



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**“Estudio de genes codificantes para enzimas policétido  
sintasa de la cepa fúngica antártica  
*Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**Vicente Edmundo Oliva Galleguillos**

Director del Seminario de Título:

Dra. Inmaculada Vaca Cerezo

Abril 2019  
Santiago – Chile



Abril 2019

Santiago – Chile  
ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE

### **INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr Vicente Edmundo Oliva Galleguillos**.

### **“Estudio de genes codificantes para enzimas policétido sintasa de la cepa fúngica antártica *Pseudogymnoascus* sp 131209-E2A-C5II-EB”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**Director Seminario de Título:**

\_\_\_\_\_

**Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión:**

\_\_\_\_\_

**Evaluador:**

\_\_\_\_\_

Santiago de Chile, .....

## BIOGRAFÍA



Nacido en la madrugada del 31 de enero de 1995, Vicente Edmundo Oliva galleguillos fue nombrado el segundo hijo de Jacqueline Ivonne Galleguillos Perez y Pedro Antonio Oliva Flores.

Distraído, callado y *cabeza de pollo* (como declara mi madre), crecí en un ambiente marcado por la innegable resiliencia de increíbles mujeres, entre ellas mi querida madre, mi incomparable tía Diome, mi loca prima Andrea, y mis dos abuelas, Ángela y Sofía, ambas mujeres fuertes como robles. Fueron ellas junto a mi hermano Ignacio quienes me enseñaron que se puede soñar, y quienes me dieron el valor para hacerlo.

Actualmente disfruto tanto la simpleza como complejidad de la biología, de los hongos, y de cómo sobrellevar a la vida en laboratorio sin perecer en el intento.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias Inmaculada por el permanente apoyo cada vez que tengo una idea, sea buena o no tan buena. Gracias María Inés por las peleas, risas y oportunos abrazos de confort. Gracias chiquillos del laboratorio por amenizar cada día como nadie más puede hacerlo. Gracias chiquillos de la USACH por hacerme sentir bienvenido. Gracias chicos del laboratorio de plantas por abrirme la puerta, aun cuando de seguro ya estaban cansados de hacerlo. Gracias a Maxi por ser "Maxi". Gracias a mis amigos del colegio y de la universidad que estuvieron, están, y deseo sigan estando, tanto en los momentos buenos como los difíciles...

En resumen, mis más profundos agradecimientos a cada una de las personas que me regalaron su sonrisa durante el desarrollo de esta tesis.

**Financiamiento:** Proyecto Fondecyt 1150894

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	vii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Metabolismo secundario en hongos filamentosos .....	1
Arquitectura génica del metabolismo secundario fúngico .....	2
Enzimas policétidos sintetas (PKSs) .....	4
Regulación de la síntesis de metabolitos secundarios en hongos filamentosos .....	8
<i>Genome Mining</i> .....	9
El metabolismo secundario del género fúngico <i>Pseudogymnoascus</i> .....	12
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	16
1 Material Biológico.....	16
1.1 Cepa fúngica .....	16
1.2 Bacterias.....	16
2 Fermentaciones .....	16
2.1 Medios de cultivo .....	16
2.2 Fermentaciones de la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB en diferentes medios de cultivo .....	17
2.3 Fermentaciones de la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB con el remodelador de cromatina 5-azacitidina .....	18
3 Extracción, análisis y tratamientos de ácidos nucleicos.....	19
3.1 Extracción de ADN genómico desde micelio.....	19
3.2 Enzimas.....	20
3.3 Purificación desde gel de agarosa .....	20
3.4 Extracción de ADN plasmidial.....	21
3.5 Extracción de ARN desde micelio .....	21
3.6 Generación de ADN complementario (ADNc) .....	22
3.7 PCR y PCR semicuantitativo .....	22

3.8 Plásmidos .....	24
4 Transformaciones .....	25
4.1 Transformación química de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	25
4.2 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> .....	26
4.3 Transformación de la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB mediante electroporación de conidias germinadas .....	26
5 Análisis químico de los caldos de las fermentaciones de la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB .....	28
<b>RESULTADOS</b> .....	30
1 Análisis bioinformático y búsqueda de genes codificantes para enzimas PKS en la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II- EB.....	30
1.1 Nuevo diseño de partidores a partir del análisis de genomas de hongos del género <i>Pseudogymnoascus</i> .....	31
1.2 Amplificación de fragmentos desde ADN genómico empleando partidores degenerados con especificidad a enzimas PKS .....	35
2 Análisis de la expresión de los genes codificantes para PKSs en la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB en diferentes medios de cultivo.....	40
3 Análisis de la expresión de los genes codificantes para PKSs y perfil de metabolitos en la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB con el remodelador de cromatina 5-Azacidina .....	43
4 Construcción de vector de silenciamiento para el gen <i>GymD</i> .....	50
4.1 Construcción plásmido pJL-D .....	50
4.2 Construcción de un cassette para resistencia a higromicina.....	53
4.3 Clonamiento del cassette pgdh-hph en el plásmido pJL-D .....	55
5 Transformación de la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB mediante electroporación de conidias germinadas .....	57
6 Análisis de la expresión del gen <i>GymD</i> en las cepas transformantes.....	59
<b>DISCUSIÓN</b> .....	61
Identificación y análisis de genes codificantes para enzimas PKS .....	62
Análisis de la expresión de los genes codificantes para PKSs en la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB .....	65
Atenuación del gen <i>GymD</i> en cepas transformantes del hongo <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB.....	72
<b>CONCLUSIONES</b> .....	74
<b>REFERENCIAS</b> .....	76

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para la fermentación de <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB .....	18
Tabla 2. Condiciones de fermentación adicionando el remodelador 5-azacitidina.....	18
Tabla 3. Partidores PCR y PCR-semicuantitativo. ....	23
Tabla 4. Plásmidos utilizados y construidos.....	24
Tabla 5. Partidores para la construcción del cassette de higromicina y el plásmido pJL-HD. ....	24
Tabla 6. Gradiente del método cromatográfico utilizado para analizar las muestras de los caldos de cultivo obtenidas durante las fermentaciones. ....	28
Tabla 7. Resultados del análisis por BLASTx de las secuencias de fragmentos de cuatro genes codificantes para enzimas del tipo PKS presentes en la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB.....	30
Tabla 8. Clusters de metabolitos que poseen una enzima del tipo PKS como enzima central identificados por antiSMAH en los genomas de <i>P. verrucosus</i> UAMH 10579. y <i>P. destructans</i> 20631-21. Análisis de los dominios de cada enzima PKS .....	32
Tabla 9. Porcentaje de identidad entre las secuencias aminoacídicas de las enzimas PKS de <i>P. verrucosus</i> y las de <i>P. destructans</i> (%). ....	33
Tabla 10. Porcentaje de identidad de las secuencias aminoacídicas de los dominios KS entre <i>P. verrucosus</i> y <i>P. destructans</i> (%). ....	33
Tabla 11. Resultados del análisis por BLASTx de la secuencia de Gym36.....	38
Tabla 12. Porcentaje de identidad de las secuencias aminoacídicas de los dominios KR identificados (%) .....	39
Tabla 13. Incremento de los niveles de transcrito de los genes codificantes para enzimas PKS en distintos medios en referencia a los obtenidos en medio CYA.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la arquitectura de un CGB.....	4
Figura 2. Diversidad estructural de los policétidos de origen fúngico .....	5
Figura 3. Esquema del mecanismo de síntesis de policétidos en enzimas iPKS del tipo I. ....	7
Figura 4. Estructuras de metabolitos aislados desde hongos del género <i>Pseudogymnoascus</i> .. ..	13
Figura 5. Arquitectura de los tipos de PKS y alineamiento de los fragmentos de PKS identificados en la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB.....	34
Figura 6. Resultados de amplificación por PCR con partidores LC1-LC2c y LC3-LC5c. ....	36
Figura 7. Confirmación del tamaño del fragmento inserto en plásmido pGEM-T correspondiente al fragmento amplificado de los partidores LC1-LC2c y LC3-LC5c... ..	37
Figura 8. Resultado del análisis por BLASTx de la secuencia nucleotídica de Gym36. ....	39
Figura 9. Fermentaciones de 10 días de cultivo de la cepa 131209-E2A-C5II-EB en diferentes medios de cultivo. ....	41
Figura 10. Electroforesis de ARN total y RT-PCR de los genes estudiados en las diferentes condiciones de cultivo .....	42
Figura 11. Niveles de transcrito relativo de los genes codificantes para enzimas PKS en diferentes medios de cultivo.....	42
Figura 12. Fermentaciones de 10 días de cultivo de la cepa 131209-E2A-C5II-EB en medio CYA y PDB con el remodelador de cromatina 5-azacitidina .....	44
Figura 13. Niveles de transcrito relativo de los genes codificantes para enzimas PKS en medio CYA y PDB con el remodelador de cromatina 5-Azacitidina.....	46
Figura 14. Cromatogramas a 254 nm de los caldos obtenidos al día 10 de fermentación con el remodelador 5-Azacitidina.....	47
Figura 15. Comparación de cromatogramas a 500 nm de distintas condiciones de cultivo de la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp 131209-E2A-C5II-EB.. ..	49
Figura 16. Espectro de UV-visible de algunos de los picos cromatográficos mayoritarios observados en el cromatograma a 500 nm entre los tiempos de retención 11 y 17.5 min de la condición de cultivo PDB 500µM de 5-azacitidina. ....	49
Figura 17. Amplificación del fragmento del gen GymD desde ADN genómico. ....	51



Figura 18. Digestión del plásmido pJL-D para confirmar la inserción del fragmento GymD .....	52
Figura 19. Esquema del plásmido PjL-D.....	52
Figura 20. Esquema del ensamble por recombinación (líneas punteadas) del promotor pgdh con el gen hph mediante la técnica de DNA assembler en el plásmido prs426..	53
Figura 21. Amplificación del gen hph y el promotor pgdh.....	54
Figura 22. Amplificación del cassette pgdh-hph.....	55
Figura 23. Purificación tras la digestión con KpnI y HindIII de los fragmentos para el ensamblaje del plásmido PjL-HD. ....	56
Figura 24. Digestión del plásmido PjL-HD para la confirmación del clonamiento del cassette de higromicina.....	56
Figura 25. Esquema del plásmido PjL-HD. ....	57
Figura 26. Germinación de conidias en medio CM.....	58
Figura 27. Confirmación de las cepas transformantes por amplificación del cassette de resistencia a higromicina.. ....	59
Figura 28. RT-PCR de las cepas transformantes T1, T2 y T4 para los genes GymD y GymC. ....	60
Figura 29. Estructura de la citosina y análogos.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia nuclear magnética de protones
ACP	Dominio proteína portadora de acilos
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
AT	Dominio acil transferasa
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CBG	Cluster de genes biosintéticos
CMeT	Dominio de Metilación
CoA	Coenzima A
D.O.	Densidad óptica
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
DH	Dominio deshidratasa
DMATS	Dimetilalil triptófano sintasa
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxiribonucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Dominio enoil reductasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HR	Altamente reductora
iPKS	Policétido sintasa iterativa
KR	Dominio ceto reductasa
KS	Dominio ceto sintasa
MAT	Malonil acetil transferasa
modPKS	Policétido sintasa modular
MS	Metabolito secundario
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NR	No reductora
NRPS	Sintetasa de péptidos no ribosomales
OSMAC	Una cepa muchos compuestos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PKS	Policétido sintasa
PR	Parcialmente reductora
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
TC	Terpeno Ciclasa

## RESUMEN

Los hongos filamentosos de ambientes extremos son fuentes promisorias de metabolitos secundarios de carácter novedoso. En particular, el género fúngico *Pseudogymnoascus*, que habita distintos ambientes fríos, entre ellos la Antártida, posee un metabolismo secundario poco explorado. En estudios previos de la cepa fúngica antártica *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB se identificaron los genes codificantes para enzimas policétido sintasa *GymB*, *GymC*, *GymD* y *Gym722*, de los cuales solo los dos primeros se expresaron fuertemente en las condiciones de cultivo ensayadas.

El objetivo de este trabajo fue identificar nuevos genes codificantes para enzimas policétido sintasa en la cepa *Pseudogymnoascus* sp 131209-E2A-C5II-EB, e identificar las condiciones de cultivo en las cuales se induce su expresión. Para encontrar estas condiciones de cultivo adecuadas se emplearon distintos medios de cultivo (aproximación OSMAC) y el remodelador de cromatina 5-azacitidina. Por último, se realizaron las primeras actividades para, mediante la técnica de ARN de interferencia, identificar el metabolito sintetizado por la ruta de biosíntesis de la que forma parte el gen *GymD*.

En resumen, en este trabajo se identificó un nuevo gen codificante para una enzima policétido sintasa, al cual se denominó *Gym36*. Por otro lado, mediante la aproximación OSMAC, se identificó que el medio PDB es donde se obtienen mayores niveles de inducción de manera generalizada de los genes estudiados (a excepción de *Gym722* que se mantuvo sin expresión). La adición del remodelador de cromatina 5-azacitidina no logró inducir la expresión de los genes estudiados, pero si se observó que la adición

de dimetilsulfóxido logró alterar positivamente los niveles de expresión de estos. Finalmente, por electroporación de conidias germinadas, se logró obtener una cepa transformante de la cepa en estudio con el gen *GymD* atenuado. Como trabajo futuro, se espera que al contar con un mayor número de cepas atenuantes se pueda identificar el metabolito sintetizado por la ruta de biosíntesis de la que forma parte el gen.

## ABSTRACT

Filamentous fungi from extreme environments are a promising source of novel secondary metabolites. In particular, fungal genus *Pseudogymnoascus*, which inhabits different cold environments, including Antarctica, has a secondary metabolism that has been poorly explored. In previous studies of the Antarctic fungal strain *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB the genes coding for polyketide synthase enzymes *GymB*, *GymC*, *GymD* and *Gym722* were identified, of which only the first two were strongly expressed in the tested culture conditions.

The objective of this work was to identify new coding genes for polyketide synthase enzymes in the strain *Pseudogymnoascus* sp 131209-E2A-C5II-EB, and to identify the culture conditions in which their expression is induced. To find these suitable culture conditions, different culture media (OSMAC approach) and the 5-azacitidine chromatin remodeler were used. Finally, the first activities were carried out to identify, through the RNA interference technique, the metabolite synthesized by the biosynthesis pathway to which the *GymD* gene belongs.

In summary, in this work it was identified a new gene coding for a polyketide synthase enzyme, named *Gym36*. On the other hand, through the OSMAC approach, it was found that the PDB medium is where the highest levels of induction are obtained in a generalized manner of the genes studied (with the exception of *Gym722* that remained silent). The addition of the chromatin remodeler 5-azacitidine failed to induce the expression of the genes studied, but it was observed that the addition of dimethylsulfoxide was able to positively alter the expression levels of these. Finally, by electroporation of germinated conidia, it was possible to obtain a transformant strain of

the studied strain with the *GymD* gene attenuated. As future work, it is expected that having a greater number of attenuating strains, will allow the identification of the metabolite synthesized by the biosynthesis pathway of which the gene belongs.

## INTRODUCCIÓN

### **Metabolismo secundario en hongos filamentosos**

La relación forjada entre la humanidad y los metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos a través de la historia ha tenido altos y bajos: desde el descubrimiento del primer antibiótico de amplio espectro producido por un hongo del género *Penicillium*, la penicilina, considerada la “droga maravilla” de la segunda guerra mundial (Lobanovska & Pilla, 2017), hasta el evento de intoxicación de una gran número de pavos en granjas de Inglaterra en el año 1960, debido a la ingesta de alimento contaminado con el hongo *Aspergillus flavus* que dio paso a la identificación de la aflatoxina, un metabolito altamente tóxico y carcinogénico (Sargeant & cols., 1961). Dada la importancia para el ser humano de los metabolitos secundarios fúngicos, el trabajo para la búsqueda e identificación de nuevas moléculas sintetizadas por estos organismos no ha cesado hasta el día de hoy.

Dentro del taxón fúngico, los metabolitos secundarios (MSs) o productos naturales, son sintetizados principalmente por hongos filamentosos pertenecientes al filo de los ascomicetes y su síntesis deriva de las vías del metabolismo central o primario. Los MSs son, en general, moléculas de bajo peso molecular cuya función radica en proporcionar alguna ventaja para el crecimiento del hongo en el ambiente en el cual se encuentra, por lo que en condiciones de crecimiento de laboratorio son considerados como dispensables (Keller, 2018). Este conjunto de moléculas posee un alto grado de heterogeneidad estructural, disponiendo de una gran variedad de arreglos y grupos funcionales que confieren la actividad biológica al metabolito. Entre los años 1993 y 2001 se estima que se aislaron más de 1500 MSs de origen fúngico, de los cuales más

de la mitad disponen de actividad antibacteriana, antifúngica o antitumoral (Peláez, 2005). Este gran conjunto de metabolitos se clasifica en grupos según su origen biosintético. Entre ellos, los más predominantes corresponden a: i) Policétidos, provenientes de la condensación de múltiples unidades de ácidos carboxílicos de cadena corta (ej: aflatoxina B1); ii) Péptidos no ribosomales, provenientes de la condensación de aminoácidos tanto proteinogénicos como no proteinogénicos (ej: penicilina G); iii) Terpenos, sintetizados a partir de unidades de isopreno (ej: carotenoides); iv) Alcaloides, provenientes de moléculas con grupos del tipo indol en su estructura (ej: communesina B). Algunos MSs son híbridos entre policétidos y péptidos no ribosomales (ej: equinocandinas), o entre policétidos y terpenos (ej: fumagilinas) (Brakhage, 2012). (Keller, 2018)

### **Arquitectura génica del metabolismo secundario fúngico**

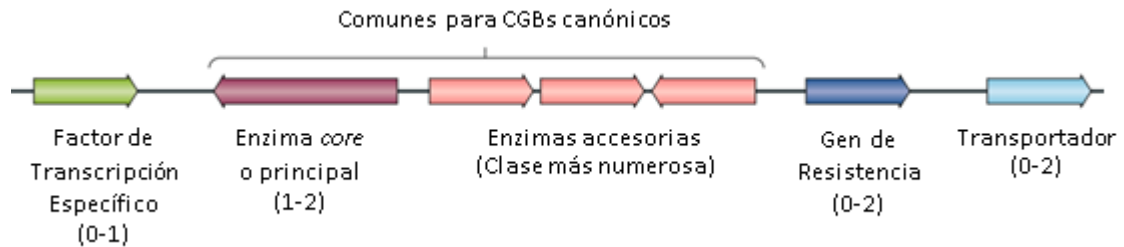
Los genes involucrados en la síntesis de un determinado metabolito secundario se localizan de manera contigua en el genoma, lo cual se denomina un *cluster* de genes biosintéticos (CGB). Esta disposición tiende a conservarse a través de la evolución, a pesar de poder sufrir re-arreglos internos, viéndose facilitada la transferencia horizontal del conjunto de genes que comparten como función la síntesis del metabolito (Khaldi & cols., 2008). Los CGBs suelen localizarse en regiones subteloméricas de los cromosomas, las cuales constituyen un lugar propicio para procesos de evolución adaptativa, ya que en ellas ocurren fenómenos como la recombinación alélica, inversiones, deleciones parciales y translocaciones (Pfannenstiel & Keller, 2019). Por otro lado, el número de CGBs que se encuentran en el genoma de cada especie es variable. Por ejemplo, al analizar los genomas de 19 especies de cepas del género



*Aspergillus* el número de CGBs está en el rango de 21-66 (de Vries & cols., 2017). Sin embargo, hay que indicar que el número de *clusters* identificados está restringido por la capacidad de predicción de los algoritmos utilizados en conjunto con las bases de datos disponibles (Medema & cols., 2011; Khaldi & cols., 2010).

Entre los componentes básicos de un CGB se encuentra la enzima principal o *core* (1 o 2 por *cluster*). Estas enzimas sintetizan el esqueleto del metabolito y por ende definen la clase a la que pertenece. Así, los policétidos son sintetizados por policétidos sintetasas (PKSs), los péptidos no ribosomales por sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPSs), los terpenos por terpeno ciclasas (TCs), y los alcaloides de tipo indol son sintetizados por dimetilalil triptófano sintetasas (DMATSS). Acompañando a la enzima principal se encuentran enzimas accesorias, de número variable. Estas enzimas tienen como función modificar el esqueleto del metabolito, alterando las características fisicoquímicas de la molécula mediante reducciones, metilaciones, ciclaciones, oxidaciones, entre otros. La cantidad de genes contenidos en un *cluster* varía desde 2 hasta más de 20 genes, donde los más pequeños contiene solo la enzima principal y unas pocas enzimas accesorias, mientras que los *clusters* de mayor tamaño también pueden poseer genes codificantes para transportadores (de sustratos o del metabolito), genes de resistencia en el caso de que dicho metabolito genere toxicidad y/o un gen codificante para un factor de transcripción específico para el *cluster* (Figura 1) (Keller, 2018). El límite que define la región que compone el *cluster* se establece experimentalmente mediante la generación de pérdidas de función de los genes candidatos a formar parte del *cluster*, Por tanto, se entiende que son parte del *cluster*

todos aquellos genes que, al perder su función, se observe una variación del fenotipo asociado a la síntesis de metabolito.



