

UCH-FC  
MAG-B  
H 519  
C.1



***“Detección y caracterización de los metabolitos secundarios de *Penicillium roqueforti* asociados a la expresión de una policétido sintasa”***

**Tesis**

**Entregada A La**

**Universidad De Chile**

**En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos**

**Para Optar Al Grado De**

**Magister en Ciencias Biológicas**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Marlene Henríquez Urrutia**

**Mayo, 2015**

**Director de Tesis Dra: Inmaculada Vaca Cerezo**

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

**Marlene Henríquez Urrutia**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 20 de mayo del 2015.

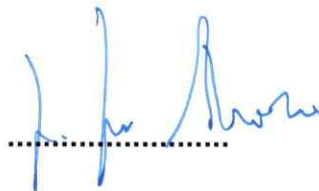
Director de Tesis:

Dr. Inmaculada Vaca Cerezo



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Jennifer Alcaíno Gorman



Dr. Ricardo Cabrera Paucar



*“Hemos sido llamados al concierto de este mundo para tocar de  
la mejor manera posible nuestro instrumento”.*

Rabindranath Tagore

## DEDICATORIA

A mis padres, hermanas y hermano, quienes con su infinita paciencia y amor me han apoyado, con sus risas y caricias me han animado y me han construido en la hija, hermana y mujer que soy.

## RESUMEN BIOGRÁFICO



Nacida y criada con el amor y sabiduría de mis padres, con los juegos y peleas de hermanas y hermano, en Santiago, bajo la protección de mi amada cordillera de los Andes.

Con cierta inmadurez e inconsciencia tomé el camino de las “ciencias” simplemente maravillada por la hermosura de la biología. En este proceso, no sólo encontré respuestas a sin número de interrogantes fascinantes sobre la célula y su biología, sino también una metodología y orden en mi pensamiento y por supuesto, nuevas interrogantes por responder.

## AGRADECIMIENTOS

*“Gracias a la vida que me ha dado tanto*

*Me ha dado la oportunidad de cometer errores y aprender de ellos*

*Me ha dado la capacidad de conocer al resto y conocerme a mi misma*

*Me ha dado una familia en constante cambio y crecimiento, que me muestran  
mis fortalezas y debilidades*

*Gracias a la vida que me ha dado la capacidad de seguir firme mi camino y las  
herramientas para transformar en oro y luz las oscuridades del alma.*

*Gracias a la vida, que ha puesto hermosas personas con quienes he marchado,  
disfrutado y aprendido.*

*Y gracias, por las aventuras que vendrán.....”*

Quiero expresar mi gratitud hacia Inma, quien me ha guiado desde mis inicios, con paciencia y cariño. A mis compañeros de laboratorio, con quienes compartí no solo el trabajo, sino también las risas.

Agradezco a las profesoras y profesores con cuyos consejos (científicos y personales) me han inspirado y formado en estos años.

A mis hermanos y amigos del alma....ellos sabrán quienes son.

**Financiamiento:** Proyecto Fondecyt 1120833  
CONICYT-PCHA/Magíster Nacional/2013-N° 22131659

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1 RESUMEN.....</b>	<b>xiii</b>
<b>2 ABSTRACT.....</b>	<b>xiv</b>
<b>3 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
3.1 El metabolismo secundario de los hongos filamentosos.....	1
3.1.1 Organización genética del metabolismo secundario .....	2
3.1.2 Principales enzimas del metabolismo secundario fúngico .....	5
3.1.2.1 Enzimas policétido sintasas.....	5
3.1.2.2 Enzimas sintetisas de péptidos no ribosómicos .....	8
3.1.3 Regulación del metabolismo secundario en hongos filamentosos ....	12
3.2 El metabolismo secundario de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	15
3.2.1 Metabolitos secundarios aislados de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	16
3.2.2 Rol de la proteína G en la regulación del metabolismo secundario de <i>P. roqueforti</i> .....	19
3.2.3 Hipótesis.....	19
3.2.4 Objetivos .....	20
3.2.4.1 Objetivo general:.....	20
3.2.4.2 Objetivos específicos: .....	20
<b>4 MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 Cepa fúngica.....	21
4.2 Medios de cultivos .....	21
4.3 Soluciones .....	22
4.4 Reactivos para biología molecular .....	22

4.5 Programas bioinformáticos .....	22
4.6 Preparación y transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> .....	23
4.7 Construcción del plásmido de ARN de interferencia (pJL43-PKS) para el silenciamiento del gen <i>ninA</i> .....	24
4.8 Protocolo de transformación de protoplastos de <i>P. roqueforti</i> . ....	27
4.8.1 Producción de protoplastos .....	27
4.8.2 Transformación de protoplastos .....	28
4.8.3 Selección de colonias de los transformantes de <i>P. roqueforti</i> . ....	29
4.9 Análisis de los niveles de expresión del gen <i>ninA</i> en las cepas transformantes .....	30
4.10 Protocolos para la extracción de los metabolitos secundarios de <i>P.</i> <i>roqueforti</i> nativo y transformantes.....	32
4.10.1 Extracción de los metabolitos secundarios presentes en el medio de fermentación.....	32
4.10.2 Extracción de andrastina y ácido micofenólico desde cultivos en medio sólido .....	32
4.11 Protocolo para el análisis de los metabolitos producidos por <i>P. roqueforti</i> mediante HPLC.....	33
4.11.1 Análisis de los perfiles de metabolitos secundarios de la cepa nativa y las cepas transformantes de <i>P. roqueforti</i> . ....	33
4.11.2 Cuantificación de andrastina A y ácido micofenólico en las cepas nativa y transformantes de <i>P. roqueforti</i> .....	34
4.12 Purificación de los metabolitos secundarios candidatos a producto biosintético de <i>ninA</i> en <i>P. roqueforti</i> .....	35



<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
5.1 Análisis bioinformático .....	38
5.2 Silenciamiento génico del gen <i>ninA</i> de <i>P. roqueforti</i> .....	42
5.2.1 Transformación de <i>P. roqueforti</i> con el plásmido pJL43-PKS y selección de transformantes por RT-PCR.....	42
5.2.2 RT-qPCR.....	43
5.3 Obtención y análisis de los perfiles de metabolitos secundarios de la cepa nativa y de las cepas transformantes mediante HPLC .....	45
5.3.1 Análisis de los metabolitos presentes en el caldo de cultivo de <i>P. roqueforti</i> .....	45
5.4 Purificación y caracterización del/los metabolitos secundarios asociados a la expresión de <i>ninA</i> . .....	50
5.5 Análisis de la producción de ácido micofenólico y de andrastina A por parte de las cepas transformantes.....	56
<b>6 DISCUSIÓN</b> .....	<b>60</b>
6.1 Caracterización estructural gen <i>ninA</i> .....	60
6.2 Metabolitos sintetizados por PKS-NRPS fúngicas .....	65
6.3 "Cross talk" entre vías del metabolismo secundario .....	70
<b>7 CONCLUSIONES</b> .....	<b>71</b>
<b>8 REFERENCIAS</b> .....	<b>72</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Estructura de las enzimas PKS y NRPS. ....	8
Figura 3.2 Estructura de una enzima híbrida PKS-NRPS. ....	12
Figura 3.3 Efecto de "cross-talk" entre los genes de dos rutas biosintéticas de metabolitos secundarios.....	15
Figura 3.4 Principales metabolitos de <i>Penicillium roqueforti</i> . ....	16
Figura 4.1 Esquema del plásmido pJL43-PKS utilizado para la generación del ARN de interferencia del gen <i>ninA</i> . ....	26
Figura 5.1 Estructura de la enzima NinA. ....	39
Figura 5.2.Estructura aproximada del núcleo del compuesto producido por la enzima NinA.....	40
Figura 5.3.Organización del hipotético cluster génico del gen <i>ninA</i> . ....	41
Figura 5.4. RT-PCR de los 5 genes candidatos del cluster génico de <i>ninA</i> .....	41
Figura 5.5 Electroforesis del producto de RT-PCR para el gen <i>ninA</i> y el gen control de la $\beta$ -tubulina. ....	42
Figura 5.6 Control de la presencia del plásmido pJL43-PKS en los transformantes.....	43
Figura 5.7.Cuantificación relativa de la expresión del gen <i>ninA</i> por RT-qPCR..	44
Figura 5.8.RT-PCR de la expresión del gen <i>ninA</i> a 7 y 10 días de cultivo. ....	45
Figura 5.9.Cromatogramas a 254 nm de los caldos de 7 días de cultivo de las cepas nativa y transformantes.....	47
Figura 5.10.Espectros de absorbancia de los compuestos seleccionados.....	48
Figura 5.11.Cromatogramas a 254 nm de los caldos de 10 días de cultivo de las cepas nativa y transformantes.....	49
Figura 5.12.Fracciones de la columna flash de fase reversa analizadas por	

HPLC analítico.....	51
Figura 5.13. Proceso de purificación de los compuesto 1 y 2. ....	53
Figura 5.14. Cromatograma compuesto 1 puro.....	54
Figura 5.15. Espectro de masas y estructura compuesto 1.....	55
Figura 5.16. Espectro <sup>1</sup> H-RMN del compuesto 2.....	56
Figura 5.17. Evaluación de la producción de andrastina A y ácido micofenólico de la cepa nativa y las transformantes por HPLC.....	58
Figura 6.1. Ruta biosintética propuesta de la isoflavipucina, un compuesto PK-NRP con leucina como aminoácido incorporado.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1 Secuencia de partidores utilizados	25
Tabla 4.2 Método cromatográfico 1	34
Tabla 4.3 Método cromatográfico 2	34
Tabla 4.4 Método de elución de la columna flash	36
Tabla 4.5 Método cromatográfico semipreparativo 1	37
Tabla 4.6 Método cromatográfico semipreparativo 2	37
Tabla 5.1 Genes pertenecientes al hipotético cluster génico del gen <i>ninA</i>	40
Tabla 6.1. Enzimas PKS-NRPS fúngicas conocidas y los compuestos que producen (Modificado de Boettger & Hertweck, 2013)	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

Cromatografía líquida de alta presión	HPLC
Resonancia Magnética Nuclear de Protones	<sup>1</sup> H-RMN
Basic Local Alignment Search Tool	BLAST
National Center of Biotechnology Information	NCBI
Enzima policétido sintasa	PKS
Enzima sintetasa de péptidos no ribosómicos	NRPS
Compuesto híbrido policétido-péptido no ribosómico	PK-NRP
Dominio ceto sintasa	KS
Dominio acil transferasa	AT
Dominio proteína acil carrier	ACP
Dominio deshidratasa	DH
Dominio enoil reductasa	ER
Dominio ceto reductasa	CR
Dominio de condensación	C
Dominio de adenilación	A
Dominio de tiolación	T
Dominio tioesterasa	TE
Dominio de metilación	MT
Dominio de epimerización	E

## 1 RESUMEN

*Penicillium roqueforti* es una de las especies más conocidas del género fúngico *Penicillium* debido a su amplia utilización en la producción de quesos azules. Varios estudios han demostrado que *P. roqueforti* es un gran productor de metabolitos secundarios, como ácido micofenólico y andrastina, y recientemente se ha encontrado que la proteína G podría estar involucrada en la biosíntesis de dichas moléculas.

En un análisis previo a este trabajo, se encontró una secuencia de cADN, denominada *ninA*, cuyo producto presenta similitud con una enzima policétido sintasa (PKS) y su expresión esta regulada negativamente por la proteína G.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el gen *ninA*. Para el análisis del gen, se utilizaron herramientas bioinformáticas para determinar la estructura del polipéptido que codifica y los genes que conforman el cluster génico al que pertenece. Para el análisis funcional, se generó un ARN de interferencia contra el gen *ninA* y se evaluó la producción de los metabolitos por parte de las cepas nativa y transformantes mediante HPLC.

En este trabajo se encontró que el gen *ninA* codifica una enzima híbrido PKS-NRPS que formaría parte de un cluster génico de 5 genes. Por otro lado, los datos espectroscópicos obtenidos hasta el momento de uno de los compuestos candidato a formar parte de la ruta biosintética a la que pertenece *ninA* sugiere que dicho compuesto contiene el aminoácido leucina en su estructura. Finalmente, se encontraron indicios de un efecto de regulación cruzada ("cross talk") entre la ruta de NinA y las rutas metabólicas del ácido micofenólico y la andrastina A.

## 2 ABSTRACT

*Penicillium roqueforti* is one of the best known species of the genus *Penicillium* because of its wide use in the production of blue cheeses. Several studies have shown that *P. roqueforti* is a major producer of secondary metabolites, such as mycophenolic acid and andrastin A, and recently it has been found that the G protein might be involved in the biosynthesis of these and other metabolites. In a previous analysis, a cDNA sequence, named *ninA*, was found. Its product has similarity to a polyketide synthase enzyme (PKS) and its expression is negatively regulated by G protein.

The aim of this study was to characterize the gene *ninA*. The gene was analysed by bioinformatics tools and the theoretical structure of the enzyme and the genes that comprise its hypothetical gene cluster were determined. For functional analysis, the gene was down regulated using the RNAi technology and the production of metabolites by the native strain and down regulated strains was evaluated by HPLC.

In this work, it was found that *ninA* encodes a hybrid PKS-NRPS enzyme, which is part of a gene cluster of 5 genes. On the other hand, the hypothetical compound produced by NinA would be composed by leucine in its structure. Finally, there would exist a "cross talk" regulation between NinA pathway and the metabolic pathways of mycophenolic acid and andrastin A.

### 3 INTRODUCCIÓN

#### 3.1 El metabolismo secundario de los hongos filamentosos

El descubrimiento de la penicilina a partir de un hongo perteneciente al género *Penicillium*, marcó un hito en la historia de la medicina y en el estudio de los productos naturales (también conocidos como metabolitos secundarios), pues a partir de este descubrimiento, se inició una fructífera búsqueda de metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas provenientes de este grupo de microorganismos. De hecho, los hongos filamentosos actualmente son reconocidos como una de las principales fuentes de compuestos bioactivos de interés tanto farmacéutico como industrial. Sin embargo, a pesar de ser compuestos tan importantes, no existe claridad sobre su función. Al respecto, Keller *et al.*, 2005, describe:

“Los metabolitos secundarios comparten las enigmáticas propiedades de dispensabilidad celular: los organismos productores pueden vivir sin sintetizar esos metabolitos, y presentan una distribución taxonómica restringida (sólo un pequeño grupo de organismos puede producir cada metabolito)”

En general, los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular y son el resultado de procesos biológicos agrupados como “metabolismo secundario”. Para lograr diferenciar estos procesos, se define el metabolismo primario como aquella serie de reacciones y vías metabólicas que permite la producción de numerosos compuestos que están universalmente distribuidos en el metabolismo celular y que son esenciales para el crecimiento activo, la morfogénesis y la reproducción en los hongos (Kaur & Collins, 2015; Gacek & Strauss, 2012). Los productos del metabolismo primario sirven de precursores para numerosas vías del metabolismo secundario, las cuales se relacionan con una fase de crecimiento del hongo frente a la escasez de nutrientes y con cambios morfológicos asociados a variaciones en factores



ambientales como la luz, la temperatura y el pH. Esto último puede otorgar a los hongos competitividad en su nicho, permitiendo mayor sobrevivencia a las especies capaces de adaptarse (Gacek & Strauss, 2012).

### **3.1.1 Organización genética del metabolismo secundario**

Los genes de los componentes de una ruta del metabolismo secundario presentan a nivel genético ciertas características:

- 1.- Los genes que codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios se encuentran habitualmente juntos físicamente en el cromosoma, formando los denominados clusters génicos.
- 2.- Los genes generalmente están transcripcionalmente co-regulados.
- 3.- La alteración en la expresión de uno o más genes del cluster génico produce una alteración en la producción del/los metabolitos secundarios producidos por la ruta biosintética en la que participan (Gazeck & Strauss, 2012; Keller *et al.*, 2005).

De acuerdo a las características mencionadas, la determinación de los genes que conforman un cluster génico del metabolismo secundario generalmente se lleva a cabo mediante la identificación, en primer lugar, de los genes que codifican las enzimas encargadas de la síntesis del núcleo estructural del compuesto. Para ello, se emplean análisis bioinformáticos de los genomas o también, se analizan cepas mutantes deficientes en la producción del metabolito de interés. Posteriormente, se realiza la identificación y el análisis de las funciones de los genes ubicados río arriba y río abajo del/los genes centrales. Para que estos genes se puedan considerar como candidatos a formar parte del cluster, su función debe estar relacionada con la posibilidad de realizar modificaciones estructurales al núcleo central del compuesto, y otras funciones esenciales para la producción del compuesto final como son transportadores, reguladores, genes de resistencia a los metabolitos

producidos, entre otros; por lo que el límite del cluster estará determinado por la presencia de genes que cumplan roles en otros procesos celulares. Finalmente, es necesario realizar la evaluación funcional de cada uno los genes en la ruta biosintética mediante técnicas de interrupción génica, complementación y sobreexpresión, o técnicas de atenuación de la expresión génica.

En particular, en los hongos filamentosos, los clusters génicos del metabolismo secundario se encuentran en la región subtelmérica del cromosoma lo que permite mayor variabilidad dado que esta zona sufre numerosos re-arreglos, deleciones parciales, translocaciones y recombinación no alélica (Kaur & Collins, 2015). Existen varias hipótesis que intentan explicar este tipo de organización. Por un lado, puede deberse a eventos de transferencia horizontal desde bacterias a hongos, existiendo evidencia de este fenómeno en la transferencia de los genes involucrados en la síntesis de penicilina. Esto se logró determinar al analizar las enzimas isopenicilina-N-sintetasas entre ambos grupos, encontrándose homología entre ellas. (Khaldi *et al.*, 2008). Por otro lado, la organización de los genes del metabolismo secundario en clusters ofrecería cierta ventaja selectiva al poder regular de manera eficiente la expresión de los genes biosintéticos, llevando a un proceso de transcripción coordinado, el cual podría ser activado por genes codificados dentro o fuera del mismo cluster (Gazeck & Strauss, 2012).

Formando parte de estos clusters génicos del metabolismo secundario se encuentran los genes que codifican proteínas necesarias para distintos procesos, todos ellos relacionados con la producción del compuesto final. Por un lado están los genes que codifican las enzimas responsables de la biosíntesis del núcleo estructural del compuesto, tales como enzimas policétido sintasa y sintetasa de péptidos no ribosómicos. También es posible encontrar genes que codifican enzimas que catalizan distintas modificaciones a la estructura central del metabolito tales como oxigenasas, metilasas, enoil reductasas, deshidratasas, etc. Por otro lado, hay genes involucrados en la

regulación que codifican factores de transcripción que, en la mayoría de los casos, se encargan de regular la transcripción del resto de los genes del mismo cluster. También es frecuente encontrar genes de transportadores de tipo ABC o transportadores MFS u otros tipos de transportadores, los cuales están involucrados en el transporte tanto de los compuestos intermediarios de la ruta como del producto final entre compartimentos celulares y hacia el exterior. En algunos casos, estos mismos transportadores confieren resistencia al organismo frente a la producción de metabolitos tóxicos. Finalmente, en ocasiones, en el mismo cluster se encuentran genes que confieren al organismo resistencia al metabolito producido por esa ruta, como en el caso del cluster génico de la síntesis de gliotoxina en *Aspergillus fumigatus*, donde el gen *gliT* codifica una gliotoxina oxidasa (Brakhage, 2013).

El tamaño de los clusters génicos es muy variable. En *Fusarium*, el cluster génico de la bikaverina es de 18 Kb y está formado por 6 genes, *bik1-bik6*, de los cuales *bik1* codifica una enzima PKS, *bik2* y *bik3* codifican enzimas oxidasas, *bik4* y *bik5* codifican 2 factores de transcripción y *bik6* codifica un transportador. Las funciones de cada uno de estos genes fueron determinadas mediante la generación de mutantes interrumpidos y también mediante la expresión heteróloga de algunos de estos genes (Hoffmeister, 2006; Campbell *et al.*, 2012). Por otro lado, en *Aspergillus parasiticus* se encuentra el cluster génico involucrado en la biosíntesis de la aflatoxina (70 kb) formado por 29 genes entre los cuales se encuentran genes de la sintasa de ácidos grasos, genes que codifican una policétido sintasa y otras enzimas involucradas en la síntesis, genes regulatorios de la vía y un gen sin función asignada. En el extremo 5' del cluster existe una región de 2 kb sin ningún ORF detectable que marca el final del cluster. En el extremo 3', el término del cluster se encuentra marcado por la presencia de 4 genes involucrados en la utilización del azúcar como fuente de carbono. Mediante técnicas de disrupción génica y de complementación, se fueron asignando las funciones a cada uno de los genes

en las distintas etapas de la biosíntesis de la aflatoxina. En cuanto a su regulación, se determinó que el gen *afIR*, que codifica un factor de transcripción  $Zn_2(II)$  Cys<sub>6</sub>, es necesario para la activación transcripcional de todos los genes del cluster (Yu *et al.*, 2004).

