefalosporina cuya inactivación inhibe el proceso de fragmentación, el gen regulador *cpcR1* (Hoff *et al.*, 2005) y el transportador *cefM* (Teijeira *et al.*, 2008). No existe ninguna información sobre los genes implicados en el proceso de conidiogénesis en *Acremonium chrysogenum*.

Bartoshevich *et al.* (1990) describieron tres fases de diferenciación en *A. chrysogenum*, y la correlación entre estas etapas y la producción de cefalosporina. En la diferenciación tipo 1 se da la transición del estado vegetativo a la reproducción mediante la formación de conidios. En esta etapa reproductiva la formación de conidios es escasa. La diferenciación tipo 2 se ha descrito para las etapas tardías de desarrollo y se caracteriza por la formación de artrosporas. Las artrosporas pueden ser consideradas como esporas reproductivas simplificadas, que permiten al microorganismo sobrevivir bajo condiciones de estrés. Esta etapa se acompañaría de una baja producción de cefalosporina C. El tipo 3 de diferenciación es una transformación con múltiples etapas del micelio, con la formación de artrosporas que son capaces de llevar a cabo un desarrollo policíclico periódico. En esta alternancia micelio-artrosporas se ha observado una elevada producción de cefalosporina C (Bartoshevich *et al.*, 1990).

La caracterización de los mecanismos que controlan el crecimiento y la diferenciación en microorganismos de interés industrial es esencial para el entendimiento de estos procesos y para la realización de estudios futuros de la implicación de estos mecanismos en el metabolismo secundario, particularmente en la biosíntesis de antibióticos.

1.6. Justificación

La biosíntesis de metabolitos secundarios (p.ej. antibióticos y toxinas) en hongos filamentosos está comúnmente asociada con la diferenciación celular y su desarrollo. En *Aspergillus nidulans* hay una clara relación entre la biosíntesis de metabolitos secundarios y la esporulación asexual. Esta regulación está mediada por la subunidad α (FadA) de una proteína G heterotrimérica (Calvo *et al.*, 2002). FadA une GTP en su forma activa y de este modo favorece el crecimiento vegetativo, inhibiendo la diferenciación asexual. Por otro lado, la inactivación de FadA por medio de su actividad GTPasa endógena permite que se lleve a cabo la esporulación y la biosíntesis de esterigmatocistina (Hicks *et al.*, 1997). La biosíntesis de esterigmatocistina y de penicilina están reguladas de forma diferencial por FadA en *Aspergillus nidulans* (Tag *et al.*, 2000).

En *A. chrysogenum*, la esporulación es deficiente y es poco conocida la relación que ésta pueda tener con la biosíntesis de cefalosporina. Se han descrito distintos tipos de diferenciación en *A. chrysogenum*, como la esporulación asexual (conidiación) y la formación de artrosporas mediante fragmentación de las hifas; este último proceso coincide con la producción máxima de cefalosporina C (Bartoshevich *et al.*, 1990). Es razonable pensar que, de forma similar a lo que ocurre en *Aspergillus nidulans*, una proteína homóloga a la subunidad FadA regule también la conidiación y la biosíntesis de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum*, hipótesis apoyada por los resultados obtenidos en *Penicillium chrysogenum* (García-Rico *et al.* 2008a y b), en los que la subunidad α Pga1, homóloga de FadA, inhibe la conidiación mientras regula positivamente la producción de otro antibiótico β -lactámico: la penicilina.

La confirmación de esta hipótesis permitiría tener un control sobre la regulación de la esporulación y la biosíntesis de cefalosporina por *A. chrysogenum*, algo de suma importancia para lograr la sobreproducción de los mismos a nivel industrial.

1.7. Hipótesis

La esporulación y la biosíntesis de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum* están reguladas por la actividad de la subunidad α de una proteína G heterotrimérica homóloga a la subunidad Pga1 de *P. chrysogenum*. Modulando la actividad de dicha subunidad α (Aga1 en *Acremonium chrysogenum*) será posible incrementar la producción de antibiótico.

1.8. Objetivos

1.8.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la expresión del alelo mutante *pga1*^{G42R}, que codifica una subunidad α de proteína G heterotrimérica constitutivamente activa, en la regulación de la esporulación y biosíntesis de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum*.

Objetivos particulares

- Transformación de *Acremonium chrysogenum* con el plásmido pG42Rb, portador de un alelo mutante del gen *pga1* de *Penicillium chrysogenum* que codifica una subunidad α constitutivamente activa.
- Determinar el efecto de la subunidad α Pga1 constitutivamente activa sobre los procesos de conidiación y producción de cefalosporina en *A. chrysogenum*.
- Clonación del gen *aga1* (*A*cremonium *G* *alpha* 1) de *Acremonium chrysogenum* mediante la utilización de oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de las secuencias de genes homólogos a éste.

Materiales y métodos

2.1. Microorganismos utilizados

2.1.1. Cepas fúngicas

Acremonium chrysogenum ATCC 48272 (C10): Cepa de mediana-alta producción de cefalosporina C (2000 µg/mL en medios definidos) liberada por Panlabs (Demain, 1983).

Acremonium chrysogenum ATCC 11550 (Brotzu): Cepa silvestre de *A. chrysogenum* aislada en el mar de Cagliari por Giuseppe Brotzu (Brotzu, 1948), productora de cefalosporina C, desacetoxicefalosporina C y penicilina N. Alcanza una producción de 200 µg/mL de cefalosporina C en medio definido.

Acremonium chrysogenum ATCC 14553: Cepa de mediana producción de cefalosporina C (400 µg/mL en medio definido) obtenida por mutación de la cepa *A. chrysogenum* ATCC 11550.

2.1.2. Cepas bacterianas

Escherichia coli DH5 α : Cepa utilizada para experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (hasta 1×10^8 transformantes/µg de ADN). Además, posee una eliminación en el gen *lacZ*, lo que hace que sean fácilmente seleccionables en ella los plásmidos capaces de originar α -complementación (p.ej. pBluescript y pGEM).

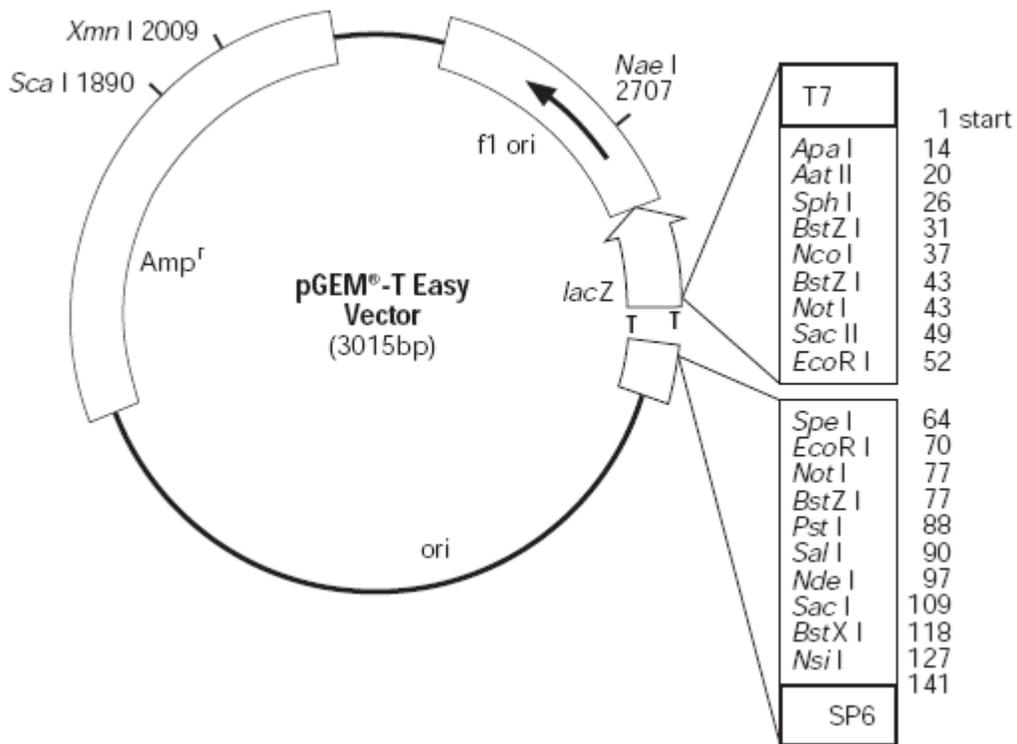
GENOTIPO: F⁻, *endA1*, *hsdR17* (r_k , m_k^+), *supE44*, *thi-1*, λ^- , *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, $\phi 80dlacZ\lambda M15$, $\Delta(lacZYA-argF)$, *deoR* (Hanahan, 1985).

Escherichia coli ESS 22-31: Cepa sensible a antibióticos β -lactámicos utilizada para la cuantificación de cefalosporina C por bioensayo. Proporcionada por el Dr. Juan Francisco Martín (Universidad de León, España).

2.2. Vectores

2.2.1. Vectores plasmídicos

pGEM-T Easy (Promega): El plásmido pGEM-T es un sistema para la clonación de productos de PCR. Este vector es derivado del plásmido pGEM-5Zf(+) cortado con *EcoRV* y con timidinas añadidas en los extremos 3' de ambas cadenas.



Las características del plásmido pGEM-T Easy son:

Tamaño de 3000 pb

Origen de replicación monocatenario del bacteriófago f1

Sitio de inicio de transcripción para la ARN polimerasa T7

Promotor de la ARN polimerasa SP6

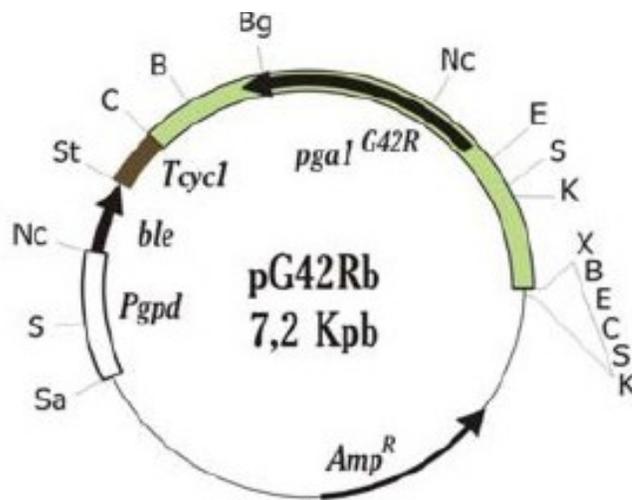
Sitio de unión a cebadores para secuenciación pUC/M13

Codón de inicio *lacZ*

Operador *lac*

Gen de resistencia a ampicilina

pG42Rb: Este plásmido es derivado del vector pJL43b1, cortado con *ClaI* y con el alelo *pga1^{G42R}* de *Penicillium chrysogenum* insertado.



Las características del plásmido pG42Rb son:

- Tamaño de 7200 pb
- Gen de resistencia a ampicilina para selección en *E. coli*.
- Gen de resistencia a fleomicina expresado bajo el promotor *gpd* para selección en hongos
- Alelo mutante del gen *pga1* de *P. chrysogenum* (*pga1^{G42R}*) que codifica una subunidad α de proteína G heterotrimérica constitutivamente activa

2.3. Reactivos químicos y bioquímicos

Los productos químicos utilizados fueron adquiridos en las siguientes casas comerciales: Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri), Bio-Rad (California), Promega Co. (Madison, Wisconsin), Stratagene (La Jolla, CA) y Aldrich Chemie GmbH & Co. (Steinheim, Alemania).

2.3.1. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sintéticos:

5' ATG GGC TGC GGA ATG WSY ACN GAG GAB AAG GA 3'
 5' TTA GAT CAG GCC GCA WAG VCG VAG RTT YTC YTG 3'

utilizados para la amplificación del marco de lectura del gen *aga1* de *A. chrysogenum* por PCR fueron sintetizados por Invitrogen.

2.4. Medios de cultivo

2.4.1 Medios de cultivo para bacterias

Medio Luria-Bertani (Miller, 1972):

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada hasta 1 litro	
Ajustar a pH 7.5 con NaOH	
Para medio sólido se añadieron 20 gramos de agar por litro	

Medio NZY (Miller, 1972):

NZ - Amina	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g
Agua destilada hasta 1 litro	
Ajustar a pH 7.5 con NaOH	
Para medio sólido se añadieron 20 gramos de agar por litro	
Para la cobertera se añadieron 7 gramos de agarosa por litro	

Medio GYT

Glicerol	100 mL
Extracto de levadura	1.25 g
Bacto-triptona	2.5 g
Agua destilada hasta 1 litro	

2.4.2. Medio de cultivo para hongos

2.4.2.1. *Acremonium chrysogenum*

Medio LPE (medio de esporulación y mantenimiento; Le Page y Campbell, 1946):

Glucosa	1 g
Extracto de levadura	2 g
NaCl	1.5 g
CaCl ₂	10 g
Agar	20 g
Agua destilada hasta 1 litro	
Ajustar a pH 6.8 con NaOH	

Medio MMC (medio definido de crecimiento; modificado de Queener *et al.*, 1985):

Sacarosa	31.6 g
Glucosa	2.2 g
Sólidos de maceración de maíz	0.5 g
L-Asparagina	7.5 g
Acetato de amonio	0.22 g
KH ₂ PO ₄	15 g
K ₂ HPO ₄	21 g
Na ₂ SO ₄	0.75 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.18 g
CaCl ₂	0.06 g
Solución de sales	1 mL
La composición de la solución de sales en gramos por litro:	
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	15 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	3 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.8 g
Agua hasta 1 litro. Ajustar pH a 7.0 con NaOH	

Medio CCM (medio completo; Minuth *et al.*, 1982)

Caldo de triptocaseína de soya	5 g
Sacarosa	3 g
Extracto de levadura	11 g
Extracto de carne	1 g
Glucosa	15 g
NaCl	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g
Agua hasta 1 litro	
Ajustar pH a 7.0 con NaOH	

Medio CCMS

Medio CCM	
Sacarosa	103 g
Agar	20 g
Agua destilada hasta 1 litro	
Ajustar pH a 7.0	

Medio TSB

Peptona de caseína	16 g
Peptona de soya	3 g
Glucosa	2.5 g
NaCl	6 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
Agua destilada hasta 1 litro	
Ajustar pH a 7.0	
Cuando se utilizó para bioensayos se añadieron 10 g de agar por litro	

Medio TSAS (Queener *et al.*, 1985)

Medio TSB	
Sacarosa	103 g
Agar	20 g
Agua destilada hasta 1 litro	
Ajustar pH a 7.0	

Medio MSMA (medio semilla modificado de *Acremonium*; Adinarayana *et al.*, 2003)

Glucosa	10 g
Sólidos de maceración de maíz	5 g
Almidón soluble	15 g
Extracto de levadura	4 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
CaCO ₃	1 g
Agua destilada hasta 1 litro	
Ajustar pH a 7.0	

Medio MCFA (medio complejo de fermentación de *Acremonium*; Caltrider y Niss, 1966)

CaCO ₃	1.5 g
Sólidos de maceración de maíz	5 g
Melaza de caña	30 g
Extracto de carne	30 g
Agua destilada hasta 1 litro	
Ajustar pH a 6.8	
Se distribuyó en matraces indentados de 500 mL de volumen con 100 mL de medio	

2.4.3. Aditivos para los medios de cultivo

Se añadieron antibióticos a los medios de cultivo, esencialmente según las recomendaciones de Sambrook y Russell (2001). El antibiótico utilizado para la cepa

bacteriana DH5 α fue ampicilina (Ap, 100 μ g/mL), mientras que para hongos se utilizó únicamente fleomicina (5-30 μ g/mL, dependiendo de la cepa).

