

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“PAPEL DE LOS GENES *srrA* Y *msnA* EN LA BIOSÍNTESIS
DE LOVASTATINA POR *Aspergillus terreus*”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

I.B.I. María Esmeralda Bibián León

COMITÉ TUTORIAL

Director de tesis:

Dr. Javier Barrios González

Asesores:

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Dr. Armando Mejía Álvarez

- México, D.F. 2015 -

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios que pertenece al Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

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

Se contó con el Apoyo de CONACyT, con el otorgamiento de la Beca para Estudios de Posgrado No. 300611.

México, D.F., a 16 de julio de 2015.

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

“PAPEL DE LOS GENES *srrA* Y *msnA* EN LA BIOSÍNTESIS DE LOVASTATINA POR *Aspergillus terreus*”

que presentó:

I.B.I. María Esmeralda Bibián León

Comité Tutorial:

Director: Dr. Javier Barrios González

Asesor: Dr. Armando Mejía Álvarez

Asesor: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Jurado:

Presidente: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Secretario: Dr. Armando Mejía Álvarez

Vocal: Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos

Vocal: Dra. Roxana Uri Miranda Labra



Este trabajo está dedicado con todo mi cariño a:

Fernando Méndez:

Por estos seis años que has pasado a mi lado siempre apoyándome en mi desarrollo profesional, porque aunque siempre fueron duras tus palabras me hicieron crecer y ver la vida diferente, sin tus consejos nada de esto sería igual. Gracias.

A mi madre Socorro:

Gracias por siempre creer en mí, por todo el esfuerzo que hiciste por verme llegar tan lejos, por sacrificarte para que lograra mis metas. Quiero decirte que sin tu apoyo jamás hubiera llegado a este punto de mi desarrollo profesional.

A mis hermanos Patricia, Juan Carlos, Verónica y Miriam:

Les agradezco mucho su apoyo, siempre tuvieron palabras de aliento y sobre todo por el cariño que me brindaron.

Un agradecimiento muy especial:

Al **Dr. Javier Barrios**, por haberme aceptado como alumna y por su invaluable paciencia. Cuando más oscuro se veía el mundo él siempre tuvo las palabras correctas para que viera la realidad. Le agradezco mucho todas sus enseñanzas.

Al **Dr. Luis Enrique Gómez** y al **Dr. Armando Mejía** por su invaluable apoyo en mi trabajo experimental.

A la **Dra. Roxana Miranda**, por sus consejos y porque con ella conocí por primera vez el mundo de la lovastatina que tanto me ha gustado.

A **Ailed Pérez**, mi amiga, que por ella llegué al laboratorio. Gracias por tus consejos y tu ayuda, siempre has estado ahí para ayudarme y enseñarme. Gracias por tu apoyo para realizar esta tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio **David, Alma, Marisol, Vanessa, Ulises, Hypatia, Teresa, Wylma, Eduardo, Kenia, Omar y Moisés**. Gracias por esos gratos momentos y el apoyo que me brindaron.

Un agradecimiento especial a **CONACyT** por haberme brindado una beca sin cual este trabajo no hubiera sido posible.

Y como olvidarme de ti, **Dios**, que siempre has estado me has dirigido y cuidado en cada etapa de mi vida. Gracias.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	9
INDICE DE TABLAS	11
ABREVIATURAS	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN	18
2. ANTECEDENTES	21
2.1 Metabolitos secundarios	21
2.1.1 Rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios	21
2.2 Lovastatina: fármaco de importancia industrial	22
2.2.1 Biosíntesis.....	23
2.2.1 Producción.....	25
2.3. Estrés oxidante.....	25
2.4. Respuesta celular al estrés oxidante	27
2.4.1 Protección cruzada.....	27
2.5 Rutas de señalización en respuesta a estrés	28
2.6 Metabolismo secundario y estrés oxidante	29
2.6.1 Modelo en aflatoxinas	29
2.6.2 EROs regulan la biosíntesis de lovastatina.....	31
2.7 SrrA	32
2.7.1 Generalidades	32
2.7.2 Ruta de activación de Skn7	33
2.8 MsnA	34
2.8.1 Msn2/4 en Levadura	34
2.8.2 Msn2/4 en Hongos.....	36
2.8.3 Participación de MsnA en respuesta al estrés.....	37
3. JUSTIFICACIÓN	38
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	41
5.1 Objetivo General.....	41
5.2 Objetivos Particulares.....	41

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
6.1 Equipos	42
6.2 Microorganismos	42
6.2.1 <i>E. coli</i> DH5 α	42
6.2.2 <i>Aspergillus terreus</i> TUBF-514	42
6.3 Vectores empleados	43
6.3.1 pJET 1.2/Blunt.....	43
6.3.2 Vector de silenciamento: pGdpki- <i>RNAi</i>	43
6.4 Medios de cultivo	44
6.4.1 Medios para <i>E. coli</i>	44
6.4.2 Medios para <i>Aspergillus terreus</i>	44
6.5 Antibióticos	47
6.5.1 Ampicilina	47
6.5.2 Fleomicina	47
6.6 Condiciones de cultivo	47
6.6.1 Crecimiento Radial	47
6.6.2 Esporulación para las <i>SimsnA</i>	47
6.6.3 Esporulación para las <i>SisrrA</i>	47
6.6.4 Análisis de sensibilidad a peróxido de hidrógeno	47
6.6.5 Análisis de sensibilidad a estrés de pared.....	48
6.6.6 Fermentación sólida y líquida.....	48
6.7 Técnicas analíticas.....	48
6.7.1 Extracción de lovastatina.....	48
6.7.2 Cuantificación de lovastatina.....	49
6.7.3 Determinación de Biomasa y Humedad	49
6.7.4 pH	50
6.8 Técnicas Moleculares	50
6.8.1 Extracción de ADN genómico de <i>A. terreus</i>	50
6.8.2 Células ultracompetentes de <i>E. coli</i>	51
6.8.3 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	51
6.8.4 Diseño de primers	53
6.8.5 PCR para obtención de fragmentos de los genes <i>srrA</i> y <i>msnA</i>	53

6.8.6 PCR para confirmación de construcción de silenciamiento en el genoma de las transformantes	55
6.8.7 Purificación de sondas por corte de banda	56
6.8.8 Clonación de los fragmentos	56
6.8.9 PCR de colonia	56
6.8.10 Digestiones con <i>NcoI</i>	57
6.8.11 Construcción de los vectores de silenciamiento	57
6.8.12 Obtención de transformantes silenciadas	59
6.8.13 Aislamiento de transformantes	61
7. RESULTADOS	63
7.1 Identificación de los genes <i>in silico</i>	63
7.2 Amplificación de fragmentos de los genes.....	63
7.2.1 Gradiente de temperatura.....	63
7.2.2 Secuenciación	64
7.3 Clonación de los fragmentos	65
7.3.1 Amplificación y Purificación.....	65
7.3.2 Clonación de los fragmentos	65
7.3.3 Secuenciación de los fragmentos clonados	66
7.4 Construcción de los vectores de silenciamiento.....	67
7.4.1 Purificación de fragmentos con corte <i>NcoI</i>	67
7.4.2 Construcción de pGdpki- <i>srrA</i> y pGdpki- <i>msnA</i>	67
7.4.3 Purificación de pGdpki- <i>srrA</i> y pGdpki- <i>msnA</i> a gran escala.....	68
7.4.4 Secuenciación de las construcciones de silenciamiento	69
7.5 Transformación de <i>Aspergillus terreus</i>	69
7.6 Caracterización de las transformantes	70
7.6.1 Crecimiento radial	70
7.6.2 Esporulación	74
7.6.3 Sensibilidad de micelio a Peróxido de Hidrógeno.....	76
7.6.4 Sensibilidad a Estrés de Pared	77
7.6.5 Producción de lovastatina en Fermentación Sólida y Líquida	78
7.7 Confirmación de integración de las construcciones en el genoma de las transformantes	79
7.7.1 Amplificación del fragmento de la secuencia <i>Ble</i> : Fleomicina	80

7.7.2 Amplificación de un fragmento del promotor <i>pKi</i>	81
8. DISCUSIÓN	82
8.1 Caracterización de las <i>SisrrA</i>	84
8.1.1 Estrés Oxidante.....	84
8.1.2 Estrés de Pared	85
8.1.3 Crecimiento y Esporulación	85
8.1.4 Producción de lovastatina.....	86
8.2 Caracterización de las <i>SimsnA</i>	87
8.2.1 Estrés oxidante.....	87
8.2.2 Crecimiento	87
8.2.3 Esporulación	88
8.2.3 Producción de lovastatina.....	88
9. CONCLUSIONES.....	89
10. PERSPECTIVAS	90
11. REFERENCIAS	91

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta biosintética de lovastatina.....	24
Figura 2. Clúster biosintético de la lovastatina.....	24
Figura 3. a) Generación de las EROs. b) Origen y daño de las EROs.....	26
Figura 4. Rutas de señalización en la activación al estrés en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> y <i>Aspergillus nidulans</i>	28
Figura 5. Modelo para la activación transcripcional de genes antioxidantes y biosíntesis de aflatoxinas por factores transcripcionales relacionados al estrés oxidante.....	30
Figura 6. Esquema de la rama Sln1 que forma parte de la vía HOG en <i>S. cerevisiae</i>	34
Figura 7. Regulación de Msn2/4 y Hsf1 en <i>S. cerevisiae</i>	36
Figura 8. Mapa del vector pJET ThermoScientific™.....	43
Figura 9. Mapa del vector pGdpki-RNAi.....	44
Figura 10. Secuencia para el aislamiento de las transformantes.....	62
Figura 11. Gel de agarosa al 1.2% que muestra el resultado del gradiente de temperatura para determinar la Tm óptima.....	64
Fig. 12. Gel de agarosa al 1.2% que muestra el resultado de la PCR a 58°C.....	64
Figura 13. Gel de agarosa al 1.2% que muestra el resultado de la PCR con <i>Pfu</i> DNA Polimerasa, de aquí se cortó las bandas correspondientes a cada gen para su purificación.....	65
Figura 14. Gel de agarosa al 1.2% que muestra el resultado de la PCR de colonia.....	66
Figura 15. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la digestión del ADNp obtenido por minipreps.....	66
Figura 16. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de los fragmentos purificados con corte <i>NcoI</i>	67
Figura 17. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la digestión con <i>NcoI</i> del ADNp obtenido por minipreps de 9 colonias de cada gen.....	68
Figura 18. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la digestión con <i>NcoI</i> de las construcciones purificadas obtenidas de la colonia 2 para pGdpki- <i>srrA</i> y la colonia 2 para pGdpki- <i>msnA</i>	68
Figura 19. Fenotipo de las transformantes <i>SisrrA</i> en medio Power después del segundo pase por fleomicina.....	70

Figura 20. Fenotipo de las transformantes <i>SisrrA</i> en placas con medio PDA durante 5 días.....	71
Figura 21. Fenotipo de las transformantes <i>SisrrA</i> en placas con medio Power durante 5 días (la última fila corresponde a las cajas petri vistas por detrás).....	72
Figura 22. Comparación del fenotipo de la transformante <i>SisrrA</i> T2 con la parental al cuarto día de crecimiento en placas de medio Power (cajas petri vistas por detrás).....	72
Figura 23. Fenotipo de las transformantes <i>SimsnA</i> en placas con medio Power.....	73
Figura 24. Fenotipo de las transformantes <i>SimsnA</i> en placas con medio PDA.....	74
Figura 25. Cultivos esporulados de las <i>SisrrA</i> al cuarto día (vista por detrás), antes del conteo de esporas.....	75
Figura 26. Placas esporuladas con las <i>SimsnA</i> al cuarto día, antes del conteo de esporas.....	75
Figura 27. Análisis de sensibilidad de micelio a peróxido de hidrógeno de las <i>SisrrA</i> a las 48 h.....	76
Figura 28. Análisis de sensibilidad de micelio a peróxido de hidrógeno de las <i>SimsnA</i> a las 48 h.....	77
Figura 29. Análisis de sensibilidad a estrés de pared para las <i>SisrrA</i>	77
Figura 30. Producción de Lovastatina en FL (a) y FS (b) de las <i>SisrrA</i> a las 144 horas...78	
Figura 31. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la PCR con los primers de fleomicina con el ADN genómico de las <i>SisrrA</i>	80
Figura 32. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la PCR con los primers de fleomicina con el ADN genómico de las <i>SimsnA</i>	80
Figura 33. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la PCR con los primers de <i>pki</i> con el ADN genómico de las <i>SisrrA</i>	81
Figura 34. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la PCR con los primers de <i>pki</i> con el ADN genómico de las <i>SimsnA</i>	81

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la reacción de PCR con <i>Taq</i> Polimerasa.....	54
Tabla 2. Condiciones PCR <i>srrA</i> y <i>msnA</i> con <i>Taq</i> Polimerasa.....	54
Tabla 3. Preparación PCR para obtener sondas de <i>srrA</i> y <i>msnA</i> con <i>Pfu</i> Polimerasa.....	54
Tabla 4. Condiciones PCR <i>srrA</i> y <i>msnA</i> con <i>Pfu</i> Polimersa.....	54
Tabla 5. Componentes de la reacción de PCR para prueba de inserción con <i>Taq</i> Polimerasa.....	55
Tabla 6. Condiciones PCR para el juego de primers <i>ble</i>	55
Tabla 7. Condiciones PCR para el juego de primers <i>pki</i>	55
Tabla 8. Composición de la reacción de ligación al vector de clonación, para <i>srrA</i> y <i>msnA</i>	56
Tabla 9. Composición de la reacción de PCR de colonia.....	56
Tabla 10. Condiciones de reacción para el PCR de colonia.....	57
Tabla 11. Composición de la reacción de digestión con <i>NcoI</i>	57
Tabla 12. Composición de la reacción de desfosforilación.....	57
Tabla 13. Composición de la reacción de ligación.....	58
Tabla 14. Controles positivos y negativos para la transformación de las células de <i>E. coli</i> con las construcciones de silenciamiento.....	58
Tabla 15. Resumen de resultados obtenidos del Blastp realizado en el genoma de <i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 con los homólogos de los genes <i>srrA</i> y <i>msnA</i>	63
Tabla 16. Primers diseñados para amplificar un fragmento de los genes. Para el gen <i>srrA</i> se diseñaron dos juegos de primers.....	63
Tabla 17. Análisis tipo Blast de cada una de las secuencias obtenidas.....	65
Tabla 18. Análisis tipo Blast de cada una de las secuencias obtenidas.....	67
Tabla 19. Concentración y pureza que alcanzaron las construcciones por su purificación con el kit Qiagen®.....	69
Tabla 20. Análisis tipo Blast de cada una de las secuencias obtenidas.....	69
Tabla 21. Transformantes obtenidas y la concentración de fleomicina a la cual crecieron.....	69
Tabla 22. Velocidad promedio linear de crecimiento de las <i>SsrrA</i> en medio Power y PDA.....	70

Tabla 23. Velocidad promedio linear de crecimiento de las <i>SimsnA</i> en medio Power y PDA.....	73
Tabla 24. Índice de esporulación (esporas/cm ²) de las <i>SisrrA</i> a las 96 horas.....	74
Tabla 25. Índice de esporulación (esporas/cm ²) de las <i>SimsnA</i> a las 96 horas.....	75
Tabla 26. Valores de pH y biomasa en FS y FL a las 144 horas para las <i>SisrrA</i>	78
Tabla 27. Fermentación sólida (FS) de las <i>SimsnA</i> a las 144 horas.....	79
Tabla 28. Fermentación líquida (FL) de las <i>SimsnA</i> a las 144 horas.....	79

ABREVIATURAS

EOX Estrés oxidante

EROs Especies Reactivas del Oxígeno

FL Fermentación líquida

FS Fermentación sólida

SisrrA Transformantes con el gen *srrA* atenuado

SimsnA Transformantes con el gen *msnA* atenuado

RESUMEN

La lovastatina es un fármaco de gran importancia industrial por reducir los niveles de colesterol en sangre, además en los últimos años se le han encontrado funciones terapéuticas potenciales como el cáncer. Su producción convencional se lleva a cabo en FL, sin embargo, en los últimos años se ha despertado un gran interés en la producción en FS por su elevada producción, entre otras ventajas, con respecto a medio líquido. En esta fisiología del medio sólido existen ciertos estímulos ambientales que anuncian al hongo que se encuentra en medio sólido. Estos estímulos deben ser detectados y entonces transducidos, disparando un número de eventos a nivel molecular. La acumulación de EROs también es diferente en FS y FL, este estado oxidante que precede a la biosíntesis de metabolitos secundarios, como la lovastatina, es necesario y recientemente se demostró que las EROs están regulando la biosíntesis de lovastatina a nivel transcripcional. Además hay evidencia de que factores de transcripción en respuesta a estrés oxidante, como *SrrA* y *MsnA*, pudieran estar regulando la biosíntesis de lovastatina en respuesta a las EROs.

Por lo que este trabajo se enfocó en el estudio de los genes *srrA* y *msnA* como posibles reguladores de la biosíntesis de lovastatina. La función de los genes se evaluó mediante silenciamiento, estrategia que se basa en la atenuación de los genes a través del RNA de interferencia que desencadena una maquinaria propia de la célula, y de esta forma, se evalúan los cambios como posibles funciones del gen.

Se realizaron construcciones de silenciamiento con los genes *srrA* y *msnA*, por separado. Se obtuvieron transformantes con el gen atenuado *srrA* (*SisrrA*) y *msnA* (*SimsnA*). Se evaluaron los efectos en cuanto a crecimiento radial, esporulación, estrés oxidante, estrés de pared (sólo para las *SisrrA*) y producción de lovastatina.

El fenotipo de las *SimsnA* presentaron ligera resistencia al estrés oxidante (4/7 transformantes), en cuanto a la velocidad lineal de crecimiento sólo una presentó ligera deficiencia. Hubo una disminución en el índice de esporulación de alrededor del 70% (3/7) y en cuanto a producción de lovastatina, no se encontró un efecto contundente.

Las *SisrrA* no presentaron efecto en sensibilidad a estrés oxidante ni resistencia a estrés de pared. Una de las transformantes (T2) tuvo un índice de esporulación menor. En cuanto a crecimiento radial, en medio PDA hubo una disminución en la velocidad de crecimiento, y en medio Power un aumento; además el fenotipo de una de las transformantes (T2) produjo

más pigmentos (metabolitos secundarios) en medio Power, el cual tomó una coloración roja. Y como era de esperarse, en cuanto a producción de lovastatina se presentó un fuerte aumento en FS (de hasta 180%) pero una disminución abrupta en FL (de hasta el 90%).

En este trabajo se ha logrado demostrar que el gen *msnA* existe en *Aspergillus terreus* además de que SrrA sí participa en la regulación de la biosíntesis de lovastatina, y lo más importante, forma parte de la fisiología del medio sólido, sin embargo, su mecanismo y función precisa aun se desconocen.

ABSTRACT

Lovastatin is a drug of great industrial importance for reducing blood cholesterol levels, also in recent years is found as potential cancer therapeutic functions. Its conventional production takes place in SmF, however, in recent years has aroused great interest in the production SSF by high production, among other advantages over liquid medium. This solid medium physiology there are certain environmental stimuli that are noted to fungus found on solid medium. These stimuli must be detected and then transduced, firing a number of events at the molecular level. ROS accumulation is also different in SSF and SmF, this oxidative stress preceding the biosynthesis of secondary metabolites, such as lovastatin, is necessary and recently demonstrated that ROS are regulating the biosynthesis of lovastatin at the transcriptional level. Furthermore there is evidence that transcription factors in response to oxidative stress (as *SrrA* and *MsnA*) could be regulating the biosynthesis of lovastatin in response to the ROS.

So this work focused on the study of the *SrrA* and *MsnA* genes as potential regulators of the biosynthesis of lovastatin. The function of genes silencing was assessed using a strategy that is based on the attenuation of genes via RNAi machinery itself which triggers a cell, and thus evaluate changes possible functions of the gene.

Silencing constructs the *SrrA* and *MsnA* genes, were performed separately. Transformants were obtained with attenuated gene *srrA* (*SisrrA*) and *msnA* (*SimsnA*). Regarding the effects radial growth, sporulation, oxidative stress, wall stress (only for *SisrrA*) and lovastatin production were evaluated.

SimsnA phenotype showed slight resistance to oxidative stress (4/7 transformants), as for the linear growth rate showed only slight deficiency. There was a decrease in the rate of sporulation of about 70% (3/7) and lovastatin terms of production, not a strong effect was found.

The *SisrrA* showed no effect on oxidative or wall stress, only had a lower rate of sporulation, but as for radial growth on PDA medium there was a decrease in the growth rate, and in the midst Power increased, but the phenotype more interesting was that one of the transformants produced more pigments (secondary metabolites) means the Power,

which took a dark red color. And as expected, in production of lovastatin was presented a sharp increase in SSF (up 180 %) but an abrupt decrease in SmF (up to 90%).

In this work it has successfully demonstrated that the gene *msnA* exists in *Aspergillus terreus*, however, its function is still unknown. It has also been shown that SrrA does participate in regulating the biosynthesis of lovastatin, and most importantly, physiology part of the solid medium, however, still unknown mechanism.

INTRODUCCIÓN

La hipercolesterolemia, es la acumulación del colesterol en el plasma sanguíneo que causa la aterosclerosis (bloqueo de arteria), conduciendo a enfermedades coronarias y ataques al corazón, que son la principal causa de muerte en México (Valera *et al.*, 2005).

De todo el colesterol contenido en el cuerpo, una tercera parte proviene de la dieta, y cerca de las dos terceras partes es sintetizado por el cuerpo (Alberts *et al.*, 1980; Furberg 1999). Debido a esto, la inhibición de la biosíntesis del colesterol, es una estrategia importante para reducir los niveles de colesterol en sangre (Barrios-González & Miranda Labra, 2010; Manzoni & Rollini, 2002).

Las estatinas son un grupo de fármacos que disminuyen los niveles de colesterol; particularmente las lipoproteínas de baja densidad o colesterol de baja densidad (conocido popularmente como el colesterol malo); con un ligero aumento de las lipoproteínas de alta densidad (colesterol bueno), por consiguiente, previenen la acumulación de la placa de colesterol dentro de las arterias (Alberts *et al.*, 1980; Manzoni *et al.*, 1998).

De todas las estatinas, la lovastatina, fue el primer medicamento hipocolesterolémico en ser aprobado por la FDA de EU, y en años recientes, se le ha encontrado uso como agente potencial terapéutico para el tratamiento de varios tipos de tumores (Barrios-González & Miranda Labra, 2010; Valera *et al.*, 2005).

La lovastatina es un inhibidor competitivo de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, que es la enzima clave en la regulación de biosíntesis de colesterol en humanos y animales (Hajjaj *et al.*, 2001). Se ha encontrado que un número de organismos tales como *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber* y ciertas especies de *Penicillium* y *Trichoderma*, producen Lovastatina como metabolito secundario (Valera *et al.*, 2005).

La producción convencional de lovastatina se ha llevado a cabo mediante FL. Sin embargo, en años recientes, los investigadores han mostrado un creciente interés por la FS, como una alternativa potencial a la FL, dado que se pueden utilizar sustratos económicos (como residuos agrícolas), se requiere poco procesamiento y las etapas de transmisión continua, utiliza menos potencia y genera menos efluentes. Además, la FS tiene una alta productividad y ofrece mejor estabilidad de producto (Rollini 2002).

Baños y col. (2005) diseñaron un proceso de producción de lovastatina por Fermentación Sólida (FS) sobre un soporte inerte artificial donde se obtuvo 19.95 mg/g en 7 días. Estos estudios fueron desarrollados con *A. terreus* TUB F-514, una cepa silvestre aislada de muestras de suelo de Irak (Szakács *et al.*, 1998). La producción de esta cepa, en FL con exactamente el mismo medio de cultivo, fue solamente de 0.62 mg/mL. Esta cepa también fue probada en FS sobre bagazo de caña impregnado con el mismo medio líquido, y la producción final fue de 8.615 mg/g.

En una segunda etapa del trabajo de Baños y col. (2007), *A. terreus* TUB F-514 fue mutada y una cepa resistente a EOX, fue elegida por métodos de selección racional. La nueva mutante, fue cultivada en el sistema con el soporte artificial, produciendo 27.89 mg/g. Estos resultados indican que la alta producción de lovastatina de *Aspergillus terreus* está relacionada con su capacidad de contender contra el EOX, ya que se encontró que las mutantes aisladas y resistentes a este tipo de estrés, eran sobre productoras de lovastatina en FS, mas no en FL.

Estudios recientes en hongos, han evaluado la participación de las EROs en los procesos de diferenciación (Aguirre *et. al.*, 2005; Aguirre *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos apoyan una interacción funcional entre el EOX y el metabolismo secundario (Roze *et al.*, 2011). Se ha propuesto que como una respuesta compensatoria a una situación de EOX, es la formación de metabolitos secundarios con función antioxidante (Lee *et al.*, 2005), por ejemplo, Narasaiah y col. (2006) sugirieron que la biosíntesis de aflatoxinas producidas por *A. parasiticus*, puede aparecer en respuesta a la acumulación de EROs, para restablecer el estado redox del hongo.

Miranda y col. (2013) encontraron una acumulación de EROs al inicio de la idiofase, en fermentación sólida y líquida, sugiriendo una posible regulación. Finalmente, se demostró que la producción de lovastatina está regulada por las EROs a nivel transcripcional, esto lo lograron, estimulando y abatiendo a las EROs, por medio de la adición de peróxido de hidrógeno y antioxidantes. El resultado fue contundente, la producción de lovastatina disminuía en presencia del antioxidante y se adelantaba en presencia de peróxido de hidrógeno en trofofase; factores de transcripción de la ruta biosintética de lovastatina (*lovE* y *lovF*) disminuyeron su expresión en presencia del antioxidante. Por lo tanto, se concluyó,

que las EROs están regulando positivamente la biosíntesis de lovastatina (Miranda *et al.*, 2014).

Actualmente, el mecanismo por el cual las EROs regulan la biosíntesis de lovastatina no está claro. Miranda y col. (2014) proponen que factores de transcripción en respuesta a estrés oxidante, como SrrA y MsnA, pudieran ser los nexos de regulación entre las EROs y la biosíntesis de lovastatina, por lo que este trabajo se enfocó en analizar la función de estos genes sobre la biosíntesis de este metabolito secundario, mediante la obtención de mutantes silenciadas con este gen. A lo largo de esta tesis se describe la identificación de los genes en *Aspergillus terreus*, la construcción de los vectores de silenciamiento y la obtención de transformantes atenuadas con este gen, finalmente la caracterización de éstas frente a diferentes tipos de estrés y sobre todo, en función de la biosíntesis de lovastatina.

2. ANTECEDENTES

2.1 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios microbianos son compuestos producidos principalmente por hongos y actinomicetos, usualmente en la fase tardía del crecimiento (idiofase), son compuestos con una variedad en estructuras químicas sofisticadas, producidos por cepas de ciertas especies microbianas, y por algunas plantas (Pandey *et al.*, 2001; Barrios-González & Mejía, 2007).

Estos compuestos, no juegan un rol fisiológico durante la fase exponencial del crecimiento (trofofase) sino que son sintetizados en una etapa de producción subsecuente (idiofase). Además, se han descrito como opuestos a los metabolitos primarios (como aminoácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos), que son esenciales para el crecimiento. La producción de metabolitos secundarios inicia cuando el crecimiento es limitado por el agotamiento de un nutriente clave: carbono, nitrógeno o fosfato (Barrios-González *et al.*, 2003).