### 3.1.2 Principales enzimas del metabolismo secundario fúngico

Actualmente, los metabolitos secundarios de los hongos filamentosos se pueden clasificar en 4 grandes grupos de acuerdo a los tipos de enzimas involucradas en su biosíntesis: policétidos, péptidos no ribosómicos, terpenos y alcaloides tipo indol. Particularmente, los policétidos y los péptidos no ribosómicos han sido los compuestos más estudiados debido a su gran diversidad, abundancia y propiedades bioactivas.

#### 3.1.2.1 Enzimas policétido sintasas

Los policétidos son los metabolitos secundarios fúngicos más abundantes (Keller, 2005). El principal interés en estos compuestos radica en que presentan una amplia gama de actividades de alto interés farmacéutico. Por ejemplo, la lovastatina, producida por *Aspergillus terreus*, es un fármaco con estructura cíclica que se utiliza para la regulación de los niveles del colesterol (Bingle *et al.*, 1999). Sin embargo, no todas las actividades biológicas que presentan los policétidos son beneficiosas para el hombre ya que muchos de ellos son causantes de grandes pérdidas económicas en la agricultura e industria alimenticia como es el caso de la toxina T de *Cochliobolus heterosporus* que provoca necrosis en el maíz (Schumann & Hertweck, 2006).

Los policétidos presentan una enorme variedad estructural, pero independientemente de ello, todos se sintetizan a partir de pequeñas unidades de ácidos carboxílicos (Teicher & Nowrousian, 2011). Las enzimas encargadas de su biosíntesis se denominan policétido sintasas (PKS) y están constituidas por varios dominios enzimáticos funcionales organizados en módulos que catalizan diferentes reacciones.

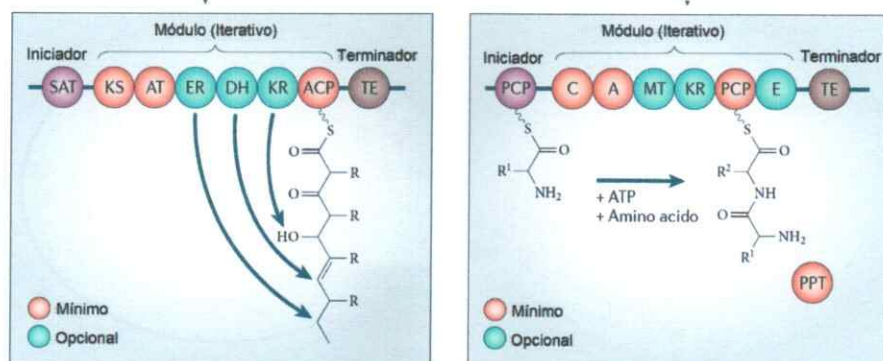
Los diferentes módulos presentan 3 dominios catalíticos básicos: cetosintasa (KS), transportador acil con 4'fosfopantotenato (ACP) y aciltransferasa (AT). Para la síntesis de policétidos se requieren dos tipos de sustratos diferentes: las moléculas de inicio, que se unen al dominio KS mediante un enlace tioéster (generalmente son moléculas de acetil-CoA) iniciándose así la síntesis del compuesto policétido. Posteriormente, el otro tipo de sustrato, conocido también como moléculas extensoras (generalmente malonil-CoA), se unen al dominio AT. Este dominio se encarga de transferir la molécula extensora al brazo de 4'fosfopantotenato del dominio ACP. De esta forma, acil-KS y acil-ACP reaccionan mediante una condensación descarboxilativa, con liberación de una molécula de dióxido de carbono, generando un intermediario  $\beta$ -cetoacil de 4 carbonos unido a ACP que puede ser sustrato en una nueva ronda de reacciones (Kim, 2013). En algunos casos, en la región C-terminal de la enzima se encuentra el dominio tioesterasa (T) que se encarga de la liberación del policétido y también, en algunas ocasiones, de catalizar la ciclación de las cadenas generando compuestos aromáticos. Adicionalmente a estos tres dominios básicos, existen otros tres dominios catalíticos: cetereductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoil reductasa (ER), que están implicados en el proceso de reducción de los grupo cetónicos y pueden estar o no presentes en la PKS, ya que la reducción es un proceso opcional en la síntesis de policétidos. También es posible encontrar dominios de metilación (MT) (Atoui *et al.*, 2006; Cox, 2007).

Actualmente se conocen 3 tipos de PKS, denominados PKS tipo I, tipo II y tipo III. Las PKS tipo I se encuentran en bacterias, hongos y protozoos, mientras que las del tipo II están presentes exclusivamente en bacterias. Las PKS tipo III o tipo chalcona sintasa, fueron descubiertas primero en plantas para posteriormente ser también encontradas en bacterias y hongos. Las PKS fúngicas son en su mayoría del tipo I y se encuentran distribuidas principalmente entre los hongos ascomicetes (Teichert y Nowrousian, 2011).

Estas enzimas usualmente presentan un único set de dominios organizados en un único módulo, a diferencia de las PKS tipo I no iterativa o PKS tipo II presentes en bacterias que presentan varios módulos que trabajan de forma secuencial traspasando la cadena creciente del policétido de módulo en módulo. Por lo tanto, en hongos, una única PKS modular cataliza múltiples ciclos de elongación de la cadena del policétido (figura 3.1) (Atoui *et al.*, 2006).

Consecuentemente, de acuerdo con la presencia y/o ausencia de dominios de reducción, las PKS tipo I fúngicas se pueden clasificar en PKS no reductoras o NRPKS (sin dominios de reducción), PKS parcialmente reductoras o PRPKS (sin dominio de iniciación ni terminación) y PKS altamente reductoras o HRPKS (presenta dominios DH, MT, KR y en ocasiones ER) (Kim, 2013).

En resumen, la variedad estructural de los policétidos depende del número de pasos de iteración en la síntesis, de la presencia o no de dominios reductores, de los sustratos utilizados y de la presencia de dominios de ciclación (para la generación de compuestos aromáticos) presentes en la PKS (Keller *et al.*, 2005). Como se mencionó anteriormente, los genes de las PKS forman parte de un cluster génico que incluye a otros genes tales como los que codifican enzimas modificadoras de los productos (metilasas, oxidasas, etc.) que aumentan la diversidad estructural de los policétidos logrando así una mayor diversidad funcional (Varga *et al.*, 2003).



**Figura 3.1 Estructura de las enzimas PKS y NRPS.**

En la figura se presenta el arreglo estructural de las enzimas PKS y NRPS. Los dominios enzimáticos se muestran como círculos. En rojo los dominios mínimos para cada enzima: cetosintasa (KS), acil transferasa (AT) y ACP (proteína acil carrier) para las enzimas PKS que se encargan de catalizar la adición de malonil-CoA en la cadena poliacetilo naciente y dominios de condensación (C), adenilación (A) y tiolación (PCP o T) para las enzimas NRPS que se encargan de la adición de aminoácidos activados por ATP en la cadena naciente. En azul los dominios opcionales: enoil reductasa (ER), deshidratasa (DH), cetoreductasa (KR), metil transferasa (MT), epimerización (E) encargados de las modificaciones a los grupos funcionales de los compuestos. Dominio final tioesterasa (TE) para la liberación del compuesto (Modificado de Brakhage 2013).

### 3.1.2.2 Enzimas sintetisas de péptidos no ribosómicos

El segundo grupo en importancia de metabolitos secundarios fúngicos corresponde a los péptidos no ribosómicos (NRP). Este tipo de compuestos también poseen un amplio espectro de actividades y, en particular, han sido un gran aporte para la industria farmacéutica. La penicilina y la cefalosporina, dos de los antibióticos más empleados en la actualidad, y la ciclosporina, un importante inmunosupresor, son algunos compuestos pertenecientes a este grupo (Strieker *et al.*, 2010). También algunos de estos compuestos poseen actividades biológicas que resultan nefastas tanto para la salud del ser humano como para la agricultura. Estos son los casos de la gliotoxina, una micotoxina

producida por *Aspergillus fumigatus* que afecta el sistema inmune; y de la toxina HC de *Cochliobolus carbonum*, un devastador patógeno del maíz que genera grandes pérdidas económicas (Cramer *et al.*, 2006). Del mismo modo que ocurre para los policétidos, la gran diversidad química y funcional de los NRP se debe en parte a la naturaleza de su biosíntesis.

Las enzimas encargadas de la síntesis de los NRP corresponden a las sintetetas de péptidos no ribosómicos o NRPS. Estas enzimas son las más grandes encontradas en la naturaleza con tamaños que alcanzan 1,689,243 Da y catalizan la condensación de aminoácidos mediante la generación de enlaces peptídicos entre ellos (Brown & Proctor, 2013). Los genes que codifican estas enzimas sólo han sido descritos en bacterias y en hongos, sin encontrarse en animales o plantas (Teichert & Nowrousian, 2011).

La principal característica de las NRPS es que pueden utilizar hasta 500 sustratos diferentes, entre los que se incluyen aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, ácidos grasos,  $\alpha$ -hidroxiácidos, entre otros, pudiendo generar compuestos con estructura lineal, ramificada o cíclica (Strieker *et al.*, 2010; Konz & Mahariel, 1999). Los NRP pueden contener entre 2 a 40 aminoácidos, los que pueden ser modificados por enzimas tales como halogenasas, hidroxilasas, glicosilasas, etc., cuyos genes se encuentran en el mismo cluster de los de NRPS, (Keller *et al.*, 2005; Teichert & Nowrousian, 2011). Todo esto en su conjunto es lo que otorga la gran diversidad química a los NRP.

La estructura de las NRPS es muy similar a la de las enzimas PKS, pues también son enzimas multimodulares donde cada módulo contiene diferentes dominios catalíticos que se encargan de cada uno de los pasos en la síntesis de los NRP (figura 3.1). En bacterias, la biosíntesis de los NRP puede requerir de varias NRPS individuales, pudiendo cada una tener entre 1-8 módulos. En cambio, la biosíntesis de los NRP fúngicos es catalizada por una única enzima codificada por un gran gen como el de la biosíntesis de ciclosporina de 46 Kb



que codifica una NRPS de 11 módulos de 15281 aminoácidos en *Tolypocladium inflatum* (Konz & Mahariel, 1999; Brown & Proctor, 2013).

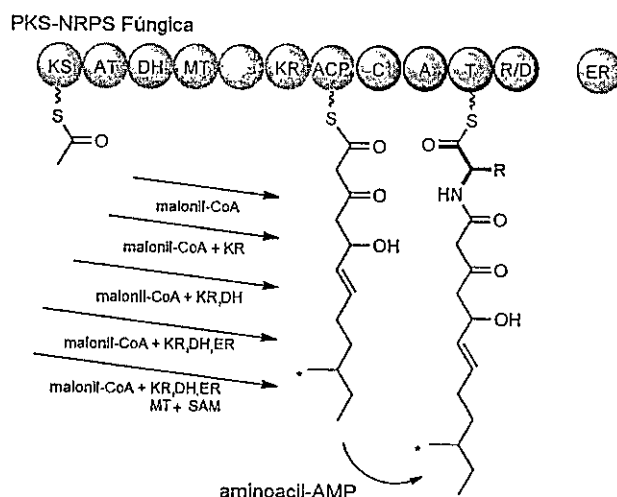
Los dominios básicos de un módulo son 3. El primero de ellos corresponde al dominio de adenilación (A) que está formado por 550 aminoácidos aproximadamente y es el encargado de 2 reacciones muy importantes:

1. Seleccionar el sustrato iniciador y adenilarlo (activarlo) para formar el intermediario aminoacil-adenilato. Este proceso conlleva el consumo de una molécula de ATP y la liberación de PPi.
2. Formación de un enlace covalente entre el intermediario y el cofactor 4-fosfopantoteno (4-PP) ubicado en el dominio adyacente (PCP), uniendo de esta forma la molécula a la enzima.

El segundo dominio corresponde al dominio de tiolación (T o PCP) que consta de 80 aminoácidos y une el cofactor 4-PP en un residuo de serina. Este dominio se encarga del transporte del aminoácido activado hacia el siguiente dominio. Por último, el tercer dominio corresponde al dominio de condensación (C) que consta de 450 aminoácidos y es el dominio clave para el proceso de elongación del péptido. El dominio C cataliza el ataque nucleofílico entre el cofactor-aminoacilado del PCP de su módulo y el cofactor amino-acilado perteneciente al módulo anterior, condensando así los dos residuos presentes mediante la formación de un enlace peptídico. Adicionalmente, es posible encontrar en los módulos dominios que generan modificaciones a los sustratos como es el dominio de metilación. La metilación ocurre antes de la formación del enlace peptídico y el grupo metilo proviene del S-adenosil-metionina (SAM). Otro dominio frecuente es el dominio de epimerización que permite utilizar aminoácidos D o L, y se suele ubicar entre los dominios T y C. Por último, en algunos casos, en el extremo carboxilo terminal de la NRPS, se encuentran diferentes dominios que permiten liberar el NRP de la enzima: el dominio tioesterasa (TE), el dominio reductasa (R) o el dominio de ciclación (CyC). Éste último, además de liberar la enzima, permite ciclar el compuesto final. Todas

estas modificaciones contribuyen a la actividad biológica del compuesto. En hongos, es frecuente encontrar el dominio de CyC y es menos frecuente el dominio TE, mientras que en bacterias es común observar el dominio TE (Konz & Mahariel 1999, Brown & Proctor, 2013). Por lo general, el orden de los aminoácidos en el NRP está en concordancia con el orden de los módulos que presenta la enzima NRPS.

Existen también metabolitos híbridos de PK-NRP donde los policétidos están fusionados por un enlace amida con los NRP. Algunos compuestos de este tipo encontrados en bacterias son la bleomicina (antibiótico) y la rapamicina (antifúngico) y en hongos, las citóchalasinas (con actividad anti-angiogénica) y el ácido ciclopiazónico (micotoxina) (Keller *et al.*, 2055). Los metabolitos PK-NRP pueden ser sintetizados por PKS y NRPS independientes o alternativamente, por una PKS fusionada a un módulo NRPS (generalmente truncado) para formar una enzima híbrida (Gallo *et al.*, 2013). Estas enzimas híbridas presentan una PKS reductora sin la presencia del dominio ER flanqueada por los dominios C, A y PCP de una NRPS típica. Incluso, algunas pueden presentar un dominio C terminal adicional que puede funcionar como TE o CyC (figura 3.2) (Gallo *et al.*, 2013).



**Figura 3.2 Estructura de una enzima híbrida PKS-NRPS.**

Las esferas grises corresponden a los dominios de la enzima PKS: cetosintetasa (KS), acil transferasa (AT), dehidratasa (DH), metil transferasa (MT), cetoreductasa (KR) y proteína acil carrier (ACP). Las esferas negras representan los dominios de la parte NRPS: condensación (C), adenilación (A), tiolación (T), tioesterasa (T). Las flechas indican la adición de malonil-CoA a la cadena naciente del policétido y las distintas modificaciones que puede sufrir y que son llevadas a cabo por los dominios KR, DH, MT y ER (en trans). El sustrato aminoacil-AMP es cargado por el dominio de adenilación (Modificado de Boettger & Hertweck, 2013).

### 3.1.3 Regulación del metabolismo secundario en hongos filamentosos

La síntesis de metabolitos secundarios está estrechamente relacionada con la capacidad de poder sensor las condiciones del ambiente específicas para la producción de un determinado compuesto y así mismo, con poseer los elementos de transducción de señales necesarios para activar componentes río abajo en la cascada de señalización.

La regulación de los clusters génicos de metabolitos secundarios ocurre a distintos niveles, en los cuales se pueden encontrar reguladores globales o específicos de una ruta metabólica, lo que hace que las vías biosintéticas sean una red compleja que involucra la interconexión entre varias rutas (Brakhage 2013). La regulación global de las vías metabólicas secundarias está dada por

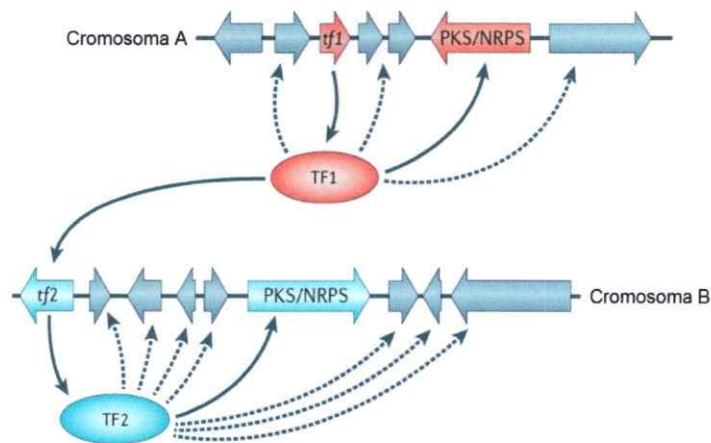
factores de transcripción que no están codificados dentro de ningún cluster génico y que regulan además otros genes no involucrados en el metabolismo secundario. Por ejemplo, las proteínas PacC y AreA están involucradas en la regulación del metabolismo secundario. PacC es un regulador global del pH en hongos y en *Aspergillus nidulans*, PacC activa la transcripción de genes como la fosfatasa alcalina y los genes de biosíntesis de penicilina frente a pH alcalinos. En cambio, AreA es un regulador dependiente del nitrógeno que media la represión por nitrógeno en la biosíntesis de giberelinas en *Fusarium fujikuroi*, pero su presencia es requerida para la biosíntesis de fumonisina B1 en *F. verticillioides* (Brakhage, 2013).

Por otro lado, dentro de los componentes celulares encargados de la labor de relacionar los estímulos del medio externo y el medio celular para generar las respuestas apropiadas, destaca la función de la proteína G heterotrimérica (Yu *et al.*, 2008). Estas proteínas se encuentran conservadas en todos los eucariontes y los componentes típicos de un sistema de señalización acoplado a la proteína G incluyen: un receptor acoplado a proteína G (GPCR), la proteína G compuesta por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Li *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013), y una variedad de efectores. En hongos, este sistema tiene un rol crítico en crecimiento, división celular, morfogénesis, quimiotaxis, virulencia, reproducción y producción de metabolitos secundarios (Yu *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2013).

La subunidad  $\alpha$  ( $G\alpha$ ) de la proteína G es la que se encuentra asociada al receptor GPCR y al dímero formado por las subunidades  $\beta\gamma$  ( $G\beta\gamma$ ) (Studt *et al.*, 2013).  $G\alpha$ , en su forma inactiva, se encuentra unida a GDP, formando un complejo con  $G\beta\gamma$  y el receptor. La unión del ligando al receptor GPCR genera un cambio conformacional que induce el intercambio de GDP a GTP, llevando a  $G\alpha$  a un estado activado, con la subsecuente disociación del dímero  $G\beta\gamma$  (Studt *et al.*, 2013). Las subunidades  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  pueden unirse y regular diferentes efectores río abajo en la cascada de señalización. Uno de los efectores de  $G\alpha$  corresponde a la enzima adenil ciclasa, responsable de la producción del

segundo mensajero cAMP, el que a su vez se une a las subunidades regulatorias de la enzima proteína quinasa A (PKA) que se encarga de fosforilar diferentes blancos río abajo (Studt *et al.*, 2013). Adicionalmente, la subunidad G $\alpha$  puede tener como efectores a fosfolipasas, fosfodiesterasas, MAP quinasas y canales iónicos (Yu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007). La hidrólisis del GTP en G $\alpha$  está mediado por la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad, permitiendo el reciclaje de ésta para una nueva ronda de señalización.

Finalmente, en los últimos años, se ha descrito un efecto de "cross talk" entre rutas del metabolismo secundario en hongos, que estaría regulando la expresión (activación o represión) de los genes entre clusters génicos (figura 3.3). Esto último se ha observado, por ejemplo, en *A. nidulans*, donde se encuentra el cluster silente *inp* del cual se encuentran formando parte dos NRPS. Tras activar este cluster, se gatilla la expresión del cluster *afo*, implicado en la síntesis de asperfurazona. Interesantemente, ambos clusters se encuentran en cromosomas distintos (Brakhage, 2013). Así también se ha observado en *P.roqueforti* que el silenciamiento génico de la enzima responsable para la síntesis de la toxina PR, no sólo disminuye la producción de esta micotoxina, sino que también altera la producción de otro metabolito, el ácido micofenólico, pero esta vez con un efecto contrario, pues la producción de este compuesto aumenta considerablemente (Hidalgo *et al.*, 2014).