2.5. Crecimiento de los microorganismos

2.5.1. Crecimiento de las cepas bacterianas

Para el crecimiento de bacterias en medio sólido se utilizó normalmente LB o TSA, y como medio líquido LB o NZY, salvo que el microorganismo o el experimento hicieran necesaria una variación (se indicará, en tal caso).

2.5.2. Crecimiento de las cepas fúngicas

2.5.2.1. Condiciones para la esporulación

Para conseguir la esporulación se cultivó *A. chrysogenum* en medio CCM, en cajas de Petri con aproximadamente 25 mL de medio durante ocho días a 28°C. A continuación, se colectó el contenido de cada caja con 5 mL de MSMA, raspando con una varilla de vidrio para obtener una suspensión, que se utilizó para el medio semilla.

2.5.2.2. Condiciones para la producción de antibióticos

Se inoculó un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 45 mL de MSMA con el contenido procedente de 3 placas de medio CCM. Se incubó a 25°C durante 38 horas.

Se inoculó; con 10 mL del medio de inóculo anterior, un matraz indentado de 500 mL con 90 mL de medio MCFA. Se incubó a 25°C y 250 rpm durante el tiempo que se siguió la fermentación. Se muestreó un matraz cada 24 horas, para valorar la producción de cefalosporina C mediante bioensayo frente a *E. coli* ESS 22-31 (anexo 1).

2.6. Mantenimiento de los microorganismos

Bacterias: Las cepas bacterianas se conservaron en placa de Petri sellada a 4°C durante un mes, como máximo, o bien en glicerol a -20°C, en una concentración final de 20%.

Hongos: El micelio se maceró con NaCl 0.9% y perlas de vidrio; esta suspensión se mantuvo a -20°C en glicerol a una concentración final de 40%.

2.7. Obtención de ADN total de *Acremonium chrysogenum*

El método usado para obtener ADN total de *A. chrysogenum* fue esencialmente el descrito previamente por Specht *et al.*, (1982), modificado por Fernández (1997).

Se inocularon 100 mL del medio MMC con micelio procedente de seis placas de Petri de medio LPE de *A. chrysogenum* y se incubó a 28°C durante 48 horas. Se recogió el micelio resultante por filtración a través de un filtro de nylon estéril de 30 µm de diámetro de poro (Nytal, Suiza). El micelio retenido se lavó con 1 volumen de NaCl al 0.9% (p/v) y en seguida con otro volumen de tampón A. Se secó con papel filtro, se congeló a -70°C y se liofilizó.

Posteriormente se maceraron, con ayuda de un mortero, 0.5 g de micelio liofilizado y se recogió parte del polvo obtenido en un microtubo de 2.2 mL (sin que se superen los 0.1 mL de volumen por tubo, aproximadamente 25 mg de micelio pulverizado). A continuación se le añadieron 0.5 mL de tampón de rotura I, se homogeneizó la mezcla y se adicionaron 0.5 mL de fenol y 0.5 mL de CIA. Se mezcló bien y se incubó a 50°C durante 20 minutos (con mezclas cada cinco minutos).

Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó la mezcla a temperatura ambiente, a 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 10 minutos, y se recuperó la fase acuosa. La mezcla se desproteinizó mediante extracciones sucesivas con fenol-CIA hasta que se obtuvo una interfase limpia (normalmente fueron necesarias entre seis y siete extracciones).

La fase acuosa se transfirió a un microtubo y se le añadió ARNasa (en una concentración final de 100 µg/mL), incubándose a 37°C durante 90 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo se adicionó un volumen de fenol neutro, se mezcló y se centrifugó a temperatura ambiente, a 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante cinco

minutos. Nuevamente se recogió la fase acuosa, se homogeneizó con un volumen de fenol-CIA y se centrifugó en las mismas condiciones del paso anterior. Se hizo un último tratamiento con un volumen de CIA.

Se tomó la fase acuosa y se precipitó el ADN a una temperatura de -20°C toda la noche con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío.

A continuación, se centrifugó a 4°C y 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 20 minutos, se decantó el sobrenadante, el precipitado se lavó con 0.5 mL de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a temperatura ambiente y 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante cinco minutos. Se eliminó el sobrenadante, se cerraron los tubos y se les dio un pulso en la centrífuga para recoger el etanol restante con una punta estéril. Finalmente, los tubos se dejaron 15 minutos abiertos, y el precipitado seco se resuspendió en 30 μ L de TE, conservándose a 4°C.

Tampón A: Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 100 mM pH 8

Tampón de rotura I: EDTA 100 mM pH 8, SDS al 1% (p/v) y Tris-HCl 0.2 M. Se ajusta el pH a 8.2 con HCl.

Fenol ácido: se mezclan 500 mL de fenol sólido con 500 mL de H₂O, se agita, se deja reposar y se retira la fase superior acuosa.

Fenol neutro: Se mezclan por agitación cuatro volúmenes de fenol ácido con un volumen de Tris-HCl 1 M pH 8. Se mantiene la mezcla en reposo hasta que se separen la fase superior acuosa y la inferior fenólica.

CIA: Se prepara mezclando 24 volúmenes de cloroformo con un volumen de alcohol isoamílico.

Fenol-CIA: Se prepara mezclando volúmenes iguales de fenol neutro y de CIA.

ARNasa: Se disuelve la ARNasa en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y NaCl 15 mM a 10 mg/mL de concentración. Se calienta a 100°C durante 15 minutos, se deja enfriar lentamente, se reparte en alícuotas y se conserva a -70°C.

TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8.

2.8. Reacción en cadena de la ADN polimerasa

Este método se utilizó para la amplificación del marco de lectura del gen de la subunidad α Aga1. Esta técnica se basa en la actividad de las ADN polimerasas, cuya función es sintetizar en dirección 5'→3' una cadena de ADN a partir de una cadena molde, un cebador y desoxinucleótidos.

Las ADN polimerasas Pfu y Taq, provenientes de los microorganismos termófilos *Pyrococcus furiosus* y *Thermus aquaticus*, respectivamente, se han utilizado preferentemente en esta técnica por su estabilidad a las altas temperaturas requeridas

para desnaturalizar el ADN. Con esta técnica es posible amplificar fragmentos específicos de ADN, acotados por los cebadores diseñados para tal efecto, mediante la repetición de tres pasos: i) desnaturalización del ADN molde, ii) hibridación de los cebadores con cada una de las cadenas molde y iii) polimerización a partir de los cebadores.

Para obtener una alta cantidad de ADN amplificado estos tres pasos se repiten entre 25 y 35 ciclos. Es recomendable que el número de ciclos no sea muy alto, ya que la frecuencia de mutaciones por parte de la Taq ADN polimerasa se incrementa exponencialmente a partir del ciclo 30. Por otro lado el uso de 25 ciclos en la amplificación ocasiona un bajo rendimiento.

Se utilizó la enzima elongasa, que es una mezcla de Taq ADN polimerasa y ADN polimerasa de *Pyrococcus* GB-D. La proporción de estas dos polimerasas termoestables es tal que la progresividad y la actividad de la Taq, junto con la actividad exonucleasa 3'→5' de la ADN polimerasa de *Pyrococcus* permite la amplificación de fragmentos mayores a 30 kb con alta fidelidad.

2.8.1. Condiciones de PCR

Se prepararon dos mezclas diferentes y se mantuvieron en hielo, una constituida por el ADN molde, cebadores y nucleótidos (tubo 1) y la otra con el buffer y la elongasa (Invitrogen) (tubo 2). La mezcla de reacción del tubo 1 fue la siguiente:

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final (μM)
dNTPs 10 mM	1	200
Cebador 1 (0.2 mM)	1	4
Cebador 2 (0.2 mM)	1	4
ADN molde	$\times \mu\text{L}$ (≥ 100 ng)	---
Agua	a 20 μL	

La mezcla de reacción del tubo 2 fue:

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
Buffer B 5 \times	10	60 mM Tris-SO ₄ (pH 9.1), 18 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , con MgSO ₄ 1-2 Mm Elongasa (0.1 U/ μL)
Elongasa (5 U/ μL)	1	
Agua	a 30 μL	

Se mezclaron los volúmenes de ambos tubos de reacción. Se homogeneizó la mezcla suavemente por pipeteo.

La reacción de PCR se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler Personal, con el siguiente programa, creado a partir de las características de los oligonucleótidos diseñados:

Etapa	T°	Tiempo	Ciclos
1 Desnaturalización	94	2 minutos	1
2	2.1 Desnaturalización	94	1 minuto
	2.2 Hibridación	63	1 minuto
	2.3 Extensión	72	2 minutos
3 Extensión adicional	68	5 minutos	1

2.9. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se utilizaron los métodos descritos por Sambrook y Russell (2001). Se utilizó agarosa en concentraciones de entre 0.3% y 1% (p/v, dependiendo del rango de tamaños a fraccionar) disuelta por calentamiento en tampón TAE 1×. Las muestras de ADN se mezclaron con un décimo del volumen final del tampón de carga concentrado y se calentaron durante 5-10 minutos a 65°C, enfriándose posteriormente en un baño de hielo y agua durante 2-3 minutos. Una vez cargadas las muestras en el gel, la electroforesis se realizó en tampón TAE 1×. La tinción del ADN se realizó con una solución de bromuro de etidio con una concentración final de 0.5 µg/mL.

Los marcadores de tamaño utilizados y la longitud de sus fragmentos, en pares de bases, se muestran a continuación:

ADN del fago λ digerido con *Hind*III (λ *Hind*III): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125.

Ladder PROMEGA 1 kb: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 y 250.

TAE 50×: Tris base 242 g, ácido acético glacial 57.1 mL, EDTA 0.5M pH 8 100 mL, agua destilada hasta 1 litro.

Bromuro de etidio: Solución 10 mg/mL en agua. Se conserva a 4°C.

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

2.10. Extracción de ADN a partir de geles de agarosa

Se utilizó fundamentalmente el método por congelación y centrifugación a través de lana de vidrio (freeze-squeeze). Este método es muy rápido y sencillo, aunque el porcentaje de recuperación no supera el 70% (Polman y Larkin, 1989).

Una vez realizada la electroforesis, se tiñó el gel por el procedimiento habitual y se cortó la banda de interés, la cual se introdujo en un microtubo en el que se había hecho un orificio en el fondo, bloqueado con lana de vidrio estéril desde el interior.

Se congeló la banda en el interior del tubo con nitrógeno líquido (o a -20°C durante 30 minutos), se centrifugó a 14,000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 10 minutos colocando debajo del microtubo perforado otro sin perforar. El tampón que atravesaba la lana de vidrio llevaba el ADN disuelto, que fue recogido en el tubo inferior, mientras que la agarosa quedó retenida en la lana de vidrio que obturaba el orificio del tubo superior. Tras la centrifugación se adicionaron 100 μL de TE y se volvió a centrifugar a 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 1 minuto.

La solución obtenida se limpió con fenol-CIA y CIA. El ADN se precipitó a -20°C con 1/10 del volumen final de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío.

2.11. Clonación de los productos de PCR en el vector pGEM-T Easy

El vector pGEM-T Easy es un sistema comercial que se basa en la actividad de transferasa terminal independiente del molde que presentan algunas polimerasas como la enzima Taq ADN polimerasa. Esto da como resultado la adición de un nucleótido en el extremo 3' durante la amplificación de fragmentos por PCR. La actividad transferasa terminal puede agregar cualquiera de los cuatro nucleótidos en esa posición, pero preferentemente se incorpora un nucleótido de adenina, con lo cual los fragmentos amplificados por PCR tienen en su mayoría extremos 3' con un nucleótido de adenina protuberante.

La actividad de transferasa terminal independiente de molde de la Taq ADN polimerasa se puede utilizar para la ligación de fragmentos amplificados por PCR con una extensión A-3', utilizando un vector linearizado con un nucleótido de timina 3' protuberante, lo que permite el apareamiento de Watson y Crick y favorece la reacción por parte de la T4 ADN ligasa. El uso de este sistema es más eficiente que la ligación de extremos romos, y también que la ligación de fragmentos digeridos con una sola enzima de restricción (en este caso puede generarse un alto número de plásmidos recircularizados, mientras que en el protocolo del "TA-cloning" los extremos T-3' no permiten apareamiento de Watson y Crick, por lo que no pueden ser ligados).

Según lo expuesto por los proveedores (PROMEGA) la construcción del vector pGEM-T Easy se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Marchuk *et al.* (1991).

2.11.1. Ligación de los productos de PCR con el vector pGEM-T Easy

Previo a la preparación de la mezcla de ligación, se centrifugó brevemente el vector pGEM-T Easy, para que todo el volumen se fuera al fondo del tubo y se agitó vigorosamente el tampón de ligación 2× antes de ser utilizado.

