



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE
PREGRADO

“Silenciamiento del gen *ninA* de *Penicillium roqueforti* y su efecto en la producción de metabolitos secundarios”

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

DIEGO ALEJANDRO PALMA ZAMORANO

Director del Seminario de Título: Dra. Inmaculada Vaca Cerezo

MAYO 2022

Santiago, Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

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.

Diego Alejandro Palma Zamorano

“Silenciamiento del gen *ninA* de *Penicillium roqueforti* y su efecto en la producción de metabolitos secundarios”

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

Dra. Inmaculada Vaca Cerezo
Directora del Seminario de Título

Comisión Revisadora y Evaluadora

Dra. Claudia Stange Klein
Presidenta

Dra. María Cecilia Rojas Garrido
Correctora

Santiago de Chile, mayo 2022

i. Biografía



Nacido el 27 de marzo de 1998 en San Vicente de Tagua Tagua, Diego Alejandro Palma Zamorano es el único hijo de Jorge Palma y Mónica Zamorano. Criado en la ciudad de Graneros con el cariño y la guía de sus padres y abuelos, desde pequeño fue un niño indeciso, afirmaba que quería ser bombero, luego paleontólogo, después dentista e historiador. Finalmente, al crecer terminó experimentando con la ciencia, y aunque todavía no sabe bien a dónde va la micro, no se arrepiente de su decisión.

Alegre, bueno para la talla, medio inseguro y un poco terco. Por ahora planea seguir buscando cosas interesantes en hongos filamentosos y enseñarles a otros jóvenes que la química es “refácil”, mientras intenta superar su adicción a las galletas.

ii. Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente a mis compañeros de laboratorio: Vicente, Mariana, Pablo y Anaí, por enseñarme desde cómo hacer un PCR hasta escucharme cuando tenía dramas y dudas en mi vida personal. Por todos esos almuerzos, juegos de mesa y risas que generaron un ambiente de trabajo increíble y que recordaré con alegría.

A la profe Inma por abrirme las puertas del laboratorio el 2018, por enseñarme, motivarme y guiarme en mi formación hasta el día de hoy.

A mis padres por apoyarme en cada decisión que he tomado y mandarme un mensajito de apoyo cuando estaba estresado o cansado.

A las hermosas personas que conocí durante la carrera, en especial a mis amigos Loretto y Daniel (alias el “*cocoro team*”), quienes me acompañaron en este viaje desde Química General I.

Finalmente, pero no por eso menos importante, gracias a esa persona que hizo de mi 2021 un año tan especial...

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1211832

iii. Índice de contenidos

i. Biografía	i
ii. Agradecimientos	ii
iv. Índice de tablas	v
v. Índice de figuras.....	vi
vi. Lista de abreviaturas	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Metabolitos secundarios de origen fúngico	1
1.2. Síntesis de metabolitos secundarios fúngicos.....	2
1.2.1. Enzimas híbridas PKS-NRPS.....	3
1.3. Regulación del metabolismo fúngico.....	6
1.3.1. Organización de los genes del metabolismo secundario	6
1.3.2. Regulación transcripcional.....	7
1.3.2. <i>Crosstalk</i> en el metabolismo secundario fúngico	8
1.4. <i>Penicillium roqueforti</i> como especie de interés biotecnológico.....	10
1.4.1. Andrastina	10
1.4.2. Ácido micofenólico	11
1.4.3. El BGC <i>ninA</i>	13
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo General.....	15
3.2. Objetivos Específicos.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. Materiales	16
4.1.1. Cepas.....	16
4.1.2. Medios de Cultivo.....	16
4.1.3. Soluciones.....	17
4.1.4. Reactivos de biología molecular	17
4.1.5. Programas bioinformáticos y bases de datos	17
4.2. Metodologías	18
4.2.1. Análisis Bioinformático	18

4.2.2. Construcción del plásmido de atenuación pJL43-ninA.....	19
4.2.3. Transformación de <i>E.coli</i> por el método de bacterias quimiocompetentes.....	21
4.2.3.1. Generación de bacterias quimio competentes	21
4.2.3.2. Transformación.....	22
4.2.4. Transformación mediada por protoplastos de <i>P. roqueforti</i>	23
4.2.4.1 Obtención de protoplastos	23
4.2.4.2. Transformación de protoplastos.....	24
4.2.5. Verificación de las transformantes.....	25
4.2.6. Verificación de la atenuación del gen <i>ninA</i> en cultivos líquidos	25
4.2.7. Análisis de transcrito en cultivos sólidos.....	27
4.2.8. Extracción de andrastina y ácido micofenólico	27
4.2.10. Análisis de los perfiles de metabolitos secundarios	28
RESULTADOS	30
5.1. Análisis bioinformático al <i>cluster ninA</i>	30
5.2. Construcción del plásmido pJL43-ninA.	36
5.3. Transformación de protoplastos de <i>P. roqueforti</i>	37
5.4. Análisis de producción de transcrito del gen <i>ninA</i>	38
5.5. Análisis de transcrito en cultivos sólidos	39
5.6. Análisis de los perfiles de metabolitos secundarios	41
DISCUSIÓN Y PROYECCIONES	44
6.1. Análisis bioinformático del BGC <i>ninA</i>	44
6.2. Análisis bioinformático comparativo de BGCs.....	50
6.4. Silenciamiento y producción de transcrito del gen <i>ninA</i>	53
6.5. Efecto del silenciamiento de <i>ninA</i> en la producción de andrastina y ácido micofenólico.....	54
CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS	59

iv. Índice de tablas

Tabla I. Algunos ejemplos de metabolitos PK-NRP sintetizados por hongos filamentosos y sus actividades biológicas	5
Tabla II. Genes de síntesis de andrastina presentes en <i>Penicillium roqueforti</i>	11
Tabla III. Genes de síntesis de ácido micofenólico en <i>Penicillium roqueforti</i>	12
Tabla IV. Partidores utilizados para los experimentos de PCR	20
Tabla V. Método de elución utilizado para analizar los perfiles de metabolitos por HPLC analítica.....	28
Tabla VI. Genes presentes en el <i>cluster ninA</i> con una función putativa.....	31
Tabla VII. Enzimas PKS-NRPS con homología de secuencia con la enzima NinA.	32
Tabla VIII. Dominios de unión de ADN predichos para los factores de transcripción del BGC <i>ninA</i>	32
Tabla IX. Proteínas presentes en BGCs de PKS-NRPS similares a <i>ninA</i> , que tienen similitud con proteínas que forman parte del cluster de <i>ninA</i>	34
Tabla X. Resumen de las funciones y efectos de los factores de transcripción similares a los del BGC <i>ninA</i> en sus respectivos <i>clusters</i>	51

v. Índice de figuras

Figura 1. Estructura de una PKS-NRPS fúngica.....	4
Figura 2. Diagrama de un BGC fúngico.....	6
Figura 3. Diagrama del mecanismo de “ <i>crosstalk</i> ” propuesto por Huang & cols en <i>Aspergillus terreus</i> en la biosíntesis de azafilonas.....	9
Figura 4. Organización del BGC de andrastina en <i>Penicillium roqueforti</i>	11
Figura 5. Organización del BGC biosintético de ácido micofenólico en <i>Penicillium roqueforti</i>	12
Figura 6. Metabolitos secundarios producidos por <i>P. roqueforti</i> que han sido asociados a un BGC.	13
Figura 7. BGC hipotético sugerido por Henríquez, 2015.	14
Figura 8. Vector de atenuación pJL43-ninA.....	19
Figura 9. Diagrama hipotético del <i>cluster ninA</i>	30
Figura 10. Dominios de la enzima NinA.....	31
Figura 11. Diagrama de los resultados de BLASTP de los BGCs de enzimas PKS-NRPS fúngicas similares a NinA.	35
Figura 12. Comprobación del ensamble del plásmido pJL43-ninA mediante PCR.....	36
Figura 13. Confirmación de la presencia del vector pJL43-ninA en las cepas las transformantes ninA seleccionadas.....	37
Figura 14. Comprobación de la atenuación del gen <i>ninA</i> en las transformantes seleccionadas mediante RT-PCR desde cultivos líquidos. En el gel	39
Figura 15. Niveles de transcrito relativo de los genes <i>adrD</i> y <i>mpaC</i> en las transformantes atenuadas para el gen <i>ninA</i>	40
Figura 16. Espectros de absorción UV-visible de la andrastina y el ácido micofenólico....	41
Figura 17. Cromatogramas a 254 nm de las cepas transformantes T1.2, T2.9, T2.18, T3.8 y WT.....	43
Figura 18. Metabolitos fúngicos cuyos BGC se encuentran caracterizados y cuyas enzimas PKS-NRPS presentan similitud de secuencia con NinA.	45
Figura 19. Diagrama de la regulación génica mediada por las proteínas Pcz1 y Sfk1.	57

vi. Lista de abreviaturas

BGC: *Cluster* génico de biosíntesis

PKS-NRPS: Enzima híbrida policétido sintasa – sintetasa de péptidos no ribosomales

PK-NRP: Metabolito híbrido policétido – péptido no ribosomal

KS: Dominio cetosintasa

KR: Dominio cetoreductasa

AT: Dominio acil transferasa

DH: Dominio deshidratasa

ER: Dominio enoil reductasa

MT: Dominio metiltransferasa

ACP: Dominio transportador de grupos acilo

SAM: S-adenosil metionina

C: Dominio de condensación

A: Dominio de adenilación

PCP: Dominio transportador de grupos peptidilo

PSTF: Factor de transcripción específico de un BGC.

MS: Metabolito secundario

MPA: Ácido micofenólico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

DBD: Dominio de unión a ADN

RESUMEN

Penicillium roqueforti es un hongo filamentoso de interés biotecnológico que produce andrastina y ácido micofenólico, dos metabolitos secundarios (MS) con actividades biológicas de uso farmacológico. Adicionalmente, esta especie presenta numerosos *clusters* génicos de biosíntesis de MS (BGCs, por su sigla en inglés) que aún no han sido caracterizados y vinculados a un compuesto, uno de estos es el BGC *ninA*.

Durante un estudio preliminar, se encontró que, al silenciar la expresión del gen principal del BGC *ninA*, que codifica para la enzima principal NinA, no había producción de andrastina y ácido micofenólico, lo que sugirió un posible efecto *crosstalk* entre esos dos BGCs y el BGC *ninA*. El *crosstalk* es un fenómeno poco estudiado en hongos filamentosos, en donde un BGC altera la producción de metabolitos de otro. Sin embargo, dicho fenómeno no pudo ser confirmado debido a la ausencia de un análisis de transcrito.

El objetivo de este estudio fue analizar bioinformáticamente el BGC *ninA* para identificar nuevos componentes y comprobar el efecto de *crosstalk* entre el gen *ninA* y los BGCs de andrastina y ácido micofenólico. Para ello, se utilizó las plataformas fungiSMASH y BLASTP para describir los genes presentes y encontrar proteínas similares. Además, empleando ARN de interferencia se silenció el gen *ninA* y se evaluó su efecto en la producción de transcrito de los genes principales de los BGCs de andrastina y ácido micofenólico, y en la producción de dichos metabolitos.

En resumen, el estudio arrojó que el BGC *ninA* presenta 14 genes putativos, de los cuales tres corresponden a factores de transcripción de tipo dedos de Zinc (*ft-60*, *ft-62* y *ft-64*). El BGC *ninA* es similar a los BGCs de síntesis de cinco compuestos producidos por especies del género *Fusarium*, y esta similitud indica que probablemente sean los factores Ft-60 y Ft-62 quienes comanden la producción del metabolito de *ninA*. Finalmente, el silenciamiento del gen *ninA* refutó la hipótesis de *crosstalk* debido a que no se obtuvo una reducción en la

producción de andrastina y ácido micofenólico, ni una reducción considerable en la producción de transcrito en las transformantes atenuadas. Se espera estudiar en un futuro el rol de los factores Ft-60 y Ft-62 en el metabolismo secundario del hongo, e intentar descifrar la ruta biosintética generada por el BGC ninA.

ABSTRACT

Penicillium roqueforti is a filamentous fungus of biotechnological importance that produces andrastin A and mycophenolic acid, two secondary metabolites (MS) with biological activities and pharmacological uses. Additionally, this fungal species has multiple biosynthetic gene clusters (BGCs) without a link with a known compound, being one of them the cluster *ninA*.

In the past, a study found that when the expression of gene *ninA*, which codes for the core enzyme NinA, was silenced the production of andrastin and mycophenolic acid were blocked totally. This experimental fact strongly suggested a possible crosstalk between these BGCs. The crosstalk is a poorly studied phenomenon in filamentous fungi which a BGC influences the metabolites production from another clusters. However, the crosstalk between BGC *ninA* and the BGCs of andrastin and mycophenolic acid could not be proved due the absence of a transcriptional analysis.

The objective of this study was to perform a bioinformatic analysis to the BGC *ninA* and to analyze the crosstalk effect between the NinA enzyme and the BGCs of andrastin A and mycophenolic acid. For that, a bioinformatic analysis of the BGC *ninA* was performed using fungiSMASH and BLASTP. The gene *ninA* was silenced using the RNAi technique. Finally, the production of andrastin A and mycophenolic acid, and the transcript-level of the core enzymes for their production were evaluated in the transformant strains.

In summary, it was found that BGC *ninA* has fourteen putative genes, being three of them Zn₂Cys₆ transcription factors (*ft-60*, *ft-62*, *ft-64*). In addition, the BGC *ninA* is similar to five BGCs from the genus *Fusarium*. This similarity suggests that transcription factors Ft-60 and Ft-62 are involved in the regulation of the metabolite *ninA* production. Finally, the analysis of strains with down expression of gene *ninA* refutes the initial hypothesis because the

andrastin A and the mycophenolic acid production are not altered. In future works, the Ft-60 and Ft-62 function will be studied to elucidate the regulation of BGC ninA.

INTRODUCCIÓN

1.1. Metabolitos secundarios de origen fúngico

Los hongos filamentosos producen una amplia gama de metabolitos secundarios (MS), los cuales pueden definirse como compuestos de bajo peso molecular que no son requeridos para asegurar el crecimiento del organismo, pero, representan una ventaja para la sobrevivencia en el nicho en el que están (Keller, 2018). Entre algunas de las funciones de los MS se encuentra la comunicación con otras especies, la adquisición de nutrientes escasos en el medio, la defensa contra otras especies competidoras e interacciones con organismos simbiotes (Macheleidt & cols., 2016).

Los MS fúngicos son clasificados en base a las enzimas que los sintetizan y los sustratos que estas utilizan. Los grupos principales son los policétidos (PK), péptidos no ribosomales (NRP), terpenos (T) y alcaloides de tipo indol. Pero, además, es posible encontrar metabolitos con una estructura híbrida, como PK-NRP, PK-T, etc., lo que extiende la posibilidad de producción de diferentes estructuras (Brakhage, 2012). Producto de esta gran diversidad estructural, los MS presentan diferentes funciones importantes para el ser humano, como antimicrobianos, antivirales, antiparasitarios, pigmentos, sideróforos, etc.

Es por esto que estos compuestos han tenido un papel importante en la biotecnología a lo largo de la historia. El ejemplo más reconocido corresponde a la penicilina, un NRP con propiedades antimicrobianas sintetizado por organismos del género *Penicillium*, con el cual, a mediados del siglo XX, se logró disminuir la tasa de mortalidad causada por enfermedades infecciosas bacterianas como la tuberculosis (Gaynes, 2017).

Otro MS fúngico utilizado como fármaco el día de hoy es la ciclosporina, un NRP descubierto en el hongo *Tolypocladium inflatum*, y que también es producido por *Aspergillus*

terreus y *Fusarium solani*. Su aplicación biotecnológica radica en su actividad inmunosupresora, ya que es utilizado para evitar el rechazo de trasplantes de corazón, hígado y riñón (Devaux & cols., 2021). Interesantemente, estudios recientes con este metabolito lo posicionan como una posible droga en contra del SARS-CoV-2, debido a que ensayos *in vitro* han mostrado su eficacia en reducir la replicación del virus (Pizzorno & cols., 2020).

Sin embargo, no todos los MS son beneficiosos para el ser humano, puesto que existe un grupo de compuestos denominados micotoxinas, moléculas sintetizadas por hongos capaces de causar daño a plantas y animales. Muestra de esto es la patulina, una γ -lactona producida por *Penicillium expansum*, un hongo filamentoso que coloniza frutos carnosos, como manzanas y peras durante el período de post cosecha. Este metabolito tiene un efecto cancerígeno al ser consumido por un período prolongado, y también ha mostrado tener efectos citotóxicos y toxicidad aguda (Zheng & cols., 2020). Debido a su buena solubilidad en agua y estabilidad a altas temperaturas, la patulina puede fácilmente acumularse en productos derivados de frutas, convirtiéndose en un grave problema en la producción de jugos y otros bebestibles. Por lo tanto, la búsqueda para desarrollar métodos de control de este metabolito continúa hasta el día de hoy.

Todos estos ejemplos ilustran la importancia de los metabolitos secundarios fúngicos en la actualidad.

1.2. Síntesis de metabolitos secundarios fúngicos

La síntesis de los MS es llevada a cabo por enzimas. Esta comienza por la acción de las enzimas principales, las que toman precursores del metabolismo primario para sintetizar el esqueleto principal del metabolito. Posterior a esto, enzimas accesorias se encargan de modificar la estructura hasta generar el compuesto final.

Las enzimas principales pueden clasificarse en cuatro grupos: policétido sintasas (PKS), que usan unidades de acil-CoA como unidad inicial, sintetetasas de péptidos no ribosomales (NRPS), que utilizan aminoácidos, terpeno ciclasas (TC), que utilizan intermediarios de la vía del mevalonato, y dimetilalil triptófano sintasa (DMATS), que sintetizan metabolitos a partir del triptófano (Keller, 2018). Pero, también, existe una variedad de enzimas con estructura híbrida, generando aún más variedad entre los MS.

1.2.1. Enzimas híbridas PKS-NRPS

Las PKS-NRPS son enzimas que presentan una región policétido sintasa (PKS) y otra región sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS). Debido a esta estructura híbrida, son proteínas de gran tamaño, con un peso molecular que ronda entre 300 y 450 kDa, y pueden sintetizar metabolitos con una gran variedad de estructuras producto del amplio rango de sustratos que pueden utilizar.

Dichas enzimas están presentes en bacterias y en hongos, sin embargo, en estos últimos solo han sido encontradas en la división *Ascomycetes*. Análisis filogenéticos han sugerido que las PKS-NRPS fúngicas corresponden a un grupo monofilético, lo que sugiere su origen común (Boettger & Hertweck, 2012).

Las PKS-NRPS están compuestas por dominios, los cuáles presentan funciones específicas para la síntesis del metabolito. La región PKS suele contener un dominio ceto sintasa (KS), encargado de condensar las unidades acil-CoA, un dominio acil transferasa (AT), que reconoce los monómeros que se deben utilizar, otro deshidratasa (DH), que cataliza reacciones de deshidratación, un metil transferasa (MT), que adiciona grupos metilo, uno ceto reductasa (KR), capaz de reducir grupos ceto a alcoholes y el transportador de grupos acilo (ACP), encargado de sostener al metabolito que se sintetiza.