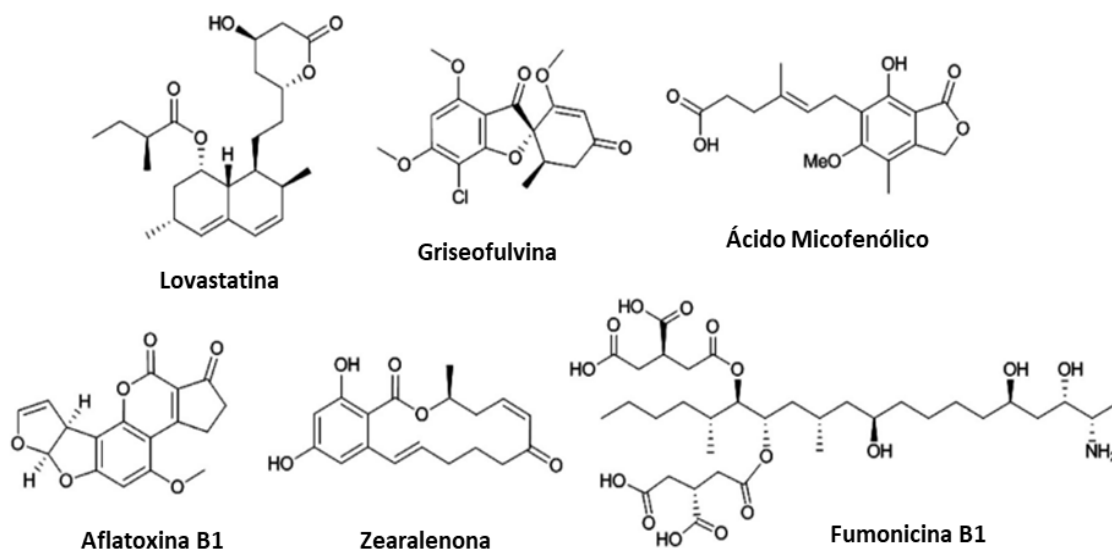
**Figura 1. Esquema de la arquitectura de un CGB.** Cada CGB está compuesto al menos por una enzima principal (PKS, NRPS, TC o DMATS) la cual define la naturaleza del metabolito y la estructura base que luego será modificada por las enzimas accesorias. Algunos CGB contienen genes codificantes para conferir resistencia frente a posible la toxicidad de metabolito, transportadores de precursores o del metabolito, y/o un factor de transcripción específico para el *cluster* (Modificado desde Keller 2018).

### Enzimas policétidos sintasas (PKSs)

El grupo de MS de origen fúngico mayormente caracterizado corresponde al de los policétidos. Entre ellos se encuentran la lovastatina, agente regulador de los niveles de colesterol, el antifúngico griseofulvina, el inmunosupresor ácido micofenólico y múltiples micotoxinas como las fumonisinas y zearalenonas entre otras (Figura 2) (Chooi & Tang, 2012).

Los CGBs que poseen como enzima principal una enzima del tipo PKS son los más abundantes dentro de los genomas fúngicos, y la conservación y modularidad de los dominios de esta clase enzimática facilita su identificación y estudio. Las enzimas PKS se clasifican en tres clases, PKS tipo I, tipo II y tipo III. Las PKS tipo I son megasintasas en donde distintos dominios catalíticos se yuxtaponen en una sola cadena polipeptídica. Las enzimas PKS del tipo I además se clasifican en dos sub-clases, de tipo iterativas (iPKS) o tipo modulares (modPKS). Las enzimas iPKS catalizan reacciones en distintos

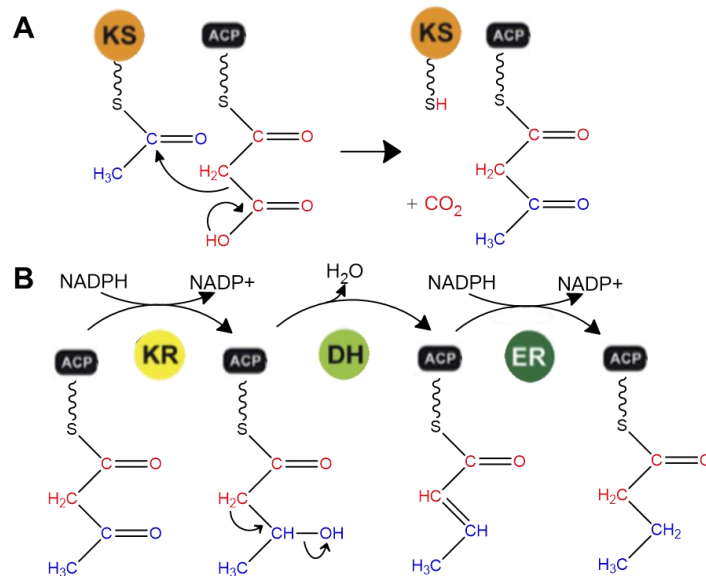
ciclos sobre una misma molécula para su elongación y modificación, mientras que las modPKS solo catalizan una ronda de reacciones y posteriormente la molécula es liberada y puede ser objeto de modificación por otras enzimas. Las enzimas PKS del tipo I pueden ser encontradas tanto en hongos, como bacterias y protozoos (Keatinge-clay, 2012). Las enzimas PKS del tipo II catalizan reacciones de manera iterativa al igual que las iPKS, pero a diferencia de las del tipo I, presentan sus dominios funcionales disociados en polipéptidos monofuncionales independientes que conforman complejos proteicos del tipo heterodimérico, y son solo encontradas en bacterias. Por último, las enzimas PKS del tipo III o del tipo chalcona sintasa son complejos proteicos del tipo homodimero, conformados por subunidades que contienen los dominios funcionales, catalizan reacciones de manera iterativa y son encontradas tanto en hongos, como en plantas y bacterias (Shimizu & cols., 2017; Smith & Tsai, 2007).



**Figura 2. Diversidad estructural de los policétidos de origen fúngico.** En la imagen se observan las estructuras de diversos policétidos donde se aprecia que su síntesis se basa en la condensación de una cadena de átomos de carbono la cual posteriormente es sustrato de diversas modificaciones iterativas (leer más abajo).

Las enzimas PKS fúngicas corresponden en un mayor porcentaje a las del tipo I, por lo que es en donde se ha centrado la mayor parte del estudio de los dominios catalíticos que conforman estas enzimas. Los dominios que todas las enzimas PKS del tipo I tienen en común son el dominio ceto sintasa (KS), dominio acil transferasa (AT) y dominio portador de acilos (ACP), mientras que existen otros dominios como el dominio ceto reductada (KR), dominio deshidratasa (DH), dominio enoil reductasa (ER) y dominio de terminación o liberación (TD o TE respectivamente), los cuales pueden, como no, estar presentes. El mecanismo de síntesis del esqueleto del policétido se puede resumir de la siguiente forma: 1) El dominio KS es acilado mediante el ataque de una cisteína reactiva, presente en el dominio, hacia un grupo acilo que este conformando una estructura del tipo tioéster con un dominio ACP (acil-ACP). 2) El dominio AT selecciona una unidad extensora como un grupo malonil proveniente de una molécula de malonil-coenzima A (malonil-CoA), y carga el dominio ACP con él. 3) El dominio ACP cargado se aproxima al dominio KS cargado, el cual cataliza una condensación descarboxilativa que termina por elongar el policétido, que termina anclado al dominio ACP. 4) El dominio ACP posteriormente transporta la cadena policetídica a dominios con funciones modificadoras, como los dominios KR, DH y ER, los cuales catalizan la reducción de un grupo ceto a un  $\beta$ -alcohol, deshidratasa de este grupo alcohol a un  $\alpha,\beta$  enoil insaturado, y reducción del enlace doble a una cadena de carbonos saturada, consecutiva y respectivamente (Figura 3). 5) En enzimas PKS del tipo iterativo el dominio ACP transporta posteriormente la cadena policetídica modificada al dominio KS, y repite el ciclo cargando una nueva unidad extensora en el dominio ACP. De esta manera la cadena es alargada hasta que pasa a ser sustrato de un dominio liberador de cadena TD o TE, el cual liberará la cadena o la traspasará a otro dominio río abajo en la ruta

biosintética, respectivamente. (Keatinge-clay, 2012). El hecho de que posean o no dominios reductores permite a su vez clasificar las PKSs según su naturaleza reductora en los tipos altamente reductoras (HR), parcialmente reductoras (PR) y no reductoras (NR). Las enzimas PKS NR carecen de los dominios KR, DH y ER, las enzimas PKS PR poseen el dominio KR y pueden poseer además el dominio DH, y por último las enzimas HR poseen los tres dominios simultáneamente. Otro dominio que puede opcionalmente estar presente es el dominio de metilación (CMeT), el cual cataliza la metilación de un carbono  $\alpha$  en la cadena policetíidica naciente.



**Figura 3. Esquema del mecanismo de síntesis de policétidos en enzimas iPKS del tipo I.** Reacciones netas catalizadas por los residuos presentes en cada dominio de la enzima PKS (no mostrados). En flechas negras se muestra parte del flujo de electrones. A: Ejemplo de una condensación descarboxilativa catalizada por el dominio KR entre un grupo acetilo y un grupo malonilo anclados a los dominios KS y ACP, respectivamente (mecanismo común en toda enzima PKS iterativa del tipo I). Como resultado se obtiene la extensión del grupo acetilo (azul) en dos átomos de carbono y la liberación de un átomo de carbono como  $\text{CO}_2$ , provenientes del grupo malonilo (rojo). B: Reacciones modificadoras catalizadas por los dominios opcionales KR, DH y ER. Las reacciones reductoras catalizadas por los dominios KR y ER utilizan NADPH como dador de electrones. La reacción de deshidratación conlleva la liberación de una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ .

## **Regulación de la síntesis de metabolitos secundarios en hongos filamentosos**

En hongos filamentosos la expresión de los genes que conforman un CGB se encuentra co-regulada, lo cual es clave para poder llevar a cabo la síntesis completa del metabolito en el momento indicado. En este sentido, un CGB suele estar regulado en concordancia con la función ecológica que cumple el metabolito sintetizado, es decir, el hongo al sentir determinado estímulo sintetizará una molécula cuya función biológica se encuentre relacionada con una respuesta frente a dicho estímulo. Por ejemplo, en el hongo fitopatógeno *Fusarium graminearum* durante el periodo de colonización de la planta que infecta, se induce la expresión del CGB para la síntesis de tricoceno, un factor de virulencia (Lysøe & cols., 2011).

En cuanto a los mecanismos de regulación de CGBs en hongos filamentosos se han descrito mecanismos llevados a cabo tanto por reguladores específicos como por reguladores globales. Los reguladores específicos corresponden a factores de transcripción presentes dentro del *cluster*. Aproximadamente, un 50% de los CGBs poseen un factor de transcripción específico, los cuales son en su mayoría proteínas del tipo dedos de Zinc C6 que reconoce secuencias palindrómicas en los promotores de los genes del *cluster* (Fernandes & cols., 1998). Por otro lado, los reguladores globales pueden regular más de un CGB y además regular genes cuya función no corresponde a la síntesis de metabolitos secundarios. Este tipo de regulador actúa a nivel epigenético alterando el perfil de modificaciones tanto de histonas como en el ADN y, por ende, modificando el estado de compactación de la cromatina (Brakhage, 2013).

El CGB de la micotoxina esterigmatocistina en *Aspergillus nidulans* es uno de los *cluster* más estudiado a nivel regulatorio. En este *cluster* está presente el factor de transcripción específico AfIR el cual, al interactuar con la proteína AfIS, induce la expresión de los genes del *cluster*. A su vez, la expresión del regulador AfIR está inducida por el factor de transcripción del tipo cremallera de leucina RsmA, el cual se encuentra codificado fuera del *cluster*, y regula tanto la síntesis de la esterigmatocistina, como la de la aspertecina, otro metabolito secundario, cuyas enzimas de biosíntesis se encuentran en otro CGB (Yin & cols., 2012). Paralelamente, este CGB también es regulado por el regulador global LaeA, el cual forma parte del complejo velvet. Este complejo proteico es necesario para la inducción de la síntesis de esterigmatocistina en la fase estacionaria de crecimiento, lo cual sucede mediante la eliminación de la marca epigenética MeH3K9 de las histonas presentes en la región del *cluster*, pasando de un estado de heterocromatina a eucromatina (Albright & cols., 2015). Por otro lado, la interacción del hongo con otros hongos y/o bacterias es capaz de inducir la expresión del *cluster* mediante la enzima acetiltransferasa de histonas GcnE, la cual es miembro del complejo de acetiltransferasas de histonas SAGA-ADA (Nützman & cols., 2011). A través de este ejemplo se observa que la regulación de un solo *cluster* puede comprender una red compleja de interacciones, de las cuales para muchas aún no se conocen los mecanismos moleculares exactos que las componen.

### **Genome Mining**

La identificación de nuevas moléculas con potencial uso farmacológico o industrial es el objetivo principal de una parte importante de la investigación que actualmente es realizada en hongos filamentosos. El método clásico de identificación y caracterización

de los metabolitos secundarios comprende el aislamiento y cultivo de la cepa fúngica en estudio, seguido de una extracción con solventes orgánicos desde el caldo de cultivo y/o micelio, el fraccionamiento de estos extractos mediante diferentes técnicas cromatográficas para la obtención de compuestos puros, y finalmente la elucidación de la estructura química del compuesto aislado. A pesar de haber permitido la identificación de una gran variedad y cantidad de compuestos, la principal desventaja de este método es la alta probabilidad de re-aislamiento de compuestos ya conocidos, debido principalmente a la falta de guía durante el proceso de fraccionamiento y purificación.

En los últimos años, a través del análisis bioinformático de un creciente número de genomas disponibles de hongos, se han desarrollado múltiples algoritmos los cuales permiten predecir, mediante la identificación de los dominios característicos, el potencial metabólico para la producción de policétidos en estos microorganismos (Medema & cols., 2011). Además, de este análisis bioinformático se destacan dos resultados importantes adicionales:

1.- Gran parte de los genes que conforman los *clusters* biosintéticos no se expresan en las condiciones de cultivo habitual de laboratorio, impidiendo así la obtención y caracterización de sus productos mediante las técnicas clásicas anteriormente mencionadas. Estos *clusters* son denominados *clusters* silentes.

2.- Una muy baja proporción de los *clusters* biosintéticos conocidos son conservados dentro de las especies fúngicas, indicando que la producción de metabolitos secundarios en hongos posee un carácter especie-específico (Larsen & cols., 2005).



Considerando además que, de acuerdo a estimaciones recientes el 95% del total de especies fúngicas se encuentran no descritas (Blackwell, 2011), el potencial de descubrir nuevos compuestos a partir de estas especies no descritas es enorme. Para explotar este gran potencial es necesario desarrollar técnicas que permitan identificar los productos finales de cada *cluster* biosintético de una determinada especie fúngica, tanto los que se expresan como los que no se expresan en condiciones estándar de laboratorio. A este proceso se le ha denominado *Genome Mining*, el cual se define como “el empleo de un conjunto de métodos y/o técnicas químicas y de biología molecular para el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios y los elementos génicos involucrados en su biosíntesis, a partir de una base bio-informática” (Archer & Dyer, 2004).

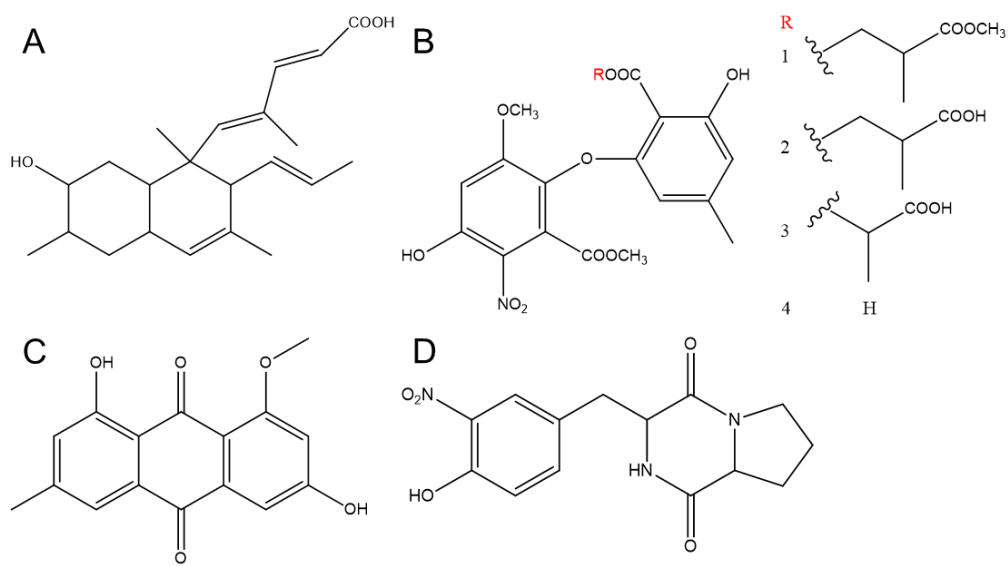
De acuerdo a lo anterior, gran parte del potencial metabólico de los hongos filamentosos reside en los CGBs silentes. Para poder inducir la expresión de los *clusters* silentes de hongos filamentosos, se han desarrollado múltiples estrategias. Entre ellas se encuentran: 1) el co-cultivo, en la cual la cepa fúngica se cultiva con otra cepa fúngica o bacteriana esperando que esta interacción induzca la expresión de un determinado CGB; 2) Aproximación por OSMAC (“Una cepa y múltiples compuestos”, por sus siglas en inglés), en la cual se varían las condiciones de cultivo (fuentes de carbono/nitrógeno, pH, temperatura, concentración de sales, oxigenación, entre otros) para poder simular posibles escenarios donde la cepa sintetice determinados metabolitos; 3) Uso de agentes remodeladores del estado de compactación de la cromatina, principalmente mediante la inhibición de las enzimas encargadas de estos procesos y/o expresión heteróloga del CGB en un huésped apto (Gross, 2007; Fisch & cols., 2009).

## **El metabolismo secundario del género fúngico *Pseudogymnoascus***

Los hongos del género *Pseudogymnoascus* se caracterizan por habitar en ambientes fríos. Por años, ha habido una importante confusión entre este género y el género *Geomyces*. Minnis y Lindner abordaron este problema taxonómico realizando un exhaustivo análisis filogenético a aproximadamente sesenta cepas descritas inicialmente como pertenecientes a ambos géneros. Como uno de los resultados principales, determinaron que se podía establecer la existencia de 5 especies tipo del género *Pseudogymnoascus*: *P. verrucosus*, *P. destructans*, *P. pannorum*, *P. roseus* y *P. appendiculatus* (Minnis & Lindner, 2013). Interesantemente, hasta el momento se encuentran disponibles en las bases de datos públicas los genomas de tres de estas especies: *P. verrucosus*, *P. destructans* y *P. pannorum*

En este contexto, el género *Pseudogymnoascus* ha sido muy poco estudiado químicamente. Concretamente, solo se han reportado dos trabajos con la descripción de metabolitos secundarios aislados desde cepas del género *Pseudogymnoascus*. En el primero ellos (Parish & cols., 2009), se logró aislar un derivado de cis-decalina el cual fue denominado pannomicina desde una cepa que fue identificada como *Geomyces pannorum*. Los datos taxonómicos aportados por Minnies & Lindler (2013) mencionados anteriormente, sugieren que esta cepa pertenecería al género *Pseudogymnoascus* (siendo por tanto *P. pannorum*), por lo que a efectos de antecedentes se considera que la pannomicina es un metabolito producido por el género *Pseudogymnoascus*. El otro trabajo fue realizado por nuestro grupo de investigación. En él se describe el aislamiento e identificación de cuatro compuestos nuevos derivados del ácido astérrico con un inusual grupo nitro en su estructura, y dos metabolitos ya descritos anteriormente, questin y piriculamida desde una cepa antártica del género *Pseudogymnoascus* que no

pudo ser identificada a nivel de especie (Figuroa & cols., 2014) (Figura 4). Por último, es necesario señalar que en los trabajos más recientes que se han publicado sobre el metabolismo secundario de cepas fúngicas aisladas desde ambientes fríos (incluyendo cepas de *Pseudogymnoascus*), solo se ha realizado la bioprospección de actividades biológicas a partir de los extractos orgánicos. Entre las actividades ensayadas destacan: actividad antimicrobiana, antitumoral, antioxidante y producción de pigmentos (Wentzel & cols., 2019; Purić & cols., 2018; Henríquez & cols., 2014).



**Figura 4. Estructuras de metabolitos aislados desde hongos del género *Pseudogymnoascus*.** A: Pannomicina; B: Derivados del ácido astérico (1-4); C: Questin; D: Piriculamida.

Actualmente, en el Laboratorio de Química Microbiológica de la Facultad de Ciencias, se investiga el potencial metabólico de la cepa fúngica antártica denominada *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB (Henríquez & cols., 2014). Esta cepa destacó sobre otras por que los extractos de su caldo de cultivo, presentaban actividad tanto antimicrobiana (ensayos de difusión en agar), como antitumoral (ensayos en disco

de papa), y porque además poseía un perfil metabólico de <sup>1</sup>H-RMN interesante en cuanto a variedad de grupos funcionales, indicado por un alto número de picos en la región de campo bajo.

Desde un punto de vista genético, hasta el momento, se han conseguido identificar desde ADN genómico de esta cepa, cuatro fragmentos candidatos a formar parte de genes que codifican para enzimas PKS, los cuales han sido denominados *GymB*, *GymC*, *GymD* y *Gym722*. Los primeros tres fueron identificados mediante el diseño de partidores específicos a partir de secuencias en regiones conservadas de genes codificantes para enzimas PKS, predichas en los genomas de las cepas *Pseudogymnoascus destructans* 20631-21 (GenBank LAJJ000000000.1), *Pseudogymnoascus pannorum* M1372 (GenBank AYKR000000000.1), *Pseudogymnoascus* sp VKM-F4513 (FW-928) (GeneBank JPJW000000000.1), *Pseudogymnoascus* sp VKM-F4281 (FW-2241) (GeneBank JPJV000000000.1) (Vega, 2018). El fragmento *Gym722* fue amplificado utilizando los partidores degenerados de la serie Lc1-Lc2c (Bingle & cols., 1999). Por otro lado, en las condiciones de cultivo que se emplean habitualmente en el laboratorio se ha comprobado que, al comparar sus perfiles de expresión mediante la técnica de RT-PCR, dos de estos genes que codifican para PKSs se expresan con intensidad (*GymB* y *GymC*), uno de forma tenue (*GymD*) y para el otro no se observaba expresión (*Gym722*) (Vega, 2018; Sacristán, 2017).

Al solo conocer cuatro de los posibles genes codificantes para enzimas PKS en la cepa en estudio, se estima que debe existir un número mayor de genes codificantes para enzimas PKS no identificadas. Por otro lado, al solo estar expresándose fuertemente dos de estos, las condiciones de cultivo no son óptimas para el estudio del potencial metabólico de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB.

A partir de este contexto, con el objetivo último de aumentar el número de genes codificantes para enzimas PKS identificados, e identificar los metabolitos sintetizados por estas enzimas es que se establecen los siguientes objetivos para este trabajo:

**Objetivo General:**

Estudiar el potencial metabólico para la producción de policétidos de la cepa antártica *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB mediante *genome mining*

**Objetivos Específicos:**

1.- Identificación de genes codificantes para enzimas PKS en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB.