En un microtubo de 0.5 mL se mezclaron:

Tampón de ligación 2×	5 µL
pGEM-T Easy	1 µL
ADN ligasa T4	1 µL
Producto de PCR	3 µL
	10 µL

La reacción se mezcló por pipeteo y se dejó toda la noche a 4°C, para obtener el número máximo de transformantes.

Tampón de ligación 2×: Tris-HCl 60 mM pH 7.8, MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM y polietilenglicol 10% (p/v).

2.11.2. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*

A partir de una placa de medio LB con crecimiento de colonias aisladas de la cepa de *E. coli* DH5 α , se inoculó con una colonia aislada un matraz de 250 mL con 50 mL de medio LB. Se incubó a 37°C con agitación de 250 rpm, entre 12-14 horas.

A continuación, de este precultivo fueron tomados 3 mL con los que se inoculó un matraz de 500 mL con 100 mL de medio LB. Se incubó bajo las condiciones anteriores hasta que el cultivo alcanzó una OD₆₀₀ entre 0.4 y 0.45. En seguida, el matraz se colocó en un baño de hielo y agua durante 30 minutos.

Las células se recogieron por centrifugación a 4°C y 2500 rpm ($\approx 1000 \times g$), durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 20 mL de H₂O dd estéril. La suspensión se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, se decantó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 20 mL de glicerol al 10% (v/v) estéril, se centrifugó (4°C, 2500 rpm, 20 minutos) y se decantó cuidadosamente el sobrenadante. A continuación, el precipitado se resuspendió en 2 mL de glicerol al 10%. Se centrifugó (4°C, 2500 rpm, 20 minutos), se retiró el glicerol aspirando con una punta de pipeta cortada y se agregaron 500 μ L de medio GYT, resuspendiéndose cuidadosamente el precipitado por pipeteo repetitivo.

Las células se distribuyeron en alícuotas de 40 μ L, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C.

2.11.3. Procedimiento de transformación de *E. coli*

El protocolo de transformación de las células electrocompetentes fue básicamente el descrito por Zhou *et al.* (1995).

Se descongeló una alícuota de células electrocompetentes (40 μ L) en un baño de hielo y agua y se mezcló con 3 μ L de la reacción de ligación. La mezcla de reacción (células + ligación) se transfirió a una celda de electroporación, previamente enfriada. Se dio un choque eléctrico en un electroporador Electroporator 2510 (Eppendorf), con una intensidad y duración aproximadas de 2500 V y 5 milisegundos, respectivamente.

Rápidamente, se añadió 1 mL de medio LB y se mezcló suavemente por inversión. La mezcla se transfirió nuevamente en un microtubo y se incubó a 37°C y 150 rpm durante una hora.

Finalmente se sembraron 100 µL en placas de LB suplementadas con ampicilina (concentración final 100 µg/mL), X-gal (concentración final 80 µg/mL) e IPTG (concentración final 0.5 mM).

X-gal: Solución stock 50 mg/mL. Disolver 100 mg de X-gal en 2 mL de N, N' dimetilformamida. Cubrir con aluminio y almacenar a -20°C.

IPTG: Solución stock 0.1 M. Disolver 1.2 g de IPTG y agregar H₂O hasta 50 mL. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C.

2.11.3.1. Minipreparaciones

El método seguido para obtener ADN plasmídico a pequeña escala fue el siguiente:

Primeramente se picó una colonia con un palillo estéril y se inoculó en un microtubo estéril 1 mL de medio LB al que se le añadió el antibiótico adecuado (en este caso ampicilina) para el mantenimiento del plásmido dentro de la bacteria. Se incubó el tubo a 37°C con agitación (250 rpm) durante un mínimo de 6 horas.

Transcurrida la incubación se recogieron las células por medio de centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en 350 µL de STET y se añadieron 10 µL de una solución de lisozima (10 mg/mL en agua). Se mezcló durante 30 segundos y se hirvió durante 45 segundos. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitaron por centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos y se eliminaron con ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipitó con 40 µL de acetato sódico 3 M, pH 5.2, y 600 µL de isopropanol. Se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos.

El ADN plasmídico se centrifugó a 14000 rpm ($\approx 15300 \times g$) durante 5 minutos y el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v). Posteriormente se secó y se resuspendió en 30 µL de TE. Dos microlitros de esta solución fueron suficientes para llevar a cabo los ensayos de digestión.

2.12. Digestión del ADN

Las enzimas de restricción fueron utilizadas siguiendo las recomendaciones de los proveedores. Cada enzima tiene condiciones óptimas de funcionamiento, en cuanto a temperatura, concentración de sales y condiciones de pH. Como norma general, el volumen de la enzima no debe superar 1/10 del volumen total de la mezcla de reacción, debido a la alta concentración de glicerol presente en las soluciones de almacenamiento de las enzimas utilizadas. Asimismo, es conveniente que el ADN esté lo suficientemente diluido y limpio con el fin de no alterar las condiciones de reacción (Fernández, 1997).

2.12.1. Esquema general de la digestión de ADN con una endonucleasa de restricción

En un microtubo de 1.5 mL se mezclaron:

- Agua destilada estéril hasta completar el volumen final de la reacción de digestión
- Tampón de digestión en la concentración óptima descrita
- n µg de ADN disuelto en H₂O_d o en tampón TE
- 2n unidades de enzima

Posteriormente se incubó a la temperatura adecuada (generalmente, 37°C) durante 1-3 horas. Los productos de la digestión se analizaron mediante geles de agarosa.

2.13. Transformación de *Acremonium chrysogenum*

En el presente trabajo se utilizó como marcador para la selección de los transformantes la resistencia al antibiótico fleomicina, lo cual permite transformar una cepa sin necesidad de obtener previamente mutantes específicos, como ocurre cuando se utiliza un marcador auxotrófico (Díez *et al.*, 1987). Este método, sin embargo, requiere un estudio preliminar para determinar el nivel de resistencia a fleomicina de la cepa en estudio.

La fleomicina pertenece al grupo de antibióticos metalo-glucopeptídicos de la familia de la bleomicina (Berdy, 1980). Tanto la fleomicina como la bleomicina originan

roturas en la molécula de ADN *in vivo* e *in vitro*, preferentemente en secuencias repetidas invertidas con ADN monocatenario y en lugares de ADN bicatenario no metilados. La fleomicina es un antibiótico de amplio espectro producido por una cepa mutante de *Streptomyces verticillus*, activo sobre la mayoría de levaduras y hongos, siendo además tóxico para células vegetales y animales en concentraciones de 0.1 a 50 µg/mL. Sin embargo, las células pueden adquirir resistencia a fleomicina cuando se les introduce el gen *ble* (gen de resistencia a bleomicina-fleomicina). Este gen se encontró en la región central del transposón Tn5 de bacterias Gram negativas, en el plásmido de bacterias Gram positivas pUB110 y en ADN cromosómico de actinomicetos productores de fleomicina como *Streptoalloteichus hindustanus* (Drocourt *et al.*, 1990).

El gen *ble* de *S. hindustanus* posee como características principales:

- el gen tiene sólo 375 pb y comienza en un sitio *NcoI* (CCATGG) que contiene el ATG inicial.
- sólo comparte un sitio *SmaI* con los sitios de corte para endonucleasas de restricción normalmente incluidos en el sitio múltiple de clonación de los vectores más utilizados.
- los niveles de resistencia están correlacionados con el nivel de expresión del gen *ble*, que viene dado por dos factores: la fuerza del promotor bajo el que se expresa el gen *ble* y el número de copias del gen *ble* integradas en el genoma del transformante.

2.13.1. 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 añadieron 100 mL de NaCl 0.9% y se recogió el micelio bajo las mismas condiciones.

2.13.2. Obtención de protoplastos

Se resuspendió el micelio en 100 mL de TPC suplementado con DTT (Ditiotreitol) 0.1 M, se incubó 2 horas 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®, 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.

Se filtró la suspensión protoplastos/restos de micelio a través de un filtro de nylon (Nytal, Suiza) de 30 μm 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 NaCl tres veces consecutivas.

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

2.13.3. Transformación

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

Suspensión de protoplastos	100 μL
ADN	1-10 μL (1-10 μg)

Se mezcló y se mantuvo durante 20 minutos en hielo. Se añadieron 500 μ L de tampón CCM, se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos más. Se diluyó el polietilenglicol presente en el CCM añadiendo 600 μ L de NCM. Se mantuvo esta mezcla de transformación a temperatura ambiente hasta el momento del plaqueo.

2.13.4. Plaqueo

Primeramente se preparó la base de las placas de transformación (60 mm de diámetro) extendiendo 5 mL de medio TSAS con fleomicina a una concentración conocida (*A. chrysogenum* ATCC 11550 5-10 μ g/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 μ L
Fleomicina (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.

CCM: CaCl₂ 50 mM, MOPS 10 mM pH 7, PEG 8000 18% (p/v)

NCM: NaCl 0.8 M, CaCl₂ 50 mM, MOPS 10 mM pH 7

TPC: NaCl 0.8 M, tampón fosfato potásico 50 mM pH 7. Después de esterilizar, añadir MgSO₄ 0.02 M

2.14. Caracterización de las cepas ATCC 14553 y ATCC 48272 (C10) de *Acremonium chrysogenum*

El método seguido para la caracterización morfológica de las cepas ATCC 11550 (Brotzu) ATCC 14553 y ATCC 48272 (C10) y PgaG42R fue en esencia el descrito por Minuth *et al.*, (1982) y Hoff *et al.*, (2005).

Partiendo del micelio recogido de tres placas de LPE de siete días de crecimiento se inoculó un matraz de 250 mL con 50 mL de medio CCM y se incubó a 27°C y 180 rpm durante 60 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, siete matraces con 100 mL de medio CCM se inocularon con 5 mL provenientes del cultivo del paso anterior y se incubaron bajo las mismas condiciones.

Cada 24 h se muestreó un matraz, se tomaron 200 μ L de cultivo y se fijaron en un portaobjetos, para luego ser teñidos con azul de lactofenol y analizados en un microscopio de contraste de fase (Olympus CH30). Este muestreo se repitió hasta que se cumplieron 168 h de cultivo.

Lactofenol: ácido láctico 100 mL, fenol 100 g, glicerol 200 mL, agua 100 mL.

Solución de azul algodón: solución saturada de azul algodón (azul anilina soluble) 10 mL, glicerol 10 mL, agua 80 mL.

Azul de lactofenol: mezclar volúmenes iguales de lactofenol y de la solución de azul algodón.

3. Resultados y Discusión

3.1. Transformación de *A. chrysogenum* con el plásmido pG42Rb y análisis de los transformantes

Dado que aún no se contaba con el gen *aga1* de *A. chrysogenum* se optó por la utilización en este trabajo del vector pG42Rb (García-Rico *et al.*, 2007). Este plásmido posee el gen de la subunidad α Pga1 de *Penicillium chrysogenum* con una mutación para que ésta sea constitutivamente activa. La activación constitutiva de la proteína Pga1 se realizó mediante la sustitución del residuo glicina en la posición 42 de la proteína por una arginina, lo que se consiguió mutando el correspondiente triplete, originando el alelo *pga1*^{G42R}, tal y como lo describieron Yu *et al.* (1996) para la proteína FadA en *A. nidulans*. Este cambio provoca la eliminación de la actividad GTPasa de la proteína, obteniéndose así una subunidad α permanentemente activa y separada del dímero $\beta\gamma$. El uso de esta estrategia se fundamentó en los resultados previos obtenidos al introducir el alelo de activación constitutiva *fadA*^{G42R} de *A. nidulans* en *Fusarium sporotrichoides*, donde se observó un incremento en la producción de la micotoxina tricoteceno (Tag *et al.*, 2000). De forma similar, la introducción del alelo *pga1*^{G42R} de *P. chrysogenum* en *P. roqueforti* tuvo como consecuencia un incremento en la producción de roquefortina; los transformantes de *P. roqueforti* también mostraron un fenotipo similar a cepas de *P. chrysogenum* con el mismo alelo mutado, caracterizado por una muy escasa conidiación y una disminución en el crecimiento radial de la colonia. Estos resultados indican un elevado grado de conservación funcional en la actividad de las subunidades α del subgrupo I fúngicas (grupo al que pertenece tanto Pga1 como FadA), en correlación con la alta identidad en la secuencia que presentan este tipo de subunidades (Bölker *et al.*, 1998).

Se decidió transformar la cepa ATCC 11550 (cepa silvestre de Brotzu) de *A. chrysogenum* para observar más claramente el efecto del plásmido mencionado sobre la esporulación y la biosíntesis de cefalosporina C.

3.1.1. Producción de protoplastos de la cepa ATCC 11550 de *A. chrysogenum*

Para la obtención de protoplastos de la cepa ATCC 11550 se siguió el procedimiento indicado en los materiales y métodos (apartado 2.12.), observándose la presencia de protoplastos a partir de 2 horas después de la adición de Driselase® (Sigma). Se evaluó la acción de dos tipos de enzimas líticas para la producción de protoplastos de la cepa silvestre de *A. chrysogenum*, obteniéndose resultados diferentes, aunque satisfactorios en ambos casos. Con las enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich, No. cat. L1412) se requirieron 3.5 horas para formar protoplastos, y se produjo una menor cantidad de protoplastos que con la otra mezcla de enzimas. Por lo anterior, la mayoría de transformaciones con protoplastos se realizaron con Driselase®.

Las observaciones microscópicas realizadas al inicio y final del proceso de producción de protoplastos permitieron apreciar que no solamente se obtuvieron las estructuras unicelulares necesarias para el procedimiento de transformación, sino que además aparecen restos de micelio (Figura 5). Se consideró que los restos celulares encontrados con los protoplastos no interferirían con la obtención de los transformantes, ya que lo más probable es que fueran eliminados por acción del antibiótico usado como marcador de selección. El control negativo de transformación, por otro lado, valoraría la confiabilidad de los resultados.