**Figura 3.3 Efecto de “cross-talk” entre los genes de dos rutas biosintéticas de metabolitos secundarios**

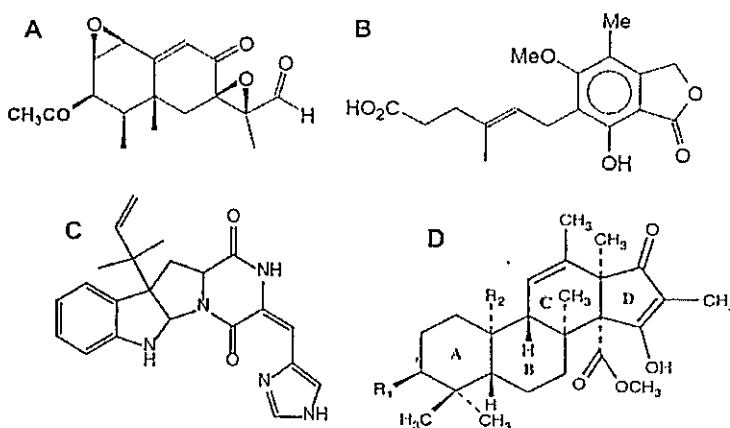
Se ejemplifican dos cluster génicos ubicados en cromosomas distintos, con genes que codifican enzimas PKS, NRPS, PKS-NRPS, factores de transcripción (tf1 y tf2) necesarios para activar los genes del cluster. El factor tf1 ubicado en el cromosoma A, activa la expresión de tf2 cuyo gen se ubica en el cromosoma B y este último activa la expresión de los genes de su propio cluster. (Modificado de Brakhage 2013).

### 3.2 El metabolismo secundario de *Penicillium roqueforti*

*P. roqueforti* es un hongo filamentoso saprófito, ampliamente distribuido en la naturaleza. En la industria alimenticia, *P. roqueforti* tiene una gran importancia ya que se utiliza en la manufactura del queso azul dada su capacidad de metabolizar el ácido láctico (Hidalgo, 2013). Su principal función es en el proceso de maduración del queso, mediante la producción de enzimas proteolíticas y lipolíticas (Martinez-Rodriguez *et al.*, 2013). La importancia económica de *P. roqueforti* se manifiesta en la producción anual de 56.865 toneladas de queso azul en Francia (Ropars *et al.*, 2012).

### 3.2.1 Metabolitos secundarios aislados de *Penicillium roqueforti*

*P. roqueforti* es conocido también como productor de una serie de metabolitos secundarios que es posible encontrar en baja cantidad en el queso azul: roquefortina C, isofumigaclavina A, andrastina A, toxina PR, ácido micofenólico, ácido orselínico, citreoisocumarina y festuclavina (figura 3.4) (Nielsen *et al.*, 1998).



**Figura 3.4 Principales metabolitos de *Penicillium roqueforti*.**

A) toxina PR B) ácido micofenólico, C) roquefortina C, D) andrastina A

Los metabolitos que han presentado un interés especial son el ácido micofenólico (MPA), la andrastina A, la roquefortina C y la toxina PR, debido a las diferentes actividades biológicas que presentan. El ácido micofenólico fue descubierto en 1893 como un compuesto producido por *P. brevicompactum* capaz de inhibir el crecimiento de *Anthrax bacillus*. Posteriormente, ha sido identificado en extractos de varias especies de *Penicillium* (Regueira *et al.*, 2011) y también se ha ampliado su espectro de actividades. Su actividad biológica más importante es la inmunosupresora y de hecho este metabolito actualmente es usado como inmunosupresor en pacientes con trasplantes

debido a su capacidad de inhibir la proliferación de los linfocitos B y T (Regueira *et al.*, 2011).

Químicamente, el MPA es un meroterpenoide, puesto que presenta un núcleo de ftalida (un policétido) y una cadena lateral que deriva de un terpeno. El núcleo ftalida se forma por el ensamblaje de un tetracétido a partir de 1 unidad de acetil CoA y 3 unidades de malonil CoA, con dos metilaciones en las posiciones meta y orto, y sin etapas de reducción (Bentley, 2000). La biosíntesis de este compuesto involucra por tanto dos importantes vías del metabolismo secundario fúngico: la de la síntesis de policétidos y la de los isoprenoides (Bentley, 2000). Hasta el momento, la ruta de biosíntesis del MPA se ha identificado únicamente en *P. brevicompactum* en donde se ha identificado un cluster de 25 Kb compuesto de 8 genes que codifican citocromos P450 monoxigenasas, metiltransferasas, hidrolasas, una IMP dehidrogenasa (que conferiría resistencia a la propia producción de MPA) y una PKS denominada MpaC. (Regueira *et al.*, 2011). Este cluster génico no ha sido descrito aún para *P. roqueforti*.

En cuanto a la andrastina A, si bien es producida por varias especies de *Penicillium*, interesantemente *P. roqueforti* la sintetiza en altas cantidades durante la maduración del queso azul. Puesto que este compuesto presenta una notable actividad anticancerígena, su presencia en el queso azul le otorga a éste un valor agregado como alimento funcional (Fernandez-Bodega *et al.*, 2009; Matsuda *et al.*, 2013). Estructuralmente, la andrastina A es un meroterpenoide por lo que para su biosíntesis se requiere de una enzima PKS y una terpeno ciclasa. En *Penicillium chrysogenum* se conocen al menos 9 enzimas codificadas en un cluster de 11 genes que están involucradas en la síntesis de la andrastina A incluyendo una PKS, una preniltransferasa, una metiltransferasa y una terpeno ciclasa (Matsuda *et al.*, 2013). Hasta la fecha, se conocen los genes homólogos de esta ruta biosintética en *P. roqueforti*, pero aún no han sido caracterizados.



La roquefortina C fue descubierta en 1975 junto con su esteroisómero la isofumigaclavina. Este alcaloide ha sido clasificado como una neurotoxina pues cuando se les suministra a ratones les provoca convulsiones. También posee propiedades antibióticas ya que inhibe la síntesis de ARN en bacterias (Richard *et al.*, 2004). Si bien su nombre proviene de que fue aislada por primera vez desde *P. roqueforti*, ya ha sido identificada en al menos 25 especies del género *Penicillium*. Este compuesto es considerado un importante contaminante en la producción del queso azul. La ruta biosintética de la roquefortina C ha sido completamente elucidada en *P. chrysogenum*. El cluster génico está compuesto por 7 genes que incluyen genes que codifican una enzima NRPS (denominada RoqA), un transportador MFS, tres citocromo p450 oxidoreductasas, una dimetilalilriptofano sintetasa (DMATs) y una monooxigenasa (Ali *et al.*, 2013).

Por último, la toxina PR es una potente micotoxina, aislada por primera vez en 1973, que se le vincula con toxicidad hepática y con abortos en el ganado. Este compuesto es un sesquiterpeno bicíclico, perteneciente a la clase eremofilano (Hidalgo *et al.*, 2013). Actualmente se conocen 4 genes en *P. roqueforti* asociados a la producción de la toxina PR: *prx1-prx4*. El silenciamiento génico de cada uno de estos genes reduce la producción de la toxina PR en un 65-75%, mostrando la intervención de todos ellos en la biosíntesis de la micotoxina. En este análisis se observó también una sobreproducción de ácido micofenólico, el cual se produce por una vía biosintética no relacionada, sugiriendo un efecto de "cross-talk" entre la biosíntesis de estos dos compuestos (Hidalgo *et al.*, 2013).

### 3.2.2 Rol de la proteína G en la regulación del metabolismo secundario de *P. roqueforti*

La regulación del metabolismo secundario en *P. roqueforti* ha sido aún muy poco estudiada. Hasta la fecha sólo se ha descrito que *P. roqueforti*, al ser transformado con el alelo *pga1G42R*, que codifica una subunidad  $\alpha$  de la proteína G constitutivamente activa, muestra un crecimiento vegetativo lento y escasa esporulación mientras que se observa una alta producción de roquefortina C (García-Rico *et al.*, 2009).

En trabajos previos, y con la finalidad de estudiar los efectos en la regulación génica de la proteína G en *P. roqueforti*, se realizó un análisis de la expresión diferencial de genes entre una cepa nativa de *P. roqueforti* y una cepa que presenta una mutación en la subunidad alfa de la proteína G, que la mantiene constitutivamente activa. En dicho análisis se detectó un fragmento de cADN que se expresa en la cepa nativa de *P. roqueforti* pero no en la mutante. Al realizar un análisis por BlastX sobre esta secuencia se encontró que presenta 42% de identidad con la enzima lovastatina sintasa de *Arthoderma gypseum*. Estos hallazgos sugieren que esta secuencia de cADN proviene de un gen que posiblemente codifica una enzima policétido sintasa. Este gen fue denominado *ninA* y es el objeto de estudio de esta tesis.

### 3.2.3 Hipótesis

Puesto que el gen *ninA* no pertenece a las rutas de biosíntesis de los principales metabolitos de *P. roqueforti* conocidas total o parcialmente hasta la fecha, se postula la siguiente hipótesis:

“El gen *ninA* de *P. roqueforti* codifica una enzima PKS involucrada en la biosíntesis de uno o varios metabolitos secundarios aún no descritos en este hongo”

### 3.2.4 Objetivos

#### 3.2.4.1 Objetivo general:

Caracterizar estructural y funcionalmente el gen *ninA*, y determinar el/los metabolitos secundarios cuya síntesis está bajo el control del gen *ninA*

#### 3.2.4.2 Objetivos específicos:

- 1.- Caracterización bioinformática del gen *ninA* y de su entorno génico.
- 2.- Silenciamiento génico del gen *ninA* de *P. roqueforti* y análisis de los perfiles de metabolitos secundarios de la cepa nativa y la cepa mutante mediante HPLC.
- 3.- Purificación y caracterización del/los metabolitos secundarios de la cepa nativa de *P. roqueforti* producidos bajo el control del gen *ninA*.
- 4.- Evaluación de un posible efecto de "cross talk" entre *ninA* y la producción de otros metabolitos como ácido micofenólico y andrastina A.

## 4 MATERIALES Y METODOS

### 4.1 Cepa fúngica

En el Laboratorio de Microbiología Básica y Aplicada de la Universidad de Santiago de Chile se dispone de la cepa nativa de *Penicillium roqueforti* CECT 2905 (ATCC 10110) la cual fue donada y utilizada para realizar todos los análisis propuestos en esta investigación.

### 4.2 Medios de cultivos

Medio CM: Glucosa 5 g/l, extracto de malta 5 g/l y extracto de levadura 5 g/l.

Medio extracto de levadura y sacarosa (YES): Extracto de levadura 20 g/l y sacarosa 150 g/l.

Medio Luria-Bertani (LB): Triptona peptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l.

Medio sólido Power (Pw): Sacarosa 25 g/l, lactosa 5 g/l, bactopectona 3 g/l, sólidos de maceración de maíz 0,5 g/l, KCl 52 g/l, NaNO<sub>3</sub> 1 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,275 g/l, NaCl 2 g/l y agar 20 g/l.

Medio sólido Czapeck y extracto de levadura (CYA): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/l, extracto de levadura 5 g/l, sacarosa 30 g/l, solución concentrada de Sales czapeck 10 ml por cada litro, agar 20 g/l.

Medio sólido Czapeck (Cz): Sacarosa 30 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g/l, solución concentrada de Sales czapeck 10 ml por cada litro y agar 20 g/l.

Medio de papa, dextrosa y agar (PDA): 39 gramos por cada litro de agua (Merck).

### 4.3 Soluciones

Solución concentrada de Sales czapeck: NaNO<sub>3</sub> 300 g/l, KCl 50 g/l, MgSO<sub>4</sub> 50g/l, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1g/l.

Solución KCM: KCl 1M, MES 0,25 mM pH 5,8 y CaCl<sub>2</sub> 50 mM.

Solución de TPP: Tampón fosfato de pH 5.8 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y KCl 0,7 M.

Solución STC: CaCl<sub>2</sub> 50 mM sorbitol 1 M y Tris-HCl 25 mM pH 7,5.

Solución PCM: Polietilenglicol (PEG) al 50%, CaCl<sub>2</sub> 50 mM y MES 10 mM pH 5,8.

Solución TN: NaCl al 0,9 % y tritón X-100 al 0,1 %.

### 4.4 Reactivos para biología molecular

MicroAmp Fast Optical 48-well reaction plate (0,1 ml) de Applied Biosystems

Membranas: MicroAmp 48-well optical adhesive film, de Applied Biosystems.

KAPA SYBR FAST qPCR kits Master Mix (2x) Universal de KAPA, BIOSYSTEMS.

RevertAid Reverse Transcriptase de Thermos

Kit RNeasy Plant Mini de Qiagen

### 4.5 Programas bioinformáticos

Para el análisis bioinformático del gen *ninA* se utilizaron las herramientas disponibles en la bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), junto con el genoma de *Penicillium roqueforti* FM 164 (Acceso GenBank HG792016.1).

Adicionalmente, para la caracterización de la enzima y la determinación del

cluster génico, se utilizó la herramienta antiSMASH (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>, Medema *et al.*, 2011).

antiSMASH es una plataforma que es capaz de identificar *loci* biosintéticos cubriendo todos los tipos de metabolitos secundarios conocidos utilizando algoritmos y bases de datos de acceso público. Este programa compara las proteínas identificadas en cada región de ADN cargado al programa contra una colección de perfiles de tipo "Hidden Markov Models" (HMM), los que describen modelos de alineamientos de las secuencias de las enzimas biosintéticas claves de los metabolitos secundarios conocidos (Medema *et al.*, 2013). Permite también identificar los sustratos utilizados por los dominios cetosintasa de las PKS y adenilación de las NRPS utilizando una secuencia de 24 aminoácidos del sitio activo.

#### **4.6 Preparación y transformación de células competentes de *Escherichia coli***

Para la preparación de células competentes, se realizó un cultivo de *E. coli* DH5 $\alpha$  en 10 ml de medio LB (Luria Bertani) con agitación a 37 °C durante toda la noche. Luego, se inoculó 1 ml de este cultivo en medio LB y se dejó creciendo durante 3 h con agitación a 37°C (hasta obtener un OD de 0,4-0,6). Posteriormente, se tomaron alícuotas de 1,5 ml y se centrifugaron. Los pellets se resuspendieron en CaCl<sub>2</sub> 50 mM y tras una incubación de 1 h a 37°C con 150 rpm se centrifugó nuevamente. El pellet obtenido, fue suspendido en 100  $\mu$ l de la solución de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Estas células fueron almacenadas a -80 °C para su posterior uso.

Para la transformación de las células competentes de *E. coli* se utilizó el protocolo descrito por Hanahan, (1983). Para ello, se mezclaron 100  $\mu$ l de células competentes de *E. coli*, previamente descongeladas en hielo, con 10  $\mu$ l

del plásmido. Esta mezcla se incubó en hielo durante 30 min y posteriormente se le sometió a un choque térmico, incubando en baño de agua a 42°C durante 45 s y enfriando rápidamente en hielo durante 2 min. Luego, se añadió 600 µl de medio LB líquido a la mezcla de transformación y se incubó a 37°C, durante dos horas a 250 rpm para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico de selección presente en el plásmido. Por último, la mezcla fue distribuida en placas de LB sólido suplementado con el antibiótico de selección (ampicilina).

#### **4.7 Construcción del plásmido de ARN de interferencia (pJL43-PKS) para el silenciamiento del gen *ninA***

Para la construcción del plásmido de ARN de interferencia, se utilizó el plásmido pJL43-RNAi (Ullán *et al.*, 2008). Este plásmido posee un sitio de corte reconocido por *NcoI* lo que permite integrar un fragmento de interés en dicha zona. Este sitio *NcoI* está flanqueado por dos promotores orientados en sentido opuesto. En consecuencia, cuando ocurra transcripción del fragmento, se generará una doble hebra de ARN que activará la maquinaria de silenciamiento génico del organismo transformado (Ullán *et al.*, 2008).

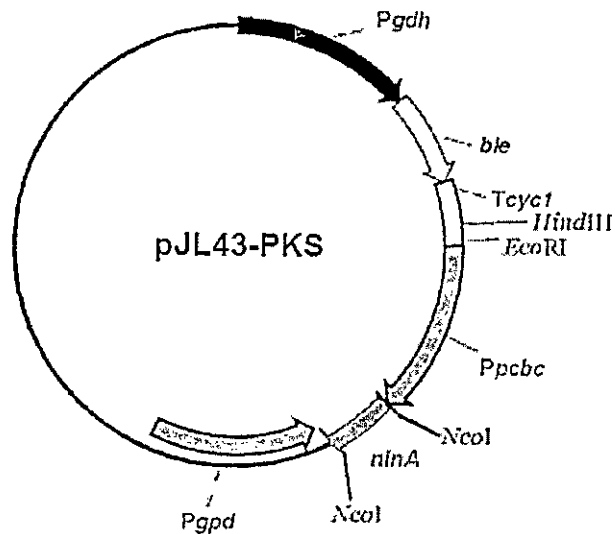
Para la construcción del plásmido de ARN de interferencia se amplificó una secuencia de 512 pb de tamaño ubicada en el exón del gen *ninA* utilizando los partidores PKSRNAiRV y PKSRNAiFW, los cuales contienen un sitio de corte reconocido por la enzima de restricción *NcoI* (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1 Secuencia de partidores utilizados**

	Nombre Partidor	Secuencia 5'→3'	Tamaño de banda esperado
q-PCR	qRTbtubrv	GAA CTC CTC ACG GAT CTT GG	89 pb.
	qRTbtubfw	TCC AAG GTT TCC AGA TCA CC	
	PKS-qPCR-fw	TGCCGCTTCACTTCTTTTCT	81 pb.
	PKS-qPCR-rv	TGCTTGTCAAATAGCCATCG	
PCR	SEQRNAiFW	GCT ACA TCC ATA CTC CAT CC	1500 pb.
	SEQRNAiRV	GCT CAG GCA CAC ACA GGA AG	
	Bt2b	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	300 pb.
	Bt2a	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	
	PKSRNAiRV	GTC AGC CTC TTC GCC AT	512 pb.
	PKSRNAiFW	AGA CTC CCA TGG AAA TGG GCT CTT GT	
	C6-Der-Rv	TGA ATC TTG GAC TTC ACA TTA TC	1200/1700 pb.
	C6-izq-fw	ACA GAT AGG AAA AAA AGC AAA TT	
RT-PCR	MFS61-FW	ACG GTA AAA CAG AAT CGG	380 pb.
	MFS61RV	ACA ATG TTC AGG AAC CTA A	
	FT62-Fw	AGA TAG TAC AAT GTC TCA TT	345 pb.
	FT62-Rv	AGT CCG AGT CAT TCA GAT	
	Ft64-Fw	AAT TAT CGG CAG ACT CCA	372 pb.
	Ft64-Rv	GCG TGG GCT ATA AGA CTT	
	PNN65-Fw	ATA TCT TGC TGG GGG ACT	474 pb.
	PNN65-Rv	GAG ACA AAT TGA TGT GGA TAG	
	Berbe-Fw	TTC CAG GAG TCA AAG AAG T	404 pb.
	Berbe-Rv	AAA GTC GCA GAC CTA GTC	

Este producto fue ligado en el plásmido pJL43-RNAi. Para ello, tanto el producto de PCR como el plásmido pJL43-RNAi fueron digeridos con la enzima *NcoI* y ambas digestiones fueron purificadas a partir de un gel de agarosa con el kit GeneJET y ligadas para generar el plásmido pJL43-PKS, el cual permite la generación de un ARN de interferencia específico para el gen *ninA*. Adicionalmente, el plásmido contiene el gen de resistencia a la fleomicina que será utilizado como marcador de selección de los transformantes (figura 4.1).





**Figura 4.1 Esquema del plásmido pJL43-PKS utilizado para la generación del ARN de interferencia del gen *ninA*.**

El plásmido presenta dos sitios de cortes para *NcoI* para de esa forma ligar el fragmento del gen *ninA* de 500pb aproximadamente. Flanqueando la región de inserción se encuentran dos promotores que darán lugar a la producción de un ARN de doble hebra (dsRNA) que activará la maquinaria de silenciamiento génico del hongo transformado. El plásmido posee un gen de resistencia a fleomicina (*ble*).

Posteriormente, se transformó *E. coli* con el plásmido pJL43-PKS. Mediante PCR de colonia, se analizó el ingreso del plásmido a las células, y se seleccionó una colonia para la posterior extracción del plásmido. La extracción de los plásmidos se llevó a cabo utilizando el kit miniprep de Axygen®. Con el fin de determinar la fiabilidad de la construcción antes de su secuenciación, se amplificó por PCR un fragmento que incluye la secuencia del gen PKS insertada y parte de las secuencias que flanquean la zona del inserto dentro del plásmido empleando los partidores SEQRNAiFW y SEQRNAiRV. Una vez verificada la correcta inserción del fragmento de la secuencia de la PKS en el plásmido pJL43-PKS, se procedió a la transformación de *Penicillium roqueforti*.

#### 4.8 Protocolo de transformación de protoplastos de *P. roqueforti*.

La metodología empleada para la generación de protoplastos de *P. roqueforti* y su transformación es esencialmente la descrita por Chávez *et al.* (2010).

##### 4.8.1 Producción de protoplastos

A partir de una siembra masiva de *P. roqueforti* en una placa de medio PDA crecida por 4 días a 28 °C, se colectaron las esporas raspando la placa con un volumen de 5 ml de medio CM. Luego, este volumen fue filtrado utilizando una membrana Nyal estéril, para eliminar los restos de micelios desprendidos junto a las esporas. Con esta solución de esporas, se inoculó un matraz de 500 ml con 95 ml de medio CM, el cual fue incubado a 28°C con una agitación orbital de 200 rpm. Transcurridas 22 h, se filtraron los 100 ml del medio de cultivo utilizando una membrana MICRALOTH estéril. El micelio retenido en la membrana se lavó con una solución estéril de NaCl al 0,9% hasta la obtención de un filtrado claro. El micelio se secó presándolo entre papeles de filtro estériles. Un gramo de micelio seco se resuspendió en 10 ml de solución TPP. Simultáneamente, se preparó una solución con 0,4 mg de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich®) en 10 ml de solución TPP.