2.1.1 Rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios microbianos, muestran una enorme diversidad de estructuras químicas. Sin embargo, sus rutas biosintéticas están unidas a una red más uniforme del metabolismo primario. Se ha mostrado que los metabolitos secundarios son formados por rutas alternas al metabolismo primario y que parten de un número pequeño de puntos de ramificación, los cuales definen una amplia categorías de familias biosintéticas (Miranda 2013; Barrios-González *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2005):

- A. *Metabolitos derivados del ácido shikímico (aminoácidos aromáticos)*. Ejemplos son los alcaloides ergot y los antibióticos candicidina y cloramfenicol.
- B. *Metabolitos derivados de aminoácidos*. Esta familia incluye los antibióticos β -lactámicos, como penicilina, cefalosporinas y cefamicinas, así como antibióticos ciclopeptídicos tales como la gramicidina o la ciclosporina como agente inmunosupresivo.
- C. *Metabolitos derivados del Acetil-CoA (y compuestos relacionados, incluyendo los intermediarios del ciclo de Krebs)*. Esta familia puede subdividirse en policétidos y terpenos. Ejemplos de este grupo, incluye al antibiótico eritromicina, el compuesto

insecticida-antiparasitario avermectina, y el agente antitumoral doxorubicina. Un ejemplo del segundo grupo es el agente antitumoral no toxigénico taxol.

D. *Metabolitos derivados de azúcares*. Ejemplos de este grupo, son la estreptomicina y la kanamicina.

Ya que las rutas biosintéticas secundarias están vinculadas a las rutas metabólicas primarias y utilizan los mismos intermedios, los mecanismos regulatorios tales como: inducción, regulación por catabolito y/o regulación por retroalimentación, regulan su biosíntesis. Estos mecanismos regulatorios específicos de las rutas, operan en conjunto con un control general el cual está ligado a la velocidad de crecimiento (Barrios-González & Mejía, 2007).

Estudios a nivel molecular han mostrado que los genes de las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios están agrupados (en *cluster*) en el genoma del hongo o de los actinomicetos. Además, hay estudios que indican que frecuentemente un gen específico regulatorio está incluido dentro de este conjunto de genes. La coregulación de estos clusters puede, en parte, ser explicado por el control transcripcional coordinado de los genes biosintéticos por factores de transcripción de dominio “estrecho” o “amplio” en hongos.

Los reguladores específicos de ruta estrechos, usualmente se localizan en el *cluster* y regulan positivamente la expresión de genes. Los factores de dominio amplio, son factores transcripcionales que son importantes en la respuesta celular integrativa, a parámetros ambientales como a fuentes de C y N, temperatura, etc.

Las respuestas a las señales ambientales, son transmitidas a través de factores de transcripción globales (Dedos de zinc Cys2His2) que median la señalización de carbón (*creA*), nitrógeno y pH (*pacC*). La regulación por factores de transcripción de dominio amplio o estrecho, asegura que las rutas de los metabolitos secundarios pueden responder a la demanda de un metabolismo celular general y la presencia de inductores de ruta específicos (Keller *et al.*, 2005).

2.2 Lovastatina: fármaco de importancia industrial

La hipercolesterolemia es la acumulación de colesterol en el plasma sanguíneo que causa aterosclerosis (bloqueo de la arteria), conduciendo a enfermedades coronarias y ataques cardíacos (Valera *et al.*, 2005). Por lo tanto la posibilidad de controlar la síntesis de novo

del colesterol endógeno que representa aproximadamente dos tercios del colesterol total del cuerpo, representa una forma efectiva de bajar los niveles de colesterol en plasma (Manzoni & Rollini, 2002).

La lovastatina es un metabolito secundario que ejerce una actividad inhibitoria sobre la enzima hidroximetilglutaril coenzima A (HMGCoA) reductasa (mevalonato: NADP1 oxidoreductasa) la cual cataliza la reducción de HMG-CoA a mevalonato durante la síntesis del colesterol (Hajjaj *et al.*, 2001).

La lovastatina (llamada también mevinolina) fue la primer estatina en ser aprobada por la FDA de EU (1987) y puesta a disposición para el mercado farmacéutico como un medicamento anticolesterolémico. Esta estatina fue obtenida de una cepa aislada del suelo y clasificada como *A. terreus* en los Laboratorios CIBE en Madrid (España) y de *M. ruber* (llamada monacolina K) por ENDO (1979). Pocos años después la lovastatina también fue obtenida de 17 cepas de diferentes especies de 124 cepas probadas de *Monascus*, en particular, *M. ruber*, *M. purpureus*, *M. pilosus*, *M. vitreus*, y *M. pubigerus* (Hajjaj *et al.*, 2001; Rollini 2002).

2.2.1 Biosíntesis

Estudios en *Monascus ruber*, *Paecilomyces viridis* y *Aspergillus terreus* sobre la ruta que involucra la síntesis de lovastatina, han demostrado que la ruta es iniciada a partir de unidades de acetato. La monacolina L, que es sintetizado a partir de 9 moléculas de acetato, es convertido luego a monacolina J mediante una hidroxilación, para posteriormente convertirse en lovastatina (Manzoni & Rollini, 2002).

La ruta biosintética de la lovastatina se ha investigado por resonancia magnética nuclear y espectroscopia de masas (Yoshizawa, 1994; Hendrickson, 1999). Estos estudios concluyeron que la lovastatina está compuesta de dos cadenas de policétidos unidas a través de un enlace éster, las cuales son ensambladas por la Policétido Sintasa, resultados que provienen de la clonación y la caracterización parcial del *clúster* de genes biosintéticos de lovastatina de *A. terreus* (Figura 1) (Hajjaj *et al.*, 2001).

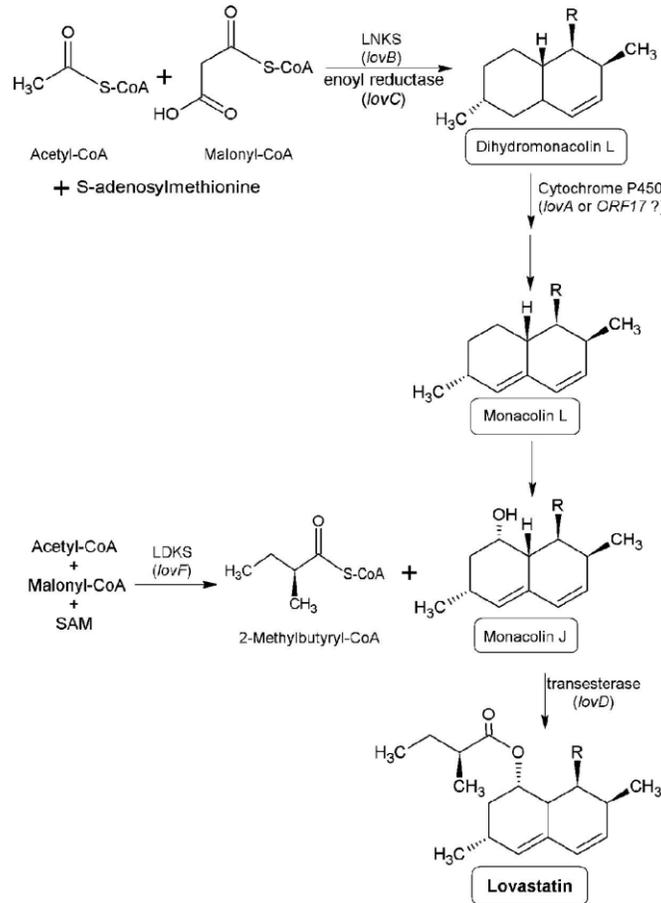


Figura 1. Ruta biosintética de lovastatina. Fuente: Barrios-González & Miranda Labra, 2010.

El *clúster* de genes biosintéticos de la lovastatina consiste en 18 probables marcos de lectura abiertos (open reading frames u ORFs), 2 de los cuales codifican para proteínas reguladoras, *lovE* y *lovH* (Figura 2) (Rollini, 2002).

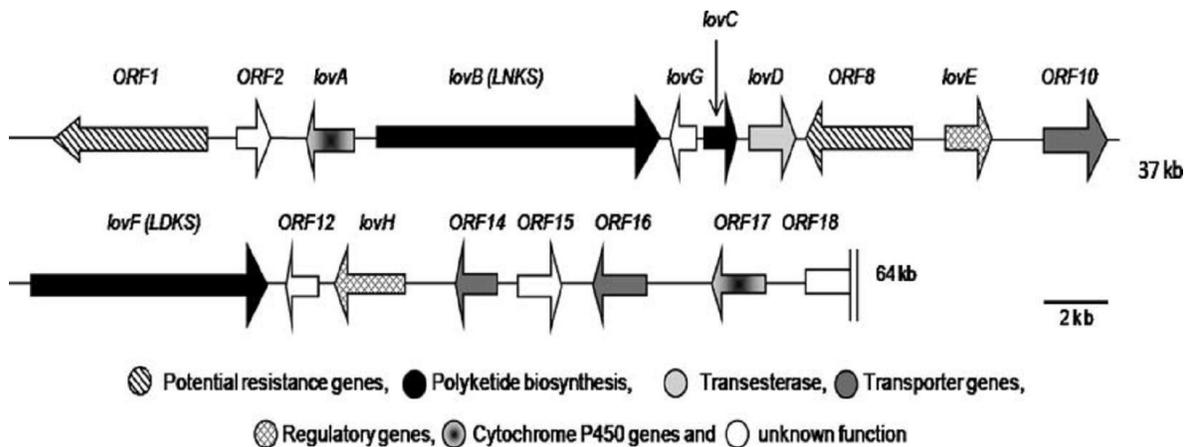


Figura 2. *Clúster* biosintético de la lovastatina: *lovB* y *lovF* biosíntesis de policétidos; *lovC* enoil reductasa; *lovD* transesterasa; *lovE* y *lovH* genes reguladores; *ORF2* y *ORF17* genes del citocromo P-450; *ORF1* y *ORF10* genes potenciales de resistencia; *ORF12* y *ORF16* genes de transporte; *lovG*, *ORF12*, *ORF15* y *ORF18* función desconocida). Fuente: Barrios-González & Miranda Labra, 2010.

2.2.1 Producción

La producción convencional de lovastatina se ha llevado a cabo mediante Fermentación Líquida (FL). La producción de la cepa de *A. terreus* ATCC 20542, el productor original de lovastatina, fue incrementado por el grupo Metkinen, hasta alcanzar 7-8 g/L, utilizando procedimientos de mutagénesis (Manzoni & Rollini, 2002).

Biocon (Biocon, Bangalore, India) es una de las compañías que ha obtenido la aprobación para la producción de lovastatina por el FDA de EU (Enero 2001). Fue la primera compañía hindú, en obtener esta aprobación para moléculas derivadas de fermentación para uso farmacéutico. El proceso de producción de lovastatina, está basada en una tecnología propia de fermentación, el Plafractor, un biorreactor a gran escala de matriz sólida (Suryanarayan & Mazumdar, 2003).

Baños y col. (2005), diseñaron un proceso de producción de lovastatina por Fermentación Sólida (FS) sobre un soporte inerte artificial donde se obtuvo 19.95 mg/g en 7 días. Estos estudios fueron desarrollados con *A. terreus* TUB F-514, una cepa silvestre aislada de muestras de suelo de Irak (Szakács *et al.*, 1998). La producción de esta cepa, en FL con exactamente el mismo medio de cultivo, fue solamente de 0.62 mg/mL. Esta cepa también fue probada en FS sobre bagazo de caña impregnado con el mismo medio líquido, y la producción final fue de 8.615 mg/g.

2.3. Estrés oxidante

El dioxígeno (O_2) es uno de los gases más importantes de la Tierra, casi todos los seres lo utilizan para respirar y obtener energía. El oxígeno molecular es inocuo o poco reactivo, sin embargo, a partir de esta molécula, se forman durante la respiración moléculas más reactivas conocidas como Especies Reactivas de Oxígeno (EROs). Las EROs regulan varios procesos pero también resultan nocivas para los organismos (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Las EROs son derivados del oxígeno más reactivo que el O_2 en su estado basal, si un solo electrón se adiciona al dioxígeno se obtendrá como producto el radical superóxido (O_2^-), de la adición de un radical más resultará el ion peróxido, el cual se protona rápidamente en el ambiente celular para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

El H_2O_2 es un oxidante débil, sin embargo, difunde y cruza las membranas fácilmente y, al reaccionar con algunos metales de transición como el hierro o el cobre reducidos (Fe^{2+} o Cu^+ respectivamente), forma el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) uno de los radicales conocidos con mayor reactividad (Figura 3-A) (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Las EROs se generan endógenamente en las células, no sólo como consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno a agua durante la respiración, sino también en otros procesos metabólicos como la β -oxidación de ácidos grasos, o al exponer a las células a fuentes de radiación ionizante, a químicos de reciclaje redox o a metales.

Los organismos son capaces de mantener un ambiente redox intracelular reducido, sin embargo, si la concentración de las EROs sobrepasa la capacidad celular para eliminarlos, se produce un estado de estrés oxidante (Storz *et al.*, 1987).

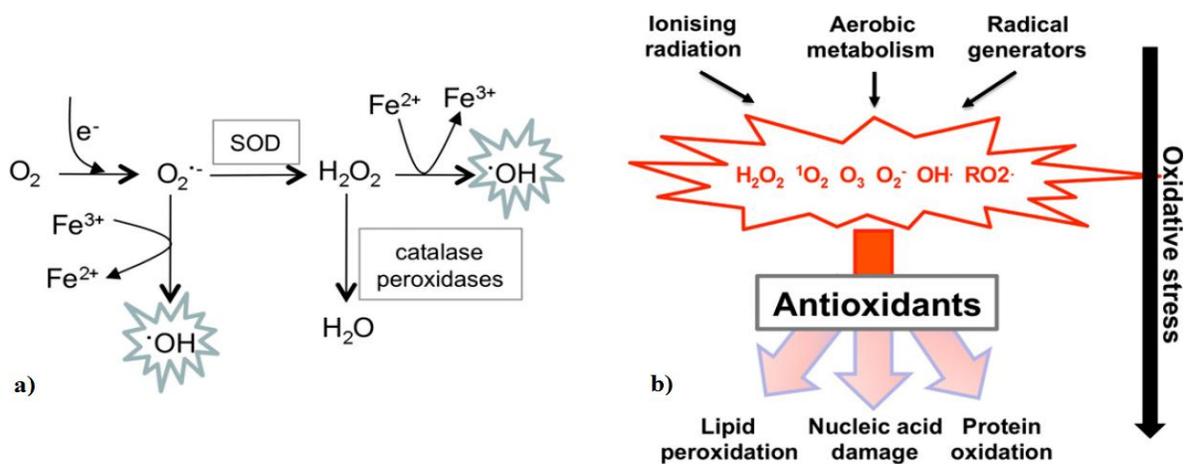


Figura 3. a) Generación de las EROs. b) Origen y daño de las EROs. Fuente: Morano *et al.*, 2011.

El estrés oxidante puede causar daño celular como daño en lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos mediados por los intermediarios reactivos del O_2 ; estos daños pueden conducir eventualmente a la muerte celular (Figura 3-B).

La célula posee una batería de defensa antioxidante conformada por sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Los sistemas de defensa enzimáticos incluyen a varias enzimas las cuales son capaces de remover EROs. Los sistemas no enzimáticos consisten típicamente de moléculas pequeñas que son solubles en agua, o en algunos casos, en un ambiente lipídico, actúan en general como atrapadores de EROs (Storz *et al.*, 1987).

2.4. Respuesta celular al estrés oxidante

Una característica crítica en la respuesta al estrés oxidante es la necesidad de una rápida señalización de un nuevo ambiente estresante, el cual a su vez, conduce a una reprogramación de genes y la expresión de los productos génicos requeridos para amortiguar la elevación letal de las EROs.

Debido a que una elevación de las EROs puede pasar rápidamente, las rutas de respuesta de los hongos deben ser igualmente rápidas, la célula debe ser capaz de detectar el balance redox alterado, modular la actividad de reguladores transcripcionales apropiados, y entonces inducir la expresión de genes blanco relevantes (Miranda 2013).

2.4.1 Protección cruzada

Se ha observado que la inducción de la tolerancia a un determinado tipo de estrés (referido a la capacidad celular para adaptarse a cambios del medio ambiente supraóptimos hasta ser capaz de sobrevivir en condiciones letales), conlleva la tolerancia a otros tipos de estrés, aunque éstos sean letales en ausencia de una inducción previa; a este fenómeno se le ha denominado “protección cruzada”, dando lugar a la idea de que las células de levadura poseen mecanismos comunes o generales de respuesta al estrés.

Si se considera que la adaptación de los organismos a los cambios en el medio ambiente no sólo implica el proteger sus funciones básicas y mantenerlas, sino también inducir procesos en que esas condiciones adversas lo conviertan en un organismo biológicamente eficiente, resulta sencillo el entender el porqué de la selección de una “respuesta general al estrés”. La integración de estas respuestas determina la capacidad adaptativa de un organismo (Kurtz *et al.*, 1986; Werner-Washburne *et al.*, 1989).

La estrategia que la célula utiliza para poder coordinar un sistema complejo formado de elementos que participan en funciones diversas, es el tener blancos comunes en genes que codifican diferentes funciones. Esto es posible a través de la intervención de factores transcripcionales capaces de captar estímulos diversos que confluyen en proteínas que activan estos factores, los cuales, a su vez activan la transcripción de diferentes genes y, por tanto, la expresión de proteínas a las que codifican (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

2.5 Rutas de señalización en respuesta a estrés

Las rutas de señalización que participan en la respuesta a múltiples tipos de estrés, como son osmótico, UV, irradiación, temperaturas altas, incluyendo el estrés oxidante han sido minuciosamente estudiadas en levaduras y se encontró que evolutivamente están muy conservadas en hongos filamentosos (Hong *et al.*, 2013).

Estas rutas de señalización conservadas se incorporan a un módulo sistemático de fosforilación multietapa (un análogo del sistema de dos componentes en bacterias), el cual transmite la señal al módulo de la ruta de estrés por la activación de la proteína quinasa (SAPK/MAPK), y estos modulan la actividad de la formación de factores transcripcionales específicos relacionados con el estrés oxidante/osmótico.

Los factores transcripcionales, dependiendo de su estado de activación, pueden modificar su expresión sobre los genes diana involucrados en la respuesta celular sobre las señales de estrés (Figura 4) (Miskei *et al.*, 2009; Ikner & Shiozaki, 2005; Aguirre *et al.*, 2006).

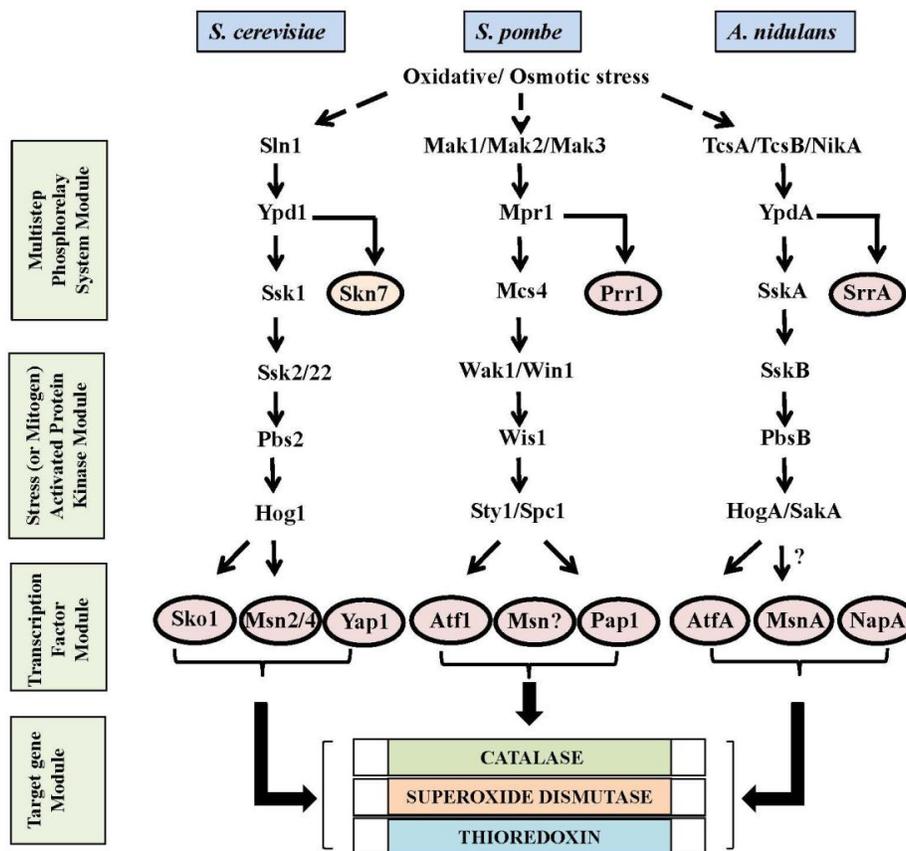


Figura 4. Rutas de señalización en la activación al estrés en *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe* y *Aspergillus nidulans*. Fuente: Hong *et al.*, 2013.

Como se describe en la figura 4, en *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *A. nidulans*, Sty1/Spc (HogA/SakA) es activado por el estrés ambiental como oxidante u osmótico e induce factores transcripcionales como Atf1 (AtfA) para la expresión de los genes diana. Por otro lado, la activación de Hog1 por Sko1 en *S. cerevisiae* es dependiente de estrés osmótico. El sensor de quinasas TcsA/TcsB/NikA transmite la señal de estrés oxidante a HogA/SakA mediante la cascada de SAPK/MAPK, a través de YpdA y SskA en *A. nidulans* mientras el sensor kinasa Sln1 transmite las señales de estrés osmótico a Hog1 por la cascada SAPK/MAPK a través de Ypd1 y Ssk1 en *S. cerevisiae*. El regulador de respuesta Skn7 está bajo la traducción de señal de Sln1-Ypd1, pero el estrés oxidante pareciera activar independientemente a Skn7 por el sistema de fosforilación (Hong *et al.*, 2013).

2.6 Metabolismo secundario y estrés oxidante

2.6.1 Modelo en aflatoxinas

A pesar de la conservación de la mayor parte de los módulos de señalización, los hongos filamentosos, en contraste con las levaduras, tienen mecanismos adicionales para enfrentar las EROs, tales como la presencia de numerosos sensores de histidina quinasa (Bahn *et al.*, 2007), enzimas antioxidantes y la producción de metabolitos secundarios con función antioxidante (Aguirre *et al.*, 2006).

En *Aspergillus parasiticus*, se ha demostrado que hay una correlación entre la formación de EROs, la activación de estrés oxidante relacionado a factores transcripcionales (ApyapA, AtfB y MsnA), activación de las enzimas antioxidantes, y la producción de aflatoxinas como metabolito secundario, sugiriendo que la producción de aflatoxinas es disparada por el estrés oxidante (Reverberi *et al.*, 2006; Roze *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2013; Reverberi *et al.*, 2007; Reverberi, *et al.*, 2008).

Muchos factores transcripcionales relacionados al estrés oxidante (Apyap1, AtfB, Nap1) asociados con la cascada de señalización SAPK/MAPK, parecieran estar regulando el metabolismo secundario en *Aspergillus* (Hong *et al.*, 2013; Reverberi *et al.*, 2008; Yin, *et al.*, 2013). Estos datos indicarían la incorporación del metabolismo secundario dentro de la respuesta al estrés oxidante que ocurre al menos a nivel de factores transcripcionales (Figura 5).

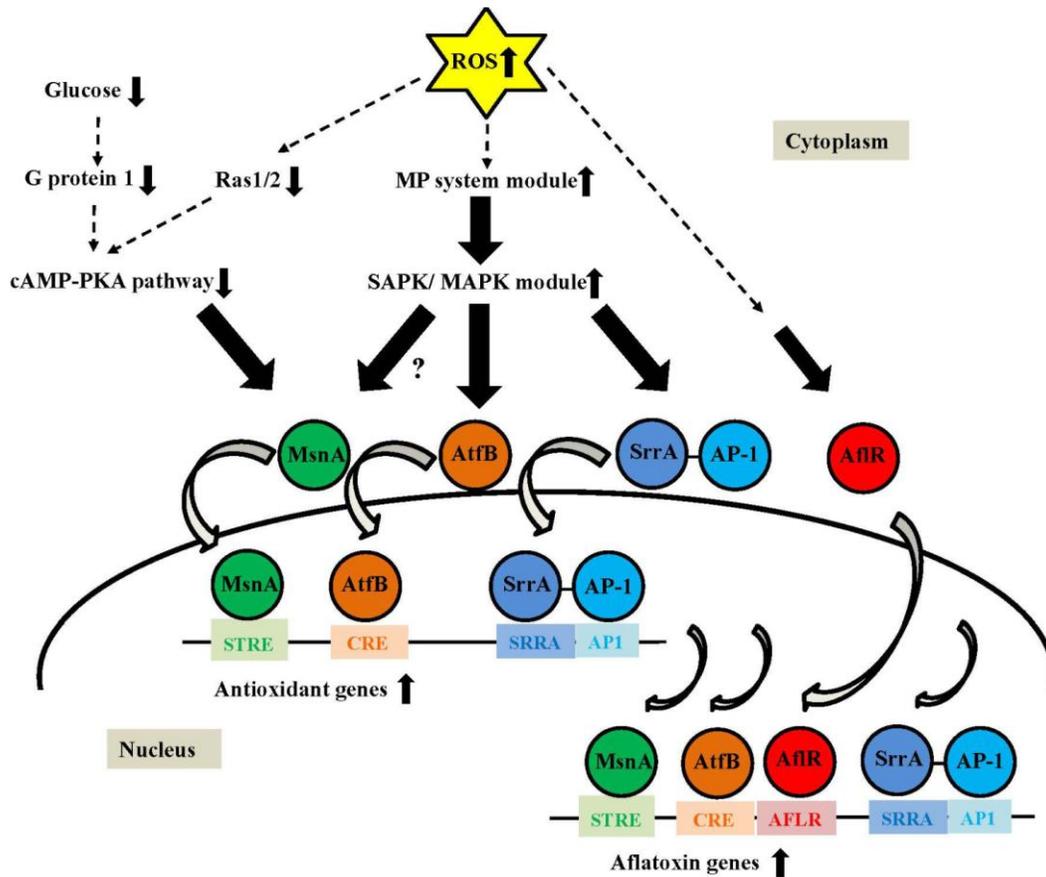


Figura 5. Modelo para la activación transcripcional de genes antioxidantes y biosíntesis de aflatoxinas por factores transcripcionales relacionados al estrés oxidante. Fuente: Hong *et al.*, 2013.

El modelo propone que el incremento de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (EROs) intracelular en células fúngicas regulan a la baja la ruta de señalización cAMP-PKA. Esto promueve la unión de MsnA a sitios STRE en promotores de genes antioxidantes para su activación. Simultáneamente, EROs regulan positivamente la cascada de señalización proteína quinasa activada por estrés/ proteína quinasa mitogénica activada (SAPK/MAPK) a través de un sistema de fosforilación multipaso. La activación de la cascada SAPK/MAPK promueve la unión de AtfB y SrrA (SrrA reclutado por AP-1), que corresponde a los sitios de unión CRE, SRRA y API en promotores de genes antioxidantes para su inducción. Entonces MsnA, AtfB y SrrA (SrrA reclutado por AP-1) se unen a su correspondiente sitio STRE, CRE, SRRA y API en los promotores de los genes de aflatoxinas para su inducción debido a niveles excesivos de EROs. AfIR asiste a la inducción de los genes de biosíntesis de aflatoxinas por la unión a sitios AFLR en los promotores de los genes de aflatoxinas (Hong *et al.*, 2013).