2.- Análisis e inducción de la expresión de los genes codificantes para enzimas PKS identificados utilizando diferentes medios de cultivo y el remodelador de cromatina 5-azacitidina.

3.- Obtención de una cepa transformante atenuada en la expresión de uno de los genes codificantes para enzimas PKS, para la identificación del metabolito sintetizado por esta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1 Material biológico

#### 1.1 Cepa fúngica

En el laboratorio de Química Microbiológica se dispone de la cepa fúngica *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB para la investigación a realizar. Para el crecimiento y mantención de la cepa, esta se cultivó en placas de medio sólido PDA a 15°C.

#### 1.2 Bacterias

Para la mantención de plásmidos se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, la cual se cultivó en medio LB suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) a 180 rpm y 37°C. Para la selección de colonias transformantes, se usó medio LB sólido (agar 2%) suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL).

### 2 Fermentaciones

#### 2.1 Medios de cultivo

CM (Medio completo): Glucosa 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, extracto de malta 5 g/L, agar 2% (sólido).

CYA (Medio Czapeck y autolisado de levadura): sacarosa 30 g/L, extracto de levadura 5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1,3g/L, NaNO<sub>3</sub> 3 g/L, KCl 0,5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,01 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,005 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,01 g/L (pH 6,3  $\pm$  0,2).

LB (Luria Bertani): Triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10g/L, agar 2% (Sólido).

PDA (Medio de papa y dextrosa agar): 39 g por litro de agua (Difco), agar 0,5% (Sólido).

PDB (Medio de papa y dextrosa caldo): 24 g por litro de agua (Difco).

YES (Medio de extracto de levadura y sacarosa): Extracto de levadura 20 g/L, sacarosa 150 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,005 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,01 g/L.

YPDA (Medio de levadura): Extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, dextrosa 20 g/L, adenina 0,2 g/L.

SC-Ura (Medio sintético completo selectivo): Glucosa 20 g/L, suplementos medio sintético *Drop-out* sin Uracilo 0,2 g/L (Sigma), base de nitrógeno para levadura sin aminoácidos 6,7 g/L (Difco), agar 2%.

## **2.2 Fermentaciones de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB en diferentes medios de cultivo**

En primer lugar, se preparó una solución de esporas en NaCl 0.9%, obtenidas desde una placa de PDA de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB de 2 semanas de crecimiento a 15°C. Se inoculó 50 mL de medio CYA líquido en un matraz de 250 mL con 1 mL de la solución de esporas a una concentración de 5x10<sup>7</sup> esporas/mL y se incubó a 15°C y 180 rpm por 72 h. Después 5 mL de este pre-inóculo se utilizaron para inocular 50 mL de los distintos medios de fermentación utilizados (**Tabla 1**) dispensados en matraces de 250 mL. Las fermentaciones se realizaron por periodos de 10 días a 15° C y 180 rpm, tras lo cual la recolección de micelio se realizó por filtración con filtro NYTAL<sup>®</sup>, secado con papel filtro estéril y almacenado a -80°C.

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para la fermentación de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB

Medio	A	B	C	D	E
<b>Medio Base</b>	CYA	CYA	YES	YES	PDB
<b>Modificación</b>	-	Lactosa 3%*	-	NaCl 5%**	-

\* Cambio de fuente de carbono de sacarosa a lactosa

\*\*Adición de NaCl al 5%

### 2.3 Fermentaciones de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB con el remodelador de cromatina 5-azacitidina

Para la preparación del pre-inóculo, se inocularon 50 mL de medio CYA líquido en un matraz de 250 mL con 1 mL de una solución de esporas (preparada como se indicó en el apartado anterior) y se incubaron, a 15°C y 180 rpm por 72 h. Las condiciones empleadas para las fermentaciones fueron usando los medios CYA y PDB, con 50 y 500 µM del remodelador de cromatina 5-azacitidina. Además, se consideraron dos tiempos diferentes para la adición del remodelador a la fermentación: al inicio de la fermentación (día 0) y al día 7 de cultivo (día 7). La inoculación de cada fermentación se realizó con 5 mL del pre-inóculo en 50 mL de medio dispensado en matraces de 250 mL. Una vez inoculados, todos los matraces fueron incubados a 15°C y 180 rpm por 10 días. El detalle de todas las condiciones de fermentación empleadas se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de fermentación adicionando el remodelador 5-azacitidina.

N°	Medio	[5-Aza] (µM)	Adición	N°	Medio	[5-Aza] (µM)	Adición
1	CYA	500	Día 0	8	PDB	500	Día 0
2	CYA	500	Día 7	9	PDB	500	Día 7
3	CYA	50	Día 0	10	PDB	50	Día 0
4	CYA	50	Día 7	11	PDB	50	Día 7
5	CYA	-	-	12	PDB	-	-
6	CYA	0	Día 0	13	PDB	0	Día 0
7	CYA	0	Día 7	14	PDB	0	Día 7



El remodelador de cromatina 5-Azacidina se solubilizó en DMSO, siendo la concentración final de DMSO en el cultivo de 1,2 %. Las condiciones 6, 7, 13 y 14 corresponden a fermentaciones a las cuales se les adicionó solo DMSO (control del efecto de la adición de DMSO). La recolección de micelio se realizó en el día 10 de la fermentación por filtración con filtro NYTAL®, secado con papel filtro estéril, y almacenado a -80°C. Paralelamente, se colectó caldo de cultivo de las fermentaciones para realizar el análisis de los perfiles químicos de estos caldos mediante HPLC.

### **3 Extracción, análisis y tratamientos de ácidos nucleicos**

#### **3.1 Extracción de ADN genómico desde micelio**

##### **3.1.1 Soluciones**

Tampón de lisis: Tris HCl 0,2M, EDTA 10 mM, SDS 1%, pH 8,2.

CIA: Cloroformo:Alcohol isoamílico (24:1).

Tampón TE: Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0.

##### **3.1.2 Extracción**

Para la extracción de ADN desde micelio, se molió micelio en mortero con nitrógeno líquido y se transfirieron 100 mg a un tubo de 2 mL. A este tubo, se le agregaron 800 µL de tampón de lisis y 800 uL de fenol básico. Posteriormente esta mezcla se incubó a 50°C por 30 min, siendo agitada en vortex cada 5 min. Finalizado el tiempo de incubación, la mezcla se centrifugó por 10 min a 15000 rpm, y se le extrajo la fase acuosa. A esta fase acuosa se le realizaron dos lavados con 1 volumen de Fenol:CIA (1:1), agitando y centrifugando a 15000 rpm por 6 min. A la fase acuosa resultante, se le realizó un último lavado con 1 volumen de CIA a 15000 rpm por 5 min. Tras rescatar

la fase acuosa, se le agregaron 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Esta mezcla se dejó a -20°C por 16 h. Finalmente, el ADN fue colectado centrifugando por 40 min a 4°C a 15000 rpm. El pellet resultante fue lavado con 500 µL de etanol 70%, secado al aire y resuspendido en 100 µL de tampón TE y almacenado a -20°C.

### **3.2 Enzimas**

Las reacciones de digestión se realizaron con las enzimas de restricción *NcoI*, *KpnI* y *HindIII* (ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante: 5 µg de ADN, 1 µL de tampón Tango (10x), agua libre de nucleasas hasta un volumen de 9 µL, 1 µL de enzima (10u/µL). Incubación a 37°C por 2 h y posterior inactivación a 80°C por 10 min.

Las reacciones de ligación fueron realizadas con la enzima ADN ligasa T4 (NEB) siguiendo las instrucciones del fabricante: 2 µL Buffer T4 DNA ligase, 50 ng de plásmido, 30-50 ng de inserto, 1 µL T4 DNA ligase, agua libre de nucleasas hasta un volumen de 20 µL. La reacción fue incubada a 16°C por 16 h y posteriormente, se utilizó para la transformación de *E. coli* DH5α quimio-competentes.

### **3.3 Purificación desde gel de agarosa**

Los productos de reacción de PCR y digestión enzimática fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8), teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador UV. Para la purificación de bandas desde gel se utilizó el kit *Wizard® Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.4 Extracción de ADN plasmidial**

#### **3.4.1 Extracción de ADN plasmidial desde *E. coli***

Las extracciones de ADN plasmidial desde *E. coli* fueron realizadas con el kit GeneJET *Plasmid Miniprep* (thermofisher) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **3.4.2 Extracción de ADN plasmidial desde *S. cerevisiae***

Para la obtención del plásmido recombinante a partir de las colonias transformantes de *S. cerevisiae* se utilizó el kit Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep (ZymoResearch) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.5 Extracción de ARN desde micelio**

Para la extracción de ARN desde micelio se utilizó el reactivo TRIsure™ (Bioline). Para cada extracción, el micelio fue molido en mortero con nitrógeno líquido. Después 50 mg de este micelio molido fue transferido a un tubo nuevo de 2 mL y se agregó 1 mL de reactivo TRIsure™. La mezcla fue homogeneizada por vortex y luego se utilizó un *Tissueruptor*® para aumentar el grado de ruptura celular. El lisado se incubó a 65°C por 5 min y posteriormente, se dejó a temperatura ambiente por 5 min. A continuación, fue centrifugado a 14000 rpm y 4°C por 15 min, y la fase acuosa obtenida fue transferida a un nuevo tubo de 1,5 mL. A este tubo se le agregaron 200 µL de cloroformo, se mezcló por inversión y se le dejó a temperatura ambiente por 3 min. La mezcla fue centrifugada a 14000 rpm y 4°C por 15 min. Entonces, la fase acuosa fue rescatada, transferida a un nuevo tubo y sometida a un segundo lavado con 200 µL de cloroformo. A la nueva fase acuosa se le agregaron 500 µL de isopropanol, fue mezclada por inversión y dejada a temperatura ambiente por 10 min. Luego, se centrifugó a 14000 rpm y 4°C por 15 min,

para posteriormente eliminar el sobrenadante y lavar el pellet formado con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (en agua tratada con DEPC) frío, centrifugando a 14000 rpm por 5 min a 4°C. Finalmente el sobrenadante fue descartado y el pellet fue secado por 45 min a temperatura ambiente. El pellet fue resuspendido en 60  $\mu\text{L}$  de agua tratada con DEPC. La cuantificación de ARN fue realizada por espectrofotometría y su integridad fue verificada mediante visualización por gel de agarosa. Para la eliminación de ADN residual tras la extracción de ARN, el ARN se trató con la enzima *DNase I (RNase-free)* (NEB) por 45 min a 37°C. La enzima posteriormente fue inactivada agregando 10  $\mu\text{L}$  de EDTA 50 mM e incubando a 75°C por 10 min.

### **3.6 Generación de ADN complementario (ADNc)**

Para la generación de ADNc, se incubó 1  $\mu\text{g}$  de ARN libre de ADN con 1  $\mu\text{L}$  de oligo-dT 15mer (100  $\mu\text{M}$ ) y agua tratada con DEPC en un volumen final de 11  $\mu\text{L}$  por 10 min a 70°C. Posteriormente, a esta mezcla se le adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10mM), 2  $\mu\text{L}$  de agua tratada con DEPC, 4  $\mu\text{L}$  de *Buffer 5x* y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima *RevertAid reverse transcriptase* (Thermofisher), para un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . La reacción fue incubada a 42°C por 60 min y posteriormente, a 70°C por 10 min. El ADNc obtenido fue almacenado a - 20°C hasta su uso.

### **3.7 PCR y PCR semicuantitativa**

Para la amplificación por PCR de rutina y para la semicuantificación de los niveles de transcrito, se realizaron reacciones de PCR con *GoTaq® Green Master Mix* en un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ . Para esta reacción se utilizaron 10  $\mu\text{L}$  de *GoTaq® Green Master Mix* (2x), 0,8  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{M}$ ) de cada partidor (**¡Error! No se encuentra el origen de la**

referencia. y Tabla 5), 7,6 µL de agua libre de nucleasas y 0,8 µL de ADN (ADNc en el caso del PCR-semicuantitativo). El programa estándar utilizado para la amplificación fue: Denaturación inicial de 3 min a 95°C, 35 ciclos de denaturación a 95°C por 40 s, hibridación de los partidores a 55°C por 45 s, elongación a 72°C por 50 s y, por último, elongación final a 72°C por 5 min. Posteriormente, el producto de cada reacción fue visualizado en gel de agarosa al 1% en un transiluminador UV. La cuantificación de la intensidad de la banda se realizó mediante el procesador de imágenes ImageJ 1.6.0. La cuantificación relativa se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Transcrito relativo}_{gen-medio} = \left( \frac{\text{Píxeles}_{gen-medio}}{\text{Píxeles}_{\beta tub-medio}} \right) * \bar{X}^{-1} \left( \frac{\text{Píxeles}_{gen-ref-CYA}}{\text{Píxeles}_{\beta tub-CYA}} \right)$$

Tabla 3. Partidores PCR y PCR-semicuantitativo.

N°	Nombre	Secuencia (5'→3')	Tamaño amplificado (pb)
1	RNAi-NcoI-GymD-fw	AGA CTC CCA TGG CAT TGA TAC TGC TTG CTC	468
2	RNAi-GymD-rv	TGC CTT GCA TCT CCT CGT GG	
3	RNAi-NcoI-GymB-fw	AGA CTC CCA TGG GGC ATA TTG CTG GGT TTA	422
4	RNAi-NcoI-GymB-rv	AGA CTC CCA TGG TGC TAT TGG AAG CTT TGG	
5	RNAi-NcoI-GymC-fw	AGA CTC CCA TGG CGT TGT CTG CTT CAG GAC	403
6	RNAi-NcoI-GymC-rv	AGA CTC CCA TGG AGA TCC CTC ACC GTG AAC	
7	Gym722-fw	GCA GGA GGT TGA CAC ATA CT	372
8	Gym722-rv	CCG AGA ACA TTG TCC TTA TC	
9	Gym36-fw	TAG ACG ATG ATG TCG CAC CG	586
10	Gym36-rv	TCA ACC GAC GTA GAT GCT CC	
11	b-tub-fw	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	300 (Desde ADNc)
12	b-tub-rv	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	
13	pgpd-Rnai	GCT ACA TCC ATA CTC CAT CC	271 (Sin inserto)
14	Pcpc-Rnai	GCT CAG GCA CAC AGG AAG	
15	LC1	GAY CCN MGN TTY TYY AAY ATG	-
16	LC2c	GTN CCN GTN CCR TGC ATY TC	
17	LC3	GCN GAR CAR ATG GAY CCN CA	-
18	LC5c	GTN GAN GTN GCR TGN GCY TC	

### 3.8 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo y los partidores utilizados para la construcción de los plásmidos obtenidos en este trabajo se listan en la Tabla 4 y 5 respectivamente.

Tabla 4. Plásmidos utilizados y construidos.

Plásmido	Descripción	Referencia
pAN7	Vector con cassette de resistencia a higromicina bajo el control del promotor <i>pgpd</i>	Punt & cols., 1987
pRS426	Vector binario <i>E. coli</i> / <i>S. cerevisiae</i> utilizado para ensamblaje de secuencias de ADN por recombinación en <i>S. cerevisiae</i>	ATCC 77107
pRS-hph	Vector pRS426 con cassette de resistencia a higromicina bajo el control del promotor <i>pgdh</i>	Este trabajo
pJL-43	Vector utilizado para silenciamiento génico; cassette de resistencia a fleomicina bajo el control del promotor <i>pgdh</i>	Ullán & cols., 2008
pJL-D	Vector pJL-43 con un fragmento del gen <i>GymD</i> clonado en el sitio de restricción <i>NcoI</i> entre los promotores <i>pgpd</i> y <i>pcbc</i>	Este trabajo
pJL-HD	Vector pJL-D con cassette de resistencia a higromicina bajo el control del promotor <i>pgdh</i>	Este trabajo
pGEM-T Easy	Vector comercial de clonamiento en <i>E. coli</i>	Promega

Tabla 5. Partidores para la construcción del cassette de higromicina y el plásmido pJL-HD.

N°	Nombre	Secuencia (5'-3')
1	R5- <i>pgdh</i> -fw	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA GCA GAT TGC GAC GGC GTA TTG C
2	<i>hph</i> - <i>pgdh</i> -rv	CTC GAC AGA CGT CGC GGT GAG TTC AGG CAT GTC TGA AGG GGA GGA TTG AT
3	<i>hph</i> -fw	ATG CCT GAA CTC ACC GCG AC
4	R3- <i>hph</i> -rv	GTA ACG CCA GGG TTT TCC CAG TCA CGA CGT CGA GTG GAG ATG TGG AGT G
5	<i>KpnI</i> - <i>pgdh</i> -fw	AGA CTC GGT ACC AGA TTG CGA CGG CGT ATT GC
6	<i>HindIII</i> - <i>hph</i> -rv	AGA CTC AAG CTT CGA GTG GAG ATG TGG AGT G
7	RNAi- <i>NcoI</i> - <i>GymD</i> -fw	AGA CTC CCA TGG CAT TGA TAC TGC TTG CTC
8	RNAi- <i>GymD</i> -rv	TGC CTT GCA TCT CCT CGT GG

## **4 Transformaciones**

### **4.1 Transformación química de *E. coli* DH5 $\alpha$**

#### **4.1.1 Generación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ quimio-competentes**

A partir de una colonia aislada de *E. coli* DH5 $\alpha$  se realizó un pre-inóculo en 6 mL de medio LB y se incubó a 37°C y 200 rpm por 16 h. Desde este pre-inóculo, se tomaron 5 mL y se utilizaron para inocular un matraz de 250 mL con 50 mL de medio LB. Este cultivo se incubó a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una D.O. a 600 nm entre 0,4 y 0,6. En ese momento, el cultivo se alicuotó en volúmenes de 10 mL en tubos falcon de 15 mL y se incubó en baño de agua-hielo por 10 min. Posteriormente, estos tubos fueron centrifugados por 5 min a 6000 rpm y 4°C. El pellet obtenido fue resuspendido en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM e incubado en baño agua-hielo por 30 min. Después, se centrifugaron por 5 min a 5000 rpm y 4°C. Finalmente, el pellet se resuspendió en 500  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 100 Mm y se alicuotó en volúmenes de 50  $\mu$ L en tubos eppendorf. Tras agregar a cada tubo con células 30  $\mu$ L de glicerol, éstos fueron almacenados a -80°C.

#### **4.1.2 Transformación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ quimio-competentes**

Para cada transformación, a 80  $\mu$ L de células *E. coli* DH5 $\alpha$  quimio-competentes se le agrega 200 ng del plásmido y se incuba 1 h en hielo. Posteriormente, se aplica un choque térmico a 42°C por 50 s y, rápidamente, se incuba de nuevo en hielo por 5 min. A continuación, a la mezcla se le agrega 500  $\mu$ L de medio LB y se deja recuperando las células por 1,5 h a 150 rpm y 37°C. Después, las células son centrifugadas por 3 min a 5000 rpm. Finalmente, el pellet se resuspende en un volumen de 100  $\mu$ L y se siembra en placas de LB sólido con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina como marcador de selección.

## **4.2 Transformación de *S. cerevisiae***

La cepa de *S. cerevisiae* S288 se inoculó en 5 mL de medio YPDA líquido y se incubó por 16 hrs a 200 rpm y 30°C. Cuando el cultivo alcanza una D.O. (600nm) entre 0,7 y 1,0, se colectan las células centrifugando a 3000 rpm por 5 min y luego se resuspenden en 1 mL de agua estéril. Las células son lavadas nuevamente con 1 mL agua estéril y alicuotadas en tubos eppendorf de 1,5 mL en volúmenes de 200 µL (uno para cada transformación). A cada reacción de transformación se le agregaron los siguientes componentes en el orden indicado: 1º) 240 µL de PEG 3350 50% (v/v); 2º) 36 µL de acetato de litio 1 M; 3º) 50 µL de ADN monohebra de salmón (2 µg/mL) previamente ebulido por 5 min e incubado en hielo. 4º) 5 µL de cada producto de PCR y 2 µg del plásmido pRS426 linearizado (34 µL). Una vez que se han añadido todos los componentes, la reacción es mezclada por vortex e incubada a 42°C por 40 min. Posteriormente, las células son recolectadas y lavadas en 200 µL de agua estéril para luego ser sembradas en placas con medio SC-Ura para la selección por auxotrofia (gen *URA3* está presente en el plásmido pRS426).

## **4.3 Transformación de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB mediante electroporación de conidias germinadas**

### **4.3.1 Obtención y germinación de conidias**

A partir de placas de PDA sembradas con la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB de 2 semanas de crecimiento, se recolectaron conidias con una solución tampón TPP ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  0,03M pH 7, tween 20 0,02%), y se filtraron a través de filtro Miracloth. Las conidias fueron lavadas con agua estéril 3 veces, centrifugando a 10.000 rpm por 5 min para recuperarlas tras cada lavado. Una vez lavadas, se incubaron



por 16-24 h a 4°C. Transcurrido este tiempo, se inoculó un matraz de 250 mL con 50 mL de medio CM con 1 mL de conidias a una concentración de  $1 \times 10^9$  conidias/mL, y se dejó agitando a 180 rpm y 15°C por 19-20 h. Periódicamente, el estado germinativo de las conidias fue chequeado mediante la observación por microscopio. Cuando el tubo germinativo del 80% de las conidias tenía un largo entre 1 y 2 veces el diámetro de la propia conidia, se procedió a colectar éstas por centrifugación a 10.000 rpm por 15 min.

A partir de este momento, todos los pasos fueron realizados en frío. Las conidias germinadas se lavaron 3 veces con agua estéril centrifugando a 10.000 rpm por 5 min. Finalmente, el pellet es resuspendido en tampón de electroporación de acetato de litio (Tris HCl 10 mM pH 7.5, sacarosa 270 mM, acetato de litio 1 mM) y ajustado a una concentración de conidias germinadas de  $5 \times 10^7$  conidias/mL.

#### **4.3.2 Electroporación de conidias germinadas GenePulser Xcell™ (BioRad)**

Para cada reacción de transformación, se mezclaron 100 µL de conidias germinadas con 3 µg de plásmido. Esta mezcla se incubó 15 min en hielo previo a la electroporación. Para electroporar se utilizaron cubetas de 2 mm y las condiciones fueron de 1000 V, 25 µF y  $\infty \Omega$ . Tras el pulso, se agregó a la mezcla 2 mL de medio CM Sorbitol 1 M frío y se dejó en recuperación por 24 hrs a 80 rpm y 15 °C. Tras el periodo de recuperación, los conidios electroporados se plaquearon mediante el método de cobertera en medio sólido CM 1M sorbitol 2% (Inferior) y 1% (superior) con 40 µg/mL de higromicina para la selección de las colonias transformantes.