En cambio, la región NRPS presenta cuatro dominios típicos: uno de condensación (C), encargado de formar el enlace entre el aminoácido y el policétido, uno de adenilación (A), encargado de seleccionar el aminoácido, un transportador de grupo peptídilo (PCP), que sostiene el metabolito, y un dominio terminal tioéster reductasa o ciclasa (R/D), encargado de liberarlo (Boettger & Hertweck, 2012). Ambas regiones se encuentran unidas por una secuencia *linker* de entre 70 y 150 aminoácidos (Figura 1).

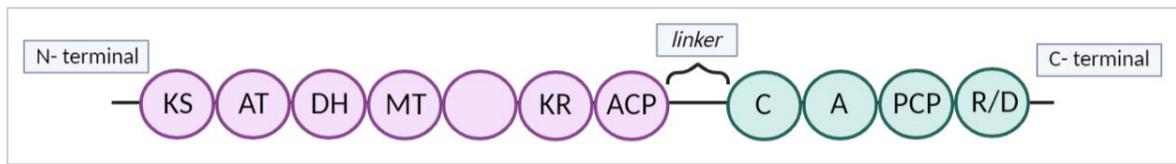


Figura 1. Estructura de una PKS-NRPS fúngica. Las enzimas híbridas PKS-NRPS presentan una región PKS (en violeta) y otra NRPS (en verde), unidas por una secuencia *linker*. La región PKS presenta un dominio cetosintasa (KS), aciltransferasa (AT), deshidratasa (DH), metiltransferasa (MT), cetereductasa (KR) y transportador de grupos acilo (ACP). La región NRPS presenta los dominios de condensación (C), adenilación (A), transportador de grupo peptídilo (PCP) y un dominio tioéster reductasa (R/D) (Imagen adaptada de Boettger & Hertweck, 2012).

Los metabolitos PK-NRP presentan gran diversidad estructural, pero todos se caracterizan por contener anillos de 5 o 6 miembros que contienen nitrógeno en su estructura (Fisch, 2013). El primer compuesto de este tipo descrito corresponde a la fusarina C, una toxina sintetizada por hongos del género *Fusarium*. Hasta la fecha, poco más de una docena de metabolitos PK-NRP han sido vinculados a un BGC. Dos de ellos son la citocalasina, molécula que destruye el citoesqueleto de actina (Qiao & cols., 2011), y la equisetina, fármaco que inhibe la integrasa del VIH y que tiene actividad antimicrobiana (Singh & cols., 1998). Dentro del género *Penicillium*, concretamente en *Penicillium expansum*, se ha descrito una enzima PKS-NRPS codificada en *cheA* que sintetiza la cadena principal de las chatoglobosinas al condensar una molécula de acetil-CoA, 8 de malonil-CoA y un L-

triptófano (Ichihara & Oikawa, 1999), otros ejemplos de metabolitos PK-NRP se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Algunos ejemplos de metabolitos PK-NRP sintetizados por hongos filamentosos y sus actividades biológicas

Molécula	Organismo	Gen PKS-NRPS	Actividad Biológica	Referencia
Equisetina	<i>Fusarium heterosporum</i>	<i>eqxS</i>	Antimicrobiana, inhibidor de la integrasa del VIH	Larson & cols. 2020
Chatoglobosina A	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>cheA</i>	Micotoxina, antiparasitaria	Yan & cols. 2021
Lovastatina	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>lovB</i>	Antihipercolesterolemica	Mulder & cols. 2015
Aspiridona	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>adpA</i>	Moderada actividad citotóxica	Bergmann & cols. 2007
Pseurotina A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>psoA</i>	Inductora del crecimiento neuronal	Maiya & cols. 2007
Ácido ciclopiazónico	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>cpaS</i>	Micotoxina, inhibidor de la ATPasa SERCA del retículo sarcoplásmico	Tokuoka & cols. 2015
Ácido burnettrámico	<i>Aspergillus burnettii</i>	<i>buaA</i>	Antifúngica	Liu & cols. 2019

El número de metabolitos secundarios con estructura PK-NRP encontrado en la literatura es menor al de policétidos o NRPs. A pesar de esto, se estima que al menos un tercio de los BGCs que presentan enzimas PKS o NRPS tienen enzimas PKS-NRPS (Wang & cols., 2014). Es por esto que, este grupo de enzimas presenta un gran potencial de estudio, para encontrar nuevos metabolitos con actividades útiles para el ser humano.

Específicamente en *Penicillium roqueforti*, el hongo utilizado en este estudio, análisis bioinformáticos revelan que presenta cuatro posibles enzimas de este tipo (Coton & cols., 2020). Una de estas, está codificada en el gen *ninA*, de la cual se desconoce el metabolito que produce, y dado que no se ha documentado ningún metabolito del tipo PK-NRP en esta especie, se presume que el producto corresponde a un metabolito de estructura novedosa.

1.3. Regulación del metabolismo fúngico

1.3.1. Organización de los genes del metabolismo secundario

Las enzimas que sintetizan los metabolitos secundarios se encuentran codificadas en *clusters* génicos de biosíntesis (BCGs), regiones cromosómicas que presentan todos los genes relacionados con la síntesis de estos compuestos (Figura 2). El componente principal de estos corresponde al gen de la enzima principal, las cuales pueden ser del tipo PKS, NRPS, TC, DMATS o enzimas híbridas como PKS-NRPS. También, todo BGC presenta genes que codifican para enzimas accesorias, las cuales modifican la estructura de esqueleto principal. Ejemplo de estas son las epimerasas, que cambian la configuración de un centro quiral, y las hidroxilasas, que agregan un grupo hidroxilo al metabolito.

Otro componente que puede estar presente son genes que codifican para transportadores, los cuales pueden ser específicos tanto para intermediarios como para el producto final de la ruta. Además, pueden contener genes que codifiquen para factores de transcripción, encargados de regular la expresión de algunos o todos los genes del BGC (Keller, 2018).

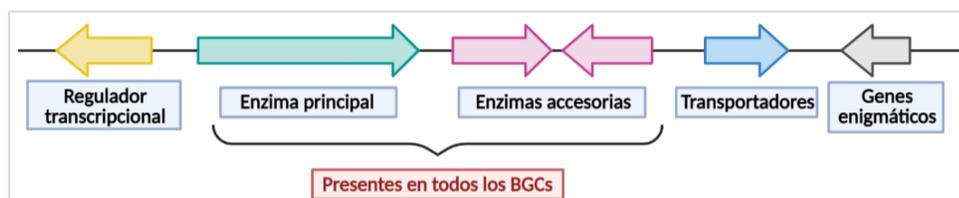


Figura 2. Diagrama de un BGC fúngico. Todo BGC se caracteriza por presentar genes que codifican para una o dos enzimas principales (PKS/NRPS/TC/DMATS), encargadas de ensamblar el esqueleto principal del metabolito. Además, presenta genes que codifican para enzimas accesorias, de tipo mono oxigenasas, metiltransferasas, epimerasas, hidroxilasas, etc, que modifican la estructura del metabolito en los pasos finales de síntesis. Otros genes que pueden formar parte de los BGCs son los reguladores transcripcionales, que activan la transcripción de los genes del *cluster*, genes que codifican para transportadores que expulsan al metabolito al medio extracelular y genes enigmáticos de los que se desconoce su función (Imagen adaptada de Keller, 2018).

Los BGCs pueden expresarse en condiciones estándares de cultivo o pueden permanecer apagados, gatillándose su expresión en circunstancias determinadas. Esta regulación del metabolismo ocurre gracias a una enorme red de complejos proteicos, los cuales responden ante diferentes estímulos ambientales, como cambios en la intensidad de luz, pH, fuentes de carbono, disponibilidad de hierro, incluso interacciones con otros microorganismos (Brakhage, 2012). Una de estas formas de regulación, es mediada por factores de transcripción.

1.3.2. Regulación transcripcional

La regulación transcripcional específica está dada por factores de transcripción codificados dentro de un BGC, que activan la transcripción de los demás genes que componen el *cluster*. Estas proteínas en su mayoría presentan motivos de dedos de Zinc, regiones que coordinan átomos de zinc en residuos de cisteína, lo que les permite interactuar con el ADN. Ejemplo de esto es el gen *gliZ* en *Aspergillus fumigatus*, que codifica para una proteína con motivos Zn_2Cys_6 , que regula la expresión del *cluster* de síntesis de gliotoxinas, micotoxina apoptótica y genotóxica (Bok & cols., 2006). Estos factores de transcripción pueden regular la expresión de todos los genes de un *cluster*, pero en algunos casos hay algunos genes cuya expresión es independiente de estas proteínas, como el gen *gliT* que codifica para una proteína de resistencia dentro del *cluster* de gliotoxinas (Brakhage, 2012).

Generalmente, los BGCs presentan un gen que codifica para una proteína reguladora, o no presentan ninguno (Keller, 2018). Sin embargo, se han registrado casos en que un *cluster* puede tener dos reguladores, como en la síntesis de aflatoxinas en *Aspergillus flavus* donde la proteína reguladora AfIS, actúa como un corregulador, interactuando con la proteína AfIR, que es el regulador transcripcional específico de este *cluster*.

1.3.2. *Crosstalk* en el metabolismo secundario fúngico

El fenómeno de *crosstalk* corresponde a otro nivel de complejidad dentro de la regulación del metabolismo secundario fúngico. En este, un gen codificado dentro de un BGC se expresa y genera un factor que puede activar la expresión de genes pertenecientes a otro, provocando cambios en la producción de metabolitos secundarios. Hasta la fecha, se han caracterizado dos fenómenos de *crosstalk* en hongos filamentosos, en donde en ambos, son factores de transcripción las proteínas que llevan a cabo el fenómeno (Bergmann & cols., 2010) (Huang & cols., 2020).

La primera evidencia de este fenómeno fue registrada en *Aspergillus terreus*, especie que produce felutamida y asperfuranona, dos metabolitos sintetizados por BGCs diferentes. En este caso, el BGC de felutamida, presenta el gen *scpR*, que codifica para un factor de transcripción, que activa la transcripción de los genes de ambos BGCs (Bergmann & cols., 2010), controlando la producción de ambos metabolitos.

El caso de *crosstalk* más reciente presente en la literatura fue encontrado en el hongo *Aspergillus terreus*, organismo que sintetiza azasperpiranona A, una azafilona con potencial anticancerígeno y que es sintetizada de manera colaborativa entre dos BGCs diferentes denominados *cluster A* y *cluster B* (Huang & cols., 2020). El *cluster B* expresa un gen que codifica para un factor de transcripción, el cual activa la expresión de otros dos genes, que regulan la expresión de sus *clusters* respectivos (Figura 3).

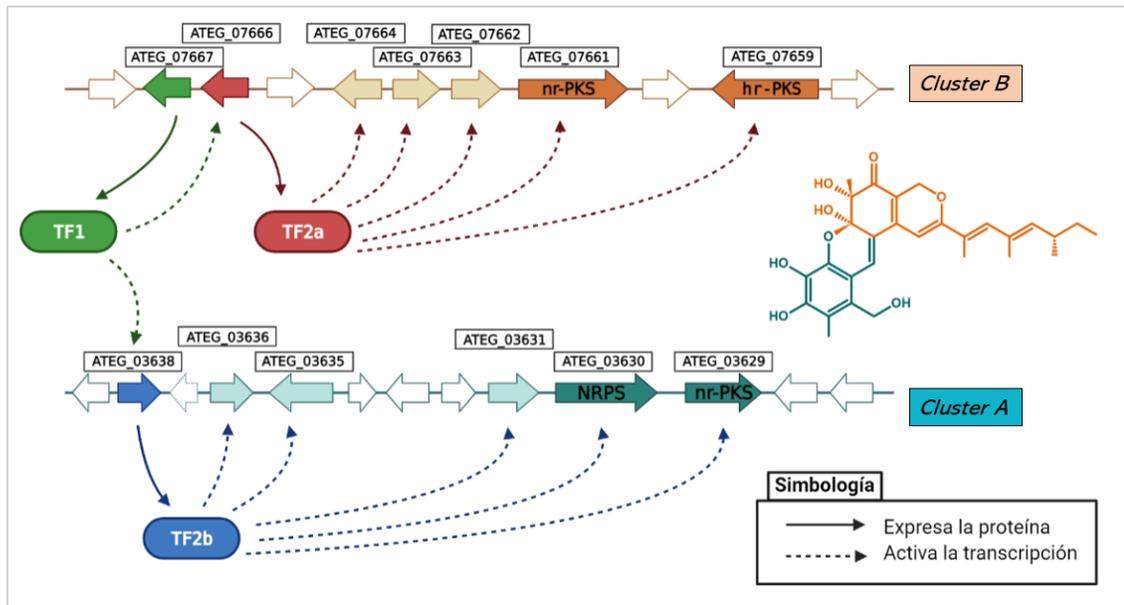


Figura 3. Diagrama del mecanismo de “crosstalk” propuesto por Huang & cols en *Aspergillus terreus* en la biosíntesis de azafilonas. En verde se muestra el factor de transcripción codificado por el gen ATEG_07667 en el *cluster B* que activa la transcripción del gen ATEG_07666 del mismo *cluster*, y del gen ATEG_03638 del *cluster A*. Cada uno de estos factores activa la transcripción de 5 genes de sus propios BGCs, resultando en la síntesis de azasperpiranona A. Se destaca en colores la sección de la estructura del metabolito sintetizado por el BGC A y B (Imagen elaborada en base a Huang & cols., 2020).

Asimismo, otro fenómeno de posible *crosstalk* se ha mencionado en la literatura, pero, curiosamente, este no es mediado por factores de transcripción. Este fue observado en *P. roqueforti*, en donde al silenciar los cuatro genes de biosíntesis de la toxina PR, se registró un aumento considerable de la producción de ácido micofenólico (Hidalgo & cols., 2014). Este hecho sugiere un *crosstalk* entre el BGC de la toxina PR y el del ácido micofenólico, sin embargo, el estudio carece de análisis de los transcritos para confirmarlo.

Identificar los fenómenos de *crosstalk* existentes en hongos filamentosos productores de MS permitiría primero, entender de mejor manera como se regula la expresión de los distintos BGCs, y, también, permitiría diseñar estrategias para optimizar la producción de metabolitos de interés biotecnológico.

1.4. *Penicillium roqueforti* como especie de interés biotecnológico

Penicillium roqueforti es un hongo saprófito con una distribución ubicua en la naturaleza, ya que es posible aislarlo desde el suelo, materia en descomposición y productos de origen vegetal. Ha sido descrito como una especie útil en la industria biotecnológica, producto de que puede crecer tolerando un amplio rango de pH, bajos niveles de O₂ (Coton & cols., 2020), puede utilizar pentosas y hexosas como fuente de carbono para su crecimiento, y produce una amplia variedad de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas (Mioso & cols., 2015).

Su uso más conocido radica en la industria del queso, ya que, favorece la maduración del queso azul, aportándole un sabor y aroma característico apreciado en diferentes regiones del mundo. Esta maduración se genera gracias a la β -oxidación del ácido láctico y la acción lipolítica de enzimas extracelulares (Martínez-Rodríguez & cols., 2014). Pero también, este hongo sintetiza diferentes metabolitos secundarios, los cuales tienen diferentes actividades biológicas, ya sean beneficiosas para el ser humano o tóxicas. Entre los más estudiados destaca la andrastina, el ácido micofenólico, la toxina PR y la roquefortina C. Adicionalmente, *P. roqueforti* presenta en su genoma 32 BGCs de los que se desconoce el metabolito que producen (Coton & cols., 2020).

1.4.1. Andrastina

La andrastina es un meroterpenoide sintetizado por varias cepas del género *Penicillium*, y producido por *P. roqueforti* durante el proceso de maduración del queso azul (Fernández-Bodega & cols., 2009). Este compuesto ha despertado el interés de los investigadores debido a su actividad antitumoral, puesto que, es capaz de inhibir la enzima farnesiltransferasa, la cual es la encargada de activar a las proteínas Ras, que, al sufrir

mutaciones, pueden generar cerca del 90% de los cánceres pancreáticos y un 50% de los cánceres de colon (Roberts & Der, 2007).

También, este compuesto estimula la acumulación de compuestos anticancerígenos como la vincristina en células tumorales (Rho & cols., 1998), característica que lo sitúa como un posible adyuvante en la entrega de medicamentos para el tratamiento de esta enfermedad. El BGC de la andrastina se encuentra caracterizado en *P. roqueforti*, y está compuesto por 10 genes, denominados genes *adr* (Rojas-Aedo & cols., 2017). La enzima principal de este *cluster* es una policétido sintasa, y está codificada por el gen *adrD*. Los demás genes codifican para enzimas accesorias y una proteína transportadora (Tabla II) (Figura 4):

Tabla II. Genes de síntesis de andrastina presentes en *Penicillium roqueforti*

Gen	Función en la biosíntesis	Gen	Función en la biosíntesis
<i>adrA</i>	Citocromo P450 monooxigenasa	<i>adrG</i>	Preniltransferasa
<i>adrC</i>	Transportador MFS	<i>adrH</i>	Monooxigenasa dependiente de FAD
<i>adrD</i>	Policétido Sintasa	<i>adrI</i>	Terpeno ciclasa
<i>adrE</i>	Cetoreductasa	<i>adrJ</i>	Acetiltransferasa
<i>adrF</i>	Deshidrogenasa de cadena corta	<i>adrK</i>	Metiltransferasa

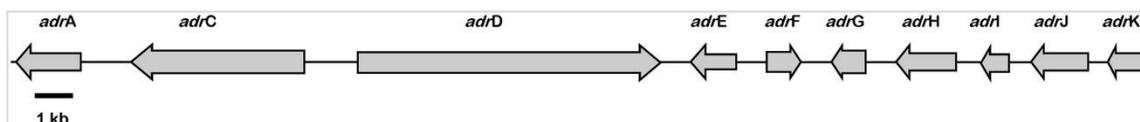


Figura 4. Organización del BGC de andrastina en *Penicillium roqueforti*. Está compuesto por 10 genes, en donde la enzima principal está codificada por el gen *adrD*, correspondiente a una enzima policétido sintasa (PKS). Los demás genes codifican para diferentes enzimas accesorias y una proteína transportadora (*adrC*).