2.6.2 EROs regulan la biosíntesis de lovastatina

El estudio de la relación del estrés oxidante y la biosíntesis de lovastatina iniciaron con los resultados obtenidos por Baños y col. (2007) donde *A. terreus* fue mutada y una cepa resistente a EOX, fue elegida por métodos de selección racional. La nueva mutante, fue cultivada en el sistema con el soporte artificial, presentando un aumento del 62% en la producción de lovastatina. Estos resultados indicaban que la alta producción de lovastatina de *Aspergillus terreus* podría estar relacionada con su capacidad de contender contra el EOX, ya se encontró que las mutantes aisladas y resistentes a este tipo de estrés, eran sobre productoras de lovastatina en FS, mas no en FL.

Posteriormente, Miranda y col. (2013) encontraron un incremento importante en la concentración de las EROs durante la idiofase en la producción de lovastatina en FL y FS de, sugiriendo una conexión entre las EROs y la biosíntesis de lovastatina.

Como seguimiento de este trabajo, Miranda y col. (2014) estudiaron la contribución de las EROs en la regulación de la biosíntesis de lovastatina. Se estudió por medio de la adición de un antioxidante (N-Acetil-L-Cisteína, NAC) a la FL y FS. En FS la adición de 100 mM de antioxidante NAC a las fermentaciones de lovastatina, provocó un decremento en la acumulación de las EROs de 53% junto con una disminución de la producción de lovastatina del 79%, una situación similar se observó en FL. Además encontraron que el decremento de la producción de lovastatina fue debido a una disminución en la expresión del gen *lovE*, pero también del gen *lovF*. Además de abatir las EROs con el NAC, estimularon su acumulación en FL y FS por medio de la adición de peróxido de hidrógeno, encontrando un adelanto en la producción de lovastatina debida a un adelanto de la expresión de *lovE* y *lovF*.

Los resultados obtenidos por Miranda y col. (2014) fueron contundentes: las EROs están regulando la biosíntesis de lovastatina a nivel transcripcional.

Al igual que en el modelo de aflatoxinas, Miranda y col. (2014) también encontraron que factores de transcripción en respuesta a estrés oxidante, como Skn7, Yap1 y Msn2/4, y otros incluyendo Hsf1, poseen sitios putativos de unión a los promotores de los genes *lovE* y *lovF*.

En un análisis de *Northern Blot* realizado en este estudio, el gen *yap1* de *Aspergillus terreus* (*Atyap1*) se expresó durante la trofofase pero se reguló a la baja durante la idiofase, por el contrario, el patrón de expresión del gen *srrA*, que en FS se expresó justo al inicio de la idiofase (junto con *lovE* y *lovF*) pero que en FL su expresión fue intermitente, sugirió que SrrA podría desempeñar un papel importante en el control positivo de la producción de lovastatina y también explicar las particularidades de la biosíntesis en FS, como su elevada producción. Por lo que, ellos concluyen que estos factores de transcripción a respuesta a estrés oxidante pudieran ser el nexo entre las EROs y la biosíntesis de lovastatina.

2.7 SrrA

2.7.1 Generalidades

Skn7 (en levadura y SrrA en *A. nidulans*) es un factor transcripcional de respuesta a estrés. Tiene una arquitectura uniforme que consiste en un dominio N-terminal de unión a DNA similar al factor transcripcional de respuesta a choque térmico (HSF) y un dominio de recepción C-terminal, el cual le confiere la regulación de la actividad transcripcional por fosforilación Histidina-Aspartato a través de una vía de señalización de fosforilación del aspartato altamente conservado en Skn7 (Fassler & West, 2011).

Skn7 en *S. cerevisiae* es un factor transcripcional de hélice-vuelta-hélice que se ha demostrado que tiene una interacción física con Yap1 (ortólogo de *A. nidulans* NapA) o Hsf1 (factor de choque térmico 1), antes de que éstos se unan a los promotores diana en respuesta al estrés oxidante y/o choque térmico (Mulford & Fassler, 2011). Fassler & West, (2011) reportaron que Skn7 se une a elementos de respuesta al estrés oxidante (OSRE) (5'GGCNGGC3', 5'GGCNGGC3', 5'GGCNAGA3', o 5'GGCNNAGA3') en los promotores de los genes diana como *CTT1* (catalasa citosólica), *CCP1* (citocromo c peroxidasa mitocondrial), *TSA1* (thioredoxin peroxidasa citosólico), *AHP1* (hidroperóxido alquil reductasa) e induce su expresión en respuesta a H₂O₂. Morgan y col. (1997) reportaron que Skn7 se une a la secuencia 5'CCGAAA3' en el promotor *TRX2* (thioredoxina) (He & Fassler, 2005). La unión de Skn7 al elemento de choque térmico (HSE) en genes de choque térmico es por la cooperación Hsf1 especialmente en respuesta al peróxido de hidrógeno (Raitt *et al.*, 2000). Pareciera que Skn7 se une a los promotores de los genes diana específicos por medio de la interacción con diferentes proteínas compañeras en respuesta a diferentes condiciones de estrés. Similar a Skn7, Pap1 y Prr1 (*S. pombe*

ortologo de Yap1 y Skn7) son requeridos por la activación de *ctt1* y *trr1* en *S. pombe* (Ohmiya *et al.*, 1999).

SrrA de *A. nidulans* (un ortologo de *S. cerevisiae* Skn7 y *S. pombe* Prr1) es miembro de un sistema de fosforilación multicomponente histidina-aspartato (análogo del sistema de fosforilación de dos componentes en procariontes) en la ruta de traducción de señales que media la respuesta celular del estímulo ambiental (Hagiwara *et al.*, 2007; Vargas-Perez *et al.*, 2007). Este regulador de respuesta es un factor transcripcional que contiene un factor de choque térmico de mamíferos (HSF) como un dominio de unión a ADN adyacente al dominio de destino, el cual es esencial para la función de fosforilación (Hagiwara *et al.*, 2007; Fassler & West, 2011). La interrupción de *srrA* in *A. nidulans* mostró hipersensibilidad al estrés oxidante como el peróxido de hidrógeno y decrecieron los niveles de la expresión *catB* específica de micelio (catalasa B) (Hagiwara *et al.*, 2007; Vargas-Perez *et al.*, 2007).

2.7.2 Ruta de activación de Skn7

Skn7 es una proteína nuclear no esencial, tiene diferentes sitios de unión en el DNA lo que sugiere que la especificidad de pegado a cada uno de estos sitios lo dan otras proteínas que también se unen a DNA y que interactúan con SrrA (Skn7p análogo en levadura). Esta proteína es un activador controlado por el sistema de dos componentes (Sln1p-Ssk1p) y, existe evidencia que indica que este factor regula la respuesta celular a condiciones hiperosmóticas para ajustar el metabolismo de la pared celular, el control de la proliferación celular y la respuesta al estrés oxidante (Li *et al.*, 1998).

Como se observa en la figura 6, Sln1 quinasa, proteína asociada a la membrana citoplasmática, es autofosforilada en el residuo H576 bajo condiciones normales de crecimiento. La hiperactivación ocurre en ciertas condiciones que causan rompimiento/remodelación de la pared celular (estrés de pared). La hiperosmolaridad y otras condiciones causan la reducción del turgor permitiendo la reducción de la actividad en Sln1 quinasa y acumulación de la forma desfosforilada de Sln1. El grupo fosfato de H576 (H) es transferido a D1144 (D) en el dominio de recepción de Sln1 y después a H64 de la fosfotrasferasa, Ypd1 y finalmente a D554 y D427 en los dominios de recepción de los reguladores de respuesta Ssk1 citoplasmática y nuclear Skn7, respectivamente. La forma no fosforilada de Ssk1 la deja inactiva. La fosforilación de Skn7 permite la activación de los

subsecuentes genes dependientes de SKN7, tal como el gen manosiltransferasa, *OCHI*. Sin embargo, no todos los genes dependientes de SKN7 requieren la fosforilación del aspartil. Por ejemplo, la activación de la respuesta a estrés oxidante dependiente de SKN7 es independiente de la ruta SLN1 (Fassler & West, 2011).

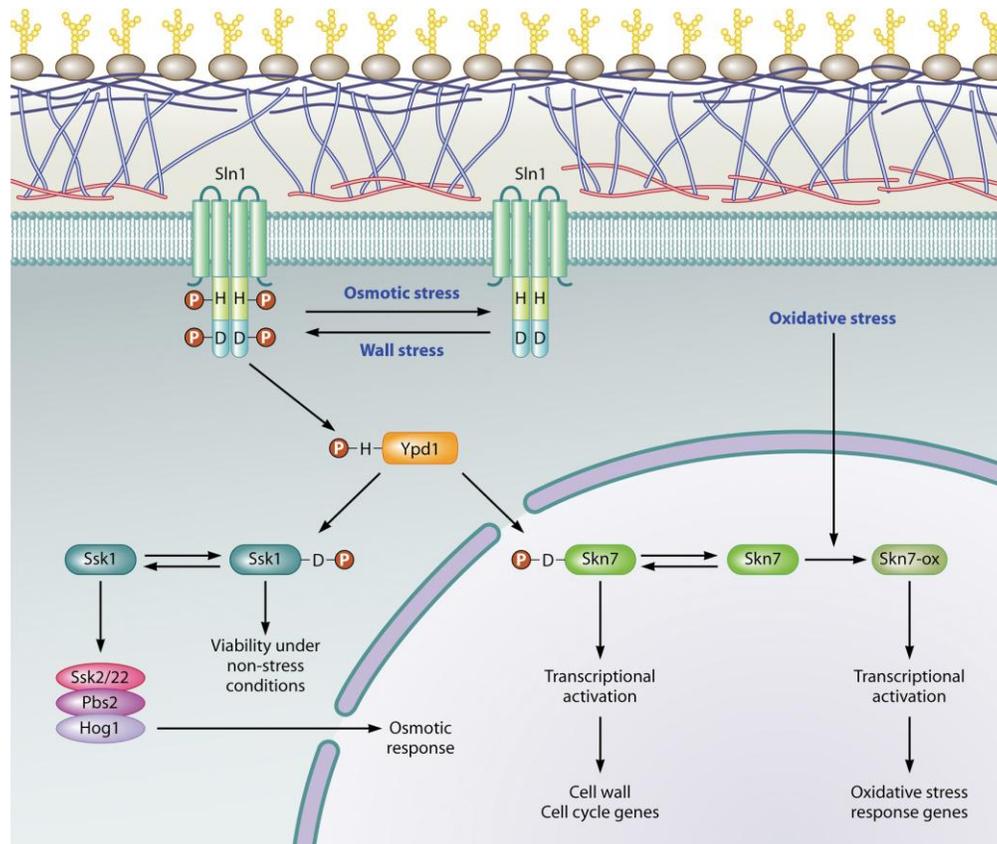


Figura 6. Esquema de la rama Sln1 que forma parte de la vía HOG en *S. cerevisiae*. Fuente: Fassler & West, 2011.

2.8 MsnA

2.8.1 Msn2/4 en Levadura

2.8.1.1 Generalidades

Msn2 y su homólogo cercano Msn4 (Msn2 es el factor dominante de los dos) fueron identificados a mediados de los años 90s como proteínas requeridas para la expresión de una amplia gama de genes en respuesta a múltiples tipos de estrés, pero no en condiciones de crecimiento normal (Martinez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt & McEntee *et al.*, 1996).

MsnA2 y MsnA4 en *Saccharomyces cerevisiae* son factores transcripcionales de “dedos” de zinc Cis2His2 que son inducidos como parte de la respuesta celular al estrés oxidante

así como otros tipos de estrés como agotamiento de la fuente de carbono, choque térmico y estrés osmótico (Martinez-Pastor *et al.*, 1996). MsnA2 y MsnA4 activan la transcripción de genes de respuesta al estrés como *CTT1* (catalasa citosólica) y *HSP12* (proteína de choque térmico 12) por la unión a elementos de respuesta al estrés en sus promotores (5' AGGGG 3').

2.8.1.2 Regulación

Msn2/4 son regulados por la fase de crecimiento y el estatus nutricional, por ejemplo, se induce después del cambio diáuxico o en la fase estacionaria tardía (Figura 7) (Trott & Morano, 2003). El control transcripcional de la respuesta nutricional es mediado por la ruta de señalización AMP (cAMP)-Proteína quinasa A que fosforila a Msn2/4 bajo condiciones normales o sin estrés, para bloquear su ingreso al núcleo y por lo tanto la inhibición de sus genes diana (Gorner *et al.*, 1998).

Otras rutas de transducción de señales están regulando la actividad de Msn2/4, la proteína quinasa dependiente de AMPc Snf1 también fosforila y regula negativamente a Msn2 (De Wever *et al.*, 2005). Pero además, la proteína fosfatasa PP1 desfosforila directamente a Msn2 pero también ejerce una regulación negativa sobre la actividad de Snf1, de esta forma se provee de dos diferentes rutas de control de la actividad de Msn2. La utilización de estas diferentes, pero relacionadas rutas de control de las funciones de Msn2/4 es como se provee la manera a través de la cual la regulación de Msn2 está ligada dentro de la respuesta general al estrés.

La “lanzadera” núcleo-citoplasmática de Msn2/4 es rápida y oscilante durante las condiciones de estrés, sugiriendo que los moduladores tal como cAMP/PKA tienen influencia sobre la sensibilidad y frecuencia de la preferencia de localización nuclear que está absolutamente restringida al transporte de un compartimiento a otro (Jacquet *et al.*, 2003). Msn2 es degradado en el núcleo sobre una activación constitutiva, proveyendo un mecanismo potencial de adaptación para periodos de prolongada limitación de nutrientes o estrés ambiental (Lallet *et al.*, 2004). Increíblemente, la eliminación de Msn2/4 permite a la célula prescindir de la “esencial” vía cAMP/PKA, sugiriendo que uno o más blancos de Msn2/4 antagonizan la función de PKA y son perjudiciales para el óptimo crecimiento (Schmitt & McEntee, 1996). Muchas líneas de evidencia señalan a la quinasa Yak1 como las primeras candidatas para ejercer este rol.

Como se observa en la figura 7, la regulación de Msn2 se lleva a cabo por proteínas de control de crecimiento y estrés oxidante. H_2O_2 dispara la oxidación de las proteínas tioredoxinas citoplasmáticas (Trx^{ox}) desde su estado normal reducido (Trx^{red}). Esto induce el reclutamiento de Msn2 dentro del núcleo donde éste puede interactuar con su sitio de reconocimiento elementos de respuesta al estrés (STRE, en inglés “STress Response Elements”), y activa la transcripción de los genes diana. Hsf1 es constitutivo nuclear y preafina a muchos genes diana que contienen elementos de choque térmico (HSEs, en inglés “Heat Shock Elements”) en sus promotores. Hsf1 también es regulado por quinasas detectoras de nutrientes, Snf1 y PKA, y por estrés oxidante a través de mecanismos desconocidos (Morano *et al.*, 2011).

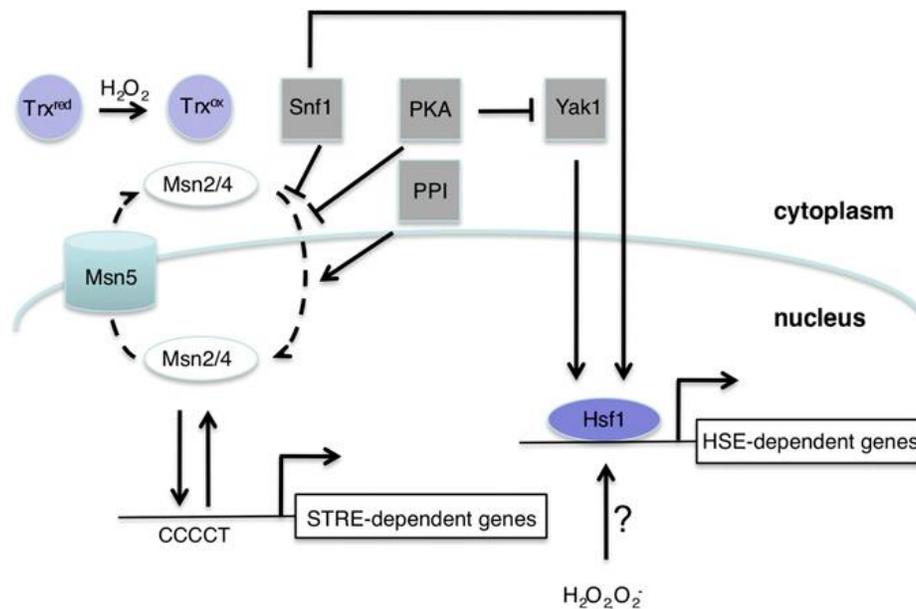


Figura 7. Regulación de Msn2/4 y Hsf1 en *S. cerevisiae*. Fuente: Morano *et al.*, 2011.

2.8.2 Msn2/4 en Hongos

El estudio de MsnA en hongos es relativamente reciente, por lo que su participación en la regulación de diferentes tipos de estrés aún es desconocida. Los primeros estudios de este factor de transcripción se ha llevado a cabo en hongos filamentosos como *A. nidulans*, *A. parasiticus* y *A. flavus*; y en los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Jeon *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010). Sin embargo, su función es polémica, puesto que en cada uno de estos sistemas biológicos se ha encontrado resultados contrastantes. MsnA en *Aspergillus terreus* no ha sido estudiado hasta en este momento.

2.8.3 Participación de MsnA en respuesta al estrés

2.8.3.1 Estrés oxidante

En levadura, Msn2/4 no es un factor crucial en respuesta a estrés oxidante, se ha demostrado que su papel está determinado por la tiorredoxina Trx1/2, y que además su intervención varía de acuerdo a la fase de crecimiento, siendo la fase tardía donde han encontrado mayor actividad (Morano *et al.*, 2011). También se sabe que este factor transcripcional participa en la “protección cruzada”, basada en la respuesta celular a diferentes tipos de estrés, originado inicialmente sólo por uno, por ejemplo, el estrés por calor en levadura genera estrés oxidante y es donde Msn2/4 participa para contener ambos.

2.8.3.2 Estrés por choque térmico

En levadura, el estrés térmico también induce el regulón Msn2/4 y activa la ruta para conservar la integridad de la pared celular. El mecanismo de la activación de Msn2/4 por condiciones de concentración bajas de glucosa a través de cAMP/PKA está bien establecido, la inducción de esta ruta por choque térmico y otros tipos de estrés ambientales es poco entendible (Thevelein *et al.*, 2000).

En hongos entomopatógenos la interrupción de MsnA presentaron deficiencia en el crecimiento de las colonias a una temperatura elevada (34°C), además sus conidios presentaron mayor sensibilidad a choque térmico (45°C) (Liu *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Los organismos son capaces de mantener un ambiente redox intracelular reducido, sin embargo, si la concentración de las EROs sobrepasa la capacidad celular para eliminarlos, se produce un estado de estrés oxidante (Storz *et al.*, 1987).

Recientemente se ha encontrado mayor evidencia de que el metabolismo secundario, en hongos filamentosos, está asociado con el estrés oxidante. El panorama surgió con resultados obtenidos por Toledo *col.* (1995) que encontraron un estado hiperoxidante que precede a los procesos de diferenciación en *Neurospora crassa*, en cada una de las etapas morfogénicas: adhesión de la hifa, formación de la hifa área y la producción de la conidia. Posteriormente Hansberg y *col.* (2007) demostraron que es necesario un estrés oxidante para que se lleve a cabo la diferenciación celular, esto lo hicieron por medio de antioxidantes exógenos y observaron que la esporulación no se llevaba a cabo. Jayashree & Subramanyam (2000), encontraron que había un estado oxidante que coincidía en la transición de la trofofase a idiofase en *Aspergillus parasiticus*, además que las cepas aflatoxigénicas mostraban una mayor concentración de EROs en este punto que las cepas no tóxicas. Narasaiah y *col.* (2006) demostraron que la producción de aflatoxinas correlacionaba en forma positiva con un estado oxidante, logrando incrementos en la producción relacionados con el incremento de concentraciones de peróxido de hidrógeno exógeno.

En nuestro grupo de trabajo también se han encontrado resultados similares con la biosíntesis de lovastatina en *A. terreus*. Baños y *col.* (2007) demostraron que el estrés oxidante en medio sólido, tiene un papel importante sobre la producción de lovastatina por *Aspergillus terreus*. Los autores aislaron mutantes resistentes a este tipo de estrés, encontrando que un alto porcentaje de éstas eran sobreproductoras de lovastatina en fermentación sólida. Posteriormente, Miranda y *col.* (2013) encontraron una acumulación de EROs al inicio de la idiofase, en fermentación sólida y líquida, sugiriendo una posible regulación de la biosíntesis por las EROs. Finalmente, se demostró que la producción de lovastatina está regulada por las EROs a nivel transcripcional. Esto lo lograron, incrementando o abatiendo a las EROs, por medio de la adición de peróxido de hidrógeno o antioxidantes. El resultado fue contundente, la producción de lovastatina disminuía en presencia del antioxidante y se adelantaba en presencia de peróxido de hidrógeno en

trofófase. Los genes de biosíntesis de lovastatina (*lovE* y *lovF*) disminuyeron su expresión en presencia del antioxidante y la incrementaron en presencia de prooxidantes. Por lo tanto, se concluyó, que las EROs regulan positivamente la biosíntesis de lovastatina (Miranda *et al.*, 2014).

Esta tesis surge de la necesidad de responder a la pregunta de cuál es el nexo entre las Especies Reactivas del Oxígeno y la biosíntesis de lovastatina. Hong y col. (2013) sugieren que factores transcripcionales de respuesta a estrés oxidante pudieran estar relacionados con la regulación de las aflatoxinas. Este grupo propone un modelo donde factores de transcripción como AP-1, AtfA, AtfB, MsnA, StuA, Hsf1, SrrA, Pcr1 y Myb podrían tener una función dual dentro de la célula. Es decir, actúan uniéndose a promotores de genes en respuesta a estrés oxidante pero que al mismo tiempo también se unen a promotores de genes de metabolismo secundario.

En relación a la síntesis de lovastatina por *A. terreus*, Miranda y col. (2014) encontraron sitios putativos de unión de factores de transcripción, en su mayoría de respuesta a estrés oxidante, en los promotores de los genes *lovE* y *lovF*, entre ellos Yap1 (Ap-1), SrrA y MsnA. Posteriormente, Pérez-Sánchez (2014) silenciaron al gen *Atyap1* (en *Aspergillus terreus*) encontrando inicio precoz y fuerte aumento, tanto en la esporulación como en la producción de lovastatina, así como de las EROs. Por lo que ellos concluyen que este factor transcripción no es un regulador positivo, pero que pudiera ser un regulador negativo para el gen *lovE*. Sin embargo, también se menciona que el aumento de producción puede ser un efecto indirecto del aumento en la acumulación de las EROs, y si esto es cierto, la pregunta prevalece: ¿cuál es el nexo?

Por lo anterior, en esta tesis, se llevó a cabo el estudio de la función de los genes *srrA* y *msnA*, como posibles blancos importantes en la regulación de las Especies Reactivas de Oxígeno y la biosíntesis de lovastatina. Es importante notar que Miranda y col. (2014) demostraron que *srrA* presenta un patrón de transcripción más compatible con una regulación de tipo positiva sobre los genes de biosíntesis de lovastatina. Además, hay una diferencia marcada entre la expresión de *srrA* en FS y en FL. Esto podría indicar que este es un gen importante para la Fisiología en Medio Sólido.

MsnA y SrrA son factores de transcripción de respuesta a estrés, su caracterización es amplia en levadura, sin embargo, en hongos filamentosos su función no se conoce con exactitud, e incluso MsnA aún no se ha identificado en *Aspergillus terreus*.

La diferencia de la expresión de *AtsrrA* encontrada por Miranda y col. (2014) (inicio fuerte en idiofase en FS e intermitente en FL) sugiere que este factor de transcripción puede formar parte de la fisiología del medio sólido, su estudio a profundidad podría abrir el camino del entendimiento de por qué la producción de lovastatina es mucho mayor en medio sólido que líquido.

Con estos resultados se obtendrá una visión más amplia, integrada y profunda de la fisiología del medio sólido, e incluso parte de la fisiología y mecanismos moleculares en medio líquido que no se conocen y a su vez este conocimiento puede llevar a un mejoramiento en la producción de metabolitos secundarios, mediante la creación de procesos más eficientes, o incluso, una nueva estrategia para el mejoramiento genético de las cepas.

4. HIPÓTESIS

- El factor transcripcional SrrA está implicado en la regulación positiva de la biosíntesis de lovastatina, por lo que las cepas silenciadas presentarán una disminución en la producción en fermentación sólida y líquida.
- El factor transcripcional MsnA también regula la biosíntesis de lovastatina pero negativamente, por lo que las cepas silenciadas presentarán un aumento diferenciado en la producción en fermentación sólida y líquida.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar el papel de los genes *srrA* y *msnA* en la biosíntesis de lovastatina en *Aspergillus terreus*, tanto en fermentación líquida como en sólida.

5.2 Objetivos Particulares

- 1) Identificar y clonar los genes *srrA* y *msnA* en *Aspergillus terreus* TUBF-514.
- 2) Realizar el silenciamiento de los genes *srrA* y *msnA* en *Aspergillus tereus* TUBF-514.
- 3) Analizar el efecto del silenciamiento de los genes *srrA* y *msnA* sobre la biosíntesis de Lovastatina, esporulación, crecimiento radial, estrés oxidante y de pared.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Equipos

- Balanza analítica Santourios BP221S
- Balanza granataria ADP
- Cámaras de electroforesis: Mini-Sub[®] Cell GT, BIO-RAD.
- Microcentrifuga 5415 C, Eppendorf
- Centrifuga refrigerada 5417 R, Eppendorf.
- DTX 880 Multimode Detector (Beckman-Coulter, Inc, Brea, CA, USA)
- Espectrofotometro UV-1201 Shimadzu.
- Eppendorf Biophotometer.
- Gel DOC 2000 BIO-RAD.
- Incubadora Environ-Shaker 3597.
- Incubadora Extech RH520
- Thermomixer, Eppendorf.
- Horno de microondas SANYO.
- Microscopio Olympus CH30.
- Potenciómetro Orion mod.525 A.
- Termociclador T100[™], BIORAD.
- Transiluminador de luz UV, BIORAD.
- HPLC Waters[™] 600.
- Ultracentrifuga AVANTI 30 BECKMAN.
- Ultracongelador -20°C Revco.
- Ultracongelador -70°C Forma Scientific.

6.2 Microorganismos

6.2.1 *E. coli* DH5 α

La cepa es utilizada normalmente en experimentos de transformación debido a la alta eficiencia que puede conseguirse en ella (hasta 5×10^8 transformantes por microgramo de ADN).

Entre sus características más útiles está la de poseer una delación en el gen Z del operón lac, que hace que se puedan seleccionar fácilmente con ella aquellos transformantes que posean un plásmido capaz de originar la α -complementación de dicha mutación. (Miranda 2008)

6.2.2 *Aspergillus terreus* TUBF-514

Esta cepa inicialmente fue aislada del suelo del desierto de Irak por el Dr. György Szakács, pertenece a la colección de la Technical University of Budapest, Hungría. Es utilizada para la producción de lovastatina, y es considerada como la mejor productora del fármaco en Fermentación Líquida (Szakács *et al.*, 1998).

6.3 Vectores empleados

6.3.1 pJET 1.2/Blunt

El vector pJET ThermoScientific™ para extremos romos es un vector de clonación linealizado, el cual acepta insertos desde 6 pb hasta 10 kpb. Los extremos 5' del vector de clonación contienen grupos fosforilados, por lo tanto, no se requiere la fosforilación de los primers. Contiene un marcador de ampicilina además, el vector recirculado expresa una enzima de restricción letal después de la transformación que no permite la propagación. Como resultado, sólo los clones recombinantes que contienen el inserto aparecen en las placas de cultivo.

