



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**CLONACIÓN Y SOBREEXPRESIÓN DEL GEN REGULADOR
GLOBAL *laeA* EN *Aspergillus terreus* TUB-514: EFECTO SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA EN FERMENTACIÓN SÓLIDA Y
LÍQUIDA**

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

I.B.I. Teresa Pérez Aguirre

Director de Tesis:

Dr. Javier Barrios González

Asesores:

Dr. Francisco Fierro Fierro

Dr. Armando Mejía Álvarez

México, D.F., 25 de Septiembre del 2009.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios, del 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 – Unidad Iztapalapa, se encuentra reconocida en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, con el número de registro 203425.

México, D.F., 25 de Septiembre del 2009.

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

**CLONACIÓN Y SOBREEXPRESIÓN DEL GEN REGULADOR GLOBAL *laeA* EN
Aspergillus terreus TUB-514: EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA
EN FERMENTACIÓN SÓLIDA Y LÍQUIDA**

Que presentó

Teresa Pérez Aguirre

Comité tutorial:

Director: Dr. Javier Barrios González.

Asesores: Dr. Armando Mejía Álvarez.
Dr. Francisco Fierro Fierro


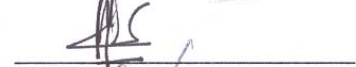
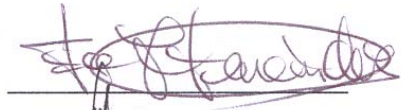
Jurado:

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino.

Secretario: Dr. Armando Mejía Álvarez.

Vocal: Dr. Francisco Fierro Fierro.

Vocal: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.



A Dios

Gracias por darme la oportunidad de vivir, estar siempre cuidándome y llenarme de bendiciones. Y por dejarme lograr una de mis metas principales, llegar a ser profesionista. Gracias por las enseñanzas de cada día.

A mis padres

Sé que sin ustedes no estaría aquí. A mi padre fallecido, gracias papí por darme el gran ejemplo de la perseverancia y coraje para enfrentar las adversidades. Y a tí mamá, por regalarme tu amor y apoyo incondicional. Tal vez casi no lo expresó, pero los admiro y amo. Son un regalo de Dios, agradezco haber caído en sus brazos, haberlos conocido y ser parte de mi vida.

A mi esposo e hijo

A tí Armando, por apoyarme en los momentos más difíciles de mi vida y ser el pilar de mi éxito y felicidad. Por ser el esposo ideal, siempre a mi lado compartiendo tristezas y alegrías; brindándome comprensión, amor y mucha mucha paciencia; y por regalarme un pedacito de tu corazón y amor, un hijo hermoso, Isaí. A tí mi pequeño bebe, gracias por ser la inspiración de amor y lucha, por darme una explicación más de porque la vida es maravillosa, gracias por tu ternura, caricias y sonrisas, es la mejor recompensa que puedo recibir por mis desvelos y sacrificios. Quiero que algún día estén orgullosos de mí como mamá, amiga y mujer. Los amo a los dos, son mis más grandes tesoros...

Con toda mi admiración y amor...

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerme inicialmente al Dr. Javier Barrios por permitirme realizar mi tesis bajo su supervisión. Gracias por la paciencia y apoyo recibido. También por los consejos brindados como amigo.

A mis asesores, Armando Mejía y Francisco Fierro, por aportar sugerencias y corregirme en el transcurso de mi trabajo. Gracias Armando por ser asesor y amigo incondicional, por tus consejos que me confortaron y fueron de gran ayuda en mis decisiones tomadas.

A todos mis profesores de la maestría, que cooperaron y brindaron parte de su conocimiento y experiencia.

A todos mis compañeros del laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios, por hacer menos tenso y cansado el trabajo, por sus sugerencias y las grandes conversaciones de lecciones de vida para ser mejor persona. Todos han aportado cosas lindas en mi vida, no tengo queja de ustedes, gracias por ser excelentes compañeros de trabajo. Especialmente tu apoyo Rox, sin tí estaría pérdida, por tus propuestas, paciencia y amistad. A ustedes, Isadora, Karla, Vicky, Ana y Jessi, por su comprensión y por brindarme sus hombros cuando lo necesitaba, por sus palabras cuando creía caer, por ser las mejores amigas que he conocido en el posgrado, me llevo gratos recuerdos de nuestras pláticas y locuras.

A Conacyt por creer en mí, y darme la oportunidad de responderles con responsabilidad, gracias por la beca dada y ofrecerme el escalón de una vida de investigación. A UAM-I por ser el soporte desde el inicio para ser profesionista e investigadora.

Y a todos aquellos que no he mencionado, pero no por ello son menospreciados. A mis hermanos, en especial a Gabriel por sus abrazos y ánimos, que de alguna forma me reconfortaron para seguir adelante. A Roberto Zúñiga, por sus lindas palabras llenas de cariño y admiración, que en momentos difíciles me llenaron de confort. A todos que de alguna manera estuvieron conmigo contribuyendo en mi desarrollo profesional, social y emocional, por hacerme ver que tengo la capacidad y fortaleza para enfrentar cada obstáculo y ser capaz de llegar hasta donde yo deseé...

GRACIAS

RESUMEN

Las bacterias del grupo actinomicetos y hongos filamentosos son los principales productores de metabolitos secundarios. *Aspergillus terreus* es un hongo filamentosos que produce lovastatina, metabolito secundario que tiene actividad farmacológica muy importante, ya que reduce los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre. En forma convencional, la producción de lovastatina se ha llevado a cabo en medio líquido, sin embargo, nuestro grupo de investigación ha desarrollado un sistema novedoso en fermentación sólida (FS) utilizando un soporte inerte artificial donde la producción de lovastatina se eleva considerablemente.

Para hacer más productivo el sistema, es necesario desarrollar metodología para mejorar genéticamente las cepas, particularmente para FS. Una opción sofisticada es la amplificación del gen regulador global positivo de metabolitos secundarios, llamado *laeA*, éste codifica una proteína con posible actividad metiltransferasa, y regula la transcripción de genes biosintéticos de metabolitos secundarios probablemente mediante la modificación de la cromatina, quizás por intervención con metilasas o diacetilasas.

El objetivo principal en este trabajo fue evaluar la sobreexpresión del gen *laeA* (*SE::laeA*) en *A. terreus* como estrategia para incrementar la producción de lovastatina, sin embargo, considerando que para lograrlo se llevaron a cabo 2 estrategias, sobreexpresar el gen *laeA* a partir de su propio promotor y mediante un promotor constitutivo (*gpdA*), es posible que el efecto sea diferente en fermentación sólida (FS) y fermentación líquida (FL).

Se amplificaron dos fragmentos con el gen *laeA* (completo y secuencia codificadora) y se clonaron en los vectores plasmídicos (pULC43 y pAN52.1), obteniéndose 2 construcciones: pUAMTPlaeA (propio promotor del gen *laeA*) y pUAMTPlaeAcons (promotor *gpdA*). Se transformaron dichas construcciones en *A. terreus*, y con las 13 transformantes confirmadas de pUAMTPlaeA, se realizó una preselección mediante la producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA). Se preseleccionaron 7 transformantes que mostraron

producciones superiores a la parental en FCA y se evaluó su producción de lovastatina al séptimo día en FS y FL.

En FS, todas las transformantes pUAMTPlaeA exhibieron niveles de producción superior a la parental; con incrementos desde 5% hasta 47.4%. Es de destacar que sólo 4 de estas transformantes presentaron incrementos en la producción de lovastatina en FL, obteniéndose fuertes disminuciones en las otras 3. El rango de variación en FL fue de -54.8% a 89.2%. En cuanto a las transformantes con promotor constitutivo (pUAMTPlaeAcos), sólo se obtuvieron 5 transformantes confirmadas, por lo que no se preseleccionaron, sino que todas se evaluaron en FS y FL. En este caso también, todas las transformantes fueron sobreproductoras en FS con incrementos desde 29.7% hasta 137.9%. En FL sólo 3 fueron sobreproductoras y 2 mostraron fuertes disminuciones; con rango de variación de -34.3% a 100.8%.

Con base en estos datos se seleccionaron las transformantes pUAMTPlaeA T12, T13 y T14 y se evaluó su producción en forma más precisa, realizando cinéticas de producción y haciendo un análisis estadístico. Así, las mejores productoras de lovastatina de este grupo, en FS, fueron T12 y T13, con producciones de 10.49 y 11.87 mg /gms respectivamente; lo cual representa incrementos de 49.26 y 68.78% con respecto a la producción de la parental. En FL la mejor productora de este grupo (y de todas) fue T14, con una producción de 1.39 mg/mL, y un incremento de 111% respecto a la parental ($p < 0.00001$).

De igual forma se hicieron cinéticas de las 2 transformantes seleccionadas que expresaron *laeA* desde un promotor constitutivo (pUAMTPlaeAcons). La mejor productora de este grupo (y de todas) en FS, fue T2, con una producción de 16.8 mg/gms, representando un incremento de 138.64% ($p < 0.00001$). La mejor productora en FL fue T5, con una producción de 1.3 mg/mL y un 94.5% de incremento. La prueba de Tukey demostró que las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$).

Estos resultados indican que el incremento de la dosis génica de *laeA* en *A. terreus* es un método eficiente de mejoramiento genético molecular de la producción de lovastatina en FS y

también en FL, aunque las mejores transformantes no son las mismas para uno u otro sistema. Probablemente es más conveniente sobreexpresar *laeA* desde un promotor constitutivo para aislar cepas específicas para FS, mientras que para FL sería probablemente más conveniente *laeA* expresado desde su propio promotor para generar cepas sobreproductoras.

Un punto interesante es que la mejor transformante para FS mostró una disminución (10.9%) en su producción en FL, confirmando que las características para producir altos niveles de lovastatina en FS son diferentes a las necesarias para producirlos en FL.

Algunos resultados sugieren que la producción en FL es más susceptible a problemas derivados del punto de inserción del gen *laeA*, pues una proporción importante de transformantes redujo su producción en FL (40%), mientras que todas incrementaron su producción en FS.

Por otra parte, las transformantes obtenidas mostraron cambios en su morfología colonial, observándose surcos y más esporulación con respecto a la parental, lo que da evidencia de que la morfología de las transformantes fue afectada por la sobreexpresión de *laeA*.

INDICE GENERAL

A. INDICE DE FIGURAS	xii
B. INDICE DE TABLAS	xiv
C. ABREVIATURAS.....	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS.....	1
1.1.1 LOVASTATINA	3
1.1.1.1 PRODUCCIÓN	6
1.2 FERMENTACIÓN EN CULTIVO SÓLIDO.....	7
1.3 REGULACIÓN GENÉTICA	10
1.4 MEJORAMIENTO GENÉTICO	14
2. ANTECEDENTES.....	16
3. HIPÓTESIS.....	18
4. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo General	18
4.2 Objetivos Específicos.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 MICROORGANISMOS UTILIZADOS	19
5.1.1 Cepa fúngica: <i>Aspergillus terreus</i> TUB-514.....	19
5.1.2 Cepa bacteriana: <i>Escherichia coli</i> DH5 α	19
5.2 VECTORES PLASMÍDICOS.....	19
5.2.1 pULC43 (S. Gutiérrez, no publicado):	19
5.2.2 pAN52.1 (Punt <i>et al.</i> , 1990):.....	19
5.3 REACTIVOS.....	19
5.3.1 Ácidos nucleicos	19
5.3.2 Antibióticos	20
5.3.3 Enzimas.....	20
5.3.4 EQUIPO.....	20
5.4 MEDIOS DE CULTIVO	20
5.4.1 Medios de cultivo para <i>Aspergillus terreus</i>	20
5.4.2 Medio de cultivo para <i>Escherichia coli</i> DH5 α	21
5.4.3 Antibióticos suplementados.....	21
5.5 CONDICIONES DE CULTIVO	22
5.5.1 Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	22
5.5.2 Crecimiento de <i>Aspergillus terreus</i>	22

5.6	TÉCNICAS ANALÍTICAS	22
5.6.1	ADN	22
5.6.1.1	Extracción de ADN genómico de <i>Aspergillus terreus</i>	22
5.6.1.2	Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	23
5.6.1.2.1	Boiling (Miniprep)	23
5.6.1.2.2	Midiprep-Kit	23
5.6.1.3	Diseño de oligos para obtener 2 fragmentos del gen <i>laeA</i> de <i>A. terreus</i>	24
5.6.1.3.1	Reacción en cadena de la ADN polimerasa	24
5.6.1.3.2	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	25
5.6.1.3.3	Purificación de insertos por Freeze & Squeeze	25
5.6.1.4	Clonación de los insertos en los vectores pULC43, pAN52.1 y PCN2	26
5.6.1.4.1	Digestiones de insertos y vectores	26
5.6.1.4.2	Ligación	26
5.6.1.4.3	Preparación de células electrocompetentes	26
5.6.1.4.4	Electroporación de <i>E. coli</i> DH5 α	27
5.6.1.5	Transformación de <i>Aspergillus terreus</i> TUB-514	27
5.6.1.5.1	Crecimiento del micelio	27
5.6.1.5.2	Obtención de protoplastos	28
5.6.1.5.3	Transformación	28
5.6.1.5.4	Extensión en placa	28
5.6.2	SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES	28
5.6.2.1	Siembra por picadura	28
5.6.2.2	Fermentación en cilindros de agar (FCA)	29
5.6.3	FERMENTACIONES	29
5.6.3.1	Fermentación líquida	29
5.6.3.2	Fermentación sólida	29
5.6.4	CUANTIFICACIÓN	30
5.6.4.1	Fermentación líquida	30
5.6.4.1.1	Biomasa y humedad	30
5.6.4.1.2	Lovastatina en caldo	30
5.6.4.1.3	Lovastatina en micelio	30
5.6.4.1.4	pH	30

5.6.4.2	Fermentación sólida	30
5.6.4.2.1	pH	30
5.6.4.2.2	Lovastatina	30
5.6.4.2.3	Humedad.....	30
5.6.4.2.4	Biomasa (Glucosamina).....	31
6.	RESULTADOS.....	32
6.1	OBTENCIÓN DE ADN TOTAL DE <i>A. terreus</i>	32
6.2	AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS FRAGMENTOS CON EL GEN <i>laeA</i>	32
6.2.1	PCR para obtener el gen <i>laeA</i> completo	33
6.2.2	PCR para obtener el gen <i>laeA</i> cds	34
6.3	CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE PCR EN VECTORES PLASMÍDICOS.....	34
6.3.1	Clonación del gen <i>laeA</i> completo en vector pULC43	35
6.3.2	Clonación del gen <i>laeA</i> cds en vector pAN52.1.....	35
6.4	SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS	37
6.5	TRANSFORMACIÓN EN <i>A. terreus</i>	37
6.5.1	Transformación de <i>A. terreus</i> con construcción pUAMTPlaeA y selección de transformantes.....	38
6.5.2	Cotransformación de <i>A. terreus</i> con construcción pUAMTPlaeAcons y selección de transformantes.....	41
6.6	CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE LAS TRANSFORMANTES EN FS Y FL.....	44
6.7	MORFOLOGÍA.....	46
6.8	INTEGRACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES EN LAS TRANSFORMANTES.....	46
7.	DISCUSIÓN	50
7.1	Obtención de ADN total de <i>A. terreus</i> y amplificación por PCR de <i>laeA</i> y <i>laeAcons</i>	50
7.2	Clonación de <i>laeA</i> en vectores plasmídicos	50
7.3	Transformación de <i>A. terreus</i> y selección de transformantes	52
7.3.1	Preselección de transformantes	52
7.3.2	Selección de transformantes en FS y FL.....	52
7.4	Caracterización de transformantes.....	54
7.4.1	Cinéticas de producción	54
7.4.2	Morfología.....	56
7.4.3	Integración de construcciones	56
8.	CONCLUSIONES	57
9.	PERPECTIVAS	57
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	58

A. INDICE DE FIGURAS

Fig.1-1.Ruta biosintética del colesterol: reproducido de http://es.wikipedia.org/wiki/Hipolipemiente .	4
Fig.1-2.Estructura de la lovastatina: reproducido de http://es.wikipedia.org/wiki/Hipolipemiente .	4
Fig. 1-3. <i>Cluster</i> de genes biosintéticos de la lovastatina: reproducido de Kennedy <i>et al.</i> (1999).	5
Fig. 1-4. Modelo propuesto de regulación de metabolitos secundarios: reproducido de Woo & Keller (2004).	12
Fig. 1-5. Modelo de la función de LaeA: reproducido de Keller <i>et al.</i> (2005).	13
Fig. 6-1. ADN genómico de <i>A. terreus</i> .	32
Fig. 6-2. Fragmento con el gen <i>laeA</i> completo.	33
Fig. 6-3. Fragmento con el gen <i>laeA</i> cds.	33
Fig. 6-4. Electroforesis que muestra PCR mediante gradiente de temperatura para obtener el gen <i>laeA</i> completo.	33
Fig. 6-5. Electroforesis que muestra PCR mediante gradiente de temperatura para obtener el gen <i>laeA</i> cds.	34
Fig. 6-6. Electroforesis de clonación: A) Vector pULC43 y gen <i>laeA</i> completo digeridos con <i>Bam</i> HI; B) Plásmidos de transformantes de <i>E. coli</i> con el producto de ligación y digeridos con <i>Bam</i> HI; C) Midiprep de construcción pUMTPlaeA y posterior digestión con <i>Bam</i> HI.	35
Fig. 6-7. Electroforesis de la amplificación del vector pAN52.1: A) Plásmidos de transformantes de <i>E. coli</i> con el vector y digeridos con <i>Bam</i> HI; B) Midiprep del vector pAN52.1 y posterior digestión con <i>Bam</i> HI.	36
Fig. 6-8. Electroforesis de clonación: A) Vector pAN52.1 y gen <i>laeA</i> cds digeridos con <i>Nco</i> I y <i>Bam</i> HI; B) Plásmidos de transformantes de <i>E. coli</i> con el producto de ligación y digeridos; C) Midiprep de construcción pUMTPlaeAcons y posterior digestión.	36
Fig. 6-9. Concentración mínima inhibitoria de fleomicina en protoplastos.	37
Fig. 6-10. Preselección de transformantes de pUAMTPlaeA.	38
Fig. 6-11. Producción de LOV al séptimo día de transformantes <i>laeA</i> en FS y FL.	1
Fig. 6-12. Producción específica de LOV al séptimo día de transformantes <i>laeA</i> en FS y FL.	1

Fig. 6-13. Preselección de transformantes de pUAMTPlaeAcons.	41
Fig. 6-14. Producción de LOV al séptimo día de transformantes laeAcons en FS y FL.	1
Fig. 6-15. Producción específica de LOV al séptimo día de transformantes laeAcons en FS y FL.	1
Fig. 6-16. Cinética de producción de LOV de transformantes seleccionadas en FS. ◆Parental; ■ T12laeA; ▲ T13laeA; ● T2laeAcons.	44
Fig. 6-17. Cinética de producción de LOV de transformantes seleccionadas en FL. ◆Parental; ■ T14laeA; ▲ T5laeAcons.	45
Fig. 6-18. Esporulación de parental y transformantes seleccionadas.	46
Fig. 6-19. A) Electroforesis de construcción pUAMTPlaeA digerido con <i>EcoRI</i> , <i>SacII</i> y <i>XhoI</i> . B) Dirección en la que se encuentra el gen completo <i>laeA</i> en el vector pULC43 para obtener la construcción pUAMTPlaeA.	47
Fig. 6-20. Construcción pUAMTPlaeAcons.	47
Fig. 6-21. Fragmento para construcción pUAMTPlaeA.	48
Fig. 6-22. Fragmento para construcción pUAMTPlaeAcons.	48
Fig. 6-23. Electroforesis que muestra fragmentos de PCR de las construcciones integradas en el ADN de las transformantes laeA y laeAcons.	49

B. INDICE DE TABLAS

Tabla 6-1. Diseño de oligos para amplificar los fragmentos del gen <i>laeA</i> .	32
Tabla 6-2. Vectores y fragmentos con el gen <i>laeA</i> .	34
Tabla 6-3. Resultados del análisis Blastn para cada secuencia del gen <i>laeA</i> obtenida.	37
Tabla 6-4. Producción de LOV al séptimo día de transformantes <i>laeA</i> en FS y FL.	38
Tabla 6-5. Comparación de medias de producción de LOV de transformantes <i>laeA</i> en FS.	39
Tabla 6-6. Comparación de medias de producción de LOV de transformantes <i>laeA</i> en FL.	39
Tabla 6-7. Transformantes de pUAMTPlaeA en orden descendente a su producción de lovastatina según preselección y selección en FS y FL.	40
Tabla 6-8. Producción de LOV al séptimo día de transformantes <i>laeA</i> en FS y FL.	41
Tabla 6-9. Comparación de medias de producción de LOV de transformantes <i>laeA</i> cons en FS.	42
Tabla 6-10. Comparación de medias de producción de LOV de transformantes <i>laeA</i> cons en FL.	42
Tabla 6-11. Transformantes de pUAMTPlaeAcons en orden descendente a su producción de lovastatina según preselección y selección en FS y FL.	43
Tabla 6-12. Resumen de transformantes seleccionadas en FS y FL evaluadas al séptimo día.	44
Tabla 6-13. Comparación de medias de producción de LOV de transformantes seleccionadas en FS.	45
Tabla 6-14. Comparación de medias de producción de LOV de transformantes seleccionadas en FL.	45
Tabla 6-15. Sitios de corte para construcción pUAMTPlaeA.	46
Tabla 6-16. Diseño de oligos para construcciones pUAMTPlaeA y pUAMTPlaeAcons.	48

C. ABREVIATURAS

MS	Metabolismo secundario
FS	Fermentación sólida
FL	Fermentación líquida
LOV	Lovastatina
PN	Penicilina
AF	Aflatoxina
ST	Esterigmatocistina
ble	Fleomicina
Amp	Ampicilina
Cm	Cloranfenicol
ADN	ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SE	Sobreexpresión
rpm	revoluciones por minuto
g	gramo
mg	miligramo
µg	microgramo
h	hora
min	minuto
mL	mililitro
µL	microlitro
mg LOV/gms	miligramo lovastatina/gramo medio seco
µg LOV/mg MS	microgramo lovastatina/miligramo micelio seco

1. INTRODUCCIÓN

1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios microbianos (MS), son compuestos con estructuras químicas variadas y sofisticadas, producidos principalmente por hongos y actinomicetos (particularmente por el género *Streptomyces*), generalmente en la fase estacionaria del ciclo del crecimiento celular (idiofase). No juegan un rol fisiológico durante la fase exponencial del crecimiento, considerándose en este sentido compuestos opuestos a los metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos), que sí son esenciales para el crecimiento (Barrios-González *et al.*, 2003).

Aunque los antibióticos son los MS mejor conocidos hay otros con una enorme gama de actividades biológicas, principalmente en campos como: farmacéutico, cosmético, alimenticio, agrícola y ganadero. Este grupo incluye compuestos con actividades anti-inflamatorias, hipotensivas, anti-tumorales, anti-colesterolémicas, y también otros usados como insecticidas, reguladores del crecimiento en plantas, herbicidas y pesticidas amigables con el ambiente, entre otros (Barrios-González *et al.*, 2003). La digitalina, morfina y quinina son MS de plantas, mientras que la penicilina, cefalosporina, ergotato y la estatinas son MS de hongos (Keller *et al.*, 2005).

Los MS son compuestos bioactivos de bajo peso molecular y provienen de un número limitado de precursores del metabolismo primario, por lo que son producidos en rutas biosintéticas comunes correlacionadas con un estado específico de diferenciación morfológica (Woo *et al.*, 2006). Algunos MS (incluyendo los antibióticos) estimulan la formación de esporas y la inhibición o estimulación de la germinación. Así, el metabolito secundario puede: (i) retrasar la germinación de esporas hasta encontrarse en un ambiente de menor competitividad y mejores condiciones para el crecimiento; (ii) proteger el estado latente o la iniciación de la espora; o (iii) limpiar el ambiente de microorganismos competidores durante la germinación (Demain & Fang, 2000).

Los MS se clasifican de acuerdo al precursor involucrado en su biosíntesis (Barrios-González *et al.*, 2003):

- a) Metabolitos derivados del ácido shikímico (aminoácidos aromáticos). Ejemplos son los alcaloides del ergot y los antibióticos candicidina y cloranfenicol.
- b) Metabolitos derivados de aminoácidos. Esta familia incluye los antibióticos β -lactámicos: penicilina, cefalosporina y cefamicina, así como antibióticos ciclopéptidicos tales como gramicidina o la ciclosporina (usado como agente inmunosupresivo).
- c) Metabolitos derivados de Acetil-CoA (y compuestos relacionados, incluyendo intermediarios del ciclo de Krebs). Esta familia puede subdividirse en policétidos y terpenos. Ejemplo de policétidos es la eritromicina, el compuesto insecticida-antiparasítico avermectina, el agente anti-tumoral doxorubicina y la lovastatina, un compuesto anti-colesterolémico de importancia comercial. Ejemplo de terpenos es el agente anti-tumoral no citotóxico taxol.
- d) Metabolitos derivados de los azúcares. Ejemplos son la estreptomycin y la kanamicina.