Para chequear la estabilidad de las colonias transformantes fueron crecidas por 3 generaciones en medio CM sólido con 40 µg/mL de higromicina.

## 5 Análisis químico de los caldos de las fermentaciones de la cepa

### *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB

#### 5.1 Preparación de muestras desde los caldos de cultivo

Para la eliminación de restos celulares del caldo de cultivo filtrado, 1 mL de caldo se centrifugó a 15000 rpm por 5 min. Posteriormente, al sobrenadante se le agregaron 4 mL de metanol y se incubó al menos 2 h a -20°C. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 15.000 rpm por 5 min y el sobrenadante recuperado se concentró hasta un volumen final de 100 µL por concentración al vacío.

#### 5.2 Análisis de muestras por HPLC

El equipo de HPLC utilizado está conformado de un detector de fotodiodo (Waters 2998), un conjunto binario de bombas (Waters 1525), un horno de columna (Waters 1500) y un desgasificador (Waters in-line degasser AF). Para todos los análisis se utilizó una columna C-18 de fase reversa (Sunfire C18, Waters, 4,6 x 25 cm, 5 µm) estabilizada a 35°C. El programa utilizado para el tratamiento de datos fue el EMPOWER 3.

El gradiente del método cromatográfico utilizado se detalla en la tabla 6. Los solventes utilizados corresponden a agua con 0.01% de ácido trifluoroacético (TFA) (Solvente A) y metanol (Solvente B). El flujo de trabajo utilizado fue de 0,9 mL/min y el volumen de la muestra inyectada fue de 20 µL.

Tabla 6. Gradiente del método cromatográfico utilizado para analizar las muestras de los caldos de cultivo obtenidas durante las fermentaciones.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
20	0	100
24	0	100
25	90	10

## 6 Análisis bioinformático

Para el análisis de identidad de secuencias se utilizaron las herramientas disponibles en la base de datos NCBI (National Center of Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Para la identificación de los clusters de síntesis de metabolitos secundarios se utilizó la herramienta antiSMASH (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>) (Medema & cols., 2011). Los genomas empleados fueron los de *Pseudogymnoascus verrucosus* UAMH 10579 (GeneBank LAJO000000000.1) y *Pseudogymnoascus destructans* 20631-21 (GenBank LAJJ000000000.1).

## RESULTADOS

### 1 Análisis bioinformático y búsqueda de genes codificantes para enzimas PKS en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II- EB

Como ya se mencionó en los antecedentes, en trabajos anteriores realizados en el laboratorio se identificaron cuatro secuencias nucleotídicas correspondientes a fragmentos de posibles genes codificantes para enzimas del tipo PKS (*GymB*, *GymC*, *GymD* y *Gym722*) desde la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB. Al analizar las secuencias de estos fragmentos mediante la herramienta bioinformática BLASTx se obtuvo la información que se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados del análisis por BLASTx de las secuencias de fragmentos de cuatro genes codificantes para enzimas del tipo PKS presentes en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB

Fragmento	Tamaño (pb)	BLASTx Función desconocida (% cobertura-%identidad-n° de acceso GenBank)	BLASTx Función conocida (% cobertura-%identidad-n° de acceso GenBank)
<b>GymB</b>	480	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> PKS Iterativa Tipo I (100%-85%-XP_018126026.1)	<i>Rasamsonia emersonii</i> Sintasa 6-deoxi-eritronolida-B (85%-58%-XP_013329845.1)
<b>GymC</b>	591	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> PKS Iterativa Tipo I (99%-100%-X1P_018125445.1)	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Sintasa fenol-phthiocerol (91%-54%-XP_001937136.1)
<b>GymD</b>	568	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> PKS Iterativa Tipo I (99%-99%-XP_018130721.1)	<i>Aspergillus udagawae</i> Sintasa de pigmento amarillo asociado a conidiación (99%-94%-GAO88312.1)
<b>Gym722</b>	722	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> PKS Iterativa Tipo I (99%-99%-XP_018127983.1)	<i>Verticillium alfalfae</i> Sintasa de pigmento amarillo asociado a conidiación (99%-88%-XP_003008898.1)

Como se puede observar en la Tabla 7, los fragmentos de los genes *GymB*, *GymC*, *GymD* y *Gym722* poseen un alto grado de similitud con secuencias de genes codificantes para enzimas PKS del tipo I encontradas en el genoma de la cepa

*Pseudogymnoascus verrucosus* UAMH 10579 (GeneBank LAJO00000000.1). Al buscar por identidad con secuencias de genes con función conocida se observa que estas corresponden a sintasas asociadas a la producción de algún metabolito secundario en otras especies fúngicas.

Con el fin de aumentar el número de genes codificantes para enzimas PKS detectados en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB. para su posterior estudio, se utilizaron dos aproximaciones: 1. Nuevo diseño de partidores a partir del análisis de genomas de hongos del género *Pseudogymnoascus*; 2. Amplificación de fragmentos desde ADN genómico empleando partidores degenerados con especificidad a genes que codifican para enzimas PKS.

### **1.1 Nuevo diseño de partidores a partir del análisis de genomas de hongos del género *Pseudogymnoascus***

Recientes análisis filogenéticos de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB utilizando los marcadores moleculares ITS, LSU, TEF1, RPB2 y MCM7 (Minnis & Lindler 2013) han mostrado que esta cepa se encuentra cercana filogenéticamente a la especie *P. verrucosus* (datos no mostrados). Por esta razón, para el análisis de genomas con la herramienta antiSMASH se seleccionó el genoma de *P. verrucosus* UAMH 10579. El otro genoma que se seleccionó para este análisis fue el de *P. destructans* 20631-21, una cepa de gran importancia ecológica cuyo genoma se encuentra bien ensamblado y curado (Zukal & cols., 2016).

Como resultado del análisis por antiSMASH de los dos mencionados genomas de *Pseudogymnoascus*, se identificaron los *clusters* de metabolitos que poseen una enzima

del tipo PKS como enzima central en cada genoma, los cuales se muestran en más detalle en la Tabla 8.

Tabla 8. *Clusters* de metabolitos secundarios que poseen una enzima del tipo PKS como enzima central identificados por antiSMAH en los genomas de *P. verrucosus* UAMH 10579. y *P. destructans* 20631-21. Análisis de los dominios presentes en cada enzima PKS

Organismo	N° Cluster	ORF PKS	pb	Dominios PKS *	
<b><i>P. verrucosus</i></b>	v 9	VC83_02202	8354	KS-AT-DH-cMT-ER-KR	
	v 17	VC83_03754	7985	KS-AT-ACP-ACP-TE	
	v 30	VC83_07905	6733	KS-AT-ACP-ACP-TE	
	v 31	VC83_08896	6654	KS-AT-ACP	
	<b>7 Clusters-PKS</b>	v 32	VC83_08971	5527	KS-AT-ACP-TE
	v 34	VC83_09308	7033	KS-AT-DH-cMT-ER-KR	
	v 35	VC83_09528	8076	KS-AT-ACP-cMT-TD	
<b><i>P. destructans</i></b>	d 10	GMDG_02728	6733	KS-AT-ACP-ACP-TE	
	d 12	GMDG_02977	5527	KS-AT-ACP	
	d 20	GMDG_04622	6802	KS-AT-ACP-TE	
	d 23	GMDG_05442	8354	KS-AT-DH-ER-KR	
	<b>7 Clusters-PKS</b>	d 27	GMDG_06308 + GMDG_06310	7985	KS-AT-cMT-ER-KR
	d 35	GMDG_07868	6763	KS-AT-ACP-ACP-TE	
	d 37	GMDG_08279	8076	KS-AT-ACP-cMT-TD	

\*(KS: Dom. Ceto-sintasa; AT: Dom. Acil-transferasa; DH: Dom. Deshidratasa; cMT: Dom. Metil-transferasa; ER: Dominio Enoil-reductasa; KR: Dom: Ceto-reductasa; A: Prot. Carrier de acilos; TE-TD: Dom. Terminación-Liberación).

A continuación, se procedió a comparar las secuencias aminoacídicas de las 7 PKS identificadas en *P. verrucosus* con las 7 PKS identificadas en *P. destructans*. El resultado de este análisis se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje de identidad entre las secuencias aminoacídicas de las enzimas PKS de *P. verrucosus* y las de *P. destructans* (%).

N° Cluster	d 10	d 35	d 12	d 20	d 23	d 27	d 37	Código
v 17	100	41.6	38.9	53.9	26.3	25.6	24.1	90-100%
v 30	41.8	100	41.5	40	24.3	26.5	24.8	45-90%
v 31	38.9	41.3	100	37.9	26.7	26.4	24.8	25-45%
v 32	54.6	40	37.9	98.7	26.1	26.2	23.7	
v 9	26.5	24.3	26.6	25.9	100	36	24	
v 34	25.4	25	25	26.6	35.7	99.1	24.4	
v 35	24.1	24.8	24.8	24	24.2	24.5	99.9	

\* v: *P. verrucosus*; d: *P. destructans*.

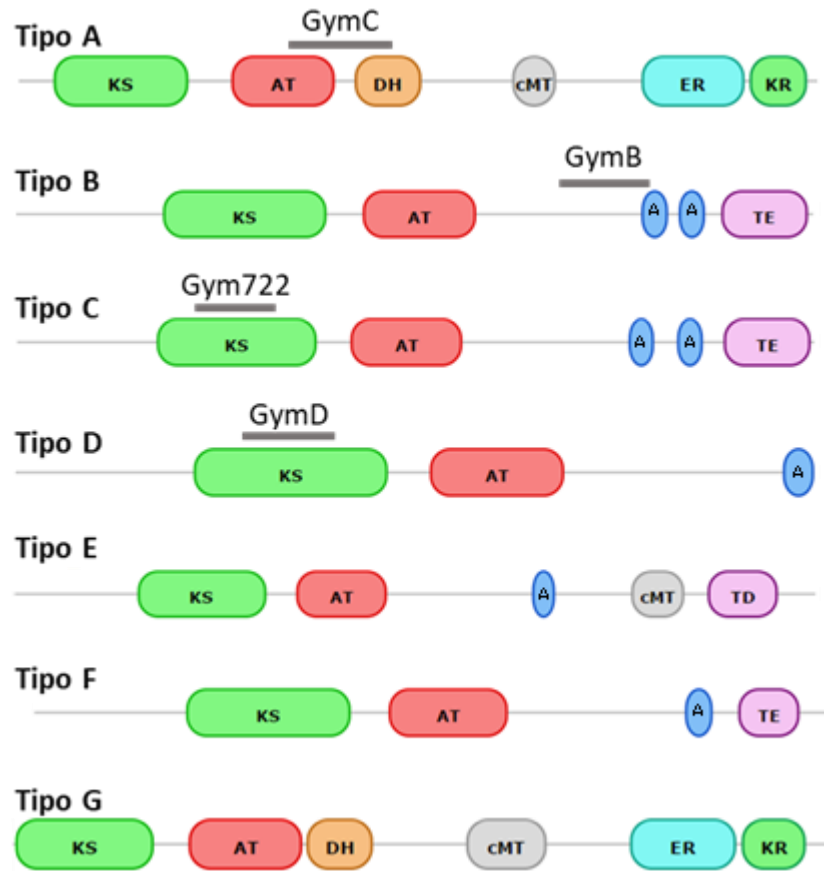
En la Tabla 9 se puede observar que cada enzima PKS de uno de los genomas posee una PKS en el otro con un alto porcentaje de identidad (>98%). Al realizar el mismo análisis, pero con las secuencias aminoacídicas de los dominios ceto-sintasa (KS) se obtiene un resultado similar. Además en este caso las secuencias comparadas alcanza el 100% (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentaje de identidad entre las secuencias aminoacídicas de los dominios KS entre *P. verrucosus* y *P. destructans* (%).

Tipo	B	C	D	F	A	G	E	Código
N° Cluster	d 10	d 35	d 12	d 20	d 23	d 27	d 37	
v 17	100	62.4	58.4	81.2	36.3	37.4	35.7	90-100%
v 30	62.4	100	60.1	59.4	35.5	35.7	34.9	45-90%
v 31	58.4	60.1	100	57.3	34.8	37.1	33.7	25-45%
v 32	81.2	59.4	57.3	100	36	39.5	36	
v 9	36.3	35.5	34.8	36	100	49.1	31.6	
v 34	36.6	35.4	37.5	39.8	48.9	100	34.3	
v 35	35.4	34.9	33.7	36	31.6	34.3	100	

\* v: *P. verrucosus*; d: *P. destructans*.

De esta forma se definieron arbitrariamente 7 tipos de enzimas PKS (Tipos A-F) presentes en los genomas de ambas especies.



**Figura 5. Arquitectura de los tipos de PKS y alineamiento de los fragmentos de PKS identificados en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB.** Líneas grises gruesas: Alineamiento de los fragmentos GymB, GymC, GymD y Gym722. Dominios: KS: Dom. Ceto-sintasa; AT: Dom. Acil-transferasa; DH: Dom. Deshidratasa; cMT: Dom. Metil-transferasa; ER: Dominio Enoil-reductasa; KR: Dom: Ceto-reductasa; A: Prot. Carrier de acilos; TE-TD: Dom. Terminación - Liberación.

Debido a que la cepa en estudio es cercana filogenéticamente a *P. verrucosus*, se analizó si las enzimas PKS ya identificadas en la cepa 131209-E2A-C5II-EB corresponden a alguno de los tipos de PKS identificados bioinformáticamente. Mediante alineamiento de las secuencias aminoacídicas predichas para las enzimas GymB, GymC, GymD y Gym722 con los tipos de PKS definidos (Tipos A-F) se determinó que:

- 1) la PKS GymB pertenece al tipo de PKS B;
- 2) GymC pertenece al tipo de PKS A;
- 3)



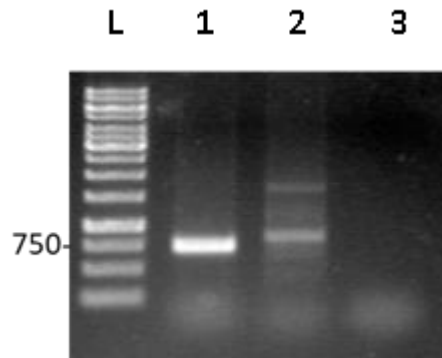
GymD pertenece al tipo de PKS D y 4) Gym722 pertenece al tipo de PKS C (>99% de similitud). Adicionalmente, se determinó el dominio o región con el cual alinean (Figura 5).

Con el fin de responder la pregunta si la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB posee enzimas PKS de los tipos E, F y G, se diseñaron partidores específicos para cada tipo en la región del dominio KS. Sin embargo, no se logró amplificar un fragmento correspondiente a alguno de los tipos de PKS faltantes (datos no mostrados).

### **1.2 Amplificación de fragmentos desde ADN genómico empleando partidores degenerados con especificidad a genes codificantes para enzimas PKS**

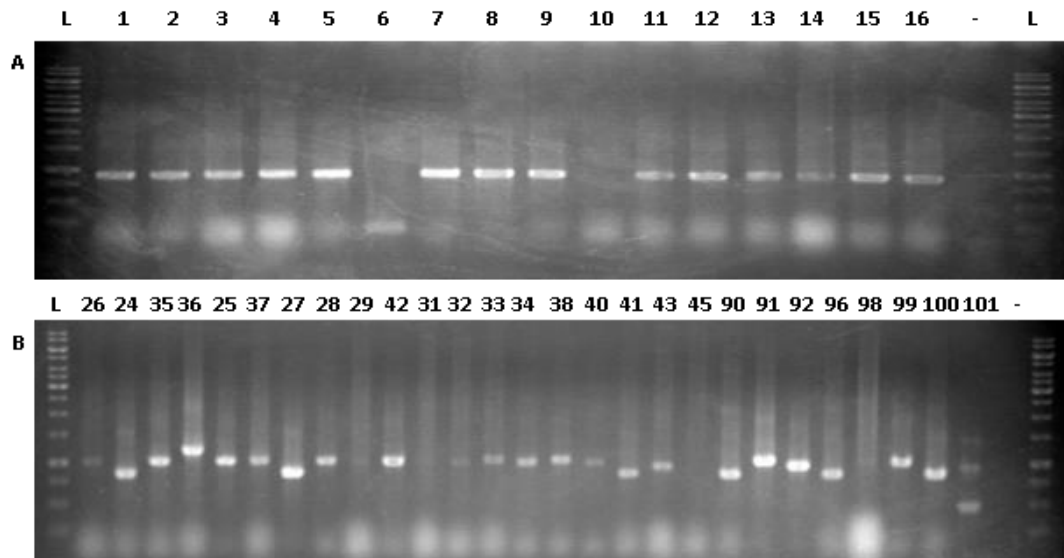
Con el fin de amplificar nuevos fragmentos de PKSs desde el ADN genómico de la cepa en estudio, se utilizaron los partidores de la serie LC3-LC5c (los cuales fueron diseñados para la amplificación de genes codificantes para enzimas PKS del tipo reductor), además de los ya previamente utilizados de la serie LC1-LC2c, (Bingle et al., 1999). Los productos de amplificación empleando estos dos pares de partidores se muestran en la Figura 6

De las bandas obtenidas al amplificar con los pares de partidores LC1-LC2c y LC3-LC5c, se purificaron las bandas de tamaño cercano a 750 - 800 pb, ya que éste es el tamaño esperado de los fragmentos. Ambas bandas fueron purificadas. y posteriormente ligadas en el vector de clonación comercial pGEM-T, cuyo producto fue transformado en *E. coli* DH5  $\alpha$  quimiocompetentes por shock-térmico.



**Figura 6. Resultados de amplificación por PCR con partidores LC1-LC2c y LC3-LC5c.** Cada carril corresponde al producto de PCR amplificado con el par de partidores indicado desde ADN genómico. L: Marcador de peso molecular 1 Kb; 1: Partidores LC1-LC2c; 2: Partidores LC3-LC5c; C-: Control negativo (sin ADN genómico).

La inserción del fragmento en el vector fue corroborada mediante PCR-colonia con los partidores universales M13. 43 colonias de un total de 101 colonias transformantes (16 colonias para los fragmentos amplificados con LC1-LC2c y 27 colonias para los fragmentos amplificados con LC3-LC5c) fueron seleccionadas aleatoriamente como templado de la reacción. Se observó que las bandas obtenidas de la amplificación desde las colonias LC1-LC2c, presentaron un tamaño cercano a los 500 pb con una mínima variación (Figura 77 A), mientras que las bandas obtenidas de la amplificación desde colonias LC3-LC5c, presentaron tamaños de banda estimados que oscilaban entre los 750 y 1100 pb (Figura 7 B).



**Figura 7. Confirmación del tamaño del fragmento inserto en plásmido pGEM-T correspondiente al fragmento amplificado de los partidores LC1-LC2c y LC3-LC5c.** Amplificados desde colonias cuyo plásmido posee inserto un producto de la amplificación con los partidores LC1-LC2c (A) y LC3-LC5c (B). Cada carril corresponde al producto de PCR amplificado con los partidores M13 desde la colonia con número indicado. L: Marcador de peso molecular 1 Kb; C-: Control negativo (Sin colonia transformante).

Se seleccionaron las colonias cuyos amplificadores fuesen de diferentes tamaños, a las cuales se les extrajo el plásmido para posteriormente secuenciar el inserto con los partidores universales M13. Un total de 19 insertos fueron secuenciados (10 provenientes de los partidores LC1-LC2c y 9 de los partidores LC3-LC5c).

De los 10 fragmentos secuenciados provenientes de la amplificación con los partidores LC1-LC2c, todos resultaron ser la misma secuencia, la cual presenta un 100.0% de similitud con el fragmento previamente identificado Gym722. Por tanto, no se logró obtener una secuencia distinta a la ya obtenida previamente con los partidores LC1-LC2c.

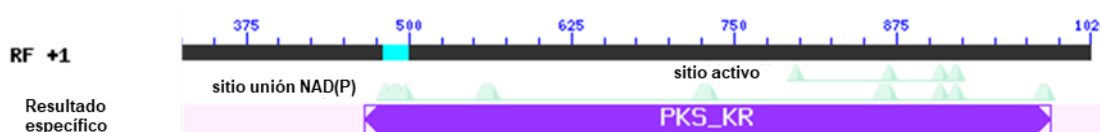
De los 9 fragmentos secuenciados, provenientes de la amplificación con los partidores LC3-LC5c, se obtuvieron 4 secuencias distintas que se denominaron secuencias 2, 3, 4 y 5. Al ser analizadas por BLASTx, las secuencias 2, 4 y 5 mostraron similitud con proteínas no relacionadas con enzimas del metabolismo secundario. Por otro lado, la secuencia 3, la cual fue denominada Gym36, presentó similitud con secuencias de enzimas PKS (Tabla 11. Resultados del análisis por BLASTx de la secuencia de Gym36.).

Tabla 11. Resultados del análisis por BLASTx de la secuencia de Gym36.

Fragmento	Tamaño (pb)	BLASTx Función desconocida (% cobertura-%identidad-n° de acceso GenBank)	BLASTx Función conocida (% cobertura-%identidad-n° de acceso GenBank)
Gym36	1021	<i>Penicillium flavigenum</i> Proteína hipotética (89%-94%-OQE32795.1)	<i>Colletotrichum incanum</i> Sintasa alternapirona (81%-43%-KZL88045.1)

La proteína que posee mayor porcentaje de identidad con Gym36 proviene de la especie fúngica *Penicillium flavigenum* (94%). El fragmento Gym36 posee el menor porcentaje de identidad con las secuencias de la base de datos de la NCBI en comparación con los cuatro genes previamente identificados, ya que la secuencia con el segundo mayor porcentaje de identidad con Gym36 es de 48%. Al analizar por BLASTx la secuencia aminoacídica hipotética de Gym36 se encontró que esta presenta motivos de un dominio ceto reductasa (KR) (Figura 8).

Al tratarse de un fragmento de un posible dominio KR de una enzima PKS, se alineó la secuencia aminoacídica de este fragmento con la de los dominios KR de las enzimas PKS de los tipos A y G (las cuales eran las únicas que presentaban dominios KR). Se observó que Gym36 no forma parte de una de enzima PKS del tipo A o G, y que posee un porcentaje de similitud con los dominios KR del tipo A y G cercano al observado entre los dominios del tipo A y G (Tabla 12).