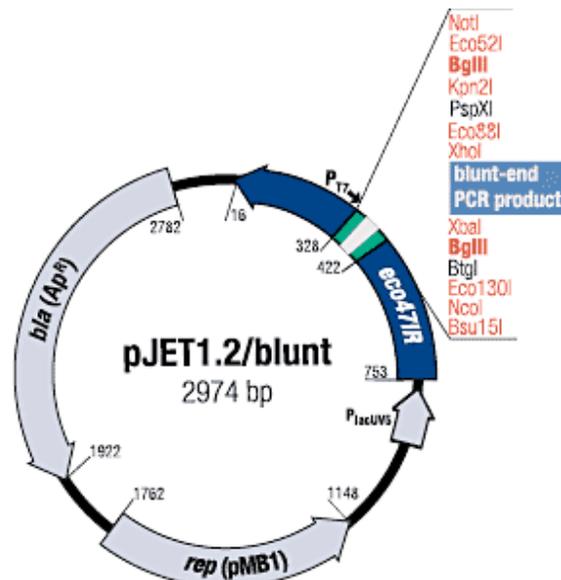


Figura 8. Mapa del vector pJET ThermoScientific™. *bla* (Ap^R) es el gen β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina; *rep* (pMB1) es el replicón del plásmido pMB1, que es el responsable de la replicación del vector; *eco47IR* es el gen letal que permite la selección positiva de las recombinantes; P_{lacUV5} es el promotor P_{lac} modificado para la expresión del gen *eco47IR* a un nivel suficiente para permitir una positiva selección.

6.3.2 Vector de silenciamiento: pGdpki-RNAi

Fue obtenido del plásmido pJL43-RNAi (Ullán *et al.*, 2008) y modificado por Marcial Quino (2011). El vector pGdpPki-RNAi contiene el promotor del gen gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa A (*gdh*) de *Aspergillus nidulans*, el terminador del gen que codifica la citocromo oxidasa 1 (*cyc1*) de *Saccharomyces cerevisiae* y el gen de resistencia a fleomicina (*ble*). Además, como se muestra en la figura 9, este vector posee los promotores de los genes *gpd* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y *pki* (piruvato quinasa), en sentidos opuestos y enfrentados, separados por un sitio de restricción *NcoI*, donde se insertó un fragmento de ADN (*AtsrrA* y *AtmsnA*, cada fragmento en una construcción diferente).

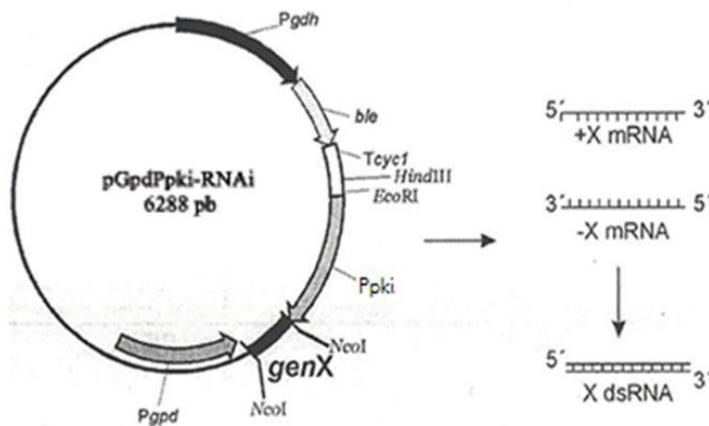


Figura 9. Mapa del vector pGdpki-RNAi. Fuente: Miranda (2013).

6.4 Medios de cultivo

6.4.1 Medios para *E. coli*

6.4.1.1 Luria-Bertani (LB)

	g/L
Bacto triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
Agar bacteriológico (para medio sólido)	15

Se disolvieron los componentes en 900 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 7 con NaOH 2N y se aforó a 1L, se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

6.4.2 Medios para *Aspergillus terreus*

6.4.2.1 Medio Power

Este medio se utiliza para propagación de las esporas y mantenimiento de la cepa.

	g/L
Sacarosa	15
Lactosa	2.5
Bacto Peptona	2.5
Sólidos de Maceración de Maíz	0.5
NaCl	2
NaNO ₃	1
K ₂ HPO ₄	0.28
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.275
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.0015
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0005
Agar bacteriológico	15

Todos los componentes se disolvieron en 900mL de agua destilada, se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 2N, se llevó hasta 1L y se esterilizó en autoclave a 120°C por 20 min.

6.4.2.2 Medio Czapek con Sorbitol

Este medio se utilizó para la regeneración de los protoplastos.

	g/L
Sacarosa	30
NaNO ₃	2
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
Sorbitol	182.17
Agar bacteriológico	10 (para 1%) ó 20 (para 2%)

Todos los componentes se disolvieron en 900mL de agua destilada, se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 2N, se llevó hasta 1L y se esterilizó en autoclave a 120°C por 20 min.

6.4.2.3 Medio PDA

Se utilizó el medio PDA Bioxon^{MR} y se siguieron las instrucciones del proveedor: 39g de polvo para cada litro de medio. Se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 2N y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 min.

6.4.2.4 Solución de sales 20X (SS20X)

	g/L
NaNO ₃	120
KCl	10.4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10.4
KH ₂ PO ₄	30.4

Se disolvieron las sales en 900 mL de agua destilada, se aforaron a 1000 mL y se guardaron a temperatura ambiente.

6.4.2.5 Solución de Elementos Traza (SET)

	g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.2
H ₂ BO ₃	1.1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
CoCl ₂ ·5H ₂ O	0.16
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.16
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.11
Na ₄ EDTA	5

Se fueron adicionando los sólidos en orden, a 80 mL de agua destilada, disolviendo cada uno completamente antes del siguiente. Se calentó a ebullición, se dejó enfriar y se ajustó el volumen a 100 mL. Se guardaron a temperatura ambiente.

6.4.2.6 Medio completo

Este medio se utiliza para obtener micelio.

	Para 100 mL
SS20X	5 mL
SET	100 µL
Glucosa	1 g
Bacto peptona	1 g
Extracto de Levadura	0.05 g

Se llevó a 100 mL de volumen y se ajustó el pH a 6.5 con KOH al 10%. Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 min.

6.4.2.7 Solución de elementos traza para medio de producción de lovastatina (SET-P)

	g/L
MnSO ₄	1.6
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3.4
CaCl ₂ ·6H ₂ O	2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5

Se fueron adicionando los sólidos en orden, disolviendo cada uno completamente antes del siguiente. Se calentó a ebullición, se ajustó el volumen y después se dejó enfriar. Se debe guardar a 4°C (Baños et al., 2005).

6.4.2.8 Medio de producción de lovastatina

Para fermentación líquida se utilizó medio 1X y para fermentación sólida 2.5X (Baños et al., 2005).

	FL	FS
	(g/L)	(g/L)
Glucosa	6	15
Lactosa	34	85
Harina de soya	3	7.5
KNO ₃	2	5
KH ₂ PO ₄	3	7.5
NaCl	0.5	1.25
MgSO ₄	0.5	1.25
SET-P (mL)	1.25	3.125

Se disolvieron todos los componentes en 900mL de agua destilada, se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 2N y se esterilizó en autoclave a 120°C por 15 min.

6.5 Antibióticos

6.5.1 Ampicilina

Se empleó ampicilina Sigma[®] para seleccionar las colonias de *E. coli* transformadas con los respectivos plásmidos. Se preparó un stock a 100mg/mL y se esterilizó por filtración en membrana de 0.22µm Millipore[™], esta solución se mantuvo a -20°C hasta su uso.

6.5.2 Fleomicina

Se empleó Fleomicina Powder (InvivoGen[®]) para seleccionar las transformantes con el vector de silenciamiento. Se preparó un stock a 20mg/mL, se esterilizó por filtración en membrana de 0.22µm Millipore[™], esta solución se mantuvo a -20°C hasta su uso.

6.6 Condiciones de cultivo

6.6.1 Crecimiento Radial

Los cultivos se hicieron en cajas de petri con 20mL de medio PDA, los cuales se inocularon con 1µL de una suspensión de esporas de 1×10^4 esporas/mL, ésta suspensión se preparó con esporas frescas y solución isotónica NaCl 0.9%. Se midió el crecimiento en centímetros cada 24 horas.

6.6.2 Esporulación para las *SimsnA*

Este análisis se hizo en cajas petri con 20mL de medio Power, las cuales se inocularon con 50µL de una suspensión de 1×10^8 esporas/mL, ésta suspensión se hizo con esporas frescas y en solución isotónica NaCl 0.9%. Se cultivaron a 30°C durante 4 días. Después de este tiempo se colectaron las esporas con una solución de tween al 0.02% (p/v) y se hizo un conteo por medio de la cámara de Neubauer.

6.6.3 Esporulación para las *SisrrA*

Se siguió el mismo protocolo que se indica en el paso 6.6.2, sólo que aquí los cultivos se realizaron en matraces de 250mL con 20mL de medio Power.

6.6.4 Análisis de sensibilidad a peróxido de hidrógeno

Se hizo con 20mL de medio PDA en cajas de petri, se utilizó un rango de concentración de 0 a 6mM con peróxido de hidrógeno Sigma[®], el cual se añadió al medio una vez que éste se encontraba tibio. Se inocularon con 10µL de suspensiones de esporas 10^2 , 10^4 , 10^6 y 10^8

esporas/mL, estas suspensiones se prepararon con esporas frescas y en solución isotónica (NaCl 0.9%). Se dejaron crecer a 30°C durante 48 horas.

6.6.5 Análisis de sensibilidad a estrés de pared

Se utilizó con Calcofluor White Sigma-Aldrich[®], el cual es un compuesto que desestabiliza la pared celular, provocando estrés de pared. Se analizó la sensibilidad a una concentración final de 300µg/mL de calcofluor en 20mL de PDA en cajas de petri. Se inoculó con 10µL de suspensiones de esporas 10⁴, 10⁵, 10⁶ y 10⁷ esporas/mL, estas suspensiones se prepararon con esporas frescas y en solución isotónica (NaCl 0.9%). Se dejaron crecer a 30°C durante 48 horas.

6.6.6 Fermentación sólida y líquida

6.6.6.1 FL

Se inoculó 50mL de medio de producción 1X con una concentración final de 2x10⁶ esporas/mL, en matraces Erlenmeyer de 250mL. Se incubaron a 30°C con una agitación de 230 rpm, durante 144 horas.

6.6.6.2 FS

El soporte utilizado fue cubos de poliuretano de 1 cm³; se inoculó 0.21g de éstos impregnados con 6mL de medio de producción 2.5X a una concentración final de 2x10⁶ esporas/mL, estos cultivos se hicieron en matraces Erlenmeyer de 250mL, los cuales se cubrieron con papel aluminio y parafilm (Pechiney Plastic Pacaging, Menasha, Wi, USA), se incubaron a 30°C con humedad controlada del 85% en incubadora RH520 ExTech[®], durante 144 horas.

6.7 Técnicas analíticas

6.7.1 Extracción de lovastatina

6.7.1.1 Fermentación sólida

Se pesó 1 g de soporte húmedo, al cual se le adicionó 10 mL de acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker[®]) al 50% con agua destilada, se dejó en agitación durante 30 min a 250 rpm y después 30 min en el sonicador (Branson 120), la muestra se filtró a través de una membrana de 0.45 µm de poro Millipore[®]. Las muestras se guardaron en microtubos de 1.5 mL a -20°C hasta su cuantificación.

6.7.1.2 Fermentación líquida

Se tomaron dos tipos de muestra: una proveniente del caldo de fermentación, del cual se tomaron 2 mL de caldo y se le adicionaron 2 mL de acetonitrilo grado HPLC J.T. Baker[®] al 50 %; la otra proveniente del micelio, se peso 1 g de micelio húmedo el cual se paso a un tubo con 5 g de perlas de vidrio y 10 mL de acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker[®]) al 50 %, seguida de una agitación en el vortex durante 2 min. Los tubos se colocaron en el sonicador durante 30 min, la muestra se filtró a través de una membrana Millipore[®] de 0.45 μ m de poro. Todas las muestras fueron guardadas en microtubos de 1.5 mL a -20°C hasta su cuantificación.

6.7.2 Cuantificación de lovastatina

Se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), utilizando una columna Novapack C-18 (150 x 3.9 mm, 4 mm), con una fase móvil de Acetonitrilo: Ácido fosfórico 0.1 % (50% v/v), la velocidad de flujo fue de 1.5 mL/min, y la forma β -hidroxiácida se determinó a 238 nm.

6.7.2.1 Curva Patrón

Se utilizó el procedimiento que describe Miranda (2013), con las siguientes modificaciones: se realizó una conversión de la lovastatina de su forma Lactona a su forma β -hidroxiácida, se usó lovastatina (Fermic S.A. de C.V.), se disolvieron en 50 mL de NaOH 0.1:25% ACN, se incubó a 45°C durante 1h y después se ajustó a pH 7.7 con HCl 0.1 N:ACN, finalmente se guardó en alícuotas a -20°C. Este proceso asegura un 98% de conversión de la forma lactona a la forma β -hidroxiácida (Yang & Hwang, 2006), sin embargo, hubo que confirmarlo mediante HPLC, para obtener una curva patrón con las concentraciones reales de la forma β -hidroxiácida.

6.7.3 Determinación de Biomasa y Humedad

En FL, la biomasa y la humedad se determinaron por peso seco, filtrando todo el contenido de un matraz a través de un papel filtro de 90mm WhatmanTM de peso constante y conocido, se dejó secar a 80 °C durante 48 h, hasta peso constante.

En el caso de FS, no se cuantificó la biomasa.

6.7.4 pH

En FS: Se tomó 1 g de soporte húmedo en 10 mL de agua destilada. La mezcla fue sometida al vortex durante 2 min, el pH fue medido directamente en el líquido resultante.

En FL: Se tomó directamente del caldo de fermentación después de haber filtrado el micelio.

6.8 Técnicas Moleculares

6.8.1 Extracción de ADN genómico de *A. terreus*

Se inocularon asadas de esporas frescas de *A. terreus* sobre 20 mL de medio completo en cajas de petri. Se incubaron a 30°C durante 20h. El micelio joven (en forma de nata) se colectó con ayuda de una espátula, se secó por arriba y abajo con papel absorbente, posteriormente se maceró hasta pulverizar con nitrógeno líquido y se guardó muestras en microtubos (llenos a la mitad) a -70°C hasta su procesamiento. Para la extracción del ADN genómico se realizó lo siguiente: A cada tubo, se le adicionaron 800 µL de Buffer de extracción (EDTA 50mm y SDA 0.2%), se incubó a 68°C durante 30 min. Se centrifugó 5 min a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le agregó 50 µL de acetato de potasio 5M pH 4.2, se mezcló bien y se colocó en hielo durante 10min. Se centrifugó 5min. Del sobrenadante se tomaron 700 µL y se le adicionaron 700 µL de isopropanol. Se centrifugó 5 min, se resuspendió en 400 µL de TE pH 8 (EDTA 1 mM-Tris-HCl 10 mM, 1:1) se adicionaron 40 µL de acetato de sodio 3M pH 7. La mezcla se calentó 68°C durante 1 h. Para solubilizar, se mezcló por agitación en vortex. Se le adicionó 1 mL de etanol al 95% y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. La mezcla se lavó 2 veces con 800 µL de etanol al 70%. El ADN se resuspendió en 100 µL de TE pH 8 con 1 µL de solución RNAsa 100 mg/mL. La mezcla se incubó a 37°C durante 1.5h. Después, se le adicionaron 300 µL de TE pH 8. Se extrajo con 1 volumen de (Cloroformo-Alcohol isoamílico, 24:1). Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se le agregó 10% del volumen total de acetato de sodio 3 M pH 5.2, más 700 µL de etanol absoluto frío (2.5 vol.). Se centrifugó durante 20 min a 14000 rpm a 4°C. La pastilla de ADN se lavó con etanol al 70% frío. Se secó sobre una superficie de papel absorbente y se resuspendió en 30 µL de H₂O grado biología molecular y se guardó a -20°C.

6.8.2 Células ultracompetentes de *E. coli*

6.8.2.1 Preparación de las células

Se hizo un preinóculo con 25 mL de medio LB al cual se inoculó con 12 colonias de células DH5 α , se incubaron a 37°C durante 8 – 10 h. Se inocularon 250 mL de LB (en un matraz de 2 L) con 2.5 mL del preinóculo. Se dejaron crecer con agitación constante (180 – 250 rpm) a 18°C durante aproximadamente dos días hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 – 0.6 a 600 nm. Se transfirió el matraz a un baño de hielo y se mantuvo durante 10 min. Se centrifugó el medio a 5,000 rpm por 10 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 80 mL de Buffer TB frío, y se mantuvo en hielo durante 10 min. Se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 20 mL de TB más 1.4 mL de DMSO, y se mantuvo en hielo durante 10 min. El volumen final se repartió en alícuotas de 100 μ L en microtubos de 1.5 mL, y se sumergió el fondo en nitrógeno líquido. Se almacenaron a -70°C para su uso (Sambrook & Russell, 2001).

6.8.2.2 Transformación de las células

Se tomaron 50 μ L de células ultra-competentes y se depositaron en un microtubo de 1.5 mL. Se le adicionaron 10 μ L de plásmido, se resuspendió suavemente y se mantuvo en hielo durante 30 min. Se transfirió la mezcla a 42°C durante 2 min y se enfrió rápidamente en hielo. Se adicionaron 800 μ L de medio LB, se mezcló por inversión y se incubó a 37°C durante 1 h. Se sembró una alícuota de 100 μ L en la superficie de una placa LB-Agar más ampicilina a una concentración final de 100 μ g/mL. Se incubó de 12 a 16 horas a 37°C (Sambrook & Russell, 2001).

6.8.3 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

6.8.3.1 Minipreps

Se inocularon 2 mL de medio LB suplementado con ampicilina (concentración final 100 μ g/mL) por cada colonia a analizar, se inoculó en tubos falcón de 15mL, se incubaron a 37°C a 250 rpm, durante toda la noche. Se centrifugó 1.5 mL de cada medio en tubos eppendorf a 5000 rpm durante 3 min, a temperatura ambiente.

TB: 10 mM Pipes; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl. Mezclar estos componentes y ajustar a pH 6.7 con KOH (1 M) y esterilizar en autoclave. Después adicionar 55 mM MnCl₂ previamente estéril.

DMSO: Antes de la elaboración de células ultra-competentes se preparan alícuotas de 1.5 mL en microtubos y se almacenan a -20°C hasta el momento de su uso.

A las células colectadas se le añadió 350µL de solución STET (EDTA 50mM pH 8, Sacarosa 8% p/v, Tris-HCl 10mM pH8 y Tritón X-100 0.5% v/v), se le añadió 20 µL de solución de lisozima 10 mg/mL (se preparó al momento y la enzima se disolvió en Tris-Cl pH 8), se homogenizó en vortex, se metieron a un baño de agua hirviendo durante 45 s, se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min, se sacó el precipitado de color blanco con un palillo estéril, al sobrenadante se le añadió 45 µL de acetato sódico 3 M pH 5.2, y 600 µL de isopropanol, se mezclaron los tubos por inversión, se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min, se tiró el sobrenadante, a la pastilla se le añadió 400 µL de Etanol 70% frío, se mezcló por inversión. Se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min, se tiró el sobrenadante y se secaron los pellets por inversión en papel, se dejó reposar los tubos a tapa abierta por 5min, finalmente se le añadió al pellet 30 µL de H₂O °BM y se guardaron a -20°C.

6.8.3.2 Midipreps

Para este procedimiento se utilizó un kit de purificación QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit, el procedimiento se describe a continuación:

Se inoculó la colonia seleccionada del miniprep en caja de petri con LB/Amp/Agar y se incubó a 37°C durante 16 h. Transcurrido el tiempo se inoculó la colonia seleccionada en 100 mL de medio LB con ampicilina a una concentración de 100µg/mL ó 30 µg/ml respectivamente y se incubó a 37°C, 300 rpm durante 16 h. Durante este tiempo se añadió solución de RNasa a Buffer P1 y se conservó a 4°C, se verificó Buffer P2 por la precipitación de SDS, si fue necesario se disolvió el SDS por calentamiento a 37°C, se enfrió el Buffer P3 a 4°C y soportes para tubos falcón de 50 mL. Transcurrido el tiempo, el medio LB con la colonia crecida se pasó a tubos falcón de 50 mL estériles. Se colectaron las células bacterianas centrifugando a 6,000 xg por 15 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet bacteriano con 2 mL de Buffer P1, se mezcló en vortex, hasta que estuvo totalmente homogéneo. Se añadió 2 mL de Buffer P2, se mezcló por inversión de 4-6 veces y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se añadió 2 mL de Buffer P3 frío, se mezcló inmediatamente por inversión de 4-6 veces y se incubó en hielo 15 min. Se centrifugó a 20,000 x g por 30 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante que contiene ADNp en otro tubo de 10 mL. Nuevamente se centrifugó 20,000 x g por 15 min a 4°C.

Se montó la columna QIAGEN-Tip 100 sobre un matraz Erlenmeyer de 125 mL con ayuda de un soporte, se equilibró aplicando 4 mL de Buffer QBT y se permitió a la columna vaciarse por flujo gravitacional. Después se aplicó el sobrenadante de los tubos dentro de la columna y se permitió que entrara a la resina y vaciarse por flujo gravitacional. Se lavó 2 veces con 10 mL de Buffer QC. Se pasó la columna a un tubo falcón de 45 mL. Se eluyó el ADNp con 5 mL de Buffer QF y se colectó el eluyente. Se hicieron alícuotas de 800 μ L del eluyente en microtubos. Se precipitó el ADNp adicionando a cada uno 560 μ L (0.7 volumen total) de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 15,000 x g por 30 min a 4°C. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante. Se lavó el pellet (ADNp) con 800 μ L de EtOH 70% a temperatura ambiente, se desprendió pellet con una punta y se mezcló por inversión, después se centrifugó a 15,000 x g por 5 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se secó pellet con golpecitos en papel absorbente y se resuspendió el ADNp de cada tubo en 50 μ L de agua grado biología molecular. Finalmente se juntaron los tubos en uno solo y se conservó a -20°C.

6.8.4 Diseño de primers

Primeramente se localizaron las secuencias de las proteínas homólogas en *Aspergillus nidulans* (para SrrA) y *Aspergillus parasiticus* (para MsnA), se realizó un análisis Blastp con *Aspergillus terreus* NIH2624 en la base de datos de NCBI (por sus siglas en inglés National Center for Biotechnology Information), de esta manera se obtuvieron la secuencia de las proteínas homólogas y a partir de éstas se obtuvo la secuencia de los genes.

El diseño de los primers se hizo sobre el exón de mayor longitud y con las siguientes condiciones: Fragmento del gen entre 300-800 pb; oligos entre 18-30 pb; oligos con secuencia para corte con la enzima de restricción *NcoI*; Tm mayor a 55°C; oligos sin “strings” (CCC o GGG); al final del oligo debe haber una “pinza” (GG o CC). Además se analizó que los primers no hibridaran entre sí (utilizando como herramienta el programa BioEditTM), ni más de una vez en el genoma de *A. terreus* NIH2624.

6.8.5 PCR para obtención de fragmentos de los genes *srrA* y *msnA*

En la tabla 1 se muestra la composición de la reacción de PCR con *Taq* polimerasa. La reacción se llevó a cabo en el Termociclador T100TM (BIORAD) con las condiciones de reacción que se muestran en la tabla 2.

Tabla 1. Componentes de la reacción de PCR con *Taq* Polimerasa.

Componente	Concentración inicial	Concentración final en la reacción	Volumen (μL) para 100 μL de preparación
H ₂ O (Grado Biología Molecular)	-	-	58
<i>Taq</i> Buffer	5x	1 x	20
MgCl ₂	25mM	1-4 mM	12
dNTPs	10 mM	200 μM	4
Oligo Forward	10 μM	0.5 μM	2
Oligo Reverse	10 μM	0.5 μM	2
ADN molde	0.2837 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$	1.5
<i>Taq</i> DNA Polimerasa (Promega®)	5 U/ μL	1.25 U /50 μL	0.5

Tabla 2. Condiciones PCR *srrA* y *msnA* con *Taq* Polimerasa.

1	Desnaturalización inicial	95°C ; 2 min
2	Desnaturalización	95°C ; 30 s
3	Alineamiento	58°C ; 30 s
4	Extensión	72°C ; 1 min
5	Go to	Paso 2 por 35 ciclos
6	Extensión final	72°C ; 5 min
7	Guardar	4°C ; ∞

También se amplificaron los fragmentos con *Pfu* DNA Polimerasa, la composición de la reacción se muestra en la tabla 3 y las condiciones de la misma en la tabla 4.

Tabla 3. Preparación PCR para obtener sondas de *srrA* y *msnA* con *Pfu* Polimerasa.

Componente	Concentración inicial	Concentración final en la reacción	Volumen (μL) para 100 μL de preparación
H ₂ O °BM (Grado Biología Molecular)	-	-	72
<i>Pfu</i> Buffer con MgSO ₄	10x	1 x	10
dNTPs	10 mM	200 μM	2
Oligo Forward	10 μM	0.5 μM	5
Oligo Reverse	10 μM	0.5 μM	5
ADN molde	0.2837 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$	3.5
<i>Pfu</i> DNA Polimerasa (Thermo Scientific™)	2.5 U/ μL	1.25-2.5 U /50 μL	2.5

Tabla 4. Condiciones PCR *srrA* y *msnA* con *Pfu* Polimerasa

1	Desnaturalización inicial	95°C ; 2 min
2	Desnaturalización	95°C ; 45 s
3	Alineamiento	58.5°C ; 30 s
4	Extensión	72°C ; 3 min
5	Go to	Paso 2 por 30 ciclos
6	Extensión final	72°C ; 5 min
7	Guardar	4°C ; ∞

6.8.6 PCR para confirmación de construcción de silenciamiento en el genoma de las transformantes

Se utilizaron los primers diseñados por (López-Calleja, 2014), los cuales hibridan en el vector de silenciamiento (pGdpki-*RNAi*). El primer juego hibrida sobre la secuencia del gen *ble* dentro del vector de silenciamiento. El segundo juego hibrida en el promotor *pki*. Para ambos se realizó un gradiente de temperatura para encontrar la T_m donde no hubiera amplificación en el genoma de la parental (control negativo) pero sí en vector de silenciamiento sin inserto (control positivo). La composición para ambos juegos se muestra en la tabla 5 y las condiciones de reacción para *ble* en la tabla 6 y para *pki* la tabla 7.

Tabla 5. Componentes de la reacción de PCR para prueba de inserción con *Taq* Polimerasa.

Componente	Concentración inicial	Concentración final en la reacción	Volumen (μL) para 100 μL de preparación
H ₂ O (Grado Biología Molecular)	-	-	58
<i>Taq</i> Buffer	5x	1 x	20
MgCl ₂	25mM	1-4 mM	12
dNTPs	10 mM	200 μM	4
Oligo Forward	10 μM	0.5 μM	2
Oligo Reverse	10 μM	0.5 μM	2
ADN molde	0.2837 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$	1.5
<i>Taq</i> DNA Polimerasa (Promega®)	5 U/ μL	1.25 U /50 μL	0.5

Tabla 6. Condiciones PCR para el juego de primers *ble*.

1	Desnaturalización inicial	95°C ; 2 min
2	Desnaturalización	95°C ; 30 s
3	Alineamiento	59°C ; 30 s
4	Extensión	72°C ; 1 min
5	Go to	Paso 2 por 35 ciclos
6	Extensión final	72°C ; 5 min
7	Guardar	4°C ; ∞

Tabla 7. Condiciones PCR para el juego de primers *pki*.