Las características biológicas de los MS han estimulado los estudios orientados a identificar los genes implicados en su síntesis. Acumulando datos de estos estudios se dispó una premisa original, la de que dichos genes podrían estar dispersos a través del genoma. Avances recientes en biología molecular, bioinformática y genómica comparativa han revelado que los genes que codifican MS específicos en hongos, en contraste con la mayoría de los genes implicados en metabolismo primario, se encuentran en agrupamientos (*clusters*) en los genomas fúngicos, frecuentemente localizados cerca de los telómeros (Keller & Hohn, 1997; Keller, *et al.*, 2005). Ejemplos de estos *clusters* de genes son notables en el género *Aspergillus*, e incluyen aquellos que sintetizan antibióticos (penicilina, PN), productos farmacéuticos (lovastatina, LOV), toxinas (aflatoxina, AF) y esterigmatocistina (ST), una toxina carcinogénica (Zhang *et al.*, 2005).

1.1.1 LOVASTATINA

La hipercolesterolemia es considerada un factor de riesgo importante en enfermedades arteriales coronarias. Así, la posibilidad de controlar la síntesis *de novo* de colesterol endógeno (el cual representa casi las dos terceras partes del total del colesterol en el cuerpo), constituye una forma efectiva de bajar los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma (Manzoni & Rollini, 2002). Las estatinas, son fármacos que inhiben la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa (mevalonato: NADP⁺ oxidoreductasa [Ec 1.1.1.34]), la cual cataliza la reducción de HMG-CoA a mevalonato, un paso clave en la biosíntesis de colesterol (Fig. 1-1) (Gunde-Cimerman *et al.*, 1993; Manzoni *et al.*, 1999; Treiber & Reamer, 1989). Actualmente hay cinco estatinas de uso clínico: la atorvastatina y fluvastatina, que son totalmente sintéticas derivados de mevalonato y piridina, la simvastatina es semi-sintética y la pravastatina (derivado de mevastatina) y lovastatina, estatinas naturales de origen fúngico. Las estatinas naturales pueden ser obtenidas de diferentes especies y géneros de hongos filamentosos, la lovastatina es principalmente producida por cepas de *Aspergillus terreus*, y la mevastatina por *Penicillium citrinum*. La pravastatina puede ser obtenida por la biotransformación de mevastatina por *Streptomyces carbophilus* y la simvastatina por procesos semi-sintéticos que involucran la modificación química de la cadena lateral de la lovastatina. El efecto hipocolesterolémico de las estatinas se traduce en la reducción de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), implicadas en la translocación de colesterol, y en el incremento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), mediante la reducción de LDL a HDL-colesterol, el mejor predictor de riesgos aterogénicos (Manzoni & Rollini, 2002). Entre las estatinas naturales, la más potente es la lovastatina (Ki 0.6 nM), debido a que es de escasa hepatotoxicidad, utilizándose en tratamiento para la hipercolesterolemia en humanos. La lovastatina actúa formando complejos reversibles con la HMG-CoA reductasa mediante una gran cantidad de interacciones de Van der Waals. Además, es un inhibidor competitivo que desplaza efectivamente al sustrato natural de la HMG-CoA reductasa uniéndose a ésta en concentraciones micromolares (Oropeza *et al.*, 2005).

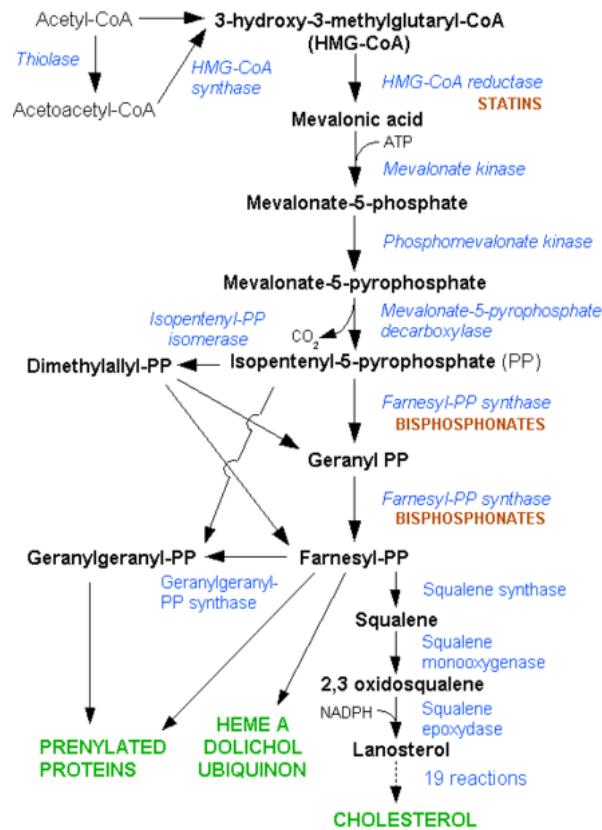


Fig. 1-1. Ruta biosintética del colesterol: reproducido de <http://es.wikipedia.org/wiki/Hipolipemiente>.

La lovastatina ($C_{24}H_{36}O_5$; y comercialmente Mevinacor, Monacolin K, Mevinolin, Mevacor, Lovalord, Nergadan, Altacor, Lovalip, Artein) tiene una estructura similar a la de la forma ácida de las demás estatinas, al poseer un policétido principal compuesto de un sistema de anillos de hidroxi-hexahidro-naftaleno (Fig. 1-2) (Manzoni & Rollini, 2002).

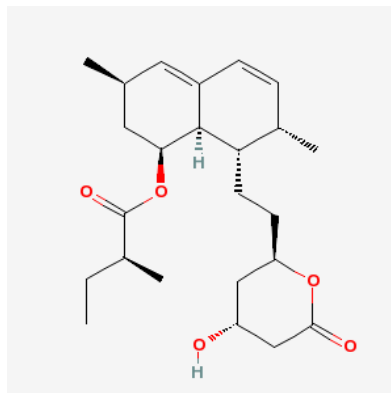


Fig. 1-2. Estructura de la lovastatina: reproducido de <http://es.wikipedia.org/wiki/Hipolipemiente>.

La ruta biosintética de la lovastatina se ha investigado por resonancia magnética y espectroscopia de masas (Chan *et al.*, 1983; Moore *et al.*, 1985; Yoshizawa *et al.*, 1994). Estos resultados concluyeron que la lovastatina está compuesta de dos cadenas de policétidos distintos unidas a través de un enlace éster, las cuales son ensambladas por 2 policétidos sintasas (Sistema Multifuncional de Policétido Sintetas (PKSs) el cual comprende una Nonacetido Sintasa (LNKS) involucrada en la ciclación de la cadena principal de policétidos, para formar el sistema de anillos de hexahidronaftaleno, y una Dicitido Sintasa (LDKS) involucrada en la transferencia del metilbutiril al costado de la cadena de la monacolina J), estos resultados provienen de la clonación y la parcial caracterización del *cluster* de genes biosintéticos de lovastatina de *A. terreus* (Hendrickson *et al.*, 1999; Manzoni & Rollini, 2002; Kennedy *et al.*, 1999). El *cluster* de los genes biosintéticos de la lovastatina consiste en 18 probables marcos de lectura abiertos (open reading frames u ORFs): *lovB* y *lovF* biosíntesis de policétidos; *lovC* enoil reductasa; *lovD* transesterasa; *lovE* y *lovH* genes reguladores; *ORF2* Y *ORF17* genes de citocromos P-450; *ORF1* y *ORF10* genes potenciales de resistencia; *ORF12* y *ORF16* genes de transporte; *lovG*, *ORF12*, *ORF15* y *ORF18* función desconocida (Fig. 1-3) (Kennedy *et al.*, 1999).

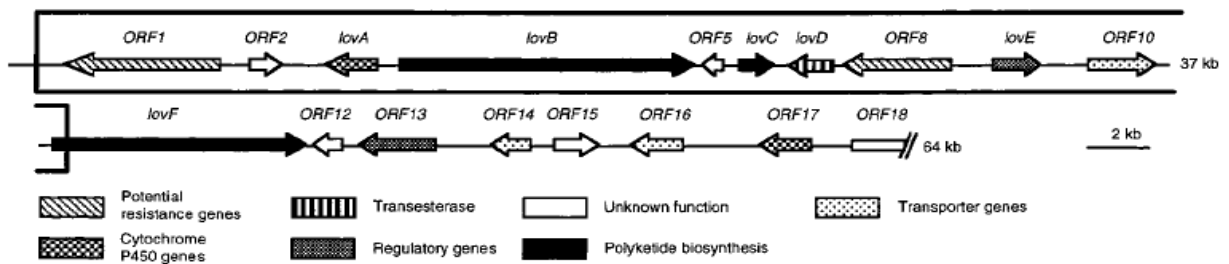


Fig. 1-3. *Cluster* de genes biosintéticos de la lovastatina: reproducido de Kennedy *et al.* (1999).

1.1.1.1 PRODUCCIÓN

La lovastatina fue la primera estatina en ser aprobada por la FDA de EU (1987) y puesta a disposición para el mercado farmacéutico. Fue obtenida de una cepa aislada del suelo y clasificada como *Aspergillus terreus* en los Laboratorios CIBE en Madrid (España) y de *Monascus ruber* (llamada monacolin K) por ENDO (1979). Pocos años después la lovastatina también fue obtenida en 17 cepas de diferentes especies, en particular: *M. ruber*, *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus*, *Monascus vitreus* y *Monascus pubigerus* (Hajjaj *et al.*, 2001; Manzoni & Rollini, 2002).

La producción convencional de lovastatina se ha llevado a cabo mediante cultivo en medio líquido. Recientemente la productividad de la cepa *A. terreus* ATCC 20542, el productor original de lovastatina, fue incrementada por el grupo Metkinen, utilizando procedimientos de mutagénesis y la experiencia adquirida en el desarrollo de programas de mejoramiento en procesos (Manzoni & Rollini, 2002). Posteriormente, se encontró que del aislamiento y purificación de 68 cepas de tipo silvestre de *Aspergillus terreus*, la mejor cepa silvestre para la producción de lovastatina fue *Aspergillus terreus* TUB-514 proveniente de la Technical University of Budapest, Hungría, más que la actualmente utilizada *Aspergillus terreus* ATCC 20542, obteniéndose en cultivo líquido 0.147 mg/mL y 0.09 mg/mL respectivamente. Posteriormente se optimizó el medio de cultivo líquido y se obtuvo una producción de 0.4 mg lovastatina /mL y en medio sólido de 1.54 mg lovastatina/g de medio seco (gms), utilizando la cepa silvestre TUB-514, estos datos son la primera indicación que la fermentación en cultivo sólido puede ser considerada como una opción viable para la producción de lovastatina (Szakács *et al*, 1998). La fermentación sólida es un método de cultivo antiguo que se ha modernizado en los últimos 20 años, de manera que se considera una tecnología emergente con gran potencial para la producción de enzimas y metabolitos microbianos. Los investigadores han mostrado un gran interés en este tipo de fermentación, como una alternativa potencial a la fermentación en cultivo líquido, debido a la utilización de sustratos económicos, poco procesamiento, requerimientos de energía bajos, fácil monitoreo y control de parámetros, no hay limitaciones de transferencia de oxígeno, altos rendimientos en tiempos

cortos, generación de pocos efluentes y no se requieren condiciones estériles estrictas. En la actualidad, esta tecnología es aplicada para la producción de MS (Barrios-González *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2001).

1.2 FERMENTACIÓN EN CULTIVO SÓLIDO

La fermentación sólida (FS) se define como el cultivo de microorganismos sobre la superficie e interior de una matriz sólida, con bajos niveles de actividad de agua. Se distinguen 2 tipos de sistemas de FS dependiendo de la naturaleza de la fase sólida utilizada; cultivo sólido sobre soportes naturales y cultivo sobre soportes inertes impregnados con medio líquido (Barrios-González & Mejía, 1996). La FS sobre sustratos naturales tales como almidón, lignocelulosa, papa, frijol, arroz, salvado de trigo, etc., es el sistema más comúnmente usado ya que sirve tanto como soporte como de fuente de nutrientes. Este sistema de cultivo tiene la ventaja de utilizar materiales crudos baratos y moderadamente procesados. Sin embargo, su desventaja es que al constituir su estructura física fuente de carbono, parte de ésta es parcialmente degradada durante el crecimiento de microorganismos, resultando en cambios en sus características físicas, por lo que la transferencia de masa y calor son reducidos. Por otra parte, la FS sobre soportes inertes puede superar las desventajas descritas de los soportes naturales, mejorando el control de transferencia de calor y masa. El soporte sirve de reservorio de nutrientes y como anclaje para los microorganismos. Otras ventajas, es que la recuperación de productos es menos complicada y son obtenidos con menos impurezas, la composición del medio puede ser diseñado con precisión y puede extraerse el medio líquido del soporte inerte en cualquier tiempo del cultivo y analizar sus componentes (Ooijkaas *et al.*, 2000; Barrios-González & Mejía, 1996).

Respecto a la FS con soportes inertes impregnados con medio líquido, se han empleado dos variantes: soportes inertes naturales, como bagazo de caña de azúcar, y soportes inertes artificiales, tales como espuma de poliuretano, poliestireno, amberlita, vermiculita, perlita, partículas de pozolano y gránulos de arcilla (Ooijkaas *et al.*, 2000; Baños *et al.*, 2005). Una fermentación con uso de un soporte polimérico absorbente inerte capaz de absorber abundante

medio líquido, conduce al incremento en el área de superficie disponible para el crecimiento fúngico sobre el soporte y la tendencia del microorganismo a adherirse a la superficie del soporte, resultando en un incremento de la producción de metabolitos secundarios, debido posiblemente a que los microorganismos imitan su hábitat de crecimiento natural. Algunas características del soporte pueden cambiar significativamente durante las etapas de crecimiento del hongo y pueden generar gradientes de condiciones ambientales que producen limitaciones nutrimentales simulando la variabilidad encontrada en la naturaleza (Ramunas *et al.*, 2006). Además, las características fisicoquímicas del soporte y su interacción con la disponibilidad de agua, oxígeno y los componentes del medio son variables principales que pueden influenciar en el crecimiento y metabolismo, mientras que otros factores pueden jugar un papel sobre la colonización de microorganismos en el soporte (Gervais *et al.*, 1988; Verstrepen *et al.*, 2004).

A través del tiempo se observó que la biosíntesis de MS por lo general está asociada con la diferenciación morfológica, tal como la esporulación, y en efecto dicha relación sugiere procesos independientes regulados por un mecanismo común (Betina, 1995). La esporulación exhibida por diversos hongos filamentosos, especialmente especies de *Aspergillus*, es estimulada principalmente por la exposición de hifas al aire (Ramunas *et al.*, 2006; Morton, 1961). Así la fermentación sólida que involucra un soporte polimérico es conveniente para la inducción de patrones de diferenciación celular en hongos, y la asociación de estímulos adicionales como los efectos de superficie, desecación, estrés osmótico y limitación de nutrientes, también influye en los procesos de desarrollo capaz de alterar el crecimiento y fisiología, así como también la producción de metabolitos secundarios (Barrios-González & Mejía, 1996; Larroche, 1996; Morton, 1961).

Baños *et al.* (2005), diseñaron un proceso de producción de lovastatina por FS sobre un soporte inerte artificial (poliuretano) con *A. terreus* TUB-514, donde se obtuvieron 19.95 mg/gms en 7 días. La producción de esta cepa en FL con exactamente el mismo medio de cultivo, fue de solamente 0.62 mg/mL. La cepa fue también probada en FS sobre bagazo de caña impregnado con el mismo medio líquido, y la producción final fue de 8.615 mg/gms. Por

lo tanto, hubo una producción 30 veces mayor en FS respecto a FL. Al emplear el poliuretano como soporte inerte permitió obtener un parámetro comparable con respecto a la FL, la producción específica, encontrándose que era 13 veces mayor en FS respecto a la FL, donde se manifiesta con claridad la fisiología especial del hongo al medio sólido (Baños *et al.*, 2005).

En una segunda etapa del trabajo de Baños *et al.* (2007), *A. terreus* TUB F-514 fue mutada y una cepa resistente a estrés oxidativo (EOX), fue elegida por métodos de selección racional. La nueva mutante, fue cultivada en el sistema con el soporte artificial, produciendo 27.89 mg/gms. Estos resultados sugieren que la alta producción de lovastatina de *A. terreus* puede estar 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 sobreproductoras de lovastatina en FS, más no en FL.

Existen reportes donde se manifiesta esta fisiología especial del medio sólido, ya que se encontró que enzimas que se producen en forma intracelular en FL, son extracelulares en FS, y que ambas muestran diferente peso molecular y características cinéticas (Smiley *et al.*, 1976; Lehnka PK & Lonsane, 1994). Por otra parte, los hongos contienen distintos genes que codifican para una misma clase de enzima y estos genes equivalentes son regulados diferencialmente dependiendo del medio donde se encuentren. Estos hechos sugieren que, el hongo recibe señales que indican que está en uno u otro sistema de cultivo y que esto hace generar una expresión diferencial de genes que dan como resultado una fisiología diferencial (Hisada *et al.*, 2005).

Pocos trabajos han estudiado las diferencias fisiológicas que se presentan durante el crecimiento de células microbianas en los 2 tipos de sistema de cultivo. Diferencias generales en la expresión génica dependiendo de la técnica de fermentación han sido exploradas. Estudios moleculares han conducido a comparaciones de la producción de lovastatina por *A. terreus* en FS y FL, mediante un análisis de expresión de 2 genes, *lovE* y *lovF*, involucrados en la biosíntesis de lovastatina. El gen *lovE* que codifica un factor transcripcional que regula la expresión de todos los genes que participan en esta vía, mientras que el gen *lovF* codifica una

policétido sintasa involucrada en la biosíntesis de lovastatina. Resultados muestran que las diferencias en producción de lovastatina entre ambos sistemas de cultivo están relacionadas con la expresión diferencial de los genes involucrados en la producción de lovastatina. La producción de lovastatina más alta está relacionada con los niveles más altos de acumulación del transcrito de ambos genes y por un periodo más largo, comparados éstos en FL. Cuando *A. terreus* creció en FS, el transcrito *lovE* muestra niveles de acumulación 4.6 más alto que en FL. En forma similar, el transcrito *lovF* muestra una acumulación 2 veces más alta en FS que el nivel más alto detectado para el micelio crecido en FL. Estos resultados muestran, por primera vez, que la producción de lovastatina más alta en FS, fue al menos parcialmente, debido a la alta transcripción de estos genes biosintéticos, y más importante, que estos altos niveles de transcripción fue el resultado de altos niveles del factor de transcripción *lovE*. Esta es probablemente una razón de la alta producción reportada de otros metabolitos secundarios en FS (Barrios-González & Mejía, 2007; Barrios-González *et. al.*, 2008).

1.3 REGULACIÓN GENÉTICA

Recientes evidencias, apuntan a los mecanismos regulatorios como una acción eficaz evolutiva, al igual que el agrupamiento de los genes de MS, incrementan la probabilidad de co-movilización y puede conferir ventajas selectivas al mismo *cluster* de genes, el cual abarca genes biosintéticos y los genes para autoresistencia, regulación y transporte (Misiek *et al.*, 2007).

La regulación del *cluster* de genes que codifican para la síntesis de MS es explicada, en parte, por el control transcripcional coordinado de los genes biosintéticos por factores de transcripción de dominio “estrecho” ó “amplio” en hongos. Los genes de los reguladores específicos de ruta estrechos se encuentran localizados normalmente en el *cluster* y regulan positivamente la expresión de genes. Estos son frecuentemente proteínas binucleares con dedos de zinc $Zn(II)_2Cys_6$, que se han identificado únicamente en hongos. Una proteína de este grupo es AflR (regulador aflatoxina), la proteína $Zn(II)_2Cys_6$ es requerida para activar los genes biosintéticos de AF y ST. Los factores transcripcionales de dominio amplio, son

importantes en la respuesta celular integrada a parámetros ambientales, como fuentes de C y N, temperatura, luz y pH. Las respuestas a las señales ambientales son transmitidas a través de factores de transcripción globales (frecuentemente del tipo dedo de zinc Cys₂His₂) que median la señalización de carbono (CreA), nitrógeno y pH (PacC). Los factores de transcripción de dominio amplio pueden regular positiva o negativamente y están conservados en todos los hongos y otros eucariontes. La regulación de factores de transcripción de dominio estrecho o amplio asegura que las rutas de los metabolitos secundarios pueden responder a la demanda de un metabolismo celular general y la presencia de inductores específicos de ruta (Keller *et al.*, 2005).

Por otra parte, se demostró que los procesos de esporulación y producción de metabolitos secundarios parten de elementos regulatorios comunes. Las rutas de transducción de señales de las proteínas G heterotriméricas, comúnmente regulan el desarrollo fúngico, la respuesta al estrés y la expresión de características de virulencia. En *Aspergillus sp.*, se ha demostrado que la esporulación y la producción de micotoxinas, son regulados conjuntamente por miembros de la ruta de señalización de las proteínas G (Hicks *et al.*, 1997). La unión de un ligando a un receptor de la proteína G (GPCR: G Protein-Coupled Receptor) es el evento que activa la señalización de la proteína G. Los receptores GPCR residen en la membrana celular, donde percibe señales extracelulares tales como luz, iones, aminoácidos, azúcares, ácidos nucleicos, esteroides, polipéptidos y ácidos grasos, y transmiten esta señal al interior de la célula, activando a las proteínas G heterométricas. La cascada de señalización de la proteína G, conectando la esporulación y el metabolismo secundario en *Aspergillus sp.*, sigue la ruta de transducción de señal G/AMPc/PKA (proteína G/ AMP cíclico/ proteína quinasa A) (Shimizu & Keller, 2001). La proteína G estimula la síntesis de AMP cíclico mediante la activación de la adenilato ciclasa. El AMPc activa la proteína quinasa A (PKA) y la fosforilación resultante de los reguladores del crecimiento da lugar a la respuesta celular y al bloqueo simultáneo de la conidiación y la producción de la micotoxina esterigmatocistina (Keller *et al.*, 2005). En la Fig. 1-4, se muestra el modelo propuesto para la regulación del metabolismo secundario, las flechas indican efectos positivos y las barras efectos negativos.

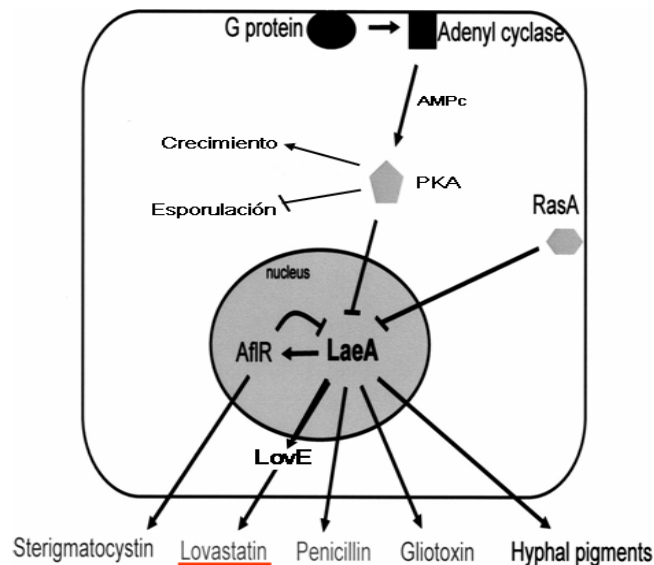


Fig. 1-4. Modelo propuesto de regulación de metabolitos secundarios: reproducido de Woo & Keller (2004).

Se demostró con cepas mutadas que sobreexpresan *pkaA* y el alelo *ras*^{G17V} (SE::*pkaA* y SE::*ras*^{G17V}), que PkaA y RasA regulan negativamente la expresión del gen *laeA*, y como consecuencia la producción de metabolitos secundarios como ST, LOV, PN, gliotoxinas y pigmentos. También demostraron que hay efectos regulatorios del factor transcripcional específico AflR sobre la transcripción de genes para la producción de aflatoxinas, de manera negativa sobre el gen *laeA* y de manera positiva sobre genes *stc*, donde la sobreexpresión de *aflR* (SE::*aflR*) reprime la expresión de *laeA*, mientras que la eliminación de *aflR* (Δ *aflR*) no afecta el nivel de transcripción de *laeA* (Woo & Keller, 2004).