**Figura 8. Resultado del análisis por BLASTx de la secuencia nucleotídica de Gym36.** Identificación de motivos de dominio KR en la secuencia aminoacídica obtenida en el marco de lectura +1 (RF +1). En números de color azul se indica el número del nucleótido. En la figura se señala la presencia de un motivo de sitio activo para la reducción de un grupo cetónico dependiente de NADPH.

Estos resultados sugieren que el fragmento Gym36 forma parte de una enzima PKS reductora con dominio KR, que no se encuentra en los genomas de *P. verrucosus* o *P. destructans*.

Tabla 12. Porcentaje de identidad de las secuencias aminoacídicas de los dominios KR identificados (%)

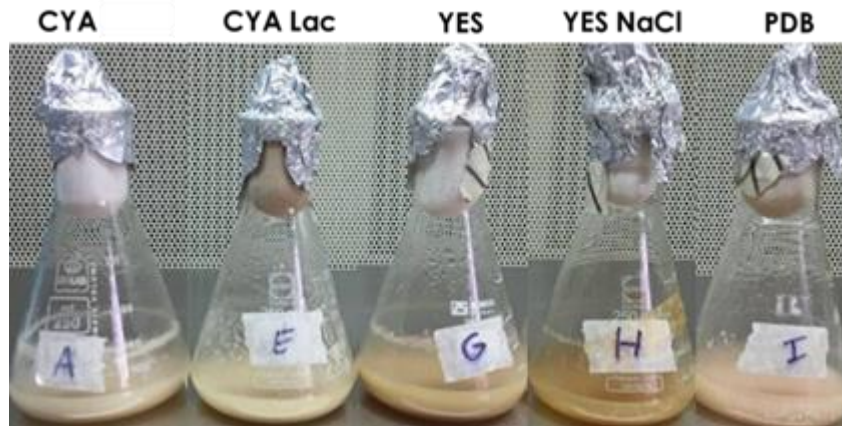
	Gym36	KR Tipo G	KR Tipo A	Código
Gym36	100	42.6	43.2	90-100%
KR Tipo G	42.6	100	46.3	50-90%
KR Tipo A	43.2	46.3	100	25-50%

## **2 Análisis de la expresión de los genes codificantes para PKSs en la cepa**

### ***Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB en diferentes medios de cultivo**

Para poder identificar los potenciales metabolitos sintetizados por las enzimas que estos genes codifican, es necesario que estos se encuentren transcripcionalmente activos. Por ello, se procedió a estudiar si estos genes se expresan en condiciones estándar de cultivo en el laboratorio. Como se especificó en los antecedentes, en un trabajo previo realizado en el laboratorio (Sacristán, 2017), se determinó que los genes *GymB*, *GymC* y *GymD* son transcripcionalmente activos al cultivar la cepa en medio CYA, siendo el gen *GymD* el que presenta los menores niveles de expresión. Con respecto al gen *Gym722*, no se detectó su transcrito.

Para poder identificar el gen responsable de la síntesis de un determinado metabolito, mediante la comparación del perfil cromatográfico entre la cepa nativa y la cepa con el gen atenuado, es conveniente cultivar estas cepas en condiciones de cultivo donde el gen sea fuertemente expresado. Por tanto, encontrar dicha condición es clave. Con el fin de encontrar la mejor condición de cultivo para la expresión de cada uno de los genes (*GymB*, *GymC*, *GymD*, *Gym722* y *Gym36*) y así facilitar su posterior estudio, se realizaron fermentaciones de la cepa en cinco medios de cultivo (Tabla 1) (Liu & cols., 2016; Hewage & cols., 2014). Tras 10 días de fermentación se colectó el micelio (Figura 9).

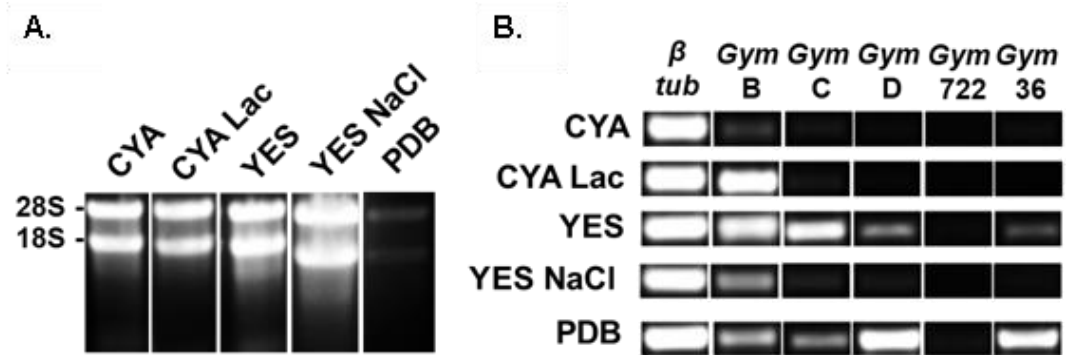


**Figura 9. Fermentaciones de 10 días de cultivo de la cepa 131209-E2A-C5II-EB en diferentes medios de cultivo.** Medios empleados: CYA, CYA con lactosa como fuente de carbono (CYA Lac), YES, YES con 5% NaCl (YES NaCl) y medio PDB. En las fermentaciones en medio YES y medio YES suplementado con 5% de NaCl, se observó una coloración café, mientras que en el medio PDB se pudo apreciar una ligera tonalidad rosa, la cual es característica de la cepa 131209-E2A-C5II-EB cuando es crecida en medio PDA.

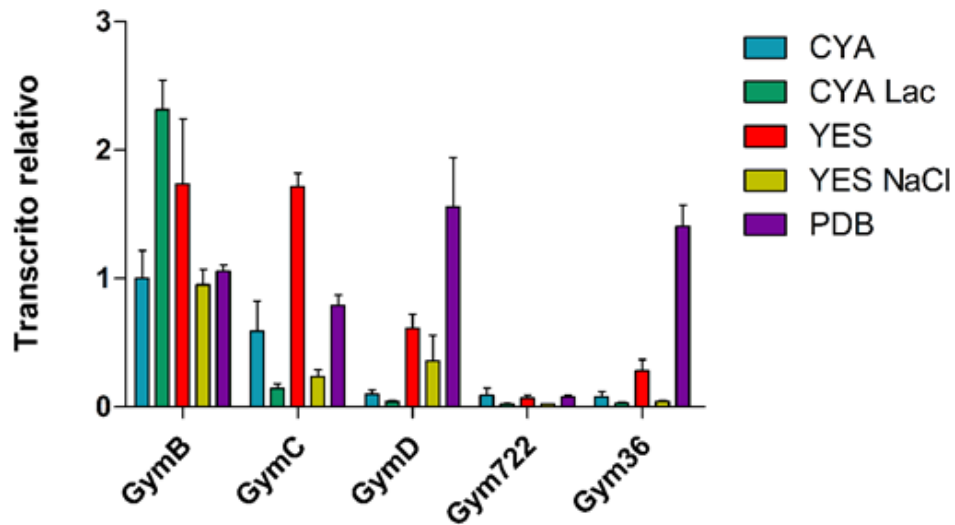
A partir del micelio se extrajo ARN y se hizo una semi-cuantificación de los niveles de transcrito de los genes estudiados mediante RT-PCR empleando partidores específicos (Tabla 3). En la figura 10 se observa el diferente nivel de expresión de los genes en los geles. La intensidad de la banda fue estimada como se indica en materiales y métodos (3.7), al igual que el cálculo para determinar las veces de cambio, cuyos resultados se muestran en la figura 11.

Los resultados indican que los cinco genes estudiados poseen niveles de expresión dependientes del medio en el cual se cultiva la cepa. El gen *GymB* posee una mayor expresión en medio CYA con lactosa como fuente de carbono en comparación con los medios CYA, YES NaCl y PDB ( $p < 0.05$ ). El gen *GymC* posee una mayor expresión en medio YES con respecto a todos los medios utilizados ( $p < 0.05$ ). En el caso de los genes *GymD* y *Gym36* ambos poseen un mayor nivel de expresión en medio PDB ( $p < 0.05$ ).

Sin embargo, la expresión del gen *Gym722* no se vio favorecida en ninguno de los medios de cultivo utilizados (Tabla 13)



**Figura 10. Electroforesis de ARN total y RT-PCR de los genes estudiados en las diferentes condiciones de cultivo.** (A) Electroforesis de ARN total al día 10 de fermentación. Se observa las bandas correspondientes al ARN ribosomal 28S y 18S; (B) RT-PCR de los genes *GymB*, *GymC*, *GymD*, *Gym722* y *Gym36* en los 5 medios de cultivo empleados. Como control de gen constitutivo se utilizó el gen beta-tubulina ( $\beta$ -tub). Los medios de cultivo empleados son: CYA, CYA con lactosa como fuente de carbono (CYA Lac), YES, YES con 5% NaCl (YES NaCl) y medio PDB.



**Figura 11. Niveles de transcrito relativo de los genes codificantes para enzimas PKS en diferentes medios de cultivo.** Medios de cultivo: CYA, CYA con lactosa como fuente de carbono (CYA Lac), YES, YES con 5% NaCl (YES NaCl) y medio PDB. El cálculo de nivel de transcrito relativo se realizó en relación a la del gen *GymB* en medio CYA. Las barras de error indican la desviación estándar; n= 3. Análisis estadístico realizado del tipo ANOVA de 1 vía y un test de comparación múltiple de tukey para el conjunto de medios dado un gen en particular de manera independiente.

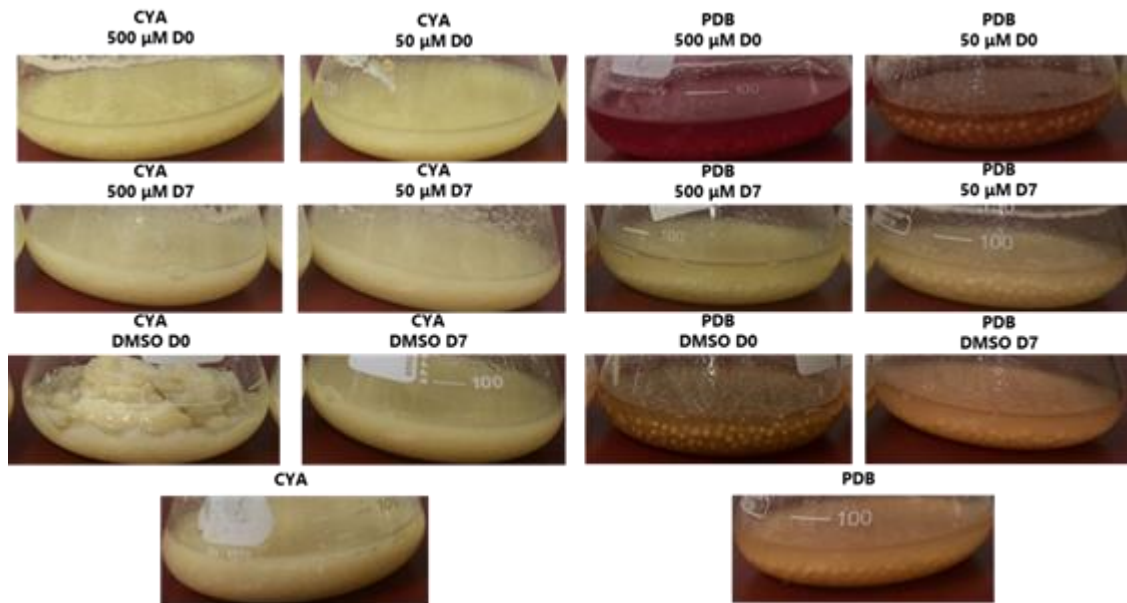


Tabla 13. Incremento de los niveles de transcrito de los genes codificantes para enzimas PKS en los distintos medios utilizados en referencia a los obtenidos en medio CYA (condición estándar de cultivo)

Gen	Medio	Incremento relativo aproximado
<i>GymB</i>	CYA Lac	X2
<i>GymC</i>	YES	X3
<i>GymD</i>	PDB	X16
<i>Gym722</i>	-	-
<i>Gym36</i>	PDB	X16

### 3 Análisis de la expresión de los genes codificantes para PKSs y perfil de metabolitos en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB con el remodelador de cromatina 5-azacitidina

Con el objetivo de inducir la expresión del gen *Gym722*, y ver el efecto sobre la expresión de los otros genes, se procedió a utilizar el remodelador de cromatina 5-azacitidina (5-Aza) (Wang & cols., 2011; Li X. & cols., 2017). Los medios de cultivo que se emplearon fueron medio CYA y medio PDB. El medio CYA se seleccionó ya que está establecido como medio de cultivo estándar, mientras que el medio PDB se seleccionó debido a que permite una expresión robusta de los genes *GymB*, *GymC*, *GymD* y *Gym36*. El remodelador 5-azacitidina fue solubilizado en DMSO y las concentraciones utilizadas fueron de 50  $\mu$ M y 500  $\mu$ M. Otra variable considerada fue el tiempo de la aplicación del remodelador al cultivo, utilizándose dos tiempos de aplicación: 1) inicio de la fermentación (día 0) y 2) a los 7 días de fermentación (día 7). Transcurridos 10 días de fermentación se colectó el micelio y una alícuota del caldo (Figura 12).



**Figura 12. Fermentaciones de 10 días de cultivo de la cepa 131209-E2A-C5II-EB en medio CYA y PDB con el remodelador de cromatina 5-azacitidina.** Las fermentaciones se realizaron por 10 días. Concentración de 5-Azacitidina: 500  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 0  $\mu$ M (DMSO); D0-7: Día de adición del remodelador o DMSO como control. Observe la distinta coloración de los cultivos (más detalles en el texto)

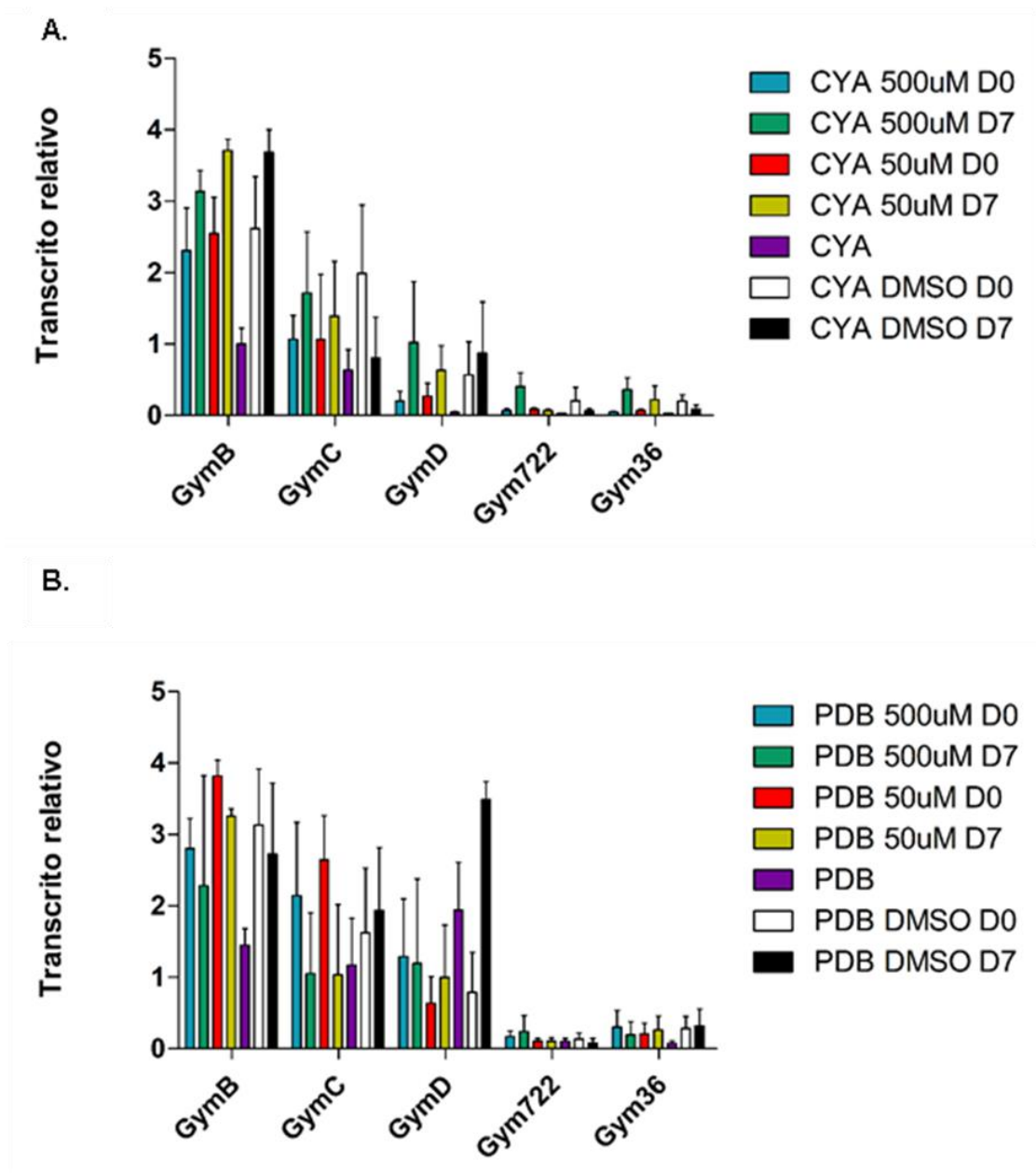
Para analizar los niveles de transcrito de los genes estudiados, a partir del micelio colectado se extrajo ARN y se hizo una semi-cuantificación de los niveles de transcrito mediante RT-PCR. Los resultados se muestran en la figura 13.

Como resultado se observó que, si bien existe un aparente aumento de la expresión al adicionar el remodelador a distintas concentraciones y días, éste efecto no es consistente. El alto valor de la desviación estándar de los datos en muchos casos no permite afirmar que existen diferencias significativas entre los datos obtenidos. Llamativamente un efecto similar en la expresión se vio al adicionar solo DMSO en las condiciones control. Por ejemplo, el aumento de los niveles de transcrito de los genes *GymB*, *GymC* y *GymD*, es similar al adicionar DMSO que al utilizar las distintas concentraciones del remodelador (entre 2 y 4 veces en referencia al medio control sin

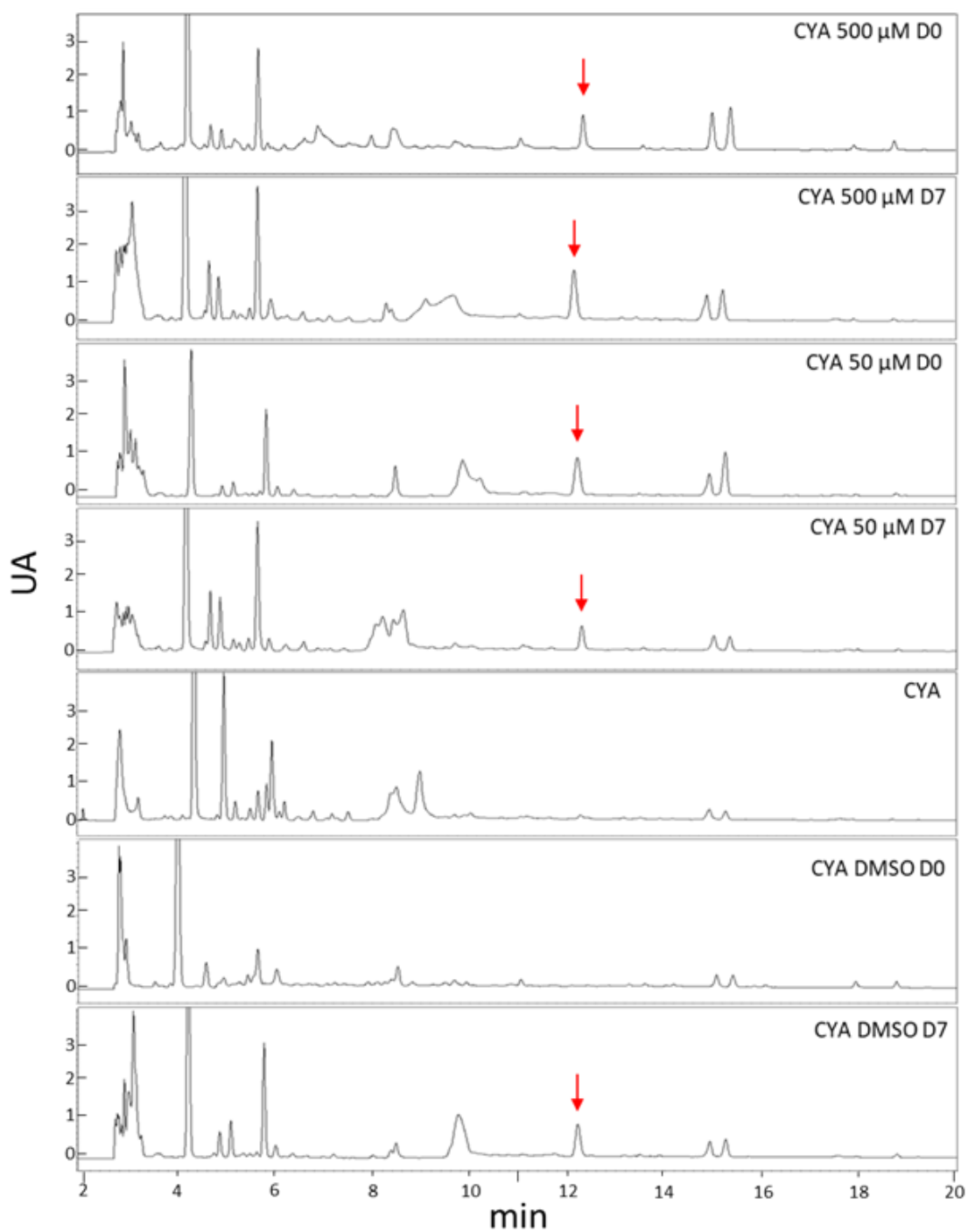
DMSO y sin 5-azacitidina). De manera opuesta a resultados obtenidos anteriormente, el gen *Gym36* no se expresó al cultivar la cepa en medio PDB.