En un matraz estéril de 250 ml se mezclaron ambas soluciones, dejándolas incubar a 28 °C, con una agitación circular de 80 rpm durante 180 min. A los 30, 60 y 120 min se adicionó 40µl de β-glucoronidasa (Sigma-Aldrich®), verificando en cada intervalo la liberación de los protoplastos mediante visualización de las muestras en el microscopio.

Al finalizar el tiempo de incubación, y con la finalidad de obtener una solución de protoplastos lo más limpia posible (libre de micelio y de restos de pared celular), el contenido del matraz fue filtrado en primer lugar por una membrana MICRALOTH y luego por una membrana Nyal. Los filtrados fueron

recolectados en tubos falcon de 15 ml y posteriormente, centrifugados a 300 rpm por 4 min. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado de cada tubo (correspondiente a los protoplastos) fue suspendido en un 1 ml de solución KCM. Todas las soluciones de protoplastos obtenidas se juntaron en un mismo tubo falcon, para ser nuevamente centrifugadas. Luego, los protoplastos se resuspendieron en 5 ml de solución KCM, para luego, por medio de una cámara de NeuBauer, contabilizarlos.

#### 4.8.2 Transformación de protoplastos

Para proceder a la transformación de *P. roqueforti*, a 100  $\mu$ l de la solución de protoplastos ( $1 \times 10^8$  protoplastos/ml) se le añadió 10  $\mu$ l de solución de PCM y 10  $\mu$ l de ácido aurintricarboxílico (ATA). Una vez homogeneizada la mezcla, se le adicionaron 10  $\mu$ l del plásmido pJL43-PKS con una concentración de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l, y se dejó incubar en hielo por 30 min. Posteriormente, se añadió a la mezcla 500  $\mu$ l de la solución PCM y se dejó incubando a temperatura ambiente por 30 min más. Luego, se adicionaron 600  $\mu$ l de solución de STC y se dejó a temperatura ambiente por 1 h y 30 min. Para aumentar la viabilidad del proceso de transformación, se procedió a la recuperación de los protoplastos antes de su plaqueo. Este procedimiento consiste en añadir 3 ml de medio líquido Czapeck con sorbitol 0,85 M a la mezcla de transformación, y dejarlo incubar por 2 h a 28°C con una agitación circular de 80 rpm. Finalizado este proceso, los protoplastos obtenidos de la transformación fueron plaqueados. Para ello, diferentes volúmenes (50, 100, 150, 200, 300 y 400  $\mu$ l) de la solución de transformación se mezclaron suavemente con 14 ml de medio Czapeck sorbitol con fleomicina a 10  $\mu$ g/ml (a una temperatura de 48 – 50°C). Una vez homogeneizada la mezcla se sirvió como cobertera sobre placas Petri con 10 ml de medio Czapeck sorbitol previamente preparadas.

Adicionalmente, se realizaron controles de viabilidad de los protoplastos y controles de la transformación. Para los controles de viabilidad de los protoplastos, se mezclaron diferentes soluciones de los protoplastos sin transformar ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) con 14 ml de medio Czapeck sorbitol sin fleomicina (a una temperatura de 48 – 50 °C). Una vez homogeneizada la mezcla se sirvió como cobertera sobre placas Petri con 10 ml de medio Czapeck sorbitol previamente preparadas. Para los controles de la transformación, diferentes volúmenes (50, 100, 150 y 200, 300 y 400  $\mu$ l) de una solución de transformación preparada sin el plásmido, se mezclaron suavemente con 14 ml de medio Czapeck sorbitol con fleomicina a 10  $\mu$ g/ml (a una temperatura de 48 – 50°C) .Una vez homogeneizada la mezcla se sirvió como cobertera sobre placas Petri con 10 ml de medio Czapeck sorbitol previamente preparadas.

#### **4.8.3 Selección de colonias de los transformantes de *P. roqueforti*.**

Transcurridos 14 días de incubación de las placas con los transformantes, las colonias de *P. roqueforti* transformantes se aislaron siguiendo la siguiente estrategia: al observar una incipiente esporulación en las colonias de las cepas transformantes se traspasaron 40 colonias distintas a placas separadas con medio Czapeck suplementado con fleomicina (10 $\mu$ g/ml). Transcurridos 5 días de crecimiento, las colonias de estos cuarenta transformantes se rasparon con solución salina (NaCl 0,9%) para obtener una solución de esporas. Con el fin de obtener cultivos monoespóricos de los transformantes, se sembraron diluciones seriadas de todos los transformantes en placas con medio PDA sin fleomicina. Tras 7 días de cultivo, se seleccionó una colonia de cada transformante. De los cuarenta transformantes así obtenidos, se seleccionaron cuatro para ser analizados. Si bien la selección fue al azar, se procuró que los transformantes seleccionados mantuvieran las características fenotípicas lo más similares a la cepa nativa.

#### 4.9 Análisis de los niveles de expresión del gen *ninA* en las cepas transformantes

Las cuatro cepas transformantes seleccionadas, junto con la cepa nativa de *P. roqueforti*, fueron crecidas en medio YES líquido a 28°C con agitación de 180 rpm. A cultivos de 7 y 10 días de incubación, se les extrajo el ARN total, utilizando el Kit RNeasy Plant Mini de Qiagen. Los ARNs obtenidos fueron cuantificados por espectrofotometría y tratados con ADNasa. Para el tratamiento con ADNasa se preparó una mezcla de 10 µl de volumen total con X µl de ARN (1 µg), 1 µl de buffer de ADNasa, 1,5 µl de enzima ADNasa y Y µl de agua DEPC.

Los volúmenes X e Y varían de acuerdo a la cuantificación obtenida para cada extracción de ARN. Esta solución se dejó incubar por 2 h a 37°C, para luego añadir 1 µl de EDTA e incubar 10 min a 62°C.

Para la realización de los RT-PCR se utilizó 1 µg/10µl del ARN obtenido del tratamiento con ADNasa para cada transformante y la cepa nativa. Para ello, se utilizó RevertAid Reverse Transcriptasa de Thermo y se procedió siguiendo el siguiente protocolo: a los 10 µl de ARN se les adicionó 1 µl de agua DEPC, 1 µl de partidor 1 y 1 µl de partidor 2, y se dejó incubar 10 min a 70°C: Posteriormente se agregaron 4 µl de buffer RT, 2 µl de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) (10 mM) y 1 µl de enzima RT. La mezcla de reacción se incubó durante 60 min a 42°C y después durante 10 min a 70°C. Con los ADNc generados tras este proceso se realizó una reacción de PCR utilizando GoTaq Master Mix de Promega. Para ello, se tomaron 12,5 µl de GoTaq Master Mix, 8 µl de agua, 2 µl de los ADNc y 1 µl de cada partidor (a una concentración 10mM). Las condiciones de amplificación fueron:

- 1.- desnaturalización inicial: 94°C por 5 min
- 2.- 30 ciclos compuestos de:
  - desnaturalización a 94°C por 40 s
  - hibridación a 54°C por 40 s
  - extensión a 72°C por 40 s

3.- extensión final: 72°C por 10 min.

Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Este procedimiento se llevó a cabo tanto para el gen *nin A* como para el gen de la  $\beta$ -tubulina que fue el gen control utilizado (acceso GenBank AY674383). Los partidores para cada reacción se encuentran descritos en la Tabla 4.1, indicando el tamaño del producto esperado.

Finalmente, para la cuantificación de los niveles de expresión relativos de las cepas seleccionadas se empleó la técnica de la PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (qPCR). Para ello, se utilizó el kit KAPA SYBR FAST qPCR que requiere la preparación de la mezcla de reacción de acuerdo al siguiente protocolo: 10  $\mu$ l Kapa, 0,4  $\mu$ l Partidor 1, 0,4  $\mu$ l Partidor 2, 0,4  $\mu$ l de ROX, 2,0  $\mu$ l de ADNc y 6,8  $\mu$ l de agua DEPC.

Antes de proceder a la cuantificación se verificó la especificidad de los partidores mediante la realización de una curva de eficiencia utilizando diluciones seriadas (1;1/4;1/16) del ADNc del gen de interés. Una vez verificada la especificidad de los partidores, se procedió a la cuantificación utilizando como gen control la  $\beta$ -tubulina. Los partidores utilizados para este análisis se encuentran descritos en la Tabla 4.1. El programa utilizado para el q-PCR se describe a continuación:

- 1.- Desnaturalización inicial a 95°C por 20 s
- 2.- 40 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 3 s  
                    hibridación a 50°C por 30 s.

#### **4.10 Protocolos para la extracción de los metabolitos secundarios de *P. roqueforti* nativo y transformantes.**

##### **4.10.1 Extracción de los metabolitos secundarios presentes en el medio de fermentación**

Las cepas nativa y transformantes de *P. roqueforti* seleccionadas mediante RT-PCR fueron crecidas en medio YES líquido por 7 y 10 días a 28°C y 180 rpm. Posteriormente, el micelio se separó del caldo de cultivo mediante filtración con un filtro Nytal y los caldos de cultivo se trataron con metanol frío (1:4; caldo:metanol) durante 2 h a -20°C con la finalidad de precipitar las proteínas. Transcurrido este tiempo, los caldos se centrifugaron y el sobrenadante se concentró a vacío reduciendo su volumen hasta 250 µl finales para su posterior análisis por HPLC.

##### **4.10.2 Extracción de andrastina y ácido micofenólico desde cultivos en medio sólido**

Las cepas fúngicas a estudiar se sembraron en medio YES sólido por 7 días a 28°C. La metodología de extracción fue diseñada a partir de lo descrito por O'Brien *et al.* (2006). Para ello, al cabo del periodo de incubación, el micelio procedente de las placas se separó del agar y ambas fracciones se depositaron por separado en frascos de vidrio. A cada muestra de micelio se le añadió 50 ml de una mezcla de acetato de etilo: diclorometano: metanol (en proporción 3:2:1), acidificada con un 1% de ácido fórmico. Por su parte, a las muestras de agar se les adicionaron 80 ml de la misma mezcla de solventes. Todas las muestras se dejaron macerar durante la noche, y posteriormente fueron sonicadas durante 30 min. Luego, cada fracción se filtró con un filtro de papel para separar la solución orgánica de los restos sólidos (micelio o agar) y

las soluciones orgánicas resultantes fueron filtradas adicionalmente a través de filtros de 45 micras. Finalmente, las fracciones de solución orgánica fueron concentradas a vacío en un rotavapor hasta sequedad. Estas fracciones fueron resuspendidas en 500 µl de metanol para su análisis por HPLC.

Las muestras de micelio se secaron por 3-4 días a 50-60°C para obtener los valores de peso seco que se emplearán para normalizar la producción de los metabolitos cuantificados.

#### **4.11 Protocolo para el análisis de los metabolitos producidos por *P. roqueforti* mediante HPLC**

El equipo de HPLC utilizado consta de un detector de fotodiodo (Waters 2998), un conjunto binario de bombas (Waters 1525), un horno de columna (Waters 1500) y un desgasificador (Waters in-line degasser AF). Para todos los análisis se utilizó una columna C-18 de fase reversa (Sunfire C18, Waters, 4.6 x 25 cm, 5 µm), estabilizada a 35°C. El programa utilizado para el tratamiento de datos fue el EMPOWER 3.

##### **4.11.1 Análisis de los perfiles de metabolitos secundarios de la cepa nativa y las cepas transformantes de *P. roqueforti*.**

Para el análisis de los extractos obtenidos desde los caldos de cultivo se diseñó el Método cromatográfico 1 cuyo gradiente se detalla en la Tabla 4.2. Los solventes utilizados en este método fueron agua con 0,01% de ácido trifluoroacético (TFA) como solvente A y metanol como solvente B. El flujo de trabajo fue de 0.9 ml/min y para cada análisis se emplearon 20 µl de muestra.



**Tabla 4.2 Método cromatográfico 1**

Tiempo [min]	Porcentaje de B [%]
0	5
2	5
32	100
39	100
42	5

**4.11.2 Cuantificación de andrastina A y ácido micofenólico en las cepas nativa y transformantes de *P. roqueforti*.**

Para el análisis y cuantificación de la andrastina A y el ácido micofenólico se diseñó el Método cromatográfico 2 cuyo gradiente se detalla en la Tabla 4.3. Los solventes utilizados en este método fueron agua con 0,02% de ácido trifluoroacético (TFA) como solvente A y acetonitrilo como solvente B. El flujo de trabajo fue de 1,2 ml/min.

**Tabla 4.3 Método cromatográfico 2**

Tiempo [min]	Porcentaje de B [%]
0	15
25	68
27	100
32	100
35	15
40	15

Para la identificación de la andrastina A y del ácido micofenólico en los extractos, se consideraron los tiempos de retención y los máximos de absorción

del espectro UV-visible de los obtenidos con los estándares que se poseen en el laboratorio: andrastina A (Enzo Life Sciences, N° producto: ALX-350-418-M001) y ácido micofenólico (Santa Cruz Biotechnology, N° producto: sc-200110). La cuantificación se llevó a cabo registrando el área del pico de cada metabolito a sus respectivos máximos de absorción, 260 nm para la andrastina A y 303 nm para el ácido micofenólico. Posteriormente, empleando la ecuación de las curvas de calibración elaboradas previamente, se calculó la concentración de cada metabolito secundario en los extractos de cada cultivo realizado.

La curva de calibración empleada para ambos compuestos posee 9 puntos: 1 µg/ml, 5 µg/ml, 15 µg/ml, 25 µg/ml, 40 µg/ml, 70 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml y 250 µg/ml. La ecuación de la recta para la curva de calibración de la andrastina A es  $y=9107X+20416$  y la ecuación de la curva de ácido micofenólico es  $y=7155X-59579$ , donde X es en ambos casos el área de cada pico.

#### **4.12 Purificación de los metabolitos secundarios candidatos a producto biosintético de *nin A* en *P. roqueforti***

Para la purificación de los compuestos, se procedió a cultivar la cepa nativa de *P. roqueforti* en dos matraces de 250 ml con 100 ml de medio YES líquido cada uno a 28°C y 180 rpm por 10 días. Al cabo del período de incubación, el micelio se separó del caldo mediante filtración y éste último se trató con metanol en una proporción de 1:4 (caldo:metanol) dejándolo a -20°C por 2 h. Finalizado este tratamiento, la mezcla fue centrifugada y el sobrenadante se concentró a vacío empleando un rotavapor hasta un volumen final de 14 ml.

La primera etapa de purificación de los compuestos, consistió en una pre-purificación del extracto obtenido empleando una columna flash de sílica de fase reversa (Merck) conectada al vacío (Gogou *et al.*, 1998). La columna empleada tiene 7 centímetros de diámetro y 20 centímetros de alto y se rellena con la sílica de fase reversa hasta un 85% del volumen de la columna. La sílica

de la columna fue activada haciéndola pasar 700 ml de agua y después 700 ml de metanol, llevando la sílica a sequedad entre cada solvente. Terminado este procedimiento, se depositaron en la columna 7 ml del extracto a purificar y una vez que, empleando el vacío, la muestra penetra en la resina, se inició el proceso de elución. Para ello, se fueron pasando por la columna las mezclas de solvente indicadas en la tabla 4.4 y recogiendo por separado cada una de las fracciones eluidas. Las mezclas de solvente fueron añadidas secuencialmente, asegurando la sequedad de la sílica antes de adicionar la mezcla siguiente.

**Tabla 4.4 Método de elución de la columna flash**

Volumen (ml)	Agua 0,01% TFA (%)	Metanol (%)
700	100	0
350	95	5
350	85	15
350	80	20
350	25	75
700	0	100

Con el fin de procesar toda la muestra de extracto (14 ml) se realizaron dos columnas flash consecutivas. Terminado este proceso, las fracciones con la misma composición fueron concentradas juntas a presión reducida en el rotavapor. Para evaluar la efectividad del tratamiento de pre purificación, una muestra de cada una de las fracciones obtenidas se analizó en el HPLC utilizando el método cromatográfico 1, indicado en la tabla 4.2. Las fracciones de la pre purificación que resultaron enriquecidas en los metabolitos a purificar, se concentraron y se sometieron a un nuevo proceso de purificación empleando el HPLC en modo semipreparativo y una columna semipreparativa (Sunfire C18,

10 x 25 cm, 5  $\mu$ m). Los métodos cromatográficos empleados en este proceso fueron los descritos en las tablas 4.5 y 4.6.

**Tabla 4.5 Método cromatográfico semipreparativo 1**

Tiempo [min]	Flujo [ml/min]	metanol [%]
0	4,2	0
15	4,2	5
20	4,2	16
21	4,2	0

**Tabla 4.6 Método cromatográfico semipreparativo 2**

Tiempo [min]	Flujo [ml/min]	metanol [%]
0	4,2	10
10	4,2	20
15	4,2	20
16	4,2	10

Para la caracterización química de el/los metabolitos seleccionados se realizaron dos tipos de análisis. Por un lado, los espectros de  $^1\text{H-NMR}$  se tomaron en un espectrómetro Bruker Avance 500 a 500 MHz utilizando metanol deuterado como solvente y TMS (trimetil silano) como standar interno. Por otro, los espectros de masas LRESIM y HRESIM se tomaron en un equipo Applied Biosystems QSTAR Elite.

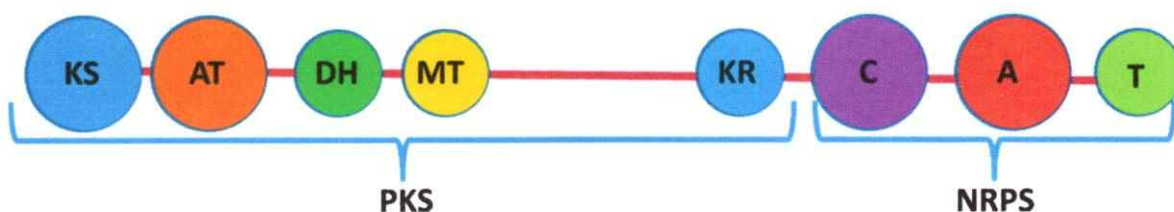
## 5-RESULTADOS

### 5.1 Análisis bioinformático

Con la finalidad de determinar la organización estructural del gen y la enzima que codifica *ninA*, así como también determinar los posibles genes que estarían formando parte del cluster génico asociado al gen *ninA*, se analizó el genoma de *P. roqueforti* FM 164 GenBank N° HG792015.1 – HG792062.1 (Cheeseman *et al.*, 2013). Este análisis se llevó a cabo utilizando las herramientas bioinformáticas detalladas en Materiales y Métodos.

Al inicio de este análisis, se tenía una secuencia de 2549 pb. Al realizar BlastX sobre esta secuencia, se encontró que el primer resultado corresponde a una beta-cetoacil sintasa de *P. roqueforti* FM 164 GenBank N° CDM 301631.1 que presenta un 92% de identidad con la secuencia ingresada. Al analizar la secuencia de este gen, que fue denominado *ninA*, encontramos que tiene un tamaño de 12 kb y codifica una proteína con 3937 aminoácidos, de tamaño molecular de 432550 Da, denominada NinA.

Al revisar los resultados de la base de datos Blast se determinó que el gen *ninA* presenta 9 exones que codifican una enzima híbrido PKS-NRPS con el siguiente arreglo de dominios: ceto sintasa, acil transferasa, deshidratasa, metil transferasa y ceto reductasa en la porción PKS y los dominios de condensación, adenilación y tiolación en la porción NRPS (figura 5.1).

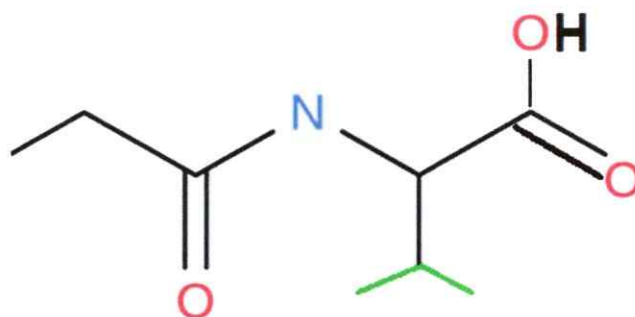


**Figura 5.1 Estructura de la enzima NinA.**

Dominio cetosintasa (KS), dominio acil transferasa (AT), dominio dehidrogenasa (DH), dominio metil transferasa (MT), dominio cetoreductasa (KR), dominio condensación (C), dominio adenilación (A), dominio tiolación (T).