1.4.2. Ácido micofenólico

El ácido micofenólico (MPA, por su sigla en inglés) es un metabolito secundario de interés comercial sintetizado por algunas especies del género *Penicillium*, como *Penicillium brevicompactum* y *Penicillium roqueforti*. Dentro de sus actividades biológicas se ha

descrito su acción antibiótica producto de su efecto antimicrobiano contra *Bacillus anthracis* (Regueira & cols., 2011). También tiene actividad antiviral, antifúngica y antitumoral (Bentley, 2010). Pero la actividad que lo posiciona como una molécula de interés comercial es su acción inmunosupresora, puesto que puede evitar la proliferación de linfocitos B y T. Esto se debe a que el MPA inhibe a la enzima inosina-5' monofosfato deshidrogenasa, la cual cataliza la reacción desde inosina monofosfato a guanosina monofosfato, molécula indispensable para la síntesis de ADN y ARN en los linfocitos, debido (Del-Cid & cols., 2016).

Actualmente, el MPA se utiliza como fármaco para pacientes que han recibido un trasplante de riñón o hígado. Las enzimas que sintetizan el MPA en *P. roqueforti* están codificadas en el BGC *mpa* recientemente caracterizado, el cual consta de 7 genes los cuáles se detallan a continuación (Tabla III) (Figura 5) (Del-Cid & cols., 2016):

Tabla III. Genes de síntesis de ácido micofenólico en *Penicillium roqueforti*

Gen	Función putativa en la síntesis de ácido micofenólico
<i>mpaA</i>	Preniltransferasa
<i>mpaB</i>	Dominio de función desconocida
<i>mpaC</i>	Policétido sintasa (PKS)
<i>mpaDE</i>	Enzima bifuncional Citocromo P450-hidrolasa
<i>mpaF</i>	Proteína de resistencia al MPA
<i>mpaG</i>	O-metiltransferasa, de tipo ácido cafeico
<i>mpaH</i>	<i>Oxidative cleavage enzyme</i>



Figura 5. Organización del BGC biosintético de ácido micofenólico en *Penicillium roqueforti*. El BGC presenta 7 genes, donde destaca el gen *mpaC* que codifica para la enzima principal de tipo PKS.

Penicillium roqueforti también sintetiza otras micotoxinas que causan daño en humanos, como la roquefortina C, la toxina PR y la patulina. De todas maneras, las cepas que se utilizan en la industria alimentaria presentan una baja producción de estas, y se ha demostrado la baja concentración de micotoxinas en el queso, siendo éste un producto seguro para el consumo humano.

A pesar de su interés biotecnológico, el metabolismo secundario de *P. roqueforti* está lejos de estar completamente caracterizado, ya que como se indicó anteriormente 32 BGCs de los 37 que esta especie posee aún no han sido asociados a un MS (Coton & cols., 2020). Es decir, únicamente se conoce el metabolito final de cinco BGCs (Figura 6).

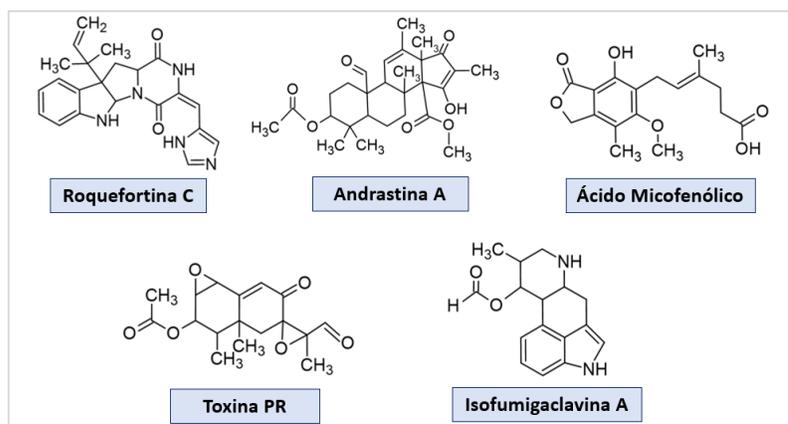


Figura 6. Metabolitos secundarios producidos por *P. roqueforti* que han sido asociados a un BGC. La roquefortina C, alcaloide y micotoxina. La andrastina, un policétido con actividad antitumoral. El ácido micofenólico, un policétido con actividad inmunosupresora y antimicrobiana. La toxina PR, terpeno y micotoxina, y la isfumigaclavina A, compuesto alcaloide y micotoxina.

1.4.3. El BGC *ninA*

En un estudio realizado hace algunos años, se encontró el gen *ninA*, que codifica para una enzima PKS-NRPS, denominada NinA. Dicho gen se expresaba en un cultivo líquido de medio YES a 28°C (Henríquez, 2015), y se postuló que formaba parte de un BGC hipotético de seis genes (Figura 7).



Figura 7. BGC hipotético sugerido por Henríquez, 2015. Presenta el gen *ninA*, que codifica para una PKS-NRPS, dos genes que codifican para un regulador transcripcional (*e-1* y *e-2*), uno para un transportador (*mrl*), un gen para una enzima accesoria (*berb1*), y un gen enigmático (*n1*) (Henríquez, 2015).

Con el fin de determinar la estructura del metabolito sintetizado por esta enzima, se silenció el gen *ninA* utilizando la técnica de ARN de interferencia para comparar el perfil metabólico de la cepa *knockdown* con el de la cepa WT. Al analizar los metabolitos presentes en el agar y el micelio de algunas cepas transformantes mediante HPLC, llamó la atención que las cepas transformantes no produjeron andrastina ni ácido micofenólico, dos metabolitos secundarios producidos en alta cantidad por la cepa WT (Henríquez, 2015). Este hecho sugirió la existencia de un efecto de *crosstalk* entre el *cluster ninA* y las rutas de síntesis de estos dos metabolitos. Para confirmar esta hipótesis, que fue formulada únicamente con esta observación experimental, es necesario realizar el análisis de los transcritos de los genes que codifican para las enzimas principales de las rutas de biosíntesis de ácido micofenólico y andrastina en las cepas con el *cluster ninA* atenuado. De este modo se podrá verificar si el silenciamiento del gen *ninA* provoca un cambio en la transcripción de los genes de las otras rutas. Si esto se comprueba, sería el primer caso de *crosstalk* en que la atenuación de la expresión de la enzima principal de un *cluster* altera la síntesis de metabolitos de otros *clusters*.

HIPÓTESIS

La expresión del gen *ninA* afecta la expresión de los genes de biosíntesis de andrastina y ácido micofenólico, y por ende la producción de estos metabolitos, en el hongo *Penicillium roqueforti*.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar si la expresión del gen *ninA* afecta la expresión de los genes principales de biosíntesis de andrastina y ácido micofenólico, y la producción de dichos metabolitos en *Penicillium roqueforti*.

3.2. Objetivos Específicos

1. Analizar bioinformáticamente el *cluster ninA* identificando sus componentes.
2. Analizar la expresión de los genes *adrD* y *mpaC*, claves en la síntesis de andrastina y ácido micofenólico respectivamente, en transformantes de *P. roqueforti* con el gen *ninA* atenuado.
3. Comparar la producción de andrastina y ácido micofenólico entre la cepa WT de *P. roqueforti* y las cepas transformantes con el gen *ninA* atenuado.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Cepas

Para esta investigación se utilizó la cepa *Penicillium roqueforti* CECT 2905 (ATCC®10110™), la cual está presente en el Laboratorio de Química Microbiológica. Adicionalmente, se utilizó *Escherichia coli* DH5- α para el mantenimiento y replicación de plásmidos, y la cepa *E. coli* pJL43, que poseía el plásmido de atenuación pJL43 (Ullán et al., 2008).

4.1.2. Medios de Cultivo

Medio Luria-Bertani (LB): Medio de cultivo y propagación de *E. coli*. Composición: extracto de levadura 5 g/L, peptona 10 g/L, NaCl 5 g/L.

Medio de papa y dextrosa (PDA): Medio para el cultivo de hongos filamentosos. Composición: mezcla de papa, dextrosa y agar 39 g/L (Difco™, EE. UU)

Medio completo (CM): Medio de crecimiento y mantenimiento de hongos filamentosos. Composición: glucosa 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, extracto de malta 5 g/L.

Medio Czapek-sorbitol (Cz): Medio mínimo para crecimiento de microorganismos capaces de utilizar el nitrato como única fuente de nitrógeno. Composición: sacarosa 30 g/L, K_2HPO_4 0,5 g/L, solución concentrada de sales Czapek 10 mL/L. Para la recuperación de posibles transformantes, se adiciona sorbitol 1,0 M.

Medio YES: Medio con elevada cantidad de carbohidratos y nitrógeno, utilizado para estimular la producción de micotoxinas y metabolitos secundarios. Composición: Sacarosa 150 g/L, extracto de levadura 20 g/L. Para medios sólidos se utiliza agar al 2,0 %.

4.1.3. Soluciones

-Solución concentrada de sales Czapek: NaNO₃ 300 g/L, KCl 0,5 g/L, MgSO₄ 0,5 g/L, FeSO₄·7H₂O 1 g/L.

-Solución tampón fosfato (TPP): tampón fosfato pH 5,8 (K₂HPO₄ y KH₂PO₄), KCl 0,7 M.

-Solución KCM: KCl 1,0 M, CaCl₂ 50 mM, MES 0,25 mM pH 5,8.

-Solución STC: sorbitol 1,0 M, Tris-HCl 25 mM pH 7,5, CaCl₂ 50 mM.

-Solución PCM: PEG 6.000 al 50%, CaCl₂ 50 mM, MES 10 mM pH 5,8.

4.1.4. Reactivos de biología molecular

- Kits: *AccuPrep*® Plasmid Mini Extraction Kit, *AccuPrep*® PCR/Gel Purification kit, Norgen's Plant/Fungi Total RNA Purification kit.

- Enzimas: NcoI BioLabs®, Fosfatasa antártica BioLabs®, DNAsa I BioLabs®, All-In-One 5X RT MasterMix, Enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* y β-Glucoronidasa de *Helix pomatia*.

4.1.5. Programas bioinformáticos y bases de datos

Para caracterizar los genes presentes en el *cluster ninA* se utilizó el programa fungiSMASH versión 6.0.1 (<https://fungismash.secondarymetabolites.org/>).

Para encontrar proteínas ortólogas se utilizó el programa BLASTP (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), el cual permite comparar una secuencia *query* con una base de datos mediante alineamientos de secuencia.

La base de datos MiBIG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster*) <https://mibig.secondarymetabolites.org/> se utilizó para encontrar información respecto a otros *clusters* de biosíntesis de hongos filamentosos.

La base de datos CISBP (*Catalog of Inferred Sequence Binding Preferences*) <http://cisbp.cabr.utoronto.ca/>, una biblioteca con información sobre factores de transcripción y sus motivos de unión a ADN de organismos eucariontes, se utilizó para encontrar los dominios de unión a ADN (DBD) de los factores de transcripción codificados en el BGC *ninA*.

4.2. Metodologías

4.2.1. Análisis Bioinformático

Para caracterizar el *cluster* donde se encuentra el gen de la enzima *NinA* se utilizó la plataforma *fungiSMASH*, a la cual se cargó el genoma de las cepas FM164 y LCP96 04111 de *Penicillium roqueforti* en formato FASTA y GFF3. Se utilizaron los genomas de estas dos cepas debido a que son las únicas que presentaban un transcriptoma o proteoma además del genoma, lo que permitiría obtener información más detallada de los genes del *cluster*. Posteriormente, se utilizó la secuencia aminoacídica de la proteína *NinA*, y se realizó BLASTP para encontrar enzimas PKS-NRPS ortólogas. Para ello se usó una matriz BLOSUM62 y la base de datos SwissProt/UnitProt, debido a que esta posee una amplia información sobre las proteínas ahí depositadas, como su función y sus dominios estructurales.

Luego de encontrar otras PKS-NRPS ortólogas, se procedió a buscar la secuencia de los otros genes presentes en sus *clusters* de síntesis en la base de datos NCBI, y se realizó BLASTP a cada uno de esos genes, utilizando una matriz BLOSUM62 y cerrando la búsqueda a las cepas de *P. roqueforti* (taxid:5082).

Finalmente, para encontrar los dominios de unión a ADN (DBD) de los factores de transcripción del *cluster*, se utilizaron sus secuencias aminoacídicas y fueron analizadas en la plataforma de CISBP.

4.2.2. Construcción del plásmido de atenuación pJL43-ninA

El plásmido para atenuar la producción de transcrito del gen *ninA* se construyó a partir del plásmido pJL43-ARNi (Ullán & cols., 2008) (Figura 8), debido a que, a pesar de haberse ensamblado en un estudio pasado (Henríquez, 2015), tras años de almacenaje, las bacterias que lo almacenaban no presentaban el vector. Este presenta los promotores *pcbc* y *pgpd* en orientación opuesta con un sitio de corte de la enzima de restricción NcoI en medio (sitio de corte CCATGG). Así, se podrá generar ARN de doble hebra, el cual será procesado por la ARNasa Dicer en un siARN de un largo de entre 21 y 25 nucleótidos. Este sARN guiará al complejo RISC hacia el ARNm del gen objetivo y lo degradará, evitando la posterior traducción de la enzima.

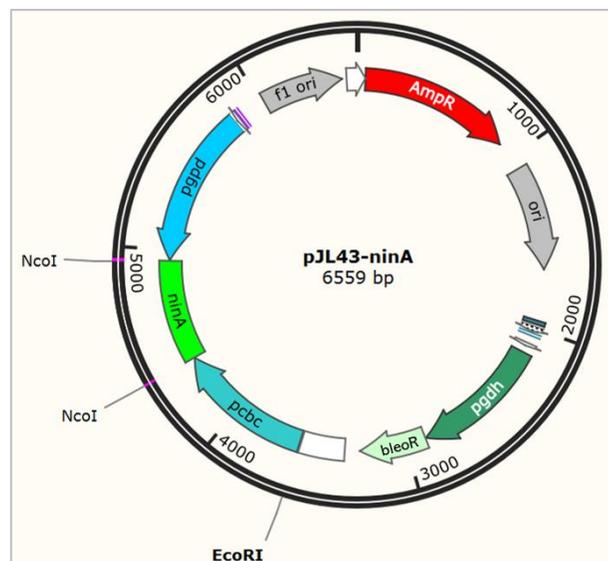


Figura 8. Vector de atenuación pJL43-ninA. (6,6 kb) Presenta los promotores *pgpd* y *pcbc* en antisentido, con un fragmento de 566 pb del gen *ninA*. Se destaca el gen *bleoR*, que confiere resistencia al antibiótico fleomicina, y el gen *ampR*, que otorga resistencia a ampicilina. Se destacan los sitios de corte de la enzima de restricción NcoI, utilizada para ensamblar el plásmido.

El fragmento del gen *ninA* fue amplificado mediante PCR desde ADN genómico del hongo con los partidores PKSARNi-fw y PKSARNi-rv (Tabla IV), los cuales eran específicos para el gen y presentaban el sitio de corte de la enzima de restricción *NcoI* en el extremo 5'.

Los productos fueron purificados utilizando el kit *AccuPrep*® PCR/Gel Purification y se ajustó su concentración para la digestión enzimática. Paralelamente, se extrajo el plásmido pJL43 desde un cultivo *overnight* de la cepa *E. coli-pJL43* empleando el kit *AccuPrep*® Plasmid Mini Extraction.

Tabla IV. Partidores utilizados para los experimentos de PCR

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tamaño del amplicón (pb)
PKSARNi-fw	AGACTCCCATGGAAATGGGCTCTTGT	566
PKSARNi-rv	GTCAGCCTCTTCGCCAT	
Conf-fw	GCATGCCATTAACCTAGG	1760 (correcto) 1200 (vacío)
Conf-rv	ACGGTGGCTGAAGATTC	
pcbc	GCTCAGGCACACAGGAAG	830 (correcto) 270 (vacío)
pgpd	GCTACATCCATACTCCATCC	
mpaC-fw	CACTACCAAGAATCTCCTCG	461 pb
mpaC-rv	CAGCCTCATTATTCGTCCAG	
adrD-fw	AATACACCTCTCTTCGTTTCG	415 pb
adrD-rv	CGTTAGAGTATACAGCCCAC	
β tubA	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	300 pb
β tubB	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC	

Una vez que se obtuvieron los productos de PCR y el plásmido, se procedió a realizar una digestión enzimática con *NcoI*, para obtener extremos cohesivos compatibles entre ellos y que posteriormente pudieran ser ligados. Adicionalmente, para la digestión del plásmido pJL43 se utilizó la enzima Fosfatasa Antártica, que desfosforila los extremos 5' y 3' terminales y evita la recircularización del plásmido. La digestión del plásmido se realizó utilizando 4 μ L buffer 3:1, 4 μ L de buffer de fosfatasa, 2 μ L de *NcoI*, 2 μ L de fosfatasa, plásmido suficiente para tener entre 4 y 5 μ g de ADN plasmidial, y agua libre de nucleasas hasta completar 40 μ L de reacción. Esta mezcla fue incubada a 37 °C por dos horas, y luego a 80 °C por 20 minutos para inactivar las enzimas. Posterior a esto, el producto de la

digestión se corrió en un gel de agarosa, y tras observarlo en un transiluminador UV se cortó la banda correspondiente al plásmido digerido. Este se purificó con el *AccuPrep*® PCR/Gel Purification kit y fue cuantificado.

Paralelamente, se realizó la digestión de los productos de PCR del fragmento del gen *ninA* con *NcoI*. Para ello se realizó una reacción con 4 µL buffer 3:1, 2 µL de *NcoI*, ADN suficiente hasta completar los 5 µg y agua libre de nucleasas hasta completar los 40 µL de reacción. Los productos de PCR digeridos fueron purificados con el *AccuPrep*® PCR/Gel Purification kit y fueron cuantificados.

Finalmente, con el plásmido y los fragmentos digeridos y purificados, se realizó una ligación con ADN ligasa para así ensamblar el plásmido pJL43-*ninA*. Para ello, se realizaron reacciones con 1 µL de enzima ADN Ligasa, 2 µL de buffer, un volumen de plásmido para alcanzar una cantidad cercana a los 100 ng, un volumen de fragmento *ninA* que alcanzara una cantidad cercana a los 200 ng, y agua libre de nucleasas hasta los 20 µL totales de reacción. Esto se incubó a 16 °C por 16 horas. Transcurrido el tiempo, esta solución fue utilizada para transformar *E. coli DH5-α*.

4.2.3. Transformación de *E.coli* por el método de bacterias quimiocompetentes

4.2.3.1. Generación de bacterias quimio competentes

Para la obtención de bacterias quimio competentes se realizó un cultivo *overnight* de 5 mL de *E. coli DH5-α* crecida a 200 rpm a 37°C. A este cultivo se le midió la densidad óptica a 600 nm, y se ajustó la concentración para obtener un cultivo de 10 mL a una D.O de 0,1. Este nuevo cultivo fue incubado a 37 °C y 200 rpm durante 1 hora, o hasta que la D.O estuviera entre 0,5 y 0,6. En ese momento, las bacterias fueron alicuotadas en volúmenes de 2 mL y colectadas por centrifugación a 6.000 rpm durante 3 minutos. Posteriormente,

cada *pellet* fue lavado dos veces con 500 μ L de una solución de CaCl_2 fría de concentración 100 mM, y se ajustó su volumen a 100 μ L para la transformación.