Inesperadamente, al adicionar el remodelador 5-azacitidina 500  $\mu$ M al día 0 en medio PDB, se observó la aparición en el cultivo de una pigmentación rojiza intensa. De igual manera, pero en menor intensidad se observó dicha pigmentación al utilizar una concentración de 50  $\mu$ M de 5-azacitidina. (Figura 12).

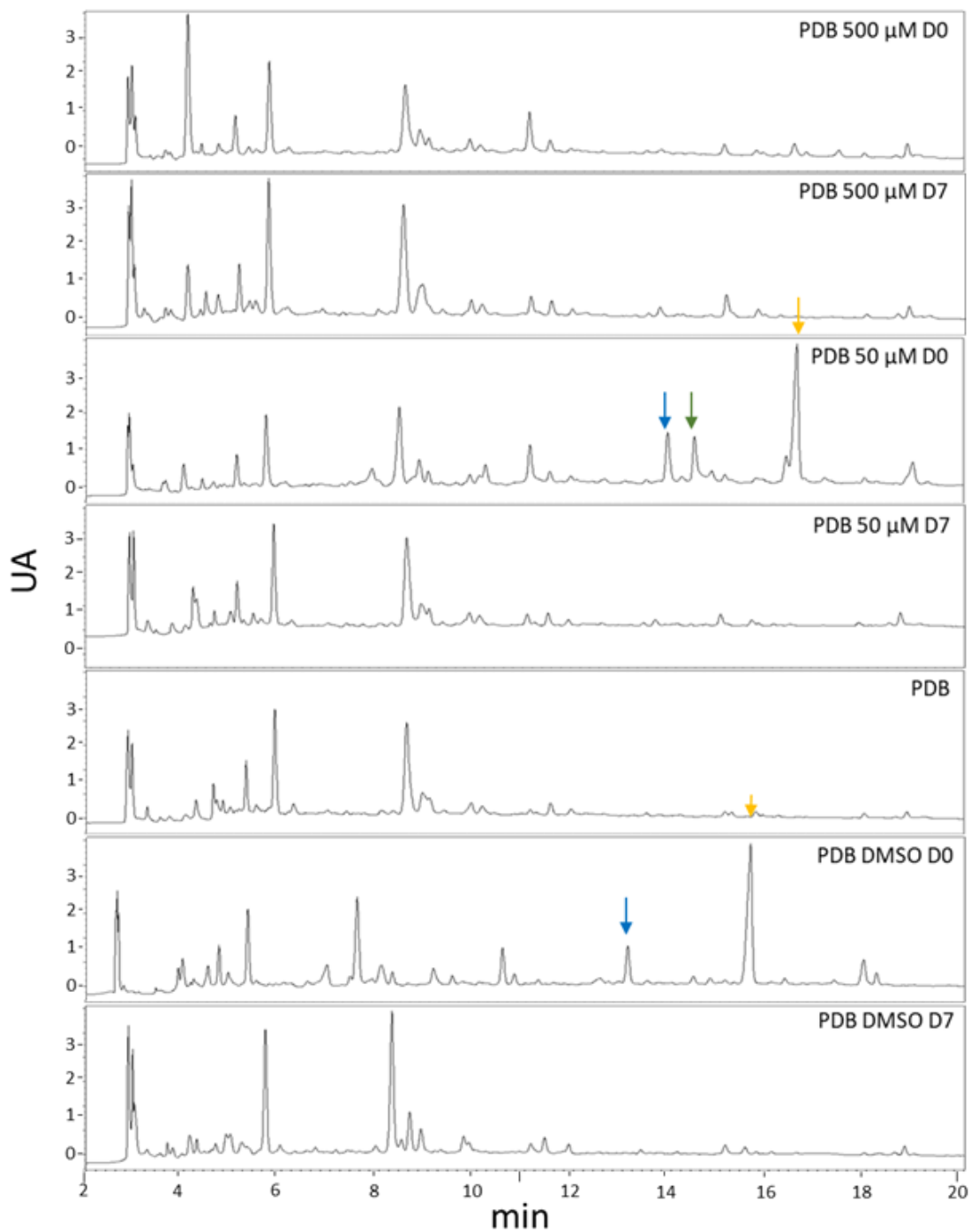
Al analizar los caldos de cada una de las fermentaciones anteriores por HPLC se obtuvieron los perfiles de metabolitos mostrados en la figura 14. A grandes rasgos lo que se observa en medio CYA es la aparición de un pico con un tiempo de retención cercano a 12 min (flecha roja) en todas las condiciones de cultivo en las que se adiciona DMSO, a excepción de la condición con solo DMSO al día 0, y la modificación de algunos de los picos presentes en medio sin tratamiento. En medio PDB los cambios más radicales se observan en las condiciones con 50  $\mu$ M de 5-azacitidina al día 0, y al agregar solo DMSO al día 0. En estas condiciones se observa la aparición de un pico entre los tiempos de retención 15 y 17 min (flecha amarilla), y de otros picos de menor tamaño entre los minutos 13 y 15 (flecha azul y verde).



**Figura 13. Niveles de transcritos relativos de los genes codificantes para enzimas PKS en medio CYA y PDB con el remodelador de cromatina 5-Azacitidina. Medios empleados: (A) CYA - (B) PDB. Concentración de 5-Azacitidina: 500  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 0  $\mu$ M (DMSO); D0-7: Día de adición del remodelador o DMSO. El cálculo de nivel de transcritos relativos se realizó en relación a la del gen GymB en medio CYA. Las barras de error indican la desviación estándar; n= 3.**

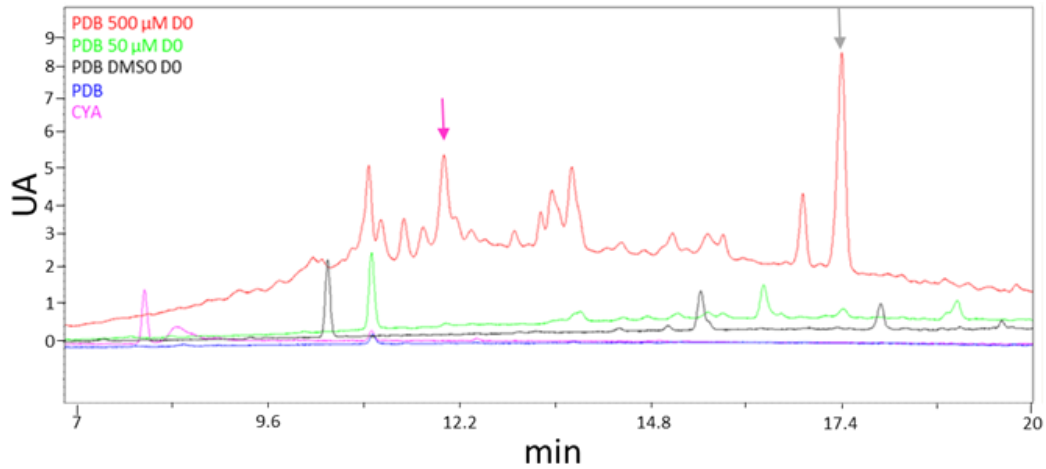


**Figura 14. Cromatogramas a 254 nm de los caldos obtenidos al día 10 de fermentación con el remodelador 5-Azacidina. Flecha roja indica un pico con un tiempo de retención cercano a 12 min aparentemente inducido por la adición de DMSO.**



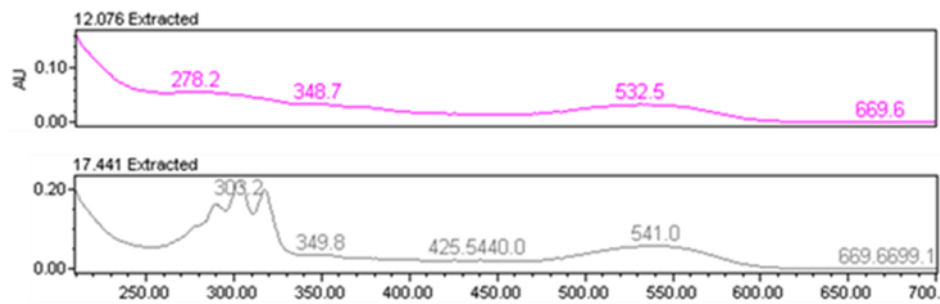
**Figura 14. Cromatogramas a 254 nm de los caldos obtenidos al día 10 de fermentación con el remodelador 5-Azacitidina (Continuación).** Flecha amarilla, azul y verde indican picos con tiempos de retención 14, 14,5 y 17 min, respectivamente. Estos compuestos son aparentemente inducidos por la adición de DMSO al día 0 (amarillo y azul), o por el efecto del 5-azacitidina 50 $\mu$ M al día 0 (verde).

Con el objetivo de identificar el metabolito que estaría dando la pigmentación roja se extrajo un cromatograma a 500 nm (Figura 15).



**Figura 15. Comparación de cromatogramas a 500 nm de distintas condiciones de cultivo de la cepa *Pseudogymnoascus* sp.** PDB 500  $\mu$ M DO (rojo); PDB 50  $\mu$ M DO (verde); PDB DMSO D0 (negro); PDB (Azul); CYA (rosado). Las flechas indican picos con espectros de absorción con máximos cercanos a 535 nm.

Se observa en la figura 15 que en medio PDB con 500  $\mu$ M de 5-azacitidina al día 0 existen múltiples picos entre los tiempos de retención 11 y 17,5 min que no se encuentran presentes en los otros extractos, y que además poseen máximos de absorción entre los 460, 520 y 540 nm (Figura 16)



**Figura 16. Espectro de UV-visible de algunos de los picos cromatográficos mayoritarios observados en el cromatograma a 500 nm entre los tiempos de retención 11 y 17.5 min de la condición de cultivo PDB 500 $\mu$ M de 5-azacitidina.**

#### **4 Construcción de vector de silenciamiento para el gen *GymD***

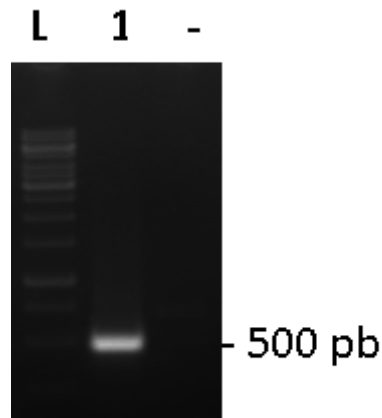
La expresión del gen *GymD* fue inducida al utilizar como medio de cultivo PDB en vez de CYA. Es por ello, que se seleccionó el gen *GymD* por sobre los otros que codifican PKS para atenuar su expresión y posteriormente, identificar el metabolito en cuya síntesis participa. La atenuación del gen *GymD* se llevará a cabo mediante la técnica de ARN de interferencia empleando el plásmido pJL-43, un plásmido no autoreplicativo que se debe insertar en el genoma fúngico, el cual posee dos promotores en sentido convergente que permiten la generación de un ARN de doble hebra del fragmento que se encuentra entre ambos promotores. Este ARN de doble hebra será procesado por la maquinaria celular de interferencia interna del hongo, y llevará a cabo el silenciamiento del gen (Ullán & cols., 2008).

##### **4.1 Construcción plásmido pJL-D**

Para la inserción del fragmento de gen *GymD* entre los promotores convergentes del plásmido pJL-43, el fragmento fue, en primer lugar, amplificado mediante PCR desde ADN genómico con los partidores RNAi-NcoI-GymD-fw y RNAi-GymD-rv (Figura 17). El partidor RNAi-NcoI-GymD-fw posee un sitio de corte para la enzima *NcoI* mientras que el partidor RNAi-GymD-rv fue diseñado sin un sitio de corte para *NcoI* debido a que, en la secuencia nativa, cercano a este partidor, existe un sitio de corte para esta enzima de restricción.

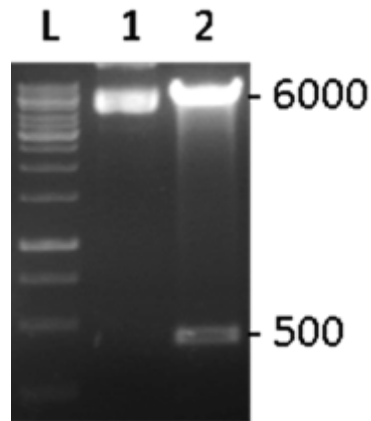
Después, el fragmento amplificado fue purificado y digerido con la enzima *NcoI*, al igual que el plásmido pJL-43.



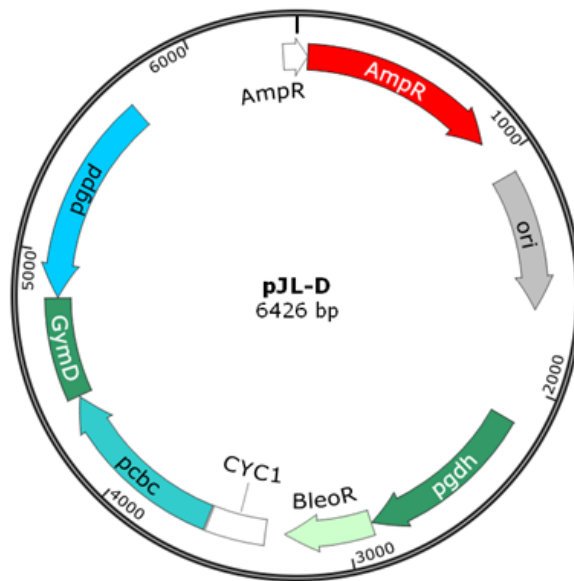


**Figura 17. Amplificación del fragmento del gen *GymD* desde ADN genómico.** L: Estandar de peso molecular de 1 Kb; 1: Amplificado de 468 pb del gen *GymD* con los partidores RNAi-*NcoI*-*GymD*-fw y RNAi-*GymD*-rv ; -: Control negativo.

Tras la digestión ambos productos fueron purificados y ligados. Con el producto resultante de la ligación se transformó *E. coli* DH5- $\alpha$ . Las colonias transformantes fueron seleccionadas por resistencia a ampicilina. Posteriormente, se seleccionaron al azar 8 colonias y, mediante PCR de colonia con los partidores RNAi-*NcoI*-*GymD*-fw y RNAi-*GymD*-rv se confirmó la presencia del plásmido. Entre las colonias con resultado positivo se seleccionó una al azar para, tras ser cultivada, efectuar la extracción de plásmido. Así el plásmido obtenido fue digerido con *NcoI* para la confirmación de la correcta inserción del fragmento (Figura 18), donde se observa que tras ser digerido con la enzima el fragmento clonado es liberado del plásmido. Por otro lado, el plásmido también fue secuenciado con los partidores *pcbc*-Rnai y *pgpd*-Rnai con el mismo propósito. El mapa del plásmido pJL-D se muestra en la figura 19.



**Figura 18. Digestión del plásmido pJL-D para confirmar la inserción del fragmento GymD.** L: Estándar de peso molecular de 1 Kb; 1: Plásmido pJL-D sin digerir; 2: Plásmido pJL-D digerido con *NcoI*.

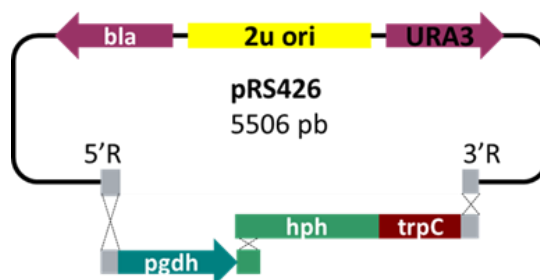


**Figura 19. Esquema del plásmido PJL-D.** pgpd: Promotor de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans*; pcbc: Promotor de la n-isopenicilina sintasa de *Acremonium chrysogenum*; pgdh: Promotor de la glutamato deshidrogenasa de *Aspergillus awamori*; BleoR: Glioxalasa, proteína de resistencia para fleomicina; AmpR: Resistencia contra ampicilina; Ori: Origen de replicación en *E. coli*. CYC1: Terminador de la citocromo oxidasa de *S. cerevisiae*; gymD: Fragmento del gen *GymD*.

## 4.2 Construcción de un cassette para resistencia a higromicina

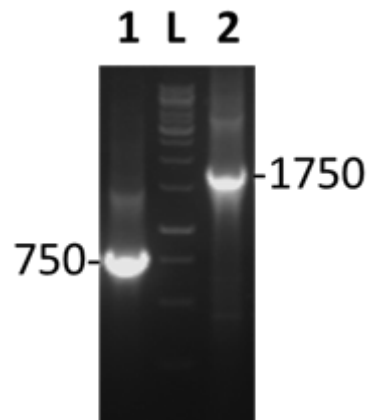
El plásmido pJL-D posee un marcador de selección de resistencia a fleomicina (BleoR). Sin embargo, ensayos previos determinaron que la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB es capaz de resistir concentraciones mayores a 800 µg/mL de fleomicina. Debido a esto se optó por cambiar el marcador de selección por uno de resistencia a higromicina, antibiótico frente al cual la cepa de trabajo no es capaz de crecer a concentraciones mayores de 40 µg/mL. Para ello, el primer paso fue la construcción de un cassette con el gen de resistencia a higromicina el cual posteriormente se introducirá en el plásmido pJL-D.

El gen para la resistencia a higromicina (*hph*), que codifica para una higromicina-B 4-O-Quinasa se obtuvo a partir del plásmido pAN7 (GenBank: Z32698.1). En este plásmido, el gen *hph* se encuentra río abajo del promotor *pgpd*. Con el fin de evitar la redundancia del promotor *pgpd* en el vector de silenciamiento a construir, se procedió a realizar una construcción que comprende el gen *hph* río abajo del promotor *pgdh* (secuencia obtenida del plásmido pJL43) mediante la técnica de *DNA assembler* en levadura (Shao & cols., 2009) (Figura 19), en el plásmido pRS426.



**Figura 20. Esquema del ensamble por recombinación (líneas punteadas) del promotor *pgdh* con el gen *hph* mediante la técnica de *DNA assembler* en el plásmido *prs426*.** *bla*: Beta-lactamasa; *2u ori*: Origen de Replicación en *E. coli*; *URA3*: Orotidina 5 fosfato descarboxilasa; *pgdh*: Promotor de la glutamato deshidrogenasa de *Aspergillus awamori*; *hph*: higromicina-B 4-O-Quinasa; *trpC*: Terminador de *A. nidulans*; 5'R – 3'R: Extremos de recombinación del plásmido pRS426.

La construcción del cassette con el gen de resistencia a higromicina se inició con la amplificación del promotor *pgdh* a partir del plásmido pJL-43 con los partidores R5-*pgdh*-fw y *hph*-*pgdh*-rv, mientras que el gen *hph* se amplificó con los partidores *hph*-fw y R3-*hph*-rv desde el plásmido pAN7, aumentando el tiempo de extensión de los ciclos a 2 min (Figura 21).

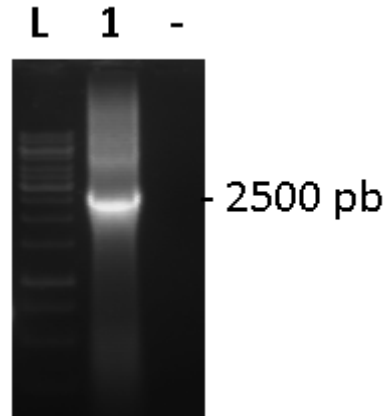


**Figura 21. Amplificación del gen *hph* y el promotor *pgdh*.** L: Estándar de peso molecular de 1 Kb; 1: Promotor *pgdh* amplificado con los partidores R5-*pgdh*-fw y *hph*-*pgdh*-rv desde el plásmido pJL-43; 2: Gen *hph* amplificado con los partidores *hph*-fw y R3-*hph*-rv desde el plásmido pAN7.

Con los dos productos de PCR obtenidos, se procedió a transformar *S. cerevisiae* como se detalla en materiales y métodos, en conjunto con el plásmido pRS426 linearizado. Las colonias transformantes crecidas en medio selectivo SC-Ura fueron cultivadas en medio YPDA para posteriormente, extraer el plásmido.

El plásmido extraído se transformó en *E. coli* DH5- $\alpha$  y se plaqueó en medio selectivo con ampicilina. Las colonias transformantes fueron chequeadas mediante PCR colonia utilizando los partidores R5-*pgdh*-fw y R3-*hph*-rv con el fin de amplificar tanto el promotor como el gen, siempre que ambos hayan sido recombinados correctamente. Para ello se

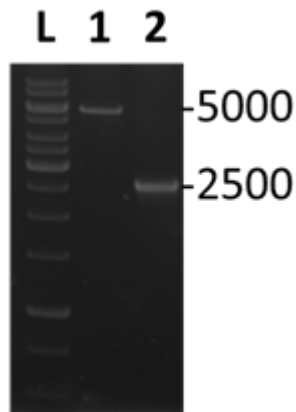
utilizó un tiempo de extensión en los ciclos de 2,75 min (Figura 22). Las colonias que presentaron el plásmido con el cassette de higromicina ensamblado fueron cultivadas y se extrajo plásmido para su posterior uso, el cual se denominó pRS-hph.



**Figura 22. Amplificación del cassette *pgdh-hph*.** L: Estandar de peso molecular de 1 Kb; 1: Amplificado del cassette de resistencia a higromicina resultado de la recombinación en *S. Cerevisiae*; -: Control negativo.

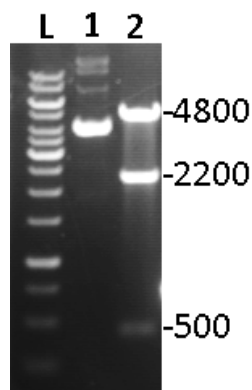
#### 4.3 Clonamiento del cassette *pgdh-hph* en el plásmido pJL-D

Para reemplazar la resistencia a fleomicina del plásmido pJL-D por el cassette de resistencia a higromicina construido se amplificó este cassette desde el plásmido pRS-hph con los partidores *KpnI*-*pgdh-fw* y *HindIII*-*hph-rv*. Tras purificar la banda obtenida, ésta fue digerida con las enzimas *KpnI* y *HindIII* al igual que el plásmido pJL-D. Posteriormente, se purificaron tanto la banda digerida como el plásmido pJL-D digerido, el cual ya no contiene el cassette de resistencia a fleomicina (Figura 23), y se ligaron.