El dominio KS corresponde al dominio cetosintasa ubicado entre las posiciones 3-433 aa (430 aa), el dominio AT corresponde al dominio acil transferasa ubicado entre las posiciones 544-856 aa (312 aa), el dominio DH al dominio dehidratasa ubicado entre las posiciones 932-1233 aa (301 aa), el dominio MT al dominio metil transferasa ubicado en las posiciones 1403-1524 aa (121 aa) y el dominio KR al dominio cetoreductasa ubicado entre las posiciones 2092-2268 aa (176 aa). Luego le sigue el dominio C de condensación ubicado entre las posiciones 2548-2841 aa (293 aa), el dominio A de adenilación ubicado entre las posiciones 3018-3514 aa (496 aa) y el dominio T de tiolación/reducción ubicado entre las posiciones 3641-3841 aa (200 aa).

Utilizando la herramienta antiSMASH fue posible hacer una predicción aproximada del núcleo del compuesto sintetizado por esta enzima. Sin embargo, cabe destacar que en esta aproximación no se consideran las posibles modificaciones que pueda sufrir el compuesto río abajo por otras enzimas (figura 5.2). El/los sustratos utilizados por la porción PKS de la enzima podrían corresponder a malonil-CoA o a metilmalonil-CoA. En cuanto al sustrato utilizado por la porción NRPS, podría ser leucina o alanina.



**Figura 5.2. Estructura aproximada del núcleo del compuesto producido por la enzima NinA**

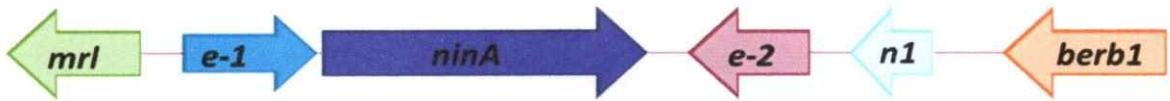
Se presenta el enlace amida entre el sustrato malonil-CoA y el aminoácido leucina (cadena lateral en verde). Esta aproximación se logró utilizando el programa antiSMASH disponible en la web.

Adicionalmente, utilizando antiSMASH y Blast, se analizaron los genes circundantes a la secuencia del gen *ninA* con la finalidad de determinar los posibles genes que formarían parte del cluster génico al que pertenece *ninA*. De acuerdo al análisis, habría 5 genes aledaños candidatos a formar dicho cluster génico. Estos genes se encuentran descritos en la tabla 5.1 y la organización del cluster en la figura 5.3.

**Tabla 5.1 Genes pertenecientes al hipotético cluster génico del gen *ninA***

Nombre	Nºacceso GeneBank	Dominios presentes/Posible función
<i>mrl</i>	CDM30161.1	Presenta dominio perteneciente a la superfamilia major transporter (MFS)
<i>e-1</i>	CDM30162.1	Factor de transcripción fúngico Zn <sub>2</sub> (II)-C <sub>6</sub>
<i>ninA</i>	CDM30132.1	Enzima PKS-NRPS, NinA
<i>e-2</i>	CDM30164.1	Factor de transcripción fúngico Zn <sub>2</sub> (II)-C <sub>6</sub>
<i>n1</i>	CDM30165.1	Proteína sin dominio conocido
<i>berb1</i>	CDM30166.1	Presenta dominio tipo berberina, que catalizan reacciones de oxidación.

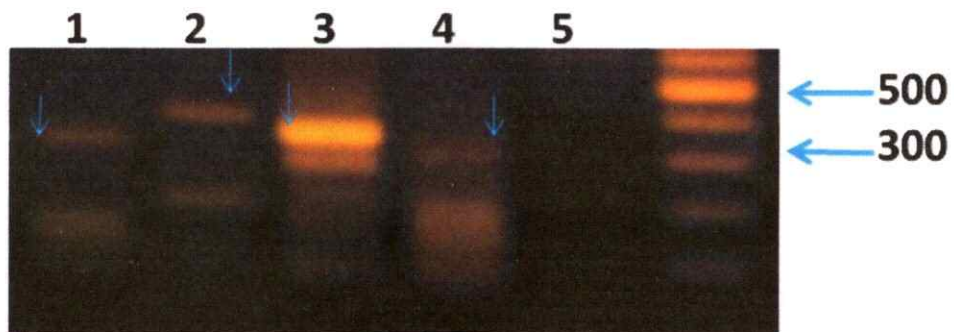




**Figura 5.3. Organización del hipotético cluster génico del gen *ninA*.**

Transportador general de sustratos (*mrl*), Factor de transcripción 1 (*e-1*). Enzima PKS-NRPS *NinA* (*ninA*), Factor de transcripción 2 (*e-2*), proteína sin nombre (*n1*), Enzima tipo Berberina (*berb1*).

Para verificar que todos los genes del cluster propuesto se expresaban al mismo tiempo que el gen *ninA*, se realizó un RT-PCR con partidores específicos para cada gen. Este análisis se llevó a cabo utilizando muestras de ARN obtenidas desde micelio de la cepa nativa de *P. roqueforti* crecido en medio YES líquido por 10 días. En la figura 5.4, se observa el resultado de este RT-PCR, donde 4 de los 5 genes se expresan al mismo tiempo que el gen *ninA*. Estos genes corresponden a los genes denominados *berb1*, *mrl*, y los genes de los factores de transcripción *e-1* y *e-2*.



**Figura 5.4. RT-PCR de los 5 genes candidatos del cluster génico de *ninA***

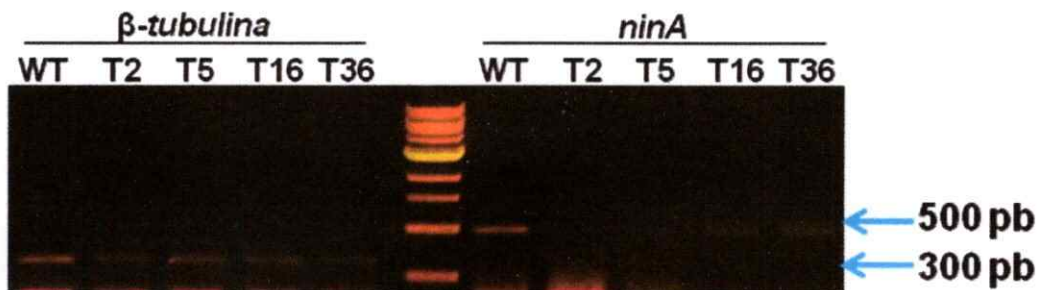
El carril 1 corresponde al gen *berb1*, el carril 2 al gen *mrl*, el carril 3 al gen *e-1*, el carril 4 al gen *e-2* y el carril 5 al gen *n1* (sin banda). El estándar utilizado es 100pb plus. Con flechas azules se indican los tamaños moleculares 500 pb y 300 pb.



## 5.2 Silenciamiento génico del gen *ninA* de *P. roqueforti*

### 5.2.1 Transformación de *P. roqueforti* con el plásmido pJL43-PKS y selección de transformantes por RT-PCR.

Tras el proceso de transformación de la cepa nativa de *P. roqueforti* con el plásmido pJL43-PKS, se obtuvieron 40 transformantes. De entre estos transformantes, se seleccionaron al azar los transformantes T2, T5, T16 y T36 para la realización de los análisis siguientes. Para evaluar la atenuación del gen *ninA*, se realizó un análisis de RT-PCR a la cepa nativa (control) y a los 4 transformantes seleccionados. Esto se llevó a cabo utilizando partidores específicos para la secuencia del gen *ninA*. Como control, se amplificó un fragmento del gen de la  $\beta$ -tubulina (figura 5.5).



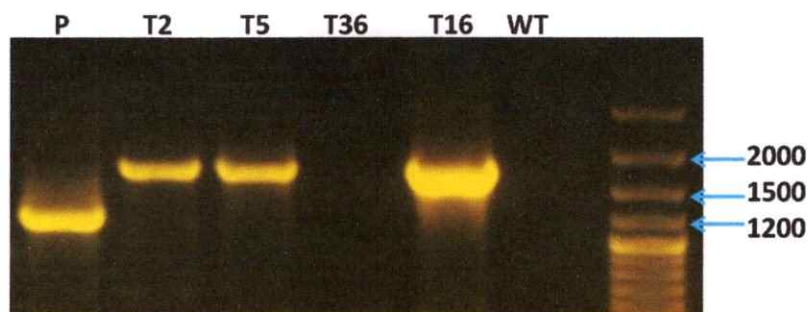
**Figura 5.5 Electroforesis del producto de RT-PCR para el gen *ninA* y el gen control de la  $\beta$ -tubulina.**

Se presenta el producto del RT-PCR con partidores que amplifican un fragmento de 500 pb del gen *ninA* y el producto del RT-PCR con partidores que amplifican un fragmento de 300 pb del gen  $\beta$ -tubulina. Estandar molecular: 1 kb. Las flechas indican los tamaños moleculares 500 pb y 300 pb.

De acuerdo a lo observado en los geles de agarosa de la figura 5.5, se determinó que dos de los transformantes, T2 y T5, presentaban una atenuación cercana al 100% ya que no se observaba ninguna banda. Por su parte, las cepas T16 y T36, si bien presentaron amplificación del gen *ninA*, la intensidad de las bandas es menor que la de la cepa nativa, por lo que se consideraron

parcialmente atenuadas.

Para verificar que las cepas transformantes seleccionadas tuvieran inserto el plásmido pJL43-PKS, se realizó un análisis por PCR usando partidores específicos para este plásmido. Estos partidores permiten amplificar una secuencia de 1200 pb cuando el plásmido no tiene inserta la secuencia de *ninA* y una secuencia de 1712 pb cuando el plásmido tiene inserta la secuencia de *ninA* (figura 5.6).



**Figura 5.6 Control de la presencia del plásmido pJL43-PKS en los transformantes.**

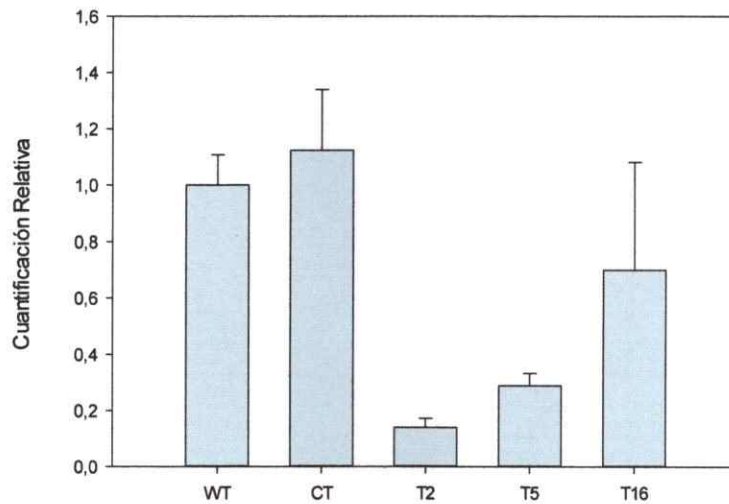
P: plásmido pJL43, transformante T2, transformante T5, transformante T36, transformante T16 y cepa nativa WT. Las cepas T2, T5 y T16 presentan amplicón de 1700 pb aproximadamente WT y T36 no presenta el plásmido. Estandar molecula 100 pb plus y las flechas indican los tamaños moleculares 2000 pb, 1500 pb y 1200 pb.

Como se puede observar en la figura 5.6, el plásmido pJL43-PKS está presente en los transformantes T2, T5 y T16, ya que todos ellos presentan un amplicón de 1700 pb aproximadamente. Puesto que se comprobó que el transformante T36 no contiene el plásmido, se descartó de los posteriores análisis.

### 5.2.2 RT-qPCR

Para cuantificar la atenuación del gen *ninA* en los transformantes T2, T5 y T16, se utilizó la técnica de RT-qPCR. El resultado de este experimento (figura 5.7) confirmó que los transformantes T2 y T5 tienen niveles de expresión del gen

*ninA* bajos, con valores de un 20 y un 30%, respectivamente, en comparación a la cepa nativa y a una cepa control transformada con el plásmido vacío. Por tanto, estos transformantes presentan una alta atenuación del gen *ninA*. En cambio, la cepa T16 mostró una disminución muy variable de la expresión de *ninA*, por lo que fue descartada de los posteriores análisis. Como control para este experimento, se utilizó el gen de la  $\beta$ -tubulina.



**Figura 5.7. Cuantificación relativa de la expresión del gen *ninA* por RT-qPCR.**

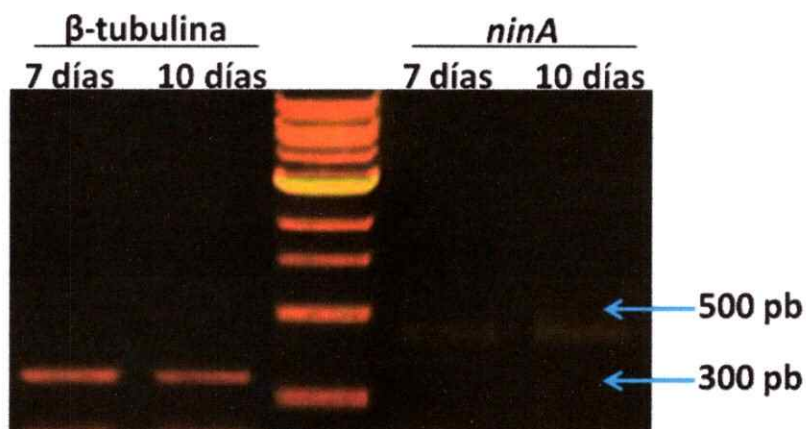
WT, cepa nativa de *P. roqueforti*. CT corresponde a *P. roqueforti* transformado con el plásmido vacío pJL43. T2, T5 y T16 son los transformantes analizados. El análisis T-test mostró que entre la cepa WT y T16 no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ )



### 5.3 Obtención y análisis de los perfiles de metabolitos secundarios de la cepa nativa y de las cepas transformantes mediante HPLC

#### 5.3.1 Análisis de los metabolitos presentes en el caldo de cultivo de *P. roqueforti*

Para la determinación del/los metabolitos secundarios asociados a la expresión de *ninA*, se creció la cepa nativa y las cepas transformantes T2 y T5 en medio YES líquido a 28°C y 180 rpm a dos tiempos distintos: 7 días y 10 días. Con el fin de verificar que en los periodos seleccionados el gen *ninA* se está expresando, el ARN de la cepa nativa se extrajo en las condiciones indicadas para realizar un RT-PCR. El resultado de este experimento indicó que el gen *ninA* se expresa en ambos días (figura 5.8).

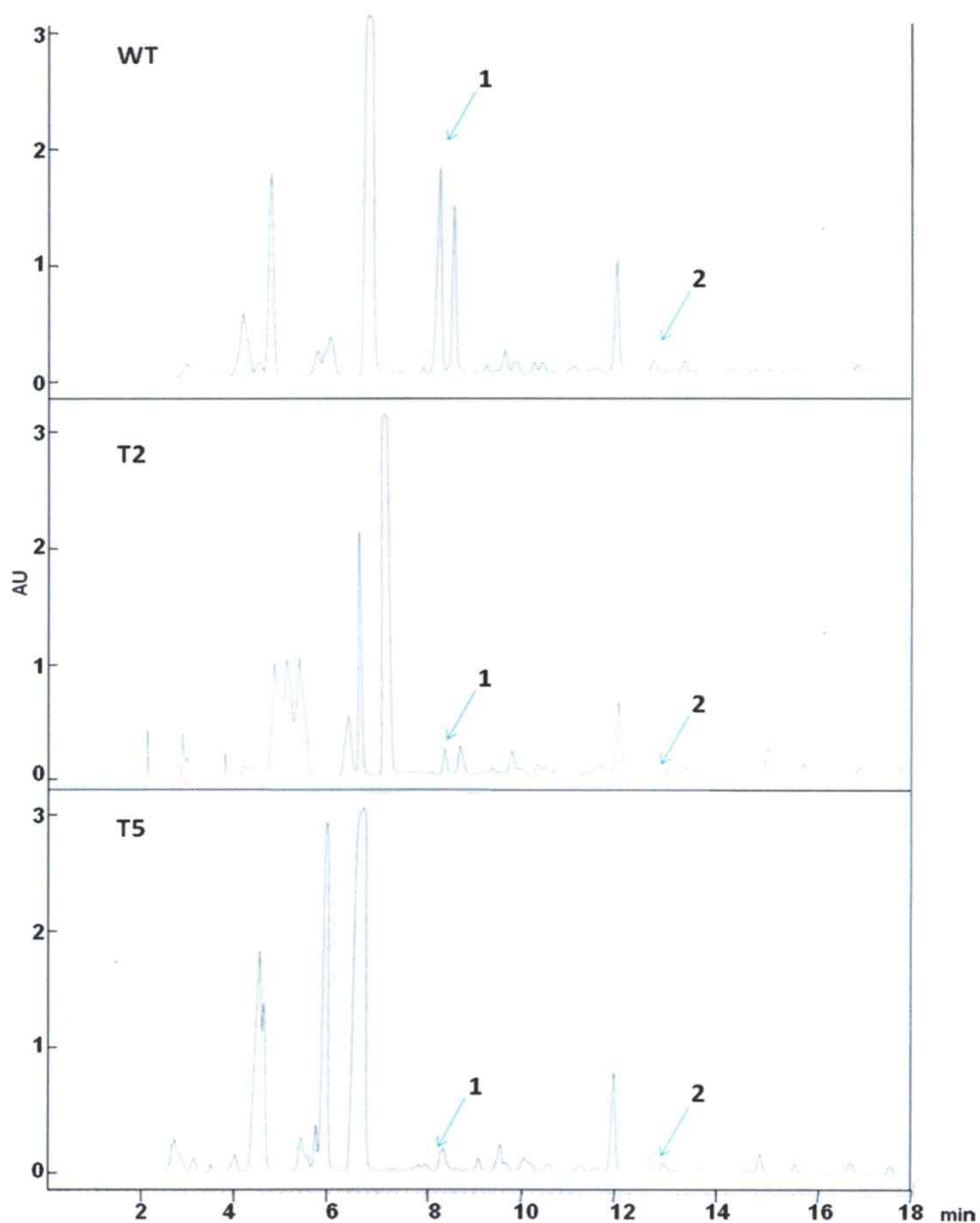


**Figura 5.8.** RT-PCR de la expresión del gen *ninA* a 7 y 10 días de cultivo.

Se muestra la expresión del gen *ninA* y del control  $\beta$ -tubulina para la cepa nativa de *P. roqueforti*. Las flechas azules indican los tamaños moleculares 500 pb y 300 pb.

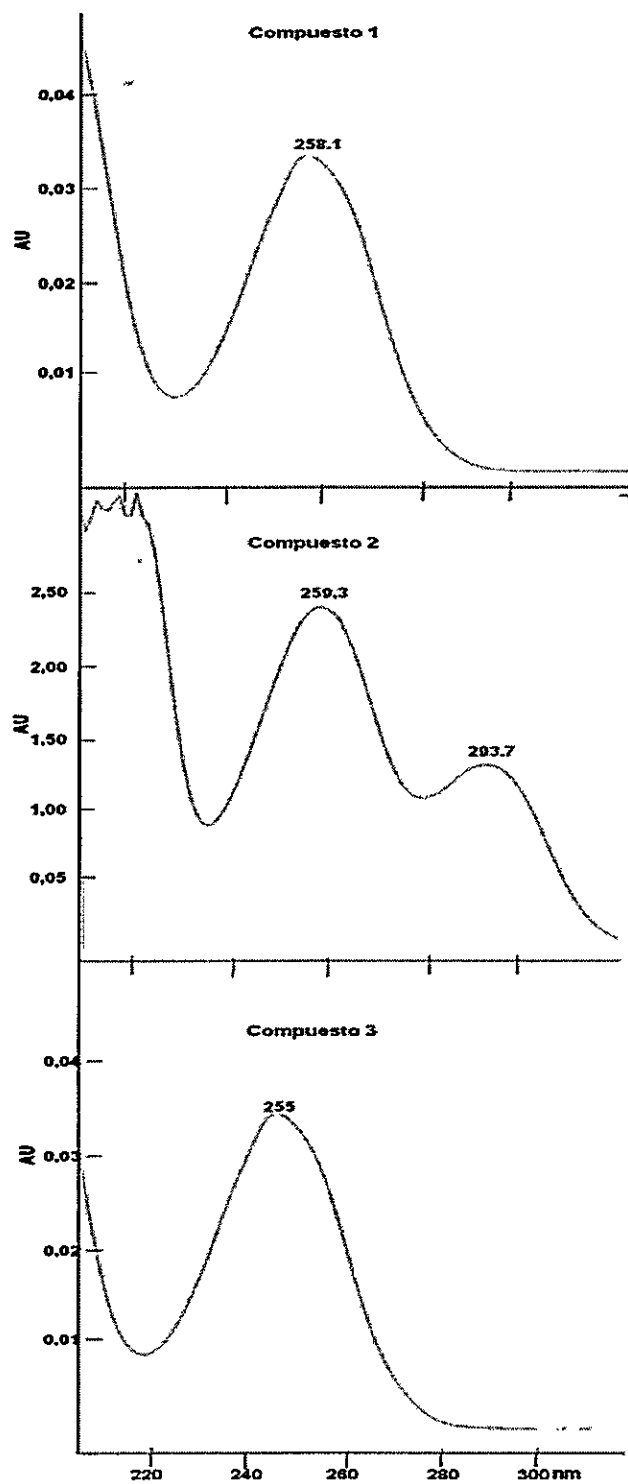
Los caldos de cultivos obtenidos para los 7 y 10 días de crecimiento, fueron tratados e inyectados en el HPLC analítico, tal y como se detalla en la sección de Materiales y Métodos, para analizar la producción de metabolitos secundarios en estas cepas. Al comparar los cromatogramas obtenidos a 254

nm para los 7 días de cultivo de la cepa nativa y las cepas transformantes (figura 5.9), se observaron 2 picos cromatográficos que se encuentran presentes en la cepa nativa pero no en las cepas transformantes. El primero de estos picos presenta un tiempo de retención de 8.1 min y tiene un máximo de absorción a 258 nm. El segundo pico presenta un tiempo de retención de 12.5 min y tiene dos máximos de absorción, a 259 nm y a 293 nm (figura 5.10). En la figura 5.11, correspondiente a los cromatogramas obtenidos a 254 nm para los 10 días de cultivo, se observaron 3 picos cromatográficos presentes en la cepa nativa y ausentes en las cepas transformantes. Los primeros dos picos corresponden a los encontrados también a los 7 días, aunque con distinta intensidad, mientras que el tercer pico cromatográfico tiene un tiempo de retención de 15.5 min con un máximo de absorción a 255 nm (figura 5.10). Si bien en los cromatogramas de las cepas T2 y T5 se observó un compuesto con 15.5 min de tiempo de retención, su espectro de absorción era diferente, indicando así que es un compuesto distinto al presente en la cepa nativa al mismo tiempo de retención.