El interés de este proyecto se centra en el gen regulador global para la síntesis de metabolitos secundarios en *Aspergillus* sp., llamado *laeA*. Este gen se identificó a través de la complementación de una mutante de *Aspergillus nidulans* con esporulación normal pero con incapacidad para expresar el gen *aflR* que codifica el factor específico AflR que regula la expresión de genes biosintéticos de ST. LaeA influye en la expresión de al menos un 9.5% del genoma de *A. fumigatus* y controla positivamente la expresión de 20-40% de la mayoría de las vías de metabolitos secundarios, incluyendo Péptido Sintetasas no ribosomales (NRPSs), Policétido Sintetasas (PKS) y monooxigenasas P450 (Perrin *et al.*, 2007). LaeA posee una gran especificidad para familias enteras de *clusters* de genes de metabolitos secundarios, ya que se

demonstró que es requerida para la biosíntesis de ST, PN y pigmentos miceliales en *A. nidulans*, gliotoxinas y pigmentos miceliales en *A. fumigatus*, como para la expresión de *clusters* de genes para la biosíntesis de heterólogos de lovastatina en *A. nidulans*, y lovastatina nativa en *A. terreus*. De manera interesante, LaeA parece estar conservada en hongos filamentosos, pero no está presente en *Saccharomyces cerevisiae*, un hongo carente de metabolitos secundarios (Perrin *et al.*, 2007; Woo & Keller, 2004).

El análisis de secuencia del gen *laeA* y de la proteína codificada indica que es una proteína metiltransferasa, de localización nuclear y con un dominio de unión de S-adenosil-L-metionina (SAM). La más alta similitud de secuencia es con metiltransferasas histona y arginina, las cuales tienen funciones importantes en la regulación de la expresión de genes, al modificar dominios cromosomales eucromático y heterocromático de levaduras y β -globina en ratones. Aunque las funciones de LaeA aún no han sido caracterizadas totalmente, se especula que esta proteína está involucrada en la modificación de cromatina. La metilación de histonas está involucrada en la represión y activación de genes mediante la definición de regiones heterocromáticas y eucromáticas en cromosomas eucarióticos. De esta manera, un modelo de la regulación de *clusters* mediada por LaeA propone un papel en la represión heterocromática. Los *clusters* de genes de metabolitos secundarios son mantenidos en heterocromatina, represora de la transcripción, pero son rodeados por eucromatina, que favorece la expresión de genes. Las funciones de LaeA inician un proceso que convierte heterocromatina a eucromatina, quizás por interacción con metilasas o desacetilasas (HDAC) que están asociadas con la heterocromatina (Fig. 1-5) (Keller *et al.*, 2005).

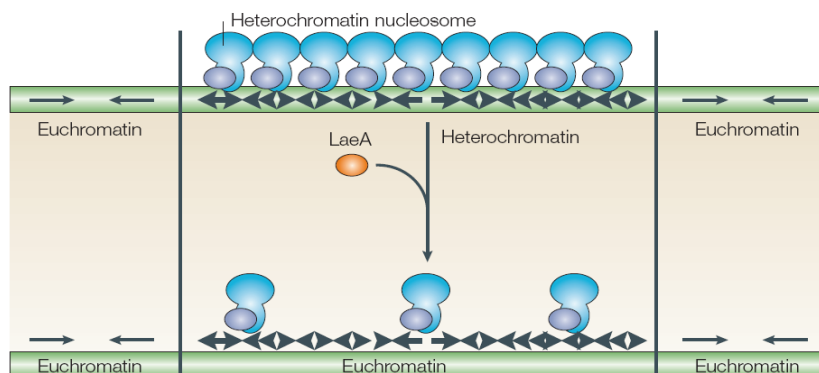


Fig. 1-5. Modelo de la función de LaeA: reproducido de Keller *et al.* (2005).

1.4 MEJORAMIENTO GENÉTICO

La ciencia y tecnología de manipulación y mejoramiento tiene como objeto la obtención de cepas mejoradas mediante el aumento de sus capacidades metabólicas para aplicaciones biotecnológicas. El éxito en el desarrollo de la industria de la fermentación competitiva depende del mejoramiento continuo de la cepa productora, que es considerada el corazón de una fermentación industrial, que usualmente se traduce en el aumento de producción del metabolito de interés, posibilitando la reducción de costos del proceso. No obstante, otras características también pueden ser mejoradas, como la eliminación de otros metabolitos no deseados, mejorar la utilización de fuentes de C y N baratos, alteración de la morfología celular para separar el micelio del producto y/o mejorar la transferencia de oxígeno en el fermentador. Hoy en día, las cepas mejoradas pueden obtenerse por dos estrategias alternativas: métodos genéticos clásicos (incluyendo recombinación genética) y métodos de mejoramiento genético molecular (Barrios-González *et al.*, 2003).

El mejoramiento de la cepa por métodos clásicos se basa en mutación, seguida de selección al azar. La mutación puede ser realizada por mutágenos físicos como luz UV ó mutágenos químicos como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina o etil-metanosulfonato (Baltz, 1999). La ventaja de esta estrategia es que es simple, se requieren pocos conocimientos de genética, fisiología bioquímica de la ruta biosintética del metabolito. Su desventaja es que es muy laboriosa y puede provocar cambios fisiológicos y metabólicos indeseados en la cepa. Otro método clásico es la selección racional, este proceso se realiza para características particulares del genotipo deseado fácil de detectar, para ello se requieren algunos conocimientos básicos del metabolismo y vías de regulación del producto, todo ello para proponer condiciones ambientales ó la adición de un químico que podría ser un cromogénico o reactivo selectivo, un tinte o un organismo indicador. Los métodos de recombinación genética se realizan por cruza sexuales y parasexuales en hongos y conjugación en actinomicetos, y la fusión de protoplastos en ambos microorganismos (Barrios-González *et al.*, 2003).

Los métodos de mejoramiento genético molecular incluyen la identificación de vías biosintéticas, vectores adecuados y protocolos de transformación efectivos para especies en particular. Además, estos métodos han brindado herramientas para conocer en detalle la naturaleza de las modificaciones que han ocurrido en cepas industriales mejoradas por métodos clásicos. Los métodos de mejoramiento genético molecular son aplicados para la caracterización de cepas sobreproductoras, duplicación efectiva ó amplificación de genes biosintéticos de metabolitos secundarios (amplificación de un gen objetivo o toda la vía biosintética), inactivación de vías competitivas, interrupción y amplificación de genes regulatorios, incremento de genes específicos de vías de secreción, incorporación de una nueva actividad enzimática y biosíntesis combinada (Barrios-González *et al.*, 2003).

El proyecto del genoma humano ha liberado un gran potencial técnico para la secuenciación del ADN de genomas microbianos. En adelante, el reto es aplicar esta enorme cantidad de información a métodos y estrategias de mejoramiento genético. La disponibilidad de la secuencia nucleotídica completa y anotaciones funcionales de algunas especies, en especial de *Aspergillus nidulans*, nos permitirá identificar todos los genes presentes en microorganismos productores de MS's incluyendo sus genes regulatorios, por ejemplo, *Aspergillus terreus* para producir LOV (Barrios-González *et al.*, 2003). La amplificación del gen regulatorio global *laeA* identificado recientemente en hongos filamentosos puede permitir el incremento en la producción de metabolitos secundarios, como lovastatina en *A. terreus*, y ser una herramienta para el mejoramiento de cepas mediante ingeniería genética, y contribuir al conocimiento de mecanismos moleculares por el cual los metabolitos secundarios son producidos (Woo & Keller, 2004).

2. ANTECEDENTES

Frente a la creciente demanda de lovastatina y las necesidades de producirla a grandes escalas y a menor costo, nuestro grupo de investigación de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAM-I), encabezado por el Dr. Javier Barrios González, desarrolló un sistema de producción eficiente que permite obtener 30 veces más lovastatina que por el método convencional (de 0.62 mg/mL a 19.95 mg/gms), con una producción específica de 59 µg/mg micelio en fermentación líquida (FL) frente a 816 µg/mg micelio en fermentación sólida (FS), indicando que el micelio muestra una fisiología distinta en FS que en FL.

Para hacer todavía más competitivo el sistema es conveniente realizar mejoramiento genético de la cepa. Actualmente se comienza a aplicar técnicas de ingeniería genética, el mejoramiento genético molecular de la cepa puede hacerse amplificando los genes de la ruta biosintética del metabolito secundario o, en una forma más sofisticada, pueden amplificarse los genes reguladores positivos o interrumpirse genes reguladores negativos.

Como se mencionó antes, en *A. nidulans* se descubrió el gen *laeA* que es un regulador global de metabolitos secundarios. La amplificación de este gen regulador global positivo en *Aspergillus terreus* se esperaba que conduzca a una producción elevada de lovastatina.

Woo & Keller (2004), probaron que el gen *laeA* regula a nivel transcripcional el factor específico AflR para la producción de aflatoxinas, también regula la producción de PN, gliotoxina y lovastatina. Además demostraron los efectos de la sobreexpresión del gen *laeA* (SE::*laeA*) en *A. nidulans* y *A. terreus*. Con respecto a la SE::*laeA* en *A. terreus*, se amplificó el gen *laeA* de *A. nidulans* con primers OEF y OER y se ligó en el sitio HindIII de pCN2 formando el plásmido pJW47.4 con un promotor del gen *alcA* y el terminador del gen *trpC*. El plásmido pJW47.4 y un gen de resistencia a higromicina B (*hygB*) en el plásmido pUCH2-8 fueron usados para la cotransformación para introducir la sobreexpresión de *laeA* en *A. terreus* ATCC 20542.

La SE::*laeA* de *A. nidulans* en *A. terreus* incrementa la transcripción y producción de LOV y en *A. nidulans* incrementa la transcripción y producción de PN, pero no de ST, debido a la existencia de 3 sitios potenciales de unión de AflR en *laeA*, mostrando que la SE::*aflR* disminuye los transcritos de *laeA*, se pensó que AflR regula negativamente la expresión de *laeA* (Woo & Keller, 2004).

También demostraron los efectos de mutantes nulas del gen *laeA* ($\Delta laeA$) en *A. nidulans* y *A. fumigatus*, detectando en forma visual la pérdida de pigmento micelial en la superficie de las colonias, al igual que la reducción de ST y PN en *A. nidulans* y de gliotoxinas en *A. fumigatus*.

Además, se examinó la expresión de *clusters* de genes para la biosíntesis de genes heterólogos de LOV en *A. nidulans* con fondo $\Delta laeA$. El *cluster* de LOV parcial derivado de *A. terreus* fue transformado en *A. nidulans* con fondo $\Delta laeA$ para estudiar los aspectos de biosíntesis de LOV, esta cepa fue usada después para cruzar el *cluster* de LOV (LOV⁺) en una mutante apropiada con fondo *laeA*. Se observa que la cepa $\Delta laeA/LOV^+$ mostró muy disminuidos niveles de los transcritos *lovE* (factor de transcripción específico para codificar LOV) y *lovC* (gen biosintético de LOV), los extractos de cloroformo de esta cepa también mostraron producción baja de MONJ (intermediario de LOV). Mientras que en la cepa WT:LOV⁺ se observaron niveles altos de los transcritos y de MONJ (Woo & Keller, 2004).

En el proyecto actual se propone introducir el gen *laeA* de *A. terreus* TUB-514 en el mismo mediante mejoramiento genético molecular, para obtener un mayor incremento de lovastatina en fermentación sólida, utilizando un soporte polimérico inerte, y en fermentación líquida.

3. HIPÓTESIS

La sobreexpresión del gen *laeA* en *Aspergillus terreus* TUB-514 incrementará la producción de lovastatina, tanto en fermentación sólida como en fermentación líquida.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Clonación y evaluación de la sobreexpresión del gen regulador *laeA* en *Aspergillus terreus* TUB-514 sobre la producción de lovastatina en FS y FL.

4.2 Objetivos Específicos

- 4.2.1 Determinar la sensibilidad a fleomicina de *Aspergillus terreus* TUB-514
- 4.2.2 Amplificación del gen *laeA* de *A. terreus* TUB-514 por PCR
- 4.2.3 Amplificación de vectores plasmídicos: pULC43 y pAN52.1
- 4.2.4 Clonación del gen *laeA* en vectores plasmídicos
- 4.2.5 Transformación de *A. terreus* TUB-514 por la técnica de protoplastos
- 4.2.6 Selección de transformantes con base en la resistencia a fleomicina y a la producción de lovastatina en fermentación en cilindro de agar (FCA)
- 4.2.7 Evaluar la producción de lovastatina de las transformantes en fermentación sólida y líquida
- 4.2.8 Confirmar la presencia de las construcciones en transformantes por PCR

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MICROORGANISMOS UTILIZADOS

5.1.1 Cepa fúngica: *Aspergillus terreus* TUB-514.

La cepa fue proporcionada por la Technical University of Budapest (TUB), Hungría (Szakács *et al.*, 1998). Es un hongo filamentoso que produce relevantes metabolitos secundarios, principalmente estatinas, el genoma haploide es de aproximadamente 35 Mb, organizado en 8 cromosomas. Linaje: *Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Trichocomaceae; mitosporic Trichocomaceae; Aspergillus; Aspergillus terreus* (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov, 2007).

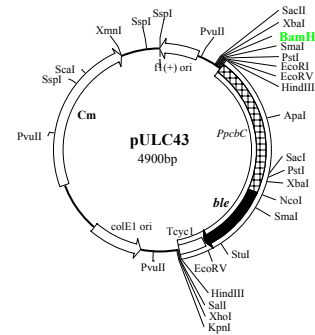
5.1.2 Cepa bacteriana: *Escherichia coli* DH5 α .

Cepa utilizada normalmente en experimentos de transformación debido a su alta eficiencia (hasta 5×10^8 transformantes por microgramo de ADN) (Hanahan, 1983).

5.2 VECTORES PLASMÍDICOS

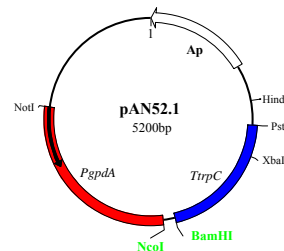
5.2.1 pULC43 (S. Gutiérrez, no publicado):

Plásmido de 4.9 kb. Contiene el gen de resistencia a fleomicina *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (0.4 kb) expresado bajo el control de las regiones promotoras del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum* (0.8 kb). Contiene, asimismo la región de terminación de la transcripción del gen *cyc1* de *Saccharomyces cerevisiae* (0.3 kb).



5.2.2 pAN52.1 (Punt *et al.*, 1990):

Plásmido derivado del pUC19, con el promotor del gen *gpd* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) de *Aspergillus nidulans* como inserto. Este promotor ha sido usado por su alto nivel de expresión en hongos.



5.3 REACTIVOS

5.3.1 Ácidos nucleicos

El GeneRuler 1kb ADN Ladder fue utilizado como marcador de tamaños en los geles de electroforesis, adquirido a Fermentas.

Los oligonucleótidos empleados como cebadores (“primers”) en los experimentos de amplificación de ácidos nucleicos utilizados como fragmentos para la clonación en vectores plasmídicos se describen a continuación:

Primers	Secuencia (5' → 3')
laeF	CTC CAG GAT CCG AGT TCA CGG TGC
laeR	AGG CGG ATC CGT CTC AAC TAC AGC
laeconsF	ACC TAT CAC CAT GGC CCC TCC G
laeconsR	GGA CTC CAG GAT CCA CTC TTG G

5.3.2 Antibióticos

La ampicilina se adquirió en forma de producto farmacéutico a Sigma - Aldrich Co., el cloranfenicol fue adquirido a la compañía Sigma Chemical Co. y la fleomicina a InvivoGen USA.

5.3.3 Enzimas

Las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nco*I fueron suministrados por Fermentas.

La enzima ARNasa A de páncreas bovino y ADN ligasa del fago T4 fueron adquiridos a Invitrogen Inc.

La enzima *Vent* ADN polimerasa de *Thermococcus litoralis* con una fidelidad de 5 – 15 veces mayor que la *Taq* ADN polimerasa, utilizada en la amplificación de fragmentos fue suministrada por BioLabs Inc.

La enzima lítica Driselase usada en la obtención de protoplastos se adquirió a la compañía Sigma - Aldrich Co.

5.3.4 EQUIPO

El equipo utilizado durante el presente trabajo fue: autoclave, balanza analítica, baños con temperatura controlada (Stuart Scientific), cámara de electroforesis, campana de flujo laminar (Veco), centrífuga refrigerada (Eppendorf 5417R), congeladores de -20 y -80°C, cromatografo de líquidos de alta resolución (HPLC) (WatersTM), equipo de filtración al vacío (Waters, Millipore), espectrofotómetro, incubadoras (Lab-Line), microcentrífugas (Eppendorf 5415C), microondas (Sanyo), micropipetas, microscopio óptico (Olympus), parrillas con agitación magnética,

potenciómetro, sistema de fotodocumentación GelDoc 2000 (Bio-Rad), sistema de purificación de H₂O MiliQ (Millipore), sonicador (Branson 1210), termociclador (Eppendorf), termomezclador, transiluminador, vortex y columnas Qiagen (Midi Kit).

5.4 MEDIOS DE CULTIVO

5.4.1 Medios de cultivo para *Aspergillus terreus*

Medio Czapeck: De esporulación y mantenimiento.

	g/L
Sacarosa	30.0
NaNO ₃	2.0
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01

Cuando se usó este medio para la regeneración de protoplastos de *A. terreus* se añadió sorbitol en una concentración de 1 M como estabilizador osmótico y agar al 2% (p/v). Se esterilizó a 15 lb/in² durante 20 min. El medio con sorbitol fue usado en transformaciones en las que se integro el gen de resistencia a fleomicina, debido a la interferencia de las altas concentraciones de sales con el patrón de sensibilidad del hongo receptor a la fleomicina.

Medio PMI: De esporulación y mantenimiento.

	g/L
Bacto-peptona	5.0
Lactosa	5.0
NaCl	4.0
Sólidos de maceración	1.0
KH ₂ PO ₄	0.06
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.003
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.001

Medio Power: De esporulación y mantenimiento.

Medio Czapeck	500 mL
Medio PMI	500 mL
Agar	2 %

Por cada matraz Erlenmeyer de 125 mL se colocaron 25 mL de este medio y se esterilizó a 15

lb/in² durante 20 min. Se inoculó 100 µL de esporas conservadas en glicerol de *A. terreus* y se incubó a 30°C durante 4 días.

Medio Agar de papa y dextrosa (PDA): De esporulación y mantenimiento.

Es comercial y la preparación se realizó de acuerdo a lo especificado por el proveedor (Bioxon). Se dejó hervir por 1 minuto y se esterilizo a 15 lb/in² durante 20 min.

Solución de Sales 20X:

	g/L
NaNO ₃	120.0
KCl	10.4
MgSO ₄ .7H ₂ O	10.4
KH ₂ PO ₄	30.4

Guardar a temperatura ambiente (Ta).

Solución de elementos traza:

	g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.20
H ₂ BO ₃	1.10
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.50
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.50
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	5.00

Se adicionaron los sólidos en orden en 80 mL de H₂O dd, disolviendo cada uno completamente del siguiente. Se calentó a ebullición, dejándose enfriar y ajustando el volumen a 100 mL.

Medio Completo: Obtención de micelio.

Sol'n de sales 20X	5 mL
Sol'n de Elementos Traza	100 µL
Glucosa	1 g
Peptona	1 g
Extracto de Levadura	0.05 g

Se llevó a un volumen de 100 mL y se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 2 M. Por cada matraz Erlenmeyer

de 125mL se colocaron 35 mL de este medio y se esterilizó a 15 lb/in² durante 20 min. Se inoculó 1 x 10⁸ esporas/mL y se incubó a 30°C durante 20 h.

Medio de Producción: Obtención de lovastatina en cilindros de agar (2.5X), fermentación sólida (2.5X) y fermentación líquida (1X). Para una concentración 2.5X:

	g/L
Glucosa	15.0
Lactosa	85.0
Harina de soya	7.5
KNO ₃	5.0
KH ₂ PO ₄	7.5
NaCl	1.25
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.25

Se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 2 M y se llevó al volumen deseado. Se esterilizó a 15 lb/in² durante 20min. Para cilindros de agar se añadió 20g de agar.

5.4.2 Medio de cultivo para *Escherichia coli* DH5α

Medio Luria-Bertani (LB):

	g/L
Bacto-triptona	10.0
NaCl	10.0
Extracto de Levadura	5.0
Agar	20.0

Se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 2 M y se llevó al volumen deseado. Se esterilizó a 15 lb/in² durante 20 min.

5.4.3 Antibióticos suplementados

Se empleó ampicilina (Amp) y cloranfenicol (Cm) para selección de transformantes y mantenimiento del plásmido con resistencia a estos en *E. coli*. El stock para Amp se preparó en una concentración de 50 mg/mL y para Cm a 30 mg/mL. Se esterilizaron por filtración empleando membranas de 0.20 µm de poro marca Millipore. Se guardaron ambas en alícuotas de 500 µL a -20°C. Cuando se requirió, fue suplementado el medio LB con Amp ó Cm en una concentración de 100 µg/mL ó 30 µg/mL respectivamente.

Se empleó fleomicina (ble) para selección de transformantes en *A. terreus*. El stock para ble se preparó en una concentración de 20 mg/mL. Se esterilizó por filtración empleando membranas de 0.20 µm de poro marca Millipore. Se realizaron alícuotas de 500 µL a -20°C. Cuando se requirió, fue suplementado el medio Czapeck con Sorbitol y fleomicina en una concentración de 160 µg/mL.

5.5 CONDICIONES DE CULTIVO

5.5.1 Crecimiento de *Escherichia coli* DH5α

Para el crecimiento de la bacteria *E. coli* se utilizó el medio LB con la adición de los antibióticos ampicilina o cloranfenicol (según el plásmido que confiriera dicha resistencia).

5.5.2 Crecimiento de *Aspergillus terreus*

La cepa *Aspergillus terreus* TUB-514, de la colección de cepas de Technical University of Budapest, fue crecida en medio Power ó PDA durante 4 días a 30°C para su esporulación. Las esporas fueron recolectadas con perlas de vidrio estériles y una solución de Tween 80 al 0.05%, posteriormente la solución de esporas fue inoculada en medio completo (1×10^8 esporas/mL) para su germinación y obtención de ADN genómico, así como para la producción de protoplastos y las fermentaciones para la producción de lovastatina.

5.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS

5.6.1 ADN

5.6.1.1 Extracción de ADN genómico de *Aspergillus terreus*

El método usado para obtener ADN total de hongos a gran escala fue esencialmente descrito por Specht *et al.*, (1982), posteriormente se fue modificando. Se germinaron esporas frescas de *Aspergillus terreus* sobre medio completo y se incubaron a 30°C durante 20 h. El micelio producido se recogió con palillo estéril, se secó con sanitas y se colocó en un mortero frío, se añadió N₂ líquido y se molió. En tubos eppendorf (epp) fríos se colocaron 0.5 mL de micelio y se le adicionó a cada uno 800 µL de buffer de extracción¹ y se incubó a 68°C por 30 min. Inmediatamente se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Al sobrenadante se le agregó 50 µL de Acetato de potasio (KAc) 5M pH 4.2, se mezcló suavemente por inversión y se colocó en hielo durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Se transfirieron 700 µL del sobrenadante a otro tubo epp y se adicionaron 700 µL de isopropanol, se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Se resuspendió el pellet con 400 µL de TE² y se agregó 40 µL de Acetato de sodio (NaAc) 3M pH 7.0. La mezcla se calentó a 68°C por 1 h. Para solubilizar basuritas se dio un breve vortex y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta, después se transfirió el sobrenadante a otro tubo epp para proseguir con la extracción. Se agregó 1 mL de Etanol (EtOH) 95%, se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Se lavó 2 veces el pellet con 800 µL de EtOH 70%, desprendiendo el pellet con la punta, mezclando por inversión suavemente y centrifugando a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Se secó el pellet por capilaridad invirtiendo el tubo epp. y se resuspendió el ADN en 100 µL de TE con RNasa³ a una concentración de 100 µg/mL. La mezcla se calentó a 68°C por 5 min para resuspender el ADN y se incubó a 37°C durante 1.5 h. Después se le

¹ Buffer de Extracción: EDTA 50 mM y SDS 0.2%.

² TE: EDTA 1 mM pH 8.0 y Tris-HCl 10 mM pH 8.0.