1	Desnaturalización inicial	95°C ; 2 min
2	Desnaturalización	95°C ; 30 s
3	Alineamiento	68°C ; 30 s
4	Extensión	72°C ; 1 min
5	Go to	Paso 2 por 35 ciclos
6	Extensión final	72°C ; 5 min
7	Guardar	4°C ; ∞

El juego de primers *ble* amplifica un fragmento entre 350 y 400 pb, mientras que para el juego *pki* se amplifica un fragmento de alrededor de 1kpb.

6.8.7 Purificación de sondas por corte de banda

Se utilizó el kit de purificación Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega[®]. Se siguió el protocolo tal y como lo indica el proveedor.

6.8.8 Clonación de los fragmentos

Se realizó con el kit CloneJET[™] PCR Cloning, Thermo Scientific[™]. La proporción de las sondas con respecto al vector pJET fue 3:1, por lo que composición de la reacción se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Composición de la reacción de ligación al vector de clonación, para *srrA* y *msnA*.

Componente	Volumen (μL)
2X Buffer de reacción	10
Producto de PCR purificado	4
Vector (50ng/μL)	1
Agua (Grado Biología Molecular)	4
T4 DNA ligasa, Thermo Scientific [™]	1
Volumen final	20

La reacción se incubó a 22°C durante 10 minutos, después se transformaron células ultracompetentes con 10 μL de la mezcla de reacción como se indica en el punto 6.8.2.2.

6.8.9 PCR de colonia

Se preparó la mezcla de reacción para PCR por colonia a estudiar (tabla 9).

Tabla 9. Composición de la reacción para la PCR de colonia, los primers utilizados fueron los del kit CloneJET[™] PCR Cloning.

Componente	Concentración inicial	Volumen (μL) para 20 μL de preparación
H ₂ O °BM (Grado Biología Molecular)	-	13.1
<i>Taq</i> Buffer 5X	10x	4
MgCl	10x	1.2
dNTPs	10 mM	0.8
Oligo Forward	10 μM	0.4
Oligo Reverse	10 μM	0.4
<i>Taq</i> DNA Polimerasa (Promega [®])	5 U/ μL	0.1

En la campana de extracción, se tomó una colonia con una punta para micropipeta estéril (de 200 mL), la colonia tomada se inoculó en una nueva placa LB/Agar con Ampicilina

100µg/mL, para descargar la mayoría de las células, y posteriormente se introdujo la misma punta dentro de la reacción de PCR durante 5 min (sin agitar).

Posteriormente, el tubo se tomó y se colocó dentro del termociclador (T100™). El programa utilizado se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Condiciones de reacción para el PCR de colonia.

1	Desnaturalización inicial	95°C ; 3 min
2	Desnaturalización	94°C ; 30 s
3	Alineamiento	60°C ; 40 s
4	Extensión	72°C ; 90 s
5	Go to	Paso 2 por 30 ciclos
6	Extensión final	72°C ; 5 min
7	Guardar	4°C ; ∞

6.8.10 Digestiones con *NcoI*

Las digestiones se realizaron con la enzima de restricción *NcoI* a 37°C durante 3 horas con la composición que se indica en la tabla 11.

Tabla 11. Composición de la reacción de digestión con *NcoI*.

Componente	Volumen (µL)
Agua (Grado Biología Molecular)	14.3
Buffer tango 10X	2
DNA plasmídico	3
RNAsa (10 mg/mL)	0.2
<i>NcoI</i> (Thermo Scientific™)	0.5
Volumen final	20

6.8.11 Construcción de los vectores de silenciamiento

6.8.11.1 Desfosforilación

Se desfosforiló el vector pGdpki-RNAi digerido para evitar que se recircule y cause falsos positivos en la transformación. La reacción se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Composición de la reacción de desfosforilación

Concepto y concentración	Volumen (µL)
H ₂ O (Grado Biología Molecular)	12.5
Buffer SAP 10X	2
ADN (pGdpki-RNAi)	5
SAP 1U/µL (Promega®)	0.5
TOTAL	20

Se incubó a 37°C durante 30 min, después se inactivó la fosfatasa a 65°C durante 5 min.

6.8.11.2 Ligación del vector con el inserto

La ligación se realizó con el vector digerido y desfosforilado. La composición de la reacción se muestra en la tabla 13, donde la relación vector-inserto fue de 5:1.

Tabla 13. Composición de la reacción de ligación.

Concepto y concentración	Volumen (µL)
H ₂ O (Grado Biología Molecular)	8
Buffer T4 10X	2
Vector	3
Inserto (<i>msnA</i> o <i>srrA</i>)	6
T4 DNA Ligasa 5U/µL (ThermoScientific™)	1
TOTAL	20

La reacción se incubó a 22°C durante 15 min. Se transformó células ultracompetentes como se indica en el punto 6.8.2.2, y tomando controles positivos y negativos como se indica en la tabla 14.

Tabla 14. Controles positivos y negativos para la transformación de las células de *E. coli* con las construcciones de silenciamiento.

Tratamiento	Objetivo	Observaciones
Células sin transformar en medio LB sin ampicilina	Verificar el buen estado de las células	- Si crece indica que las células son viables - Si no hay crecimiento las células no son funcionales y se tiene que proseguir a elaborar nuevas.
Células en medio con ampicilina	Verificar el medio de cultivo	- Si no crece indica que el medio contiene la ampicilina necesaria para inhibir el crecimiento de células sin transformar. - Si crece puede indicar que el medio no tiene la suficiente ampicilina para inhibir el crecimiento o que la ampicilina ya no sirve y se ha degradado o que las células tengan ya la resistencia a ampicilina. Para solucionarlo se elabora nuevo medio de cultivo con ampicilina funcional si se sigue observando el mismo comportamiento se pueden analizar las células para verificar que no tenga algún plásmido que les confiera resistencia así mismo elaborar nuevas células.
Células transformadas con resistencia a ampicilina en medio con ampicilina	Verificar medio de cultivo	-Si crecen verifica que el medio permite el crecimiento para aquellas que tienen resistencia y que la inhibición del crecimiento sea por la ampicilina y no por algún otro factor como alguna carencia de algún factor nutricional. - Si no crece se puede deber a que medio contenga un exceso de ampicilina o que las transformantes ya han perdido la resistencia a la ampicilina o no son viables. Para solucionarlo se prosigue a verificar con otras transformantes el medio de cultivo si se observa de nuevo que no hay crecimiento, se puede sembrar en nuevo medio con y sin ampicilina para ver su comportamiento.

<p>Células transformadas con vector sin digerir en medio LB con ampicilina</p> <p>Células transformadas con vector digerido en Medio con ampicilina</p>	<p>Verificar trasformación y vector</p> <p>Verificar digestión</p>	<p>- Si hay crecimiento verifica la viabilidad del vector así como que la trasformación se llevo a cabo correctamente.</p> <p>-Si no hay crecimiento se puede llevar a cabo la prueba con otro vector o en otras condiciones la trasformación para verificar cuál de estos factores está fallando.</p> <p>-Si no crece es que todo el vector esta lineal, esto implica que la digestión del vector se llevo a cabo correctamente. El número de colonias que crezcan nos indica la cantidad de vector circular ya sea por recircularizacion o que no se digirió.</p> <p>-Si hay crecimiento es que el vector no se digirió correctamente o que se esta recircularizando. En general la digestión se tiene que purificar y verificar que el vector este linealizado antes usarlo.</p>
<p>Células transformadas con vector digerido y ligado en medio con ampicilina</p>	<p>Verificar ligación</p>	<p>-Si hay crecimiento quiere decir que la ligasa está funcionando adecuadamente, se tiene que observar la misma cantidad de colonias que en la caja del vector sin digerir.</p> <p>-Si no hay crecimiento se puede deber a que el vector no sea viable se haya degenerado o que la reacción de la ligasa tenga alguna deficiencia esta puede ser el Buffer que no contenga ATP, el tiempo de reacción sea insuficiente, la temperatura no sea la adecuada o que la ligasa haya perdido su actividad.</p>
<p>Células transformadas con vector digerido y desfosforilado en medio con ampicilina</p> <p>Células transformadas con vector digerido desfosforilado y ligado en medio con ampicilina</p>	<p>Verificar Desfosforilación y fondo de la ligación con vector desfosforilado</p> <p>Verificar desfosforilación, fondo de la ligación vector-inserto</p>	<p>-Si no hay crecimiento es que la desfosforilación es óptima y no hay recircularización del vector.</p> <p>-Si hay crecimiento es que el vector se está recirculando, para ello hay que mejorar las condiciones de la reacción de la desfosforilación: temperatura tiempo y concentración.</p> <p>-Si no hay crecimiento es que la desfosforilación es óptima y no se religa el vector con sí mismo. Entre menor sea el número de colonias nos garantiza mejores condiciones para la ligación vector-inserto.</p> <p>-Si un gran número de colonias (mayor a 30) es que las condiciones de ligación no son las correctas.</p>

6.8.12 Obtención de transformantes silenciadas

6.8.12.1 Obtención de protoplastos

Se hicieron cultivos de *A. terreus* en tres matraces de 250mL con 20 mL de medio completo, se inocularon con esporas frescas a una concentración final de 1×10^8 esporas/mL, se cultivaron a 30°C a 200 rpm. En un tubo falcón de 15 mL se agregaron 10 mL de SP2X y se dejó en hielo, después se mezcló con 150 mg de enzimas líticas (Sigma-Aldrich®). Se agitó en vortex hasta homogenizar y se dejó reposar por 5 min, se esterilizó por filtración a

través de una membrana Milipore® de 0.22 µm, se deja la solución en hielo. El cultivo de micelio en medio completo se monitorea a las 20 horas, hasta observar en el microscopio poca ramificación (micelio joven), después se juntó este micelio en un solo matraz para después filtrarlo. Se lavó con 100 mL de NaCl 0.9%. Una vez lavado el micelio se pasa del filtro al papel absorbente para secarlo poniendo en contacto el papel por encima y por debajo del micelio. En la campana se peso 1g de micelio seco, se colocó en un matraz de 250 mL y se agregó 10 mL de la solución SP2X/Enzimas líticas hecha anteriormente. Se incubó a 30°C a 80 rpm y se monitoreó cada hora en el microscopio para observar la formación de protoplastos. La reacción duró aproximadamente 3 horas: cuando se observaron protoplastos aislados el igual que conglomerados sin pared celular. Se filtró nuevamente el micelio, en el filtrado se encuentran a los protoplastos. El filtrado se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante dejando 5mL con el pellet del fondo (protoplastos). Esto se resuspendió por inversión, para distribuir 1mL por cada microtubo; estos se centrifugaron a 6000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se tiró el sobrenadante. Se agregó al pellet 500 µL de SP2X, se resuspendió por inversión y centrifugó a 6000rpm por 7min a 4°C, se desechó el sobrenadante. Y se agregó nuevamente 500µL de SP2X, se resuspendió por inversión y se centrifugó a 6000 rpm por 7 min a 4°C. Se lavó el pellet con 1 mL de KCM, se centrifugó a 6000 rpm por 10 min a 4°C. Se tiró el sobrenadante dejando únicamente de 100 o 200 µL para resuspender por inversión nuevamente el pellet y agregar 20 µL de PCM.

6.8.12.2 Transformación de *A. terreus*

En hielo, en nuevos microtubos de 1.5 mL, se agregó 15 µL de DNA (construcciones de silenciamiento purificadas) y a estos se añadió 100 µL de protoplastos, se mezcló por inversión y se deja reposar 20 minutos en hielo, se tomó uno como control donde no haya ADN. Se agregó 600 µL de PCM, se mezcló por inversión y se dejó reposar 20 min a temperatura ambiente. Se agregó 600 µL de KCM, se mezcló bien y se dejó a temperatura ambiente hasta la extensión de la placa.

SP2X: KCl 1.1M y Ácido cítrico 0.1 M. Ajustar pH a 5.8 con KOH 0.1 M.

KCM: KCl 0.7 M; CaCl₂ 50 mM; MES 10 mM. pH 5.8 ajustar con HCl 10 %.

PCM: CaCl₂ 50mM ; MES 10 mM; Polietilenglicol 6000 30%. Ajustar pH a 5 con HCl 10%.

Extensión en placa

Se preparó en tubos falcón estériles de 50 mL el medio Czapek/Sorbitol (agar 2%) junto con su respectiva concentración de fleomicina, en placas petri chicas (5 cm), se vació 5 mL de este medio a 50°C y se dejó solidificar. En nuevos tubos falcón estériles de 50 mL se agregó el medio Czapek/Sorbitol (agar 1%) con su respectiva concentración fleomicina y 300 µL de mezcla de transformación por cada 5 mL de medio, se vertió en cajas de petri con bases anteriormente hechas y se dejó solidificar. Se incubó a 30°C por 5 días, monitoreando cada día.

6.8.13 Aislamiento de transformantes

Se elaboró un protocolo de aislamiento de transformantes, la secuencia de éste se muestra gráficamente en la figura 10. El objetivo de este nuevo protocolo es obtener transformantes estables, evitar que las transformantes finales posean heterocarión (dos diferentes tipos de núcleos). En la figura se observa la obtención de protoplastos por la digestión de micelio joven con enzimas líticas (A), estos protoplastos son transformados (B) con las construcciones de silenciamiento (pGdpki-*srrA* y pGdpki-*msnA*) por separado, dando como resultado una mezcla de protoplastos con núcleo transformado (color naranja) y no transformado (color negro), pero el verdadero problema surge cuando estos protoplastos se fusionan unos con otros, dando como resultado dicariones. Como es de esperarse, la extensión en placa (C) sobre medio de selección con fleomicina (sólo crecerán aquellos protoplastos que contengan al menos un núcleo transformado) nos dará como resultado tres tipos de micelio: un solo núcleo transformado, dicarion transformado y heterocarion (uno transformado y otro no). El primer pase (D) es con el objetivo de eliminar el micelio dicarion, y se hace pasando el micelio a un medio de esporulación (Power), en el cual las esporas que se formen sólo llevarán un núcleo, y por lo que tendremos dos variantes: esporas con núcleo transformado y esporas con núcleo no transformado. Estas esporas se inocularon en medio de selección de fleomicina, donde sólo obtendremos un tipo de micelio: con un solo núcleo transformado. Por lo que para el segundo pase (E) ya habíamos seleccionado un solo tipo de esporas.

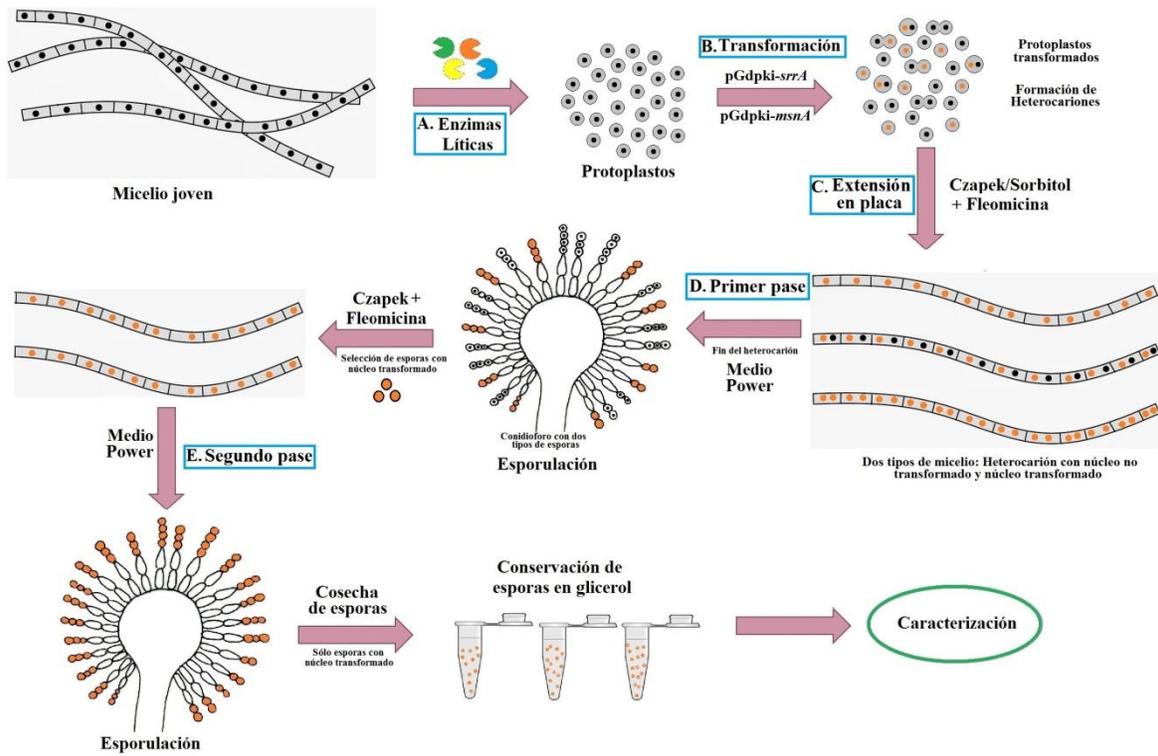


Figura 10. Secuencia para el aislamiento de las transformantes.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de los genes *in silico*

Se identificaron los genes homólogos *srrA* y *msnA* en el genoma de *Aspergillus terreus* NIH2624 dentro de la base de datos NCBI (National Center of Biotechnology Information); como se muestra en la tabla 15 para el homólogo de *srrA* se obtuvo 89% de identidad con *A. oryzae* y para el homólogo de *msnA* 70% con *A. parasiticus*.

Tabla 15. Resumen de resultados obtenidos del Blastp realizado en el genoma de *Aspergillus terreus* NIH2624 con los homólogos de los genes *srrA* y *msnA*.

	<i>srrA</i>	<i>msnA</i>
Título	Hypothetical Protein, similar to stress response regulator SrrA	Conserved hypothetical protein
Código	ATEG_03268.1	ATEG_05308
Número de acceso	XM_001212446.1	XP_001214486
Identidad	89 % (537/645) con <i>A. oryzae</i> RIB40 78% (415/533) con <i>A. nidulans</i>	70% (436/621) con <i>A. parasiticus</i>

7.2 Amplificación de fragmentos de los genes

Con el objetivo de obtener un fragmento de los genes homólogos, se diseñaron primers para cada uno. La estructura final y características de los primers se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Primers diseñados para amplificar un fragmento de los genes. Para el gen *srrA* se diseñaron dos juegos de primers.

	Secuencia 5' → 3'	Tm (°C)	Longitud de Oligos (pb)	Longitud de la sonda (pb)
<i>srrA</i>	F1 TCA AAC CCA TGG AGT TTC GCG CC	59	23	398
	R1 ATC ATC CAT GGA GGC GAC TTG GG	58	22	340
	F2 CTC GAC CAT GGT CGT CGC AAG G			
	R2 GGC CAT GGC TAA GGG TTG AGC C			
<i>msnA</i>	F GGC CAT GGA GCA ATA CTA CGG G	70	22	476
	R GTG CCA TGG GCG GCG AGTC G		20	

7.2.1 Gradiente de temperatura

Para encontrar la temperatura de hibridación (Tm) óptima para amplificar los fragmentos de los genes se hizo una PCR con gradiente partiendo de la Tm de diseño. Para *srrA*, además se probaron las cuatro combinaciones de ambos juegos de primers para encontrar el ideal.

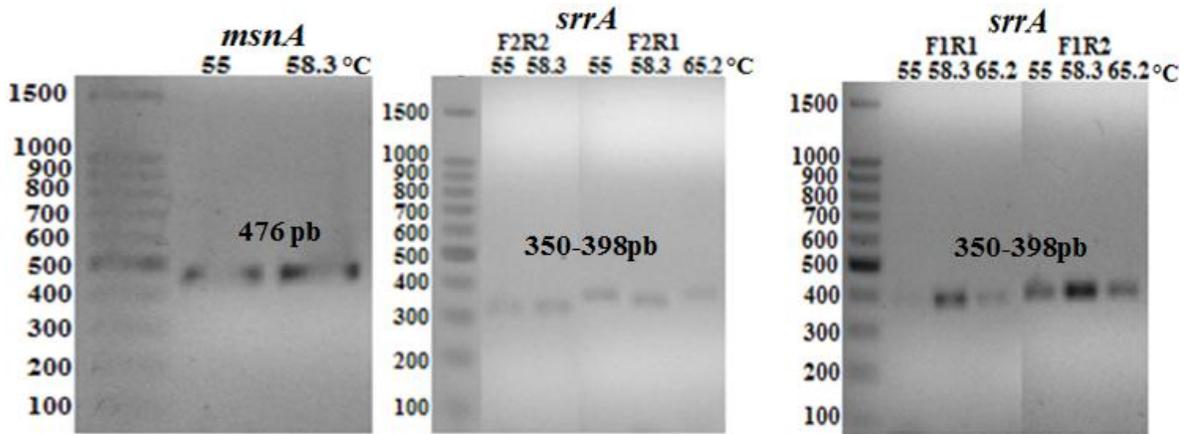


Figura 11. Gel de agarosa al 1.2% que muestra el resultado del gradiente de temperatura para determinar la T_m óptima.

En el caso de la amplificación del fragmento de *msnA* la T_m estuvo muy por debajo de la de diseño, para *srrA* la T_m correspondió a la diseño y las cuatro combinaciones de primers dieron un buen resultado (Figura 11).

Finalmente la temperatura óptimas para los primers de *srrA* y *msnA* fueron de 58 °C. Se corroboró realizando una nueva PCR, además se probaron las dos mejores combinaciones de primers para *srrA*, F1R1 y F1R2, como se muestra en la figura 12. Para *srrA* la combinación de primers con la cual se trabajó finalmente fue F1R2.

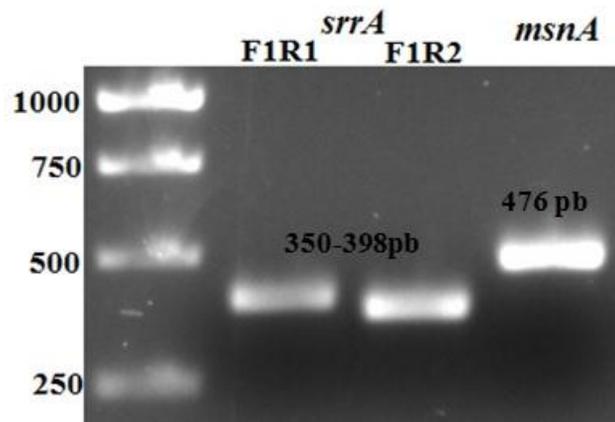


Figura 12. Gel de agarosa al 1.2% que muestra el resultado de la PCR a 58°C.

7.2.2 Secuenciación

Los fragmentos de los genes amplificados se secuenciaron con el objetivo de corroborar que los fragmentos amplificados corresponden a los genes. Se hizo un Blast con cada una de las secuencias obtenidas y los resultados coinciden con los genes *srrA* y con *msnA* (Tabla 17).

Tabla 17. Resultado del análisis tipo Blast de cada una de las secuencias obtenidas.

Gen	Resultado del Blast	No. De Acceso Gen Bank	% de identidad
<i>AtsrrA</i>	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 hypothetical protein (ATEG_03268) partial mRNA; note="similar to stress response regulator SrrA"	XM_001212446.1	98% (256/260)
<i>AtmsnA</i>	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 conserved hypothetical protein (ATEG_05308) partial mRNA	XM_001214486.1	97% (428/439)

7.3 Clonación de los fragmentos

7.3.1 Amplificación y Purificación

Con el objetivo de amplificar los fragmentos con mayor fidelidad y extremos romos se procedió a realizar una PCR utilizando *Pfu* DNA Polimerasa. El producto de la PCR se purificó por corte de banda.

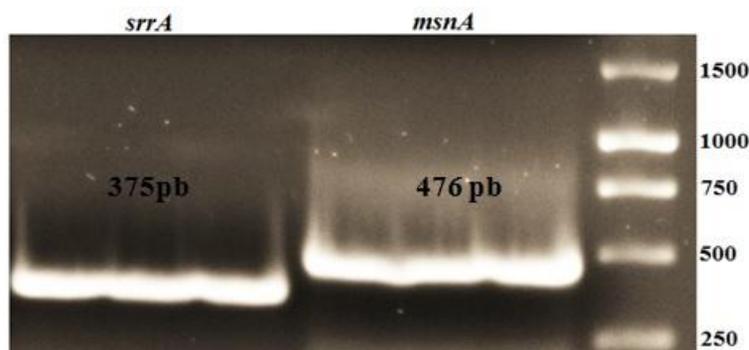


Figura 13. Gel de agarosa al 1.2% que muestra el resultado de la PCR con *Pfu* DNA Polimerasa, de aquí se cortó las bandas correspondientes a cada gen para su purificación.

7.3.2 Clonación de los fragmentos

Se ligó el fragmento de cada gen al vector de clonación pJET (por separado). Se transformaron las mezclas de ligación en *E. coli* y posteriormente, de ellas se purificaron los fragmentos de cada gen a gran escala. Este punto es sumamente importante para resguardar y tener disponibles las cantidades que necesitaremos de los fragmentos de cada gen.

Las colonias que crecieron en ampicilina se analizaron por PCR de colonia y de ADN genómico para corroborar que se transformaron con las construcciones *srrA*-pJET y *msnA*-pJET:

a) PCR de colonia

Se observó la amplificación de los fragmentos correspondientes a la suma de la longitud del fragmento más los nucleótidos donde hibridan los primers (dan como resultado un fragmento de 460 pb para *srrA* y para *msnA* es de 560 pb) en las PCRs de colonia realizadas (Figura 14).

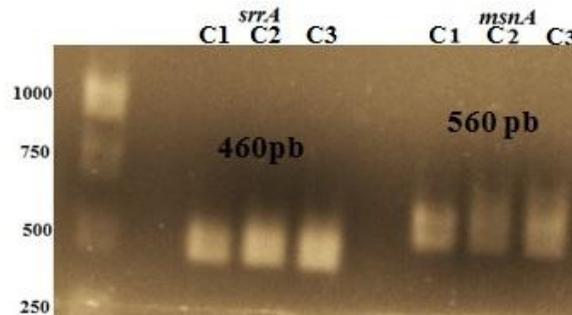


Figura 14. Gel de agarosa al 1.2% que muestra el resultado de la PCR de colonia hecha para 3 colonias por cada gen de *E. coli* transformadas con las construcciones *srrA*-pJET y *msnA*-pJET.

b) Minipreps

Se analizaron 4 colonias por cada gen. En la Fig 15 se observa la liberación de los fragmentos que coincide con su tamaño, el vector pJET lineal se ve como una banda a 3 kpb.

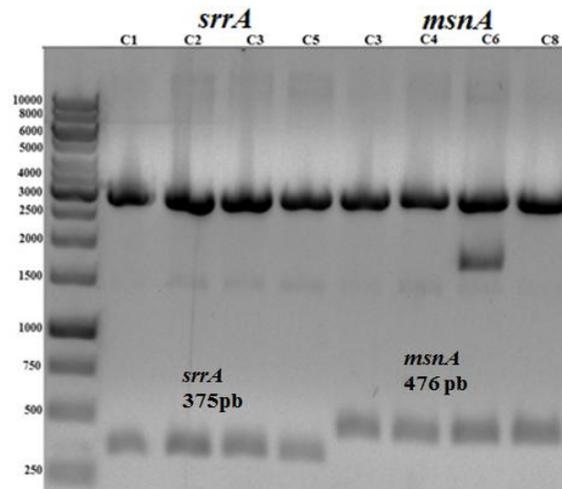


Figura 15. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la digestión del ADNp obtenido por minipreps.

7.3.3 Secuenciación de los fragmentos clonados

Se secuenció una vez más para probar que los fragmentos de los genes se encuentran en buen estado, esta vez habían sido amplificados con *Pfu* DNA polimerasa.