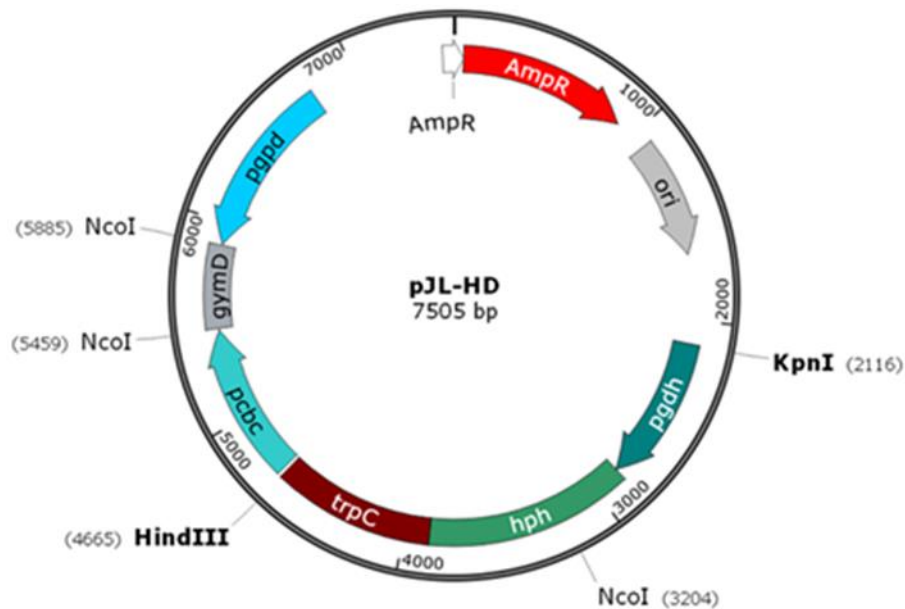
**Figura 23. Purificación tras la digestión con *KpnI* y *HindIII* de los fragmentos para el ensamblaje del plásmido pJL-HD:** L: Estándar de peso molecular de 1 Kb; 1: Fragmento del plásmido pJL-D sin cassette de resistencia a fleomicina; 2: Casette de resistencia a higromicina.

El producto de ligación se transformó en *E. coli* DH5- $\alpha$ . Las colonias transformantes fueron chequeadas por PCR colonia con los partidores *pcbc-Rnai* y *pgpd-Rnai* para verificar la presencia del plásmido. Las colonias positivas fueron cultivadas y se les extrajo el plásmido. Para chequear el correcto ensamble del plásmido se digirió con la enzima *NcoI* (Figura 24).



**Figura 24. Digestión del plásmido pJL-HD para la confirmación del clonamiento del cassette de higromicina:** L: Estándar de peso molecular de 1 Kb; 1: Plásmido pJL-HD sin digerir; 2: Plásmido pJL-HD digerido con *NcoI*.

En la figura 24 se puede observar que al cortar con *NcoI* se generan tres fragmentos, esto debido a los dos sitios de corte a los extremos del fragmento de *GymD* y a un sitio de corte presente en el gen *hph* (figura 25).

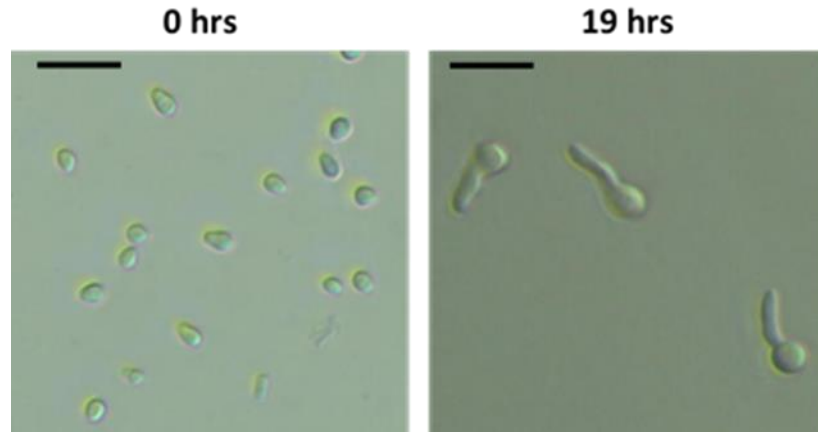


**Figura 25. Esquema del plásmido pJL-HD.** pgpd: Promotor de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans*; pcbc: Promotor de la n-isopenicilina sintasa de *Acremonium chrysogenum*; pgdh: Promotor de la glutamato deshidrogenasa de *Aspergillus awamori*; hph: higromicina-B 4-O-Quinasa; AmpR: Resistencia contra ampicilina; Ori: Origen de replicación en *E.coli*. CYC1: Terminador de la citocromo oxidasa de *S. cerevisiae*; gymD: Fragmento del gen *GymD*.

## 5 Transformación de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB mediante electroporación de conidias germinadas

Con el plásmido de silenciamiento pJL-HD construido se procedió a transformar la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB mediante electroporación de conidias germinadas. Para esto las conidias fueron obtenidas como se indica en materiales y métodos y fueron posteriormente incubadas a 4°C por una noche. Transcurrido el tiempo de incubación estas fueron puestas a crecer en medio CM para inducir su germinación. El tiempo fue de aproximadamente 19 h, tiempo en el cual alrededor del 80% de las

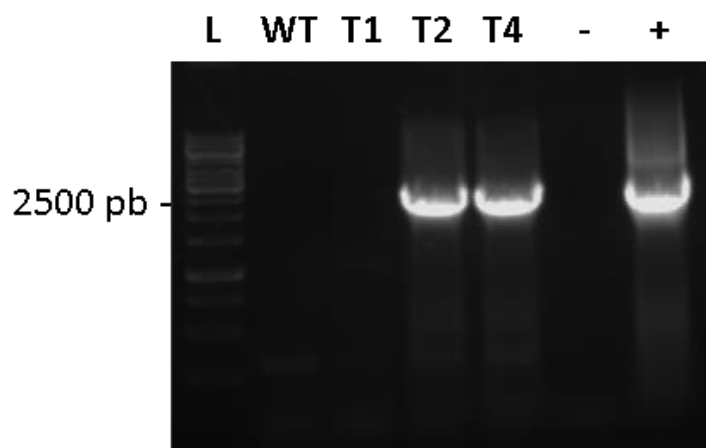
conidias presentó un tubo germinativo de una longitud semejante a dos veces el diámetro de la espora (Figura 26).



**Figura 26. Germinación de conidias en medio CM.** Imágenes obtenidas por microscopía óptica. En la figura 25 se observa las conidias de *Pseudogymnoascus* a tiempo 0 hrs sin germinar. Transcurridas 19 hrs se observa que las conidias aumentaron de diámetro y que además apareció el tubo germinativo (Aumento 40x).

En una primera transformación se obtuvieron 4 colonias transformantes. Estas fueron repicadas y sometidas al proceso de purificación para la obtención de cultivos monoespóricos (provenientes de una sola espora o monocariote). Uno de los transformantes fue descartado debido a defectos en la esporulación. Tras cultivar por dos generaciones las cepas transformantes bajo presión selectiva con higromicina, se procedió a crecer las cepas en medio líquido para extraer ADN y confirmar la inserción del plásmido en el genoma de las cepas transformantes mediante PCR con los partidores R5-pgdh-fw y R3-hph-rv (Figura 27).



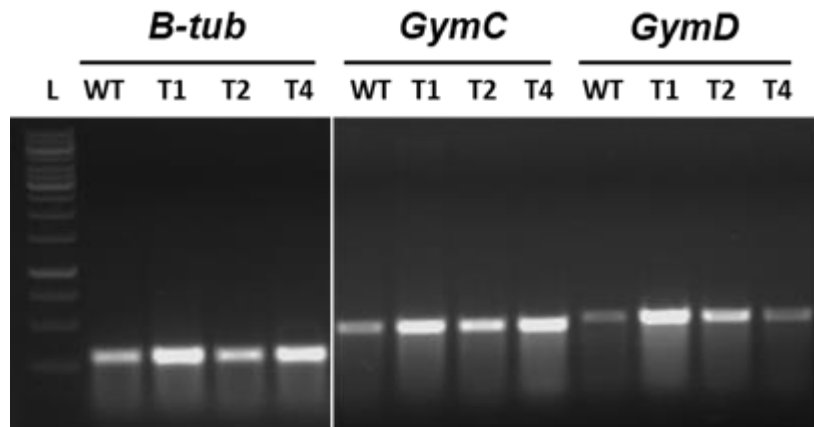


**Figura 27. Confirmación de las cepas transformantes por amplificación del cassette de resistencia a higromicina.** L: Estandar de peso molecular de 1 Kb; WT: Cepa nativa; T1-2-4: Cepas transformantes; -: Control negativo; +: Control positivo, amplificación desde plásmido pJL-HD.

Se puede observar en la figura 26 que se logró amplificar el cassette de resistencia a higromicina desde las cepas transformantes T2 y T4, confirmando la inserción de este en el genoma de la cepa. En la cepa transformante T1 no se observa la amplificación del cassette de resistencia, lo cual se atribuyó en esta oportunidad a un posible mal estado en la calidad de ADN genómico extraído debido a que la cepa transformante T1 si es capaz de crecer bajo una concentración de 40µg/mL de higromicina.

## 6 Análisis de la expresión del gen *GymD* en las cepas transformantes

Las tres cepas transformantes se crecieron en medio PDB para inducir la expresión del gen *GymD*. A partir del micelio se extrajo ARN y se hizo el RT-PCR con los partidores específicos para *GymD*, y para  $\beta$ -tubulina. Además, se utilizó *GymC* como control del estado metabólico de la cepa (Figura 28).



**Figura 28.** RT-PCR de las cepas transformantes T1, T2 y T4 para los genes *GymD* y *GymC*: L: Estándar de peso molecular de 1 Kb; WT: Cepa nativa; T1-2-4: Cepas transformantes.

En la figura 28 se observa que los niveles de transcrito para los genes *GymD* y *GymC* en las cepas transformantes no varían de manera significativa (en relación a la intensidad de banda de la  $\beta$ -tubulina), a excepción de la transformante T4 donde sí que se observa una disminución en los niveles de transcrito del gen *GymD* mientras que los del gen *GymC* se mantienen similares. Para cuantificar los niveles de transcrito y comprobar que el transformante T4 presenta el gen *GymD* atenuado, se requiere realizar un RT-PCR cuantitativo.

## DISCUSIÓN

El conjunto de metabolitos secundarios sintetizados por una cepa fúngica es determinado por dos aspectos generales: i) Los *clusters* de síntesis de metabolitos secundarios que ésta posea en su genoma, y ii) Las condiciones de cultivo o crecimiento que determinarán si estos *clusters* se expresan o no. Por ende, para poder estudiar la totalidad del potencial de síntesis de metabolitos secundarios en una especie, es necesario conocer la totalidad de los *clusters* que posee dicha especie, y también las condiciones que permiten inducir la expresión de dichos *clusters* (Brakhage, 2013).

En nuestro grupo de investigación se tiene como organismo modelo de estudio la cepa fúngica antártica *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB. Considerando lo dicho anteriormente, el objetivo final que se persigue es empleando las herramientas moleculares, bioinformáticas y químicas necesarias, identificar todos los *clusters* de metabolitos secundarios presentes en el genoma de esta cepa y determinar que metabolito es sintetizado por cada *cluster*.

En este contexto, este Seminario de Título aborda el estudio de los *clusters* de metabolitos secundarios cuya enzima principal es una PKS presentes en la cepa fúngica antártica *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB

## Identificación y análisis de genes codificantes para enzimas PKS

Las enzimas PKS corresponden al tipo de enzimas responsables de la síntesis de metabolitos secundarios más abundantes en hongos filamentosos (junto a las enzimas NRPS), donde la modularidad y conservación de sus dominios catalíticos facilitan la predicción de estos mediante el uso de herramientas bioinformáticas (Medema & cols., 2011).

Como se observa en la tabla 7, los fragmentos previamente identificados de los genes *GymB*, *GymC*, *GymD* y *Gym722* poseen un alto porcentaje de similitud con genes codificantes para enzimas PKS de la cepa *P. verrucosus* UAMH 10579. Al analizar los porcentajes de similitud con genes con función conocida se observa que los fragmentos *GymD* y *Gym722* poseen mayores porcentajes de similitud que los fragmentos *GymB* y *GymC*, lo cual puede deberse a la región o dominio de la enzima que codifica dicha secuencia. Al corresponder las secuencias de los fragmentos *GymD* y *Gym722* a parte del dominio dominio KS de la enzima (Figura 5), esta secuencia tenderá a ser mayormente conservada. Por el contrario, los fragmentos *GymC* y *GymB* poseen una mayor diferencia con la secuencia con mayor grado de similitud, debido a que la región que abarca dichos fragmentos corresponden principalmente a elementos estructurales de andamiaje para la enzima, que pueden o no poseer un grado de conservación (Herbst & Townsend, 2018).

Al analizar los genomas de *P. verrucosus* y *P. destructans* se encontró en cada especie siete *clusters* cuya enzima principal corresponde a una enzima PKS (Tabla 8). Entre las enzimas PKS encontradas en ambas especies existe un alto porcentaje de similitud

(>98%) (Tabla 9 y Tabla 10), por lo cual se procedió a clasificar arbitrariamente estas enzimas dentro de siete tipos que se denominaron A-G. Esto sugiere que ambas especies compartirían un perfil o potencial de síntesis metabólico similar en cuanto a policétidos se refiere, siendo este conjunto de compuestos buenos candidatos a ser característicos del género *Pseudogymnoascus* (Frisvad & cols, 2008). Sin embargo, también podría ser que los metabolitos secundarios sintetizados por estas PKS poseyeran importantes diferencias estructurales debido a la ausencia o presencia de enzimas modificadoras dentro del *cluster*. La dilucidación de estas diferencias requiere de un análisis bioinformático más exhaustivo de la región que comprende estos *clusters*.

Dada la presencia de dominios reductores en su secuencia, podemos clasificar los tipos de PKS detectados según su poder reductor: Los tipos de PKS B, C, D y F son enzimas del tipo no reductoras (NR) y las enzimas PKS de los tipos A y G, son altamente reductoras (HR). Esta separación en grupos dada la naturaleza reductora de la enzima se puede observar también al comparar la secuencia aminoacídica de los dominios KS (Tabla 10), en donde se observa que las PKS no reductoras de tipo B, C, D y F se agrupan dados los porcentajes de similitud. Esto ocurre de igual manera para las PKS reductoras de los tipos A y G. Este resultado es similar al observado en el trabajo de Gallo & cols, en donde al realizar un análisis filogenético de los dominios KS de un conjunto de enzimas PKS responsable de la síntesis de diversas micotoxinas, la secuencia aminoacídica de este dominio permitió diferenciar las tres clasificaciones existentes, PKSs del tipo HR, PR y NR (Gallo & cols., 2013). Por otro lado, existen tres tipos de PKS presentes en los genomas de *P. verrucosus* y *P. destructans* no identificados a la fecha en la cepa de estudio. Al intentar amplificar las enzimas del tipo E, F y G mediante el diseño de partidores específicos en la región del dominio KS, no

se obtuvieron resultados positivos. Una posible alternativa corresponde a diseñar partidores con especificidad a otro de los dominios catalíticos de las enzimas, tal como el dominio Acil-transferasa (AT) o bien los dominios reductores enoil-reductasa (ER) o ceto-reductasa (KR) en el caso de una PKS reductora como la del tipo G.

Como estrategia alternativa para la identificación de nuevas enzimas PKS también se empleó el uso de partidores degenerados con especificidad para enzimas PKS, en donde el uso de los partidores de la serie LC3-LC5c permitió amplificar un fragmento identificado como el dominio KR de una enzima PKS distinta a las encontradas anteriormente en cepas del género *Pseudogymnoascus*. Este fragmento se denominó *Gym36*.

El fragmento *Gym36*, a diferencia de los otros genes identificados, no se encuentra presente en los genomas de *P. verrucosus* o *P. destructans*, y al analizar la secuencia con la base de datos de la NCBI mediante BLASTx la secuencia con mayor grado de similitud proviene del hongo filamentoso *Penicillium flavigenum*. El género *Penicillium* está compuesto por más de 354 especies, de las cuales múltiples son de importancia industrial para la producción de metabolitos secundarios con interés farmacológico, entre ellas *P. chrysogenum* empleado para la producción de penicilina (Nielsen & cols., 2017). La baja similitud a nivel aminoacídico con las secuencias presentes en la base de datos de la NCBI, y la presencia de esta solo en los genomas de la cepa en estudio y de solo una cepa de *P. flavigenum*, sugieren que se trata de una enzima PKS con alta probabilidad de generar un metabolito no previamente descrito.

## **Análisis de la expresión de los genes codificantes para PKSs en la cepa**

### ***Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB**

La producción de metabolitos secundarios en hongos se encuentra fuertemente relacionada con el favorecimiento de su crecimiento frente al ambiente al cual se encuentra o la presencia de otros organismos competidores. Por ello la expresión de un *cluster* en particular suele estar comandada por la capacidad de sensar determinado estímulo o señal para así generar una respuesta, siendo en este caso la síntesis de determinado metabolito (Brakhage, 2013). En estudios previos realizados en el laboratorio en la cepa *P. sp* 131209-E2A-C5II-EB, se observó mediante RT-PCR que los genes *GymD* y *Gym722* poseen bajos niveles de expresión en relación con los genes *GymB* y *GymC*, tanto en medio CYA como medio CM. En esta oportunidad, se utilizaron dos aproximaciones para la inducción de la expresión de estos dos genes codificantes para enzimas PKS; la primera, OSMAC mediante la fermentación de la cepa en cinco medios de cultivo distintos, y la segunda, adición del remodelador de cromatina 5-azacitidina.

Como resultado de la fermentación de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB en diferentes medios de cultivo, se observó que es posible inducir la expresión de cuatro de los cinco genes estudiados. En concreto, los genes *Gym36* y *GymD* presentaron mayores niveles de expresión en medio PDB (incremento de 16 veces), el gen *GymB* en medio CYA con lactosa (semejante a los observados en medio YES) (incremento de 2 veces), el gen *GymC* en medio YES (incremento de 3 veces), y por último el gen *Gym722* no se pudo inducir.

Como uno de los componentes más importantes del medio de cultivo, la fuente de carbono juega un rol crítico como fuente de precursores y energía para la síntesis de biomasa y metabolitos secundarios. El almidón y la lactosa son consideradas fuentes de carbono de lenta asimilación debido a las distintas transformaciones que deben sufrir antes de poder ser incorporadas en el metabolismo central, por lo que al disponer solo de estas fuentes se simula un ambiente de baja disponibilidad de nutrientes, alterando el crecimiento, la morfología y la producción de metabolitos secundarios (Jia & cols., 2009).

Los medios en base a extracto de papa PDA y PDB, donde la principal fuente de carbono corresponde a almidón, son ampliamente utilizados para el crecimiento de diversas cepas fúngicas pertenecientes a géneros que pueden bien o no ser cercanos filogenéticamente. Con frecuencia son utilizados para obtener una mayor tasa de crecimiento, mayor tasa de esporulación y también para la producción de diversos metabolitos. A modo de ejemplo en la cepa *Fusarium moniliforme* KUMBF1201, un hongo parásito de plantaciones de cereales, el cultivo en medio PDA y PDB, dentro de una batería de 14 medios, propició la mayor tasa de crecimiento al igual que los mayores niveles de producción de pigmentos (Pradeep & cols., 2013).

Por otro lado, en la especie *Aspergillus terreus* se ha observado que la síntesis de lovastatina se ve favorecida al utilizar como fuente de carbono lactosa, a cambio de una disminuida tasa de crecimiento en comparación al utilizar fuentes de carbono como sacarosa o glucosa (Jia & cols., 2009). Comportamientos como este se pueden observar también en el hongo *Acremonium chrysogenum*, donde los genes codificantes para los genes encargados de la síntesis de cefalosporina se ven reprimidos por el regulador



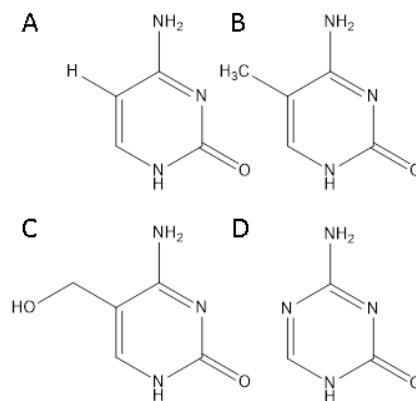
CreA al crecer la cepa con glucosa como fuente de carbono, represión la cual no sucede al utilizar lactosa (Jekosch & cols., 2000).

Por su parte, el medio YES es un medio frecuentemente utilizado en la producción de metabolitos secundarios en hongos filamentosos el cual destaca por ser un medio complejo y rico en sacarosa (15%), una fuente de carbono de rápida asimilación. El crecimiento de cepas fúngicas en medio YES tiende a proveer un espectro de metabolitos más amplio que otros medios (Fischer & cols., 1999; Malmstrøm & cols., 2000). Concordando con lo mencionado, en esta oportunidad los resultados sugieren que la expresión tanto el gen *GymB* como del gen *GymC* es inducida de manera consistente en medio YES.

Otro agente capaz de regular la síntesis de metabolitos secundarios en hongos corresponde a la presión osmótica. Las cepas aisladas desde ambientes marinos, al provenir de un ambiente de alta osmolaridad deben ser capaces de sensor esta y responder frente a posibles variaciones, lo cual altera tanto su crecimiento como metabolismo secundario. A modo de ejemplo se ha reportado en cepas del género *Penicillium* aisladas desde ambientes marinos el aumento en la tasa de crecimiento y la producción del alcaloide crisogina al aumentar las concentraciones de sal en el medio (Huang & cols., 2011). En esta oportunidad al comparar el perfil de expresión de los genes en medio YES y medio YES 5% NaCl se observa que la adición de este 5% de NaCl estaría inhibiendo la expresión de estos, dando pie a considerar que, si bien la respuesta osmoadaptativa en hongos tiende a ser conservada, esta no es idéntica para distintas especies (Duran & cols., 2010).

En los últimos años el uso de remodeladores de cromatina ha demostrado ser una herramienta útil y de fácil implementación para la activación de *clusters* biosintéticos en hongos filamentosos, siendo su principal ventaja no requerir manipulación genética de la cepa en estudio. Por otro lado, en hongos filamentosos se ha comprobado que la regulación basada en la modificación del estado de la cromatina es uno de los principales mecanismos para la modulación del metabolismo secundario (Fisch & cols., 2009; Pfannenstiel & Keller, 2019).