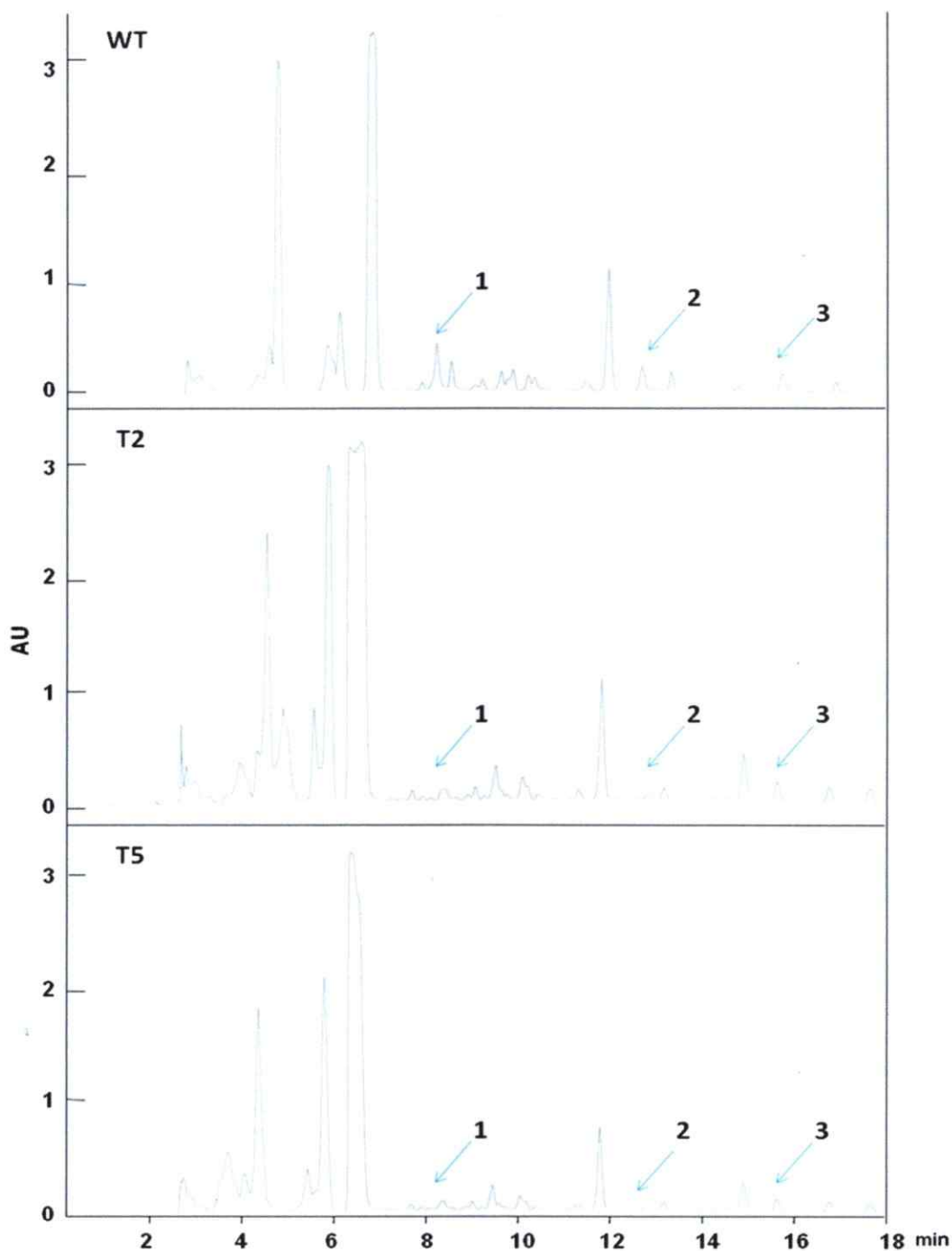
**Figura 5.9. Cromatogramas a 254 nm de los caldos de 7 días de cultivo de las cepas nativa y transformantes.**

Las flechas azules indican los compuestos seleccionados como candidatos a producto biosintético de NinA 1) RT 8,1 min; 2) RT 12.5 min.



**Figura 5.10. Espectros de absorción de los compuestos seleccionados.**

Se presentan espectros de absorción de los compuestos 1, 2 y 3 seleccionados para la purificación.



**Figura 5.11. Cromatogramas a 254 nm de los caldos de 10 días de cultivo de las cepas nativa y transformantes.**

Las flechas azules indican los compuestos seleccionados como candidatos a producto biosintético de NinA: 1) RT 8,1 min; 2) RT 12,5 min; 3) RT 15,5 min.

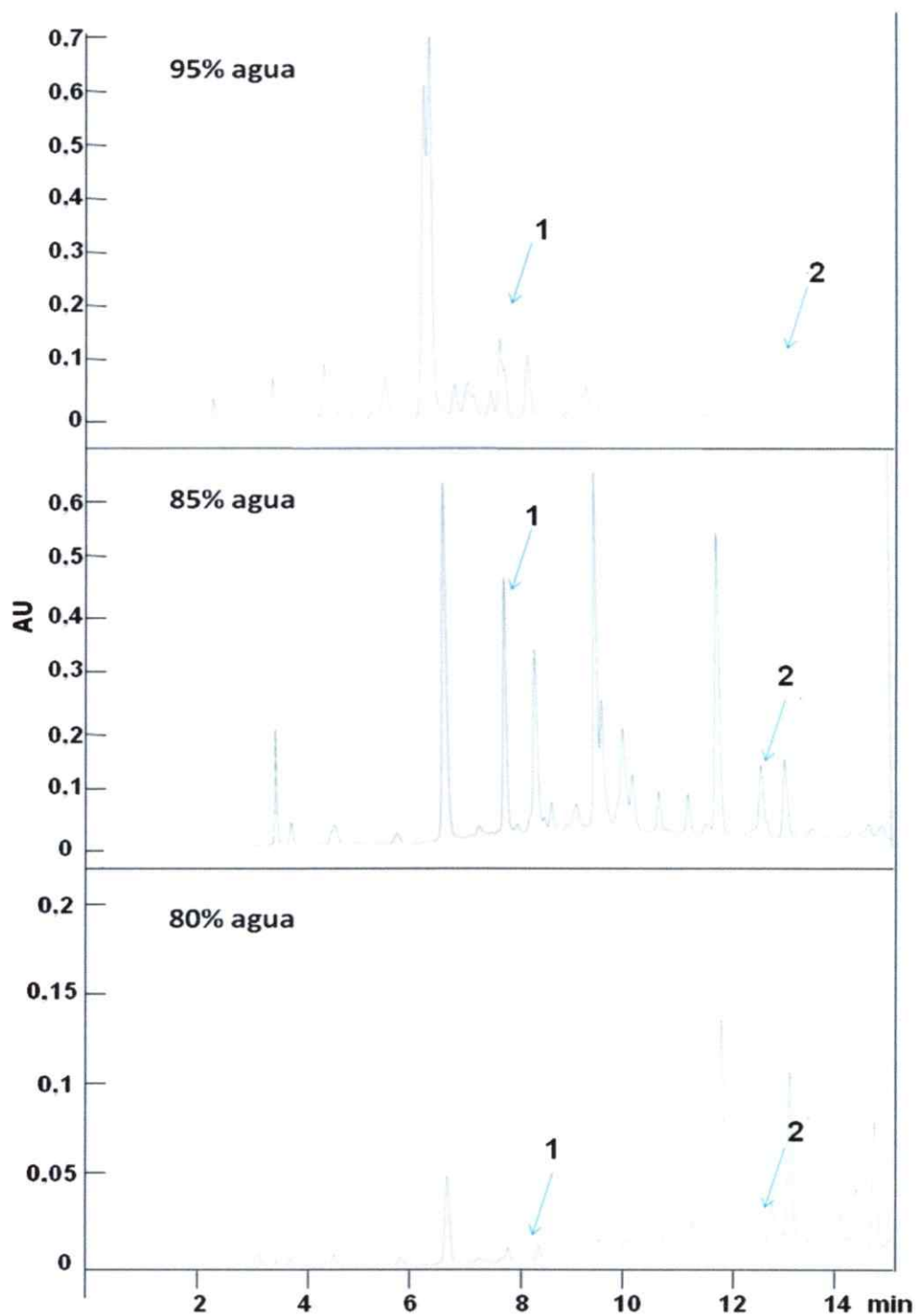


En base a estas comparaciones, se escogieron los compuestos con tiempos de retención 8,1 (compuesto 1); 12,5 (compuesto 2) y 15,5 (compuesto 3) como productos biosintéticos candidatos de la enzima NinA y por lo tanto, fueron seleccionados para su purificación. Cabe mencionar que todos estos análisis se realizaron por triplicado, observándose una excelente reproducibilidad del experimento, ya que en todos los casos se obtuvo el mismo perfil de metabolitos tanto para los 7 como para los 10 días de cultivo.

#### **5.4 Purificación y caracterización del/los metabolitos secundarios asociados a la expresión de *ninA*.**

Para llevar a cabo la purificación de los compuestos seleccionados, se realizó una fermentación de la cepa nativa en un volumen de 200 ml de medio YES líquido por 10 días a 28°C y 180 rpm. El motivo de seleccionar un tiempo de cultivo de 10 días, a pesar de que los compuestos 1 y 2 parecen estar presentes en menor proporción, es que en estas condiciones era posible encontrar también el compuesto 3. Los 200 ml de caldo de cultivo fueron desproteinizados y concentrados en el rotavapor para obtener un extracto final de color amarillo.

Posteriormente, a una pequeña fracción del caldo de cultivo concentrado (1 ml) se le realizó una etapa de pre-purificación empleando una columna flash con sílica de fase reversa. Esto se hizo de acuerdo al gradiente descrito en Materiales y Métodos. Las fracciones resultantes de este tratamiento fueron analizadas en el HPLC para verificar la presencia de los compuestos de interés. En la figura 5.12 se observan los cromatogramas de las fracciones 90% agua, 85% agua y 80% agua. Como se puede apreciar, la fracción 85% agua se encuentra enriquecida en los compuestos 1 y 2, por lo que fue seleccionada para el posterior proceso de purificación mediante HPLC con columna semipreparativa.



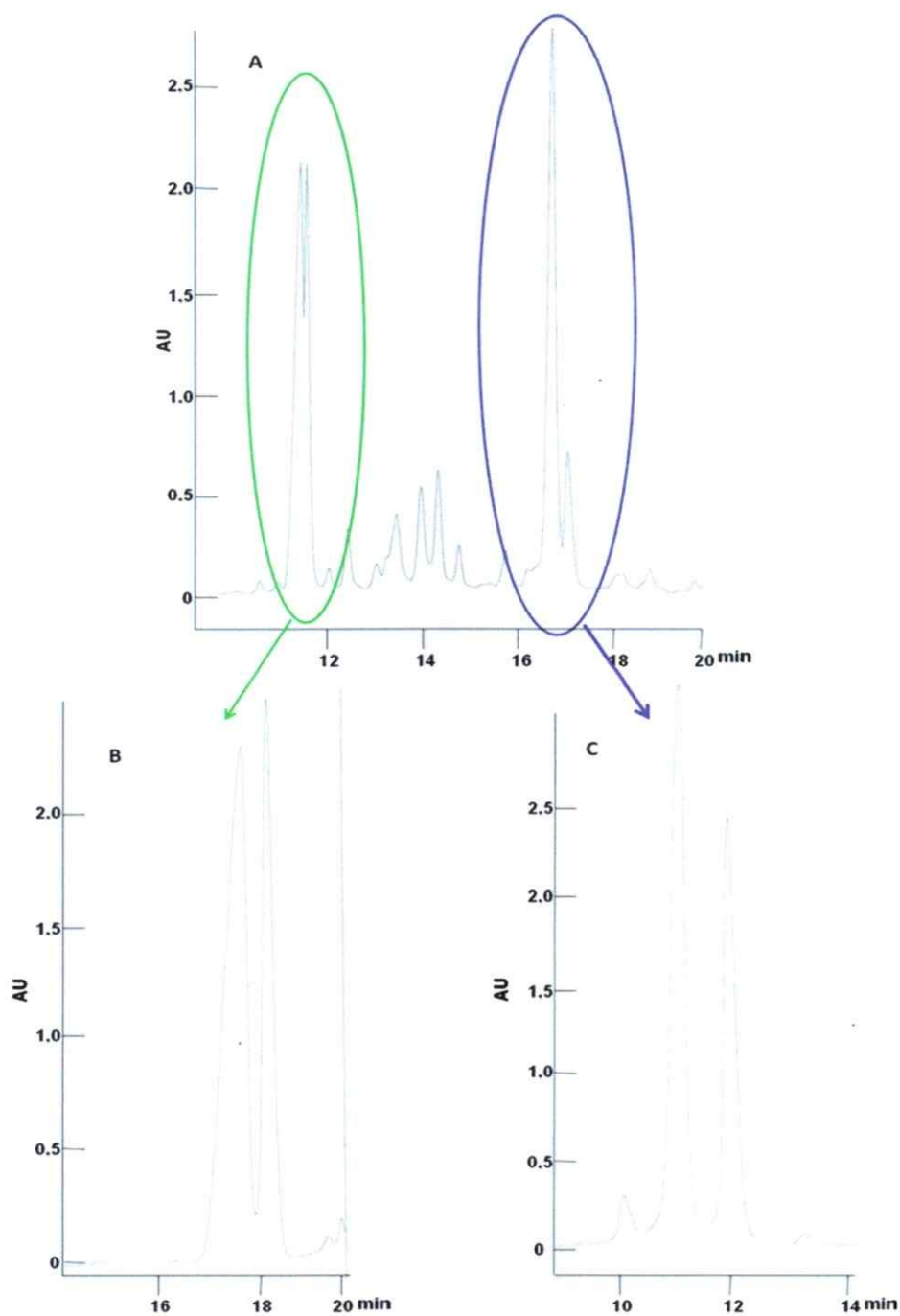
**Figura 5.12. Fracciones de la columna flash de fase reversa analizadas por HPLC analítico.**

Las flechas azules indican la presencia de los compuesto 1 y 2.

Sin embargo, en ninguna de las fracciones analizadas fue posible encontrar el compuesto 3. Al analizar el caldo de cultivo inicial concentrado tampoco se encontró el compuesto 3, sugiriendo que este compuesto no soportó las condiciones de concentración del caldo de cultivo.

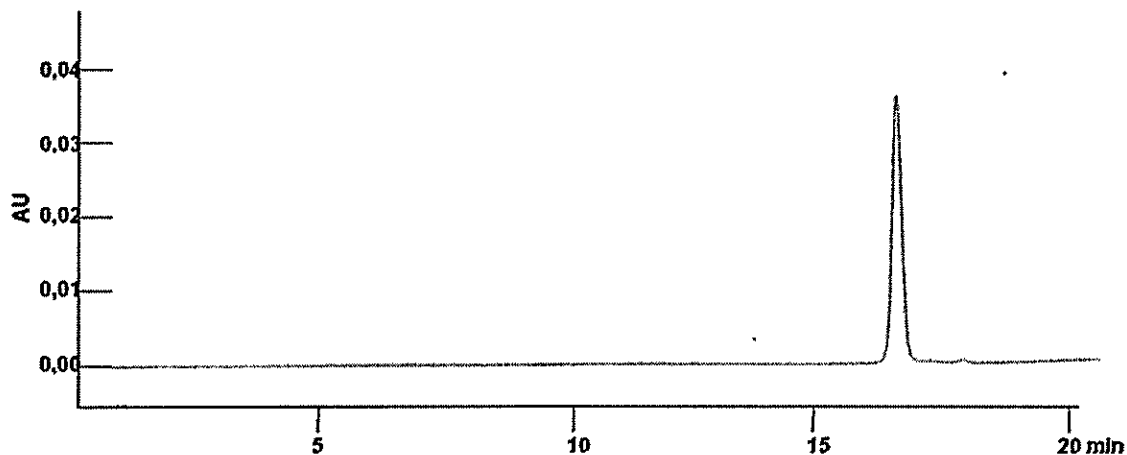
Con estos resultados preliminares, se procedió a la pre-purificación por columna flash de fase reversa de todo el caldo de cultivo concentrado (14 ml). Las fracciones de 95% agua, 85% agua y 80% agua fueron concentradas y de nuevo analizadas por HPLC para confirmar su composición en metabolitos.

Una vez confirmado que el perfil de la fracción 85% de agua contenía los compuestos 1 y 2, se procedió a su purificación en el HPLC empleando una columna semipreparativa. Para ello, se utilizó el método cromatográfico semipreparativo 1 detallado en Materiales y Métodos (figura 5.13 A). En esta purificación, se recolectaron dos fracciones enriquecidas en los compuestos 1 y 2 respectivamente (figura 5.13, B y C), pero que no estaban puras. Por ello, una vez concentradas las fracciones recolectadas, se purificaron de nuevo empleando el HPLC utilizando un método específico para cada compuesto, el método cromatográfico semipreparativo 1 para el compuesto 1 y el método cromatográfico semipreparativo 2 para el compuesto 2, que se detallan en Materiales y Métodos. Dada la baja cantidad de los compuestos purificados, sólo se evaluó la pureza del compuesto 1 mediante su inyección en el HPLC analítico (figura 5.14). Las fracciones recolectadas para cada compuesto fueron liofilizadas, obteniéndose finalmente 3.4 mg del compuesto 1 y 1,4 mg del compuesto 2.



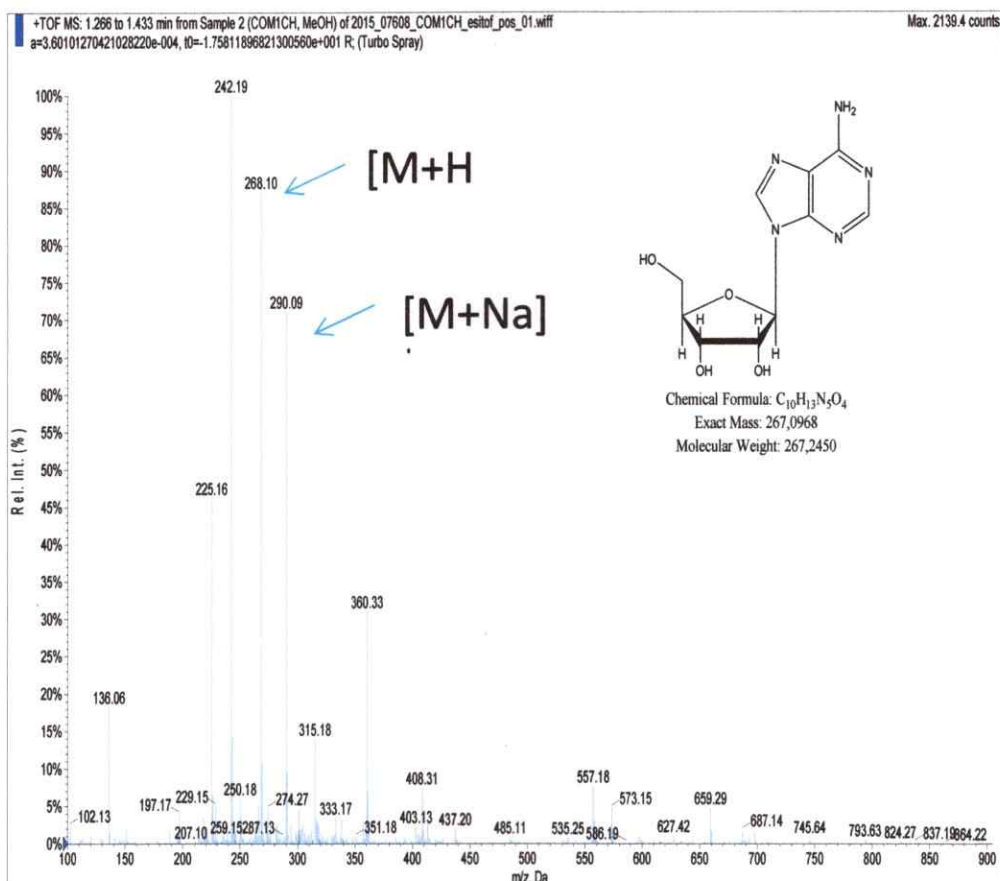
**Figura 5.13. Proceso de purificación de los compuesto 1 y 2.**

En A) se observa la fracción 85% agua inicial. Luego de la primera etapa de purificación en columna semipreparativa, se obtuvo las fracciones semipuras de los compuestos 1 (B) y 2 (C).