Tabla 18. Análisis tipo Blast de cada una de las secuencias obtenidas.

Gen	Resultado del Blast	No. De Acceso Gen Bank	% de identidad
<i>AtsrrA</i>	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 hypothetical protein (ATEG_03268) partial mRNA; note="similar to stress response regulator SrrA"	XM_001212446.1	97% (294/302)
<i>AtmsnA</i>	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 conserved hypothetical protein (ATEG_05308) partial mRNA	XM_001214486.1	99% (391/396)

7.4 Construcción de los vectores de silenciamiento

7.4.1 Purificación de fragmentos con corte *NcoI*

Para la ligación de los fragmentos con el vector de silenciamiento (pGdpki-*RNAi*) se requiere que éstos tengan extremos protuberantes de corte *NcoI*. Se purificaron y digirieron con *NcoI* las construcciones *srrA*-pJET y *msnA*-pJET, para obtener fragmentos que ya poseen los extremos deseados (Figura 16).

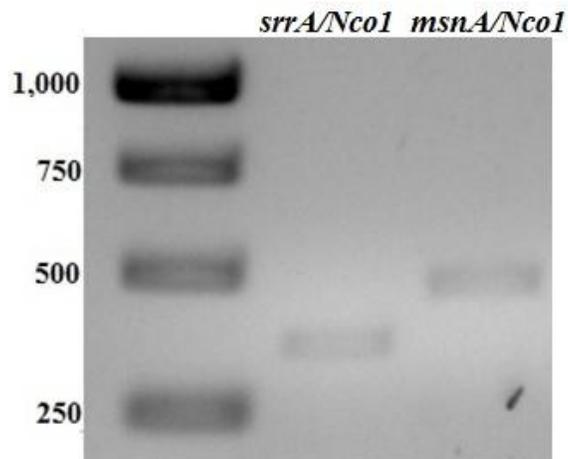


Figura 16. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de los fragmentos purificados con corte *NcoI*.

7.4.2 Construcción de pGdpki-*srrA* y pGdpki-*msnA*

Para las construcciones de silenciamiento se realizó la digestión del vector de silenciamiento sin inserto (pGdpki-*RNAi*) con la enzima de restricción *NcoI* y posteriormente se desfosforiló con SAP Fosfatasa para evitar su recircularización; finalmente se ligó con el inserto correspondiente (*srrA* y *msnA*, por separado). Para este experimento se utilizaron las células ultracompetentes y se analizaron 9 colonias correspondientes a cada gen. Se purificaron los ADN plasmídicos, los cuales se digirieron con *NcoI*. Al correrlos en geles de agarosa se observó que la mayoría liberó el fragmento del gen. El vector pGdpki-*RNAi* lineal se observa alrededor de 7 kpb (Figura 17).

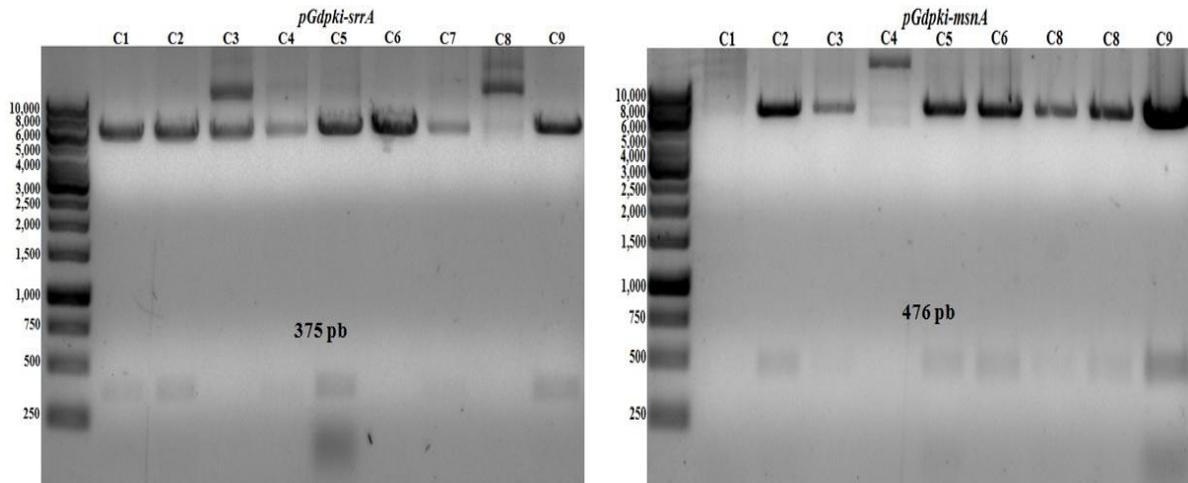


Figura 17. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la digestión con *NcoI* del ADNp obtenido por minipreps de 9 colonias de cada gen.

7.4.3 Purificación de pGdpki-*srrA* y pGdpki-*msnA* a gran escala

Para la posterior transformación de *A. terreus* se requiere que las construcciones estén a una alta concentración y pureza, por lo que se purificaron por medio de Midipreps con el kit de purificación Qiagen®. Las construcciones purificadas y digeridas con *NcoI* se corrieron en un gel para confirmar su tamaño y pureza; en la fig. 8 se observa el vector pGdpki lineal alrededor de 7 kpb, además de la liberación de los fragmentos que se comparan con los originales.

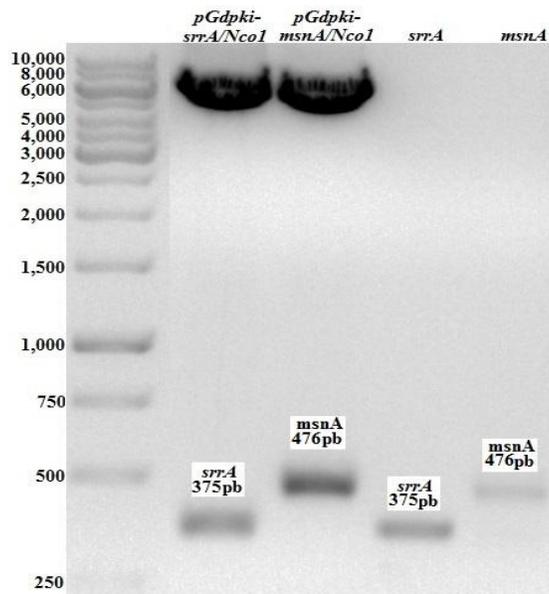


Figura 18. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la digestión con *NcoI* de las construcciones purificadas obtenidas de la colonia 2 para pGdpki-*srrA* y la colonia 2 para pGdpki-*msnA*.

Tabla 19. Se muestra la concentración y pureza que alcanzaron las construcciones por su purificación con el kit Qiagen®.

Concepto	ng/μL	Pureza	
		260/280	260/230
pGdpki- <i>srrA</i>	2880	1.83	2.15
pGdpki- <i>msnA</i>	2979	1.83	2.14
pGdpki-RNAi	2942	1.87	2.03

7.4.4 Secuenciación de las construcciones de silenciamiento

Se mandó a secuenciar por tercera vez, se enviaron las construcciones completas. En la Tabla 20 se muestra el resultado obtenido.

Tabla 20. Análisis tipo Blast de cada una de las secuencias obtenidas.

Gen	Resultado del Blast	No. De Acceso Gen Bank	% de identidad
<i>AtsrrA</i>	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 hypothetical protein (ATEG_03268) partial mRNA; note="similar to stress response regulator SrrA"	XM_001212446.1	94% (308/326)
<i>AtmsnA</i>	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 conserved hypothetical protein (ATEG_05308) partial mRNA	XM_001214486.1	98% (418/426)

7.5 Transformación de *Aspergillus terreus*

Primeramente se determinó la concentración mínima inhibitoria de fleomicina, la cual fue de 130 μg/mL. Posteriormente se transformó al hongo con las construcciones pGdpki-*srrA* y pGdpki-*msnA* por separado. Las transformantes obtenidas se aislaron, como se describe en metodología, al final del aislamiento de transformantes sólo se quedaron 4 transformantes verdaderas *SisrrA* y 7 *SimsnA*.

Tabla 21. Se muestra el número de transformantes obtenidas y la concentración de fleomicina a la cual crecieron.

Concepto	Número de transformantes	Concentración de Fleomicina (μg/mL)
<i>SisrrA</i>	4	180-190
<i>SimsnA</i>	7	160-180

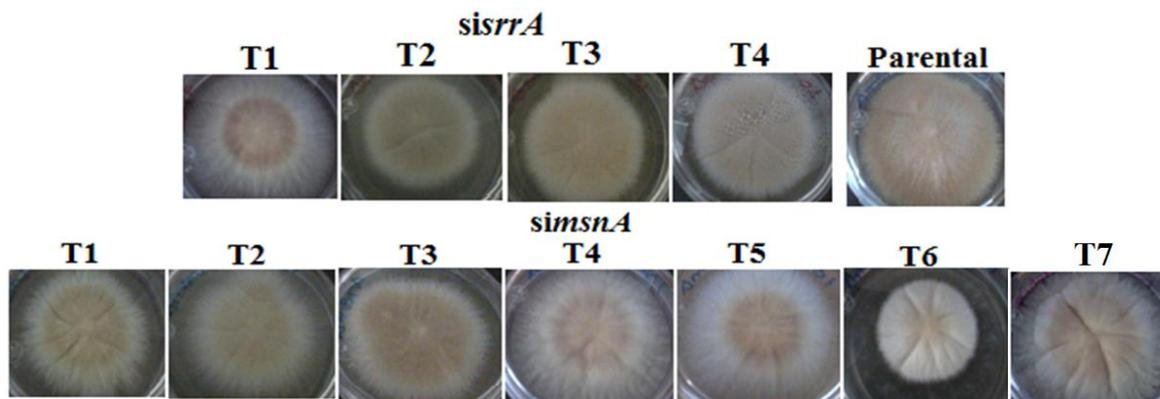


Figura 19. Fenotipo de las transformantes en medio Power después del segundo pase por fleomicina.

7.6 Caracterización de las transformantes

7.6.1 Crecimiento radial

Se determinó si había un efecto del silenciamiento de cada gen en el crecimiento radial. Se realizó por cuadruplicado, es decir, se inocularon 4 veces una misma placa. Se realizó en medio Power y también en PDA.

7.6.1.1 Transformantes silenciadas con el gen *srrA*: *SisrrA*

En la Tabla 22, se aprecia que las velocidades de crecimiento correspondiente a T1, T2 y T3 tienen diferencia significativa con la parental en medio Power. En el medio PDA, todas tienen diferencia significativa con la parental, para T1 no se pudo medir su crecimiento por fallas en la inoculación. Las diferencias en fenotipo se aprecian como apariencia de las colonias en las figuras 20 y 21. En la figura 22 se aprecia la producción de pigmentos por la T2, el medio se tiñe de color rojo oscuro, señal de producción de metabolitos secundarios.

Tabla 22. Velocidad promedio lineal de crecimiento de las *SsrrA* en medio Power y PDA, la diferencia significativa (*) está basada en la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett ($p < 0.05$).

	Medio Power		Medio PDA	
	Velocidad Lineal (mm/día)	Desviación estándar	Velocidad Lineal (mm/día)	Desviación estándar
Parental	8.37	± 0.25	7.56	± 0.125
T1	9.12*	± 0.14	-	-
T2	9.44*	± 0.31	6.69*	± 0.125
T3	9.69*	± 0.24	6.56*	± 0.125
T4	8.7	± 0.35	5.81*	± 0.125

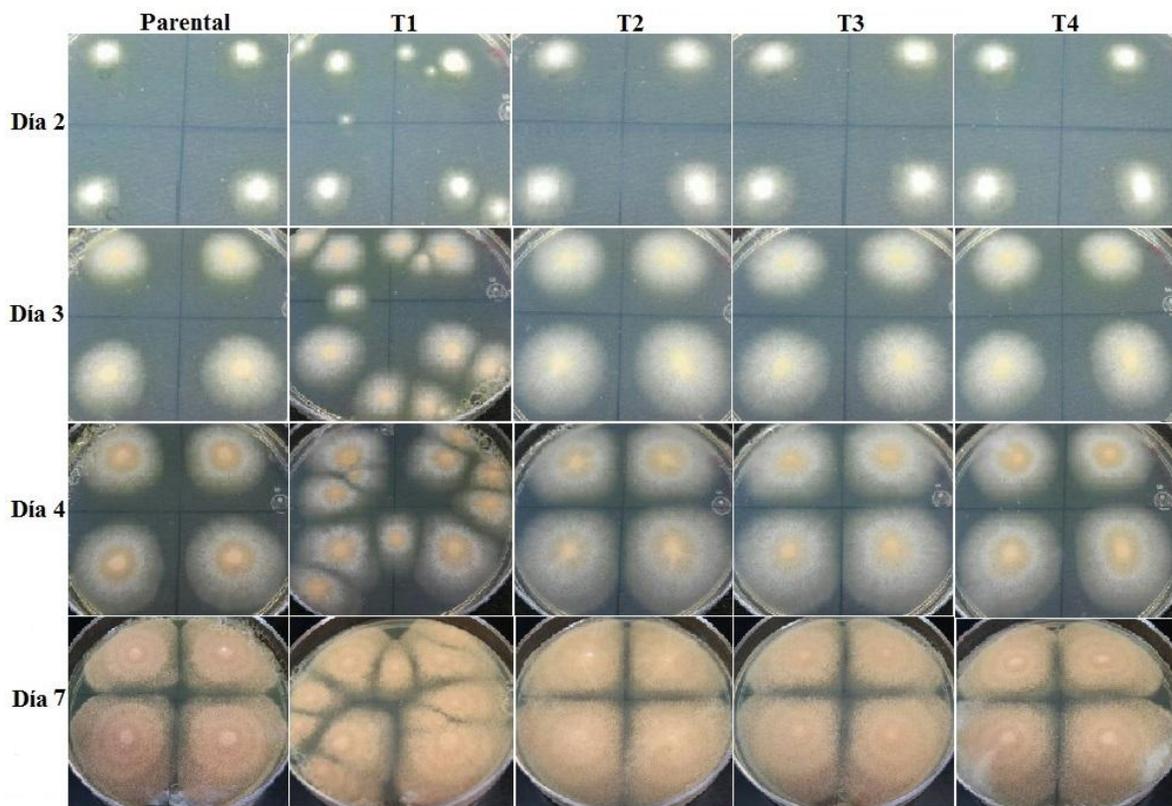


Figura 20. Fenotipo de las transformantes *SisrrA* en placas con medio PDA durante 5 días.

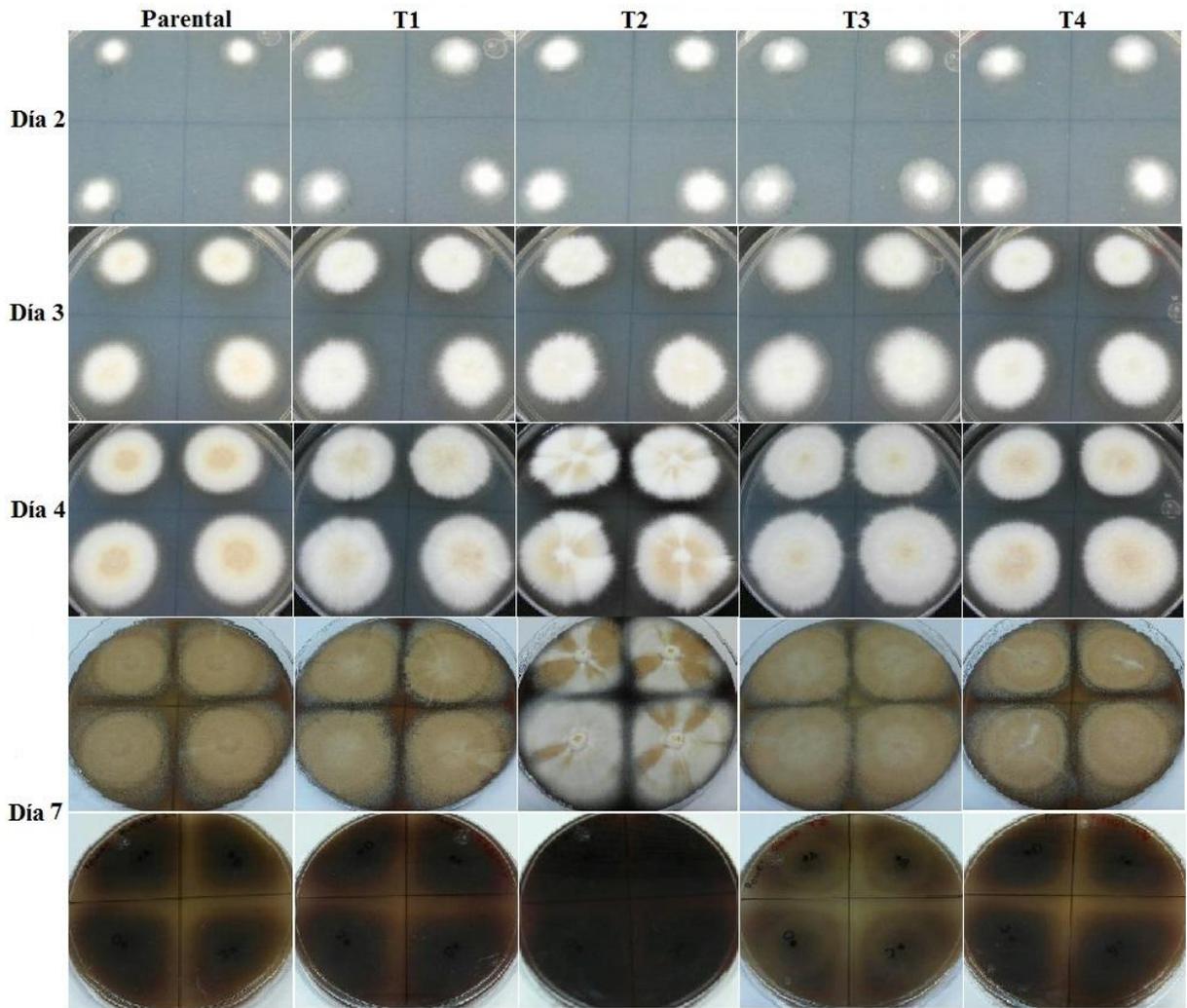


Figura 21. Fenotipo de las transformantes *SisrrA* en placas con medio Power durante 5 días (la última fila corresponde a las cajas petri vistas por detrás).

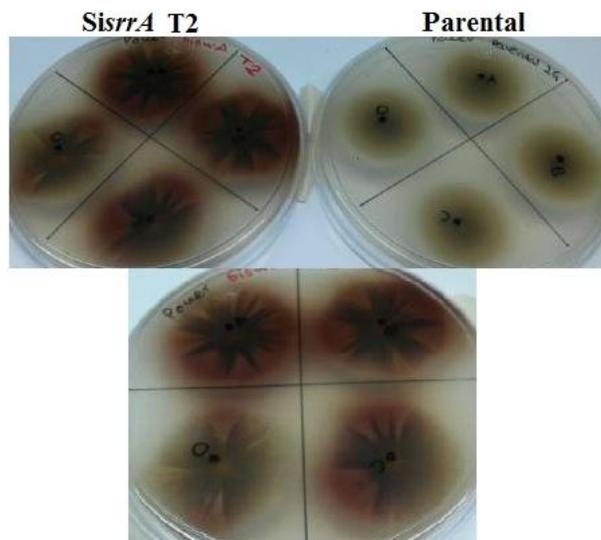


Figura 22. Comparación del fenotipo de la transformante *SisrrA* T2 con la parental al cuarto día de crecimiento en placas de medio Power (cajas petri vistas por detrás).

7.6.1.2 Transformantes silenciadas con el gen *msnA*: *SimsnA*

Se determinó la tasa de crecimiento radial en medio Power y en medio PDA (que es el que reportan más comúnmente). Se aprecia que la T1 y T7 tienen diferencia significativa ($p < 0.05$) con la parental en medio Power. En el medio PDA, además de la T1, y la T7, también la T6 presenta mayor crecimiento y por ende diferencia significativa ($p < 0.05$) (Tabla 23). En cuanto a fenotipo en medio PDA (figura 24) no se aprecia gran diferencia, sin embargo, en medio Power (figura 23) se observa que la T1 presenta una deficiencia en crecimiento y esporulación.

Tabla 23. Velocidad promedio lineal de crecimiento de las *SimsnA* en medio Power y PDA, la diferencia significativa (*) está basada en la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett ($p < 0.05$).

	Medio Power		Medio PDA	
	Velocidad Lineal (mm/día)	Desviación estándar	Velocidad Lineal (mm/día)	Desviación estándar
Parental	10.37	± 0.25	7.87	± 0.322
T1	8.62 *	± 0.144	8.44 *	± 0.515
T2	10.87 *	± 0.144	8.25	± 0.353
T3	10.31	± 0.125	8.18	± 0.125
T4	10.69	± 0.375	8.06	± 0.125
T5	10.69	± 0.125	8.37	± 0.144
T6	10.31	± 0.239	8.81 *	± 0.125
T7	10.5	± 0.288	9.06 *	± 0.125

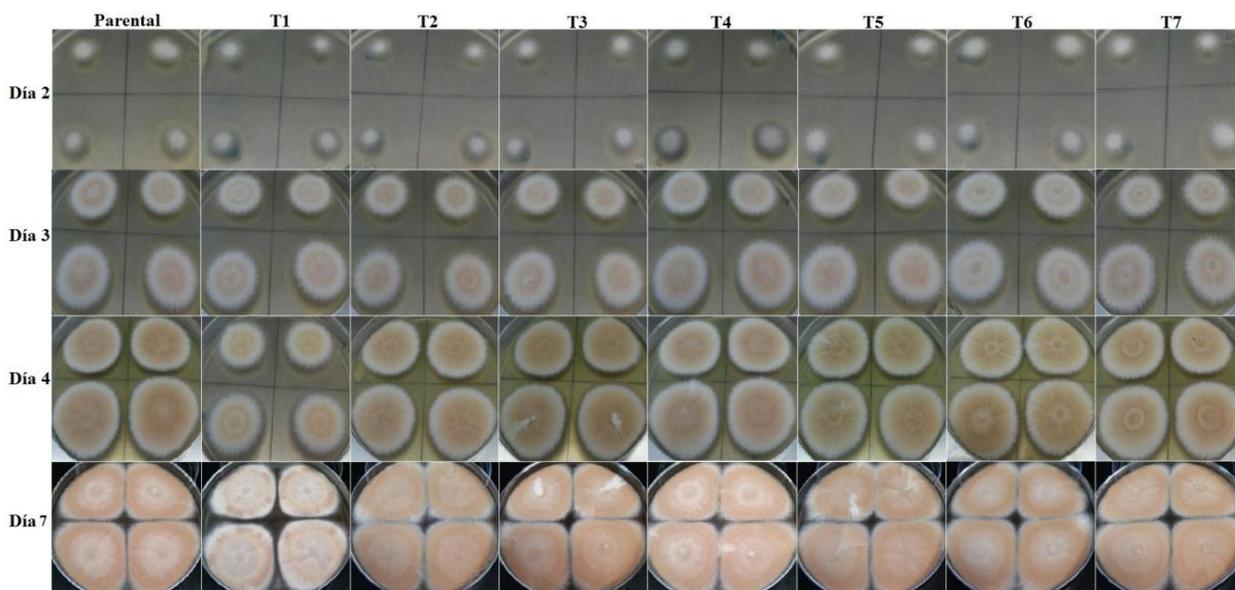


Figura 23. Fenotipo de las transformantes *SimsnA* en placas con medio Power.

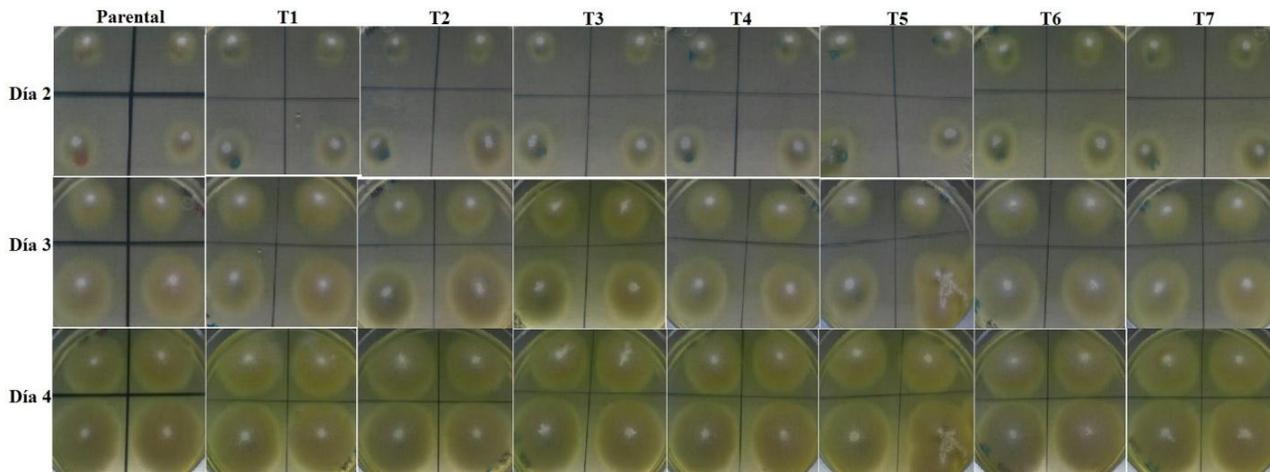


Figura 24. Fenotipo de las transformantes *Simsna* en placas con medio PDA.

7.6.2 Esporulaci3n

Se evalu3 la esporulaci3n para las *SisrrA* y *Simsna*, ambas se dejaron crecer hasta cuarto d3a en medio Power. Se contaron esporas por medio de la c3mara de Neubauer.

7.6.2.1 *SisrrA*

Los resultados mostraron que la transformante T2 (*) es la que presenta diferencia significativa ($p < 0.05$) con la parental, esporula menos (tabla 24). En los experimentos de esporulaci3n tambi3n se observaron diferencias de coloraci3n, que indican producci3n de metabolitos secundarios (figura 25).

Tabla 24. 3ndice de esporulaci3n (esporas/cm²) de las *SisrrA* a las 96 horas, la diferencia significativa (*) est3 basada en la prueba de comparaciones m3ltiples de Dunnett ($p < 0.05$).

	(Esporas/cm ²) x 10 ⁷	Desviaci3n Est3andar
Parental	10.9	± 2.25
T1	9.8	± 3.1
T2	3.5 *	± 0.7
T3	9.8	± 1.83
T4	9.5	± 3.06

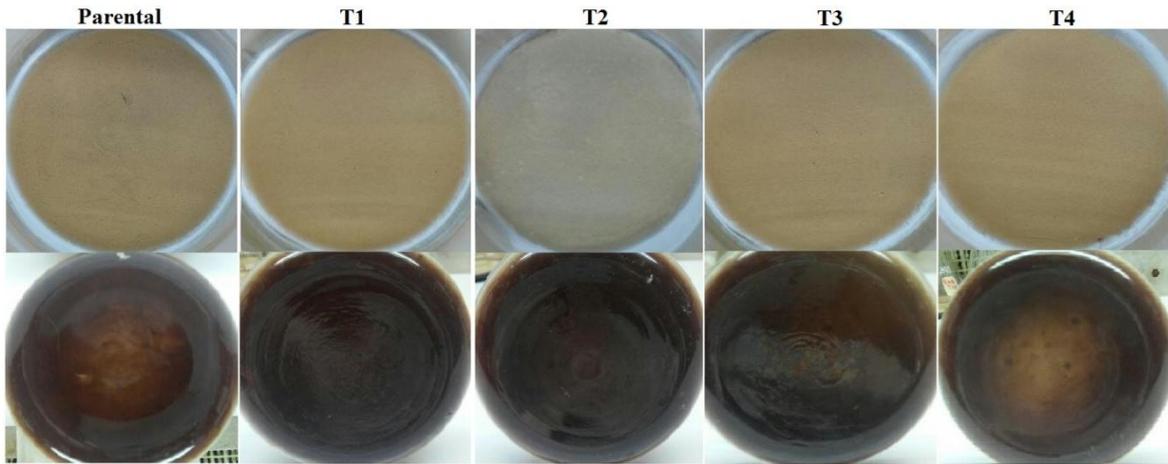


Figura 25. Cultivos esporulados de las *SisrrA* al cuarto día (vista por detrás), antes del conteo de esporas. Estos cultivos se hicieron en matraces Erlenmeyer de 250mL con 20 mL de medio Power.