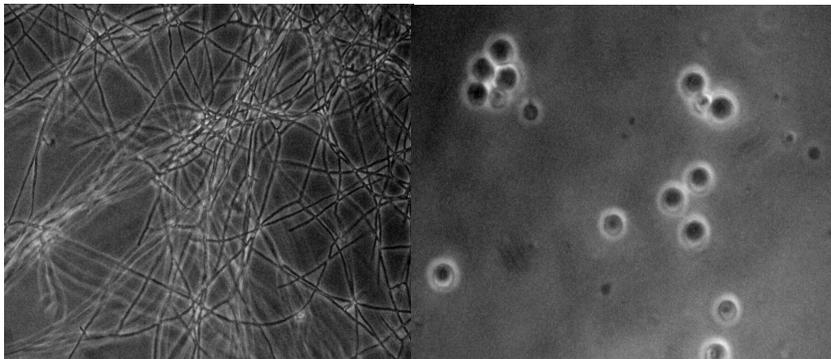


Figura 5. Morfología microscópica de *A. chrysogenum* (ATCC 11550) observada antes (izquierda) y después (derecha) del proceso de producción de protoplastos. Las muestras se visualizaron en un microscopio de contraste de fase (OLYMPUS CH30) con un aumento 100×.

3.1.2. Evaluación de la resistencia a fleomicina de los protoplastos de la cepa ATCC 11550 de *A. chrysogenum*

La resistencia al antibiótico fleomicina fue utilizada como marcador para la selección de los transformantes, lo que requirió de un estudio preliminar para determinar el nivel de resistencia a fleomicina de la cepa en estudio. Se siguió el mismo procedimiento indicado para la transformación en los materiales y métodos, salvo que no se añadió plásmido alguno. Se plaquearon los protoplastos con concentraciones crecientes de fleomicina (5-30 $\mu\text{g/mL}$), para cuantificar la resistencia de estos a dicho antibiótico. Al cabo de siete días de incubación a 25°C se observó que el nivel de resistencia fue de 10 $\mu\text{g/mL}$ de fleomicina para la cepa ATCC 11550 de *A. chrysogenum*.

3.1.3. Transformación de *A. chrysogenum* ATCC 11550 y selección de los transformantes

La tabla 1 indica las condiciones de transformación utilizadas para los protoplastos de la cepa ATCC 11550, buscando obtener transformantes de *A. chrysogenum* que incorporaran el plásmido pG42Rb, y por tanto expresaran la subunidad α Pga1 activada constitutivamente. Con el propósito de determinar si el efecto observado sobre la esporulación y la producción de cefalosporina se debía realmente a la introducción del alelo *pga1*^{G42R}, se utilizó como control el plásmido sin inserto (pJL43b1).

Tabla 1. Condiciones de transformación para *A. chrysogenum* ATCC 11550

Tratamiento	Control +	Control -	pG42Rb	pJL43b1
ADN plasmídico	--	--	alelo <i>pga1</i> ^{G42R}	vector pJL43b1
Fleomicina	--	10 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$
Variable evaluada	Viabilidad	Sensibilidad	Efecto alelo constitutivamente activo	Efecto plásmido solo
Nombre transformante	WT	No crecimiento	Pga1G42R	PJL43b1

Se observó la aparición de transformantes a partir del tercer día de incubación. Todas las transformantes obtenidas fueron cultivadas en medio CCMS con el doble concentración de fleomicina (en relación con la concentración de antibiótico en la cual

aparecieron. De esta forma se aseguró el crecimiento exclusivo de verdaderas transformantes). En total se obtuvieron ocho transformantes, cinco transformantes con el alelo *pga1*^{G42R} (las cuales se nombraron como Pga1G42R, seguido por un número, asignado del 1-5) y tres transformantes con el plásmido sin inserto (PJL43b1, seguido de un número del 1-3).

Las cepas Pga1G42R de *A. chrysogenum* mostraron una disminución en su crecimiento radial de entre un 24 y 40%, en comparación con la cepa silvestre ATCC 11550 (Figura 6).

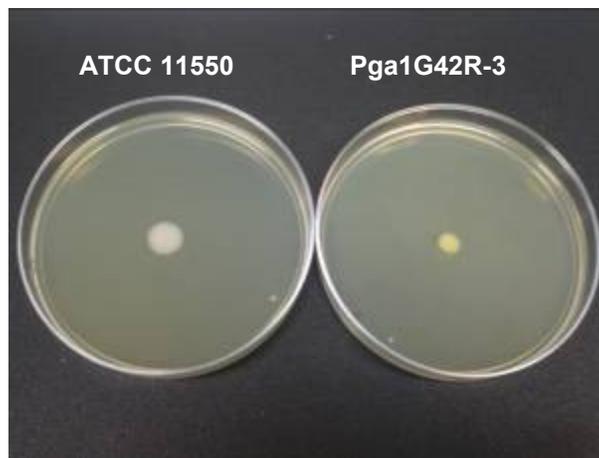


Figura 6. Morfología colonial de *A. chrysogenum* ATCC 11550 y de la cepa transformante Pga1G42R-3, incubadas durante 96 h a 28°C en medio CCM.

Es también de destacar que en el caso de las cepas transformantes Pga1G42R, se comenzó a observar la presencia de una pigmentación amarilla (Figura 6) tras 96 horas de incubación, lo que probablemente se pueda explicar por la sobreproducción de un metabolito secundario de tipo pigmento. Esta pigmentación se apreció también en la cepa parental (ATCC 11550) y en las cepas PJL43b1, aunque en estos casos se requirieron de hasta 216 horas de incubación para que apareciera, por lo que la subunidad α constitutivamente activa parece estar induciendo la producción temprana de este pigmento.

La expresión de la subunidad α Pga1^{G42R} da lugar a un crecimiento vegetativo retardado en *A. chrysogenum*, con colonias de menor diámetro. Estos resultados coinciden con los obtenidos en cepas de *P. chrysogenum* que portan el alelo *pga1*^{G42R}

(García-Rico *et al.*, 2007) y en cepas de *Fusarium sporotrichioides* con el alelo *fadA*^{G42R} (Tag *et al.*, 2000). En *A. nidulans*, la mutación *fadA*^{G42R} favorece el desarrollo de micelio aéreo (fenotipo *fluffy*), aunque no se observa un efecto significativo sobre el diámetro de las colonias (Calvo *et al.*, 2002). En *Neurospora crassa*, la subunidad Gna1 constitutivamente activa favorece el crecimiento de las hifas, aumentando así el peso seco del micelio y la proliferación de micelio aéreo (Yang y Borkovich, 1999), aun cuando el diámetro de las colonias es ligeramente menor al de la cepa silvestre. En *Magnaporthe grisea*, el alelo *magB*^{G42R} disminuye el crecimiento apical en medio V8 con deficiencia de nutrientes, mientras que en medio complejo se incrementa la proliferación de hifas aéreas (Liu y Dean, 1997). En otros hongos, como *Cryphonectria parasitica*, la ausencia de la subunidad α del subgrupo I activa provoca la reducción del crecimiento apical (Gao y Nuss, 1996). Por su parte, en *P. marneffeii*, este tipo de subunidad no está aparentemente involucrada en el crecimiento vegetativo (Zuber *et al.*, 2002).

Con base en estos antecedentes, no existe un modelo uniforme con respecto al efecto de las subunidades α del subgrupo I sobre el crecimiento vegetativo de los hongos filamentosos. En general, las subunidades α poseen un efecto positivo sobre el crecimiento del micelio, si se determina por la extensión apical de la colonia, el aumento del peso seco o la proliferación de las hifas aéreas. Sin embargo, altos niveles de actividad de la subunidad α pueden tener en algunos casos, como el ya descrito de *Cryphonectria parasitica* (Segers y Nuss, 2003), o el observado en *P. chrysogenum* (García-Rico *et al.* 2007) y en nuestro caso trabajando con *Acremonium chrysogenum* se observó un efecto negativo. Lo anterior, indica que el establecimiento de niveles adecuados de actividad de las subunidades α es importante para mantener un desarrollo correcto de la hifa.

Las cepas de *A. chrysogenum* portadoras del alelo *pga1*^{G42R} exhibieron además una pigmentación amarilla tras alcanzarse las 96 horas de incubación, (Figura 6), lo que probablemente corresponde a la sobreproducción de un metabolito secundario de tipo pigmento. Esta pigmentación se apreció también en la cepa parental (ATCC 11550) y en las cepas PJL43b1, aunque en estos casos se requirió un mayor tiempo de incubación para que apareciera. La subunidad α constitutivamente activa parece estar induciendo la producción temprana de este pigmento.

La alteración en la producción de pigmentos también se ha evidenciado en otros hongos. Así, por ejemplo, en *Neurospora crassa* la activación constitutiva de Gna1 conlleva una disminución en la producción de los pigmentos carotenoides característicos de esta especie (Yang y Borkovich, 1999). Este efecto represor se evidencia también en *Phaeosphaeria nodorum*, en la cual la ausencia de la subunidad α genera un aumento en la secreción de pigmentos de color marrón al medio de cultivo (Solomon *et al.*, 2005). Por el contrario, en *Penicillium marneffe* la eliminación de la subunidad GasA disminuye la secreción de un pigmento rojo propio de esta cepa (Zuber *et al.*, 2002).

3.2. Caracterización fenotípica de las cepas ATCC 48272 (C10), ATCC 14553, ATCC 11550 y Pga1G42R de *A. chrysogenum*

Estudios recientes han demostrado que algunos de los componentes de la vías de transducción de señales juegan un papel esencial en el cambio entre el crecimiento vegetativo y la formación de artrosporas (Borneman *et al.*, 2001).

Como en otros deuteromicetos, la diferenciación morfológica en *A. chrysogenum* es diversa y su desarrollo en cultivo sumergido se caracteriza por diferentes morfologías, que cambian completamente durante su ciclo celular (Bartoshevich *et al.*, 1990). En la fase exponencial de crecimiento, los filamentos de las hifas se extienden de manera polarizada mediante la inserción de nuevas estructuras de la pared celular, exclusivamente en los extremos de las hifas que se encuentran en desarrollo. Este fenómeno conduce a la formación de compartimentos individuales dentro de la hifa (Harris y Momany, 2004). En contraste, la aparición de las artrosporas se da al final de la fase exponencial, como describió Gams (1971) para cultivos envejecidos de *A. chrysogenum*. La formación de artrosporas asemeja la artroconidiación de *P. marneffe*, la cual ocurre cuando la temperatura de incubación cambia de 25° a 37°C. Investigaciones recientes han demostrado que algunos de los componentes conservados de la vías de transducción de señales juegan un papel relevante en el cambio entre el crecimiento vegetativo y la formación de artrosporas (Borneman *et al.*, 2001).

Varias evidencias sugieren que el metabolismo secundario y la morfogénesis se encuentran relacionados en *A. chrysogenum*. Durante el mejoramiento de las cepas productoras de cefalosporina C por mutagénesis clásica, la formación de artrosporas

parece estar correlacionada con altos rendimientos en la producción de cefalosporina. Además, la fase de diferenciación de las hifas en artrosporas se ha reportado que coincide con los niveles máximos de biosíntesis de antibióticos β -lactámicos (Nash y Huber, 1971; Bartoshevich *et al.*, 1990). Queener y Ellis (1975) describieron observaciones similares, aunque para ellos no existe una correspondencia lineal entre la capacidad de las cepas de *A. chrysogenum* para formar artrosporas y la síntesis de antibióticos β -lactámicos. Estos autores observaron que mutantes incapaces de producir cefalosporina no presentaban cambio alguno en el proceso de fragmentación. Por otro lado, la reducción del número de enlaces disulfuro a nivel de la pared celular aumenta la fragmentación, sin cambiar la producción de antibióticos β -lactámicos (Crabbe, 1988). Estos reportes indicarían que la diferenciación morfológica en *Acremonium* se encuentra co-regulada con la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos, aunque debe resaltarse que la producción de cefalosporina no depende estrictamente de la formación de artrosporas. Recientemente se han encontrado nuevas evidencias de la relación entre producción de cefalosporina y fragmentación en artrosporas; Teijeira *et al.* (2008) caracterizaron el gen *cefM* de *Acremonium chrysogenum*, que codifica un transportador de penicilina N desde microcuerpos al citosol, comprobando que la eliminación del mismo evita tanto la producción de cefalosporina como la formación de artrosporas, aunque se desconoce el mecanismo por el cual tiene lugar este segundo efecto.

La caracterización de las cepas de *Acremonium chrysogenum* con las que se cuenta en nuestro laboratorio representa un dato de partida necesario para poder interpretar los resultados de la activación constitutiva de la subunidad alfa en la cepa de trabajo. Teniendo en cuenta las evidencias expuestas en el párrafo anterior sobre la existencia de una relación entre el metabolismo secundario y la morfogénesis en *A. chrysogenum*, es posible que al introducir un alelo dominante que codifica la subunidad α Pga1 de *P. chrysogenum* constitutivamente activada (cepas transformantes Pga1G42R), se logren apreciar cambios en ambos parámetros en dichas cepas transformantes. Por lo anterior, era necesario caracterizar los cambios morfológicos que sufren las diferentes cepas de *A. chrysogenum* durante periodos prolongados de cultivo, y de esta forma poder determinar las diferencias antes y después de introducir el alelo mutado (*pga1*^{G42R}). La caracterización de las cepas de *A. chrysogenum* se realizó en cultivo líquido, tal y como se describe en el reporte de Hoff *et al.*, (2005).

Las cepas de *A. chrysogenum* ATCC 14553, ATCC 48272, ATCC 11550 y Pga1G42R se caracterizan por una producción escasa o nula de conidios. La cepa ATCC 48272 (también llamada C10) es una cepa de mediana-alta producción de cefalosporina C (2000 µg/mL en medio definido) (Gutiérrez, 1994), y no formó conidios en ningún momento a lo largo de la fermentación. La cepa ATCC 11550 (cepa silvestre de Brotzu) es productora de cefalosporina C, desacetoxicefalosporina C y penicilina N y alcanza una producción máxima de cefalosporina de 200 µg/mL (Gutiérrez, 1994), siendo la cepa con mayor esporulación de las cuatro, evidenciándose la presencia de conidios en cultivo sumergido a partir de las 48 h de cultivo (Fig. 7). La cepa ATCC 14553 es una cepa originada por mutagénesis clásica a partir de la cepa ATCC 11550, y su esporulación es escasa, apareciendo conidios únicamente tras 120 h de incubación (Fig. 7). La cepa Pga1G42R se obtuvo en el presente trabajo a partir de la cepa ATCC 11550, y su fenotipo en cuanto a la conidiación y producción de cefalosporina se describirá con detalle en el apartado 3.3.