4.2.3.2. Transformación

Se utilizaron tres de los tubos que tenían bacterias quimio competentes, y cada uno fue mezclado con 20 μ L de la mezcla de ligación que presentaba el plásmido pJL43-*ninA* y se resuspendió suavemente. Esta mezcla se incubó en hielo durante 1 hora, para después realizar un golpe de calor a 42 °C durante 50 segundos con el que promover la entrada del ADN a las bacterias. Posterior a esto, las mezclas de transformación fueron incubadas 3 minutos en hielo, para luego adicionar 500 μ L de medio LB líquido e incubar a 37°C durante 1 hora, todo esto para recuperar a las bacterias transformadas. Finalmente, se centrifugaron a 6.000 rpm durante 3 minutos y se eliminó 400 μ L de medio, para resuspender el *pellet* en los 100 μ L restantes y plaquearlos en LB sólido suplementado con ampicilina en concentración de 1 μ g/mL. Adicionalmente, se realizó un control negativo que no presentaba ADN exógeno, y un control positivo, transformado las bacterias con el plásmido pJL43 vacío.

Luego de dejar crecer las placas por una noche, se seleccionaron 20 colonias al azar para realizar un PCR de colonias con los partidores *pcbc* y *pgpd* (Tabla IV), que generan un amplicón de 834 pb si el fragmento del gen *ninA* fue correctamente insertado, y un amplicón de 268 pb si el fragmento estaba ausente. Una vez que se determinó que colonia tiene el plásmido correctamente armado, se procedió a extraerlo desde un cultivo en LB líquido crecido con 2 μ g/mL de ampicilina. Para esto se utilizó el *AccuPrep*® Plasmid Mini Extraction Kit. Luego de ser cuantificado, se realizó un PCR de confirmación al plásmido extraído, con los partidores *pcbc* y *pgpd*, y con el par *Conf-fw* y *Conf-rv* (Tabla IV), que

amplifican desde los promotores pcbc y pgpd, pero generando un amplicón de 1.760 pb si el fragmento está inserto.

4.2.4. Transformación mediada por protoplastos de *P. roqueforti*

4.2.4.1 Obtención de protoplastos

Para la obtención de protoplastos de *P. roqueforti* se sembraron esporas del hongo en placas Petri con medio PDA, y se incubaron a 28 °C durante 7 días. Posteriormente, cada placa se raspó con 5 mL de solución de NaCl 0,9% estéril, lo que se utilizó como inóculo a 100 mL de medio CM dispuesto en un matraz de 250 mL. Este cultivo fue incubado a 28°C a 180 rpm de agitación durante 21 horas o hasta que el largo del tubo germinativo fuera entre 10 y 15 veces el diámetro del conidio. Posterior a esto, el micelio se filtró y lavó con ayuda de un filtro miracloth estéril y 500 mL de NaCl 0.9%. Luego, el micelio fue secado utilizando papel filtro previamente esterilizado. Tras secar cuidadosamente el micelio, se masó 1,0 g de este y se mezcló con 10 mL de solución TPP. Paralelamente, se mezclaron 0,4 g de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* con 10 mL de solución TPP, que se utilizaran para estimular la degradación de la pared celular. Ambas soluciones se mezclaron en un matraz estéril, el cual fue incubado a 28 °C durante 3 horas a una agitación de 80 rpm. Para facilitar la liberación de protoplastos, se adicionaron 40 µL de β-glucoronidasa de *Helix pomatia* a los 30, 60 y 120 min. Transcurridas las 3 horas, la solución de protoplastos se filtró con ayuda de un filtro de miracloth y un filtro de nylon (Nytal) estéril para eliminar los restos de micelio. Esta solución fue incubada en hielo para evitar la ruptura de los protoplastos. Para concentrarlos, fueron centrifugados a 3.000 rpm durante 4 minutos descartando el sobrenadante. Posteriormente, el pellet fue lavado con 1 mL de solución KCM fría dos veces. Luego, los protoplastos fueron resuspendidos en 1 mL de solución

KCM, para ser contados al microscopio con una cámara de Neubauer. Finalmente, con solución STC se ajustó la concentración de esta solución a 10^8 protoplastos/mL, la cual fue utilizada para la transformación.

4.2.4.2. Transformación de protoplastos

Para la transformación se utilizó la solución PCM, la cual posee polietilenglicol 6.000, compuesto que facilita la fusión del ADN exógeno con los protoplastos (Li & cols., 2017). Utilizando 100 μ L de solución STC con protoplastos (10^7 protoplastos en total), se mezclaron con 10 μ L de solución PCM y 10 μ L de ácido aurintricarboxílico (ATA) 1,0 M, solución que inhibe la interacción entre ADN y proteínas. Posteriormente, se adicionó 10 μ L del plásmido pJL43-*ninA* (1 μ g/ μ L), y se mezcló con suavidad hasta homogeneizar. Paralelamente, se realizó un control negativo, con los mismos componentes que la mezcla de transformación, pero en ausencia de plásmido, y un control positivo, para comprobar la viabilidad de los protoplastos. Ambas mezclas fueron incubadas en hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 500 μ L de solución PCM y fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se adicionaron 600 μ L de solución STC a cada una, mezclando con suavidad, y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 3 mL de medio Czapek con sorbitol 1,0 M a las mezclas de transformación, y se incubaron a 28 °C durante 2 horas a 80 rpm. Este paso es importante para aumentar la viabilidad de los protoplastos y obtener un mayor número de transformantes. Finalmente, la solución con posibles transformantes fue mezclada con 40 mL de Czapek sólido 1,0% suplementado con sorbitol 1,0 M y fleomicina en concentración 30 μ g/mL. Esta mezcla fue vertida en 4 placas de Czapek 2,0% agar sorbitol 1,0 M, en partes iguales. El control negativo fue mezclado con 10 mL del mismo medio y fleomicina en la misma concentración, mientras que el control

positivo sólo fue mezclado con 10 mL de Czapek 1,0% agar sorbitol 1,0 M en ausencia de fleomicina. La temperatura del medio no debía superar los 52°C para evitar la pérdida de posibles transformantes. Las placas se incuban a 28 °C durante 14 días o hasta verificar la esporulación de las posibles transformantes.

4.2.5. Verificación de las transformantes

Tras obtener colonias que mostraran una evidente esporulación en el medio, se procedió a picarlas y crecerlas en medio PDA con 30 µg/mL de fleomicina por 5 días. Las colonias que lograron crecer fueron raspadas con 5 mL de NaCl 0,9% estéril, y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-3} y 10^{-4} , las cuales fueron plaqueadas en PDA con 30 µg/mL de fleomicina para producir cultivos monospóricos. Finalmente, se seleccionó una colonia aislada de cada transformante que fue cultivada en medio PDA sin fleomicina. Posteriormente, se colectaron esporas de cada transformante con NaCl 0,9% estéril, y se cultivaron en medio CM a 180 rpm a 28°C durante 5 días para obtener micelio para realizar una extracción de ADN genómico, siguiendo el protocolo de Mahuku, 2004, modificado por Rojas-Triviño, 2015 (Mahuku, 2004) (Rojas-Triviño, 2015). Con este ADN genómico se realizó un PCR utilizando los partidores Conf-fw y Conf-rv, que amplifican un fragmento de 1.760 pb que confirma la inserción del plásmido en el ADN genómico de las transformantes. De estas, se seleccionaron las que presentaron un amplicón del tamaño indicado para los análisis posteriores.

4.2.6. Verificación de la atenuación del gen *ninA* en cultivos líquidos

Para verificar que el gen *ninA* estaba atenuado en las cepas transformantes seleccionadas, se procedió a cultivarlas en medio YES líquido a 28 °C a 180 rpm durante 7 días. Posteriormente, se separó el micelio del caldo con ayuda de un filtro Nytal, desde el cual

se extrajo ARN con el Norgen's Plant/Fungi Total RNA Purification kit. Luego de ser cuantificada su concentración, y revisada su integridad por visualización en un gel de agarosa, el ARN fue tratado con DNAsa I, para eliminar los restos de ADN genómico. Para ello, se realizaron reacciones de 100 μ L, con 1 μ L de enzima, 10 μ L de buffer, un volumen de ARN que tuviera una cantidad de 10 μ g, y agua tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC), molécula que inactiva las ARNsas, para evitar la degradación del ARN. Cada reacción fue incubada a 37 °C durante 45 minutos. Posteriormente, para detener la actividad de la DNAsa, se agregaron 10 μ L de EDTA 50 mM, compuesto quelante de Mg^{+2} , ion importante para la acción de la DNAsa. Esta mezcla se incubó a 75 °C por 10 minutos. El ARN tratado con DNAsa fue utilizado para obtener cADN por medio de una reacción de reverso transcripción. Para esto se utilizó 4 μ L de All-In-One 5X RT MasterMix, 11 μ L de la solución de ARN tratado con DNAsa, para tener una cantidad aproximada de 1 μ g, y 5 μ L de agua tratada con DEPC hasta completar los 20 μ L de reacción. Las reacciones se incubaron a 25 °C durante 10 minutos, luego a 42 °C durante 50 minutos. Finalmente, para inactivar la enzima se incubó a 85 °C por 5 minutos.

Con el ADN complementario de cada transformante y la cepa WT, se realizaron PCRs utilizando los partidores PKSARNi-fw y PKSARNi-rv (Tabla IV), que producen un amplicón de 556 pb en las cepas que si presentaban transcrito del gen *ninA*. Se utilizó el gen de la β -tubulina como control, debido a que se expresa de manera constitutiva en el hongo, siendo amplificado con los partidores β Tub-A y β Tub-B (Tabla IV), amplificando un fragmento de 300 pb. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % durante 55 minutos a 85 V, y se revisaron en un transiluminador UV.

4.2.7. Análisis de transcrito en cultivos sólidos

Para analizar la producción de transcrito de los genes *mpaC* y *adrD* en las cepas transformantes atenuadas, se crecieron placas de las cepas transformantes seleccionadas en medio YES sólido a 28°C durante 7 días. Transcurrido dicho tiempo, se raspó el micelio de una placa y se utilizó para una extracción de ARN utilizando el Norgen's Plant/Fungi Total RNA Purification kit siguiendo las mismas etapas que en el punto anterior.

Con el ADN complementario de cada transformante y la cepa WT, se realizaron PCRs utilizando los partidores *mpaC*-fw y *mpaC*-rv (Tabla IV), que amplifican un fragmento de 460 pb del gen *mpaC*, que codifica para la PKS que ensambla el esqueleto principal del ácido micofenólico. Lo mismo se realizó para la andrastina, con los partidores *adrD*-fw y *adrD*-rv (Tabla IV) que amplifican un fragmento de 415 pb del gen *adrD*, y con el gen de la β -tubulina como control.

El protocolo de PCR utilizado constó de una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C, y 37 ciclos de: una desnaturalización a 94 °C durante 35 s, una hibridación a 55 °C durante 35 s y una polimerización a 72 °C durante 45 s, con una fase adicional de polimerización al final a 72 °C por 10 minutos. Finalmente, los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % durante 55 minutos a 85 V, y se revisaron en un transiluminador UV. La intensidad de las bandas fue analizada con el programa ImageJ 1.53k, y se calculó la expresión relativa de ambos genes en relación con la intensidad de banda del gen de la β -tubulina.

4.2.8. Extracción de andrastina y ácido micofenólico

Para evaluar los cambios en la producción de andrastina y ácido micofenólico de las transformantes obtenidas, se crecieron placas en medio YES durante 7 días a 28°C. Transcurrido el tiempo, se separó el micelio del agar, mientras que el primero fue utilizado

para evaluar la producción de transcrito de los genes de interés (según protocolo indicado en la sección anterior), el agar se utilizó para la extracción de metabolitos. Para ello, se maceró el agar de una placa en 30 mL de una mezcla de acetato de etilo, diclorometano y metanol en proporción 3: 2: 1, acidificada con ácido fórmico al 1%, por una noche. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas durante 30 minutos, para ser filtradas con papel filtro para eliminar los restos de agar y micelio. Luego, cada solución fue filtrada con un filtro de jeringa de 45 µm. Finalmente, cada muestra se secó en rotavapor, y fueron resuspendidas en 200 µL de metanol para su análisis en el HPLC analítico.

4.2.10. Análisis de los perfiles de metabolitos secundarios

La producción de andrastina y ácido micofenólico por parte de la cepa WT y las cepas transformantes atenuadas fue evaluada por HPLC, equipo que presenta un detector de fotodiodo (Waters 2998), equipado con un conjunto de bombas (Waters 1525), un horno de columna (Waters 1500) y un desgasificador (Waters on-line degasser AF). El método de elución que se utilizó presentaba agua acidificada con ácido trifluoroacético al 0,02% como solvente A, y acetonitrilo como solvente B. El flujo que se utilizó fue de 1,2 mL/min, y se inyectó 20 µL de cada muestra. El gradiente de elución empleado se detalla en la Tabla V.

Tabla V. Método de elución utilizado para analizar los perfiles de metabolitos por HPLC analítica

Tiempo (min)	% Solvente B
0	15
25	68
27	100
32	100
35	15
40	15

Los cromatogramas obtenidos fueron analizados con el programa EMPOWER 3. Para encontrar el pico cromatográfico correspondiente al ácido micofenólico, los cromatogramas

fueron observados a 303 nm, mientras que, para observar el pico cromatográfico correspondiente a la andrastina, se revisaron los cromatogramas a 260 nm. Los tiempos de retención esperados eran conocidos ya que se disponían de patrones de ácido micofenólico y andrastina. Adicionalmente, para confirmar que los picos cromatográficos observados correspondían a los metabolitos que se querían analizar, se verificaron los perfiles de absorción, sabiendo que el ácido micofenólico presenta tres máximos de absorción a 215, 250 y 304 nm, mientras que la andrastina tiene un único máximo de absorción a los 260 nm.

RESULTADOS

5.1. Análisis bioinformático al *cluster ninA*

Tras analizar los genomas de las cepas FM164 ([GCA_000513255.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000513255.1)) y LCP96 04111 ([GCA_015533775.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_015533775.1)) de *P. roqueforti* con el programa fungiSMASH se encontró el BGC del gen *ninA* en ambos genomas. El BGC presenta 14 posibles genes, los cuales codifican para una enzima PKS-NRPS, tres factores de transcripción, un transportador, tres posibles enzimas accesorias, una permeasa y cuatro genes sin función conocida (Figura 9).

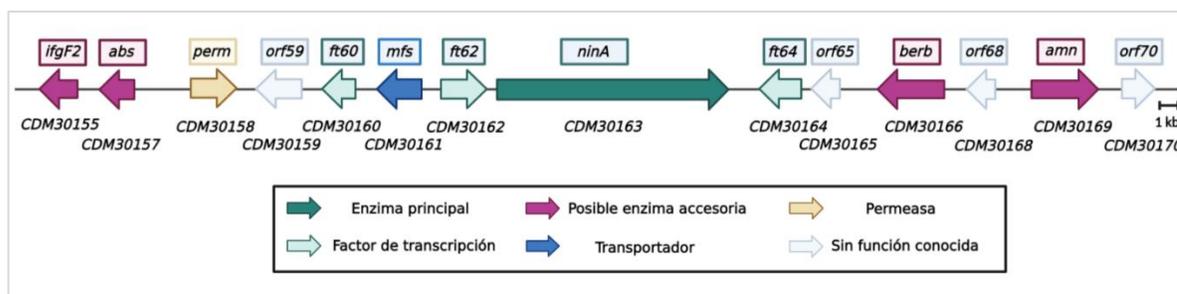


Figura 9. Diagrama hipotético del *cluster ninA*. Presenta el gen *ninA* que codifica para la enzima principal del tipo PKS-NRPS. Tres factores de transcripción (*ft60*, *ft62* y *ft64*), un transportador (*mfs*) y el tres enzimas accesorias: el gen *berb*, que codifica para una posible enzima accesoria que cataliza reacciones de oxidación, *abs*, que codifica para una enzima con un dominio de unión a *amp*, y el gen *amn*, que codifica para una enzima con un dominio aminotransferasa.

El gen de la enzima principal del tipo PKS-NRPS tiene un largo de 11,8 kb, y la proteína generada presenta un largo de 3.937 aminoácidos. La información de los genes analizados en este estudio se muestra a continuación (Tabla VI):

Tabla VI. Genes presentes en el *cluster ninA* con una función putativa.

Gen	Código NCBI	Función putativa	Largo de la proteína (aa)
<i>abs</i>	CDM30157.1	Enzima con dominio de unión a AMP	377
<i>ft60</i>	CDM30160.1	Factor de transcripción	415
<i>mfs</i>	CDM30161.1	Transportador	498
<i>ft62</i>	CDM30162.1	Factor de transcripción	694
<i>ninA</i>	CDM30163.1	PKS-NRPS	3.937
<i>ft64</i>	CDM30164.1	Factor de transcripción	498
<i>berb</i>	CDM30166.1	Enzima con dominio oxidasa	599
<i>amn</i>	CDM30169.1	Enzima con dominio aminotransferasa	437

Al analizar los dominios presentes en la enzima, en la región PKS se encuentran los dominios KS, AT, DH, MT y KR y ACP (Figura 10). No se encuentra un dominio ER, esta ausencia es típica de las PKS-NRPS fúngicas. La región NRPS presenta los dominios C, A, PCP y R.

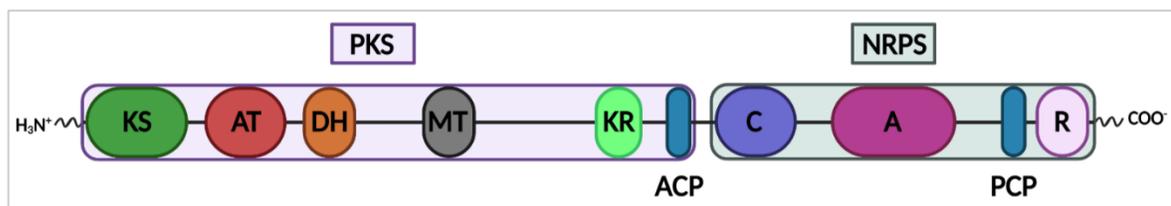


Figura 10. Dominios de la enzima NinA. Presenta los dominios típicos de una enzima PKS-NRPS fúngica: los módulos KS: cetosintasa, AT: aciltransferasa, DH: deshidratasa, cMT: metil transferasa, KR: cetorreductasa y ACP: acil transferasa de la región PKS, y los módulos C: condensación, A: adenilación, PCP: peptidil transferasa y R: reducción en la región NRPS.

La herramienta NRPS2 Predictor, que predice los aminoácidos que selecciona el dominio de adenilación, indica que la enzima utiliza un aminoácido hidrofílico.

Al realizar BLASTP a la enzima NinA contra la base de datos SwissProt/UniProt se encontraron cinco enzimas PKS-NRPS con un porcentaje de identidad superior al 40%, las cuales presentan BGCs descritos y están propuestas las posibles vías de síntesis. Estos resultados se recogen en la Tabla VII.