**Figura 5.14. Cromatograma compuesto 1 puro.**

La estructura del compuesto 1 fue confirmada tanto por  $^1\text{H-RMN}$  como por espectroscopía de masas. Estos análisis realizados permitieron identificar al compuesto 1 como una adenosina. En el espectro de masas del compuesto 1 (figura 5.15) se puede observar claramente la señal del ión molecular así como la señal de dicho ión más un átomo de sodio.



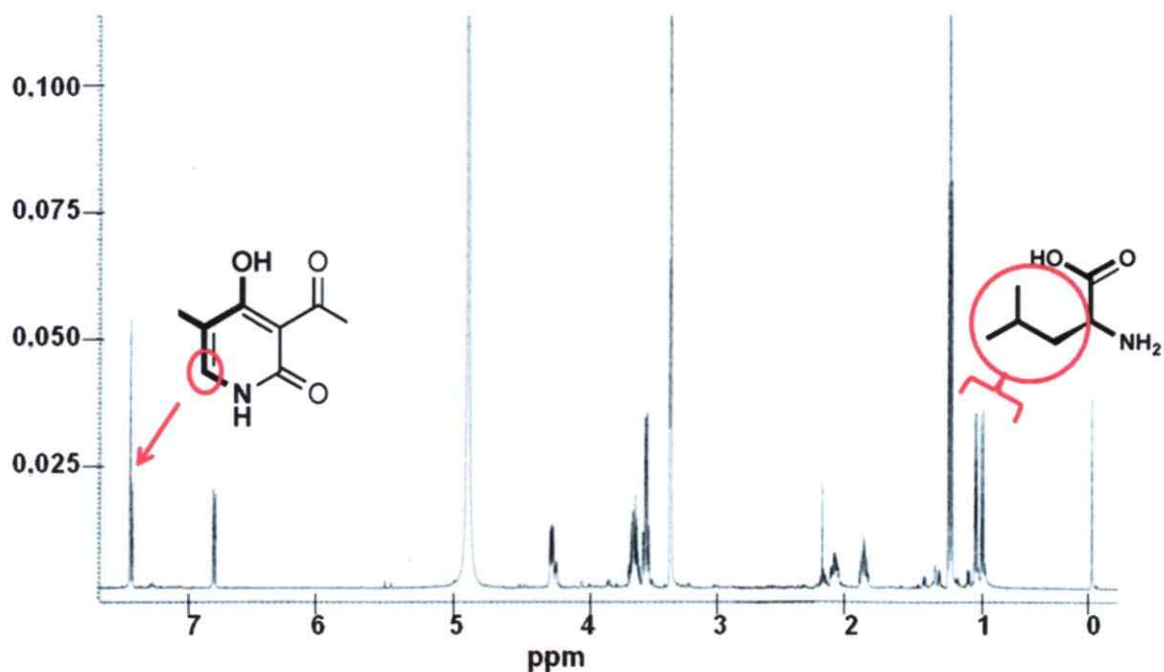
**Figura 5.15. Espectro de masas y estructura compuesto 1.**

Las señales observadas indican que el compuesto se trata de una adenosina

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 2 (figura 5.16) se encontraron dos señales a un desplazamiento químico de 1 que son características del grupo isopropilo. Este grupo carbonado esta presente en el aminoácido leucina, lo que sugiere que éste podría ser el aminoácido utilizado como sustrato por la parte NRPS de la enzima NinA. Por otro lado, la señal a un desplazamiento químico de 7,5 es coincidente con la de un protón vecino a un grupo amida cíclico. Esta señal es característica de varios compuestos PK-NRP que se encuentran en la literatura.

Lamentablemente, el resto de los análisis espectroscópicos necesarios para establecer inequívocamente la estructura del compuesto 2 no pudieron

realizarse ya que el compuesto 2 se degradó durante la realización de estos experimentos.



**Figura 5.16. Espectro <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 2.**

En el eje x se indican las unidades en ppm y en el eje Y la intensidad. A desplazamiento químico de 1 ppm se observa las señales del grupo isopropilo y a desplazamiento químico 7.5 las señales de un protón vecino a un enlace amida.

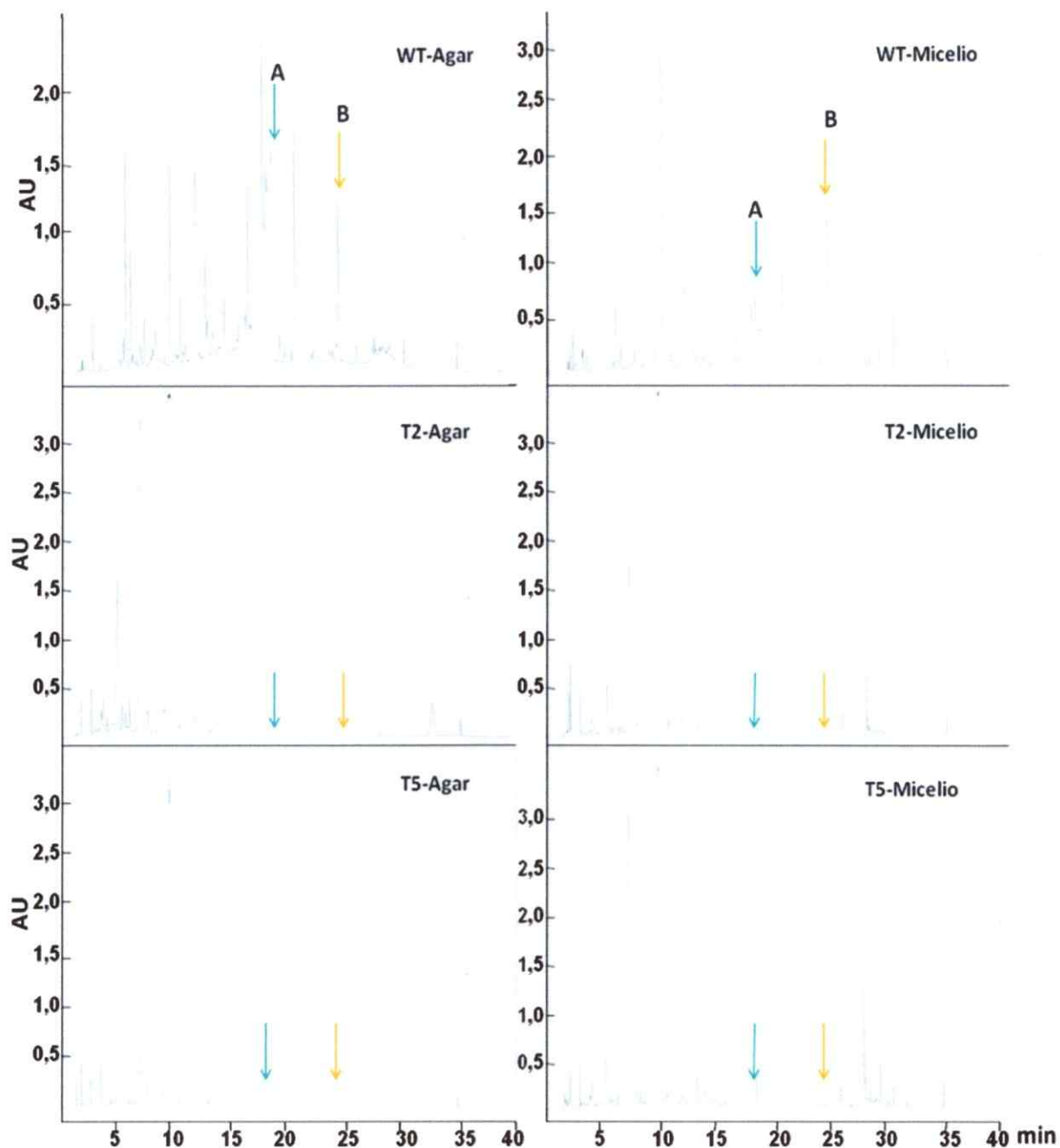
### **5.5 Análisis de la producción de ácido micofenólico y de andrastina A por parte de las cepas transformantes.**

Con la finalidad de evaluar un posible efecto de "cross-talk" entre las vías del metabolismo secundario de la enzima NinA y las vías de los metabolitos secundarios conocidos de *P. roqueforti*, se evaluó la producción de los compuestos andrastina A y ácido micofenólico por parte de la cepa nativa y las

cepas transformantes T2 y T5. Para ello, se cultivaron las cepas a analizar en medio YES sólido por 7 días tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

Pasado los 7 días de cultivo, la andrastina A y el ácido micofenólico presentes tanto en el micelio como en el agar de cada una de las cepas, fue extraído siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Los metabolitos extraídos fueron analizados por HPLC analítico. Como se observa en la figura 5.17, la cepa nativa produce andrastina y ácido micofenólico en cantidades detectables tanto en la muestra de agar como en la de micelio. En cambio, al observar los cromatogramas de las cepas T2 y T5, tanto para las muestras de agar como las de micelio, no se observa la presencia de ninguno de los dos compuestos.





**Figura 5.17. Evaluación de la producción de andrastina A y ácido micofenólico de la cepa nativa y las transformantes por HPLC.**

En la izquierda se muestran los cromatogramas de los metabolitos extraídos del a agar y en la derecha, los extraídos del micelio. El compuesto **A** (indicado con una flecha azul) corresponde al ácido micofenólico y el compuesto **B** (indicado con una flecha amarilla) a la andrastina A.

Utilizando una curva de calibración para la andrastina A y otra para el ácido micofenólico, se determinó la cantidad de cada uno de estos metabolitos en las muestras de la cepa nativa y de las transformantes en unidades de  $\mu\text{g}/\text{gramo}$  de peso seco. Los valores obtenidos para la cepa nativa fueron:  $831 \pm 159$  y  $658 \pm 174$   $\mu\text{g}$  de andrastina A por gramo de peso seco en agar y micelio respectivamente y  $335 \pm 119$  y  $289 \pm 160$   $\mu\text{g}$  de ácido micofenólico por gramo de peso seco en agar y micelio respectivamente. Para las dos cepas transformantes la cantidad de andrastina A y de ácido micofenólico en todas las cepas fue cero.

## 6 DISCUSIÓN

Con el fin de determinar los efectos de la proteína G en la regulación génica en *P. roqueforti*, en nuestro grupo de investigación se realizaron experimentos para comparar la expresión diferencial de genes entre una cepa nativa de *P. roqueforti* y una cepa mutante con la subunidad alfa de la proteína G modificada, de tal forma que esté constitutivamente activa (Gil-Durán *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos permitieron acotar un subgrupo de genes que se encuentran expresados en la cepa nativa pero no en la cepa mutada, es decir, que son regulados negativamente por la proteína G. Dentro de estos genes regulados negativamente por la proteína G, se encontró un fragmento de una secuencia de ADNc, que al ser contrastada en las bases de datos mediante blastx, presentaba un 42% de identidad con el gen de la lovastatina sintasa de *Arthoderma gypseum*. Esto sugirió que este gen, denominado *ninA*, codificaba una enzima policétido sintasa aún no descrita en *P. roqueforti*, la cual es el objeto de estudio de esta Tesis de Magíster.

### 6.1 Caracterización estructural gen *ninA*

El análisis bioinformático de la secuencia parcial de *ninA* empleando el genoma de *P. roqueforti* y Blast, mostró que *ninA* probablemente codifica una enzima híbrido PKS-NRPS. Además, de acuerdo con este análisis, la enzima PKS-NRPS denominada NinA, tiene 3937 aminoácidos y su estructura presenta los siguientes dominios: KS-AT-DH-MT-KR-C-A-TD. La secuencia de NinA tiene un 47% de identidad con la enzima fusaridiona A sintasa de *Fusarium heterosporum* y un 45% de identidad con la enzima equisetin sintasa del mismo organismo, ambas enzimas PKS-NRPS. Por otro lado, la enzima NinA no posee el dominio ER, lo cual es una característica que ya ha sido observada en otras PKS-NRPS como la equisetin sintasa (EqiS), la tenellina sintasa (TenS), y la

fusarin sintasa (FUSS), entre otras. Si bien es posible no encontrar el dominio ER o que éste se encuentre no funcional en la enzima, la actividad enoil reductasa, en los casos que es necesaria, es rescatada por la acción de una enzima ER que actúa en *trans* y que puede o no estar codificada dentro del mismo cluster génico (Boettger & Hertweck, 2013).

Las enzimas PKS-NRPS pueden ser encontradas tanto en bacterias como en hongos; sin embargo, en este último grupo sólo han sido encontradas en los hongos pertenecientes a la subclase Euascomycetes (Boettger & Hertweck, 2013). El análisis filogenético a partir de las secuencias de PKS-NRPS fúngicas tanto conocidas como no descritas, demuestra que corresponden a un grupo monofilético, lo que sugiere un origen común entre todas ellas (Bushley *et al.*, 2010). A diferencia de las bacterias, que pueden incorporar diversos tipos de unidades extensoras (ramificadas o no), las PKS-NRPS fúngicas sólo incorporan malonil-CoA como unidad extensora, variando entonces la cantidad de unidades extensoras integradas. Las ramificaciones usualmente son incorporadas por metilaciones dependientes de SAM llevadas a cabo por el dominio de metilación (MT) (Boettger & Hertweck, 2013). Generalmente el producto final de esta biosíntesis pasa a través de numerosas reacciones posteriores, para lo cual los genes responsables de ello están usualmente ubicados en el mismo cluster génico del gen codificante de la PKS-NRPS.

Para la búsqueda de genes involucrados en el metabolismo secundario tanto fúngico como bacteriano, existen en la web varias plataformas que además arrojan una predicción de la estructura química de los compuestos finales que estas rutas biosintéticas sintetizan. Particularmente para hongos, existe la plataforma SMURF que entrega una lista de genes del metabolismo secundario a partir del genoma de los hongos, sin embargo no entrega mayor información. Por otro lado, antiSMASH es una plataforma que permite la identificación de clusters génicos, la predicción de los productos biosintéticos y la comparación con cluster génicos conocidos (Medema *et al.*, 2011).

Mediante esta herramienta, al analizar el genoma del *P. roqueforti*, se determinó la presencia de 5 genes aledaños al gen *ninA*, que de acuerdo a las funciones que estos presentan, podrían estar formando parte del cluster génico. Mediante RT-PCR se determinó que sólo 4 de estos genes se expresan al mismo tiempo que el gen *ninA*. Por lo tanto, estos serían los genes candidatos a formar parte del cluster génico y corresponden al transportador MFS (*mrl*), dos factores de transcripción Zn<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> (*e-1* y *e-2*) y una oxidasa (*berb1*). Cabe mencionar que el hecho de no detectar transcritos del gen *n1* puede deberse a que efectivamente este gen no se expresa junto con el resto de genes del hipotético cluster en esas condiciones, o bien que el gen *n1* no esté correctamente anotado, lo que ya ha ocurrido en otras ocasiones.

Los transportadores MFS, corresponden a una gran familia de proteínas de transportadores de membranas que pueden ser encontrados tanto en bacterias como en eucariontes. En hongos, estos transportadores otorgan protección contra compuestos tóxicos presentes en el hábitat o evita la acumulación citoplasmática de metabolitos secundarios tóxicos producidos por el mismo hongo (Stergiopoulos *et al.*, 2002). Por ejemplo, estos transportadores son esenciales para la secreción de las micotoxinas cercosporina y toxina HC de *Cercospora kikuchii* y *Cochliobolus carbonum*, respectivamente (Chang *et al.*, 2004). Sin embargo, también es posible encontrar genes de transportadores MFS dentro del cluster que no tienen una función conocida y cuya expresión depende de otros reguladores transcripcionales (Chang *et al.*, 2004).

En el alrededor del 60% de los clusters génicos que se conocen se encuentra al menos un gen regulador que, por lo general, se considera vía-específico. Casi el 90% de los factores de transcripción descritos en los cluster génicos de PKS pertenecen a la familia Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>. (Brackhage, 2013). Pero también es posible encontrar factores de transcripción tipo bZIP, como en el caso del cluster génico de la biosíntesis de ciclosporina (Bushley *et al.*, 2013). A modo de ejemplo, en *Aspergillus fumigatus*, GliZ, correspondiente a un factor de transcripción tipo

Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> está codificado en el cluster génico de la biosíntesis de gliotoxina y su delección afecta la producción de este compuesto, mientras que su sobreexpresión aumenta la producción de gliotoxina. Sin embargo, GliZ no activa todos los genes del cluster, siendo la excepción *gliT*, correspondiente a la gliotoxina oxidasa, gen que otorga resistencia a gliotoxina (Brackhage 2013).

Con estos antecedentes, para determinar la función de los factores de transcripción encontrados, *e-1* y *e-2*, es necesario realizar análisis funcionales de ganancia o pérdida de función para evaluar si estos serían factores de transcripción específicos de esta vía o incluso, si están afectando la transcripción de otras rutas metabólicas secundarias.

Finalmente, es muy frecuente encontrar genes que codifican para enzimas oxidoreductasas en los cluster génicos fúngicos. En este estudio se encontró que el gen *berb1* codifica una enzima tipo "puente de berberina". Estas enzimas catalizan una etapa de ciclación oxidativa de un N-metil de la S-reticulina en plantas. Esto sugiere que *berb1* puede estar formando parte de una etapa de oxidación de 2 electrones (Awakawa *et al.*, 2013). Este tipo de enzimas no es común en los cluster génicos de PKS-NRPS conocidos. La presencia de este tipo de genes sugiere que él o los compuestos sintetizados por este cluster génico son nuevos. Para determinar la función de *berb1* en el cluster génico de *ninA*, sería necesario disponer de la estructura completa del producto biosintético de NinA, y evaluar las modificaciones del compuesto frente a una delección/silenciamiento de *berb1*.

Al comparar el cluster génico de *ninA* con otros clusters fúngicos descritos, se observan ciertas semejanzas. A modo de ejemplo, para la síntesis de fusarina C, correspondiente a una micotoxina producida por diferentes especies de *Fusarium*, se requiere la actividad de la enzima fusarin sintasa codificada por el gen *fusA*. Hasta el momento se ha identificado una zona de 26 Kb involucrada en la síntesis de la fusarina C que incluye los genes *orf1* y *orf4* de función desconocida, *orf2* un gen hipotético de hidrolasa, *orf5* y *orf6* un transportador

monocarboxilato y un transportador ABC, respectivamente.

Puesto que el punto clave para definir un cluster génico, es la funcionalidad de cada uno de los genes en la ruta biosintética, es necesario realizar análisis funcionales mediante pérdida o ganancia de función para cada uno de los genes candidatos y así definir exactamente el rol de cada uno de los genes en la vía. Las técnicas principalmente utilizadas para el estudio del metabolismo secundario en hongos corresponden a la generación de *knock-outs* para los genes relacionados con la biosíntesis. Mediante esta técnica se han podido identificar y asignar funciones a varios cluster génicos. Por ejemplo, en la síntesis del pigmento rojo bikaverina en *Fusarium fujikuroi*, mediante análisis de "chromosome Walker" se determinó la presencia de 5 genes alrededor del gen *bik1* que codifica la PKS involucrada de la síntesis del pigmento, y que formarían parte del cluster: *bik2* (codifica una monooxigenasa), *bik3* (codifica una metiltransferasa), *bik4* (codifica un factor de transcripción), *bik5* (codifica un factor de transcripción) y *bik6* (codifica un MFS). Mediante delección de cada uno de los genes, se corroboró el rol de estos en la síntesis de la bikaverina (Wiemann *et al.*, 2009). Sin embargo, debido a que la tasa de recombinación homóloga varía entre los organismos, no es siempre eficiente y/o sencillo lograr *knock-outs* en todas las especies fúngicas. Para ello, existen otras estrategias como la complementación génica a mutantes generadas de manera aleatoria (utilizando mutagénesis inducida por UV, mutagénesis por transposones, entre otros) y la técnica de silenciamiento génico. Esta última técnica cada vez está siendo más utilizada en estos análisis ya que si bien no genera un fenotipo nulo como los *knock-out*, si es una herramienta eficiente y sencilla para trabajar. Adicionalmente, permite analizar aquellos fenotipos que serían letales en un *knock-out* (Schümann & Hertweck, 2006).