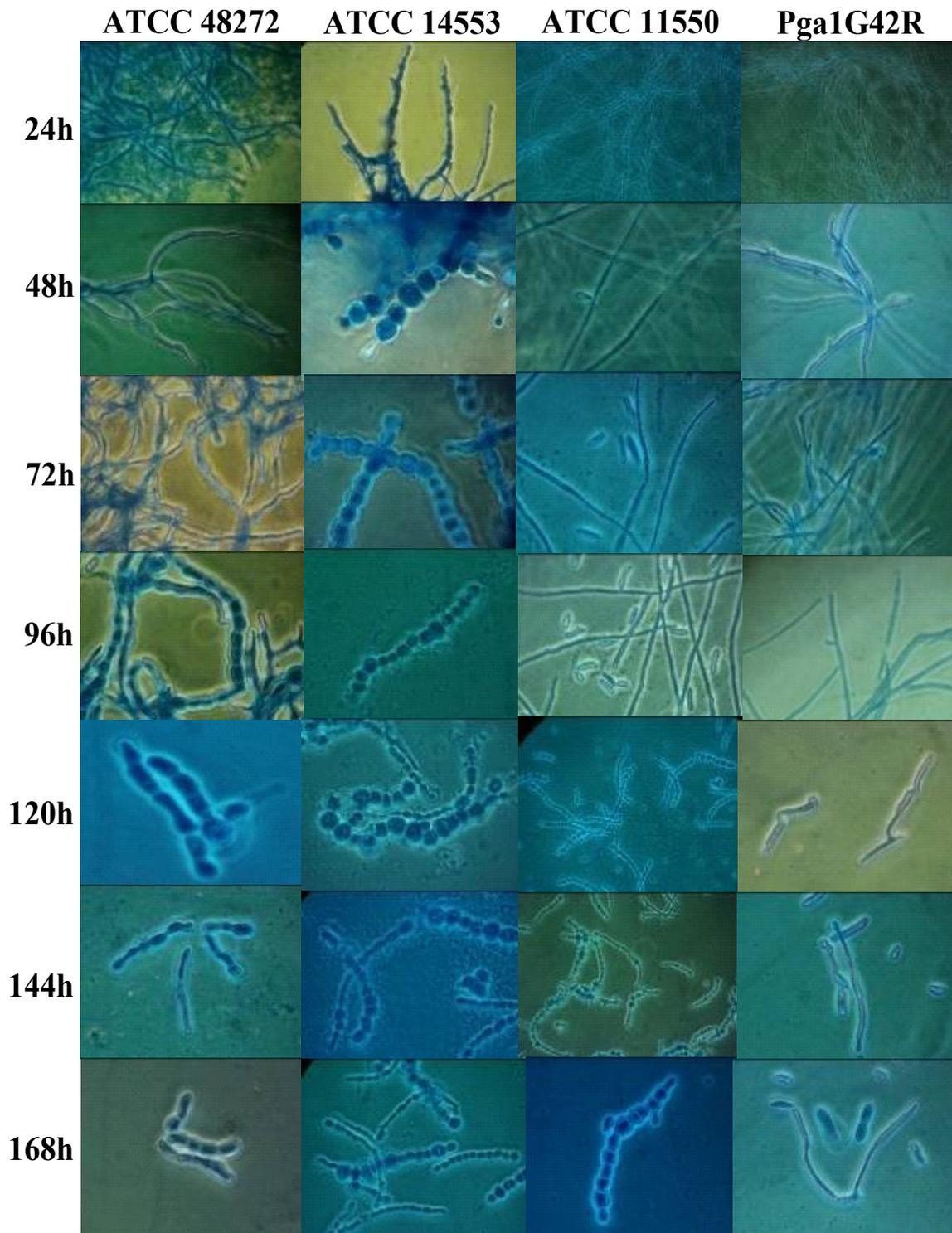


Figura 7. Caracterización morfológica de las cepas ATCC 48272, ATCC 14553, ATCC 11550 y Pga1G42R de *A. chrysogenum* en cultivo líquido. El muestreo se realizó cada 24 h hasta alcanzar las 168 h de cultivo en medio CCM. (Minuth *et al.*, 1982). Para la tinción de las muestras se utilizó azul de lactofenol y se visualizaron en un microscopio de contraste de fase (OLYMPUS CH30).

En lo referente al fenómeno de fragmentación de las hifas, se puede observar en la Figura 7 que la aparición de artrosporas se da en diferentes tiempos de incubación en cada una de las cepas: en la cepa ATCC 14553 comenzó a haber fragmentación de las hifas a las 24 horas de cultivo y en la cepa ATCC 48272 la fragmentación se comenzó a observar a las 72 horas de crecimiento. El desarrollo de la cepa ATCC 48272 es similar al descrito en el reporte de Hoff *et al.* (2005). En este trabajo, los autores utilizaron la cepa A3/2, la cual no forma conidiosporas. Tanto la cepa A3/2 como la ATCC 48272 comenzaron a presentar artrosporas a las 96 horas de cultivo, lo cual coincide con el inicio de la fase estacionaria de crecimiento de *A. chrysogenum*. En el caso de las cepas ATCC 11550 y su derivada Pga1G42R, la fragmentación se presentó al cumplir el mismo tiempo de incubación, las 96 horas, por lo que la presencia de la subunidad α Pga1 constitutivamente activa al parecer no tiene efecto sobre la formación de artrosporas.

3.3. Efecto del alelo *pga1*^{G42R} sobre la conidiación y producción de cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum*

3.3.1. Efecto del alelo *pga1*^{G42R} sobre la conidiación

Una vez que las transformantes, tanto las cepas Pga1G42R como PJL43b1, fueron confirmadas (mediante la selección por fleomicina) se determinó su comportamiento en relación al desarrollo asexual (conidiación) en cultivo sumergido. Las transformantes Pga1G42R mostraron una reducción de su producción conidial de alrededor de un 90% a lo largo de 7 días de crecimiento en medio CCM (Fig. 8), mientras que las transformantes PJL43b1 (vector sin el alelo *pga1* mutado) no mostraron diferencias apreciables respecto a la cepa parental ATCC 11550. Este resultado nos indica que la presencia de la subunidad α Pga1 constitutivamente activa en *Acremonium chrysogenum* provoca una drástica disminución de su desarrollo asexual.

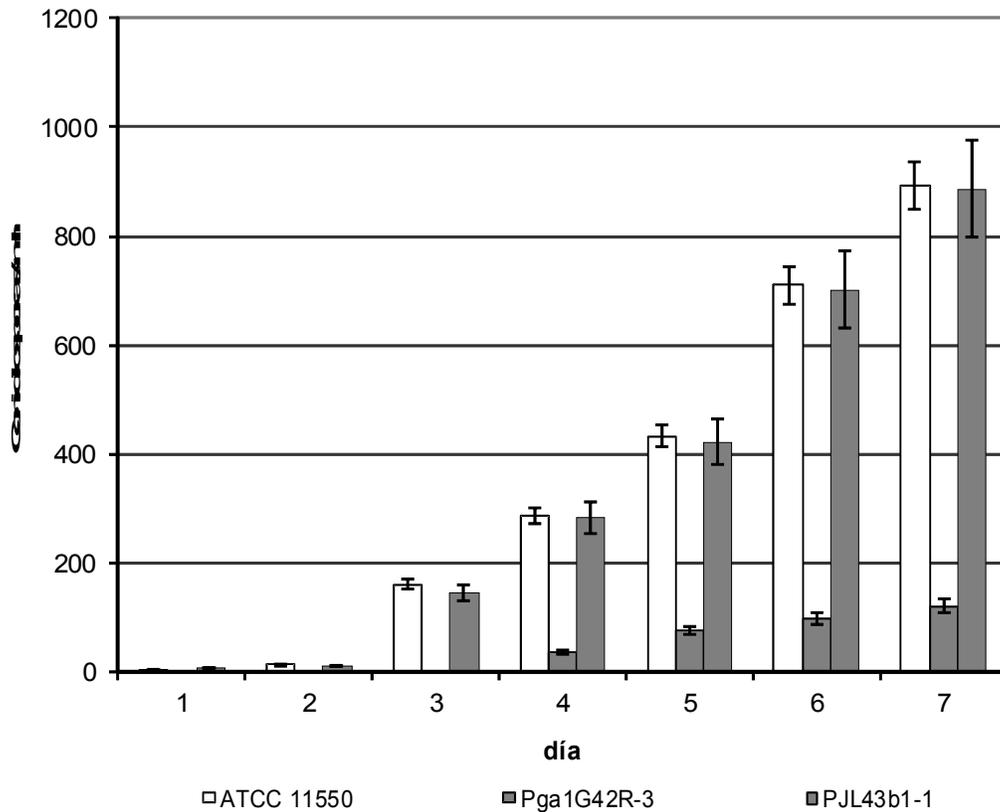


Figura 8. Producción de conidiosporas de *A. chrysogenum* ATCC 11550, el transformante Pga1G42R-3 y el transformante PjL43b1-1 en cultivo sumergido con medio CCM durante 7 días de crecimiento.

La reducción en formación de conidios también se observó en medio sólido (figura 9). En el caso de la cepa ATCC 11550, se comenzó a observar un fenotipo esporulado a partir de las 168 horas cultivo, mientras que en el caso de las cepas Pga1G42R, la esporulación fue escasa y se dio hasta las 288 horas de cultivo. La cuantificación de esporas no se realizó a partir de cultivos en medio sólido, dado que no fue posible la remoción uniforme de las esporas a partir de las placas, o bien se obtenía una suspensión turbia que no permitía el conteo de las mismas.

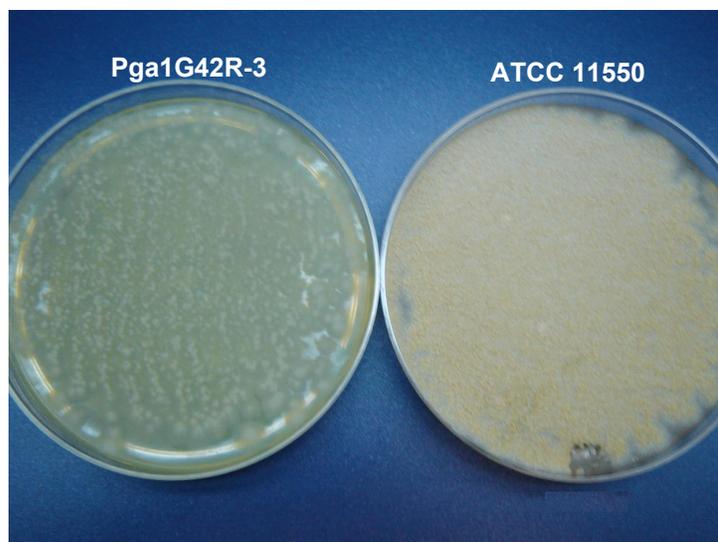


Figura 9. Morfología de *A. chrysogenum* ATCC 11550 y de la cepa transformante Pga1G42R-3, incubadas durante 168 h a 28°C en medio CCM.

La represión de la conidiogénesis es uno de los efectos más característicos de las subunidades α del subgrupo I en hongos filamentosos. La sobreexpresión o la activación constitutiva de la subunidad α da lugar a fenotipos con una formación deficiente de conidios (Yang y Borkovich, 1999; Rocha-Ramírez *et al.*, 2002; Tag *et al.*, 2000), o bien a su ausencia total, como ocurre en *A. nidulans* (Yu *et al.*, 1996), *C. parasitica* (Segers y Nuss, 2003) y *P. marneffe* (Zuber *et al.*, 2002). Asimismo, se han reportado fenotipos hiperconidiantes tras la eliminación de la subunidad α Pga1 en *P. chrysogenum* (García-Rico *et al.*, 2008a) y mediante la atenuación de la expresión de la subunidad Tga1 por ARN antisentido en *Trichoderma atroviride* (Rocha-Ramírez *et al.*, 2002). En todos los casos estos datos se refieren a cultivos en medio sólido, ya que la conidiación en cultivo sumergido es muy infrecuente en la mayoría de las especies de hongos estudiadas, al contrario de lo que sucede en *A. chrysogenum*, donde se produce conidiación en ambos medios.

El fenotipo observado en las cepas *A. chrysogenum pga1^{G42R}* es muy claro: aun cuando la conidiación no es completamente inhibida, como ocurre en *A. nidulans* (Yu *et al.*, 1996) y *P. marneffe* (Zuber *et al.*, 2002), la formación de conidios sufre una disminución drástica. Un efecto similar ha sido observado en cepas de *P. roqueforti* portadoras del mismo alelo *pga1^{G42R}*, las cuales muestran un fenotipo con nula producción de conidios (García-Rico *et al.*, 2008a). Por tanto, al igual que ocurre en la mayoría de

especies fúngicas estudiadas, elevados niveles de actividad de $G\alpha$ -GTP ejercen una regulación negativa sobre la conidiación en *A. chrysogenum*.

3.3.2. Efecto del alelo *pga1*^{G42R} sobre la biosíntesis de cefalosporina (medio sólido)

Dado que se ha sugerido que existe una relación entre el metabolismo secundario y la morfogénesis en *A. chrysogenum*, es posible que al introducir un alelo dominante de activación de la subunidad α Pga1 (cepas transformantes Pga1G42R) se logre apreciar el efecto de dicha mutación sobre la producción de cefalosporina en *A. chrysogenum*. Para confirmarlo, se realizaron bioensayos utilizando la cepa parental ATCC 11550, las cepas transformantes Pga1G42R y las cepas transformantes PjL43b1 de *A. chrysogenum*. En un primer bioensayo se observaron los halos de inhibición producidos por las cepas transformantes Pga1G42R en comparación con la cepa silvestre ATCC 11550 tras 120 h de crecimiento en medio MCFA. Como se observa en la figura 10, las transformantes Pga1G42R-1 y Pga1G42R-2 no produjeron cantidades detectables de CPC, mientras que los transformantes Pga1G42R-3, -4 y -5 produjeron halos de inhibición de un diámetro muy inferior al de la cepa parental ATCC 11550 (Tabla 2).