Tabla VII. Enzimas PKS-NRPS con homología de secuencia con la enzima NinA.

Gen	Metabolito	Especie	% de Identidad	Código NCBI
<i>fsdS</i>	fusaridiona	<i>Fusarium heterosporum</i>	45,72%	Q5SBL6.2
<i>prlS</i>	pirrolocina	<i>funga</i> sp. NRRL 50135	45,44%	A0A089FSA4.1
<i>fsa1</i>	fusarisetina	<i>Fusarium</i> sp. FN080326	45,01%	A0A0E4AZP0.1
<i>eqxS</i>	equisetina	<i>Fusarium heterosporum</i>	44,81%	S4W172.1
<i>pks-nrps1</i>	tricozetina	<i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289	45,08%	S0DS59.1

Las estructuras primarias de los tres factores de transcripción del BGC fueron analizadas con la plataforma CISBP, para predecir los dominios de unión a ADN (DBD) de cada una, y buscar posibles factores descritos que presenten motivos de ADN conocidos. Los DBD predichos se detallan a continuación (Tabla VIII).

Tabla VIII. Dominios de unión de ADN predichos para los factores de transcripción del BGC ninA.

Factor	Dominio de unión a ADN (DBD)	E-value
Ft-60	KPTQSYRTSCDRCLQLRCVPSSDGEWLNTCQRCSRARVPCVFS	3.8e-05
Ft-62	RRSKPQLSCNLCRRRKLRCDRNQPCLTCTARGLALSCAYP	2.7e-07
Ft-64	PASGRRSKNCGNCRSIRKRRCDQKFPHCGQCIRAHEEC	1.8e-07

Estos dominios fueron analizados con BLASTP con el objetivo de buscar otros factores con DBD similares. Se obtuvo que el Ft-60 presentó un 59,09% de identidad de secuencia con el factor CgdH ([Q2HBN3.1](#)), de *Chaetomium globosum*, factor que regula la síntesis de ácido tetramico. El factor Ft-62 mostró un 73,68% de identidad con la proteína Fsa6 ([A0A0E4AZF8.1](#)) de *Fusarium sp. FN080326*, que regula la síntesis de fusarisetina. Finalmente, la proteína con la que el factor Ft-64 tuvo mayor porcentaje de identidad de secuencia fue con un factor aún no caracterizado de *Schizosaccharomyces pombe* ([O59830.1](#)) con un 39.39% .

En base a estos resultados, utilizando la secuencia de cada una de las proteínas de los BGCs de los cinco metabolitos de la Tabla VII, se buscaron proteínas ortólogas con BLASTP en el proteoma de *P. roqueforti* que estuviesen presentes en el *cluster* del gen *ninA*. Para ello, se tomaron en consideración las proteínas que presentaran un E-Value inferior a $1 \cdot 10^{-15}$.

Como resultado principal de estos análisis, se obtuvo que las proteínas NinA, Ft60, Ft62 y Mfs son los que presentan posibles ortólogos con los otros BGCs cuyas PKS-NRPSs poseen similitud con NinA. Específicamente, el *cluster* de biosíntesis de fusaridiona presenta similitud entre la enzima principal y el transportador. En cambio, los BGCs de equisetina, tricoseptina y fusarisetina son los que tienen una mayor cantidad de proteínas ortólogas, siendo estas, dos factores de transcripción de tipo dedos de Zinc, la enzima principal y el transportador. Los resultados de este análisis se muestran a continuación (Tabla IX) (Figura 11).

Tabla IX. Proteínas presentes en BGCs de PKS-NRPS similares a *ninA*, que tienen similitud con proteínas que forman parte del *cluster* de *ninA*.

Metabolito	Proteína	Función	% Identidad	E-Value	Proteína <i>P. roqueforti</i>
Fusaridiona	FsdG	Transportador	47,27%	3,00E-154	Mfs
	FsdS	PKS-NRPS	45,78%	0.0	NinA
Equisetina	EqxS	PKS-NRPS	44,81%	0.0	NinA
	EqxR	Factor de transcripción (Zn ₂ Cys ₆)	30,81%	1,00E-15	Ft-60
	EqxF	Factor de transcripción (Zn ₂ Cys ₆)	40,53%	1,00E-149	Ft-62
	EqxG	Transportador	49,60%	6,00E-169	Mfs
Pirrolocina	PrIS	PKS-NRPS	45,47%	0.0	NinA
	PrIR	Factor de transcripción (Zn ₂ Cys ₆)	38,29%	2,00E-148	Ft-62
	PrIG	Transportador	51,93%	1,00E-179	Mfs
Tricosetina	Ffuj_19	PKS-NRPS	45,15%	0.0	NinA
	Ffuj_22	Factor de transcripción (Zn ₂ Cys ₆)	44,05%	8,00E-16	Ft-60
	Ffuj_23	Factor de transcripción (Zn ₂ Cys ₆)	38,31%	1,00E-150	Ft-62
	Ffuj_24	Transportador	47,20%	1,00E-161	Mfs
Fusarisetina	Fsa1	PKS-NRPS	45,01%	0.0	NinA
	Fsa5	Factor de transcripción (Zn ₂ Cys ₆)	28,54%	3,00E-24	Ft-60
	Fsa6	Factor de transcripción (Zn ₂ Cys ₆)	42,48%	1,00E-173	Ft-62
	Fsa7	Transportador	53,72%	0.0	Mfs

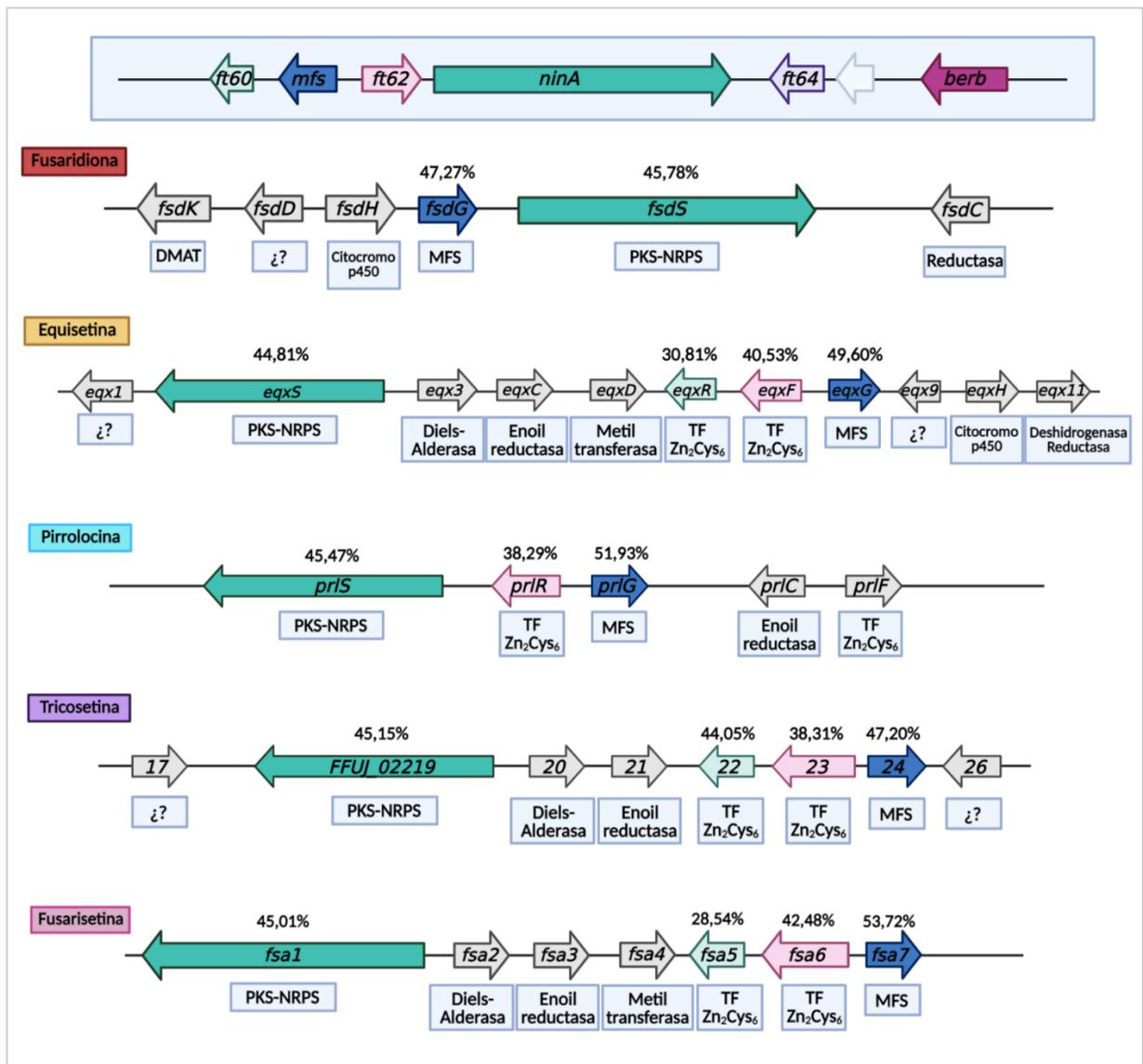


Figura 11. Diagrama de los resultados de BLASTP de los BGCs de enzimas PKS-NRPS fúngicas similares a NinA. Las proteínas que presentaron homología de secuencia con los genes del *cluster ninA* se muestran destacadas en colores: en verde oscuro las PKS-NRPS, en azul los transportadores MFS, en verde claro el factor Ft-60, en rosado el factor Ft-62, y en violeta el factor Ft-64. Además, se destaca la función de la proteína codificada por cada gen, y el porcentaje de identidad de secuencia. Los BGCs analizados fueron los de biosíntesis de fusaridiona, equisetina, pirrolocina, tricosetina y fusarisetina.

5.2. Construcción del plásmido pJL43-ninA.

Tras el proceso de digestión, ligación y transformación de *E. coli* con el plásmido pJL43-ninA se logró obtener un alto número de colonias resistentes a ampicilina. Para determinar cuáles presentaban el plásmido correctamente ensamblado, se realizó un PCR de colonias seleccionadas al azar, con los partidores pcbc y pgpd, que generan un amplicón de 800 pb en las colonias con el fragmento del gen *ninA* en el plásmido, y con los partidores Conf-fw y Conf-rv, que producen un amplicón de 1.760 pb en las transformantes con el vector correcto.

Tras realizar esto, se seleccionó una colonia que presentó las dos bandas correspondientes (Figura 12), y fue crecida en medio LB líquido con ampicilina a concentración 200 µg/mL para la extracción de ADN plasmidial.

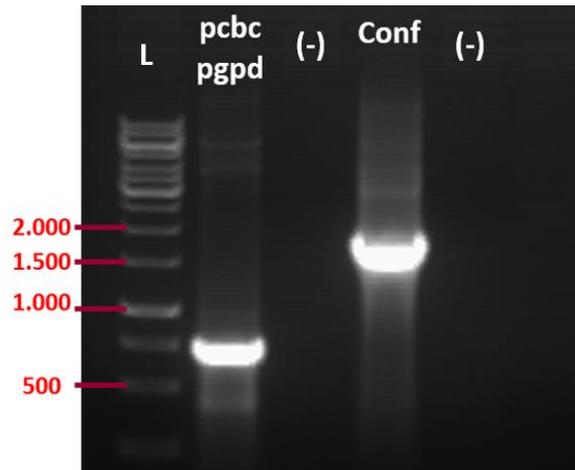


Figura 12. Comprobación del ensamble del plásmido pJL43-ninA mediante PCR. En (L) se muestra el ladder de 1 kb. En el carril (pcbc/pgpd) se muestra el amplicón de largo cercano a 800 pb. Mientras que en el carril Conf se muestra el amplificado de PCR con los partidores de confirmación, que generan un fragmento de 1.760 pb en presencia del fragmento del gen *ninA* correctamente insertado. Ambos PCRs reafirman el correcto ensamble del plásmido pJL43-ninA.

5.3. Transformación de protoplastos de *P. roqueforti*

Tras la realización de tres experimentos diferentes de transformación, se obtuvieron treinta y siete colonias capaces de crecer en Czapek-sorbitol con 30 µg/mL de fleomicina. Tras la recolección de esporas y diluciones seriadas en medio PDA con fleomicina, se obtuvieron 10 cepas transformantes capaces de sobrevivir a tres rondas de cultivo con antibiótico y de las que se generaron cultivos monoespóricos.

A estas se les realizó un PCR con los partidores Conf-fw y Conf-rv para confirmar la presencia del vector pJL43-ninA en el genoma de estas. Este PCR mostró la presencia del vector en 9 transformantes, debido a que muestran una banda de un tamaño aproximado de 1.700 pb (Figura 13).

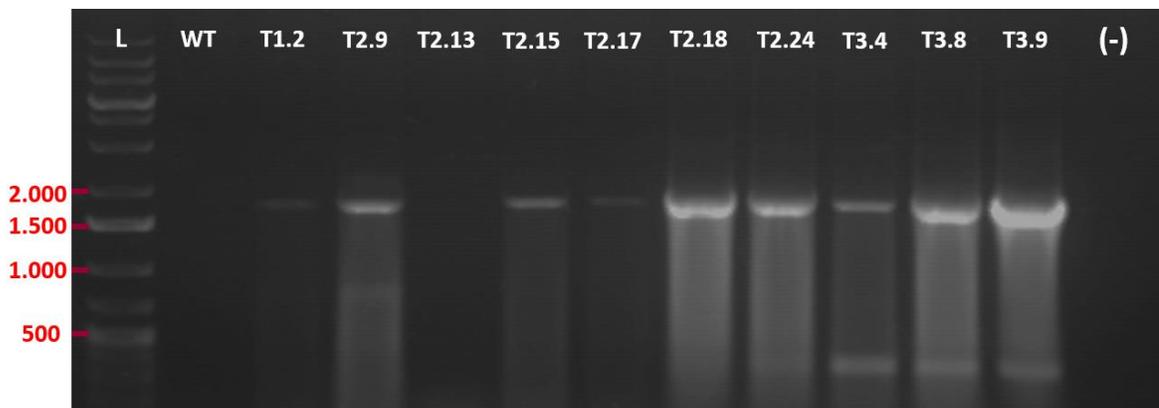


Figura 13. Confirmación de la presencia del vector pJL43-ninA en las cepas las transformantes ninA seleccionadas. En (L) se muestra el ladder de 1 kb. En los demás carriles se muestra a la cepa WT, que carece del vector, y a las 10 cepas transformantes seleccionadas. De estas, 9 muestran un fragmento cercano a los 1.700 pb, confirmando la inserción del plásmido en el genoma. En (-) se muestra el carril con el control negativo (Experimento repetido 2 veces).

De estas cepas transformantes, se seleccionaron las cinco transformantes T1.2, T2.9, T2.18, T3.8 y T3.9, para el análisis de producción de transcrito y producción de metabolitos, debido a que presentan el vector y fueron obtenidas desde tres procesos de transformación diferentes.

5.4. Análisis de producción de transcrito del gen *ninA*.

Tras extraer el ARN de las cinco transformantes seleccionadas desde micelio de cultivos líquidos, se verificó su integridad por medio de electroforesis en gel de agarosa, logrando observar una banda correspondiente al ARN de 28S y 18S, confirmando la buena calidad de este.

Se utilizó el ADN complementario para verificar la correcta atenuación del gen *ninA* mediante RT-PCR. La electroforesis revela que tres de las cinco transformantes estaban correctamente atenuadas (Figura 14), debido a que el RT-PCR con los partidores PKSRNAi no muestra una banda de 566 pb, tamaño que corresponde al amplicón del gen *ninA*. Cabe decir que el PCR con los partidores β tub reveló un amplicón en torno a los 300 pb en todas las cepas transformantes, correspondiente a la banda de β -tubulina, lo que confirma la buena calidad del ADN complementario (Figura 14). El RT-PCR a la cepa WT reveló producción de transcrito del gen *ninA*, pero con una intensidad tenue. Sorprendentemente la transformante T3.8 mostró una banda más intensa que la cepa WT.

Finalmente, las transformantes T1.2, T2.9 y T2.18 fueron seleccionadas para análisis posteriores, así como también, la transformante T3.8, debido a la alta producción de transcrito del gen *ninA* presente en ella.

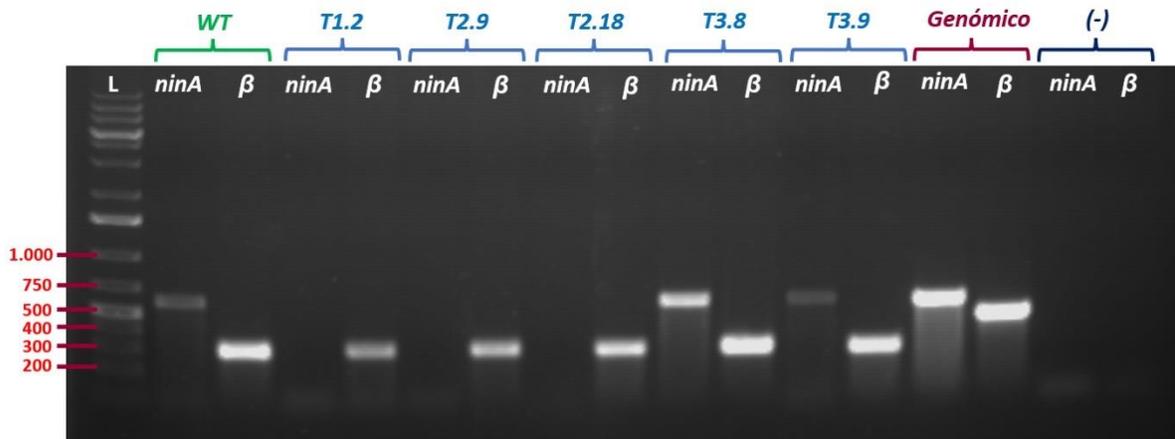


Figura 14. Comprobación de la atenuación del gen *ninA* en las transformantes seleccionadas mediante RT-PCR desde cultivos líquidos. En el gel se muestran los amplicones generados a partir de ADN complementario de una colonia WT, cinco transformantes seleccionadas por presentar el vector pJL43-*ninA* y ADN genómico del hongo, que se utilizó como control positivo. Las cepas que producían transcrito del gen *ninA* muestran un amplicón de 566 pb, esto se observa en la cepa WT, y en las transformantes T3.8 y T3.9, lo que indica que estas no están atenuadas. Las cepas T1.2, T2.9 y T2.18 no muestran una banda en los carriles de *ninA*, por tanto, no presentan transcrito del gen y son las transformantes correctamente atenuadas que fueron ocupadas en análisis posteriores. Para cada transformante se muestra en su carril respectivo un amplicón de 300 pb correspondiente a la β -tubulina, gen que se expresa constitutivamente en el hongo y es utilizado como control (Experimento repetido 2 veces).