³ RNasa: Se disolvió la RNasa a una concentración de 10 mg/mL en una solución con NaCl 15 mM y tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5. La mezcla se hirvió durante 15 min y se dejó enfriar lentamente a Ta. Posteriormente se repartió en alícuotas y se conservó a -20°C.

adicionaron 300 μ L de TE. Se extrajo el ADN con 1 volumen de CIA (Cloroformo - Alcohol isoamílico), se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Se recogió la fase acuosa y se añadió 1/10 volumen de NaAc 3 M pH 5.2 (aprox. 40 μ L) y 2.5 volumen de Etanol frío, se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min a 4°C. El ADN se lavó con 800 μ L de EtOH 70%, se secó y resuspendió en 30 μ L de H₂O de alta pureza. Se conservó a -20°C.

5.6.1.2 Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli*

5.6.1.2.1 Boiling (Miniprep)

El método seguido para obtener ADN plasmídico (ADNp) a pequeña escala fue una modificación del descrito por Holmes & Quigley (1981). El ADN plasmídico a pequeña escala se obtuvo de 4 vectores: pULC43 y pAN52.1, pULC43/laeA (pUAMTPlaeA) y pAN52.1/laeA (pUAMTPlaeAcons).

Se picaron con palillos estériles las colonias seleccionadas crecidas por el método de electroporación, éstas se inocularon en otra caja petri con LB/Amp ó Cm y los palillos con las colonias se colocaron cada uno en un tubo epp. con 1 mL de LB suplementado con Amp ó Cm a una concentración de 100 μ g/mL ó 30 μ g/mL respectivamente. Después de un rato se sacó el palillo del tubo epp. y se incubó a 37°C, 200 rpm aproximadamente 16 h. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta. Se resuspendió el pellet en 350 μ L de STET⁴ y se añadió 20 μ L de solución de lisozima⁵ a una concentración de 10 mg/mL en la tapa del tubo epp, se agitó 2 min en el mixer hasta la resuspensión y se dejó hervir 45 segundos en baño maría. Inmediatamente se precipitaron los restos celulares centrifugando a 14,000 rpm por 10 min a Ta y se eliminó el pellet con palillo estéril. Se añadió al sobrenadante 45 μ L de NaAc 3M pH 5.2 y 600 μ L de isopropanol, se mezcló por inversión, dejando reposar 5 min a Ta y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a Ta. Se lavó el pellet con 400 μ L de EtOH 70% y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a Ta.

⁴ STET: EDTA 50 mM pH 8.0, Sacarosa al 8% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y Tritón X-100 al 0.5% (v/v).

⁵ Lisozima: Se pesó 0.01 g de lisozima y se disolvió en 1 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8.0.

Se secó el pellet por capilaridad invirtiendo el tubo epp. y se resuspendió el ADNp en 30 μ L de H₂O de alta pureza. Se conservó a -20°C.

5.6.1.2.2 Midiprep-Kit

El método seguido para obtener ADN plasmídico (ADNp) a gran escala fue mediante columnas de Qiagen-100. El ADN plasmídico a gran escala se obtuvo de 4 vectores: pULC43 y pAN52.1, pULC43/laeA (pUAMTPlaeA) y pAN52.1/laeA (pUAMTPlaeAcons).

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 Amp ó Cm a una concentración de 100 μ g/mL ó 30 μ g/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 pre-enfrió el Buffer P3 a 4°C y soportes para tubos de 50 mL translucidos.

Transcurrido el tiempo, el medio LB con la colonia crecida se pasó a tubos translucidos de 50 mL estériles. Se cosecharon las células bacterianas centrifugando a 4,000 rpm por 20 min en los soportes previamente enfriados y se eliminó sobrenadante. Se resuspendió el pellet bacteriano de cada tubo en 2 mL de Buffer P1, se pipeteó de arriba abajo y se pasaron las bacterias resuspendidas a un tubo translucido de 10 mL estéril. Se añadió 2 mL de Buffer P2, se mezcló por inversión de 4-6 veces y se incubó de 15-25°C por 5 min. Se añadió 2 mL de Buffer P3 enfriado, se mezcló inmediatamente por inversión de 4-6 veces y se incubó en hielo 15 min. Se equilibraron los tubos y después se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min a 4°C en centrifuga Beckman con rotor F-1010. Se transfirió el sobrenadante que contiene ADNp en otro tubo de 10 mL. Nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C y se transfirió sobrenadante en otro tubo falcón de 15 mL estéril. Se equilibró el QIAGEN-100 aplicando 4 mL de Buffer QBT y se permitió a la columna vaciarse por flujo gravitacional en un matraz de 125 mL con su soporte correspondiente. Después se aplicó el sobrenadante de los tubos al QIAGEN-100 y se permitió que entrara a la resina y vaciarse por flujo gravitacional. Se lavó 2 veces el QIAGEN-100 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 µL del eluyente en tubos epp. Se precipitó el ADNp adicionando a c/tubo epp. 560 µL (0.7 volumen total) de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min a 4°C. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante. Se lavó el pellet (ADNp) con 800 µL de EtOH 70% a Ta, se desprendió pellet con punta y se mezcló por inversión, después se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C y se eliminó sobrenadante. Se secó pellet por capilaridad invirtiendo el tubo epp. y se resuspendió el ADNp de cada tubo epp. en 50 µL de H₂O de alta pureza. Finalmente se juntaron los tubos en uno solo y se conservó a -20°C.

5.6.1.3 Diseño de oligos para obtener 2 fragmentos del gen *laeA* de *A. terreus*

Para el diseño de los oligos (“primers”), se tomó como base el gen *laeA* del genoma de *Emericella nidulans* ubicado en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con número de acceso al GenBank: AY394722.1 y mediante Blastn se encontró el gen *laeA* en *Aspergillus terreus* publicado en esta misma base de datos con número de acceso al GenBank: XM_001210764.1, obteniendo un 74% de identidad del gen.

Seleccionado el tamaño de los fragmentos del gen *laeA* en *A. terreus*, se prosiguió al diseño de oligos, incluyendo secuencia de reconocimiento para enzimas de restricción destinadas con un colchón de 3 nucleótidos en el extremo 5’ y pinza ó clamp en el extremo 3’ (3 ó 4 G/C), obteniendo el diseño de oligos con un tamaño entre 18-25 nucleótidos.

5.6.1.3.1 Reacción en cadena de la ADN polimerasa

Esta técnica es, conceptualmente, un método muy simple para la amplificación de ácidos nucleicos (Saiki *et al.*, 1985; Mullis & Faloona, 1987). El método se basa en la repetición de 3 pasos: desnaturalización, hibridación de los cebadores y elongación, efectuados de forma sucesiva en condiciones de temperatura determinada y controlada.

Se preparó en un tubo epp. de 500 µL en orden la siguiente mezcla de reacción sobre hielo:

Componentes (µL)	Inserto <i>laeA</i> completo (2.6 kb)	Inserto <i>laeA</i> cds (1.25 kb)
H ₂ O estéril	72.5	73.5
Buffer ThermoPol 10X ⁶	10	10
Cebador Forward (10 mM)	5	5
Cebador Reverse (10 mM)	5	5
dNTP’s ⁷ (10 mM)	4	4
MgSO ₄ (100 mM)	2	-
ADN molde	1	2
Vent ADN polimerasa (2 U/µL)	0.5	0.5

Se buscó la temperatura de hibridación mínima en los cebadores F y R, a ésta se le restó -10°C y el resultado se consideró como la temperatura máxima para realizar el gradiente, con un rango de 1-2°C, obteniendo al final 5 temperaturas para obtener la temperatura óptima de hibridación de los cebadores mediante la función de gradiente en el Termociclador. Ya obteniendo las 5 temperaturas consideradas, se repartió la mezcla de reacción en 5 tubos de 500 µL y se metieron en el Termociclador Eppendorf. Previamente se programó dicho aparato de la siguiente manera:

- Se encendió regulador y Termociclador
- Se tecleó: Options, Gradient, T = T_m intermedia, G = 2-4°C.
- Se eligió columna dependiendo del tubo con su temperatura asignada
- Se regresó al Menú principal: *Exit* (2 veces)
- Se tecleó: Files, New, Block, Tube.
- Se tecleó: Lid: 105°C, Wait, Fix.
- Se metió programa:

```

1  T = 94°C    ▷ Fix = 3'    ↵ Sel
2  T = 94°C    ▷ Fix = 30"   ↵ Sel
3  T = Tm interm ▷ Fix = 50"  ◁ 3 Opt
3  R = 3°C/s   ▷ G = 2-4°C  ↵ Sel
4  T = 72°C    ▷ Fix = tiempo ↵ (4 veces) Sel
5  Goto = 2    ▷ Rep = 35    ↵ Sel
6  T = 72°C    ▷ Fix = 10'   ↵ (2 veces) Sel
7  Hold = 22°C ↵ Exi

```

⁶ Buffer de Reacción ThermoPol 1X: KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8.8, MgSO₄ 2 mM y Tritón X-100 0.1%.

⁷ dNTP’s (mezcla de nucleótidos): Mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, en una concentración de 10 mM cada uno de ellos.

- h) Se pidió salvar el programa: *Save = Yes*.
- i) Se dio el nombre del programa eligiendo cada palabra con la tecla *Sel* ▷ ↵, *Exit* ↵
- j) Se colocaron los tubos de acuerdo a la columna que le corresponda en base a su temperatura
- k) Se tapó y eligió el tipo de tubo en la parte superior del Termociclador. Tubo PCR = 0.2ml
- l) Se tecléo *Start* ↵ *Elegir programa* ↵ ↵ ↵
- m) Para saber a qué hora se terminan los ciclos de PCR, se tecléo *Opt*.

Ya que se eligió la temperatura óptima de hibridación de los cebadores en PCR mediante electroforesis. Se prosiguió a realizar nuevamente PCR con dicha temperatura y en mayor volumen para posteriormente hacer la purificación de dicha amplificación.

5.6.1.3.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se siguieron los métodos descritos por Maniatis *et al.* (1982) y Sambrook *et al.* (1989). Se utilizó agarosa SeaKem LE (FMC, Ref. 50004) en una concentración de 1% (p/v) para obtener fragmentos de ADN separados de 0.5-10 kb, la agarosa se disolvió por calentamiento con microondas en tampón TAE 1X⁸ durante 1 min y se dejó enfriar, se vació en la base con peine y se dejó solidificar.

Las muestras de ADN se mezclaron con un quinceavo del volumen final de tampón de carga⁹ concentrado y H₂O de alta pureza hasta completar 20 µL. Las muestras se cargaron en el gel ya metido en la cámara de electroforesis bañado en tampón TAE 1X y se dejó correr a 90V durante aproximadamente 2 h. La tinción del ADN se realizó con una solución de bromuro de etidio¹⁰ (BrEt) en una concentración final de 0.5 µg/mL (el BrEt se intercala en la doble cadena del ADN y permite su visualización tras iluminarse el gel con luz ultravioleta (UV)). Los geles se fotografiaron sobre un transiluminador GelDoc 2000 Bio-Rad (emite luz con longitud de onda de 302 nm).

⁸ TAE 1X: 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, 242 g Tris base y H₂O dd hasta completar 1 L. Tomar 100 mL de esta solución y llevar a 5 L con H₂O dd.

⁹ Tampón de carga 6X: Azul de bromofenol al 0.25% (p/v), Sacarosa al 40% (p/v) y Xileno cianol al 0.25% (p/v). Se esterilizó a 15 lb/in² durante 20 min. Se conservó a 4°C.

¹⁰ Bromuro de etidio: Se preparó una solución 10 mg/mL en agua y se conservó a 4°C. Para 1 L de H₂O dd se requirieron 50 µL de esta solución.

El marcador de tamaño usado es el ADN Ladder¹¹ de 1 kb que contiene fragmentos de ADN individuales purificados.

5.6.1.3.3 Purificación de insertos por Freeze & Squeeze

Este método es rápido y sencillo y no requiere del uso de agarosa de bajo punto de fusión, aunque el porcentaje de recuperación no supera el 70% del ADN cargado en el gel (Polman & Larkin, 1989). Hubo pequeñas modificaciones y los pasos esenciales son los siguientes:

Se realizó un gel de agarosa al 1%, juntando los 3 dientes en uno solo para correr muestras de 50 µL en cada pozo, se cargaron las muestras y se corrió el gel a 80V durante aproximadamente 2 h, por otra parte hacer un agujero en la tapa y en el fondo de tubos epp. 0.5 mL con una aguja caliente. Colocar lana de vidrio en el fondo del tubo perforado, empacar y rotular. Colocar este tubito dentro de otro tubo epp de 1.5 mL. Ya teñido el gel con solución de BrEt a una concentración final de 0.5 µg/mL, se colocó en una cámara de UV y se cortó la banda con cutter, tratando de no tomar más agarosa de lo necesario, después se metió dentro de los tubos de 0.5 mL. Se congeló ambos tubos con N₂ líquido y se centrifugó a 8,000 rpm por 5 min a 4°C. Se desechó el tubo epp. 0.5 mL conteniendo la lana de vidrio con agarosa y se siguió trabajando con el tubo epp. 1.5 mL conteniendo el ADN disuelto. Se añadió a cada tubo epp. 2.5 µL de glucógeno a una concentración de 25 mg/mL y 3.5 volumen de Acetato de amonio 7.5 M/Etanol absoluto frío en una proporción 1:6. Se dejó precipitar toda la noche a -20°C. Se prosiguió a centrifugar a 14,000 rpm por 8 min a 4°C. Se lavó el pellet (ADN) con 200 µL de EtOH 70% frío desprendiendo pellet con punta y se mezclando por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 8 min a 4°C. Se secó pellet por capilaridad invirtiendo el tubo epp. y se resuspendió el ADN en 10 µL de H₂O de alta pureza. Se juntaron tubos y se conservó a -20°C.

¹¹ ADN Ladder: Tris-HCl 10 mM pH 7.6 y EDTA 1 mM

5.6.1.4 Clonación de los insertos en los vectores pULC43, pAN52.1 y PCN2

5.6.1.4.1 Digestiones de insertos y vectores

Se realizaron las siguientes digestiones:

Insertos	Vectores	Enzimas de restricción
gen <i>laeA</i> completo	pULC43	<i>Bam</i> HI
gen <i>laeA</i> con promotor y terminador	pAN52.1	<i>Nco</i> I y <i>Bam</i> HI

Cada enzima tiene condiciones óptimas de funcionamiento, en cuanto a temperatura, concentración de sales y condiciones de pH (éstas 2 últimas características las proporciona el tampón de reacción). Como norma general el volumen de la enzima no debe superar 1/10 del volumen total de la mezcla de reacción, debido a la alta concentración de glicerol presente en las soluciones de almacenamiento de las enzimas utilizadas.

En un tubo epp. 1.5 mL se mezcló en orden, los siguientes componentes:

- H₂O dd estéril hasta completar el volumen final de la mezcla de digestión
- Tampón de digestión en la concentración óptima descrita (normalmente se requiere la décima parte del volumen final de la mezcla)
- n µg de ADN disuelto en H₂O de alta pureza
- 5n unidades de enzima

Posteriormente se incubó a la temperatura adecuada durante 2 h. El ADN digerido se purificó añadiendo 1/10 del volumen final de NaAc 3 M pH 5.2 y 2 del volumen de EtOH 100%, se mezcló y se incubó a Ta por 15 min. Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4°C. Al pellet se lavó con EtOH 70% desprendiendo pellet con punta y se mezclando por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4°C. Se secó pellet por capilaridad invirtiendo el tubo epp. y se resuspendió el ADN digerido proveniente del PCR (insertos) en 10 µL de H₂O de alta pureza y el ADNp proveniente de los midiprep en 40 µL de H₂O de alta pureza.

5.6.1.4.2 Ligación

A una cantidad de ADN vector de entre 10 y 40 ng se le añadió ADN inserto en una proporción de 1:8 vector/inserto. Se añadió H₂O de alta pureza para alcanzar un volumen final de reacción de 10 µL y se calentó la mezcla a 65°C durante 15 segundos con el fin de relajar los fragmentos de ADN presentes. Se enfrió en hielo y se agregó 1 µL de tampón de reacción 10X para la ADN ligasa¹² y 1 µL de ADN ligasa del bacteriófago T4. Se incubó la reacción toda la noche a 16°C. Los vectores con inserto generados durante este proceso son posteriormente transformados en la cepa de *E. coli* DH5α.

5.6.1.4.3 Preparación de células electrocompetentes

A la hora de introducir ADN en *E. coli* por medio de procesos de transformación se requiere una disponibilidad de la bacteria, se debe facilitar el paso de las moléculas de ADN a través de las barreras externas de la célula. Este estado es lo que se denomina como “competencia” y las células que lo presentan se denominan “células competentes”. La preparación de células competentes de *E. coli* se realizó por un método básico.

Se bañaron 2 gradillas para tubos epp. de 1.5 mL con H₂O dd, se enfriaron a -70°C y a 4°C glicerol al 10% estéril. En un frasco de 20 mL se sembró una colonia de *E. coli* DH5α con 5 mL de medio LB y se incubó a 37°C, 200 rpm de 16-18 h. En un matraz de 125 mL, se añadió 50 mL de medio LB y una alícuota de 50 µL del medio LB inoculado anteriormente con *E. coli* DH5α y se incubó a 37°C a 150 rpm hasta que se obtuvo una densidad óptica 0.4-0.6 a 600 nm (turbio pero que aún penetre la luz, aproximadamente 3 h). Se retiró el cultivo de la incubadora y se colocó en hielo por 15 min agitando suavemente en forma continua para enfriar uniformemente. Se distribuyó en alícuotas de 1 mL en tubos epp y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C. Se mantuvieron las muestras en gradilla previamente enfriada y se tiró sobrenadante. Se agregó al pellet 1 mL de glicerol al 10% frío, se resuspendieron las células suavemente con los dedos, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C y se tiró sobrenadante. Se repitió nuevamente el paso

¹² Tampón de reacción 5X para ADN ligasa del bacteriófago T4: ATP 5 mM, Polietilenglicol-8000 25% (p/v), DTT 5 mM, MgCl₂ 50 mM y Tris-HCl 250 mM pH 7.6.

anterior. Finalmente se resuspendieron las células en 50 μL de glicerol al 10% frío y se dejaron las muestras en gradilla enfriada previamente. Se conservaron a -70°C .

5.6.1.4.4 Electroporación de *E. coli* DH5 α

Previamente se realizó la ligación respectiva del vector e inserto. Se hicieron placas con medio LB y su antibiótico respectivo, $[\text{Cm}] = 30 \mu\text{g/mL}$ ó $[\text{Amp}] = 100 \mu\text{g/mL}$. Se enfriaron celdas de electroporación de 0.1 cm. En condiciones estériles, se sacaron las células electrocompetentes de a -70°C y se dejaron descongelar en hielo. Se agregó 1 μL de ADN (Si es ligación 2 μL) y se dejó en hielo. Se prendió electroporador y se ajustó el voltaje a 1,100 V. Se vació esta mezcla de células y ADN en la celda fría de 0.1 cm, se tapó y se metió al carrito del electroporador con el piquito al frente y se llevó el carrito hasta el final del carril. Se dieron 2 pulsos en el botón, cuando apareció nuevamente el voltaje se sacó el carrito. En forma simultánea se midieron 400 μL de medio LB y se agregaron en la celda al sacarla (Si es ligación 200 μL). Se traspasó el medio LB con las células electroporadas en un tubo epp. y se incubó a 37°C , 200 rpm durante 1 h. Se sembraron en las placas: 10, 50, 100 μL (Si es ligación 50 y 150 μL).

NOTA: Se tomaron controles:

- 1) Se electroporaron células sin ADN y se sembró en placas con LB y LB/Antibiótico para saber si las células vivieron a la electroporación y si el antibiótico funcionó y su concentración fue la adecuada.
- 2) Se electroporaron células con vector entero sin digerir ni ligar, para una comparación sobre las demás.
- 3) Se electroporaron células con vector digerido y ligado pero sin inserto, para saber si la ADN ligasa trabajó bien.
- 4) Se electroporaron células con vector digerido y ligado con inserto, para observar transformantes.

Se seleccionaron las colonias aisladas y grandes, se realizó extracción de ADNp a pequeña escala mediante el método de Boiling. Se hizo digestión y electroforesis para seleccionar colonia con tamaño adecuado. A la colonia seleccionada se le extrajo ADNp a gran escala mediante columnas de Qiagen-100.

5.6.1.5 Transformación de *Aspergillus terreus* TUB-514

En la transformación en *A. terreus* es necesaria la utilización de un marcador para la selección de transformantes, esta selección puede conseguirse con un marcador que confiera resistencia al efecto de un compuesto tóxico (en nuestro caso el antibiótico fleomicina). La fleomicina pertenece al grupo de antibióticos metalo-glicopeptídicos de la familia de la bleomicina (Berdy, 1980). La resistencia se produce por inactivación o bloqueo físico de la fleomicina por parte de una proteína codificada por el gen *ble* localizado en el ADN cromosómico de actinomicetos productores de fleomicina como *Streptomyces hindustanus*. La fleomicina es un antibiótico de amplio espectro activo sobre la mayor parte de levaduras y hongos y tóxico para células vegetales y animales en concentraciones que van desde 0.1 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Actúa a nivel del ADN originando roturas en la molécula, preferentemente en secuencias repetidas invertidas de ADN monocatenario y en secuencias no metiladas de ADN bicatenario (Hertzberg *et al.*, 1985).

La construcción pUAMTPlaeAcons no contiene el gen *ble*, marcador de selección para hongos, por lo tanto de ésta se realizó una cotransformación utilizando el plásmido pULC43 que contiene dicho marcador. La transformación de la cepa *A. terreus* TUB-514, se realizó siguiendo un método modificado a partir del descrito por Yelton *et al.* (1984).

5.6.1.5.1 Crecimiento del micelio

En matraces de 125 mL con 25 mL de medio Power se inoculó 100 μL de esporas de *A. terreus* y se incubó a 30°C por 4 días. Transcurrido el tiempo, a un matraz esporulado se añadió 10 mL de Tween 80% estéril, se agitó con perlas de vidrio estériles, esta suspensión se pasó al siguiente matraz esporulado, para al final obtener el mismo volumen pero más concentrado de esporas. Se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer y en una caja de Petri con 20 mL de medio completo se inoculó 1×10^8 esporas/mL y se incubó a 30°C , 200 rpm por 17 h. Al observar en microscopio poca ramificación del micelio se recuperó éste en un filtro de nilón Nyltal con poro de 30 μm y se lavó el micelio con 100 mL de NaCl 0.9%, se secó el micelio con papel filtro en campana.

5.6.1.5.2 Obtención de protoplastos

En un tubo falcon de 15 mL se agregó 10 mL de solución de protoplastos 2X¹³ (SP 2X) y 150 mg de enzimas líticas en condiciones estériles (espátula estéril en papel aluminio) para tener una concentración de 15 mg/mL, se agitó bien en vortex y se filtró con membrana de 0.22µm. Se pesó 1 g de micelio, se colocó en matraz de 250 mL y se agregaron los 10 mL de SP 2X/enzimas líticas previamente preparada. Se incubó a 28°C a 75 rpm y se monitoreo el micelio cada hora en la formación de protoplastos, la reacción paró aproximadamente en 2.5 h, cuando se observó protoplastos aislados al igual que conglomerados sin membrana celular. Se filtró nuevamente el micelio en un filtro de nilón Nyltal estéril de 30 µm de diámetro poro y el filtrado se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min a Ta. Se concentró el pellet (protoplastos) en 3 mL del mismo sobrenadante y se distribuyeron 1,000 µL de esta solución en tubos epp., nuevamente se centrifugó. Se tiró sobrenadante y se agregó a cada tubo epp. 500 µL de SP 2X y se centrifugó a 4,000 rpm por 7 min a 4°C. Se lavó el pellet con 1 mL de KCM¹⁴ y se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min a 4°C. Se resuspendió el pellet (protoplastos) con 100 µL de KCM (5 veces volumen del pellet) y se agregó 10 µL de PCM¹⁵ (1/10 del volumen final).

5.6.1.5.3 Transformación

En tubos epp. nuevos y en hielo se agregó 10 µL de las construcciones (plásmido con inserto) pUAMTPlaeA (pULC43 con laeA) ó pUAMTPlaeAcons (pAN52.1 con laeA) y pULC43 (con marcador resistente a fleomicina), y se añadió 100 µL de protoplastos (se tomó un tubo epp. sólo con 100 µL de protoplastos como control y para la obtención de la sensibilidad basal de *A. terreus* a fleomicina), se mezcló por inversión y se dejó reposar 20 min en hielo. Se agregó 500 µL de PCM, se mezcló por inversión y se dejó reposar 20 min a Ta. Para diluir el polietilenglicol, se agregó 600 µL de KCM, se mezcló bien y se dejó a Ta hasta la extensión en placa.

¹³ SP 2X: Hacer una solución KCl 1.1 M y ácido cítrico 0.1 M, después ajustar pH 5.8 con KOH 1.1 M.

¹⁴ KCM: KCl 0.7M, CaCl₂ 50 mM y MES 10 mM pH 5.8.