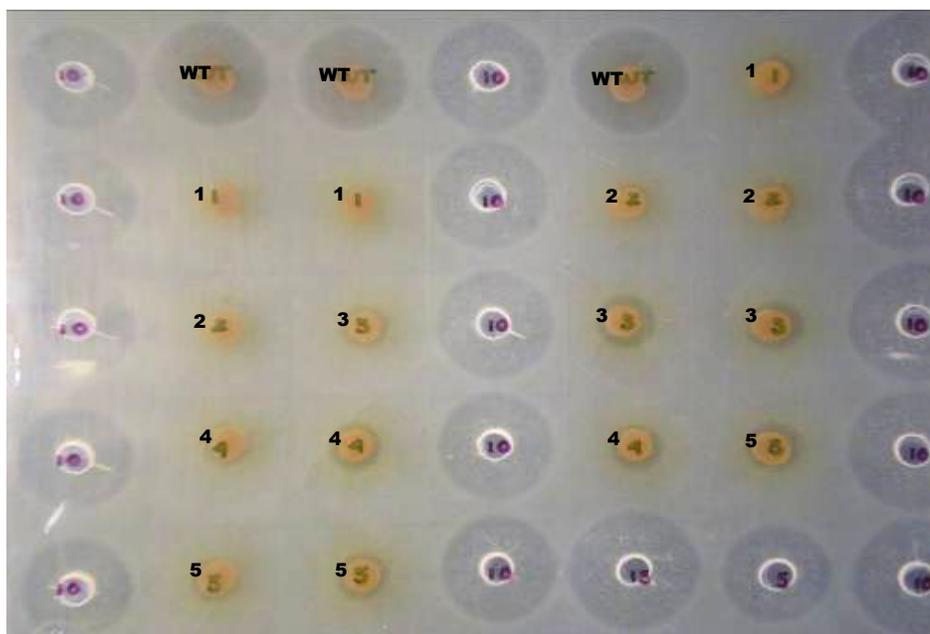


Figura 10. Bioensayo de producción de CPC a las 120 horas (5to. día) de crecimiento. WT: Cepa silvestre (ATCC 11550) de *A. chrysogenum*. Las cepas transformantes Pga1G42R se enumeraron del 1-5. Cada experimento se realizó por triplicado. Estándares de cefalosporina, columnas extremos y central.

Tabla 2. Diámetro de los halos de inhibición de las cepas ATCC 11550 y Pga1G42R 1-5 de *A. chrysogenum*, obtenidos en el bioensayo a las 120 horas.

Cepa	Halo inhibición (cm)
ATCC 11550	2.66
Pga1G42R-1	0.9
Pga1G42R-2	0
Pga1G42R-3	1.32
Pga1G42R-4	1.2
Pga1G42R-5	1.25

A continuación se realizó un nuevo bioensayo con la cepa silvestre ATCC 11550, la transformante Pga1G42R-3 y las cepas control PJL43b1-1, -2 y -3, crecidas durante 72, 96 y 120 horas en medio CCM. En los bioensayos correspondientes a las 72 y 96 horas no se observó producción de cefalosporina C por la cepa transformante Pga1G42R-3. El tamaño de los halos de inhibición formados por la cepa ATCC 11550 y las cepas transformantes PJL43b1 se presentan en la Tabla 3 para esos tiempos de incubación. La producción de cefalosporina C por parte de la cepa Pga1G42R-3 no se dio hasta las 120 horas. Como se observa en la Figura 11, los halos de inhibición de la cepa Pga1G42R-3, que son proporcionales a la producción de cefalosporina C, son de muy pequeño tamaño en comparación con los formados tanto por la cepa ATCC 11550 como por las transformantes PJL43b1; entre estas dos últimas no se aprecia una diferencia apreciable en el tamaño de los halos. El tamaño de los halos de inhibición a las 120 horas de las cinco cepas utilizadas en el bioensayo también se presenta en la Tabla 3. Con base en estos resultados, podemos concluir que los niveles elevados de G_{α} -GTP ejercen una regulación negativa sobre la producción cefalosporina en *A. chrysogenum*.

Tabla 3. Diámetro de los halos de inhibición de las cepas ATCC 11550, PJL43b1-1, PJL43b1-2 y Pga1G42R-3 de *A. chrysogenum*, obtenidos en el bioensayo a las 72, 96 y 120 h.

Cepa	Halo de inhibición (cm)		
	72 h	96 h	120 h
ATCC 11550	1.75	1.88	2.7
PJL43b1-1	1.7	1.9	2.55
PJL43b1-2	1.7	1.85	2.65
PJL43b1-3	1.65	1.8	2.7
Pga1G42R-3	--	--	0.15

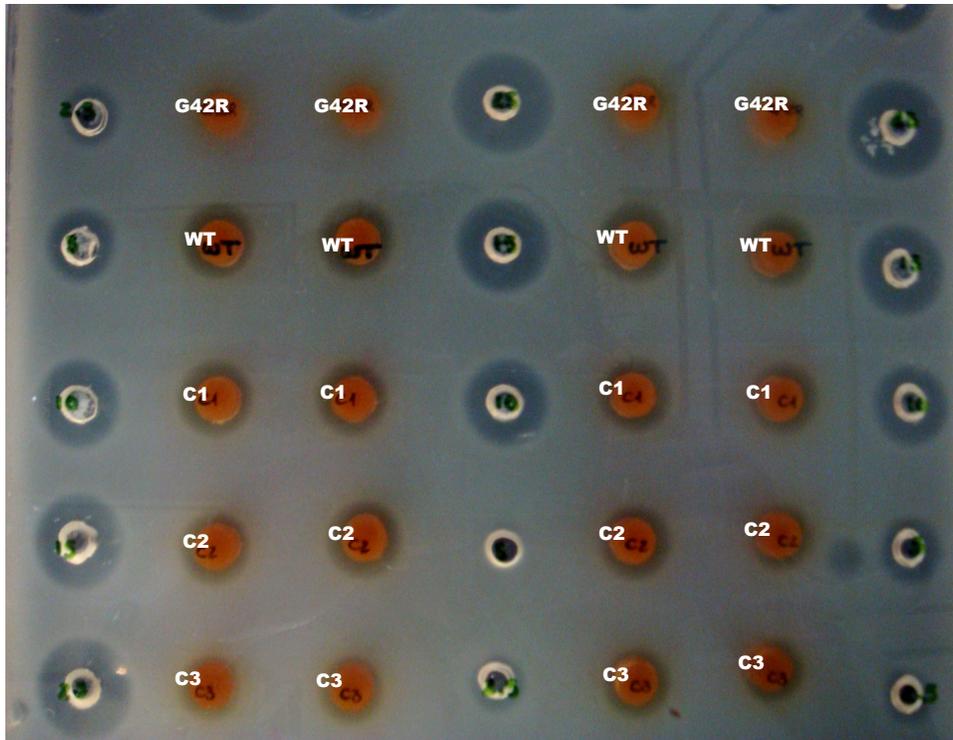


Figura 11. Bioensayo de producción de CPC a las 120 horas (5º día) de crecimiento. WT: Cepa silvestre (ATCC 11550) de *A. chrysogenum*. La cepa transformante Pga1G42R-3 (G42R, línea superior), las cepas transformantes PJL43b1 (control) se enumeraron del 1-3 (C1-C3). Cada experimento se realizó por cuadruplicado. Estándares de cefalosporina columnas de los extremos y central.

3.3.3. Efecto del alelo *pga1*^{G42R} sobre la biosíntesis de cefalosporina (fermentación líquida)

Los niveles de producción de cefalosporina de las ocho transformantes (entre las que se encontraban las que contienen el plásmido con el alelo *pga1*^{G42R} y las que contienen el plásmido control sin inserto) fueron evaluados de forma preliminar, de acuerdo a lo indicado en la sección de materiales y métodos (2.5.2.2.). No se apreció diferencia apreciable entre las tres cepas transformantes PJL43b1 y la cepa silvestre ATCC 11550, por lo que se optó por elegir una de ellas al azar, la PJL43b1-1, para ser utilizada en una fermentación líquida comparativa.

Tras el cultivo en medio semilla de las cepas transformantes y la silvestre, se inoculó un matraz para cada una de ellas con medio MCFA y se midieron la producción de cefalosporina, la cinética del pH y la biomasa a lo largo de seis días de fermentación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

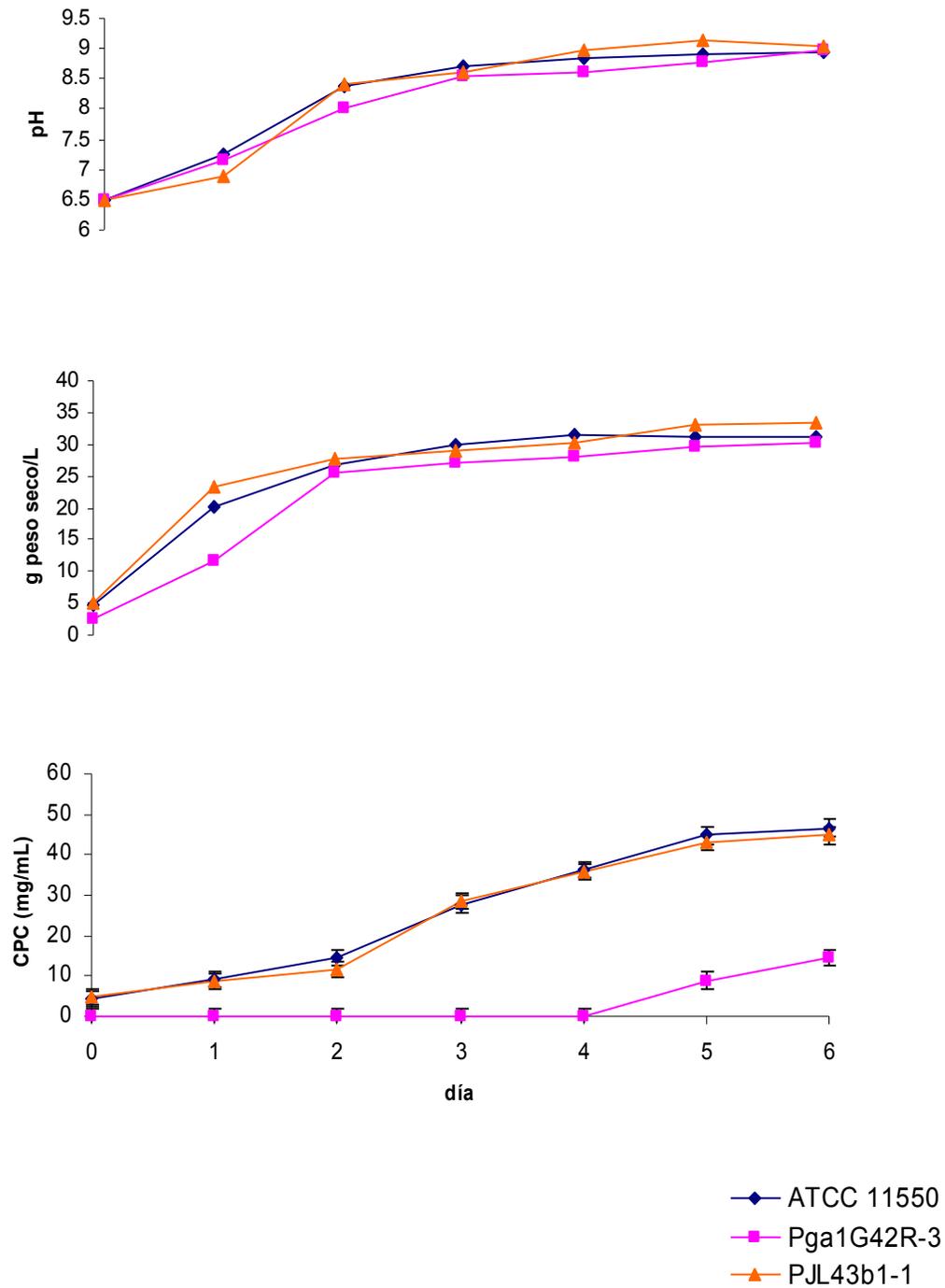


Figura 12. Cinéticas de pH, producción de biomasa y de cefalosporina C para las cepas ATCC 11550, Pga1G42R-3 y PjL43b1-1 de *A. chrysogenum*.

En los cultivos de la cepa ATCC 11550 y sus transformantes no se observaron diferencias apreciables en la cinética de pH ni en la producción de biomasa a lo largo de 144 horas de fermentación (Figura 12), excepto un retraso en la producción de biomasa en la cepa Pga1G42R-3 a las 24 h de cultivo, retraso que se corrigió a las 48 h permaneciendo los niveles de biomasa similares en las 3 cepas hasta el fin de la fermentación. Por otro lado, la cepa parental y las cepas transformantes con el plásmido control (PJL43b1) no mostraron diferencia significativa entre sí en cuanto a la producción de cefalosporina, iniciándose la producción del antibiótico a las 24 horas de fermentación. En cambio, la cepa Pga1G42R comenzó a producir cefalosporina C sólo a partir del cuarto día de fermentación, y acumuló al final de la misma un 25% de la producida por las cepas control. Estos resultados son similares a los descritos para el caso de la esterigmatocistina en *Aspergillus nidulans* (Hicks *et al.* 1997), los niveles elevados de G α -GTP están ejerciendo también en este caso una regulación negativa sobre la producción de un metabolito secundario.