5.5. Análisis de transcrito en cultivos sólidos

Una vez extraído ARN a partir micelio de cultivos en placas de la cepa WT y las cepas transformantes seleccionadas se realizó un RT-PCR para revisar la presencia o ausencia de transcrito de los genes *adrD* y *mpaC*. Para ello se emplearon los partidores *adrD*-fw, *adrD*-rv, *mpaC*-fw y *mpaC*-rv (Tabla IV). Este experimento fue repetido tres veces, y la cantidad de transcrito relativo respecto al gen de la β -tubulina se muestra en la Figura 15:

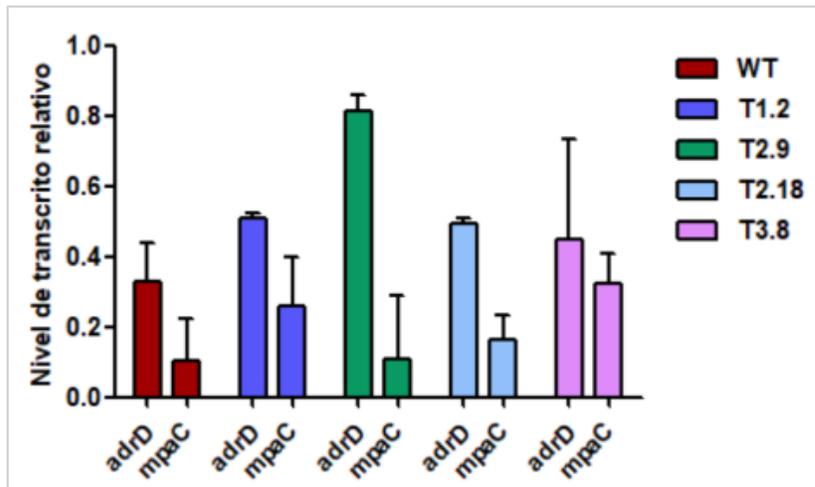


Figura 15. Niveles de transcrito relativo de los genes *adrD* y *mpaC* en las transformantes atenuadas para el gen *ninA*. Se muestra el promedio de transcrito relativo, calculado como la intensidad de banda de cada gen respecto a la intensidad de banda del gen de la β -tubulina para cada transformante y la cepa WT. La figura muestra que las tres transformantes atenuadas para el gen *ninA* (T1.2, T2.9 y T2.18) expresan los genes *adrD* y *mpaC*. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico del tipo ANOVA de 1 vía y un test de comparación de Tukey para los datos de cada transformante respecto a la cepa WT (Experimento realizado 3 veces).

Los resultados muestran que todas las cepas estudiadas producen transcrito del gen *adrD* y *mpaC*. La única diferencia significativa respecto a la cepa WT se observó en la transformante T2.9, que produce alrededor de 2,5 veces más transcrito del gen *adrD*. Los niveles de transcrito de las demás transformantes no muestran diferencias significativas respecto a la cepa WT.

5.6. Análisis de los perfiles de metabolitos secundarios

Tras realizar la extracción de metabolitos desde el agar de los cultivos, se obtuvo entre 40 y 50 mg de extracto a partir de cada placa, y se inyectó entre 2,5 y 3,5 mg de extracto en un volumen de 20 μ L de metanol en el HPLC analítico. Los espectros de absorción UV-visible de los dos metabolitos estudiados se muestran a continuación (Figura 16).

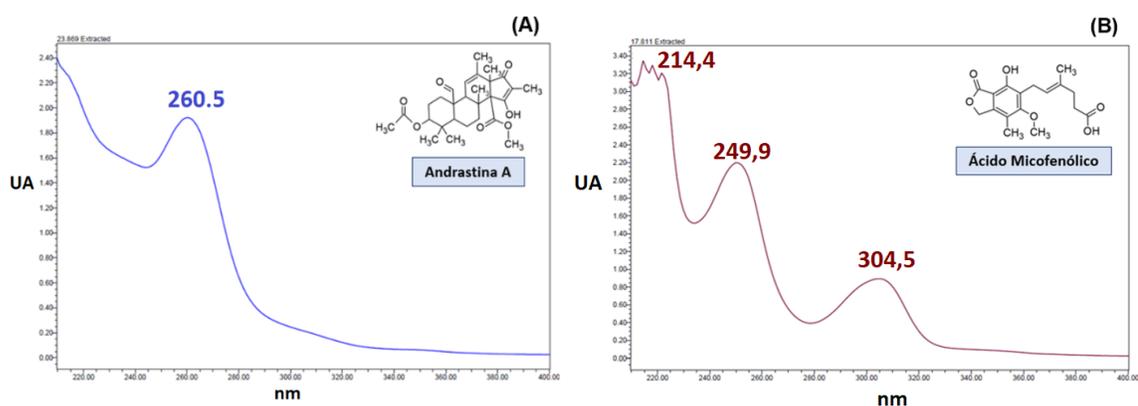
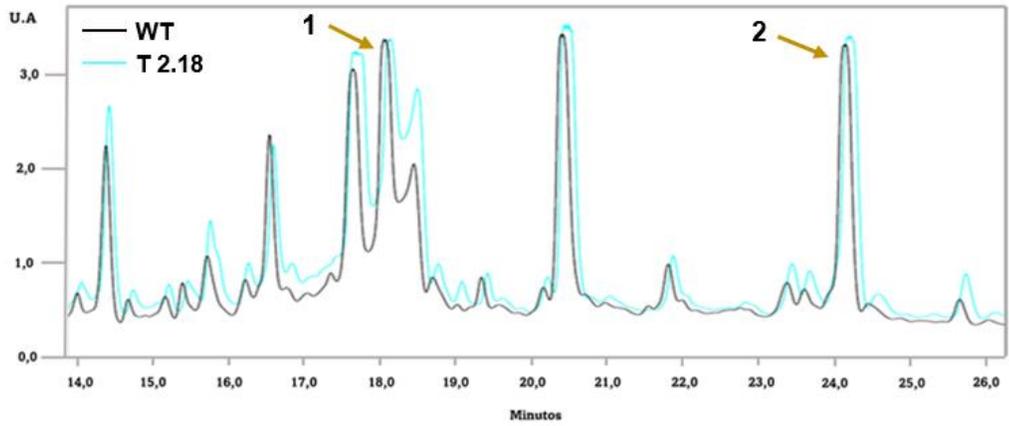
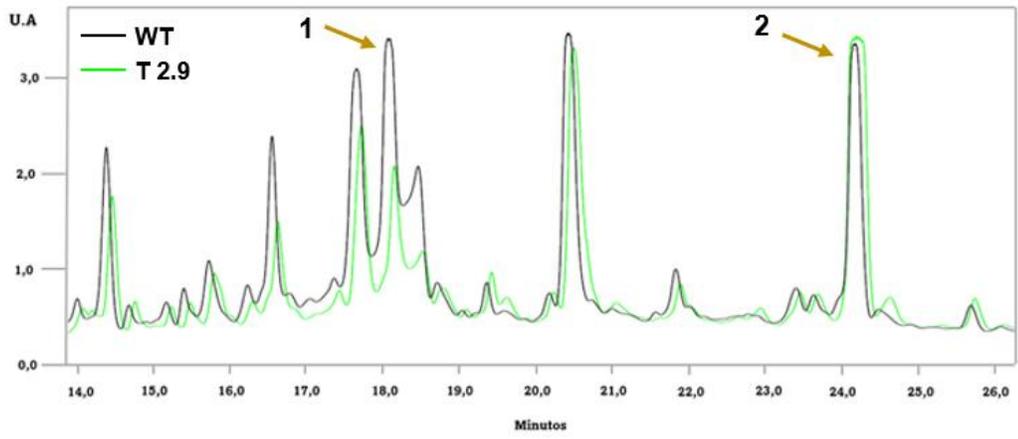
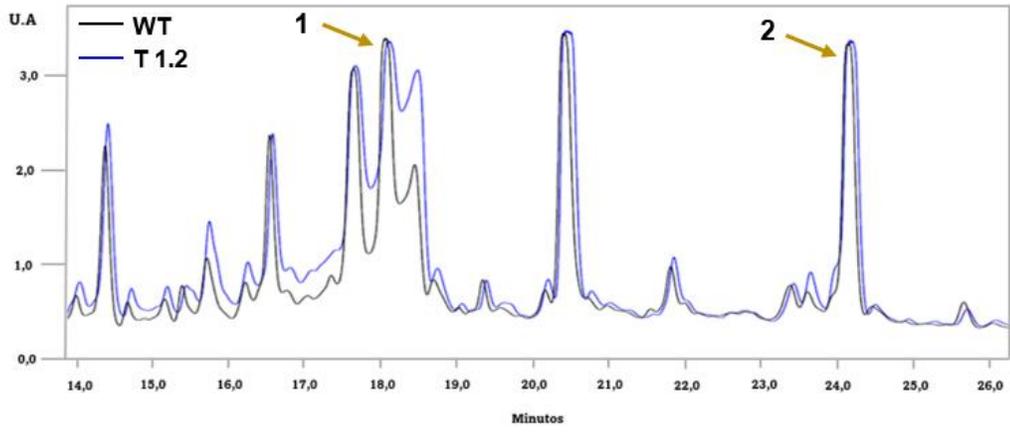


Figura 16. Espectros de absorción UV-visible de la andrastina y el ácido micofenólico. Los máximos de absorción fueron utilizados para encontrar los picos cromatográficos correspondientes de cada metabolito (A) Andrastina, que presenta un máximo en los 260 nm, (B) Ácido micofenólico, que presenta tres máximos: en 215, 250 y 304 nm.

Los espectros de absorción UV-visible de los compuestos analizados coinciden con los presentados en los correspondientes patrones (Figura 16).

Los cromatogramas a 254 nm revelan que la cepa WT produce ácido micofenólico y andrastina (Figura 17), debido a que presenta un pico cromatográfico a los 18 minutos de elución, que coincide con el tiempo de retención del patrón de ácido micofenólico, y otro cerca de los 24 minutos de elución, que coincide con el tiempo de retención del patrón de la andrastina.



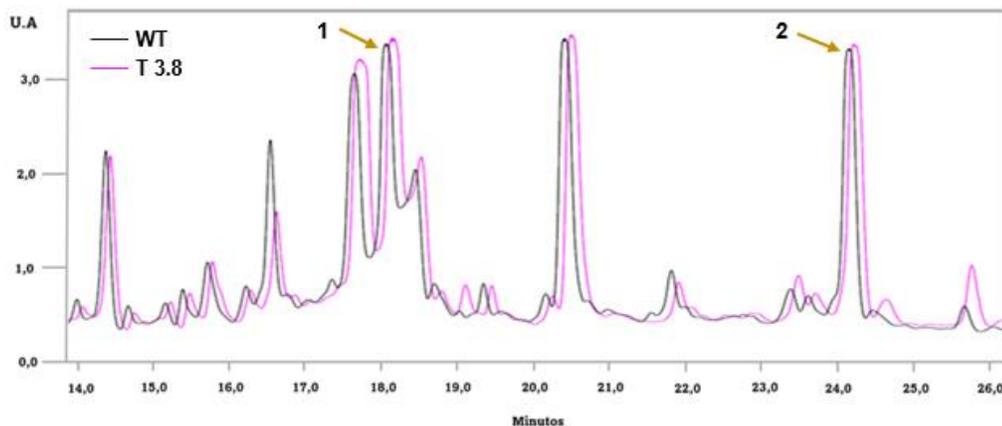


Figura 17. Cromatogramas a 254 nm de las cepas transformantes T1.2, T2.9, T2.18, T3.8 y WT. En cada cromatograma se muestra la comparación de los perfiles metabólicos de la cepa WT y la cepa transformante. En (1) se muestra con una flecha el pico cromatográfico correspondiente al ácido micofenólico a los 18 minutos de tiempo de retención, y en (2) se muestra con una flecha el pico cromatográfico de la andrastina, con un tiempo de retención de 24 minutos.

La Figura 17 muestra que las transformantes T1.2, T2.18 y T3.8 no presentan grandes diferencias entre los perfiles de metabolitos. Todas sintetizan ácido micofenólico y andrastina al igual que la cepa WT. Al comparar los cromatogramas de la transformante T2.9 y la cepa WT, se observa una disminución de la absorbancia del pico cromatográfico de ácido micofenólico aproximadamente a la mitad. Cabe decir que esta es la única diferencia apreciable entre ambos cromatogramas.

DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

En estudios anteriores realizados por nuestro grupo de investigación, se intentó determinar la estructura del metabolito sintetizado por la PKS-NRPS NinA utilizando la técnica de ARN de interferencia. Tras lograr silenciar exitosamente el gen, y analizar el perfil de metabolitos de cultivos sólidos de dos cepas transformantes se observó que estas no sintetizaban ni ácido micofenólico ni andrastina (Henríquez, 2015). Este resultado sugirió un posible fenómeno de *crosstalk* entre estos dos BGCs y el *cluster ninA*, mediado por la expresión del gen *ninA*, pero no pudo confirmarse debido a la falta de un análisis de transcrito de los genes de síntesis de esos metabolitos. El objetivo de esta investigación fue confirmar o refutar la existencia de este fenómeno en el metabolismo secundario del hongo de importancia biotecnológica, para así entender de mejor manera la forma en la que se regula la producción de estos dos metabolitos de interés.

6.1. Análisis bioinformático del BGC *ninA*

El análisis bioinformático por fungiSMASH mostró que el *cluster ninA* tiene 14 genes putativos, de los cuales 5 corresponden a genes típicos de BGCs fúngicos: una enzima principal de tipo PKS-NRPS (*ninA*), tres factores de transcripción de tipo Zn₆Cys₂ (*ft-60*, *ft-62*, *ft-64*), y un transportador (*mfs*). Se encontró tres genes con una posible función de enzima accesoria (*berb*, *amn*, *abs*) y un gen que codifica para una permeasa (*perm*). Además, presenta cuatro genes que no muestran una función clara que sugiera su participación en la síntesis o regulación del metabolito *ninA* (*orf59*, *orf65*, *orf68*, *orf70*).

Es probable algunos genes propuestos por el programa como parte del BGC *ninA* no formen parte de él, por ejemplo, la proteína codificada en el *orf59* presenta un 59,3 % de identidad con un canal de potasio de *Penicillium rolsii*, por lo tanto, es probable que ese gen no tenga

una función en el metabolismo secundario. Otro ejemplo es la proteína codificada por el gen *ifgF2*, propuesta como parte del BGC *ninA*, pero que, la evidencia experimental lo sitúa como parte del BGC de isofumigaclavina en *P. roqueforti*, codificando para una segunda copia de la festuclavina sintasa (Fernández-Bodega & cols., 2017).

Así, según el análisis realizado con el programa fungiSMASH, la enzima NinA presenta la estructura típica de una PKS-NRPS fúngica, con los dominios KS-AT-DH-MT-KR-ACP en la región correspondiente a la PKS, y los dominios C-A-PCP-R en la región correspondiente a la NRPS. Dado que el BGC no muestra ningún gen que codifique para un dominio enoil reductasa, es probable que el esqueleto principal del metabolito del BGC *ninA* no presente carbonos completamente reducidos.

Por otro lado, el análisis por BLASTP reveló que la enzima NinA tiene cerca de un 45% de identidad de secuencia con cinco enzimas PKS-NRPS que se encuentran caracterizadas (Tabla I), y cuyos metabolitos se muestran en la Figura 18.

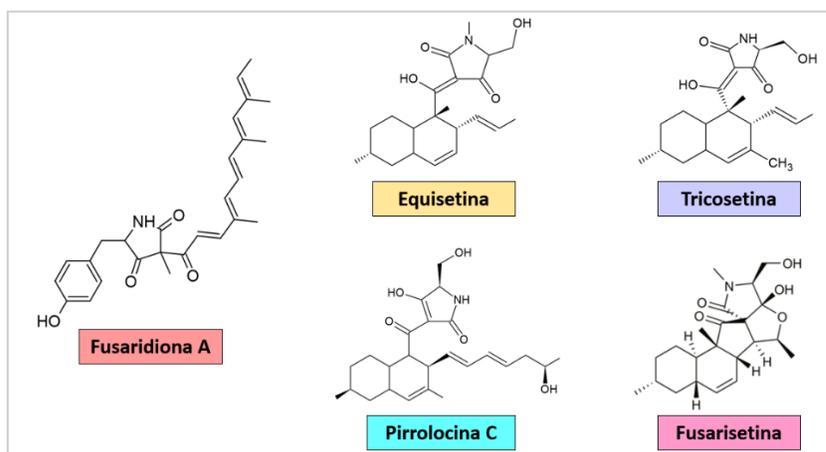


Figura 18. Metabolitos fúngicos cuyos BGC se encuentran caracterizados y cuyas enzimas PKS-NRPS presentan similitud de secuencia con NinA. Todos los metabolitos provienen de alguna cepa de *Fusarium*: la fusaridiona A, equisetina y pirrolocina provienen de *Fusarium heterosporum*, la tricosetina de *Fusarium fujikuroi*, y la fusarisetina de *Fusarium* sp. FN080326.

La fusaridiona A es sintetizada a partir de una unidad de acetil-CoA, seis unidades de malonil-CoA, y cuatro carbonos provenientes de SAM, que son condensados por la región PKS de la enzima FsdS, formando un octacétido intermediario. Posteriormente, la región NRPS lo condensa con el aminoácido tirosina, generando el metabolito final (Fisch, 2013). Los otros cuatro compuestos corresponden a metabolitos similares al ácido tetrámico sintetizados a partir de una unidad de acetil-coA, siete unidades de malonil-CoA, dos carbonos provenientes de dos unidades de SAM y el aminoácido serina, condensados por la enzima híbrida EqxS (Boettger & Hertweck, 2012). Esta enzima ensambla el esqueleto principal denominado tricoseína, y posteriormente, la enzima EqxD metila el nitrógeno del ácido tetrámico, produciendo equisetina (Fisch, 2013). La fusarisetina en tanto, es un metabolito que presenta la misma ruta biosintética que la equisetina, con uno o varios pasos adicionales que aún se desconocen (Kato & cols. 2015), que adicionan un oxígeno y forman dos anillos de 5 miembros.

Estos metabolitos han despertado el interés científico por sus peculiares actividades biológicas: mientras que la fusaridiona A presenta actividad antimicrobiana (Kakule & cols., 2014), la equisetina ha sido descrita como una molécula capaz de inhibir la actividad de la integrasa del VIH (Sims & cols. 2005). La fusarisetina en tanto, fue descrita como un inhibidor de la morfogénesis de células acinares (Kato & cols. 2015). La equisetina junto a la pirrolocina, presentan actividad antimicrobiana en contra de bacterias Gram positivas, debido a su capacidad de inhibir la acetil-CoA carboxilasa, primordial en la síntesis de ácidos grasos (Larson & cols. 2021). Finalmente, la tricoseína ha mostrado ser capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas como *S. aureus* y *B. subtilis* (Marfori & cols., 2002).