¹⁵ PCM: CaCl₂ 50 mM, MES 10 mM pH 5.8 y Polietilenglicol-8000 50% (p/v).

5.6.1.5.4 Extensión en placa

Para obtener la sensibilidad basal de *A. terreus* a fleomicina en protoplastos se realizó lo siguiente: en cajas de Petri de 5 cm de diámetro se vertieron 5 mL de medio Czapek/Sorbitol (agar 2%) a 50°C y se varió la concentración de fleomicina de 0 a 160 µg/mL, en intervalos de 30 µg/mL. El medio se homogeneizó totalmente y se dejó solidificar. Después, en un tubo falcón de 15 mL, se agregó 5 mL de medio Czapek/Sorbitol (agar 1%) a 50°C y fleomicina en las concentraciones antes mencionadas y 300 µL de mezcla de transformación (sin ADN), se homogeneizó y se vació en las cajas de Petri con bases solidificadas anteriormente y se dejó solidificar. Se incubó a 30°C por 7 días, se monitoreó cada día para saber a qué concentración se obtenía la concentración mínima de inhibición de fleomicina.

Para las transformantes en cajas de Petri chicas se vació 5 mL de medio Czapek/Sorbitol (agar 2%) a 50°C y fleomicina a una concentración de 160 µg/mL. Se dejó solidificar. Por otra parte, en un tubo falcón de 15 mL, se agregó 5 mL de medio Czapek/Sorbitol (agar 1%) a 50°C, fleomicina a la misma concentración y 300 µL de mezcla de transformación, se vació en las cajas de Petri con bases solidificadas anteriormente y se dejó solidificar. Se incubó a 30°C por 7 días, se monitoreó cada día para hallar transformantes.

5.6.2 SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES

5.6.2.1 Siembra por picadura

Las transformantes obtenidas en la transformación de *A. terreus* TUB-514 con las construcciones pUAMTPlaeA (TlaeA) y pUAMTPlaeAcons (TlaeAcons) se volvieron a sembrar por picadura en cajas de Petri chicas con 10 mL de medio Czapek (agar 2%) y fleomicina a una concentración de 160 µg/mL. Se incubó a 30°C por 7 días, se monitoreó cada día para hallar crecimiento nuevamente de las transformantes. Las transformantes reales se esporularon en medio Power y se conservaron las esporas en viales con glicerol al 30%.

5.6.2.2 Fermentación en cilindros de agar (FCA)

El método de Agar en taco y Bioensayo por *Neurospora crassa* es descrito por Kumar *et al.* (2000).

En cajas de Petri chicas conteniendo 10 mL de medio Power solidificado se dejó esporular micelio, crecido a partir de 10 μ L de la solución de transformantes y la parental como control, se incubó a 30 °C por 4 días. Por otro lado, en cajas de Petri de vidrio se colocó papel Whatman No. 1 y encima de éste 2 cubreobjetos, se acomodaron las cajas en el soporte de metal destinado para ello y se esterilizaron.

Se preparó medio de producción 2.5X, se esterilizó y se vació 20 mL de este medio en cajas de Petri grandes, se dejó solidificar en campana de flujo laminar. Ya solidificado se hicieron cilindros de agar con sacabocados de 6 mm de diámetro y 5 mm de alto. Se colocaron los cilindros sobre los cubreobjetos de las cajas de Petri de vidrio previamente preparados y se inocularon con palillo estéril sobre los cilindros de agar esporas recientes de las transformantes. Se añadió 2 mL de H₂O de alta pureza (BM) en el papel filtro de la caja sin mojar el cubreobjeto ni los cilindros de agar. Se cubrió con parafilm la caja Petri y se depositó en una caja para bioensayo. Se añadió H₂O dd hasta cubrir la mitad de la caja de bioensayo y se incubó a 30 °C por 7 días. Simultáneamente, se creció *Neurospora crassa* en medio SDA y se incubó a 30°C por 7 días. Pasado el tiempo, se recolectaron esporas de *N. crassa* con 10 mL de Tween 0.8%, se cuantificó la concentración. Respecto a los cilindros de agar ya esporulados, se metió cada cilindro en tubos de ensayo de 10 mL y se les adicionó 2 mL de acetato de etilo y con la ayuda de una varilla de vidrio se maceró el taco hasta casi disolverlo, se dejó reposar 2 h. Se prepararon 120 mL de medio SDA, se esterilizó y ya mantenido a 45°C se sembraron 0.5 X 10⁸ esporas de *N. crassa*. Se vació el medio en una caja de bioensayo y se dejó solidificar. Se cortaron discos de 6 mm de diámetro de papel Whatman No. 1 y se adicionaron 10 μ L del extracto de los tacos ya macerados, se contó con controles positivos adicionando 10 μ L de lovastatina pura en forma de β -hidroxiácida, en concentraciones conocidas de 0 a 3 μ g/mL en un rango de 0.5 μ g/mL. Se dejaron secar los discos y con la ayuda de pinzas estériles se pasaron a la caja

de bioensayo donde se inoculó *N. crassa*. Se incubó a 30°C durante 18 h y se midió el halo de inhibición y la concentración de β -hidroxiácida producida, cada transformante se obtuvo con la linearización de una curva estándar cuyas concentraciones fueron de 0 a 3 μ g/mL de β -hidroxiácida utilizadas como controles positivos.

5.6.3 FERMENTACIONES

5.6.3.1 Fermentación líquida

En 3 matraces de 125ml con 25 mL de medio Power se inoculó a c/u 100 μ L de esporas de *A. terreus* (parental y transformantes) y se incubó a 30°C durante 4 días. Transcurrido el tiempo, a un matraz esporulado se añadió 10 mL de Tween 80% estéril, se agitó con perlas de vidrio estériles para desprender las esporas, esta suspensión se pasó al siguiente matraz esporulado, de tal forma que al final se obtuvo el mismo volumen pero más concentrado de esporas. Se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer. En cada matraz de 250 mL se preparó 50 mL de medio de producción de lovastatina 1X y se esterilizó. Se inoculó 1x10⁸ esporas por cada matraz y se incubó a 30°C de 150-200 rpm. Se realizó la fermentación de la parental y transformantes por duplicado y triplicado.

5.6.3.2 Fermentación sólida

En 3 matraces de 125ml con 25 mL de medio Power se inoculó a c/u 100 μ L de esporas de *A. terreus* (parental y transformantes) y se incubó a 30°C durante 4 días. Transcurrido el tiempo, a un matraz esporulado se añadió 10 mL de Tween 80% estéril, se agitó con perlas de vidrio estériles para desprender las esporas, esta suspensión se pasó al siguiente matraz esporulado, de tal forma que al final se obtuvo el mismo volumen pero más concentrado de esporas. Se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer. Se utilizó el poliuretano como soporte inerte para la fermentación sólida, el cual fue cortado en cuadrillos de 1x1x1 cm³, se pretrató con 2 lavados de NaOH al 40%, 2 lavados con HCl al 10% y con varios lavados al agua corriente hasta que el pH fuera de 7. Se hicieron los cálculos correspondientes para pesar el poliuretano por cada matraz para tener una humedad del 85%, siendo de 0.21 g \pm 0.005 g. Se pesó y adicionó el poliuretano en matraces de 250 mL secos, se taparon con papel aluminio y se

esterilizaron. Se preparó medio de producción de lovastatina 2.5X y se esterilizó. En cada matraz con poliuretano, se añadió 5.79 mL de medio de producción 2.5X con 2×10^6 esporas, con espátula estéril se homogenizó la mezcla con el poliuretano, se tapó el matraz con papel aluminio y se reforzó con parafilm. Se incubó a 30°C.

5.6.4 CUANTIFICACIÓN

5.6.4.1 Fermentación líquida

5.6.4.1.1 Biomasa y humedad

Se tomó el matraz y se filtró el micelio en papel filtro (previamente pesado). Se anotó el peso del papel filtro y papel filtro + micelio. Después de secar el papel filtro + micelio por 2 días en horno a 60°C, se volvió a pesar y con estos datos se obtuvo el porcentaje (%) de humedad y la cantidad de micelio producido.

5.6.4.1.2 Lovastatina en caldo

Del caldo obtenido después de la filtración, en un tubo falcón de 50 mL se tomaron 2 mL y a éste se le adicionó 2 mL de acetonitrilo + agua (1:1). Se agitó 30 min a 150 rpm, se filtró con membranas de 0.45 μm y se guardó en refrigerador en un tubo epp.

5.6.4.1.3 Lovastatina en micelio

De la biomasa obtenida después del filtrado, en un tubo falcón de 50 mL se peso 1 gr de ésta y se le adicionó 10mL de acetonitrilo + agua (1:1). Se le agregaron 5 gr de perlas de vidrio, se agitó con vortex durante 1 min, se pasó al sonicador durante 30 min y se filtró con membranas de 0.45 μm . Se guardó en refrigerador en un tubo epp.

La cuantificación de lovastatina del caldo y micelio de la fermentación se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), utilizando una columna Novapack C-18 (150 x 3.9 mm, 4mm), 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 con un detector de arreglo de diodos.

5.6.4.1.4 pH

Al final de haber tomado el muestreo para todas las pruebas, se midió el pH directamente en el matraz.

5.6.4.2 Fermentación sólida

5.6.4.2.1 pH

En un tubo falcón de 50 mL se pesó 1 gr de poliuretano y se adicionó 10 mL de H₂O. Se midió el pH directamente.

5.6.4.2.2 Lovastatina

En un tubo falcón de 50 mL se pesó 1 gr de poliuretano y se adicionó 10 mL de acetonitrilo + agua (1:1). Se agitó 30 min a 150 rpm, se pasó al sonicador durante 30 min y se filtró con membranas de 0.45 μm . Se guardó en refrigerador en un tubo epp.

La cuantificación de lovastatina se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), utilizando una columna Novapack C-18 (150 x 3.9 mm, 4mm), 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 con un detector de arreglo de diodos.

5.6.4.2.3 Humedad

En un papel aluminio previamente pesado, se colocó todo el soporte húmedo restante, se pesó todo en conjunto y se metió al horno a 60°C para su secado durante 2 días. Por diferencia de pesos se obtuvo el porcentaje (%) de humedad. Para obtener el dato de biomasa se utilizó el método de Glucosamina.

5.6.4.2.4 Biomasa (Glucosamina)

De acuerdo a la metodología propuesta por Elson & Morgan (1933). Se requiere de una hidrólisis ácida total para liberar la glucosamina de la pared celular en los hongos. La glucosamina liberada se combina con acetilacetona para formar un compuesto pirólico, éste reacciona con para-dimetilamino benzaldehído (PDBA) para formar un compuesto estable, de color rojo con un máximo de absorbancia a 530 nm.

En un tubo de vidrio se colocó el soporte seco restante en el muestreo, se agregó 5 mL de H₂SO₄ al 72%, se incubó a 25°C, 130 rpm por 30 min. Posteriormente se diluyó con 54 mL de H₂O dd y se esterilizó la mezcla 1 h a 121°C. Se neutralizó la mezcla a un pH 7.0 con NaOH 10 M, se anotó el volumen. Se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min, se tomó 2 mL de la muestra hidrolizada (sobrenadante) y se agregó 1 mL de la solución A¹⁶ (preparación reciente), 1 mL de H₂O dd, y se puso en baño maría durante 15 min. Se enfriaron los tubos en hielo y se adicionó 4 mL de etanol, 1 mL de reactivo B¹⁷ y 1 mL nuevamente de etanol, se agitó y se dejó reposar 1 h en oscuridad. Se determinó la densidad óptica a 530 nm. La concentración de glucosamina producida en las muestras se obtuvo con la linearización de una curva estándar cuyas concentraciones fueron de 0 a 100 mg/mL de glucosamina.

¹⁶ Solución A: 1 mL de Acetilacetona en 50 mL de Na₂CO₃ 0.5N.

¹⁷ Solución B: 0.8 g p-Dimetilaminobenzaldehído (PDBA) en 30 mL de HCl y 30 mL de Etanol.

6. RESULTADOS

6.1 OBTENCIÓN DE ADN TOTAL DE *A. terreus*

Al realizar la electroforesis del ADN genómico extraído se observó alto peso molecular así como buena integridad al observar bandas no tan degradadas, por lo que las muestras 2 y 7, que presentaron las mejores características, se utilizaron posteriormente para realizar PCR, con el propósito de obtener los fragmentos con el gen *laeA* (Fig. 6-1).

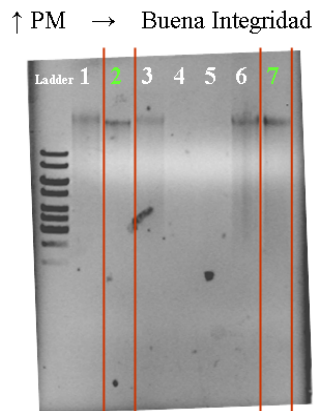


Fig. 6-1. ADN genómico de *A. terreus*.

6.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS FRAGMENTOS CON EL GEN *laeA*

El diseño de los oligos correspondientes y el tamaño esperado de los fragmentos del ADN, se describen en la Tabla 6-1.

Tabla 6-1. Diseño de oligos para amplificar los fragmentos del gen *laeA*.

Gen	Oligos (5'→3')	Tamaño de fragmento (pb)
<i>laeA</i> completo	CTCCAGGATCCGAGTTCACGGTGC	2,624
	AGGCGGATCCGTCTCAACTACAGC	
<i>laeA</i> cds	ACCTATCACCATGGCCCCTCCG	1,249
	GGACTCCAGGATCCACTCTTGG	

Los oligos diseñados para obtener el fragmento con el gen *laeA* completo de 2,624 pb constan de 24 nucleótidos y contienen una secuencia de reconocimiento para la enzima *Bam*HI (Fig. 6-2). El gen *laeA* completo obtenido contiene el promotor, secuencia codificante y terminador.

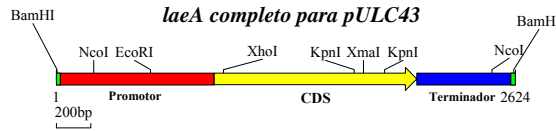


Fig. 6-2. Fragmento con el gen *laeA* completo.

Los oligos diseñados para obtener el fragmento con el gen *laeA* cds de 1,249 pb constan de 22 nucleótidos y contienen una secuencia de reconocimiento para la enzima *Nco*I, que corta justo en el triplete de inicio de la secuencia codificante del gen *laeA*, y la enzima *Bam*HI (Fig. 6-3). El gen *laeA* cds obtenido contiene sólo la secuencia codificante.

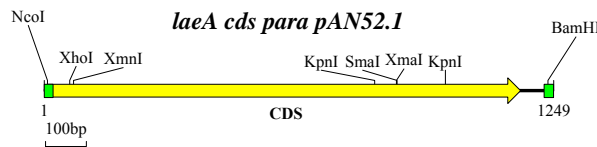


Fig. 6-3. Fragmento con el gen *laeA* cds.

6.2.1 PCR para obtener el gen *laeA* completo

Para obtener el fragmento del gen *laeA* completo de 2,624 pb, se probaron 10 temperaturas diferentes y se encontró que la mejor temperatura de anillamiento (hibridación) de los oligos fue de 69°C (Fig. 6-4).

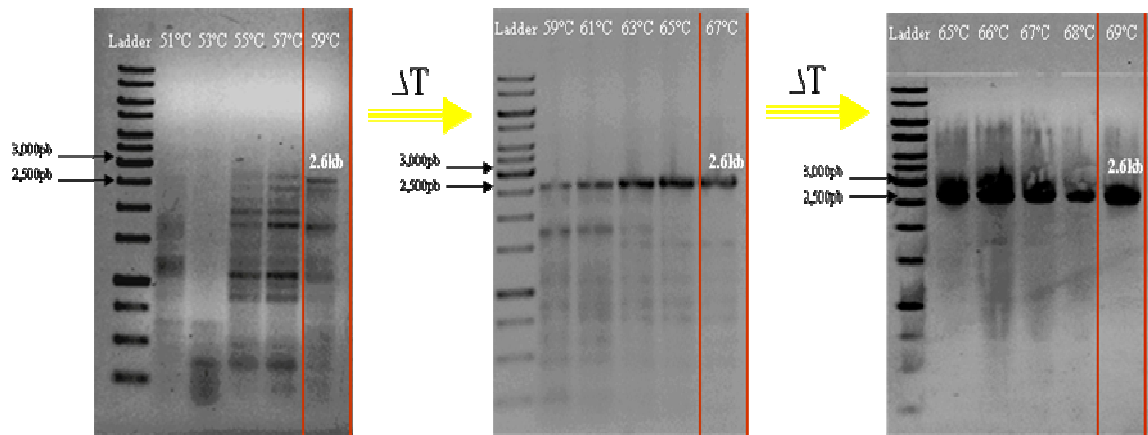


Fig. 6-4. Electroforesis que muestra PCR mediante gradiente de temperatura para obtener el gen *laeA* completo.

6.2.2 PCR para obtener el gen *laeA* cds

Para obtener el fragmento del gen *laeA* cds de 1,249 pb, se probaron 8 temperaturas diferentes y se encontró que la mejor temperatura de anillamiento (hibridación) de los oligos fue de 52°C (Fig. 6-5).

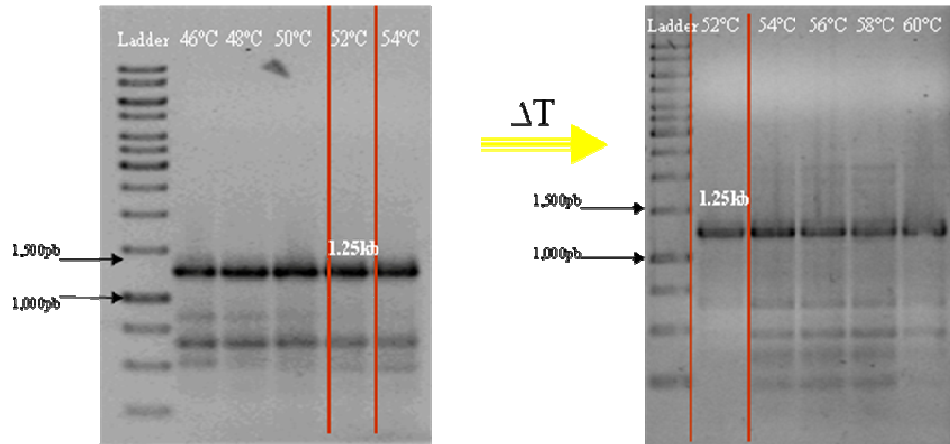


Fig. 6-5. Electroforesis que muestra PCR mediante gradiente de temperatura para obtener el gen *laeA* cds.

6.3 CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE PCR EN VECTORES PLASMÍDICOS

Cada uno de los fragmentos con el gen *laeA* fue clonado en su vector correspondiente, como se muestra en la Tabla 6-2. El gen *laeA* completo que trae consigo su propio promotor y terminador se clonó en el vector pULC43 y el gen *laeA* cds que solo tiene la secuencia codificante se clonó en el vector pAN52.1, bajo el control de un promotor constitutivo, proveniente del gen *gpd* de *A. nidulans*, y el terminador del gen *trpC*.

Tabla 6-2. Vectores y fragmentos con el gen *laeA*.

Fragmentos	Vector	Enzima	Tamaño final
gen <i>laeA</i> completo (2.6 kb)	pULC43 (4.9 kb)	<i>Bam</i> HI	7.5 kb
gen <i>laeA</i> cds (1.25 kb)	pAN52.1 (promotor constitutivo; <i>gpdA</i>) (5.5 kb)	<i>Nco</i> I <i>Bam</i> HI	6.75 kb

6.3.1 Clonación del gen *laeA* completo en vector pULC43

El vector pULC43 ya lo teníamos en el laboratorio en cantidad suficiente por lo que sólo se comprobó su integridad por transformación en *E. coli*.

Se procedió a la digestión con *Bam*HI del vector pULC43 y del gen *laeA* completo, a la ligación, transformación en *E. coli* y minipreps. En la Fig. 6-6 se observa que de 18 colonias obtenidas solo la colonia 5 incorporó el plásmido con inserto. Se mostró que dicha construcción, llamada pUAMTPlaeA, sin digerir presenta mayor tamaño molecular respecto a las demás y al digerirse con *Bam*HI se corta en 2 fragmentos obteniéndose el gen *laeA* (2.6 kb) y el plásmido linearizado (4.9 kb) de tamaños adecuados. Finalmente esta construcción se amplificó a gran escala para proseguir con la transformación en *A. terreus*.

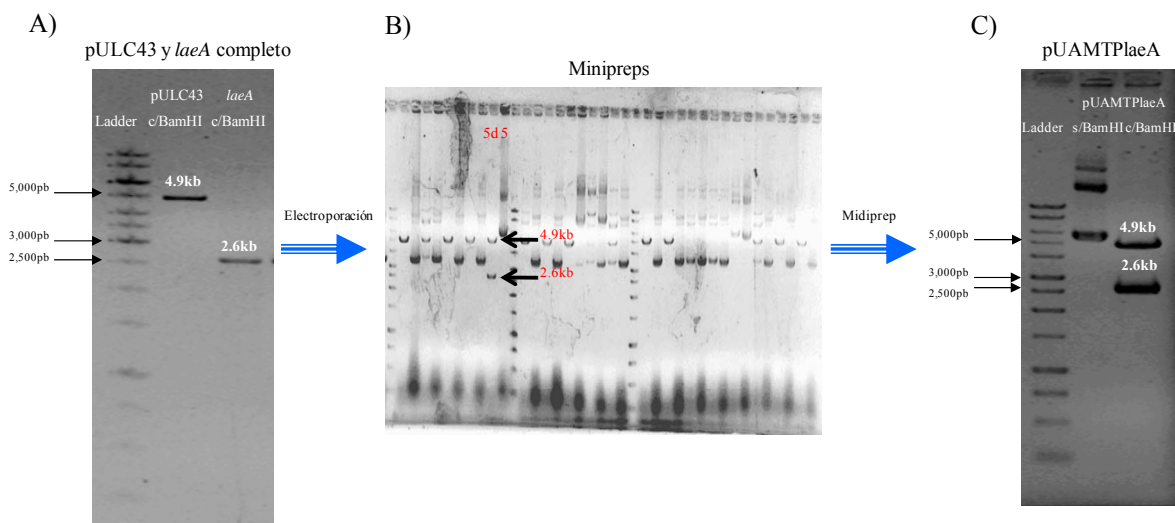


Fig. 6-6. Electroforesis de clonación: A) Vector pULC43 y gen *laeA* completo digeridos con *Bam*HI; B) Plásmidos de transformantes de *E. coli* con el producto de ligación y digeridos con *Bam*HI; C) Midiprep de construcción pUMTPlaeA y posterior digestión con *Bam*HI.

6.3.2 Clonación del gen *laeA* cds en vector pAN52.1

Respecto al vector pAN52.1 no se tenía suficiente por lo que se tuvo que amplificar, se realizó transformación en *E. coli*, en la Fig. 6-7 se observa la selección de 4 colonias transformantes del plásmido pAN52.1 para realizar minipreps, los ADNs plasmídicos se digirieron con *Bam*HI y se seleccionó la colonia 3 ya que presentó el tamaño correspondiente de 5.5 kb al linearizarse y buena concentración. Finalmente la colonia 3 que lleva el vector pAN52.1 se amplificó a gran escala para proseguir con la clonación con el gen *laeA* cds.

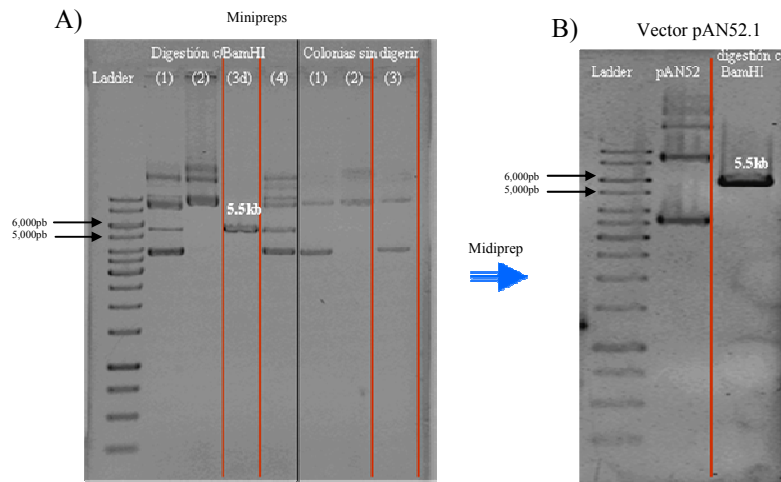


Fig. 6-7. Electroforesis de la amplificación del vector pAN52.1: A) Plásmidos de transformantes de *E. coli* con el vector y digeridos con *Bam*HI; B) Midiprep del vector pAN52.1 y posterior digestión con *Bam*HI.