Resulta de gran interés el hecho de que la misma subunidad α constitutivamente activa, Pga1^{G42R}, regule de forma diferente dos metabolitos secundarios pertenecientes al mismo grupo de los β -lactámicos; mientras en *P. chrysogenum* provoca un incremento en la producción de penicilina (García-Rico *et al.*, 2008b), en *A. chrysogenum* ocasiona una disminución en la producción de cefalosporina. La regulación diferencial del metabolismo secundario por parte de subunidades α del subgrupo I ha sido descrita con anterioridad, pudiendo ocurrir incluso dentro de una misma especie. Esto ocurre por ejemplo en *A. nidulans*, donde FadA regula diferencialmente la biosíntesis de esterigmatocistina y penicilina (Tag *et al.*, 2000), y en *Trichoderma atroviride*, en la cual la subunidad Tga1 tiene papeles opuestos en la regulación de distintos metabolitos antifúngicos (Reithner *et al.*, 2005). No se conocen los mecanismos moleculares por los cuales se produce esta regulación diferencial; será necesario profundizar en el conocimiento de las diferentes dianas sobre las que actúan las subunidades α y en los mecanismos de regulación de cada metabolito secundario.

3.4. Amplificación y clonación del gen *aga1* mediante el uso de oligonucleótidos degenerados

Con base en la secuencia de nucleótidos de otros genes de subunidades alfa de la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI), se diseñaron oligonucleótidos degenerados para la amplificación por PCR del marco de lectura abierto del gen *aga1*. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se muestra a continuación.

Cebador	Secuencia (5'→3')	T _m (°C)
Aga1 F	ATG GGC TGC GGA ATG WSY ACN GAG GAB AAG GA	67.4
Aga1 R	TTA GAT CAG GCC GCA WAG VAG RTT YTC YTG	65.2
W= A/T, S= C/G, Y= C/T, N= A/C/G/T, B= C/G/T, V= A/C/G, R= A/G, Y= C/T		

Como molde para la reacción de amplificación se utilizó ADN total de la cepa *A. chrysogenum* ATCC 48272. Los fragmentos amplificados se separaron en un gel de agarosa (Figura 13).

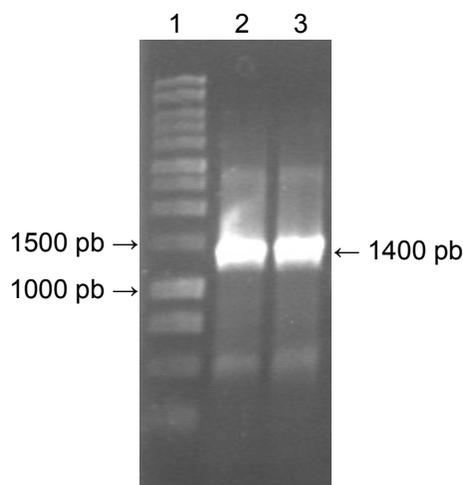


Figura 13. Amplificación por PCR del marco de lectura abierto del gen *aga1* a partir del ADN total de *A. chrysogenum*. Carril 1: Marcador peso molecular 1 kb (Promega). Carriles 2 y 3: Amplificación gen *aga1*.

Las bandas de los carriles 2 y 3 fueron aisladas a partir del gel de agarosa y se purificaron. Los fragmentos purificados fueron ligados al vector linearizado pGEM-T Easy (Promega), de acuerdo a las indicaciones del proveedor. La mezcla de ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α y se seleccionaron las transformantes en medio LB suplementado con ampicilina, IPTG y X-Gal. Las colonias que contenían el plásmido recombinante se seleccionaron por su color crema, prueba de

que se perdió la característica de la α -complementación aportada por el plásmido original. Se aisló el ADN plasmídico siguiendo el protocolo de minipreparaciones y fue digerido para comprobar la presencia del inserto de interés.

El plásmido pGEM-T Easy posee dos sitios de reconocimiento para la enzima *EcoRI* (posiciones 52 y 70), por lo que al digerir el ADN plasmídico purificado se esperaría que se liberara un fragmento de aproximadamente 1400 pb, y el resto del plásmido (alrededor de 3000 pb). Las digestiones se separaron por electroforesis en un gel de agarosa, mostrado en la Figura 14.

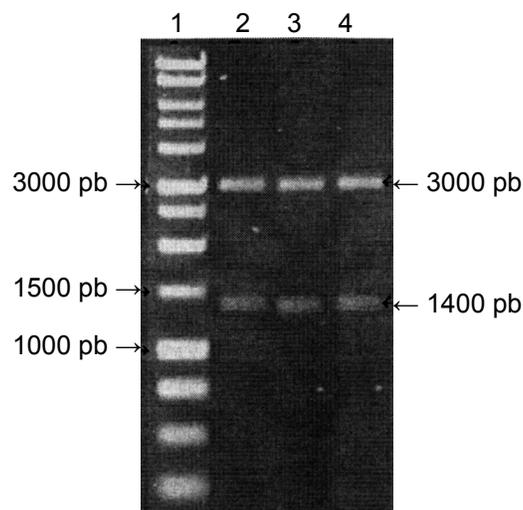


Figura 14. Digestión con la endonucleasa *EcoRI* de los plásmidos recombinantes (carriles 2-4). Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).

De acuerdo al gel, en los carriles 2, 3 y 4 se encontraría el ADN correspondiente a clones donde se insertó el posible gen *aga1*, de aproximadamente 1400 pb.

Una vez confirmada la construcción del plásmido pGEM-Aga1, se envió a secuenciar el inserto de 1400 pb, obteniéndose una secuencia parcial de 867 pb. Mediante un alineamiento en BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se obtuvieron la mayor similitud con secuencias aminoacídicas de diferentes subunidades alfa de distintos hongos, entre las cuales se encuentran: Tga3 de *Trichoderma atroviride* (96%), GanA de *Aspergillus clavatus* NRRL 1 (92%) y Fga1 de *Fusarium sporotrichioides* (88%). Este resultado fortalece la posibilidad de que la secuencia obtenida se trate de la subunidad alfa de una proteína G heterotrimérica de *A. chrysogenum*.

Conclusiones

- La expresión de la subunidad α Pga1 de *P. chrysogenum* constitutivamente activa (Pga1^{G42R}) en *A. chrysogenum* tuvo como consecuencia una disminución en la producción de conidios en cultivo sumergido de un 80-100%, y del crecimiento radial de las colonias en un 24-40%, en comparación con la cepa silvestre ATCC 11550.
- La expresión de Pga1^{G42R} en *A. chrysogenum* provocó una drástica disminución en la biosíntesis de cefalosporina C, inhibiendo totalmente la producción del antibiótico durante las primeras 96 h de cultivo.
- Por lo tanto, los niveles elevados de G_α-GTP ejercen una regulación negativa sobre la esporulación y la biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum*.
- La subunidad α Pga1 constitutivamente activa no tuvo efecto sobre el proceso de formación de artrosporas en *A. chrysogenum*.
- Se amplificó mediante PCR un fragmento de 1400 pb cuya secuencia parcial mostró un elevado grado de similitud (88-96%) con las secuencias de otras subunidades α pertenecientes al grupo I de los hongos filamentosos. Se puede confirmar, a falta de estudios posteriores, que la secuencia obtenida es la de la subunidad alfa de una proteína G heterotrimérica de *A. chrysogenum*.

Bibliografía

Adams, T.H., Wieser, J.K. y Yu, J.H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 35–54.

Adinarayana, K., Prabhakar, T., Srinivasulu, V., Anitha, V. y Jahansi-Lakshmi, P. (2003). Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum*. Proc. Biochem. 39(2): 171–177.

Bartoshevich, Y.E., Zaslavskaya, P.L., Novak, M.J. y Yudina, O.D. (1990). *Acremonium chrysogenum* differentiation and biosynthesis of cephalosporin. J. Basic Microbiol. 30: 313–320.

Bennett, J.W. y Lasure, L.L. (1992). More gene manipulation in fungi. Academic Press, NY, 363–370.

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.

Bölker, M. (1998). Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. Fungal Genet. Biol. 25: 143–156.

Borneman, A.R., Hynes, M.J. y Andrianopoulos, A. (2001). An STE12 homolog from the asexual, dimorphic fungus *Penicillium marneffe* complements the defect in sexual development of an *Aspergillus nidulans steA* mutant. Genetics 157: 1003–1014.

Brakhage, A.A. (1998). Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 547–585.

Brakhage, A.A. y Turner, G. (1995). Tomado de: Kück, U. (ed). The Mycota II. Genetics and biotechnology. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 263–270.

Brotzu, G. 1948. Recherche sudi un nuovo antibiotico. Lavori Dell'Instituto D'Igiene du Cagliari, 1-11.

Cai, M. y Davis, R.W. (1990). Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-loop protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. Cell 61: 437–446.

Caltrider, N.P. y Niss, H.F. (1966). Role of methionine in cephalosporin synthesis. Appl. Microbiol. 14: 746–753.

Calvo, A., Wilson, A., Woo-Bok, J. y Keller, N. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 447–459.

Cheres, H. y Surdin-Kerjan, Y. (1992). Genetic analysis of a new mutation conferring cysteine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: updating of the sulfur metabolism pathway. Genetics 130: 51–58.

Clapham, D.E. y Neer, E.J. (1997). G protein $\beta\gamma$ subunits. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37: 167.

Crabbe, M.J. (1988). The effect of thiols and the Ca^{2+} ionophore A23817 on growth and antibiotic production in *Cephalosporium acremonium*. FEMS Microbiol. Lett. 56: 71–78.

- Demain, A.L. (1983). Biosynthesis of β -lactam antibiotics. En: Antibiotics containing the β -lactam structure. A.L. Demain y N.A. Solomon, eds. Springer-Verlag, Berlin, pp. 189–228.
- Díez B., Álvarez, E., Cantoral, J.M., Barredo, J.L., Martín, J.F. (1987). Selection and characterization of *pyrG* mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase and complementation by the *pyr4* gene of *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* 12: 277–282.
- Díez B., Gutiérrez, S., Barredo, J., van Solingen, P., van der Voort, L. y Martín, J.F. (1990). The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteiny-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. *J. Biol. Chem.* 265(27): 16358–16365.
- Drocourt, 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 eukaryotes. *Nucl. Acid Res.* 18: 4009.
- Elander, R.P. (2003). Industrial production of β -lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 385–392.
- Esmahan, C. Alvarez, E., Montenegro, E. y 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: 1705–1710.
- Evers, M.E., Trip, H., van den Berg, M.A., Bovenberg, R.A. y Driessen, A.J. (2004). Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotics biosynthesis. *Adv Bioche Eng Biotechnol.* 88:111-135.
- Fernández, F.J. (1997). Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*penDE*) de la ruta biosintética de penicilina. Tesis Doctoral. Universidad de León, España.
- Fernández-Moreno, M.A., Caballero, J.L., Hopwood, D.A. y Malpartida, F. (1991). The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for transcriptional control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* 66: 769–780.
- Fernández Perrino, F.J. (1997). Caracterización de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*penDE*) de la ruta de penicilina. Tesis Doctorado en Biología. Universidad de León. España.
- Ford, C.E., Skiba, N.P., Hyunsu, B., Daaka, Y., Reuveny, E., Shekter, L.R., Rosal, R., Weng, G., Yang, Ch., Iyengar, R., Miller, J.R., Jan, L., Lefkowitz, R.J., y Hamm, H.E. (1998). Molecular basis for interactions of G protein $\beta\gamma$ subunits with effectors. *Science* 280: 1271–1274.
- Gams, W. (1971). *Moulds as Cephalosporium*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Gao, S. y Nuss, D.L. (1996). Distinct roles for two G protein α subunits in fungal virulence, morphology, and reproduction revealed by targeted gene disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14122–14127.
- García-Rico, R.O., Martín, J.F. y Fierro, F. (2007). The *pga1* gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development. *Research Microbiol.* 158: 437–446.

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

García-Rico, R.O., Fierro, F., Mauriz, E., Gómez, A., Fernández-Bodega, M.A., Martín, J.F. (2008b). The heterotrimeric G α protein pga1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology.* 154(Pt 11):3567-78.

Grishina, G. y Berlot, C.H. (1998). Mutations at the domain interface of G α impair receptor-mediated activation by altering receptor and guanine nucleotide binding. *J. Biol. Chem.* 273: 15053–15060.

Gutiérrez, S., Velasco, J., Fernández, F.J. y Martín, J.F. (1992). The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserin O-acetyltransferase. *J. Bacteriol.* 174: 3056–3064.

Gutiérrez, S. (1994). Caracterización de los genes *pcbAB* y *cefG* y análisis de las regiones del genoma de *A. chrysogenum* que contienen los genes *pcbC* y *cefEF* implicados en la biosíntesis de cefalosporina C. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de León. España.

Gutiérrez, S., Fierro, F., Casqueiro, J., Martín, J.F. (1999). Gene organization and plasticity of the β -lactam genes in different filamentous fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75:81-94.

Gygax, D., Döbeli, N., Nüesch, J. (1980). A revised chromosome map of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* 8: 85–92.

Hamm, H.E. (1998). The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 273: 669–672.

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In: DNA Cloning. A practical approach. Glover DM, ed. Irl. Press, Oxford. 109-135.

Harris, S.D. y Momany, M. (2004). Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet. Biol.* 41: 391–400.

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 α protein-dependent signaling pathway. *EMBO J.* 16: 4916–4923.

Hijarrubia, M.J., Aparicio, J.F., Casqueiro, J. y Martín, J.F. (2001). Characterization of the *lys2* gene of *Acremonium chrysogenum* encoding a functional α -amino adipate activating and reducing enzyme. *Mol. Gen. Genet.* 264: 755–762.

Hijarrubia M.J., Aparicio, J.F. y Martín, J.F. (2002). Nitrate regulation of alpha-amino adipate reductase formation and lysine inhibition of its activity in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59(2-3): 270–277.

Hoff, B., Schmitt, E.K. y Kück U. (2005). CPC1, but not its interacting transcription factor AcFKH1, controls fungal arthrospores formation in *Acremonium chrysogenum*. *Mol. Microbiol.* 56: 1220–1233.

Jain, S., Akiyama, K., Mae, K., Ohguchi, T. y Takata, R. (2002). Targeted disruption of a G protein α subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* 41: 407–413.