El compuesto 5-azacitidina es un análogo del nucleósido citidina, que forma parte de la cadena de ADN y su adición en el medio de cultivo permite la incorporación de este en la macromolécula. El mecanismo de acción de la 5-azacitidina radica en su incapacidad de ser metilado por las enzimas del tipo ADN metil transferasas, la cual es utilizada como una marca epigenética en determinadas zonas de heterocromatina. Al incorporar esta molécula en las hebras de ADN el estado de eucromatina se ve favorecido, y por ende la disponibilidad para la unión de factores y de la maquinaria de transcripción a la hebra de ADN (Figura 29) (Fisch & cols., 2009).



**Figura 29. Estructura de la citosina y análogos.** A: Citosina; B: Citosina metilada; C: Citosina Hidroximetilada; D: Base nitrogenada de la 5-azacitidina.

Se ha reportado que la adición del remodelador 5-azacitidina es capaz de inducir la expresión de CGBs los cuales se encontraban previamente silentes en cepas fúngicas de múltiples géneros. A modo de ejemplo Wang y colaboradores lograron identificar dos nuevos metabolitos, los meroterpenos Antlatinona A y B, a partir de una cepa de *Penicillium citreonigrum*, al adicionar el remodelador 5-azacitidina a las condiciones de cultivo, (Wang & cols., 2010). Por otro lado, Qadri y cols reportaron que la adición de 5-azacitidina en el cultivo de la cepa *Muscodora yucatanensis* Ni30 incremento la expresión de cuatro genes codificantes para enzimas PKS, alcanzando un incremento de hasta 140 veces en uno de estos cuatro genes (Qadri & cols., 2017).

En este trabajo se determinó que la adición de 5-azacitidina no aumentó los niveles de transcrito de los genes estudiados. Al considerar el modo de acción el 5-azacitidina es factible que su adición al medio de cultivo no se traduzca en un aumento en la transcripción de genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios. Es más, también es posible el efecto contrario. Por ejemplo Lin y colaboradores reportaron que al cultivar una cepa de *Aspergillus flavus* en presencia del remodelador 5-azacitidina la producción de aflatoxinas se vio inhibida, lo cual en parte fue atribuido a una disminución en la expresión de los genes responsables de su síntesis (Lin & cols., 2013). Por otro lado, también se ha descrito que el mayor control epigenético en hongos está dado por modificaciones post-transcripcionales en histonas, y no así por marcas epigenéticas en el ADN (Pfannenstiel & Keller, 2019). En particular en el trabajo realizado por Fisch y colaboradores, donde se observó que el remodelador de cromatina ácido suberoilánido hidroxámico (SAHA), un inhibidor de enzimas deacetilasa de histonas (HDACs), posee un mayor efecto sobre la expresión de los genes codificantes para

enzimas PKS y NRPS de la cepa *Aspergillus niger* ATCC 1015 que el remodelador 5-azacitidina (Fisch & cols., 2009).

Como resultado inesperado de este experimento epigenético, en las condiciones control con DMSO al día 0 y al día 7, se pudieron ver aumentos en los niveles de expresión similares o incluso mayores a los observados al adicionar el remodelador a distintas concentraciones. El DMSO es un compuesto orgánico ampliamente utilizado en investigación dadas sus características polares apróticas como solvente. Por otro lado, se ha reportado que la adición de este compuesto por si solo es capaz de alterar la producción de metabolitos secundarios. En particular, en cultivos de las cepas *Streptomyces venezuelae* y *Streptomyces glaucescens* se ha reportado que al ser cultivados en presencia de 3% de DMSO, incrementó la producción de cloranfenicol y tetracenomicina C respectivamente (Chen & cols, 2000). También se ha descrito que tanto en células de ratón, como en preosteoblastos, la adición de DMSO genera variaciones en el estado de metilación de la citosina en el ADN, tanto aumentando o disminuyendo el porcentaje de metilación, o bien induciendo hidroximetilaciones de la citosina (figura 29). Las modificaciones del tipo hidroximetilación, al igual que una metilación, es capaz de influenciar en el estado de compactación de la cromatina (Thaler & cols., 2012; Iwatani & cols., 2006).

Este posible efecto de inducción de la expresión de metabolitos secundarios en el hongo *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB tras la adición de DMSO se ve respaldado por los resultados obtenidos del análisis de los perfiles cromatográficos en las distintas condiciones de cultivo. En los cromatogramas de la figura 14, se observa la existencia de un pico con tiempo de retención cercano a los 12 min (flecha roja) en los cultivos en

medio CYA con DMSO (a excepción de la condición con DMSO agregado al día 0), cuya síntesis pareciera ser inducida por la adición de DMSO. Por su parte, en medio PDB destaca la aparición de dos picos con tiempos de retención cercanos a los 14 y 17 min (flechas azules y amarillas) en las condiciones de DMSO al día 0 y de 50  $\mu$ M de 5-azacitidina al día 0. En esta última condición, aparece además un pico con tiempo de retención cercano a los 15 min, lo cual se podría atribuirse al posible efecto combinado entre el DMSO y el remodelador.

En la condición de cultivo con medio PDB y 500 $\mu$ M de 5-azacitidina, a pesar de no inducir la expresión de alguno de los genes estudiados, se observó la aparición de una pigmentación rojiza intensa en el caldo de cultivo. Al analizar el perfil del extracto del caldo mediante HPLC en un cromatograma a 500 nm, longitud de onda en la que absorben compuestos de tonalidad roja, se pudo observar la aparición de un conjunto de picos con tiempos de retención entre los 10 y 18 min. Estos múltiples picos presentaron espectros de absorción muy similares (datos no mostrados), que poseen máximos de absorción entre los 450 y 540 nm, lo que implica que son estos compuestos los que estarían otorgando la coloración al caldo. Este resultado da cuenta de la activación de un posible cluster biosintético no identificado en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, dando origen a una familia de compuestos con estructuras similares, en donde muchos de estos picos pueden corresponder a intermediarios de la ruta de biosíntesis de un pigmento de coloración rojiza.

## **Atenuación del gen *GymD* en cepas transformantes del hongo**

### ***Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB**

La incorporación de material genético al genoma de hongos filamentosos es un procedimiento en donde la técnica que se utilice depende fuertemente del género o incluso especie de la cepa en la cual se trabaje. Entre las técnicas descritas más utilizadas se encuentra la transformación química mediante la generación de protoplastos, transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, y transformación por electroporación de conidias. La principal razón por la cual se dificulta la transformación en hongos filamentosos es la diversidad de composición de la pared celular que existe entre distintas especies y géneros (Li D. & cols., 2017; Poyedinok & Blume, 2018).

A la fecha, la única técnica que se ha utilizado para transformar cepas del género *Pseudogymnoascus* corresponde a la mediada por *A. tumefaciens* (Zhang & cols., 2015; Zhang & cols., 2018). Actualmente en nuestro laboratorio se están desarrollando protocolos para la transformación de la cepa 131209-E2A-C5II-EB empleando tanto transformación por protoplastos, como electroporación de conidias germinadas.

En este trabajo se muestra uno de los resultados preliminares donde de un evento de transformación por electroporación se obtuvieron 4 cepas transformantes al utilizar 3 µg de ADN. Este rendimiento es considerado bajo, principalmente por el hecho que al emplear la técnica de atenuación por ARNi, es necesario contar con un alto número de cepas transformantes debido a que no todas las cepas transformantes presentarán altos niveles de atenuación. Una forma de mejorar el rendimiento es utilizando distintos

tiempos de germinación, con lo cual se espera modificar el estado y composición de la pared celular del tubo germinativo, alterando la permeabilidad a la entrada de ADN (Xu & cols., 2014).

El porcentaje de transformantes con atenuación efectiva con el plásmido empleado está entre 15-20% en los hongos *Penicillium chrysogenum* y *Acremoium chrysogenum* (Ullán & cols., 2008). Una atenuación efectiva depende en parte de la capacidad de reconocimiento de la maquinaria de transcripción de la cepa por los promotores adyacentes al fragmento del gen que se quiere atenuar, pgpd y pcbc (Figura 25). Respecto a esto Zhang y colaboradores lograron expresar el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor pgpd en la especie *Pseudogymnoascus destructans*, lo cual indica que, a lo menos, uno de los dos promotores en el plásmido pJL-HD es reconocido por la maquinaria de transcripción de hongos del género *Pseudogymnoascus* (Zhang & cols., 2018).

De las cuatro cepas transformantes obtenidas, tres fueron sometidas a análisis de la expresión del gen *GymD*, de las cuales solo una, la transformante TD4, presentó una aparente disminución en los niveles de transcrito del gen. Debido a que para comparar de mejor forma el perfil cromatográfico entre la cepa nativa y la cepa atenuada se debe contar con el mayor grado de atenuación posible, es necesario obtener un mayor número de cepas transformantes que alcancen niveles de atenuación entre el 70 y 100%, y así poder identificar de mejor manera que pico o picos corresponden a los metabolitos sintetizados por las enzimas del *cluster* del gen atenuado.

## CONCLUSIONES

En la cepa estudiada *Pseudogymnoascus sp* 131209-E2A-C5II-EB se han identificado 5 genes codificantes para enzimas PKS (*GymB*, *GymC*, *GymD*, *Gym722* y *Gym36*) para los cuales los metabolitos que sintetizan aún no han sido reportados. Entre ellos, *GymB*, *GymC*, *GymD* y *Gym722* son comunes para las especies *P. destructans*, *P. verrucosus* y la cepa *Pseudogymnoascus sp* 131209-E2A-C5II-EB, definiendo así un posible grupo de enzimas PKS comunes a nivel de género. Por su parte, *Gym36*, identificado en este trabajo, es hasta el momento propio de la cepa en estudio

Empleando diferentes medios de cultivo se logró inducir la expresión de los genes *GymB*, *GymC*, *GymD* y *Gym36* en 2 (medio CYA lac), 3 (medio YES), 16 y 16 veces (medio PDB) respectivamente con respecto al medio de cultivo estándar (CYA). El gen *Gym722* se mantuvo silente en todas las condiciones ensayadas. Por otro lado, el remodelador 5-azacitidina no generó la inducción de la expresión de ninguno de los genes estudiados, pero si provocó la inducción de la síntesis de una familia de pigmentos de tonalidad roja. Inesperadamente el DMSO por si solo si alteró positivamente los niveles de expresión de los genes estudiados. En particular *GymB*, *GymC* y *GymD* vieron incrementada su expresión de forma notoria (entre 2 y 4 veces). Este trabajo constituye el primer reporte de la implementación de la técnica OSMAC y de remodeladores de cromatina en un hongo del género *Pseudogymnoascus* con el fin de inducir la expresión de genes codificantes para enzimas PKS.



Finalmente, mediante la transformación por electroporación de conidias germinadas y la técnica de ARNi con el plásmido pJL-HD, se obtuvo una cepa transformante que presentó una disminución en los niveles de transcripción del gen *GymD*.

Como trabajo a realizar se contempla obtener un mayor número de cepas transformantes con el gen *GymD* atenuado, y de esta forma poder determinar mediante comparación de perfiles cromatográficos por HPLC con respecto a la cepa silvestre, el posible metabolito sintetizado por el *cluster*.

## REFERENCIAS

- Albright, J. C., Henke, M. T., Soukup, A. A., McClure, R. A., Thomson, R. J., Keller, N. P., & Kelleher, N. L. (2015). Large-scale metabolomics reveals a complex response of *Aspergillus nidulans* to epigenetic perturbation. *ACS chemical biology*, 10(6), 1535-1541.
- Archer, D. B., & Dyer, P. S. (2004). From genomics to post-genomics in *Aspergillus*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(5), 499-504.
- Bingle, L. E., Simpson, T. J., & Lazarus, C. M. (1999). Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genetics and Biology*, 26(3), 209-223.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American journal of botany*, 98(3), 426-438.
- Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 21.
- Chen, G., Li, X., Waters, B., & Davies, J. (2000). Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide. *The Journal of antibiotics*, 53(10), 1145-1153.
- Chooi, Y. H., & Tang, Y. (2012). Navigating the fungal polyketide chemical space: from genes to molecules. *The Journal of organic chemistry*, 77(22), 9933-9953.
- de Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., ... & Battaglia, E. (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome biology*, 18(1), 28.
- Duran, R., Cary, J. W., & Calvo, A. M. (2010). Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. *Toxins*, 2(4), 367-381.
- Fernandes, M., Keller, N. P., & Adams, T. H. (1998). Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AfIR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Molecular microbiology*, 28(6), 1355-1365.
- Figuroa, L., Jiménez, C., Rodríguez, J., Areche, C., Chávez, R., Henríquez, M., ... & Vaca, I. (2015). 3-Nitroasterric acid derivatives from an Antarctic sponge-derived *Pseudogymnoascus* sp. fungus. *Journal of natural products*, 78(4), 919-923.
- Fisch, K. M., Gillaspay, A. F., Gipson, M., Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Jackson, L., ... & Cichewicz, R. H. (2009). Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(9), 1199-1213.
- Fischer, G., Schwalbe, R., Möller, M., Ostrowski, R., & Dott, W. (1999). Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility. *Chemosphere*, 39(5), 795-810.

- Frisvad, J. C., Andersen, B., & Thrane, U. (2008). The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological research*, 112(2), 231-240.
- Gallo, A., Ferrara, M., & Perrone, G. (2013). Phylogenetic study of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of mycotoxins. *Toxins*, 5(4), 717-742.
- Gross, H. (2007). Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(2), 267-277.
- Henríquez, M., Vergara, K., Norambuena, J., Beiza, A., Maza, F., Ubilla, P., ... & Darias, M. J. (2014). Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World journal of microbiology and biotechnology*, 30(1), 65-76.
- Herbst, D. A., Townsend, C. A., & Maier, T. (2018). The architectures of iterative type I PKS and FAS. *Natural product reports*, 35(10), 1046-1069.
- Hewage, R. T., Aree, T., Mahidol, C., Ruchirawat, S., & Kittakoop, P. (2014). One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. *Phytochemistry*, 108, 87-94.
- Huang, J., Lu, C., Qian, X., Huang, Y., Zheng, Z., & Shen, Y. (2011). Effect of salinity on the growth, biological activity and secondary metabolites of some marine fungi. *Acta Oceanologica Sinica*, 30(3), 118.
- Iwatani, M., Ikegami, K., Kremenska, Y., Hattori, N., Tanaka, S., Yagi, S., & Shiota, K. (2006). Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem cells*, 24(11), 2549-2556.
- Jekosch, K., & Kück, U. (2000). Loss of glucose repression in an *Acremonium chrysogenum*  $\beta$ -lactam producer strain and its restoration by multiple copies of the *cre1* gene. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(4), 556-563.
- Jia, Z., Zhang, X., & Cao, X. (2009). Effects of carbon sources on fungal morphology and lovastatin biosynthesis by submerged cultivation of *Aspergillus terreus*. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 4(5), 672-677.
- Keatinge-Clay, A. T. (2012). The structures of type I polyketide synthases. *Natural product reports*, 29(10), 1050-1073.
- Keller, N. P. (2018). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology* volume 17, pages167–180
- Khaldi, N., Collemare, J., Lebrun, M. H., & Wolfe, K. H. (2008). Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi. *Genome biology*, 9(1), R18.

- Khaldi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H., & Fedorova, N. D. (2010). SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 47(9), 736-741.
- Larsen, T. O., Smedsgaard, J., Nielsen, K. F., Hansen, M. E., & Frisvad, J. C. (2005). Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural product reports*, 22(6), 672-695.
- Li, D., Tang, Y., Lin, J., & Cai, W. (2017). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial cell factories*, 16(1), 168.
- Li, X., Xia, Z., Tang, J., Wu, J., Tong, J., Li, M., ... & Wang, L. (2017). Identification and biological evaluation of secondary metabolites from marine derived Fungi-*Aspergillus* sp. SCSLOW3, Cultivated in the presence of epigenetic modifying agents. *Molecules*, 22(8), 1302.
- Lin, J. Q., Zhao, X. X., Wang, C. C., Xie, Y., Li, G. H., & He, Z. M. (2013). 5-Azacytidine inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Annals of microbiology*, 63(2), 763-769.
- Liu, W. C., Yang, F., Zhang, R., Shi, X., Lu, X. H., Luan, Y. S., ... & Dong, Y. S. (2016). Production of polyketides with anthelmintic activity by the fungus *Talaromyces wortmannii* using one strain-many compounds (OSMAC) method. *Phytochemistry letters*, 18, 157-161.
- Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Focus: Drug Development: Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *The Yale journal of biology and medicine*, 90(1), 135.
- Lysøe, E., Seong, K. Y., & Kistler, H. C. (2011). The transcriptome of *Fusarium graminearum* during the infection of wheat. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(9), 995-1000.
- Malmstrøm, J., Christophersen, C., & Frisvad, J. C. (2000). Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. *Phytochemistry*, 54(3), 301-309.
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., ... & Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research*, 39(suppl\_2), W339-W346.
- Minnis, A. M., & Lindner, D. L. (2013). Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal biology*, 117(9), 638-649.
- Nielsen, J. C., Grijseels, S., Prigent, S., Ji, B., Dainat, J., Nielsen, K. F., ... & Nielsen, J. (2017). Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. *Nature microbiology*, 2(6), 17044.

- Nützmann, H. W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Gacek, A., ... & Brakhage, A. A. (2011). Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34), 14282-14287.
- Parish, C. A., Cruz, M. D. L., Smith, S. K., Zink, D., Baxter, J., Tucker-Samaras, S., ... & Vicente, F. (2008). Antisense-guided isolation and structure elucidation of pannomycin, a substituted cis-decalin from *Geomyces pannorum*. *Journal of natural products*, 72(1), 59-62.
- Peláez, F. (2005). Biological Activities of Fungal Metabolites. En Zhiqiang, A. (ed), *Handbook of Industrial Mycology*. pp 49-92. Marcel Dekker, New York, NY.
- Pfannenstiel, B. T., & Keller, N. P. (2019). On top of biosynthetic gene clusters: How epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi. *Biotechnology advances*.
- Poyedinok, N. L., & Blume, Y. B. (2018). Advances, Problems, and Prospects of Genetic Transformation of Fungi. *Cytology and Genetics*, 52(2), 139-154.
- Pradeep, F. S., Begam, M. S., Palaniswamy, M., & Pradeep, B. V. (2013). Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. *World Applied Sciences Journal*, 22(1), 70-77.
- Purić, J., Vieira, G., Cavalca, L. B., Sette, L. D., Ferreira, H., Vieira, M. L. C., & Sass, D. C. (2018). Activity of Antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. *Letters in applied microbiology*, 66(6), 530-536.
- Qadri, M., Nalli, Y., Jain, S. K., Chaubey, A., Ali, A., Strobel, G. A., ... & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2017). An insight into the secondary metabolism of *Muscodora yucatanensis*: small-molecule epigenetic modifiers induce expression of secondary metabolism-related genes and production of new metabolites in the endophyte. *Microbial ecology*, 73(4), 954-965.
- Sacristán, L. 2017. Efecto del remodelador químico de cromatina 5-azacitidina sobre la expresión de genes del metabolismo secundario en el hongo antártico *Pseudogymnoascus* sp. Unidad de investigación. Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile.
- Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J., & Carnaghan, R. B. A. (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, 192(4807), 1096.
- Shao, Z., Zhao, H., & Zhao, H. (2008). DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic acids research*, 37(2), e16-e16.
- Shimizu, Y., Ogata, H., & Goto, S. (2017). Type III polyketide synthases: functional classification and phylogenomics. *ChemBioChem*, 18(1), 50-65.
- Smith, S., & Tsai, S. C. (2007). The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Natural product reports*, 24(5), 1041-1072.

Thaler, R., Spitzer, S., Karlic, H., Klaushofer, K., & Varga, F. (2012). DMSO is a strong inducer of DNA hydroxymethylation in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Epigenetics*, 7(6), 635-651.

Ullán, R. V., Godio, R. P., Teijeira, F., Vaca, I., García-Estrada, C., Feltrer, R., ... & Martín, J. F. (2008). RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using  $\beta$ -lactam genes expression. *Journal of microbiological methods*, 75(2), 209-218.

Vega, F. 2018. Búsqueda de clusters génicos para la biosíntesis de metabolitos secundarios en la cepa fúngica Antártica *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5-II-EB y desarrollo de herramientas moleculares para su estudio. Tesis para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Wang, X., Sena Filho, J. G., Hoover, A. R., King, J. B., Ellis, T. K., Powell, D. R., & Cichewicz, R. H. (2010). Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. *Journal of natural products*, 73(5), 942-948.

Wentzel, L. C. P., Inforsato, F. J., Montoya, Q. V., Rossin, B. G., Nascimento, N. R., Rodrigues, A., & Sette, L. D. (2019). Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) Soils and Marine Sediments. *Microbial ecology*, 77(1), 12-24.

Xu, S., Zhou, Z., Du, G., Zhou, J., & Chen, J. (2014). Efficient transformation of *Rhizopus delemar* by electroporation of germinated spores. *Journal of microbiological methods*, 103, 58-63.

Yin, W. B., Amaike, S., Wohlbach, D. J., Gasch, A. P., Chiang, Y. M., Wang, C. C., ... & Keller, N. P. (2012). An *Aspergillus nidulans* bZIP response pathway hardwired for defensive secondary metabolism operates through aflR. *Molecular microbiology*, 83(5), 1024-1034.

Zhang, T., Ren, P., Chaturvedi, V., & Chaturvedi, S. (2015). Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for the cold-adapted fungi *Pseudogymnoascus destructans* and *P. pannorum*. *Fungal Genetics and Biology*, 81, 73-81.

Zhang, T., Ren, P., De Jesus, M., Chaturvedi, V., & Chaturvedi, S. (2018). Green Fluorescent Protein Expression in *Pseudogymnoascus destructans* to Study Its Abiotic and Biotic Lifestyles. *Mycopathologia*, 183(5), 805-814.

Zukal, J., Bandouchova, H., Brichta, J., Cmokova, A., Jaron, K. S., Kolarik, M., ... & Pikula, J. (2016). White-nose syndrome without borders: *Pseudogymnoascus destructans* infection tolerated in Europe and Palearctic Asia but not in North America. *Scientific Reports*, 6, 19829.