Se procedió a la digestión, con *Nco*I y *Bam*HI, del vector pAN52.1 y del gen *laeA* cds. Después se efectuó la ligación, transformación de *E. coli* y minipreps, en la Fig. 6-8 se observa que de 24 colonias obtenidas solo la colonia 3 incorporó el plásmido con inserto. Se observó que dicha construcción, llamada pUAMTPlaeAcons, sin digerir presenta mayor tamaño molecular respecto a las demás y al digerirse con *Nco*I y *Bam*HI se corta en 2 fragmentos obteniéndose el gen *laeA* cds (1.25 kb) y el plásmido linealizado (5.5 kb) de tamaños adecuados. Finalmente esta construcción se amplificó a gran escala para proseguir con la transformación en *A. terreus*.

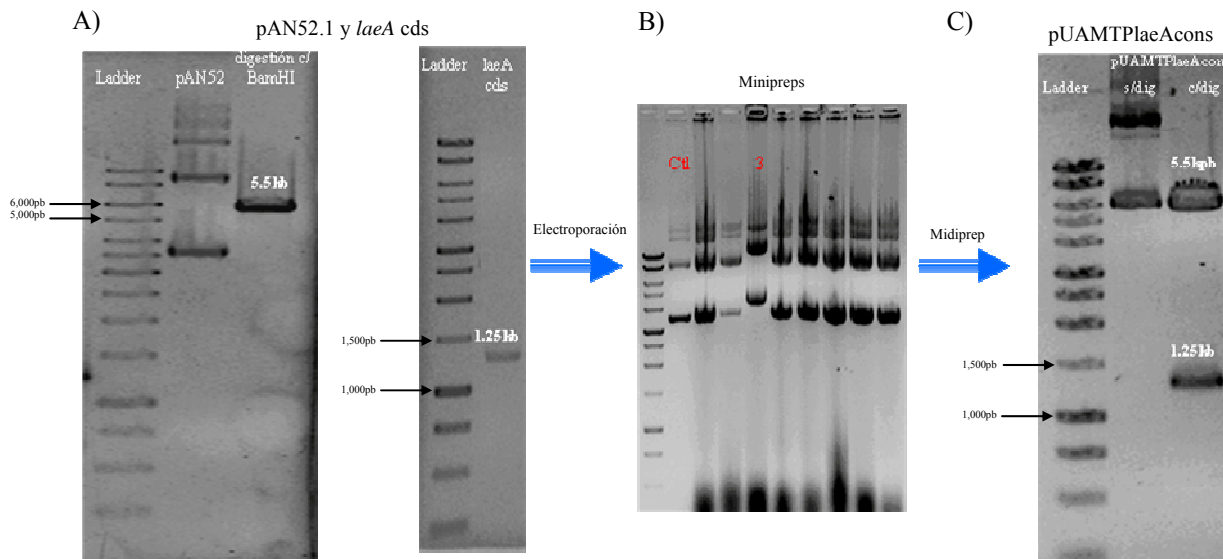


Fig. 6-8. Electroforesis de clonación: A) Vector pAN52.1 y gen *laeA* cds digeridos con *Nco*I y *Bam*HI; B) Plásmidos de transformantes de *E. coli* con el producto de ligación y digeridos; C) Midiprep de construcción pUAMTPlaeAcons y posterior digestión.

6.4 SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS

La secuenciación fue realizada y la alineación de los nucleótidos fue realizada por el Programa Blastn del NCBI en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, comprobando que cada uno de los fragmentos obtenidos, correspondían al gen *laeA* de *A. terreus* (Tabla 6-3).

Tabla 6-3. Resultados del análisis Blastn para cada secuencia del gen *laeA* obtenida.

Gen	Resultado del Blastn	No. Acceso al GenBank	Oligos empleados	% Identidad
<i>laeA</i> completo	Aspergillus terreus NIH2624 cont1.16, whole genome shotgun sequence. 375773 bp ADN linear	AAJN01000016.1	laeF (802/829)	96
			laeR (769/814)	94
			laeAcdsF (363/411)	88
			laeAcdsR (895/947)	94
<i>laeA</i> cds	Aspergillus terreus NIH2624 cont1.16, whole genome shotgun sequence. 375773 bp ADN linear	AAJN01000016.1	laeAcdsF (720/746)	96
			laeAcdsR (682/690)	98

6.5 TRANSFORMACIÓN EN *A. terreus*

Para proseguir con la transformación en *A. terreus* se montó la técnica de transformación por protoplastos ya que no se había realizado en laboratorio. También se determinó la concentración mínima inhibitoria de fleomicina o nivel basal de fleomicina en protoplastos. Observándose que desde 30 $\mu\text{g/mL}$ cae drásticamente la sobrevivencia de protoplastos, pero al seguir aumentando la concentración de fleomicina existían colonias resistentes a este antibiótico, por lo que se optó por manejar una concentración de 160 $\mu\text{g/mL}$ de fleomicina; donde no existían colonias resistentes y cerciorándonos que a ésta concentración se generaban transformantes con vector sin el gen *laeA* (Figura 6-9).

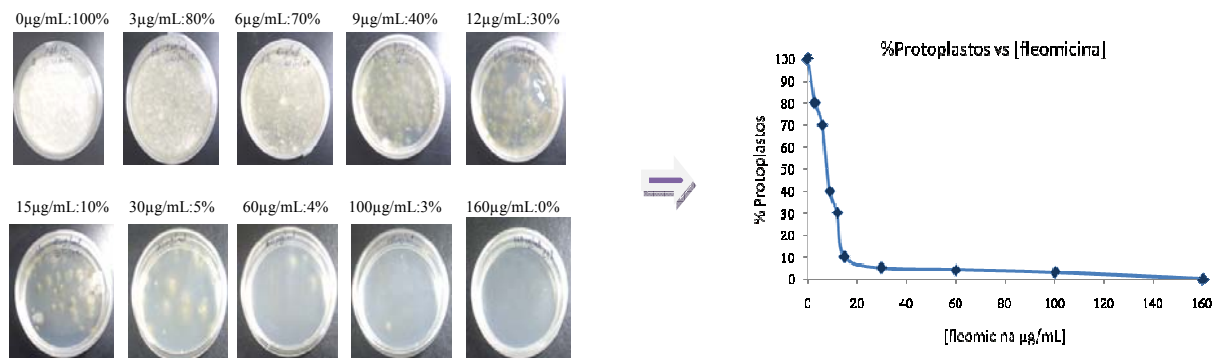


Fig. 6-9. Concentración mínima inhibitoria de fleomicina en protoplastos.

6.5.1 Transformación de *A. terreus* con construcción pUAMTPlaeA y Selección de transformantes

Se transformó *A. terreus* con la construcción pUAMTPlaeA obteniéndose 24 transformantes, después se resembraron nuevamente en Czapeck/ble obteniéndose sólo el crecimiento de 13 transformantes. La preselección de éstas se hizo mediante fermentación en cilindro de agar, seleccionando 7 transformantes con una producción de LOV más alta con un rango 201-260 µg/mL (parental de 190 µg/mL). Éstas transformantes fueron: T2laeA, T4laeA, T5laeA, T7laeA, T12laeA, T13laeA y T14laeA. Los 3 controles obtenidos que son transformantes con sólo el vector pULC43 sin el gen *laeA* completo tuvieron una producción de LOV menor a la parental por lo que se comprueba que el vector no influye en la sobreproducción de LOV (Figura 6-10).

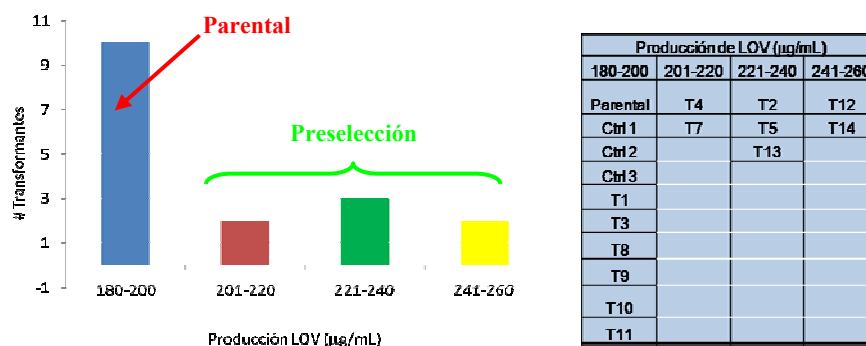


Fig. 6-10. Preselección de transformantes de pUAMTPlaeA.

Posteriormente se realizó FS y FL de estas 7 transformantes y se cuantificó la producción de LOV al séptimo día de fermentación, para poder seleccionar sólo una de ellas y realizar cinética de ésta. En la FS, todas las transformantes con construcción pUAMTPlaeA tuvieron incrementos en la producción de lovastatina respecto a la cepa parental, mientras que en FL se observan incrementos y disminuciones de éstas. Las mejores productoras de lovastatina en FS fueron T12laeA y T13laeA, con un incremento de 45.6 y 47.4%, pero en FL éstas tuvieron sólo un incremento de 21 y 37%. La mejor productora de lovastatina en FL fue la T14laeA con un incremento de 89.2%, pero en FS ésta sólo tuvo un incremento del 5% (Tabla 6-4 y Figura 6-11).

Tabla 6-4. Producción de LOV al séptimo día de transformantes *laeA* en FS y FL.

Transformantes con pUAMTPlaeA	Fermentación sólida (FS)		Fermentación líquida (FL)	
	Producción LOV (mg Lov/gms)	Incremento (%)	Producción LOV (mg Lov/mL)	Incremento (%)
Parental	7.54±0.66		0.677±0.027	
T2laeA	10.35±1.50	37.2	0.306±0.030	-54.8
T4laeA	7.97±1.21	5.6	0.496±0.024	-26.7
T5laeA	8.36±0.81	10.8	0.561±0.015	-17.2
T7laeA	9.78±1.01	29.7	0.761±0.084	12.3
T12laeA	10.99±1.13	45.6	0.820±0.053	21.1
T13laeA	11.12±0.60	47.4	0.930±0.037	37.2
T14laeA	7.92±0.71	5.0	1.281±0.073	89.2

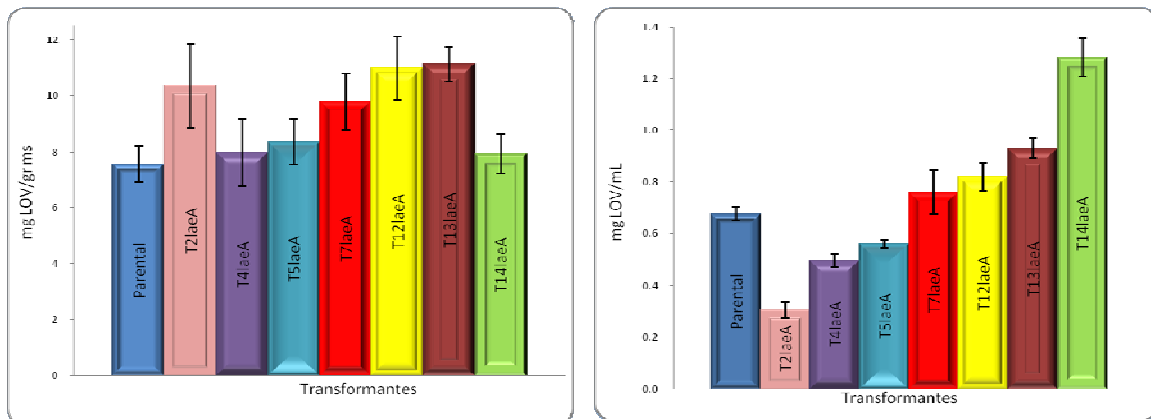


Fig. 6-11. Producción de LOV al séptimo día de transformantes laeA en FS y FL.

Para evaluar con precisión las diferencias en la producción de lovastatina entre las transformantes con construcción pUAMTPlaeA y la parental se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Duncan (programa estadístico SPSS). Los resultados indicaron que en FS las transformantes T12laeA y T13laeA fueron las mejores productoras de lovastatina ($p < 0.03$) (Tabla 6-5). Mientras que en FL, la T14laeA fue la mejor productora ($p < 0.00001$) (Tabla 6-6). En ambos casos se realizaron las cinéticas de producción de lovastatina de las transformantes respectivas. Se confirmó así el mejoramiento genético de las transformantes T12laeA, T13laeA y T14laeA, mostrando incrementos del 45 al 89% respecto a la parental.

Tabla 6-5. Comparación de medias de producción de LOV de transformantes laeA en FS.

Transformantes laeA	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
Parental	2	7.544		
T14laeA	2	7.924	7.924	
T4laeA	2	7.965	7.965	
T5laeA	2	8.356	8.356	
T7laeA	2	9.782	9.782	9.782
T2laeA	2		10.349	10.349
T12laeA	2			10.987
T13laeA	2			11.119
Sig.		.071	.055	.243

Tabla 6-6. Comparación de medias de producción de LOV de transformantes laeA en FL.

Transformantes laeA	N	Subconjunto para alfa = .05					
		1	2	3	4	5	6
T2laeA	2	0.306					
T4laeA	2		0.496				
T5laeA	2		0.561				
Parental	2			0.677			
T7laeA	2			0.761	0.761		
T12laeA	2				0.820	0.820	
T13laeA	2					0.930	
T14laeA	2						1.281
Sig.		1.000	.221	.126	.259	.055	1.000

En la Tabla 6-7 se muestra que T12laeA, T13laeA y T14laeA son las mejores productoras de lovastatina en la preselección. T12laeA y T13laeA son las mejores productoras en FS, sin embargo, T14laeA es la peor productora. Finalmente, estas 3 son las mejores productoras en FL.

Tabla 6-7. Transformantes de pUAMTPlaeA en orden descendente a su producción de lovastatina según preselección y selección en FS y FL.

Preselección (FCA)	Selección en FS	Selección en FL
T12laeA	T13laeA	T14laeA
T14laeA	T12laeA	T13laeA
T13laeA	T2laeA	T12laeA
T5laeA	T7laeA	T7laeA
T2laeA	T5laeA	T5laeA
T4laeA	T4laeA	T4laeA
T7laeA	T14laeA	T2laeA

Para saber si el incremento en la producción de lovastatina fue debido a un mayor crecimiento de *A. terreus* o a mayor producción del hongo, se calculó la producción específica, que se obtiene del cociente de la producción de lovastatina y de su biomasa. Se observó un comportamiento similar de las transformantes con respecto a lo ya graficado, por lo que se asume que el incremento en la producción de lovastatina no es debido a un mayor crecimiento de *A. terreus* (Figura 6-12).

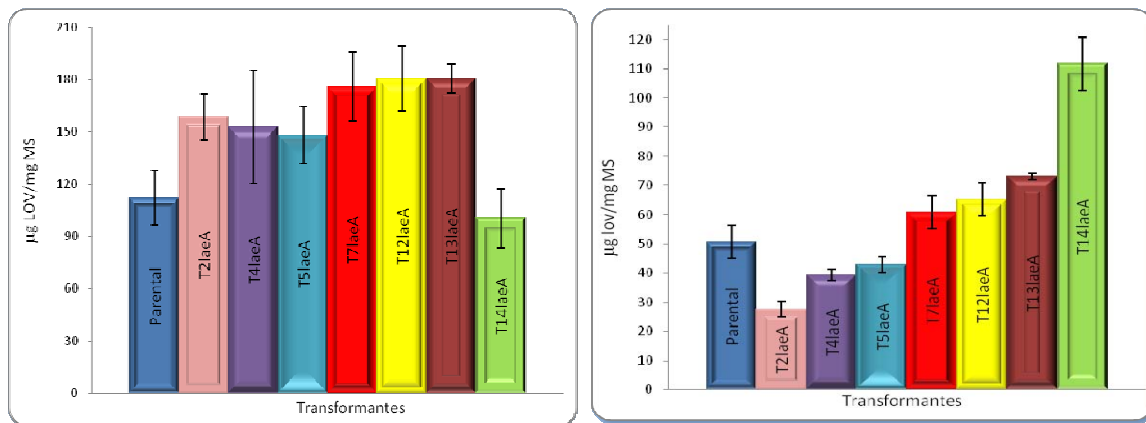


Fig. 6-12. Producción específica de LOV al séptimo día de transformantes laeA en FS y FL.

6.5.2 Cotransformación de *A. terreus* con construcción pUAMTPlaeAcons y Selección de transformantes

Se cotransformó *A. terreus* con la construcción pUAMTPlaeAcons, integrando de igual forma el plásmido pULC43 ya que este lleva el marcador de fleomicina para hongos. Se obtuvieron 20 transformantes, las que posteriormente se sembraron en Czapeck/ble obteniéndose sólo el crecimiento de 5 transformantes. La preselección de estas se hizo con FCA, obteniéndose una producción de LOV de las 5 transformantes más alta con un rango 191-230 µg/mL (parental de 190 µg/mL). Debido a que eran muy pocas se optó por tomar todas las transformantes para realizar FS y FL cuantificando la producción de LOV al séptimo día de fermentación para seleccionar sólo una de ellas y realizar cinética de ésta. Los 5 controles obtenidos que son transformantes con solo el vector pULC43 sin el fragmento del gen *laeA* tuvieron una producción de LOV menor a la parental por lo que se comprueba que el vector no influye en la sobreproducción de LOV (Figura 6-13).

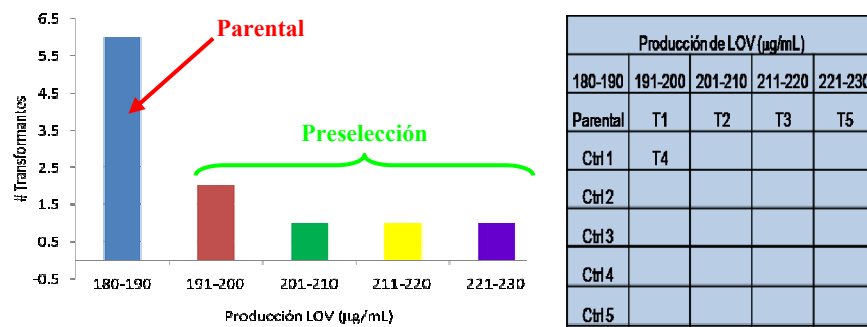


Fig. 6-13. Preselección de transformantes de pUAMTPlaeAcons.

En la FS, todas las transformantes con construcción pUAMTPlaeAcons tuvieron incrementos en la producción de lovastatina respecto a la parental, mientras que en FL se observan incrementos y disminuciones de éstas, la mejor productora de lovastatina en FS fue la T2laeAcons con un incremento de 138%, pero en FL ésta tuvo una disminución del 10.9%. La mejor productora de lovastatina en FL fue la T5laeAcons con un incremento de 100.8%, pero ésta en FS sólo tuvo un incremento del 59.6% (Tabla 6-8 y Figura 6-14).

Tabla 6-8. Producción de LOV al séptimo día de transformantes *laeA* en FS y FL.

Transformantes con pUAMTPlaeAcons	Fermentación sólida (FS)		Fermentación líquida (FL)	
	Producción LOV (mg Lov/gms)	Incremento (%)	Producción LOV (mg Lov/mL)	Incremento (%)
Parental	7.54±0.66		0.677±0.027	
T1laeAcons	10.63±1.18	40.9	0.839±0.013	23.9
T2laeAcons	17.95±1.02	137.9	0.604±0.034	-10.9
T3laeAcons	9.79±0.72	29.7	0.743±0.059	9.7
T4laeAcons	13.23±2.09	75.4	0.444±0.031	-34.3
T5laeAcons	12.04±0.79	59.6	1.361±0.056	100.8

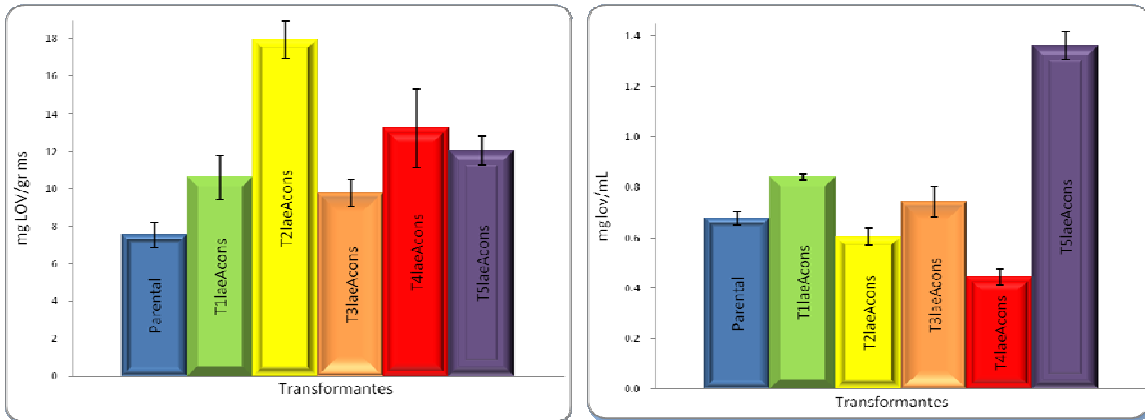


Fig. 6-14. Producción de LOV al séptimo día de transformantes laeAcons en FS y FL.

En caso de las transformantes con construcción pUAMTPlaeAcons, se empleó la misma prueba estadística para corroborar si existe diferencia significativa en la producción de lovastatina de las transformantes con respecto a la parental. Se obtuvo que en FS la transformante T2laeAcons fue la mejor productora de lovastatina ($p < 0.00003$) (Tabla 6-9). Mientras que en FL, la T5laeAcons fue la mejor productora ($p < 0.00001$) (Tabla 6-10). Se confirmó así el mejoramiento genético de las transformantes T2laeAcons y T5laeAcons, mostrando incrementos de 137.9 y 100.8% respecto a la parental. Por lo anterior, se hicieron cinéticas de ambas transformantes.

Tabla 6-9. Comparación de medias de producción de LOV de transformantes laeAcons en FS.

Transformantes laeAcons	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	4
Parental	2	7.544			
T3laeAcons	3		9.785		
T1laeAcons	2		10.626		
T5laeAcons	3		12.042	12.042	
T4laeAcons	2			13.230	
T2laeAcons	3				17.948
Sig.		1.000	.057	.261	1.000

Tabla 6-10. Comparación de medias de producción de LOV de transformantes laeAcons en FL.

Transformantes laeAcons	N	Subconjunto para alfa = .05				
		1	2	3	4	5
T4laeAcons	2	0.444				
T2laeAcons	2		0.604			
Parental	2		0.677	0.677		
T3laeAcons	2			0.743	0.743	
T1laeAcons	2				0.839	
T5laeAcons	2					1.361
Sig.		1.000	.115	.153	.053	1.000

En la Tabla 6-11 se muestra que T5laeAcons, T3laeAcons y T2laeAcons son las mejores productoras de lovastatina en la preselección. T2laeAcons es la mejor productora en FS, sin embargo, T3laeAcons es la peor productora. Finalmente, T5laeAcons es la mejor productora en FL.

Tabla 6-11. Transformantes de pUAMTPlacons en orden descendente a su producción de lovastatina según preselección y selección en FS y FL.

Preselección (FCA)	Selección en FS	Selección en FL
T5laeAcons	T2laeAcons	T5laeAcons
T3laeAcons	T4laeAcons	T1laeAcons
T2laeAcons	T5laeAcons	T3laeAcons
T1laeAcons	T1laeAcons	T2laeAcons
T4laeAcons	T3laeAcons	T4laeAcons

Para saber si el incremento en la producción de lovastatina fue debido a un mayor crecimiento de *A. terreus* ó a una mayor producción del hongo, también se calculó la producción específica. Se observó un comportamiento similar de las transformantes con respecto a lo ya graficado, por lo que se asume que el incremento en la producción de lovastatina no es debido a un mayor crecimiento de *A. terreus* (Figura 6-15).