Continuando con el análisis de la enzima NinA, la predicción de los monómeros que utiliza revela que el aminoácido utilizado por la región NRPS es hidrofílico. La base de datos

NORINE, que fue la utilizada por fungiSMASH, clasifica a 9 aminoácidos en esta categoría: arginina, asparagina, glutamina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, ornitina y ácido- α -aminoadípico (Caboche & cols. 2008), por lo que NinA podría usar cualquiera de estos residuos para unirlos al esqueleto policétido del metabolito.

Como se dijo anteriormente, el BGC de *ninA* presenta tres factores de transcripción de tipo Zn_2Cys_6 . Esta familia de proteínas es el grupo de factores de transcripción más ampliamente distribuido en hongos filamentosos, y puede regular distintos procesos celulares, como el metabolismo de aminoácidos y azúcares, remodelación de cromatina, síntesis de metabolitos secundarios, etc. (Shelest, 2008). La cantidad de factores de transcripción presentes en los BGCs varía entre cero y dos por *cluster*. En *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus fumigatus*, dos especies en las que la mayoría de sus BGCs han sido descritos, se ha encontrado que el 42,3% y 55,6% de ellos respectivamente, presentan factores de transcripción codificados al interior del BGC (Wang & cols 2021). Además, se ha descrito que existe una relación entre el número de factores de transcripción por BGC y la cantidad de genes que presente: mientras más genes posea el BGC, mayor será el número de factores de transcripción que tendrá (Wang & cols 2021). Por ejemplo, el BGC de aflatoxinas de *A. nidulans* presenta 25 genes, de los cuales dos codifican para factores de transcripción: los genes *afIR* y *afIS*, en donde la proteína AfIS funciona como coactivador del factor AfIR, que activa la transcripción de los genes del BGC (Calvo & Dhingr, 2011), mientras que el BGC de fumisoquina que solamente tiene 7 genes presenta un solo factor de transcripción, que activa la transcripción de los genes del *cluster* (Baccile & cols., 2016). Hasta el momento, no se han descrito BGCs fúngicos que presenten tres factores de transcripción, por lo que el *cluster* estudiado en esta investigación sería el primero. Sin embargo, es probable que alguno de estos tres factores codificados dentro del BGC regule la expresión de otros genes no vinculados con la función del BGC *ninA*.

Al inicio del análisis bioinformático se esperaba lograr predecir las secuencias de ADN a las que los factores de transcripción del BGC se unían, utilizando la base de datos MEME (*Multiple Em for Motif Elicitation*), que predice el motivo de unión en base a motivos ya conocidos al entregarle las secuencias promotoras de los genes. Sin embargo, este análisis no mostró resultados significativos en la región promotora de ningún gen. Esto nos sugiere que los motivos de ADN a los que se unen estos factores de transcripción difieren notoriamente de los conocidos hasta ahora.

Por tanto, se continuó el análisis buscando dominios de unión al ADN (DBD) similares a los de los tres factores de transcripción encontrados en el BGC mediante BLASTP, debido a que se ha descrito que es posible predecir la secuencia de ADN de unión de manera correcta al tener DBDs lo suficientemente similares (Weirauch & cols. 2014). El análisis mostró que el DBD del Ft-62 mostró un 73,68% de identidad de secuencia con el factor Fsa6 de *Fusarium* sp. FN080326 ([AOA0E4AZF8.1](#)). Si bien este porcentaje de identidad de secuencia es alto, no es lo suficiente para establecer que la proteína Ft-62 se una al mismo motivo que el factor Fsa6. De todas maneras, el parecido de la proteína Fsa6 y el factor Ft-62 será discutido más adelante en la comparación de BGCs.

El DBD del Ft-64 mostró un 39,39% de identidad de secuencia con un factor de transcripción aún no caracterizado de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* ([O59830.1](#)). El bajo porcentaje de identidad con otras proteínas caracterizadas no permite proponer una función para dicho factor. Lo mismo ocurre con la proteína Ft-60, cuyo DBD muestra un 59,09% de identidad con el factor *CghD* de *Chaetomium globosum* CBS 148.51 ([Q2HBN3.1](#)).

Como proyección de este trabajo, se espera en un futuro estudiar la función de los factores de transcripción Ft-60, Ft-62 y Ft-64 mediante la metodología de *knockdown* por ARN de interferencia, y establecer si regulan la producción del metabolito ninA o de algún otro metabolito secundario conocido en *P. roqueforti*.

Por otro lado, el análisis bioinformático del BGC *ninA* también reveló la presencia de un gen que codifica para un transportador de la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*). Los transportadores de esta familia se caracterizan por ser proteínas de membrana que trasladan moléculas mediante transporte activo secundario, utilizando protones como fuerza impulsora para ya sea introducir o expulsar compuestos (Liu & cols. 2017). Las moléculas transportadas pueden ser desde azúcares simples y aminoácidos, hasta intermediarios del ciclo de Krebs y metabolitos secundarios (Pao & cols. 1998). La presencia de este gen en el *cluster* sugiere que el metabolito generado por el BGC *ninA*, o algunos de sus intermediarios, son movilizados entre distintos compartimentos celulares, o bien expulsado activamente al medio extracelular. En estudios anteriores mediante RT-PCR se demostró que el gen que codifica para este transportador se expresa en condiciones normales de cultivo, en medio YES a 27°C, junto a la enzima NinA (Henríquez, 2015). Sería interesante analizar el gen *mfs* participa en la secreción del metabolito *ninA*, debido a que se han demostrado casos en los que el MFS de un BGC no secreta el metabolito, como el gen *afIT* en el BGC de aflatoxinas en *Aspergillus parasiticus*, que codifica para un transportador, pero suele no expresarse cuando los demás genes del BGC lo hacen (Chang & cols. 2004). Otra posibilidad es que la expresión del transportador sea necesaria para la producción del metabolito, esto se ha evidenciado en la biosíntesis de andrastina, en donde tras silenciar el gen que codifica para el transportador AdrC se observó que disminuía la producción del metabolito (Rojas-Aedo & cols. 2017).

Finalmente, el programa fungiSMASH arrojó la presencia de la enzima Berb, una posible enzima accesoria codificada en el BGC. Esta enzima presenta un dominio de tipo “puente de berberina”, típico de enzimas oxidasas unidas a FAD, por lo que podría catalizar una reacción de oxido-reducción del esqueleto principal del metabolito luego de que la PKS-NRPS lo sintetice. En la cepa de *P. roqueforti* LCP96 04111, esta proteína Berb fue anotada

como una enzima activa sobre carbohidratos (CAZyme) de la familia *Auxiliary Activity Family 7* (AA7) ([XP_038929233.1](#)), familia de enzimas que oxida los residuos glicosil terminales de oligosacáridos. Si bien hasta la fecha no se han descrito BGCs fúngicos ni bacterianos que contengan enzimas de tipo “puente de berberina”, se han encontrado en el metabolismo secundario del reino vegetal, en donde, por ejemplo, participan en la conversión de (S)-reticulina en (S)-scoleurina, en la biosíntesis de sanguinarina, un compuesto antimicrobiano producido por *Papaver somniferum*, conocida comúnmente como amapola (Facchin & cols., 1996). Por tanto, esta enzima podría participar en el metabolito secundario de *P. roqueforti*. Así, la acción de una enzima hasta ahora no encontrada en ningún otro BGC sugiere que el metabolito producido por el *cluster ninA* podría presentar una estructura no descrita. Para conocer el papel de esta enzima en la síntesis del compuesto producido por el BGC *ninA*, se debe conocer la estructura del metabolito y realizar una pérdida de función, para encontrar si existe un intermediario que se acumule en el perfil de metabolitos y dilucidar su estructura.

6.2. Análisis bioinformático comparativo de BGCs

Dado que las enzimas principales de los BGCs de fusaridiona A, equisetina, tricosetina, fusarisetina y pirrolocina mostraron un alto porcentaje de identidad de secuencia con la enzima NinA, y con el fin de encontrar otras proteínas similares que permitieran predecir la función de los genes del BGC *ninA*, se realizó una búsqueda de proteínas similares a las que forman parte de estos BGCs en el proteoma de *P. roqueforti*. Al realizar este análisis, se encontró que algunas proteínas del BGC *ninA* compartían similitud con proteínas que integran los otros *clusters*. En concreto, esta similitud se encontró entre los factores de transcripción Ft-60, Ft-62, y el transportador Mfs.

El factor Ft-62 mostró cerca de un 40% de identidad de secuencia con las proteínas EqxF, PrIR, Fsa6 y Tf23. El factor EqxF ha sido predicho como uno de los reguladores en la síntesis de equisetina, pero la evidencia muestra que su sobreexpresión no aumenta la producción del metabolito (Kakule & cols., 2014). De la proteína PrIR no se tiene evidencia experimental de que regule los genes de su BGC, pero se ha inferido dicha actividad (Kakule & cols., 2014). La proteína Fsa6 ha sido descrita como un activador de la transcripción en la síntesis de fusarisetina y equisetina, puesto que su delección genera una pérdida de producción de ambos metabolitos (Kato & cols., 2015). Finalmente, en el BGC de tricosetina en *Fusarium fujikuroi* el factor Tf23 regula la expresión del transportador y de otras proteínas de detoxificación del metabolito sintetizado, específicamente de un citocromo P450 y un transportador de tipo ABC. Además, esta proteína se expresa en presencia de tricosetina, lo que apoya la idea que este factor se expresa para aminorar el efecto tóxico del metabolito (Janevska & cols., 2017) (Tabla X).

Tabla X. Resumen de las funciones y efectos de los factores de transcripción similares a los del BGC *ninA* en sus respectivos *clusters*.

	Ft-60		Ft-62	
	Factor	Función	Factor	Función
Fusarisetina (Kato & cols., 2015)	Fsa5	<ul style="list-style-type: none"> Activa la transcripción del BGC. Su delección elimina la producción de fusarisetina y equisetina 	Fsa6	<ul style="list-style-type: none"> Regula al BGC en un rol secundario. Su delección disminuye los niveles de equisetina y fusarisetina
Equisetina (Kakule & cols., 2014)	EqxR	<ul style="list-style-type: none"> Su sobreexpresión induce un aumento en la producción de equisetina 	EqxF	<ul style="list-style-type: none"> Su sobreexpresión no produce un aumento en la producción del metabolito
Tricosetina (Janevska & cols., 2017)	Tf22	<ul style="list-style-type: none"> Activa la transcripción de la PKS-NRPS, una Diels-Aldersa y una enoil reductasa, codificadas dentro del BGC. 	Tf23	<ul style="list-style-type: none"> Activa la transcripción del transportador MFS del BGC. Activa la transcripción de otros genes de detoxificación: transportador ABC y citocromo P450.

Por su parte, el factor Ft-60 mostró entre un 28% y un 44% de identidad de secuencia con las proteínas Fsa5, del BGC de fusarisetina, EqxR del BGC de equisetina y Tf22 del BGC de tricisetina. El factor EqxR regula la síntesis de equisetina, y su sobre expresión aumenta la producción del metabolito (Kakule & cols., 2014). Adicionalmente, el factor Fsa5 ha sido descrito como un regulador que controla tanto la síntesis de equisetina como fusarisetina en *Fusarium* (Kato & cols., 2015). Finalmente, el factor Tf22 activa la transcripción de tres genes del BGC de tricisetina: la PKS-NRPS, una Diels-Alderasa y una enoil reductasa (Janevska & cols., 2017). Por lo tanto, esta proteína regula la expresión de las enzimas principales del BGC (Tabla X).

Esta evidencia sugiere que tanto el factor Ft-60 como el Ft-62 podrían regular positivamente la producción del metabolito ninA en *P. roqueforti*.

Por su parte, la proteína Mfs mostró entre un 47% y un 53% de identidad de secuencia con transportadores de los cinco BGCs anteriormente descritos. De estos, se conoce que el transportador Fsa7 es necesario para la síntesis del metabolito, debido a que su delección produjo una notable reducción de fusarisetina (Kato & cols., 2015). Se cree que los transportadores FsdG, EqxG y PrIG son necesarios para la expulsión del metabolito al medio extracelular, pero no hay evidencia experimental de aquello (Kakule & cols., 2015). Finalmente, la proteína Mfs-T ha sido descrita como necesaria para la síntesis de tricisetina, ya que al deleccionarla, disminuye la expresión de tres enzimas del BGC, y se reduce la producción del metabolito (Janevska & cols., 2017). Esto indica que es probable que la proteína Mfs sea necesaria para la síntesis del metabolito ninA, ya sea para la expulsión del metabolito al exterior, o para transportar algún intermediario al interior de algún compartimiento, como pasa en la síntesis de penicilina G en *P. chrysogenum*, donde la isopenicilina N debe ser transportada al peroxisoma para finalizar la biosíntesis (Meijer & cols., 2010). De este análisis se establece que, los factores Ft-60 y Ft-62 y el transportador

Mfs son las proteínas del BGC *ninA* que se seleccionarían en primer lugar para ser atenuadas con el fin de dilucidar la ruta de biosíntesis del metabolito *ninA*.

6.4. Silenciamiento y producción de transcrito del gen *ninA*

Tras los experimentos de transformación de *P. roqueforti* con el vector pJL43-*ninA*, se determinó que nueve cepas transformantes presentaban este vector insertado en el genoma. Posteriormente, tras seleccionar cinco de estas al azar, se confirmó que tres de ellas estaban correctamente atenuadas (T2.1, T2.9 y T2.18), y dos no lo estaban (T3.8 y T3.9).

Los RT-PCR mostraron que la expresión del gen *ninA* en la cepa WT era baja en comparación con la expresión de un gen constitutivo como el de la β -tubulina. Si bien, ese nivel de producción de transcrito sirvió para clasificar las cepas correctamente atenuadas y las no atenuadas, para futuros estudios en los que se intentará purificar el metabolito producido por el *cluster*, se necesita una mayor expresión de dicha enzima. Para esto, se podría utilizar un medio de cultivo distinto al medio YES, como el PDB, caldo en base a patata y dextrosa el cual ha mostrado generar altos niveles de equisetina en *Fusarium* sp. *FN080326* (Kato & cols., 2015). Otra posibilidad es utilizar el medio que usaron Hatzuda & cols. durante la caracterización de la equisetina, un medio con glucosa, peptona, urea y una alta cantidad de iones como magnesio, zinc, calcio y potasio (Hatzuda & cols. 1999). En el caso de que no obtener una buena expresión de la enzima NinA con un cambio del medio de cultivo, se puede intentar una sobreexpresión de alguno de los factores de transcripción Ft-62 o Ft-60, ya que, este estudio demostró que es probable que sean los que regulen la expresión del BGC *ninA*.

6.5. Efecto del silenciamiento de *ninA* en la producción de andrastina y ácido micofenólico

El objetivo principal de esta investigación fue demostrar experimentalmente la existencia de un fenómeno de *crosstalk* en *P. roqueforti* entre la expresión del gen *ninA* y la producción de andrastina y ácido micofenólico. Para ello, se realizó la medición de la cantidad de andrastina y de ácido micofenólico producido por las cepas transformantes (que presentaban el gen *ninA* atenuado), junto con la determinación de la presencia del transcrito de los genes principales de biosíntesis de estos metabolitos, en estas mismas cepas transformantes.

Para el caso de la andrastina, su producción se mantuvo en los mismos niveles que los de la WT en todas las transformantes analizadas, incluyendo tanto las cepas correctamente atenuadas (T1.2, T2.9 y T2.18) como la no atenuada (T3.8). Estos resultados se correlacionaron con los experimentos de RT-PCR en donde se podía observar una expresión constante del gen *adrD*. Sorprendentemente, la transformante T2.9 mostró niveles aumentados de expresión del gen de síntesis de andrastina, pero, se cree que este fenotipo es propio de esta transformante y no un efecto del silenciamiento del gen *ninA*, debido a que no se repite en las demás transformantes. Estos resultados indican, por tanto, que ninguno de los productos del BGC *ninA* tendrían, en principio, incidencia en la producción de andrastina.

El análisis realizado para el ácido micofenólico arrojó resultados distintos. Tanto la cepa transformante T1.2 como la T2.18 mostraron niveles de producción de ácido micofenólico similares a los de la cepa WT, mientras que la cepa transformante T2.9 mostró niveles notoriamente menores de este compuesto. Sin embargo, estos resultados no se correlacionan con los análisis de transcrito, debido a que todas las cepas producen niveles similares a la cepa WT (Figura 19).

Esto podría deberse a una disminución de la producción de ácido micofenólico a los 7 días de cultivo, pero también podría relacionarse con que en algunas cepas transformantes la enzima NinA podría estar generando un cambio en la producción de dicho metabolito. Debido a que las otras transformantes no muestran el mismo fenotipo, esta baja producción del ácido micofenólico se podría deber a algún efecto diferente exclusivo de esa cepa transformante. Como se indicó en los antecedentes, Hidalgo y cols. (2014) realizaron el silenciamiento de cuatro de los genes de síntesis del metabolito toxina PR en *P. roqueforti*: el gen de la enzima principal y tres genes de enzimas accesorias lo cual conllevó un aumento significativo en la producción de ácido micofenólico en cada una de esas cepas transformantes. Esto los llevó a sugerir la existencia de un fenómeno de *crosstalk* entre el BGC de la toxina PR y el ácido micofenólico, sin mediar la acción, en principio, de ningún factor de transcripción (Hidalgo & cols., 2014). Sin embargo, en este trabajo no se analizaron los niveles de transcrito de las enzimas involucradas en la producción de ácido micofenólico. Es por ello que, considerando también los resultados de esta investigación, parece que la producción de ácido micofenólico se ve de algún modo influenciada al modificar otras rutas de biosíntesis de otros metabolitos secundarios. Esto podría deberse más que a un fenómeno de *crosstalk*, a reajustes en los flujos de precursores o compuestos intermediarios, entre otras causas que serán necesario investigar en un futuro.

Finalmente, tanto la evidencia bibliográfica como la experimental obtenida en este trabajo sugieren que la disminución en la producción de andrastina y ácido micofenólico observada por Henríquez (2015), no correspondía a un fenómeno de *crosstalk* como había sido propuesto inicialmente. Una posibilidad es que los transformantes seleccionados en esa investigación tuvieran el vector utilizado para silenciar la producción de *ninA* insertado en alguno de los BGCs de esos metabolitos o, más probablemente, en alguna región que regula la expresión de dichos *clusters*.

Los mecanismos que regulan la producción de ácido micofenólico y andrastina no se encuentran completamente descritos (Rojas-Aedo & cols., 2018), y debido a que no existen factores de transcripción codificados en sus BGCs, su regulación debe ser comandada por proteínas codificadas en otras regiones del genoma, ya sean reguladores globales o específicos (Figura 19). Uno de estos es el factor de transcripción del tipo dedos de Zinc denominado Pcz1, factor que había sido descrito como un regulador positivo del crecimiento y la conidiación, y negativo de la germinación conidial (Gil-Durán & cols., 2015). Esta proteína al ser silenciada mostró efectos negativos en la producción de andrastina y ácido micofenólico (Rojas-Aedo & cols., 2018), por lo que este regulador global tendría un rol importante en la producción de ambos compuestos.