7.6.2.2 *SimsnA*

Los resultados muestran que la T3, T4 y T7 tienen un menor índice de esporulación que la parental (tabla 25). Visualmente (figura 26) T2 y T3 presentaron crecimiento de micelio prematuro.

Tabla 25. Índice de esporulación (esporas/cm²) de las *SimsnA* a las 96 horas, la diferencia significativa (*) está basada en la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (p<0.05).

	(Esporas/cm ²) x 10 ⁷	Desviación Estándar
Parental	22.4	± 4.46
T1	16.6	± 8.06
T2	15	± 7.8
T3	8.5 *	± 4
T4	7.1 *	± 4.1
T5	20.3	± 4.8
T6	13.7	± 4.6
T7	4.99 *	± 2.4

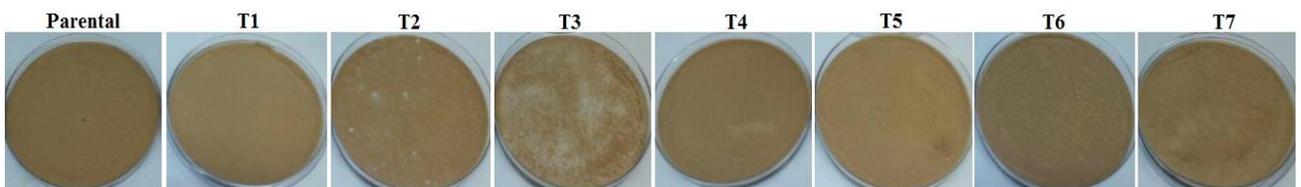


Figura 26. Placas esporuladas con las *SimsnA* al cuarto día, antes del conteo de esporas. Estos cultivos se hicieron en cajas petri con 20 mL de medio Power.

7.6.3 Sensibilidad de micelio a Peróxido de Hidrógeno

Se evaluó la sensibilidad de las transformantes a estrés oxidante causado por el peróxido de hidrógeno en placas de PDA con concentraciones de 0 a 5mM. Se inoculó con 10 μ L de concentración de esporas 1×10^2 , 1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 esporas/mL por cada condición. Se analizó el efecto a las 48 horas.

7.6.3.1 *SisrrA*

Como se observa en la figura 27, las transformantes con el gen *srrA* silenciado no presentan sensibilidad al peróxido de hidrógeno, no son diferentes con la parental.

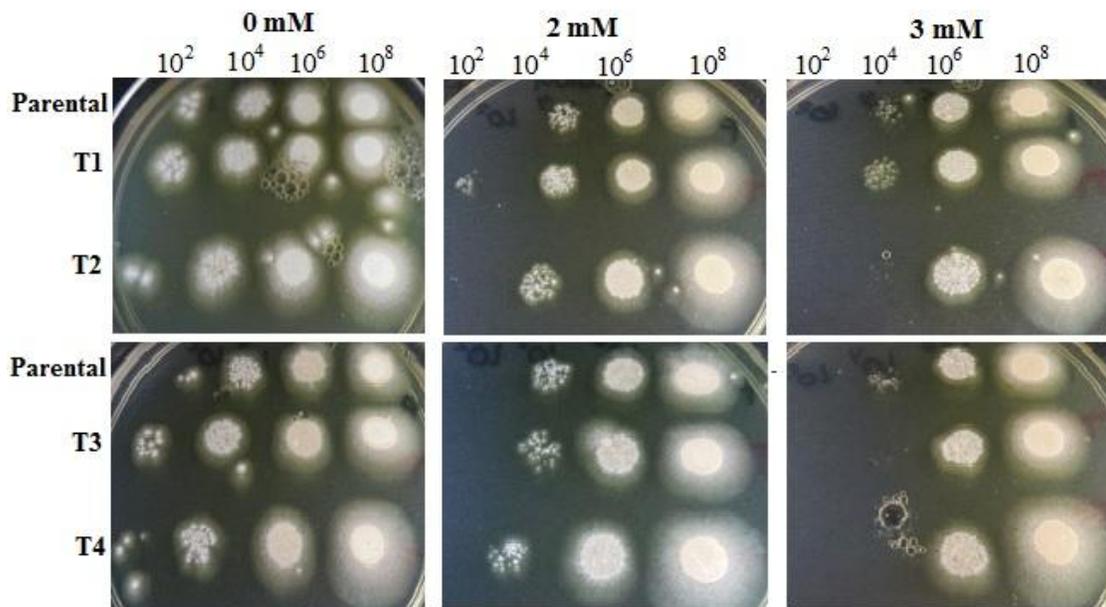


Figura 27. Análisis de sensibilidad de micelio a peróxido de hidrógeno de las *SisrrA* a las 48 h.

7.6.3.2 *SimsnA*

Se puede observar en la figura 28 que la T1, T5, T6 y T7 presentan ligera resistencia con respecto a la parental.

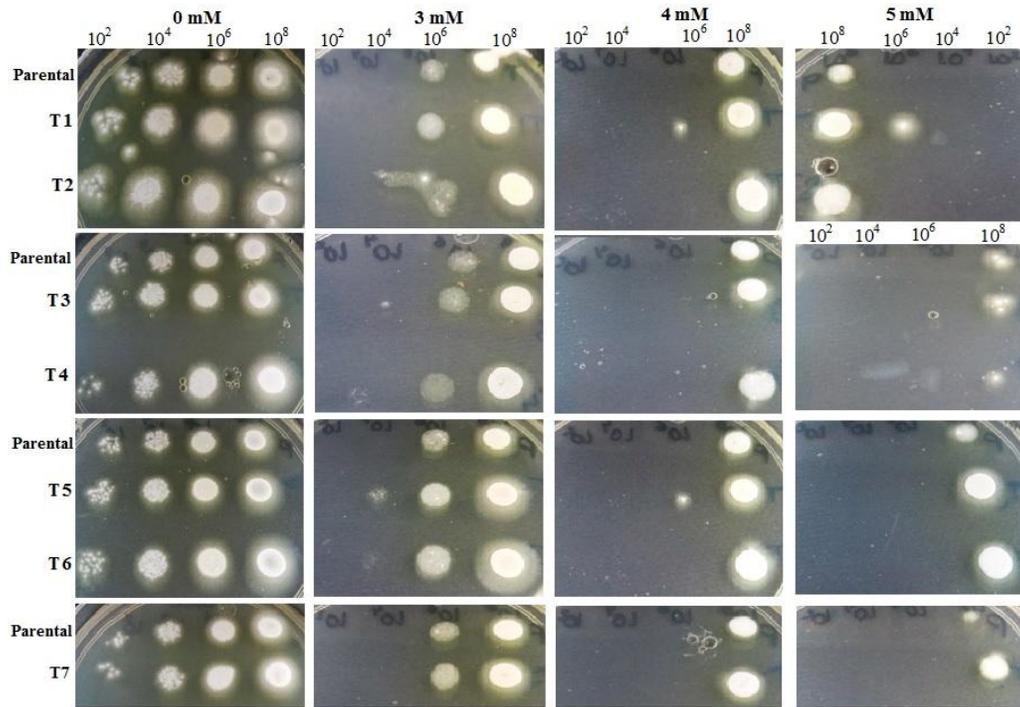


Figura 28. Análisis de sensibilidad de micelio a peróxido de hidrógeno de las *SimsnA* a las 48 h.

7.6.4 Sensibilidad a Estrés de Pared

Este análisis sólo se realizó para las *SisrrA*, se utilizó el reactivo Calcofluor en medio PDA a una concentración de 300µg/mL, las cuales se inocularon con 10µL de suspensiones 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 esporas/mL. Como se observa en la figura 29 no se observa ningún efecto.

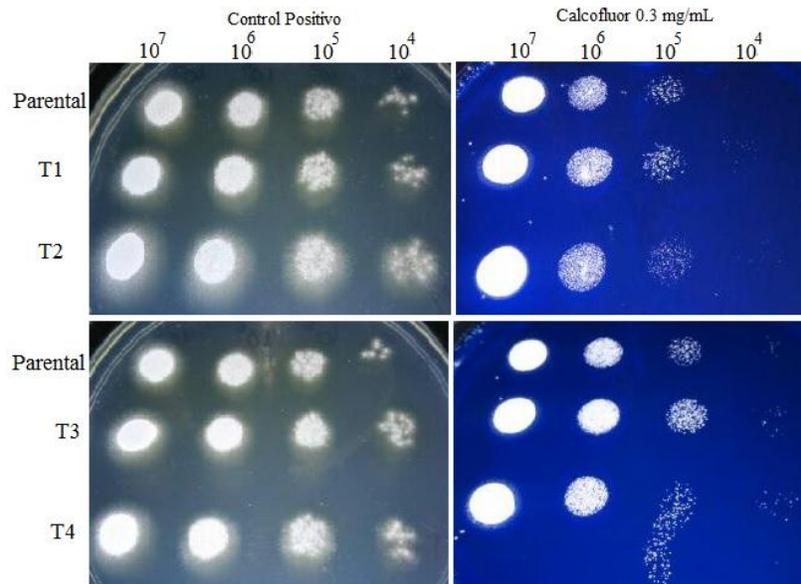


Figura 29. Análisis de sensibilidad a estrés de pared para las *SisrrA*.

7.6.5 Producción de lovastatina en Fermentación Sólida y Líquida

Con el objetivo de conocer el fenotipo de las transformantes en cuanto a biosíntesis de lovastatina se llevaron a cabo fermentaciones en medio sólido y líquido, midiendo sólo producción final a las 144 horas.

7.6.5.1 *SisrrA*

Como se puede observar en la figura 30 las transformantes T2 y T4 presentan un aumento en la producción de 182 y 169 % más en fermentación sólida, sin embargo, las mismas transformantes disminuyen abruptamente su producción en fermentación líquida, con una disminución del 81 y 92 %, respectivamente. Para los valores de pH en FS se obtuvo que T2, T3 y T4 presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la parental, mientras que en FL, sólo la T2 (tabla 26). Para los valores de biomasa, no hubo diferencia.

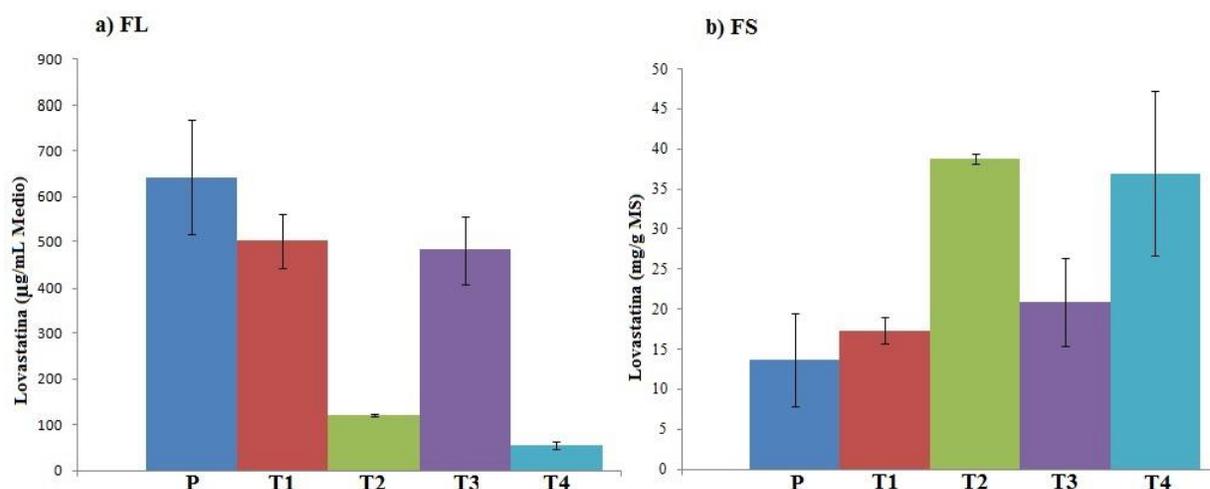


Figura 30. Producción de lovastatina en FL (a) y FS (b) de las *SisrrA* a las 144 horas. T2 y T4 presentan diferencia significativa en ambas condiciones, de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett ($p < 0.05$).

Tabla 26. Valores de pH y biomasa en FS y FL a las 144 horas para las *SisrrA*. La diferencia significativa (*) está basada en la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett ($p < 0.05$).

	Fermentación Sólida		Fermentación Líquida			
	pH	Desviación Estándar	pH	Desviación Estándar	Biomasa (mg/mL)	Desviación Estándar
Parental	5.58	0.063	6.31	0.014	10.03	0.534
T1	5.77	0.035	6.35	0.070	10.25	0.330
T2	5.82 *	0.070	5.93 *	0.049	9.70	0.313
T3	5.86 *	0.042	6.34	0.014	9.95	1.187
T4	6.14 *	0.070	6.54	0.134	9.21	0.353

7.6.5.2 *SimsnA*

Se midió producción de lovastatina también para las *SimsnA*, los resultados preliminares se muestran en la tabla 28 para fermentación líquida, en la cual, las transformantes no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$). Para fermentación sólida (tabla 27) T5 produce más que la parental, sin embargo, la T6 produce menos. Para resultados más concretos, se debe repetir de nuevo las fermentaciones.

Tabla 27. Fermentación sólida (FS) de las *SimsnA* a las 144 horas. * Son los datos que presentan diferencia significativa con respecto a la parental, de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett ($p < 0.05$).

Fermentación Sólida				
	Lovastatina (mg/g MS)	Desviación Estándar	pH	Desviación Estándar
Parental	9.445	± 0.977	6.023	± 0.099
T1	9.794	± 5.46	6.035	± 0.007
T2	10.512	± 1.25	6.22	± 0.084
T3	11.266	± 1.34	6.315	± 0.063
T4	15.538	± 6.76	5.965	± 0.035
T5	17.877 *	± 0.176	6.025	± 0.035
T6	4.323 *	± 0.02	6.395 *	± 0.063
T7	7.466	± 1.58	6.295	± 0.148

Tabla 28. Fermentación líquida (FL) de las *SimsnA* a las 144 horas. * Son los datos que presentan diferencia significativa con respecto a la parental, de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett ($p < 0.05$).

Fermentación Líquida						
	Lovastatina (µg/mL)	Desviación Estándar	pH	Desviación Estándar	Biomasa (mg/mL)	Desviación Estándar
Parental	109.188	± 0.098	6.493	0.07	10.376	± 0.36
T1	102.121	± 0.007	6.435	0.035	10.398	± 0.57
T2	66.178	± 0.084	6.445	0.063	10.11	± 0.23
T3	93.819	± 0.063	6.385	0.035	10.662	± 0.32
T4	126.494	± 0.035	6.44	0.01	10.543	± 0.72
T5	78.402	± 0.035	6.46	0.042	9.73	± 0.35
T6	84.580	± 0.063	6.75 *	0.001	10.406	± 0.74
T7	109.188	± 0.148	6.493	0.005	11.582	± 0.86

7.7 Confirmación de integración de las construcciones en el genoma de las transformantes

Para corroborar que la construcción de silenciamiento se encuentra insertada en el genoma de *A. terreus* se procedió a extraer DNA genómico de cada una de las transformantes, para después realizar una PCR con un juego de primers que hibrida en el marcador de fleomicina (*Ble*) y otros que hibridan en el promotor *Pki*, ambas secuencias forman parte de

la estructura del vector de silenciamiento (pGdpki-*RNAi*). Se utilizó como control positivo el vector sin inserto purificado, y como negativo DNA genómico de la parental.

7.7.1 Amplificación del fragmento de la secuencia *Ble*: Fleomicina

Hubo amplificación del fragmento del marcador de fleomicina para todas las *SisrrA* (figura 31) y las *SimsnA* (figura 32), el control positivo y negativo son correctos para ambos casos.

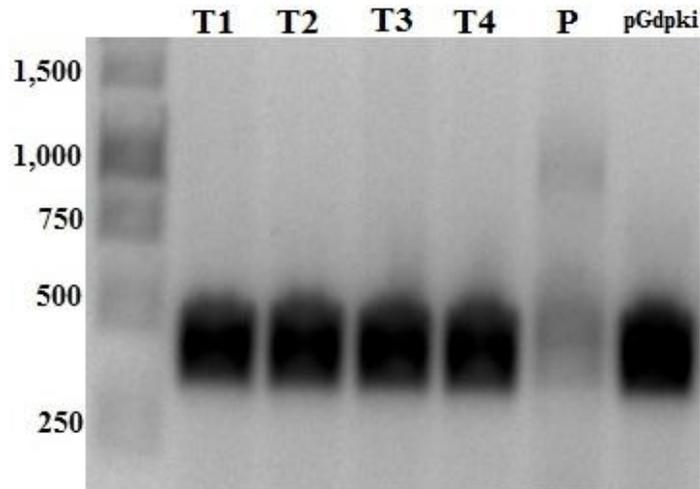


Figura 31. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la PCR con los primers de fleomicina con el ADN genómico de las *SisrrA*.

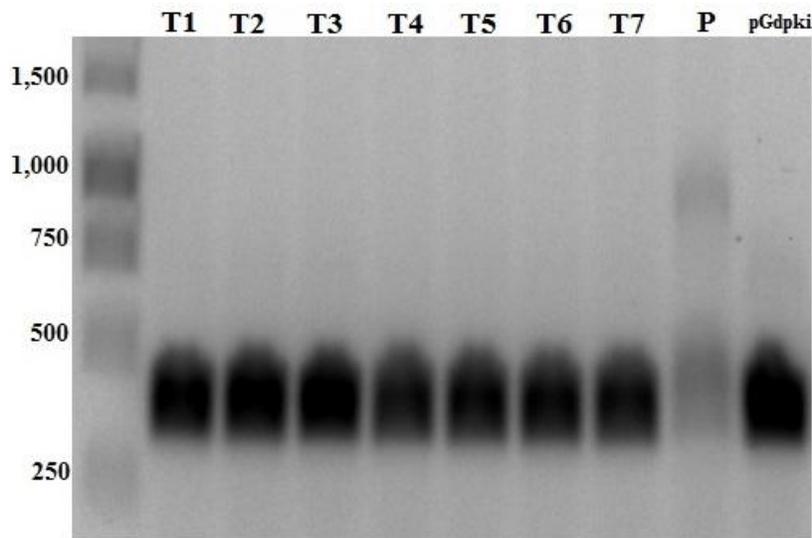


Figura 32. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la PCR con los primers de fleomicina con el ADN genómico de las *SimsnA*.

7.7.2 Amplificación de un fragmento del promotor *pKi*

Hubo amplificación del fragmento de promotor *pki* para todas las *SisrrA* (figura 33) y las *SimsnA* (figura 34), el control positivo y negativo son correctos para ambos casos.

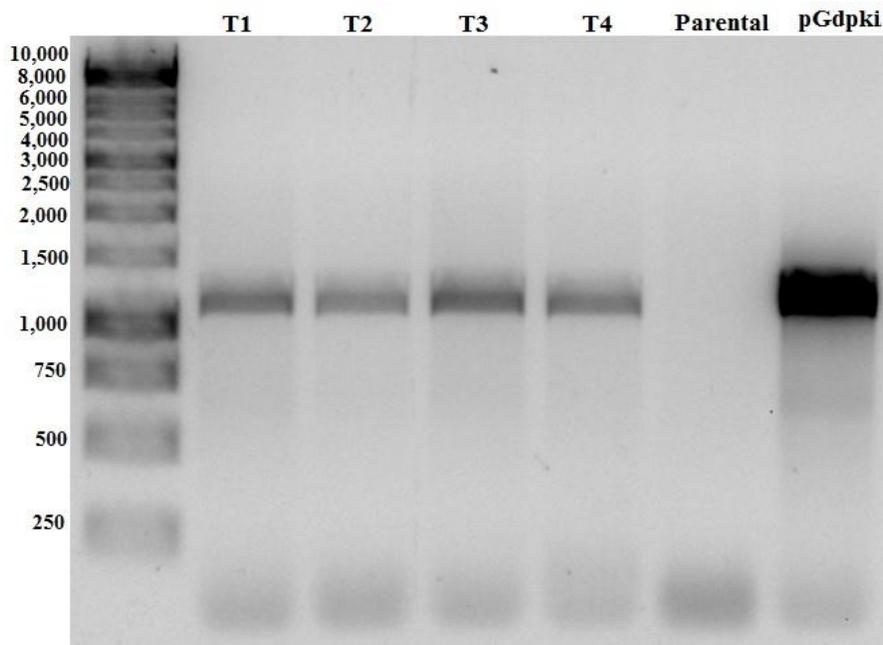


Figura 33. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la PCR con los primers de *pki* con el ADN genómico de las *SisrrA*.

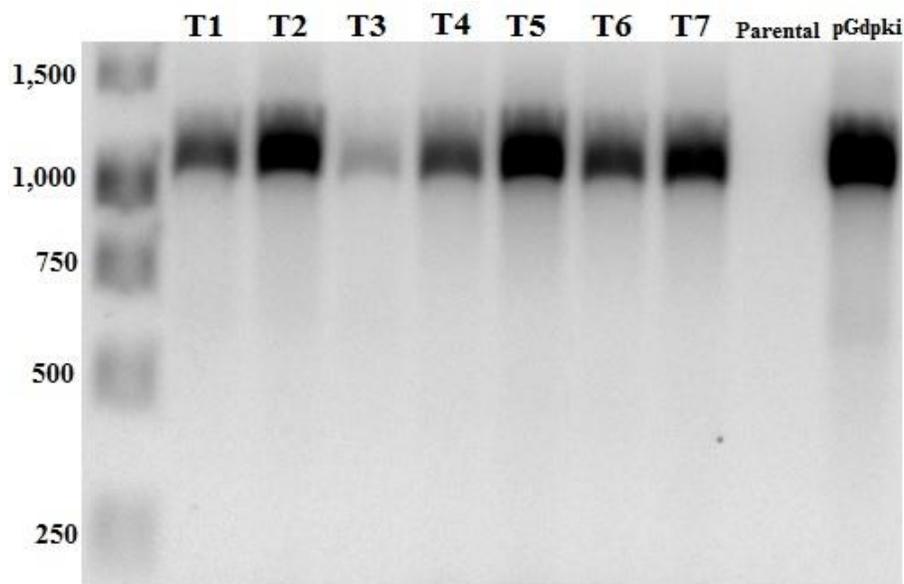


Figura 34. Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la PCR con los primers de *pki* con el ADN genómico de las *SimsnA*.

8. DISCUSIÓN

Recientemente se ha encontrado mayor evidencia de que el metabolismo secundario, en hongos filamentosos, está asociado con el estrés oxidante. El panorama surgió con resultados obtenidos por Toledo y col. (1995) que encontraron un estado hiperoxidante que precede a los procesos de diferenciación en *Neurospora crassa*, en cada una de las etapas morfogénicas: adhesión de la hifa, formación de la hifa área y la producción de la conidia. Posteriormente, Hansberg y col. (2007) demostraron que es necesario un estrés oxidante para que se lleve a cabo la diferenciación celular, esto lo hicieron por medio de antioxidantes exógenos y observaron que la esporulación no se llevaba a cabo. Jayashree & Subramanyam (2000), encontraron que había un estado oxidante que coincidía en la transición de la trofofase a idiofase en *Aspergillus parasiticus*, además que las cepas aflatoxigénicas mostraban una mayor concentración de EROs en este punto que las cepas no tóxicas. Narasaiah y col. (2006) demostraron que la producción de aflatoxinas correlacionaba en forma positiva con un estado oxidante, logrando incrementos en la producción relacionados con el incremento de concentraciones de peróxido de hidrógeno exógeno.

En nuestro grupo de trabajo también se han encontrado resultados similares con la biosíntesis de lovastatina en *A. terreus*. Baños y col. (2007) demostraron que el estrés oxidante en medio sólido, tiene un papel importante sobre la producción de lovastatina por *Aspergillus terreus*. Los autores aislaron mutantes resistentes a estrés oxidante, encontrando que un alto porcentaje de éstas eran sobreproductoras de lovastatina en fermentación sólida. Posteriormente, Miranda y col. (2013) encontraron una acumulación de EROs al inicio de la idiofase, en fermentación sólida y líquida, sugiriendo una posible regulación de la biosíntesis por las EROs. Finalmente, se demostró que la producción de lovastatina está regulada por las EROs a nivel transcripcional. Esto lo lograron, incrementando o abatiendo a las EROs, por medio de la adición de peróxido de hidrógeno o antioxidantes. El resultado fue contundente, la producción de lovastatina disminuía en presencia del antioxidante y se adelantaba en presencia de peróxido de hidrógeno en trofofase. Los genes de biosíntesis de lovastatina (*lovE* y *lovF*) disminuyeron su expresión en presencia del antioxidante y la incrementaron en presencia de prooxidantes. Por lo tanto, se concluyó, que las EROs regulan positivamente la biosíntesis de lovastatina (Miranda *et al.*, 2014).

Esta tesis surge de la necesidad de responder a la pregunta de cuál es el nexo entre las Especies Reactivas del Oxígeno y la biosíntesis de lovastatina. Hong, Roze, & Linz (2013) sugieren que factores transcripcionales de respuesta a estrés oxidante pudieran estar relacionados con la regulación de las aflatoxinas. Este grupo propone un modelo donde factores de transcripción como AP-1, AtfA, AtfB, MsnA, StuA, Hsf1, SrrA, Pcr1 y Myb podrían tener una función dual dentro de la célula. Es decir, actúan uniéndose a promotores de genes en respuesta a estrés oxidante pero que al mismo tiempo también se unen a promotores de genes de metabolismo secundario.

En relación a la síntesis de lovastatina por *A. terreus*, Miranda y col. (2014) encontraron sitios putativos de unión de factores de transcripción, en su mayoría de respuesta a estrés oxidante, en los promotores de los genes *lovE* y *lovF*, entre ellos Yap1 (Ap-1), SrrA y MsnA. Posteriormente, Pérez-Sánchez (2014) silenció al gen Ap-1 (*Atyap1*, en *Aspergillus terreus*) encontrando inicio precoz y fuerte aumento, tanto en la esporulación como en la producción de lovastatina, así como de las EROs. Ellos concluyen que este factor de transcripción no es un regulador positivo, pero pudiera ser un regulador negativo para el gen *lovE*. Sin embargo, también mencionan que el aumento de producción puede ser un efecto indirecto del aumento en la acumulación de las EROs, y si esto es cierto, la pregunta prevalece: ¿cuál es el nexo?

Por lo anterior, en esta tesis, se llevó a cabo el estudio de la función de los genes *srrA* y *msnA*, como posibles nexos de la regulación entre las Especies Reactivas del Oxígeno y la biosíntesis de lovastatina. Es importante notar que Miranda y col. (2014) demostraron que *srrA* presenta un patrón de transcripción más compatible con una regulación positiva de los genes de biosíntesis de lovastatina. Además, hay una diferencia marcada entre la expresión de *srrA* en FS y en FL. Esto podría indicar que este es un gen importante para la Fisiología en Medio Sólido.