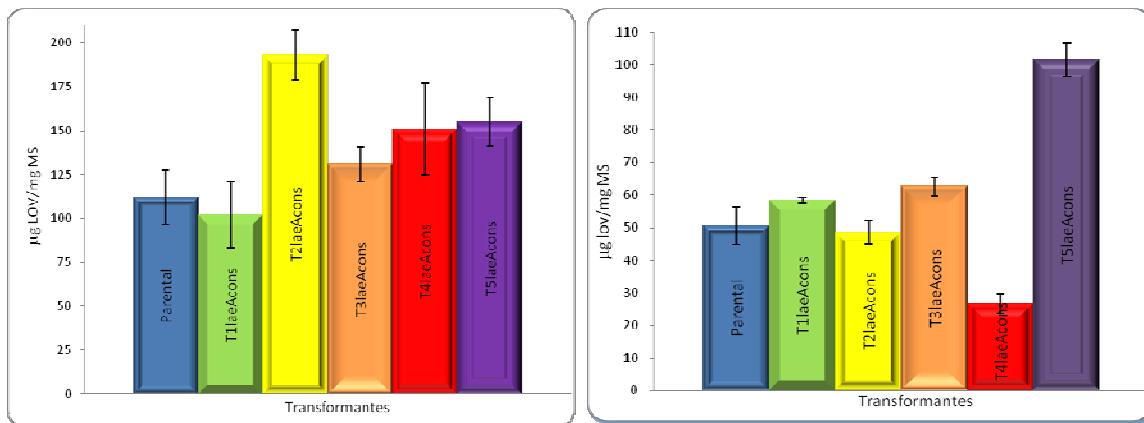


Fig. 6-15. Producción específica de LOV al séptimo día de transformantes laeAcons en FS y FL.

6.6 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE LAS TRANSFORMANTES EN FS Y FL

Se realizaron cinéticas en FS y FL de las distintas transformantes seleccionadas previamente de las 2 construcciones (Tabla 6-12).

Tabla 6-12. Resumen de transformantes seleccionadas en FS y FL evaluadas al séptimo día.

Construcción	Transformantes	FS (LOV: mg Lov/gms)	Incremento en FS (%)	FL (LOV: mg Lov/mL)	Incremento en FL (%)
Transformantes con pUAMTPlaeA	Parental	7.54±0.66		0.677±0.027	
	T12laeA	10.99±1.13	45.6	0.820±0.053	21.1
	T13laeA	11.12±0.60	47.4	0.930±0.037	37.2
	T14laeA	7.92±0.71	5.0	1.281±0.073	89.2
Transformantes con pUAMTPlaeAcons	T2laeAcons	17.95±1.02	137.9	0.604±0.034	-10.9
	T5laeAcons	12.04±0.79	59.6	1.361±0.056	100.8

En el caso de las cinéticas en FS, se obtuvo una producción de lovastatina de T12laeA y T13laeA de 10.5±0.41 y 11.87±0.09 mg lov/gms respectivamente, lo que representa incrementos de 49.26 y 68.78%, respectivamente, frente a la parental (7.03±0.44 mg lov/gms). Finalmente la T2laeAcons obtuvo una producción de lovastatina de 16.78±0.45 mg lov/gms, con un incremento de 138.64% (Figura 6-16). La transformante T13laeA tuvo un poco más de incremento en comparación a lo ya reportado anteriormente en la preselección, de 47.38% a 68.78% respecto a la parental.

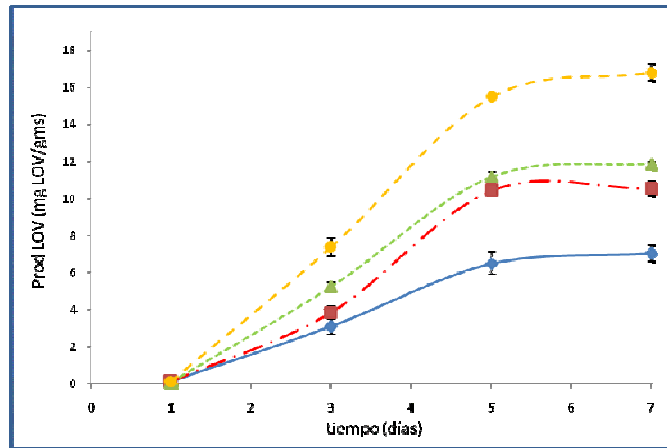


Fig. 6-16. Cinética de producción de LOV de transformantes seleccionadas en FS. ◆Parental; ■ T12laeA; ▲ T13laeA; ● T2laeAcons.

Utilizando la prueba estadística de Tukey se encontró que las producciones de lovastatina en FS de las transformantes T12laeA, T13laeA, T2laeAcons y parental son significativamente diferentes ($p < 0.00001$). Demostrándose que la T2laeAcons (con promotor constitutivo) fue la mejor productora de LOV en FS con una producción de 16.78±0.45 mg lov/gms, con un incremento 138.64% respecto a la parental (Tabla 6-13). El resultado sugiere sobreexpresar *laeA* en FS con un promotor constitutivo.

Tabla 6-13. Comparación de medias de producción de LOV de transformantes seleccionadas en FS.

Transformantes seleccionadas FS	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	4
Parental	3	7.03			
T12laeA	3		10.49		
T13laeA	3			11.87	
T2laeAcons	3				16.78
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Para la FL, se obtuvo una producción de lovastatina de T14laeA de 1.39 ± 0.017 mg lov/mL, con un incremento de 111% respecto a la parental (0.66 ± 0.012 mg lov/mL), y la T5laeAcons una producción de 1.28 ± 0.032 mg lov/mL, con 94.5% de incremento (Figura 6-17).

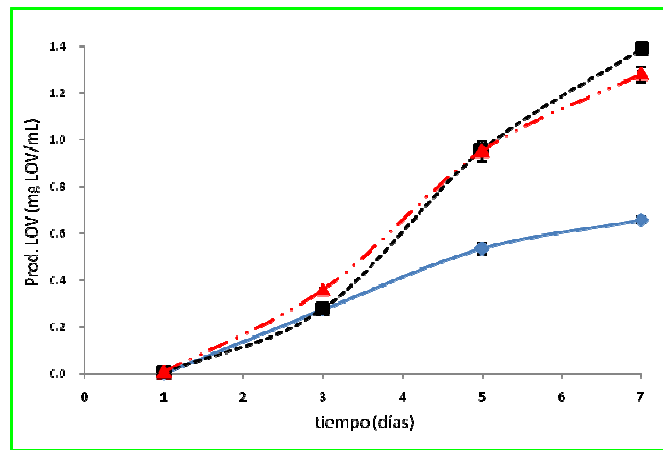


Fig. 6-17. Cinética de producción de LOV de transformantes seleccionadas en FL. ◆ Parental; ■ T14laeA; ▲ T5laeAcons.

Aquí también se realizó un análisis estadístico para confirmar cuál de las dos estrategias utilizadas fue mejor para FL. La prueba de Tukey indicó que la T14laeA (con promotor propio) fue la mejor productora de LOV en FL ($p < 0.00001$), con una producción de 1.39 ± 0.017 mg lov/mL e incremento de 111% respecto a la parental (Tabla 6-14). El resultado sugiere sobreexpresar *laeA* en FL con su propio promotor.

Tabla 6-14. Comparación de medias de producción de LOV de transformantes seleccionadas en FL.

Transformantes seleccionadas FL	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
Parental	3	0.658		
T5laeAcons	3		1.281	
T14laeA	3			1.389
Sig.		1.000	1.000	1.000

6.7 MORFOLOGÍA

Se obtuvo la esporulación de las transformantes, para saber si éstas eran afectadas por la expresión de *laeA*, se observaron surcos y más esporulación en las transformantes seleccionadas con respecto a la parental (Figura 6-18).



Fig. 6-18. Esporulación de parental y transformantes seleccionadas.

Es interesante notar que la morfología colonial mostrada por las transformantes recuerda la morfología observada en mutantes de *A. terreus* resistentes a estrés osmótico (Baños comunicación personal).

6.8 INTEGRACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES EN LAS TRANSFORMANTES

Finalmente se diseñaron los oligos para verificar por PCR que la construcción pUAMT*laeA* y pUAMT*laeA*cons estén integradas en las transformantes T*laeA* y T*laeA*cons respectivamente.

Para diseñar los oligos para las transformantes T*laeA*, inicialmente se analizó la construcción pUAMT*laeA* mediante la digestión con enzimas de restricción *SacII*, *EcoRI* y *XhoI*, para saber en qué dirección está incorporado el gen completo *laeA* en el vector pULC43. Por lo que se da en la Tabla 6-15 los tamaños de los fragmentos que se obtendrían tanto en el vector como en el gen *laeA* de acorde a la enzima utilizada.

Tabla 6-15. Sitios de corte para construcción pUAMT*laeA*.

Enzima de restricción	Sitio en <i>laeA</i> (2,624pb)	Sitio en pULC (4,900pb)	Fragmentos con inserto dirección →	Fragmentos con inserto dirección ←
<i>SacII</i>	2,481pb	450pb	2,481pb 5,043pb	143pb 7,381pb
<i>EcoRI</i>	539pb	480pb	2,085pb 5,439pb	539pb 6,985pb
<i>XhoI</i>	956pb	2,312pb	3,518pb 4,006pb	2,806pb 4,718pb

Se observó con más claridad que la construcción pUAMTPlaeA digerida con *SacII* se obtienen 2 fragmentos de tamaños aprox. de 2,500 y 5,000 pb (Fig. 6-19A), por lo que dicha construcción tiene insertado el gen *laeA* completo en la dirección →, como se muestra en la figura 6-19B.

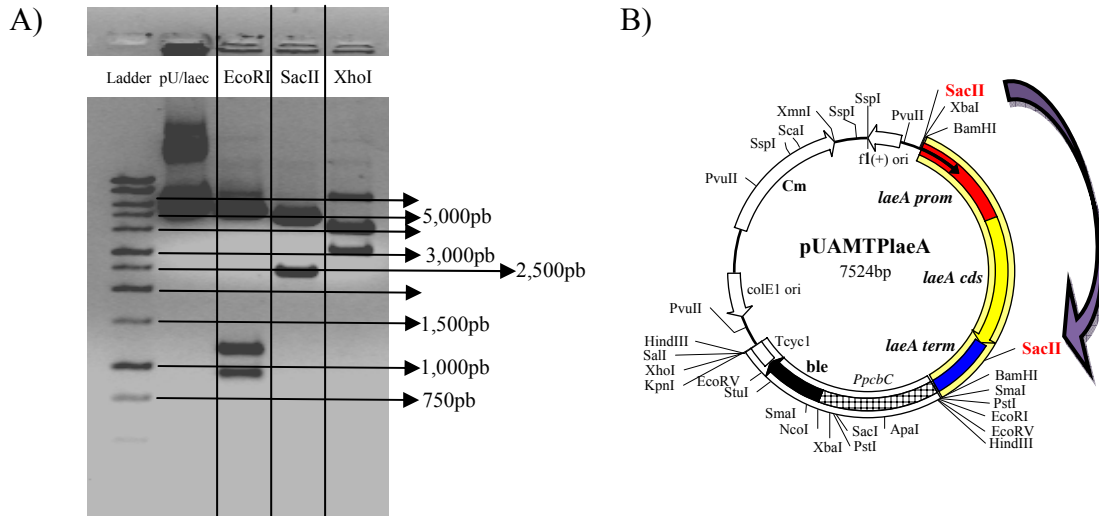


Fig. 6-19. A) Electroforesis de construcción pUAMTPlaeA digerido con *EcoRI*, *SacII* y *XhoI*. B) Dirección en la que se encuentra el gen completo *laeA* en el vector pULC43 para obtener la construcción pUAMTPlaeA.

En el caso del vector pAN52.1, que lleva integrado el promotor constitutivo del gen *gpd* (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa) de *A. nidulans*, el gen *laeA* cds (sólo la secuencia codificadora) sólo podía clonarse en una dirección, obteniéndose la construcción pUAMTPlaeAcons como se muestra en la Fig. 6-20.

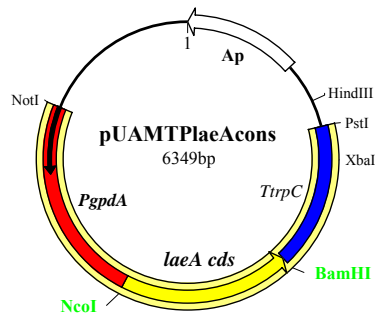


Fig. 6-20. Construcción pUAMTPlaeAcons.

Se prosiguió con el diseño de los oligos para ambas construcciones (Tabla 6-16), para la construcción pUAMTPlaeA, ambos oligos constan de 23 nucleótidos y se tomó para el oligo Forward parte del terminador del gen *laeA* completo y para el oligo Reverse parte del promotor *pcbC* del gen fleomicina (*ble*) (Figura 6-21).

Tabla 6-16. Diseño de oligos para construcciones pUAMTPlaeA y pUAMTPlaeAcons.

Construcción	Oligos (5' → 3')	Tamaño de fragmento (pb)
pUAMTPlaeA	CCAAGAGTGGATAATGGAGTCCC	914
	CGACAGTTGACAGAGCCAATGGC	
pUAMTPlaeAcons	CCAGAGGGTCATGACTTGAGC	1,279
	CCACGTCAATTGCCAGATCC	

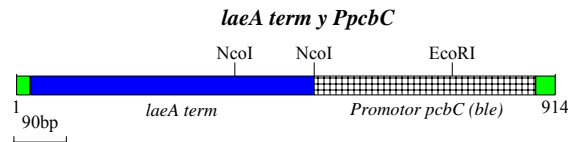


Fig. 6-21. Fragmento para construcción pUAMTPlaeA.

Para la construcción pUAMTPlaeAcons, los oligos constan de 21 nucleótidos, el oligo Forward involucra parte del promotor constitutivo del gen *gpdA* y el oligo Reverse parte de la secuencia codificadora del gen *laeA* (Figura 6-22).

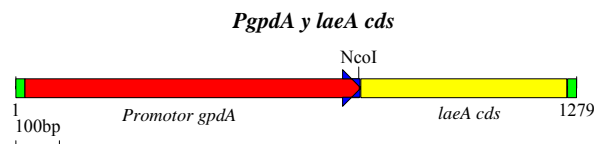


Fig. 6-22. Fragmento para construcción pUAMTPlaeAcons.

Los fragmentos se obtuvieron por PCR de las transformantes T12laeA, T13laeA, T14laeA, T2laeAcons y T5laeAcons. Se observaron fragmentos similares de las transformantes con la misma construcción, pero con tamaños más grandes de lo esperado según Tabla 6-16. El fragmento obtenido de T12laeA, T13laeA y T14laeA con la construcción pUAMTPlaeA realmente tuvo un tamaño de aprox. 1,300 pb en lugar de 914 pb, y el fragmento obtenido de T2laeAcons y T5laeAcons con la construcción pUAMTPlaeAcons tuvo un tamaño aprox. de 1,500 pb en lugar del tamaño esperado de 1,279 pb (Fig. 6-22), sugiriéndose en primer lugar se deba a que no se tomó en cuenta el *polilinker* integrado en medio del gen *laeA term* y el promotor *gpdA* y en segundo lugar que debido a que la secuencia de nucleótidos de ambos vectores no se tuvo en forma original y el promotor constitutivo (*PgpdA*) y el promotor para sintetizar fleomicina (*PpcbC*) utilizados para obtener los fragmentos, se obtuvieron en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/475161>), se pensó que no se están tomando en cuenta nucleótidos que existen de más en los vectores. Estos resultados indican la integración de éstas construcciones en las transformantes.

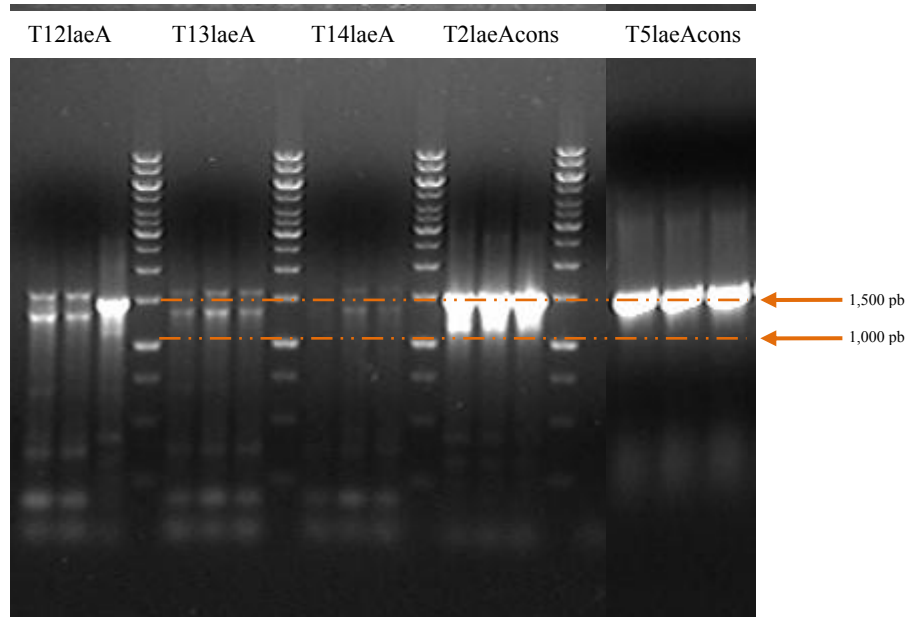


Fig. 6-23. Electroforesis que muestra fragmentos de PCR de las construcciones integradas en el ADN de las transformantes laeA y laeAcons.

7. DISCUSIÓN

El interés de este proyecto se centró en la amplificación del gen regulador global para la síntesis de metabolitos secundarios en *Aspergillus* sp., llamado *laeA*. Este gen se identificó a través de la complementación de una mutante de *Aspergillus nidulans* con esporulación normal pero con incapacidad para expresar el gen *afIR* que codifica el factor específico AfIR que regula la expresión de genes biosintéticos de esterigmatocistina. LaeA controla positivamente la expresión de 20-40% de la mayoría de las vías de metabolitos secundarios. LaeA parece estar conservada en hongos filamentosos, pero no está presente en *Saccharomyces cerevisiae*, un hongo carente de metabolitos secundarios (Perrin, *et al.*, 2007; Woo & Keller, 2004). El análisis de la secuencia del gen *laeA* y de la proteína codificada indica que es una proteína metiltransferasa, de localización nuclear y con un dominio de unión de S-adenosil-L-metionina (SAM). Aunque las funciones de LaeA aún no han sido caracterizadas totalmente, se especula que esta proteína está involucrada en la modificación de cromatina. De esta manera, un modelo de la regulación de *clusters* mediada por LaeA propone un papel en la represión heterocromatina. Las funciones de LaeA inician un proceso que convierte heterocromatina a eucromatina, por interacción con metilasas o desacetilasas que están asociadas con la heterocromatina (Keller *et al.*, 2005).

7.1 Obtención de ADN total de *A. terreus* y amplificación por PCR de *laeA* y *laeAcons*

El método de purificación empleado en este trabajo en la extracción del ADN genómico de *A. terreus*, fue fundamental para obtener buena integridad, tamaño molecular adecuado y pureza del ADN, para su posterior utilización en la amplificación por PCR de los fragmentos con el gen *laeA*. Un buen diseño de los oligos y hallar su temperatura óptima de anillamiento fue primordial para obtener el gen *laeA* (completo y cds) de tamaños adecuados. De igual manera, la utilización de *Vent* ADN polimerasa cuya fidelidad es de 5 – 15 veces mayor que la *Taq* polimerasa, fue esencial para que dichos fragmentos tuvieran menos errores de transcripción, que es necesario para que el gen *laeA* se exprese correctamente.

7.2 Clonación de *laeA* en vectores plasmídicos

Ya obtenidos los fragmentos de ADN y la amplificación de los vectores plasmídicos, se prosiguió a la clonación y transformación de *A. terreus*. Debido a que el gen *laeA* normalmente se expresa en la idiofase, no estaba claro si su expresión constitutiva (en el vector pAN52.1) podría causar problemas metabólicos en *A. terreus*. Así, se decidió probar la sobreexpresión de *laeA*: a) aumentando el número de copias del gen con su propio promotor (clonando en el vector pULC43; para dar la construcción pUAMTPlaeA) y b) a partir del promotor constitutivo del gen *gpdA* (integrado en el vector pAN52.1; para dar la construcción pUAMTPlaeAcons).

Las construcciones obtenidas se transformaron en *A. terreus* mediante la técnica de protoplastos, que es usualmente lograda en hongos filamentosos. El primer reporte de transformación en hongos filamentosos aparece en 1979 cuando el ADN fue introducido dentro de protoplastos de *Neurospora crassa*. Una variedad de métodos han sido explorados, la mayor parte basada en la preparación de protoplastos, sometiendo una suspensión celular a la acción de enzimas degradativas de la pared en un medio isotónico, precediendo la fusión de protoplastos y ADN en presencia de un agente inductor (polietilenglicol 50%) y finalmente la incubación para la regeneración de la pared celular y reversión a una célula de morfología normal (Prabha & Punekar, 2004). En este trabajo, se montó por primera vez las condiciones de transformación por protoplastos en *A. terreus*, ya que previamente no se había transformado este hongo en nuestro grupo de investigación. Así mismo, se obtuvo la concentración mínima inhibitoria de fleomicina en protoplastos, siendo de 160 µg/mL. Esta concentración al parecer es muy elevada, en comparación con concentraciones activas sobre la mayor parte de levaduras y hongos que van de 0.1 a 50 µg/mL (Hertzberg *et al.*, 1985), y fue debido a que se observaron algunas mutantes resistentes en un rango de 20 a 150 µg/mL.

Posteriormente, se prosiguió en la transformación de *A. terreus* mediante la resiembra en medio con fleomicina para evitar los heterocariones. Al respecto, usando este método de transformación se obtuvo un porcentaje de confirmación de las transformantes del 54% con la construcción pUAMTPlaeA (porcentaje obtenido de número de colonias viables por resiembra entre número de colonias iniciales) y de sólo 25% con la construcción pUAMTPlaeAcons. En esta última, la baja confirmación quizás está relacionada con la cotransformación, tal vez por la fusión de protoplastos y el tamaño desigual de los vectores (1,850 pb más en pUAMTPlaeAcons con respecto a pULC43), lo que impidió integrarse con la misma capacidad. Otro inconveniente de obtener pocas transformantes de laeAcons pudo ser la expresión constitutiva del gen *laeA* que pudo causar algún problema metabólico al estarse produciendo desde la trofófase y combinado con el tener que crecer con fleomicina.

En la transformación es posible lograr la recombinación genética definiendo por tal, a cualquier proceso que genere nuevas combinaciones de genes. Verdoes *et al.* (1995) mostraron que de transformantes obtenidas por cualquier método, las secuencias introducidas son integradas establemente en el genoma por recombinación homóloga o heteróloga. La recombinación heteróloga es un modo predominante de integración en hongos filamentosos; mientras que la integración homóloga llega a ser posible sólo cuando hay longitudes extensas de secuencias homólogas entre el vector y el genoma (en relación a levaduras o *E. coli*). En *A. terreus*, no se ha reportado la eficiencia de la recombinación homóloga. Sin embargo, Barrios *et al.* (2003) hacen notar que en las transformantes obtenidas el vector se integra en diferentes sitios en el genoma del hongo, por lo tanto, una simple selección de las mejores productoras entre ellas indicará los casos donde el gen se integró en un sitio adecuado neutro del cromosoma. Esta fue la estrategia utilizada en esta tesis, donde se preseleccionaron las transformantes por su producción en fermentación en cilindro de agar (FCA).

Un alto nivel de expresión de los genes de biosíntesis es logrado por la introducción de copias múltiples por la transformación, aunque aumentando en el número de copias frecuentemente conduce al incremento de los niveles de actividad de los genes introducidos, una correlación lineal no es usualmente observada, debido al afecto del sitio de integración y a las limitaciones del procesamiento post transduccional. De la misma manera, una característica de un sistema de expresión eficiente es el uso de promotores fuertes ó constitutivos, como el utilizado en nuestro trabajo como segunda estrategia (promotor constitutivo *gpd* de *A. nidulans*).

7.3 Transformación de *A. terreus* y selección de transformantes

7.3.1 Preselección de transformantes

El éxito de cualquier mejoramiento de la cepa depende en gran parte del número total de cultivos que podrían ser seleccionados con la mejor combinación de genes después de un tratamiento de transformación. Durante una selección de rutina por agentes antifúngicos, Kumar *et al.* (2000) observaron que la cepa *Neurospora crassa* es sensible a la forma activa de la lovastatina, la β -hidroxiácido, esta propiedad antifúngica fue explorada con el método de FCA para seleccionar mutantes de *A. terreus*, los cuales producen zonas de inhibición contra *N. crassa*, obteniendo un método rápido y sencillo para evaluar un gran número de aislados. Una modificación de este método (Baños *et al.*, 2009) fue utilizada en nuestro trabajo para la preselección de transformantes de ambas estrategias.

En esta tesis, con las 13 transformantes confirmadas de pUAMTPlaeA (*laeA* con su propio promotor) se realizó una preselección por producción de lovastatina en FCA. Seis de ellas mostraron producciones de lovastatina en el rango o similares (180 a 200 mg/mL) al de la parental (y controles como la parental con vector vacío), pero 7 presentaron niveles de producción superiores al de la parental (201 a 260 mg/mL). Estas 7 fueron evaluadas para producción en FS y en FL en la siguiente etapa. En relación a las transformantes con *laeA* con el promotor constitutivo (pUAMTPlaeAcons), las confirmadas fueron sólo 5, por lo que no se les preseleccionó y pasaron directo a la siguiente etapa.