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

- Kosalková, K., Marcos, A.T. y Martín, J.F. (2001). A moderate amplification of the *mecB* gene encoding cystathionine- γ -lyase stimulates cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27: 252–258.
- Le Page, G.A. y Campbell, E. Preparation of streptomycin. *J Biol Chem.* 162:163-171.
- Liu, S. y Dean, R.A. (1997). G protein alpha subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 1075–1086.
- Liu, G., Casqueiro, J., Bañuelos, O., Cardoza, R.E., Gutiérrez, S. y Martín, J.F. (2001). Targeted inactivation of the *mecB* gene encoding cystathionine- γ -lyase shows that the transsulfuration pathway is required for high level cephalosporin biosynthesis in *Acremonium*. *J. Bacteriol.* 183: 1765–1772.
- Luengo, J.M., Revilla, G., López-Nieto, M.J., Villanueva, J.R. y Martín, J.F. (1980). Inhibition and repression of homocitrate synthase by lysine in *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* 144: 869–876.
- Marchuk, D., Drumm, M., Sauling, A. y Collins, F. (1991). Construction of T vector, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nuc. Acid. Res.* 19 (5): 1154.
- Marcos, A.T., Kosalková, K., Cardoza, R.E., Fierro, F., Gutierrez, S., Martín, J.F. (2001). Characterization of the reverse transsulfuration gene *mecB* of *Acremonium chrysogenum*, which encodes a functional cystathionine- γ -lyase. *Mol Gen Genet* 264:746.
- Martín, J.F. (1991). Biochemistry and molecular genetics of penicillin production in *Penicillium chrysogenum*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 646:193.
- Martín, J.F. y Aharonowitz, Y. (1983). En: Demain, A.L., Solomon, N.A. (eds). Antibiotics containing the beta-lactam structure, vol 1. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 229.
- Martín, J.F. y Gutiérrez, S. (1995). Genes for beta-lactams biosynthesis. *Antonie van Leeuwenhoek.* 67:181-200.
- Martín, J.F. y Demain, A.L. (2002). Unraveling the methionine–cephalosporin puzzle in *Acremonium chrysogenum*. *Trends Biotech.* 20: 502–507.
- Mathison, L., Soliday, C., Stepan, T., Aldrich, T. y Rambosek, J. (1993). Cloning, characterization, and use in strain improvement of the *Cephalosporium acremonium* gene *cefG* encoding acetyl transferase. *Curr. Genet.* 23(1): 33–41.
- Matsuda, A., Sugiura, H., Matsuyama, K., Matsumoto, H., Ichikawa, S. y Komatsu, K. (1992). Cloning and disruption of the *cefG* gene encoding acetyl coenzyme A: deacetylcephalosporin C o-acetyltransferase from *Acremonium chrysogenum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186(1): 40–46.
- Mehta, R.J., Specth, J.L. y Nash, C.H. (1979). Lysine stimulation of cephalosporin C synthesis in *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8(3): 177–182.
- Menne, S., Walz, M. y Kück, U. (1994). Expression studies with the bidirectional *pcbAB-pcbC* promoter region from *Acremonium chrysogenum* using reporter gene fusions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 57-66.
- Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York., pp. 352–355.

- Minuth, W., Tudzynski, P. y Esser, K. (1982). Extrachromosomal genetics of *Cephalosporium acremonium*. *Curr. Genet.* 5: 227–231.
- Nash, C.H. y Huber, F.M. (1971). Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Microbiol.* 22: 6–10.
- Neer, E.J. (1994). G proteins: Critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci.* 3: 3–14
- Neves, S.R., Ram, P.T. e Iyengar R. (2002). G protein pathways. *Science.* 296: 1636–1639.
- Nishida, H. y Nishiyama, M. (2000). Disruption analysis of *DR1420* and/or *DR1758* in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Mol. Evol* 51: 2911–2914.
- Peñalva, M.A., Moya, A., Dopazo, J., Ramón, D. (1990). Sequences of Isopenicillin N synthetase genes suggest horizontal gene transfer from prokaryotes to eukaryotes. *Proc R Soc Lond B Biol.* 241:164-169.
- Polman, J.K. y Larkin, J.M. (1989). Purification of DNA from agarose gels. *Biotechnol. Techn.* 3: 329–332.
- Queener, S.W. y Ellis, L.F. (1975). Differentiation of mutants of *Cephalosporium acremonium* in complex medium: the formation of unicellular arthrospores and their germination. *Can. J. Microbiol.* 21: 1981–1996.
- Queener, S.W., Ingolia, T.D., Skatrud, P.L., Chapman, J.L. y Kaster, K.R. (1985). A system for genetic transformation of *Cephalosporium acremonium*. *En: Microbiology ()*. L. Lieve, ed. American Society for Microbiology, pp. 468–472.
- Reithner, B., Brunner, A., Schuhmaher, R., Peissel, L., Seidl, V., Krska, R. Y Zeilinger, S. 2005. The G protein α subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet. Biol.* 42: 749-760.
- Rens-Domiano, S., Hamm, H.E. (1995). Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J.* 9(11):1059-66.
- Rocha-Ramírez, V., Omero, C., Chet, I., Horwitz, B.E. y Herrera-Estrella, A. (2002). *Trichoderma atroviride* G-protein α -subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot. Cell.* 1: 594–605.
- Sambrook, J. y Russell, D. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual.* 3rd ed. Cold Spring Harbor Press, Nueva York.
- Samson, S.M., Blankenship, D.T., Chapman, J.L., Perry, D., Skatrud, P.L., van Frank, R.M., Abraham, E.P., Baldwin, J.E., Queener, S.W. e Ingolia, T.D. (1985). Isolation, sequence determination and expression in *Escherichia coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium*. *Nature* 318: 191–194.
- Samson, S.M., Dotzlaw, J.E., Slisz, M.L., Becker, G.W., van Frank, R.M., Veal, L.E., Yeh, W.K., Miller, J.R., Queener, S.W. e Ingolia, T.D. (1987). Cloning and expression of the fungal expandase/hydroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis. *Biotechnol.* 5: 1207–1214.
- Schmitt, E., y Kück. (2000). The fungal CPC1 protein, which binds specifically to β -lactam biosynthesis genes is related to human RFX transcription factors. *J. Biol. Chem.* 275: 9348–9357.

- Schmitt, E., 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. Genom.* 265: 508–518.
- Schmitt, E., Birgit, H. y Kück, U. (2004a). Regulation of cephalosporin biosynthesis. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 88: 1–43.
- Schmitt, E., Hoff, B., y Kück, U. (2004b). AcFKH1, a novel member of the forkhead family, associates with the RFX transcription factor CPCR1 in the cephalosporin C-producing fungus *Acremonium chrysogenum*. *Gene.* 342: 269–281.
- Schmitt EK, 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.
- Schmitz, W., Albers, C., Fingerhut, R. y Conzelmann, E. (1995). Purification and characterization of an α -methylacyl-CoA racemase from human liver. *Eur. J. Biochem.* 231: 815–822.
- Schmitz, W., Helander, H.M., Hiltunen, J.K. y Conzelmann, E. (1997). Molecular cloning of cDNA species for rat and mouse liver α -methylacyl-CoA racemases. *Biochem. J.* 326: 883-889.
- Shieh, W.R. y Chen, C.S. (1993). Purification and characterization of novel "2-arylpropionyl-CoA epimerases" from rat liver cytosol and mitochondria. *J. Biol. Chem.* 268: 3487-3493.
- Shimizu, K. y Keller, N.P. (2001). Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 157: 591-600.
- Sim, T.S. y Loke, P. (2000). Molecular studies of Isopenicillin N synthases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 54:1-8.
- Segers, G.C. y Nuss, D.L. (2003). Constitutively activated G α negatively regulates virulence, reproduction and hydrophobin gene expression in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet. Biol.* 38: 198-208.
- Solomon, P.S., Waters, O.D.C., Simmonds, J., Cooper, R.M. y Oliver, R.P. (2005). The Mak2 MAP kinase signal transduction pathway is required for pathogenicity in *Stagonospora nodorum*. *Curr. Genet.* 48: 60–68.
- Smith, A.W., Ramsden, M., Dobson, M.J., Harford, S., y Peberdy, J.F. (1990). Regulation of isopenicillin N synthetase (IPNS) gene expression in *Acremonium chrysogenum*. *BioTechnol.* 8(3): 237–240.
- Specht, 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.
- Swartz, M.N. (2007). Use of antimicrobial agents and drug resistance. *NEJM.* 337: 491-493.
- Tag, A., Hicks, J., Garifullina, G., Ake, C., Phillips, TD., Beremand, M. y Keller, N. (2000). G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Mol. Microbiol.* 38: 658–665.
- Teijeira, F., Ullán, R.V., Guerra, S., García-Estrada, C., Vaca, I., Martín, J.F. (2008). The transporter CefM involved in translocation of biosynthetic intermediates is Essential for cephalosporin production. *Biochem J.* En prensa.

- Thomas, D., Cherest, H. y Surdin-Kerja, Y. (1989). Elements involved in S-adenosylmethionine-mediated regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* MET25 gene. *Mol. Cell. Biol.* 9: 3292–3298.
- Ullán, R.V., Casqueiro, J., Bañuelos, O., Fernández, F.J., Gutiérrez, S. y Martín, J.F. (2002a). A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in *Acremonium chrysogenum*. *J. Biol. Chem.* 277: 46216–46225.
- Ullán, R.V., Liu, G., Casqueiro, J., Gutiérrez, S., Bañuelos, O., Martín, J.F. (2002b). The *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a putative multidrug efflux pump proteína that significantly increases cephalosporin C production. *Mol Genet Genocs.* 267:673-683.
- Ullán, R.V., Teijeira, F., Martín, J.F. (2008). Expression of the *Acremonium chrysogenum cefT* gene in *Penicillium chrysogenum* indicates that it encodes an hydrophilic beta-lactam transporter. *Curr Genet.* 54(3):153-161.
- van de Kamp, M., Driessen, A.J. y Koning, W.N. (1999). Compartmentalization and transport in β -lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75: 41–78.
- Velasco, J., Gutierrez, S., Fernandez, F.J., Marcos, A.T., Arenós, C. y Martín, J.F. (1994). Exogenous methionine increases levels of mRNAs transcribed from *pcbAB*, *pcbC*, and *cefEF* genes, encoding enzymes of the cephalosporin biosynthetic pathway, in *Acremonium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* 176(4): 985–991.
- Velasco, J., Gutiérrez, S., Casqueiro, J., Fierro, F., Campoy, S. y Martín, J.F. (2001). Cloning and characterization of the gene *cahB* encoding a cephalosporin C acetylhydrolase from *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57(3): 350–356.
- Wess, J. (1998). Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther.* 80(3):231-64.
- Yang, Q. y Borkovich, K.A. 1999. Mutational activation of a $G\alpha_i$ causes uncontrolled proliferation of aerial hyphae and increased sensitivity to heat and oxidative stress in *Neurospora crassa*. *Genetics* 151: 107–117.
- Yu, J.H., Butchko, R.A., Fernandes, M., Keller, N.P., Leonard, T.J. y Adams, T.H. (1996) Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *affR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Curr. Genet* 29: 549–555.
- Zhang, J.Y., Banko, G., Wolfe, S., Demain, A.L., (1987). Methionine induction of ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2:251-255.
- Zhang, J. y Demain, A.L. (1992). Regulation of ACV synthetase activity in the beta-lactam biosynthetic pathway by carbon sources and their metabolites. *Arch. Microbiol.* 158: 364–369.
- Zhou, M.Y., Clark, S.E. y Gómez-Sánchez, C.E. (1995). Universal cloning method by TA strategy. *Biotechniques* 19: 34–35.
- Zuber, S., Hynes, M.J. y Andrianopoulos, A. (2002). G-protein signalling mediates asexual development at 25 degrees C but has no effect on yeast-like growth at 37 degrees C in the dimorphic fungus *Penicillium marneffeii*. *Eukaryot. Cell* 1: 440–447.

Anexo

ENSAYO GENERAL DE ACTIVIDAD DE CEFALOSPORINA C

Condiciones generales para el bioensayo

Medio de cultivo	TSA 1%
Microorganismo de prueba	<i>Escherichia coli</i> ESS 22-31
OD _{600nm}	1
Concentración de inóculo en el cultivo	1 mL/15 mL de medio
Medio inoculado a verter en placa	220 mL + inóculo
Concentración de estándares	2.5, 5, 10, 15, 25 µg/mL
Diámetro de las perforaciones en el agar	8 mm
Volumen inóculo de estándar o muestra por perforación	60 µL

Técnica

Pesar exactamente una cantidad de estándar equivalente a 100 mg de cefalosporina C, sal de zinc (base seca). Colocar en matraz volumétrico de 100 mL, y llevar hasta ese volumen disolviendo en EDTA 0.01 M.

De la solución anterior tomar una alícuota de 25 mL, colocarla en matraz volumétrico de 50 mL y llevar hasta el volumen con agua destilada. Esta solución stock tiene una concentración de 500 microgramos de cefalosporina C, sal de zinc/mL.

Curva de calibración

De la solución stock tomar una alícuota de 5 mL, colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar hasta el volumen con agua destilada (concentración final: 25 microgramos/mL).

Tomar una alícuota de 3 mL de la solución stock, colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar hasta el volumen con agua destilada (concentración final: 15 microgramos/mL).

De la solución stock tomar una alícuota de 1 mL, colocarla en un matraz volumétrico de 50 mL y llevar hasta el volumen con agua destilada (concentración final: 10 microgramos/mL).

Tomar una alícuota de 1 mL de la solución stock, colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar hasta el volumen con agua destilada (concentración final: 5 microgramos/mL).

De la solución stock tomar una alícuota de 0.5 mL, colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar hasta el volumen con agua destilada (concentración final: 2.5 microgramos/mL).

Una vez cargadas las placas de bioensayo, se almacenan a 4°C durante al menos una hora, tiempo en el que el antibiótico difundirá a través del medio. Después las placas de bioensayo se incubarán durante 12-15 horas a 37°C. El antibiótico presente en el medio inhibirá el crecimiento del microorganismo inoculado, dando lugar a halos de inhibición de crecimiento, que normalmente se encuentran entre los 15 y 28 mm.

Cálculos

Los controles con diferentes concentraciones de cefalosporina C sal de zinc permitirán realizar una recta patrón que relaciona 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 recta de los diámetros de los halos de inhibición de las muestras problema permitirá determinar la concentración de antibiótico en los caldos de fermentación.