MsnA y SrrA son factores de transcripción de respuesta a estrés, su caracterización es amplia en levadura, sin embargo, en hongos filamentosos su función no se conoce con exactitud, e incluso MsnA aún no se ha identificado en *Aspergillus terreus*.

La diferencia de la expresión de *AtsrrA* encontrada por Miranda y col. (2014) (inicio fuerte en idiofase en FS e intermitente en FL) sugiere que este factor de transcripción puede

formar parte de la fisiología del medio sólido, su estudio a profundidad podría abrir el camino del entendimiento de por qué la producción de lovastatina es mucho mayor en medio sólido que en líquido.

En el presente trabajo de tesis, se encontró que las transformantes silenciadas presentaron variabilidad en su fenotipo, es decir no presentaron un fenotipo único. Aparentemente el lugar de integración del vector y/o el número de copias insertado afecta la expresión del cassette de silenciamiento. Sin embargo, fue posible detectar características comunes y algunas características muy interesantes que sólo expresaron una o algunas transformantes.

8.1 Caracterización de las *SisrrA*

8.1.1 Estrés Oxidante

En *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 (*SrrA* en *A. parasiticus*) es un factor de transcripción en respuesta a estrés oxidante, uniéndose a promotores de genes que codifican enzimas antioxidantes, como catalasa citosólica, citocromo C peroxidasa mitocondrial, tiorredoxina peroxidasa citosólica, entre otros. Su función como respuesta a estrés oxidante está dada por la interacción con Yap1, y su intervención en la respuesta a estrés por choque térmico está dado por su interacción con el factor transcripcional Hsf1 (Hong *et al.*, 2013).

La interrupción del gen *skn7* en *S. cerevisiae* mostró hipersensibilidad a peróxido de hidrógeno (Fassler & West, 2011), estos resultados fueron similares en interrupciones del gen homólogo en diferentes microorganismos, como *A. nidulans*, *S. pombe* y *C. glabrata*, entre otros (Vargas-Perez *et al.*, 2007; Nakamichi *et al.*, 2003; Cuellar-Cruz *et al.*, 2008).

Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis contrastan con lo anterior, las mutantes con el gen *AtsrrA* silenciado no muestran sensibilidad a peróxido de hidrógeno, y esto sólo coincide con lo reportado en los hongos *M. oryzae* y *C. neoformans*, en los cuales al interrumpir el gen homólogo, no encontraron sensibilidad a peróxido de hidrógeno (Motoyama *et al.*, 2008; Bahn *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que la respuesta a estrés oxidante, mediada por este factor transcripcional, no está altamente conservada en todos los hongos; sin embargo, para nuestros resultados haría falta realizar más experimentos (tal vez con otros compuestos que generan estrés de pared) poder hacer una conclusión más contundente.

8.1.2 Estrés de Pared

Los resultados reportados de las mutantes interrumpidas con el gen homólogo *skn7* en diversos microorganismos es más polémica que para estrés oxidante. En *S. cerevisiae* se ha demostrado que este factor transcripcional regula la biosíntesis de la pared celular, las mutantes $\Delta skn7$ muestran hipersensibilidad a estrés de pared (Li *et al.*, 2002); resultados similares fueron obtenidos en *A. nidulans* y *A. fumigatus* (Vargas-Perez *et al.*, 2007). Sin embargo, la interrupción del gen homólogo en *S. pombe*, *C. glabrata* y *C. albicans* no causó sensibilidad (Nakamichi *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004). Nuestras cepas silenciadas tampoco presentaron sensibilidad a estrés de pared, lo que nos hace pensar que posiblemente *AtsrrA* no participa en la ruta de señalización para estrés de pared.

8.1.3 Crecimiento y Esporulación

En el caso de crecimiento, las mutantes silenciadas con el gen *AtsrrA* sí presentaron diferencia significativa con la parental, mostrando una menor velocidad de crecimiento en PDA y en medio Power aumentó, esto comparado con la cepa silvestre. Sin embargo, la diferencia, a pesar de ser estadísticamente significativa, no fue tan marcada, ni su fenotipo es tan diferente con la parental, a excepción de la transformante 2 (T2). Ésta presentó mayor producción de pigmentos (metabolitos secundarios) en medio Power desde el tercer día de crecimiento, este fenotipo se manifestó como la tinción del medio de un color rojo oscuro (figura 22). Además de que se observó que una vez que comienza a producir esporas, éstas germinan (figura 19). No hay reporte acerca de efectos en cuanto a crecimiento por las interrupciones de este gen.

En cuanto a conidiación, en *A. nidulans* se ha reportado disminución en la esporulación asexual, viabilidad de las esporas y en *S. pombe* las mutantes *skn7* presentaron afecciones en el apareamiento o sexual así como deficiencia en la formación de las esporas (Vargas-Perez *et al.*, 2003). Las mutantes de *C. neoformans* exhibieron un aumento en el apareamiento, mostrado por una filamentación incrementada en el apareamiento bilateral (Bahn *et al.*, 2007).

La T2 de las cepas silenciadas mostraron un decremento en la esporulación (Fig. 25), sin embargo, creemos que este fenómeno no es debido a deficiencias en esporulación, si no a que las esporas de esta transformante germinan de inmediato (tercer día de cultivo); para cuando se hizo el conteo, ya no eran las mismas esporas iniciales y es por esto que se

aprecia una disminución en esporas, y se observa micelio joven, el resto de las transformantes no presentaron este fenotipo. El análisis de viabilidad no se llevó a cabo, creemos que la deficiencia viene por este camino y no en la esporulación, por supuesto, esto debe probarse.

8.1.4 Producción de lovastatina

Hasta ahora, no hay reportes del efecto del factor transcripcional *SrrA* en cuanto a producción de metabolitos secundarios. La caracterización de las transformantes en cuanto a producción de lovastatina resultó interesante. Dos de las transformantes silenciadas, T2 y T4, (que representan el 50%) presentaron efectos en la producción de lovastatina. En fermentación sólida, hubo un aumento del 182% y 169%, respectivamente, sin embargo, estas mismas transformantes disminuyeron drásticamente su producción en fermentación líquida, 81% y 92%, respectivamente.

Inicialmente se pudiera pensar que al no estar el factor transcripcional (o haber menos), las EROs aumentan y, a través de otro mecanismo, éstas señalizan para que aumente la producción, de manera que *AtsrrA* no está implicado como un regulador directo en la biosíntesis de lovastatina. El problema surge cuando la producción en fermentación líquida disminuye, si la hipótesis anterior fuese cierta, en FL la producción debería aumentar y no disminuir. Una explicación sería que en FL la concentración de EROS ya es alta en sí, por lo que pudo haber habido un exceso. Estos resultados pueden estar relacionados con la diferencia, en cuanto a expresión de este gen, encontrada por Miranda y col. (2014). Ellos encontraron que *AtsrrA* se expresa diferente en FS y FL. En fermentación sólida se expresaba en idiofase, junto con los genes *lovE* y *lovF*, además en este punto inicia la acumulación de las EROs; pero en FL, *AtsrrA* se expresaba durante toda la trofofase e intermitente durante la idiofase. Los autores discuten que la expresión de *AtsrrA* pareciera estar relacionada con la acumulación de las EROs, ya que en FL presenta una concentración alta y variable.

De esta manera, *AtsrrA* pudiera ser una pieza clave en la diferencia de la Fisiología del Medio Sólido. Con los resultados de esta tesis, sólo podemos inferir que sí participa en la regulación del metabolismo secundario de *A. terreus*, pero aun es desconocido de qué forma. Sería muy importante, en un futuro próximo determinar el efecto del silenciamiento de este gen en la acumulación de EROs durante la FS y FL de lovastatina.

8.2 Caracterización de las *SimsnA*

Msn2/4 en *S. cerevisiae* es un factor transcripcional de respuesta a diferentes tipos de estrés, como oxidante, térmico, osmótico y por fuente de carbono; esta proteína es considerada en levadura, entre otras, como un regulador general de respuesta a estrés (Morano *et al.*, 2011).

En hongos filamentosos la identificación de este factor transcripcional es relativamente reciente puesto que se creía que no existía dentro del genoma, y por lo tanto, aun no es conocida ampliamente su función. En esta tesis, por primera vez se analiza a MsnA en *Aspergillus terreus* como un posible regulador en el metabolismo secundario.

8.2.1 Estrés oxidante

Los resultados obtenidos demuestran que las cepas silenciadas de este gen son ligeramente resistentes a peróxido de hidrógeno (figura 28), resultado inesperado, pues la hipótesis planteada era obtener hipersensibilidad. En levadura, Msn2/4 no es un factor crucial en respuesta a estrés oxidante, se ha demostrado que su papel está determinado por la tiorredoxina Trx1/2, además, que su intervención varía de acuerdo a la fase de crecimiento, siendo la fase tardía donde han encontrado mayor actividad (Morano *et al.*, 2011). También se sabe que este factor transcripcional participa en la “protección cruzada”, basada en la respuesta celular a diferentes tipos de estrés, originado inicialmente sólo por uno. Por ejemplo, el estrés por calor en levadura genera estrés oxidante y es donde Msn2/4 participa para contener ambos. Es posible que encontrar un efecto más contundente en nuestras mutantes se deba optar por el análisis de protección cruzada.

En hongos entomopatógenos las cepas interrumpidas presentaron un decremento en la tolerancia al peróxido de hidrógeno tanto en crecimiento como en conidios (Liu *et al.*, 2013). Sin embargo, no tenemos algún antecedente más acerca de estrés oxidante en hongos filamentosos.

8.2.2 Crecimiento

Reportes de interrupción de *msnA* en *A. parasiticus* y *A. flavus* mostraron una evidente deficiencia en el crecimiento de las colonias (Chang *et al.*, 2010), sin embargo, sólo una de nuestras mutantes presentó deficiencia en crecimiento radial pero no tan dramática como la encontrada en *A. parasiticus* y *A. flavus*.

8.2.3 Esporulaci3n

Chang y col. (2010) reportaron que las cepas interrumpidas mostraron un incremento en la conidiaci3n, datos que se parecen a los obtenidos por Jeon y col. (2009), donde al interrumpir a MsnA en *A. nidulans* provoc3 un aumento en la conidiaci3n. Sin embargo, en *B. bassiana* y *M. anisopliae*, Liu y col. (2013) obtuvieron una deficiencia en la producci3n de conidios. Nuestros resultados coinciden con 3ste 3ltimo, ya que encontramos que tres de las transformantes presentaron menor producci3n de esporas, T3 con 70% menos, T4 y T7 de 78% (Tabla 25).

8.2.3 Producci3n de lovastatina

Chang y col. (2010) encontraron un aumento en la producci3n de aflatoxinas y 3cido k3jico (ambos metabolitos secundarios), sin embargo, tambi3n de EROs, ellos s3lo concluyen que MsnA en *A. parasiticus* y *A. flavus* pareciera estar implicado en el mantenimiento del estado redox dentro de la c3lula. Como ya se mencion3 antes, la mayor acumulaci3n de EROs estar3a regulando positivamente el metabolismo secundario, sin embargo, es muy prematuro afirmar que MsnA est3 implicado en esta regulaci3n.

Nuestros resultados son sumamente pol3micos, dos de las transformantes presentan diferencia significativa en fermentaci3n s3lida, sin embargo, una aumenta y otra disminuye. Es imperativo que se repita este experimento y se profundice en este tema para poder concluir si las *SimsnA* presentaron efectos en cuanto a producci3n de lovastatina.

Como se ha observado, los resultados obtenidos hasta ahora en el estudio de MsnA en hongos son muy contrastantes, por lo que es importante seguir con el estudio de este factor transcripcional para esclarecer su participaci3n dentro de la c3lula, y aun m3s importante, dentro del metabolismo secundario.

9. CONCLUSIONES

- 1) Se identificaron los homólogos de los genes *srrA* y *msnA* en *A. terreus*. El primero con la anotación: Hypothetical Protein, similar to stress response regulator SrrA, ATEG_03268.1. El segundo como Conserved hypothetical protein, ATEG_05308.
- 2) Se clonaron fragmentos adecuados con los cuales se construyeron los vectores de silenciamiento pGdpki-*srrA* y pGdpki-*msnA*.
- 3) Se obtuvieron transformantes que presentaron el siguiente fenotipo:

SisrrA

- Una disminución ligera en la tasa de crecimiento radial en PDA.
- Las cepas silenciadas mostraron un decremento en la esporulación.
- Dos de las 4 transformantes silenciadas presentaron un fuerte aumento en la producción de lovastatina en FS (182% y 169%). Pero, una drástica disminución de su producción en FL (- 81% y - 92%).

SimsnA

- Tres de las transformantes presentaron menor producción de esporas.
- Cuatro de las transformantes mostraron ligera resistencia a peróxido de hidrógeno.
- No se encontró un efecto claro en la producción de lovastatina. Sólo 2 (de 7) transformantes mostraron efectos sobre la producción, pero en sentido contrario.

10. PERSPECTIVAS

Este trabajo ha aportado la primera evidencia de que factores de transcripción en respuesta a estrés oxidante, pueden estar regulando la biosíntesis de lovastatina. Sin embargo, aun falta caracterizar a profundidad las transformantes para presentar resultados más contundentes. Para esto haría falta monitorear las EROs en una cinética completa en FS y FL, manipularlas con peróxido de hidrógeno y antioxidantes; esto nos podría dar la respuesta de las transformantes *SisrrA* estar regulando la biosíntesis de lovastatina o simplemente en su ausencia hubo un descontrol con las EROs y éstas están regulando por otra vía la biosíntesis.

Evaluar la expresión de genes de enzimas antioxidantes como *cat* y *sod1* sería un punto sumamente importante, al igual que *brlA* y sobre todo *lovE* y *lovF*, esto para las transformantes *SisrrA* y *SimsnA*.

Para probar la intervención de *SrrA* en la fisiología del medio sólido un camino posible sería el análisis de las fermentaciones en presencia de diferentes estímulos que se han probado, son la diferencia entre medio sólido y líquido, como el contacto directo con el aire y el soporte. Además se probar que la acumulación de CO₂ no es quien estimula la producción en los sistemas de FS.

También se probó, al igual que en otros trabajos, que el silenciamiento es una importante herramienta en ingeniería genética para evaluar la función de un gen. Sin embargo, se presentaron diversas desventajas, como el problema del lugar de inserción de la construcción generando un nuevo problema, que es la heterogeneidad en los fenotipos de las transformantes. Por lo que creemos que para genes no esenciales, la mejor opción son las interrupciones de los mismos.

La interrupción de otros genes de factores transcripcionales en respuesta a estrés como *AtfB*, *AtfA* y *Hsf1* podría ampliar la visión de la regulación del metabolismo secundario.

11. REFERENCIAS

- Aguirre, J., Hansberg, W., & Navarro, R. (2006). Fungal responses to reactive oxygen species. *Medical Mycology* , 44, S101-S107.
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology* , 111-118.
- Alberts, A. W., Chen, J., Kurov, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., *et al.* (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductasa and cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA* , 3957-3961.
- Bahn, Y. S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (2007). Sensing the environment: Lessons from fungi. *Nature Rev.* , 5, 57-69.
- Baños Mejía, J. G., Mejía, A., Garay, A., & Barrios-González, J. (2007). Producción de lovastatina en fermentación sólida por mutantes resistentes a estrés oxidante. *XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería 25 a 29 de junio. Morelia, Michoacán, México.*
- Baños, J. G., Tomasini, A., Szakács, G., & Barrios-González, J. (2005). *Fisiología y producción de lovastatina de A. terreus en fermentación sólida de dos fases.* Morelia, Michoacán, México: VI Congreso de Biología Celular y Molecular de Hongos .
- Barrios-González, J., & Mejía, A. (2007). Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites. En A. Pandey, C. Larroche, C. R. Soccol, & J. A. Rodríguez-León (Edits.), *Current Developments in Solid-State Fermentation* (págs. 262-296). New Delhi: Asiatech Publishers Inc.
- Barrios-González, J., & Miranda Labra, R. U. (2010). Biotechnological production and application of statins. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 869-883.
- Barrios-González, J., Fernández, F. J., & Tomasini, A. (2003). Production of microbial secondary metabolites and strain improvement. *Microbial Biotechnology* , 322-333.
- Chang, P. K., Scharfenstein, L. L., Luo, M., Mahoney, N., Molyneux, R. J., Yu, J., *et al.* (2010). Loss of *msnA*, a putative stress regulatory gene, in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* Increased Production of conidia, aflatoxins and kojic Acid. *Toxins* , 82-104.
- Cuellar-Cruz, M. (2008). High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot. Cell* , 814-825.
- De Wever, V., Reiter, W., Ballarini, A., Ammerer, G., & Brocard, C. (2005). A dual role for PP1 in shaping the Msn2-dependent transcriptional response to glucose starvation. *EMBO J.* , 4115-4123.

- Fassler, J. S., & West, A. H. (2011). Fungal Skn7 stress response and their relationship to virulence. *Eukaryotic Cell* , 10, 156-167.
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Covarrubias Robles, A. A. (2004). La respuesta a estrés en levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología ALAM* , 24-46.
- Furberg, C. D. (1999). Natural statins and stroke risk. *Circulation* , 185-188.
- Gorner, W. E., Durchschlag, M. T., Martinez-Pastor, F., & Estruch, G. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* , 586-597.
- Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J., Furukawa, K., Kanamaru, K., Kato, M., *et al.* (2007). The SskA y SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnology Biochemical* , 71, 1003-1014.
- Hajjaj, H., Niederberger, P., & Duboc, P. (2001). Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* , 2596-2602.
- Halliwell, B., & Gutteridge, M. C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine* . London, Oxford University Press .
- Hansberg, W., Peraza, L., Vega, V., Cano, N., Aguirre, J., Rangel, P., *et al.* (Octubre 17-19, 2007. Cuautla, Morelos, México.). Microbial cell differentiation: a response to oxidative stress. *III Taller Internacional de Aspectos Comparativos del Estrés Oxidante en Sistemas Biológicos* .
- He, X. J., & Fassler, J. S. (2005). Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* , 58, 1454-1467.
- Hendrickson, L. (1999). Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and multifunctional polketides synthase gene. *Chemistry and Biology* , 429-439.
- Hong, S. Y., Roze, L. V., & Linz, J. E. (2013). Oxidative Stress-Related Transcription Factors in the Regulation of Secondary Metabolism. *toxins* , 683-702.
- Hong, S. Y., Roze, L. V., Wee, J., & Linz, J. E. (2013). Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in aspergilli. *Microbiology Open* , 2, 144-160.

- Ikner, A., & Shiozaki, K. (2005). Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat. Res.* , 569, 13-27.
- Jacquet, M., Renault, G., Lallet, J., De Mey, J., & Goldbeter, A. (2003). Oscillatory nucleocytoplasmic shuttling of general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Cell Biology* , 497-505.
- Jayashree, T., & Subramanyam, C. (2000). Oxidative stress of *Saccharomyces cerevisiae* protein induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology* , 3277-3283.
- Jeon, M. H., Hagiwara, D., Yoshimi, A., Abe, K., Han, D. M., & Chae, S. K. (2009). Analysis of *nrdA*, a negative regulator of differentiation in *Aspergillus nidulans* . *In Proceedings of 25th Fungal Genetics Conference, Pacific Grove, CA, USA* , 17-22.
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nature Reviews/Microbiology* , 937-947.
- Kurtz, S., Rossi, J., Petko, L., & Lindquist, S. (1986). An ancient developmental induction: heat shock proteins induced in sporulation and oogenesis . *Science* , 231, 1154-1157.
- Lallet, S., Garreau, H., Poiser, C., Boy-Marcotte, E., & Jacquet, M. (2004). Heat shock-induced degradation of Msn2p, a *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional factor, occurs in the nucleus. *Molecular Genetic Genomics* , 353-362.
- Lamarre, C., Ibrahim-Granet, O., Du, C., Calderone, R., & Latge, J. P. (2007). Characterization of the SKN7 ortholog of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* , 682-690.
- Lee, B. N., Kroken, S., & Chou, D. Y. (2005). Functional analysis of all nonribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, NPS6, involved in virulence and resistance to oxidative stress. *Eukaryot Cell* , 545-555.
- Li, S. (2002). The eukaryotic two-component histidine kinase Sln1p regulates OCH1 via the transcription factor, Skn7p. *Mol. Biol. Cell* , 412-424.
- Li, S., Ault, A., Malone, C. L., Raitt, D., Dean, S., Johnston, L. H., *et al.* (1998). The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J* , 17 (23), 6952-6962.
- Liu, Q., Ying, S. H., Li, J. G., Tian, C. G., & Feng, M. G. (2013). Insight into the transcriptional regulation of Msn2 required conidiation, multi-stress responses and virulence of two entomopathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* , 42-51.
- López-Calleja, C. A. (2014). Efecto de la regulación por pH y la expresión del factor de transcripción PacC sobre la producción de antibióticos beta-lactámicos en *Acremonium*

- chrysogenum. *Tesis (Doctorado en Biotecnología) Universidad Autónoma Metropolitana* , 71-75.
- Manzoni, M., & Rollini, M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statin by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 555-564.
- Manzoni, M., Rollini, M., Bergomi, S., & Cavazzoni, V. (1998). Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains. *Biotechnology Techniques* , 529-532.
- Marcial Quino, J. (2011). Identificación de una aspartato proteasa producida por *Amylomyces rouxii*, silenciamiento del gen que la codifica y efecto sobre la actividad tirosinasa. *Tesis (Doctorado en Biotecnología) México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana* .
- Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., & Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO Journal* , 15, 2227-2235.
- Miranda Labra, R. U. (2008). Expresión del gen *sod1* durante trofofase e idiofase de *Aspergillus terreus* en fermentación sólida y líquida. *Tesis (Maestría en Biotecnología) Universidad Autónoma Metropolitana* .
- Miranda Labra, R. U. (2013). Relación del estrés oxidante con la biosíntesis de lovastatina por *Aspergillus terreus* en fermentación sólida y líquida. *Tesis (Doctorado en Biotecnología) Universidad Autónoma Metropolitana* .
- Miranda Labra, R. U., Gómez-Quiroz, L. E., Mendoza, M., Fierro, F., & Barrios-González, J. (2014). Reactive oxygen species regulate lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus* during submerged and solid-state fermentations. *Fungal Biology* , 85-93.
- Miranda, R. U., Gómez-Quiroz, L. E., Mejía, A., & Barrios-González, J. (2013). Oxidative state in idiophase links reactive oxygen species (ROS) and lovastatin biosynthesis: Differences and similarities in submerged- and solid- state fermentations. *Fungal Biology* , 117, 85-93.
- Miskei, M., Karanyi, Z., & Pócsi, I. (2009). Annotation of stress-response proteins in the aspergilli. *Fungal Genet. Biol.* , 46, S105-S102.
- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2011). The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* , 190, 1157-1195.

- Morgan, B. A., Banks, G. R., Toone, W. M., Raitt, D., Kuge, S., & Johnston, L. H. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* , 16, 1035-1044.
- Motoyama, T. (2008). Involvement of putative response regulator genes of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in osmotic stress response, fungicida action and pathogenicity. *Curr. Genet.* , 185-195.
- Mulford, K. E., & Fassler, J. S. (2011). Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryotic Cell* , 10, 761-769.
- Nakamichi, N. (2003). Characterization of Prr1 response regulator with special reference to sexual development in *Schizosacchamycles pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , 547-555.
- Narasaiah, K., Sashidhar, R., & Subramanyam, C. (2006). Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia* , 179-189.
- Ohmiya, R., Kato, C., Yamada, H., Aiba, H., & Mizuno, T. (1999). A fission yeast gene (prp1+) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response . *Journal Biochemistry* , 125, 1061-1066.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A., & Nigam, P. (2001). Solid-State Fermentation in Biotechnology-Fundamentals and Applications. *Asia Tech Publishers, Inc. New Delhi* , 100-221.
- Pérez-Sánchez, A. (2014). Efecto de los estímulos del medio sólido: contacto con el aire y estímulos de soporte en la biosíntesis de lovastatina por *Aspergillus terreus*. *Tesis (Maestría en Biotecnología) Universidad Autónoma Metropolitana* , 96-100.
- Raitt, D. C., Johnson, A. L., Erkin, A. M., Makino, K., Morgan, B., Gross, D. S., *et al.* (2000). The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for induction of heat shock genes by oxidative stress. *Molecular Biology Cell* , 11, 2335-2347.
- Reverberi, M., Zjalic, S., Punelli, F., Ricelli, A., Fabbri, A. A., & Fanelli, C. (2007). Apyap1 affects aflatoxin biosynthesis during *Aspergillus parasiticus* growth in maize seeds. *Food Additives and Contaminants* , 24, 1070-1075.
- Reverberi, M., Zjalic, S., Ricelli, A., Fabbri, A. A., & Fanelli, C. (2006). Oxidant/antioxidant balance in *Aspergillus parasiticus* affects aflatoxins biosynthesis. *Mycotoxin Research* , 22, 39-47.

- Reverberi, M., Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F., Camarena, E., Fabbri, C., *et al.* (2008). Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: A role for the ApyapA gene. *Eukaryotic Cell* , 7, 988-1000.
- Rollini, M. M. (2002). Biosynthesis and biotechnology production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 555-564.
- Roze, L. V., Chanda, A., Wee, J., Awad, D., & Linz, J. E. (2011). Stress-related transcription factor ATFB integrates secondary metabolism with oxidative stress response in aspergilli. *Journal of Biological Chemistry* , 286, 35137-35148.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmitt, A. P., & McEntee, K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 5777-5782.
- Schmitt, A. P., & McEntee, K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 5777-5782.
- Singh, P., Chauhan, A., Ghosh, F., Dixon, F., & Calderone, R. (2004). SKN7 of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect. Immun* , 2390-2394.
- Storz, G., Christman, M. F., Sies, H., & Ames, B. N. (1987). Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 84, 8917-8921.
- Suryanarayan, S., & Mazumdar, K. (2003). *Patente n° US6664095- Solid state fermentation*.
- Szakács, G., Morovján, R. P., & Tegerdy. (1998). Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Letters* , 411-415.
- Thevelein, J. M., Cauwenberg, L., Colombo, S., De Winde, J. H., & Donatoni, M. (2000). Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance and growth in yeast. *Enzyme Microbiology and Technology* , 819-825.
- Toledo, I., Rangel, P., & Hansberg, W. (1995). Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Archives of Biochemistry* , 519-524.
- Trott, A., & Morano, K. A. (2003). The yeast response to heat shock . *Yeast Stress Responses* , 71-119.

- Ullán, R. V. (2008). RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: Validation studies using B-lactam genes expression. *Journal of microbiological methods* , 209-218.
- Valera, H. R., Gomes, J., Lakshmi, S., Gururaja, R., Suryanarayan, S., & Kumar, D. (2005). Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. *Enzyme and Microbial Technology* , 521-526.
- Vargas-Perez, I., Sanchez, O., Kawasaki, L., Georgellis, D., & Aguirre, J. (2007). Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* , 6, 1570-1583.
- Werner-Washburne, M. B., J., M. B., Koscic-Smithers, J., & Craig, E. A. (1989). Yeast HSP70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *Journal of Bacteriology* , 171, 2680-2688.
- Yang, D. J., & Hwang, L. S. (2006). Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in PuErh tea. *Journal of chromatography* , 277-284.
- Yin, W. B., Reinke, A. W., Szilagy, M., Emri, T., Chiang, Y. M., Keating, A. E., *et al.* (2013). bZIP transcription factors affecting secondary metabolism sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Mycrobiology* , 159, 77-88.
- Yoshizawa, Y. (1994). Revision of the biosynthetic origin of oxygens in mevilonin (lovastatin), a hypocholesterolemic drug from *Aspergillus terreus* MF 4845. *Journal of the American Chemical Society* , 2693-2694.