7.3.2 Selección de transformantes en FS y FL

La producción de lovastatina de las transformantes preseleccionadas fue evaluada en el día 7 en FS y en FL. Un punto muy interesante es que, en FS todas las transformantes pUAMTPlaeA exhibieron niveles de producción superior al de la parental; con incrementos desde 5% hasta 47.4%). En contraste, en FL sólo 4 de estas transformantes presentaron incremento en la producción de lovastatina, obteniéndose fuertes disminuciones en las otras 3 (aproximadamente el 40%). El rango de variación en FL fue desde -54.8% a 89.2%.

En cuanto a las transformantes con promotor constitutivo (pUAMTPlaeAcons), sólo se obtuvieron 5 transformantes confirmadas, por lo que no se preseleccionaron, sino que todas se evaluaron en FS y FL. En este caso también, todas las transformantes fueron sobreproductoras en FS con incrementos desde 29.7% hasta 137.9%. En FL sólo 3 fueron sobreproductoras y 2 mostraron fuertes disminuciones (también alrededor del 40%); con rango de variación de -34.3% a 100.8%.

Finalmente, se observó en la evaluación de transformantes *laeA* que el porcentaje en los incrementos es mayor en FL que en FS, obteniendo la T14*laeA* como la mejor productora de lovastatina en FL de ambas estrategias. Mientras que en la evaluación de transformantes *laeA*cons es inverso, el porcentaje en los incrementos es mayor en FS que en FL, obteniendo la T2*laeA*cons como la mejor productora de lovastatina en FS de ambas estrategias.

La fisiología mostrada para hongos y otros microorganismos en fermentación en estado sólido (FS) no se conoce bien. Pero, muchas ventajas de FS son una consecuencia de la diferente fisiología mostrada por microorganismos en medio sólido, en relación a la presentada para la fermentación en líquido sumergido (FL). En relación con la producción de metabolitos secundarios en FS, una clara diferencia son los altos rendimientos en periodos cortos. Por otra parte, se han reportado casos en los que el metabolito secundario es producido solamente por FS aún cuando el organismo exhibe buen crecimiento en FL. Además, se ha demostrado que cepas sobreproductoras de FL no funcionan bien en FS, por lo que existe la necesidad de desarrollar cepas especiales en FS (Barrios-González *et al.*, 1993; Barrios-González & Mejía, 2007). Esto se confirmó con las transformantes obtenidas en esta tesis, donde las mejores productoras de lovastatina en FS no lo eran en FL, y viceversa, y no sólo eso, sino que tenían disminuciones importantes en el otro sistema de cultivo. Un ejemplo de esto es la transformante T2*laeA*cons que fue la mejor en FS, pero tuvo una disminución del 10.9% en FL. Otra observación importante, es que todas las transformantes seleccionadas de ambas estrategias tuvieron sólo incrementos en FS, esto se debe quizás a que el hongo en FS se adapta a la señalización mejor desde el inicio de su crecimiento, pero al evaluarlas éstas mismas en FL, tuvieron incrementos ó disminuciones, quizás porque el sitio de integración del gen *laeA* es más crítico para producir lovastatina en medio líquido y transduce la señalización con menos claridad afectando la expresión de *laeA*. Por lo que, la sobreexpresión de *laeA* siempre funciona bien para FS pero no para FL. Las razones moleculares y fisiológicas subyacentes al diferente comportamiento de los microorganismos en medio sólido no están actualmente entendidas. Se ha encontrado que los hongos contienen distintos genes que codifican para una misma clase de enzima y que estos genes equivalentes son regulados diferencialmente dependiendo del medio donde se encuentren. Estos hechos sugieren que, el hongo recibe señales que indican que está en uno u otro sistema de cultivo y que esto hace generar una expresión diferencial de genes que dan como resultado una fisiología diferencial (Hisada *et al.*, 2005).

7.4 Caracterización de transformantes

7.4.1 Cinéticas de producción

Con base en estos datos de la sección anterior, se seleccionaron, de las transformantes pUAMTPlaeA la T12, T13 y T14 y se evaluó su producción en forma más precisa, realizando cinéticas de producción y haciendo un análisis estadístico. Así, las mejores productoras de lovastatina, de este grupo, en FS fueron la T12 y T13 con producciones de 10.49 y 11.87 mg/gms respectivamente; lo cual representa incrementos de 49.26 y 68.78% con respecto a la producción de la parental. En FL la mejor productora de este grupo (y de todas) fue la T14 laeA con una producción de 1.39 mg/mL, con un incremento de 111%. La prueba de Tukey demostró que las diferencias fueron significativas ($p < 0.00001$).

De igual forma se hicieron cinéticas de las 2 transformantes seleccionadas que expresaron *laeA* desde un promotor constitutivo (pUAMTPlaeAcons). La mejor productora de este grupo (y de todas) en FS, fue la T2, con una producción de 16.781 mg/gms, representando un incremento de 138.64%. La prueba de Tukey demostró que las diferencias fueron significativas ($p < 0.00001$). En FL, la mejor productora fue la T5 con una producción de 1.281 mg/mL, y un 94.5% de incremento. Por otro lado, aunque en este trabajo se utilizaron las mismas condiciones y la misma cepa reportada por Baños *et al.* (2009) para ambos sistemas de cultivo, se obtuvieron producciones de lovastatina más bajas, en particular en FS, a los ya reportados. Esto se debe a la producción relativamente más baja de la parental utilizada. Esto puede deberse al uso de una parental de *A. terreus* TUB F-514 conservada en glicerol a -20°C por 4 años, lo cual redujo su capacidad de producción.

Estos resultados indican que el incremento de la dosis génica de *laeA* en *A. terreus* es un método eficiente de mejoramiento genético molecular de la producción de lovastatina en FS y también en FL, aunque las mejores transformantes no son las mismas para uno u otro sistema. De hecho, la estrategia propuesta parece más eficiente para generar cepas sobreproductoras para FS, ya que todas las transformantes seleccionadas muestran incrementos en la producción. Sin embargo, es probablemente más conveniente expresar *laeA* desde un promotor constitutivo para FS, ya que los incrementos exhibidos por estas transformantes (68.8% en promedio) son superiores a los incrementos de las transformantes de la otra estrategia (25.7% promedio).

Por otro lado, para FL el promedio de incrementos de las transformantes derivadas de ambas estrategias no es muy diferente (45 vs 43%). Sin embargo, tomando en cuenta que la mejor productora en FL proviene de la expresión de *laeA* con su propio promotor y de que fue más fácil (numerosas) obtener este tipo de transformantes, consideramos ligeramente más conveniente *laeA* expresado desde su propio promotor, para generar sobreproductoras para FL.

Desde un punto de vista básico, era muy importante determinar si el incremento del número de copias del gen *laeA* en *A. terreus* tuvo un efecto sobre la producción de lovastatina y no sobre el crecimiento. Es decir, demostrar que el incremento en la producción de lovastatina fue debido a una mayor producción específica y no a un mayor crecimiento. Los resultados demostraron que todas las transformantes seleccionadas para FS y las seleccionadas para FL muestran producciones específicas superiores a la de la parental.

En esta tesis se estableció una estrategia de mejoramiento genético molecular para generar cepas sobreproductoras especiales para FS, y se confirmó que éstas son diferentes a las sobreproductoras para FL. Actualmente distintos proyectos del laboratorio se enfocan en la identificación de las señales ambientales en cultivo sólido y sus vías de transducción que inducen los genes reguladores, factores de transcripción y los *clusters* de genes biosintéticos. Algunos resultados (Miranda-Labra *et al.*, 2007 y 2009) apoyan lo reportado por Baños *et al.* (2009) en cuanto a que la capacidad de contender con el estrés osmótico y oxidativo es importante para la producción de lovastatina en FS. Por otra parte, esto ha sido la base para algunos métodos de mutación y selección racional eficaces para aislar mutantes sobreproductoras especiales para FS (Baños *et al.* manuscrito en preparación).

En relación con el mejoramiento genético molecular, Campos *et al.* (2008), estudiaron la producción de penicilina de *P. crysogenum* en FS y FL. Los resultados mostraron que incrementar la dosis de todo el *clusters* de genes de penicilina es una eficiente estrategia de mejoramiento molecular para generar cepas sobreproductoras en FS y FL. Ya que obtuvieron transformantes, provenientes de una cepa de baja producción, con incrementos en la producción de penicilina en FS y FL de 67.3 y 28.3% respectivamente, y en transformantes, a partir de una cepa con alta producción, un incremento del 92.9% en FS y 158.4% en FL. Es importante notar que en ese trabajo la transformante de la cepa más cercana a la silvestre (Wis 54-1255), mostró un incremento en producción de penicilina mayor en FS que en FL.

Existen varios hallazgos importantes en esta tesis que no se habían reportado. En primer lugar, nunca se había sobreexpresado el gen *laeA* de *A. terreus* en él mismo. Otro es la utilización de dos estrategias para sobreexpresar *laeA* (con su propio promotor y un promotor constitutivo). Tampoco había sido reportada una medición cuantitativa (HPLC) de la producción de lovastatina, lo cual permitió evaluar con precisión el efecto de incrementar el número de copias de este gen. Otro aspecto novedoso es la comparación del efecto de ambas estrategias (para incrementar la expresión *laeA*) en FS y FL.

En relación a la sobreexpresión del gen *laeA*, Woo & Keller (2004) construyeron una cepa de *A. nidulans* con su gen *laeA* y el *cluster* parcial de genes de lovastatina proveniente de *A. terreus*, obteniendo incrementos importantes en la producción de penicilina y lovastatina. Donde la producción de monacolin J (intermediario de lovastatina) fue incrementado ~400% y niveles altos de penicilina fueron producidos en tiempos donde la cepa silvestre no mostraba actividad de penicilina. Finalmente se sobreexpresó el gen *laeA* de *A. nidulans* (bajo el

control del promotor inducible *alcA*) en *A. terreus*, lo cual condujo a un incremento de 400 a 700% en la producción de lovastatina. Es importante notar que en dicho trabajo la medición de los metabolitos secundarios fue semicuantitativa, realizada en placas de cromatografía en capa fina y la FL en matraz sólo se realizó hasta las 36 h de crecimiento. También, Kosalková *et al.* (2008), sobreexpresaron el gen *laeA* de *Penicillium chrysogenum*, en el plásmido pIBRC43 bajo el control de un promotor fuerte (*gdh* de *A. awamori*), pero obtuvieron sólo un 25% de incremento en la producción de penicilina.

7.4.2 Morfología

En el mismo trabajo de Kosalková *et al.* (2008), se obtuvieron mutantes nulas del gen *laeA* exhibiendo niveles drásticamente reducidos de penicilina y defectos en la pigmentación y esporulación. De manera interesante, nuestros resultados de sobreexpresión de *laeA* en *A. terreus* muestran cambios en la morfología con la aparición de surcos en las transformantes y mayor esporulación en algunas de ellas; sugiriendo que la expresión del gen *laeA* tiene cierta relación con el tipo de crecimiento (morfología colonial) y la esporulación. Esto parece no concordar con la vía de señalización donde interviene LaeA (ver Fig. 1-4), ya que éste es independiente pues está más debajo de la rama que lleva a los genes de esporulación. De hecho, el gen *laeA* fue descubierto buscando mutantes que habían perdido su capacidad de producir metabolitos secundarios, pero mantenía su capacidad de esporulación (Keller *et al.*, 2005). Sin embargo, Woo *et al.* (2005) presentaron resultados donde muestra que en *A. fumigatus* LaeA actúa como un regulador de expresión de genes que codifican para componentes conidiales tal como pigmentos e hidrofobinas y que contribuyen a su virulencia. Todo esto sugiere que debe haber otras vías en las que LaeA influencia la forma de crecimiento y la esporulación.

7.4.3 Integración de construcciones

Finalmente la confirmación de la presencia de las construcciones en las transformantes no se obtuvo de forma contundente; por la falta de la secuencia detallada de nucleótidos de los vectores pULC43 y pAN52.1. En el futuro se deberán comprobar por el método de Southern Blot, siendo este método más preciso. Por otro lado, también sería conveniente realizar Northern Blot para confirmar además que el incremento en la producción de lovastatina en las transformantes, se debe a una mayor expresión del gen *laeA*. Esto sería la consecuencia esperada del incremento de la dosis génica.

8. CONCLUSIONES

- El incremento de la dosis génica de *laeA* en *A. terreus*, es una eficiente estrategia de mejoramiento genético molecular, generando transformantes sobreproductoras para FS y otras para FL.
- En FS todas las transformantes de ambas estrategias mostraron incrementos en la producción de lovastatina, mientras que en FL hubo incrementos y disminuciones. Además la mejor productora de lovastatina en FS, no lo fue en FL, y viceversa, comprobando la fisiología distinta de cepas sobreproductoras para ambos sistemas.
- La morfología de las transformantes fue afectada por la sobreexpresión de *laeA*, observándose surcos en las colonias y más esporulación en algunas transformantes.

9. PERSPECTIVAS

Es importante caracterizar con mayor profundidad las mejores transformantes, en primer lugar evaluando mediante Southern Blot el número de copias introducidas. Después, se podría confirmar que el incremento en la dosis génica trajo como consecuencia un incremento en la expresión de *laeA*, con un análisis de Northern Blot. Asimismo, se podría ver si ese incremento trajo como consecuencia un incremento en la expresión de *lovE*, el factor específico transcripcional para los genes biosintéticos de lovastatina. Si no es así, sería conveniente sobreexpresar el gen *lovE*, ya que suponemos que potenciaría la sobreexpresión del gen *laeA*, ya que se considera que al inducir *laeA* se activa *lovE*, y este permite la transcripción de los genes de biosíntesis de lovastatina.

También sería interesante obtener nuevas transformantes con las mismas construcciones pero derivadas de una cepa liofilizada de *A. terreus*, comprobando previamente que no haya bajado su producción de lovastatina, es decir, que la cepa no se haya degenerado, para lograr transformantes con producciones de lovastatina más altas de las ya reportadas y con incrementos (si se logran) más elevados a los obtenidos en este trabajo. De igual manera, podría sobreexpresarse el gen *laeA* mediante un promotor inducible y ver si éste tiene alguna ventaja en comparación a la estrategias utilizadas anteriormente tanto en FS como en FL. Adicionalmente, sería interesante hacer la disrupción del gen *laeA* para confirmar su papel como regulador en la producción de lovastatina, y para saber si hay un efecto sobre la diferenciación morfológica en *A. terreus*.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Baltz, R. H.** (1999). Mutagénesis. in *Encyclopedia of Bioprocess technology: Fermentation, biocatalysis and separation*, edited by M.C. Flickinger & S.W. Grew. Wiley, New York. 307-311.
- Baños, G. J., Tomasini, A., Szakács, G. & Barrios-González, J.** (2005). Fisiología y producción de lovastatina de *A. terreus* en fermentación sólida en dos fases. VI Congreso de Biología Celular y Molecular de Hongos. 27-29 de Octubre. Morelia, Michoacán, México.
- Baños, G. J., Mejía, A., Garay, A. & Barrios-González, J.** (2007) Producción de lovastatina en fermentación sólida por mutantes resistentes a estrés oxidativo. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 25-29 de Junio. Morelia, Michoacán, México.
- Baños JG, Tomasini A, Szakács G, Barrios-González J** (2009) High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: an artificial inert support. *J Biosci Bioeng.* **108(2)** Doi: 10.1016/j.biosci.2009.03006
- Barrios-González, J. & Mejia A.** (1996). Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotechnol Annu Rev.* **2:85-121**.
- Barrios-González, J., Fernández, F. J. & Tomasini, A.** (2003). Microbial secondary metabolites production and strain improvement. *Indian J of Biotechnol.* **2:322-333**.
- Barrios-González, J. & A. Mejía.** (2007). Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites. In: Pandey A, Larroche C, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA (eds) *Current Developments in Solid-State Fermentation*. Chapter **14**: 262-296.
- Berdy, J.** (1980). Bleomycin type antibiotics. *Handbook of antibiotic compounds.* **4:459-491**.
- Betina, V.** (1995). Differentiation and secondary metabolism in some prokariotes and fungi. *Folia Microbiol.* **40(1): 51-67**.
- Campos, C., Fernández, J. F., Sierra, C. E., Fierro, F., Garay, A. & Barrios-González, J.** (2008). Improvement of penicillin yields in solid-state and submerged fermentation of *Penicillium chrysogenum* by amplification of the penicillin biosynthetic gene cluster. *World J Microbiol Biotechnol.* **24:3017-3022**.
- Chan, J. K., Moore, N. R., Nakashima, T. T., & Vederas, C. J.** (1983). Biosynthesis of mevinolin. Spectral assignment by double-quantum coherence NMR after high carbon-13 incorporation. *J Am Chem Soc.* **105:3334-3336**.
- Demain, A. L. & Fang A.** (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **69: 1-39**.
- Gervais, P., Molin, P., Grajek, W., & Bensoussan, M.** (1988). Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnol Bioeng.* **31:457-463**.
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A. & Cimerman. A.** (1993). *Pleurotus* fungi produce mevinolin, an inhibitor of HGM CoA reductase. *FEMS Microbiol Lett.* **133:333-338**.
- Hajjaj, H., Niederberger, P. & Duboc, P.** (2001). Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl and Env Microbiol.* **67(6):2596-2602**.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166:557-580**.

- Hendrickson, L., Davis, R. C., Roach, C., Nguyen, K. D., Aldrich, T., McAda, C. P. & Reeves, D. C.** (1999). Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: Characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem Biol.* **6**:429-439.
- Hertzberg, R.P., Caranfa, M.J. & Hecht, S.M.** (1985). DNA methylation diminishes bleomycins-mediated strand scission. *Biochem.* **24**:5285-5289.
- Hicks, K. J., Yu, J., Keller, P. N. & Adams, H. T.** (1997). *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FdaA Ga protein-dependent signaling pathway. *The EMBO Journal.* **16**(16):4916-4923
- Hisada, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y. & Akita, O.** (2005). Cloning and expression analysis of two catalase genes from *Aspergillus oryzae*. *J of Bioscience and Bioeng.* **99**(6):562-568
- Holmes, D. S. & Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal Biochem.* **114**:193-197.
- Keller, N. P., & Hohn, T.M.** (1997). Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol.* **21**:17-29.
- Keller, P. N., Turner, G. & Bennett, W.J.** (2005). Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol.* **3**: 937-946.
- Kennedy, J., Auclair, K., Kendrew, G. S., Park, C., Vederas, C. J. & Hutchinson, R.** (1999). Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science.* **284**:1368-1372.
- Kosalková, K., García-Estrada, C., Ullán, V. R., Godio, P. R., Feltrer, R., Teixeira, F., Mauriz, E. & Martín, J. F.** (2008). The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie.* doi:10.1016/j.biochi.2008.09.004. 1-12.
- Kumar, S. M., Kumar, M. P., Sarnaik, M. H. & Sadhukhan, K. A.** (2000). A rapid technique for screening of lovastatin-producing strains of *Aspergillus terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay. *J of Microbiol Methods.* **40**: 99-104.
- Larroche, D.** (1996). Microbial growth and sporulation behavior in solid state fermentation. *J Sci Ind Res.* **55**:408-423.
- Lehnka, P. K. & Lonsane, B. K.** (1994) Comparative titres location and properties of tannin acyl hydrolase produced by PKL 104 in solid-state, surface and submerged cultures. *Proc. Biochem.* **29**: 497-503.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.** (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- Manzoni, M., Bergomi, S., Rollini, M. & Cavazzoni, V.** (1999). Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnol Lett.* **21**:253-257.
- Manzoni, M. & Rollini, M.** (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biotechnol.* **58**:555-564.
- Miranda-Labra, R., Mejía, A., Garay-Arroyo, A. & Barrios-González, J.** (2007). Different expression of gene *sod1* (superoxide dismutase) in *A.terreus*, during solid-state and liquid fermentations. International Workshop on Oxidative Stress. Octubre, Cuautla, Mor. Mexico
- Miranda-Labra, R., Fierro, F., Gómez, L. & Barrios-González, J.** (2009). Un estado oxidativo intenso es necesario para la producción de lovastatina por *Aspergillus terreus*. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Junio, Acapulco Guerrero.

- Misiek, M., & Hoffmeister, D. (2007). Fungal genetics, genomics and secondary metabolites in pharmaceutical sciences. *Rev Planta Med.* **73**:103-115.
- Moore, R. N., Bigam, G., Chan, K. J., Hogg, M. A., Nakashima, T. T. & Vederas, C. J. (1985). Biosynthesis of the hypocholesterolemic agent mevillin by *Aspergillus terreus*. Determination of the origin of carbon, hydrogen, and oxygen by ¹³C NMR and mass spectroscopy. *J Am Chem Soc.* **107**:3694-3701.
- Morton, A. G. (1961). The induction of sporulation in mould fungi. *Proc R Soc Lond Biol Sci.* **153**:548-569.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology.* **155**: 335-350.
- Ooijkaas, L. P., Weber, F. J., Buitelaar, R. M., Tramper, J. & Rinzema A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnol.* **18**:356-360.
- Oropeza, J. M. A., Zagoya, D. J. C. & Durán, T. P. V. (2005). Las estatinas y su amplio espectro de efectos benéficos. *Reb.* **24** (2):37-38.
- Perrin, M. R., Fedorova, D. N., Bok, W. J., Cramer Jr, A. R., Wortman, R. J., Kim, S. H., Nierman, C. W. & Keller, P. N. (2007). Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. *PLoS Pathog.* **3**(4): 508-517.
- Polman, J.K. & Larkin, J.M. (1989). Purification of DNA from agarose gels. *Biotechnol Techn.* **3**:329-332.
- Prabha, V. L. & Punekar, N. S. (2004). Genetic transformation in Aspergilli: Tools of the trade. *Ind J of Biochem & Biophysics.* **41**: 205-215.
- Punt, P. J., Dingemans, M. A., Kuyvenhoven, A., Soede, R. D. M., Pouwels, P. H. & Van den Hondel, C.A.M.J.J. (1990). Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene, encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* **93**:101-109.
- Ramunas, B., Haiyin, H., Hui, Y., Yang, L. C. & Greenstein, M. (2006). Production of fungal antibiotics using polymeric solid supports in solid-state and liquid fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **33**(10):815-826.
- Robinson, T., Singh, D. & Nigam, P. (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl Microbiol Biotechnol.* **55**:284-289.
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Nueva York.
- Shimizu, K. & Keller, P. N. (2001). Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus*. *Genetics.* **157**:591-600.
- Smiley, K. L., Hensley, D. E. & Gadsdorf, H. J. (1976). Alpha-galactosidase production and use in a hollow-fibre reactor. *Appl Environ Microbiol.* **31**: 615.
- Specht, C. A., DiRusso, C. C., Novotny, C. P., & Ulrich, R. C. (1982). A method for extracting high-molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal. Biochem.* **119**:158-163.
- Szakács, G., Morovján G. & Tengerdy R. P. (1998). Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnol Lett.* **20**(4):411-415.

- Treiber, L. R., & Reamer, A. R.** (1989). Origin of monacolin L from *Aspergillus terreus* cultures. *J Antibiot.* **XLII**: 30-36.
- Verdoes, C. J., Punt, J. P. & Van den Hondel, J. J. C. A. M.** (1995). Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* **43**: 195-205.
- Verstrepen, K. J., Reynolds, T. B. & Fink, G. R.** (2004). Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol.* **2**:533-540.
- Woo, B. J. & Keller, P. N.** (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell.* **3**(2):527-535.
- Woo, B. J., Balajee, A. S., Marr, A. K., Andes, D., Fog, N. K., Frisvad, C. J., & Keller, P. N.** (2005). LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryotic Cell.* **4**(9): 1574-1582.
- Woo, B. J., Noordermeer, D., Kale, P. S. & Keller, P. N.** (2006). Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* **61**(6):1636-1645.
- Yelton, M. M., Hamer, J. E. & Timberlake, W. E.** (1984). Transformation de *Aspergillus nidulans* by using trpC plasmid. *P Natl Acad Sci U.S.A.* **81**:1470-1474.
- Yoshizawa, Y., Witter, J. D., Liu, Y. & Vederas, C. J.** (1994). Revision of the biosynthetic origin of oxygens in mevinoлин (lovastatin), a hypocholesterolemic drug from *Aspergillus terreus* MF 4845. *J Am Chem Soc.* **116**:2693-2694.
- Zhang, Y. Q., Wilkinson, H., Keller, N. P., & Tsitsigiannis, D.I.** (2005). Secondary metabolite gene clusters. *In Handbook of Ind Microbiology.* Ed. An, Z. 355–386.