Otra proteína involucrada en la producción de estos metabolitos es el supresor de kinasas Sfk1, el cual, tras ser silenciado, mostró un efecto negativo en la producción de andrastina y ácido micofenólico, reduciendo dichos niveles en un 70% (Torrents & cols., 2017).

Esto evidencia lo compleja que es la red de proteínas involucradas en la producción de estos metabolitos de interés biotecnológico. Dentro de las cuales la enzima NinA no muestra indicios de estar involucrada.

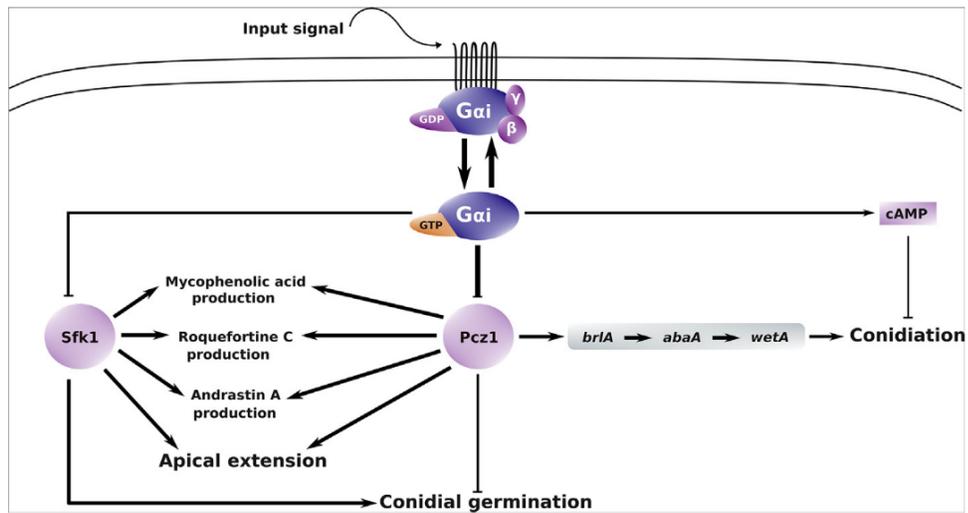


Figura 19. Diagrama de la regulación génica mediada por las proteínas Pcz1 y Sfk1. Ambas proteínas comandan la producción de ácido micofenólico, roquefortina C y andrastina. Además, controlan procesos primordiales para el hongo, como la conidiación, germinación de los conidios y la extensión apical (Cotton & cols., 2020).

En estudios futuros se espera analizar el efecto que tiene el silenciamiento o delección de los factores de transcripción del BGC *ninA*: Ft-60, Ft-62 y Ft-64, en la producción de andrastina, ácido micofenólico y otros metabolitos secundarios producidos por *P. roqueforti* para seguir encontrando nuevas proteínas partícipes en la regulación de la producción de estos compuestos.

CONCLUSIONES

El análisis bioinformático del BGC *ninA* mostró que presenta al menos seis genes, los cuales codifican para una enzima principal, una enzima accesoria que podría catalizar una reacción de oxidación, un transportador de la familia MFS y tres factores de transcripción de tipo Zn₂Cys₆. La presencia de tres factores de transcripción en un BGC fúngico no ha sido documentada hasta el momento.

Al comparar los BGCs a los que pertenecen las PKS-NRPSs que presentan similitud con *NinA*, con el BGC *ninA*, se encontró que en los BGCs de equisetina, fusarisetina, tricisetina y *ninA* mostraban similitud no solo la enzima principal, sino también el transportador y dos de los factores de transcripción (Ft-60 y Ft-62). Este resultado sugiere que probablemente los factores Ft-60 y Ft-62 sean los que estén involucrados en la regulación de la producción del metabolito final del BGC *ninA*, así como que el transportador también participe en la producción de dicho metabolito.

Los análisis de transcrito del gen que codifica para la enzima *NinA* en medio YES líquido revelaron bajos niveles de este. Por tanto, si se quiere purificar el metabolito vinculado a este BGC para determinar su estructura, se debe encontrar, en primer lugar, la forma de aumentar la expresión del gen *ninA*, empleando metodologías tales como un cambio en el medio de cultivo, o la sobreexpresión de los factores de transcripción del *cluster*.

Los experimentos de análisis de transcrito y perfiles de metabolitos realizados en este trabajo refutan la hipótesis inicial de la presencia de un fenómeno de *crosstalk* entre la enzima *NinA* y los BGCs de andrastina y ácido micofenólico. En este sentido, y considerando los resultados de este trabajo, sería interesante estudiar el rol de los factores de transcripción del BGC *ninA* y comprobar si su silenciamiento o delección genera un efecto en la producción de estos dos metabolitos de interés biotecnológico.

REFERENCIAS

- **Baccile, J. A., Spraker, J. E., Le, H. H., Brandenburger, E., Gomez, C., Bok, J. W., Macheleidt, J., Brakhage, A. A., Hoffmeister, D., Keller, N. P., Schroeder, F. C. (2016).** Plant-like biosynthesis of isoquinoline alkaloids in *Aspergillus Fumigatus*. *Nat. Chem. Biol.*, 12(6): 419–424.
- **Bentley, R. (2010).** Mycophenolic Acid: a one-hundred-year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chem. Rev.*, 100: 3801–3825.
- **Bergmann S, Funk A.N., Scherlach K., Schroeckh V., Shelest E. Horn U., Hertweck C (2010).** Activation of a silent fungal polyketide biosynthesis pathway through regulatory cross talk with a cryptic nonribosomal peptide synthetase gene cluster. *Environ. Microbiol.*, 76: 8143-9.
- **Bergmann, S., Schümann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A. A., & Hertweck, C. (2007).** Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat. Chem. Biol.*, 3(4), 213–217.
- **Boettger, D., & Hertweck, C. (2012).** Molecular diversity sculpted by fungal PKS-NRPS hybrids. *ChemBioChem.*, 14(1): 28–42.
- **Bok, J. W., Chung, D., Balajee, S. A., Marr, K. A., Andes, D., Nielsen, K. F., Keller, N. P. (2006).** GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence, *Infect. Immun.*, 74(12): 6761–6768.
- **Brakhage, A. A. (2012).** Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.*, 11(1): 21–32.
- **Caboche, S., Pupin, M., Leclère, V., Fontaine, A., Jacques, P., Kucherov, G., (2008).** NORINE: A database of nonribosomal peptides, *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan; 36: D326–D331.
- **Calvo, M., A., & Dhingr, S. (2011).** Conserved regulatory mechanisms controlling aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis. - *Biochem. Mol. Biol.*
- **Chang, P.-K., Yu, J., & Yu, J.-H. (2004).** aflT, a MFS transporter-encoding gene located in the aflatoxin gene cluster, does not have a significant role in aflatoxin secretion. *Fungal Genet. Biol.*, 41(10): 911–920.
- **Coton, E., Coton, M., Hymery, N., Mounier, J., & Jany, J.-L. (2020).** *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. *Fungal Biol. Rev.*, 34 (2): 59-73.
- **Del-Cid, A., Gil-Durán, C., Vaca, I., Rojas-Aedo, J. F., García-Rico, R. O., Levicán, G., & Chávez, R. (2016).** Identification and functional analysis of the mycophenolic acid gene cluster of *penicillium roqueforti*. *PLoS One*, 11(1): e0147047.
- **Devaux, C., Melenotte, C., Piercecchi-Marti, M D., Clémence Delteil, Raoult, D. (2021).** Cyclosporin A: a repurposable drug in the treatment of COVID-19?, *Front. Med.*, 6 (8): 663708.
- **Fernández-Bodega, M. A., Mauriz, E., Gómez, A., & Martín, J. F. (2009).** Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains, *Int. J. Food Microbiol.*, 136 (1):18-25.

- **Fernández-Bodega, Á., Álvarez-Álvarez, R., Liras, P., & Martín, J. F. (2017).** Silencing of a second dimethylallyltryptophan synthase of *Penicillium roqueforti* reveals a novel clavine alkaloid gene cluster, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101(15): 6111–6121.
- **Fisch, K. M. (2013).** Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS–NRPS. *RSC Advances*, 3(40).
- **Gaynes, R. (2017).** The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use, *emerg. Infect. Dis.*, 23(5): 849–853.
- **Gil-Durán, C., Rojas-Aedo, J. F., Medina, E., Vaca, I., García-Rico, R. O., Villagrán, S., Chávez, R. (2015).** The *pcz1* gene, which encodes a Zn(ii)2Cys6 protein, is involved in the control of growth, conidiation, and conidial germination in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*. *PLoS One*, 10(3): e0120740.
- **Hazuda, D., Blau, C. U., Felock, P., Hastings, J., Pramanik, B., Wolfe, A., ... Singh, S. (1999).** Isolation and characterization of novel human immunodeficiency virus integrase inhibitors from fungal metabolites, *Antivir. Chem. Chemother.*, 10(2): 63–70.
- **Henríquez, M. (2015).** “Detección y caracterización de los metabolitos secundarios de *Penicillium roqueforti* asociados a la expresión de una policétido sintasa”. (Tesis de magister). Universidad de Chile.
- **Hidalgo P., Ullán R., Albillos S., Montero O., Fernández Bodega M., García-Estrada C., Fernández-Aguado M. & Martín J., (2014)** “Molecular characterization of the PR-toxin gene cluster in *Penicillium roqueforti* and *Penicillium chrysogenum*: Cross talk of secondary metabolite pathway”, *Fungal Genet. Biol.*, 62: 11-24.
- **Huang X., Zhang W., Tang S., Wei S., Lu X. (2020)** Collaborative Biosynthesis of a class of bioactive azaphilones by two separate gene clusters containing four PKS/NRPSs with transcriptional crosstalk in fungi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59 (11): 4349-4353.
- **Ichihara, A., & Oikawa, H. (1999).** The Diels–Alder reaction in biosynthesis of polyketide phytotoxins, *Comprehensive Nat. Prod. Chem.*, 367–408.
- **Janevska, S., Arndt, B., Baumann, L., Apken, L., Mauriz Marques, L., Humpf, H.-U., & Tudzynski, B. (2017).** Establishment of the inducible Tet-On system for the activation of the silent trichosetin gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. *Toxins*, 9(4): 126.
- **Kakule, T. B., Jadulco, R. C., Koch, M., Janso, J. E., Barrows, L. R., & Schmidt, E. W. (2014).** Native promoter strategy for high-yielding synthesis and engineering of fungal secondary metabolites, *ACS Synth. Biol.*, 4(5): 625–633.
- **Kato N., Nogawa T., Hirota H., Jang J.H., Takahashi S., Ahn J.S., Osada H. (2015).** A new enzyme involved in the control of the stereochemistry in the decalin formation during equisetin biosynthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 460: 210-215.
- **Keller, N. P. (2018).** Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery., *Nat. Rev. Microbiol.*, 17: 167–180.
- **Larson, E. C., Lim, A. L., Pond, C. D., Craft, M., Čavuzić, M., Waldrop, G. L., Schmidt, E. W., Barrows, L. R. (2020).** Pyrrolocin C and equisetin inhibit bacterial acetyl-CoA carboxylase. *PLoS One*, 15(5): e0233485.
- **Li, H., Gilchrist, C. L. M., Lacey, H. J., Crombie, A., Vuong, D., Pitt, J. I., Piggott, A. M. (2019).** Discovery and heterologous biosynthesis of the burnettram acids: Rare PKS-

NRPS-Derived bolaamphiphilic pyrrolizidinediones from an Australian fungus, *Aspergillus burnettii*. *Org. Lett*, 21(5): 1287–1291

- **Liu, L., Yan, Y., Huang, J., Hsiang, T., Wei, Y., Li, Y., Gao, J., Zheng, L. (2017).** A novel MFS transporter gene *chmfs1* is important for hyphal morphology, conidiation, and pathogenicity in *Colletotrichum higginsianum*. *Front. Microbiol.*, 8.
- **Macheleidt, J., Mattern, D. J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Brakhage, A. A. (2016).** Regulation and role of fungal secondary metabolites, *Annu. Rev. Genet.*, 50(1): 371–392.
- **Marfori, E. C., Kajiyama, S., Fukusaki, E., & Kobayashi, A. (2002).** Trichosetin, a Novel Tetramic Acid Antibiotic Produced in Dual Culture of *Trichoderma harzianum* and *Catharanthus roseus* Callus. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.*, 57(5-6): 465–470.
- **Mahuku, G. S. (2004).** A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 22(1): 71–81.
- **Martínez-Rodríguez, Y., Acosta-Muñoz, C., Olivas, G.I., Guerrero-Berltran, J., Rodrigo-Aliaga, D., Mujica-Paz, H., Welti-Chanes, J. and Sepulveda, D.R. (2014).** Effect of high hydrostatic pressure on mycelial development, spore viability and enzyme activity of *Penicillium roqueforti*, *Int. J. Food Microbiol.*, 42 (6): 168-169.
- **Maiya S., Grundmann A., Li X., Li S., Turner G. (2007)** Identification of a hybrid PKS/NRPS required for pseurotin A biosynthesis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*, *ChemBioChem*, 8(14) 1736–1743.
- **Meijer, W. H., Gidijala, L., Fekken, S., Kiel, J. A. K. W., van den Berg, M. A., Lascaris, R., van der Klei, I. J. (2010).** Peroxisomes Are Required for Efficient Penicillin Biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(17): 5702–5709.
- **Mioso R., Toledo Marante F.J., Herrera Bravo de Laguna I. (2015).** *Penicillium Roqueforti*: a multifunctional cell factory of high value-added molecules, *J. Appl. Microbiol.*, 118 (4): 781-91.
- **Mulder, K. C. L., Mulinari, F., Franco, O. L., Soares, M. S. F., Magalhães, B. S., Parachin, N. S. (2015).** Lovastatin production: From molecular basis to industrial process optimization. *Biotechnol. Adv.*, 33(6), 648–665
- **Pao, S., Paulsen, I., Saier, M. H. (1998).** Major facilitator superfamily, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 (1): 1-34.
- **Pizzorno, A., Padey, B., Dubois, J., Julien, T., Traversier, A., Dulière, V., Terrier, O. (2020).** In vitro evaluation of antiviral activity of single and combined repurposable drugs against SARS-CoV-2, *Antivir. Res.*, 104878.
- **Qiao, K., Chooi, Y.-H., & Tang, Y. (2011).** Identification and engineering of the cytochalasin gene cluster from *Aspergillus clavatus* NRRL 1, *Metab. Eng.*, 13(6): 723–732.
- **Regueira, T. B., Kildegaard, K. R., Hansen, B. G., Mortensen, U. H., Hertweck, C., & Nielsen, J. (2011).** Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*., *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(9): 3035–3043.
- **Rho M. C., Toyoshima M., Hayashi M., Uchida R., Shiomi K., Komiyama K., & cols (1998).** Enhancement of drug accumulation by andrastin A produced by *Penicillium* sp. FO-3929 in vincristine-resistant KB cells., *J. Antibiot.*, 51: 68–72.

- **Roberts, P. J., & Der, C. J. (2007).** Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26(22): 3291–3310
- **Rojas-Aedo, J. F., Gil-Durán, C., Del-Cid, A., Valdés, N., Álamos, P., Vaca, I., García-Rico, R., Levicán, G., Tello, M., Chávez, R. (2017).** The biosynthetic gene cluster for andrastin A in *Penicillium roqueforti*, *Front. Microbiol.*, 8.
- **Rojas-Aedo, J. F., Gil-Durán, C., Goity, A., Vaca, I., Levicán, G., Larrondo, L. F., & Chávez, R. (2018).** The developmental regulator Pcz1 affects the production of secondary metabolites in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*., *Microbiol. Res.*, 212-213, 67–74.
- **Rojas-Triviño, A., (2015).** Metodología de extracción de ADN propuesta por Mahuku (2004), adaptado por Rojas-Triviño, Alberto. Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira.
- **Shelest, E. (2008).** Transcription factors in fungi, *FEMS Microbiol. Lett.*, 286(2): 145-51.
- **Sims, J. W., Fillmore, J. P., Warner, D. D., & Schmidt, E. W. (2005).** Equisetin biosynthesis in *Fusarium heterosporum*, *Chem. Commun.*, (2): 186.
- **Singh, S. B., Zink, D. L., Goetz, M. A., Dombrowski, A. W., Polishook, J. D., & Hazuda, D. J. (1998).** Equisetin and a novel opposite stereochemical homolog phomasetin, two fungal metabolites as inhibitors of HIV-1 integrase., *Tetrahedron Lett.*, 39(16): 2243–2246.
- **Tokuoka, M., Kikuchi, T., Shinohara, Y., Koyama, A., Iio, S., Kubota, T., Sato, K. (2015).** Cyclopiazonic acid biosynthesis gene cluster gene *cpaM* is required for speradine A biosynthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 79(12), 2081–2085.
- **Uchida R., Shiomi K., Inokoshi J., Sunazuka T., Tanaka H., Iwai Y., & cols (1996).** Andrastins A-C, new protein farnesyltransferase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FO-3929 II. Structure elucidation and biosynthesis, *J. Antibiot.*, 49: 418–424.
- **Wang, H., Fewer, D. P., Holm, L., Rouhiainen, L., & Sivonen, K. (2014).** Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *PNAS.*, 111(25): 9259–9264.
- **Wang, W., Yu, Y., Keller, N., & Wang, P. (2021).** Presence, mode of action and application of pathway specific transcription factors in *Aspergillus* Biosynthetic gene clusters, *Int. J. Mol. Sci.*, 22(16): 8709.
- **Weirauch M. T., Yang A., Albu M., Cote A. G., Montenegro-Montero A., Drewe P., Najafabadi H. S., Lambert S. A., Mann I., Cook K., Zheng H., Goity A., van Bakel H., Lozano J. C., Galli M., Lewsey M. G., Huang E., Mukherjee T., Chen X., Reece-Hoyes J. S., Govindarajan S., Shaulsky G., Walhout A. J., Bouget F.Y., Ratsch G., Larrondo L.F., Ecker J.R., Hughes T.R. (2014).** Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity, *Cell.*, 158 (6) :1431-43.
- **Yan Y., Xiang B., Xie Q., Lin Y., Shen G., Hao X., Zhu X. (2021).** A putative C2H2 transcription factor CgTF6, controlled by CgTF1, negatively regulates chaetoglobosin A biosynthesis in *Chaetomium globosum*, *Front. Fungal Biol.*, 2021.
- **Zheng, X., Wei, W., Zhou, W., Li, H., Rao, S., Gao, L., & Yang, Z. (2020).** Prevention and detoxification of patulin in apple and its products: A review., *Int. Food Res. J.*, 140: 110034.