En este estudio se obtuvieron dos transformantes (T2 y T5) con una atenuación del gen *ninA* de entre un 70-80%. Al comparar los perfiles de metabolitos obtenidos por HPLC de la cepa nativa y las transformantes, se observó que

esta atenuación provocaba una drástica reducción, de entre el 80-99%, en la presencia de 3 compuestos denominados como compuesto 1, compuesto 2 y compuesto 3. Este cambio observado es acorde a lo reportado en la literatura para este hongo. Por ejemplo, en *P. roqueforti* se ha estudiado la ruta de biosíntesis de la toxina PR mediante silenciamiento génico. El cluster génico de la toxina PR se compone de 4 genes, *prx1* (codifica una óxido reductasa), *prx2* (codifica a aristoloceno sintasa, PKS), *prx3* (codifica una oxidasa) y *prx4* (codifica una alcohol deshidrogenasa). El silenciamiento de cada de ellos disminuyó entre un 65-99% la producción de toxina PR (Hidalgo *et al.*, 2013).

## 6.2 Metabolitos sintetizados por PKS-NRPS fúngicas

En hongos filamentosos se han caracterizado al menos 12 enzimas PKS-NRPS, asociando el cluster génico con la producción de un compuesto determinado (Tabla 6.1) (Boettger & Hertweck, 2013). Las bioactividades que estos presentan varían entre micotoxinas, inmunosupresores, antiangiogénicos, entre otras.

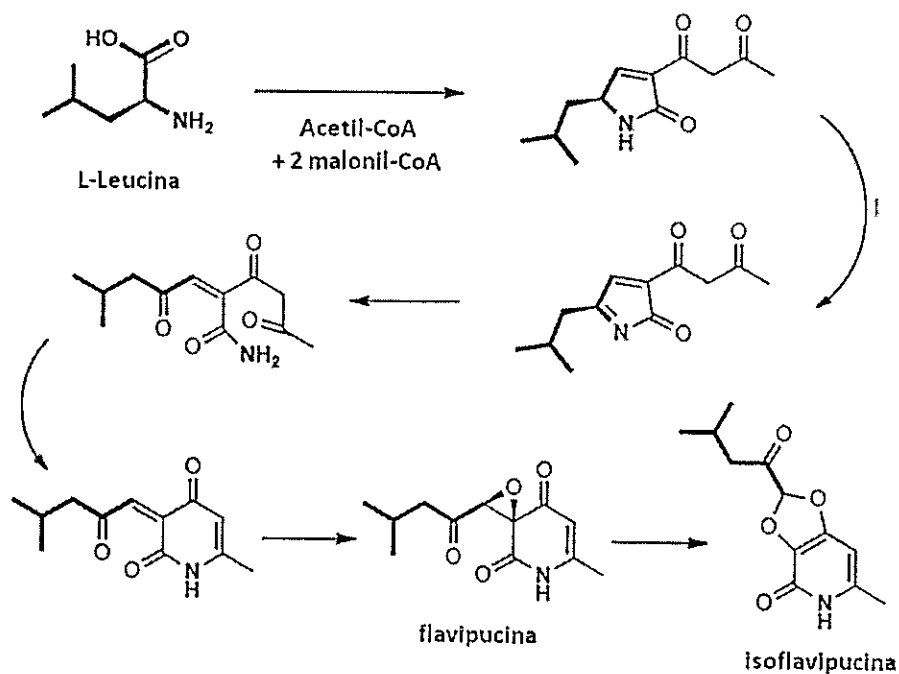
Particularmente en *P. roqueforti*, no se ha caracterizado ninguna enzima PKS-NRPS. Por tanto, este sería el primer estudio de este tipo de enzimas en esta especie. En cuanto al género *Penicillium*, hasta el momento sólo se ha descrito y caracterizado la PKS-NRPS, CheA, involucrada en la biosíntesis de la citoglobosina (una citochalasinina) en *P. expansum*.



Tabla 6.1. Enzimas PKS-NRPS fúngicas conocidas y los compuestos que producen (Modificado de Boettger & Hertweck, 2013)

Compuesto	Productor	Sustratos	PKS-NRPS
Aspiridona	<i>A. nidulans</i>	L-tirosina acetil-CoA 3 Malonil-CoA 2 SAM	ApdA
Caetoglobosina A	<i>P. expansum</i>	L-triptofano Acetil-CoA 8 Malonil-CoA 3 SAM	CheA
Ácido ciclopiazónico	<i>A. flavus, A. oryzae</i>	L-triptofano Acetil-CoA Malonil-CoA	CpaS
Citochalasina E	<i>A. clavatus</i>	L-fenilalanina Acetil-CoA 8 Malonil-CoA 3 SAM	CcsA
Equisetin	<i>F. heterosporum</i>	L-serina Acetil-CoA 7 Malonil-CoA	EqiS
Fusarina C	<i>G. moniliformis.</i>	L-homoserina Acetil- CoA 6 Malonil-CoA	FusA
Isoflavipucina	<i>A. terreus</i>	L-leucina Acetil-CoA 2 Malonil-CoA	ATEG_00325
NG-391	<i>M. robertsii</i>	L-homoserina acetil- CoA 6 Malonil-CoA	NGS1
Pseurotina A	<i>A. fumigatus</i>	L-fenilalanina Acetil-CoaA 4 Malonil-CoA	PsoA
Tenellin	<i>B. bassiana</i>	L-tirosina Acetil-CoA 4 Malonil-CoA 2 SAM	TenS
Desmetilbassianina	<i>B. bassiana</i>	L-tirosina Acetil-CoA 4 Malonil-CoA	DmbS
Xyrrolina	<i>Xylaria spp.</i>	L-serina Acetil-CoA 3 Malonil-CoA	PKS3

En este trabajo, la caracterización química mediante técnicas espectroscópicas de dos de los tres compuestos identificados como candidatos a ser el producto biosintético de NinA, identificó al compuesto 1 como una adenosina. En cuanto al compuesto 2, si bien no fue posible caracterizar completamente su estructura debido a su degradación durante el proceso de caracterización, se consiguió determinar la presencia de una leucina en la estructura. De acuerdo a las características de estas enzimas, en cuanto a su estructura, sustratos y modo de síntesis, el compuesto 2 pareciera ser el candidato a ser el producto biosintético de NinA. Esto además concuerda con la predicción bioinformática hecha con la plataforma antiSMASH, que predijo la presencia de leucina o alanina en la estructura del compuesto. En base a esto, es posible que la estructura de este compuesto posea ciertas semejanzas con el compuesto isoflavupicina (figura 6.1)



**Figura 6.1. Ruta biosintética propuesta de la isoflavipucina, un compuesto PK-NRP con leucina como aminoácido incorporado**

Este compuesto corresponde a isoflavipucina, producido por *Aspergillus terreus*. Para la biosíntesis de este compuesto se requiere de 1 molécula de acetil-CoA, 2 moléculas de malonil-CoA y 1 leucina (Modificado de Boettger & Hertweck, 2013).

Para poder confirmar que efectivamente NinA utiliza como sustrato leucina, se podría aislar el dominio de adenilación de la porción NRPS y mediante ensayo *in vitro*, evaluar la capacidad de activación de un grupo de aminoácidos. Por otra parte, para determinar la cantidad de unidades extensoras incorporadas, se pueden realizar experimentos con isotopos radioactivos que permitan medir la incorporación de malonil-CoA en la cadena policétido.

En lo que respecta a la presencia de adenosina en los extractos de *P. roqueforti*, esto no había sido reportado previamente. En efecto, tampoco se conoce la producción de adenina o sus derivados como metabolitos secundarios en hongos filamentosos. En cambio, si es posible encontrar

metabolitos derivados de adenina producidos por bacterias y levaduras. Pirttila *et al.*, 2004 analizó la producción de metabolitos secundarios por las bacterias *Methylobacterium extorquens*, *Pseudomonas synxantha* y la levadura *Rhodotorula minuta* en *Pinus sylvestris*. En estos estudios se encontró la producción de adenina, adenina desoxirribosido y adenina ribosido. Al tratar los tejidos meristemáticos con antibióticos (para suprimir el crecimiento bacteriano y producción de metabolitos secundarios) observó una disminución en el desarrollo y formación de callos. Al suplementar los cultivos con AMP, se recuperó la formación de callos y crecimiento de los tejidos, lo que sugirió que la presencia de estos compuestos, producido por los microorganismos endófitos, juegan un rol en el desarrollo morfológico en los tejidos de *Pinus sylvestris*, probablemente sirviendo como precursores para la síntesis de citoquinas. Esto sugiere que la adenosina encontrada puede estar jugando un rol en el proceso del metabolismo secundario de *P. roqueforti* hasta ahora desconocido.

Por otro lado, la alteración en la producción de adenosina observada en los transformantes T2 y T5 no puede ser explicada directamente por el silenciamiento del gen *ninA*, ya que la biosíntesis de adenosina, si bien utiliza aminoácidos como sustratos, pertenece a una ruta diferente y ya está establecida. Sin embargo, considerando las evidencias que apuntan a una regulación en conjunto entre los procesos de crecimiento, diferenciación y el metabolismo secundario de los hongos (Brackhage, 2013), podría ser que la ausencia del producto biosintético de la ruta del gen *ninA* afecte de manera cruzada la regulación de éstos procesos que llevan a una alteración en la síntesis de adenosina.

### 6.3 “Cross talk” entre vías del metabolismo secundario

El primer caso de “cross talk” entre vías del metabolismo secundario en hongos, fue descrito en *Aspergillus nidulans*, donde se encontró que la expresión inducida de *scpR*, factor de transcripción del cluster génico *ipn* ubicado en el cromosoma II activa no solo dicho cluster, sino también un segundo cluster génico silente, ubicado en el cromosoma VIII, compuesto de los genes *afoE* y *afoG*, ambos codifican PKS, y el gen *afoA* (Bergmann *et al.*, 2010).

Un segundo ejemplo, corresponde al encontrado en *P. roqueforti* al silenciar los genes *prx*, involucrados en la biosíntesis de la toxina PR. Este silenciamiento lleva a una mayor producción ácido micofenólico. Esto puede deberse a que la biosíntesis de ácido micofenólico involucra una unidad isopentenil de 5 carbonos y la sobreproducción en las mutantes se puede deber a que se ahorra unidades de isopentenil al reducir la biosíntesis de toxina pR. (Hidalgo *et al.*, 2013).

En el presente estudio se encontró que la producción de andrastina A y ácido micofenólico sorprendentemente disminuye en un 100% en las cepas T2 y T5. Esto sugiere un posible efecto de “cross talk” entre las rutas metabólicas de la andrastina A y el ácido micofenólico y la ruta biosintética de NinA. Sin embargo, no es posible determinar qué tipo de interacciones ocurren entre ellas. Para poder dilucidar esto, es necesario realizar análisis de expresión de los genes de las rutas biosintéticas de la andrastina A y el ácido micofenólico en las cepas nativas, T2 y T5, pues podría ser que un elemento de la vía NinA active estas otras dos rutas. De igual forma, es necesario corroborar que la inserción del plásmido pJL43-PKS no ocurriera en los cluster génicos de ambas vías, o en zonas regulatorias de estas. Otra posible forma de interacción entre estas rutas metabólicas es que la ruta NinA genere precursores que son utilizados por una de estas vías, o que estos precursores activen la transcripción de los genes regulatorios globales que a su vez, regulan estas vías.

## 7 CONCLUSIONES

Se confirma que el gen *ninA* codifica una enzima híbrida PKS-NRPS, denominada NinA. En *P. roqueforti* no se han descrito enzimas híbridas PKS-NRPS, por lo que esta es la primera descripción de la presencia de este tipo de enzimas en esta especie.

El análisis bioinformático del entorno genético del gen *ninA* permite sugerir que el cluster génico al que pertenece *ninA* estaría conformado por otros 5 genes (*mrl*, *e-1*, *e-2*, *n1*, *berb1*). El análisis de expresión de los seis genes de este hipotético cluster indica que a excepción del gen *n1*, los demás se expresan simultáneamente bajo las condiciones experimentales ensayadas.

Entre los compuestos producidos por la cepa nativa de *P. roqueforti* que fueron seleccionados como metabolitos candidatos de la ruta de biosíntesis en la cual participa NinA, el compuesto 2 presentó características estructurales que sugieren su pertenencia al grupo de los compuestos híbridos PK-NRP. Por lo tanto, es probable que el compuesto 2 corresponda a uno de los metabolitos de la ruta biosintética de NinA. Considerando que en *P. roqueforti* no se ha descrito ningún compuesto híbrido PK-NRP, estos resultados sugieren que el compuesto 2 es un metabolito no identificado previamente en esta especie.

Finalmente, la ausencia de ácido micofenólico y andrastina A en las cepas con el gen *ninA* atenuado, sugiere un efecto de "cross talk" entre la ruta biosintética de NinA y las de los metabolitos mencionados. Los mecanismos involucrados en este fenómeno se desconocen y sería interesante evaluar las variables que están implicadas en esta regulación.

## 8 REFERENCIAS

- Amaiike S., Affeldt K., & Keller N. (2013) "Genetics, Biosynthesis, and Regulation of Aflatoxins and other *Aspergillus flavus* Secondary Metabolites". Agricultural Applications, 2° edición The Mycota XI Cap. 3.
- Ali H., Ries M., Nijland J., Lankhorst P., Hankemeier T., Bovenberg R., Vreeken R. & Driessen A. (2013) "A branched biosynthetic pathway is Involved in production of roquefortine and related compounds in *Penicillium chrysogenum*". Public Library of Science one 8(6), 1-12.
- Atoui A., Dao H., Mathieu F. & Lebrihi A. (2006) "Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A". Molecular Nutrient Food Research 50, 488 – 493.
- Awakawa T., Yang X., Wakimoto T. & Abe I. (2013) "Pyranonigrin E: A PKS-NRPS Hybrid Metabolite from *Aspergillus niger* Identified by Genome Mining" ChemBioChem 14, 2095 – 2099.
- Brackhage A. (2013) "Regulation of fungal secondary metabolism" Nature Reviews Microbiology 11,21-32.
- Bentley R. (2000) "Mycophenolic Acid: A One Hundred Year Odyssey from Antibiotic to Immunosuppressant" Chemical Reviews 100, 3801–3825.
- Bergmann S., Funk A., Scherlach K., Schroeckh V., Shelest E., Horn U. & Brakhage A. (2010) "Activation of a silent fungal polyketide biosynthesis pathway through regulatory cross talk with a cryptic nonribosomal peptide synthetase gene cluster". Applied and environmental microbiology 76(24), 8143-8149.
- Bingle L., Simpson T. & Lazarus C. (1999) "Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase gene". Fungal Genetics and Biology 26,209-223.
- Boettger D. & Hertweck C. (2013) "Molecular diversity sculpted by fungal PKS-NRPS hybrids". ChemBioChem 14,28-42.
- Brown D. & Proctor R. (2013) "Diversity of polyketide synthase in *Fusarium*" Genomics, Molecular and Celular Biology. Caister Academic Press. Cap. 8, pag 143-151.
- Bushley K. & Turgeon B. (2010) "Phylogenomics reveals subfamilies of fungal

nonribosomal peptide synthetases and their evolutionary relationships" BMC evolutionary biology 1,10-26.

Bushley K., Raja R., Jaiswal P., Cumbie J., Nonogaki M., Boyd A., Owensby A., Knaus B., Elser J., Miller D., Di Y., McPhail K. & Spatafora J. (2013) "The Genome of *Tolypocladium inflatum*: Evolution, Organization, and Expression of the Cyclosporin Biosynthetic Gene Cluster". PLoS Genetics 9(6): e1003496. doi:10.1371/journal.pgen.1003496.

Campbell M., Rokas A. & Slot J. (2012) "Horizontal Transfer and Death of a Fungal Secondary Metabolic Gene Cluster". Genome Biological Evolution 4(3), 289–293.

Chang P., Yu J. & Yu J. (2004) "afIT, a MFS transporter-encoding gene located in the aflatoxin gene cluster, does not have a significant role in aflatoxin secretion". Fungal Genetics and Biology 41,911–920.

Chang P., Horn B. & Dorner J. (2009) "Clustered genes involved in cyclopiazonic acid production are next to the aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus flavus*". Fungal Genetics and Biology 46, 176–182.

Chávez R., Roa A., Navarrete K., Trebotich J., Espinosa Y., Vaca I. (2010). Evaluation of properties of several cheese-ripening fungi for potential biotechnological applications. Mycoscience 51,84–87.

Cox R (2007). "Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nanomachines begin to reveal their secrets". Organic Biomolecular Chemistry 5, 2010–2026.

Cramer R., Stajich J., Yamanaka Y., Dietrich F., Steinbach W. & Perfect J. (2006) "Phylogenomic analysis of non-ribosomal peptide synthetases in the genus *Aspergillus*". Gene 383, 24–32.

Fernández-Bodega M., Mauriz E., Gómez A., Martín J. (2009) "Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes–Tresviso local varieties of blue-veined cheeses". International Journal of Food Microbiology 136, 18–25.

Frisvad J. & Samson R. (2004). "Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins". Studies in Mycology 49, 1-74.

Gacek A. & Strauss J. (2012). "The chromatin code of fungal secondary metabolite gene clusters". Applied Microbiology Biotechnology 95,1389–1404.



Gallo A., Bruno K., Solfrizzo M., Perrone G., Mule G., Visconti A. & Baker S. (2012) "New insight into the Ochratoxina A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*". Applied and environmental microbiology, 78, 8208-8218.

García-Rico R., Chávez R., Fierro F., & Martín J. (2009) "Effect of a heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunit on conidia germination, stress response, and roquefortine C production in *Penicillium roqueforti*". International Microbiology 12, 123-129.

Gil-Durán C., Rojas-Aedo JF., Medina E., Vaca I., García-Rico R., Villagrán S., Levicán G. & 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. 26;10(3):e0120740. doi: 10.1371/journal.pone.0120740.

Gogou A., Apostolaki M. & Stephanou E. (1998) "Determination of organic molecular markers in marine aerosols and sediments: one-step flash chromatography compound class fractionation and capillary gas chromatographic analysis." Journal of Chromatography A 799, 1, 215-231.

Gressler M., Zaehle C., Scherlach K., Hertweck C. & Brock M. (2011) "Multifactorial Induction of an Orphan PKS-NRPS Gene Cluster in *Aspergillus terreus*". Chemistry & Biology 18, 198–209.

Hidalgo P., (2013). "Caracterización bioquímica y molecular de la biosíntesis del antitumoral andrastina y de la toxina PR en *Penicillium roqueforti*". (Tesis de doctorado). Universidad de León. León.

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 pathways". Fungal Genetics and Biology 62, 11–24.

Hoffmeister D. & Keller N. (2007) "Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes and their regulation". Natural Product Report 24, 393–416.

Kaur J. & Collins C. (2015) "Regulatory genes in fungal secondary metabolism" Fungal Biomolecules Sources, Applications and Recent Developments. 1ª Edición, Cap. 17, pag 225-226.

Khaldi N., Collemare J., Lebrun M., & Wolfe, K. (2008) "Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi" *Genome Biology* 9(1), 18.

Kakule T., Sardar D., Lin Z. & Schmidt E. (2013) "Two Related Pyrrolidinedione Synthetase Loci in *Fusarium heterosporum* ATCC 74349 Produce Divergent Metabolites" *ACS Chemical Biology* 8, 1549–1557

Keller N., Turner G. & Bennett J. (2005) "Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics". *Nature reviews. Microbiology* 3(12), 937-947.

Kim S. (2013) "Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications" *Capitulo* 13, pag 223-230.

Kinsella J. & Hwang DH. (1976) "Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor". *CRC Critical Reviews Food Science Nutrition*. 8(2),191-228.

Konz D. & Mahariel M. (1999) "How do peptide synthetases generate structural diversity?" *Chemistry & Biology*, 6.

Martínez-Rodríguez Y., Acosta-Muñiz C., Olivas G., Guerrero-Beltrán J., Rodrigo-Aliaga D., Mujica-Paz H., Welti-Chanes J. & Sepulveda D. (2014) "Effect of high hydrostatic pressure on mycelial development, spore viability and enzyme activity of *Penicillium roqueforti*". *International journal of food microbiology* 168, 42-46.

Matsuda Y., Awakawa T. & Abe I. (2013) "Reconstituted biosynthesis of fungal meroterpenoid andrastin A" *Tetrahedron* 69, 8199-8204.

Medema M., Marnix H., Blin K., Cimermancic P., de Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M., Weber T., Takano E. & Breitling R. (2011) "antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences" *Nucleic acids research* 39, W339-W346.

Nielsen M., Frisvad J., & Nielsen, P. (1998) "Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese". *International journal of food microbiology*, 42(1), 91-99.

Li L., Wright S., Krystofova S., Park G. & Borkovich K. (2007) "Heterotrimeric G Protein Signaling in Filamentous Fungi" *Annual Reviews Microbiology* 61,423–52.

- O'Brien M., Nielsen K, O'Kiely P., Forristal P., Fuller H. & Frisvad J. (2006) "Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* and *Penicillium roqueforti* isolated from baled grass silage in Ireland". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9268-9276.
- Pirttila M., Joensuu P., Pospiech H., Jalonen J. & Hohtola A. (2004) "Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures" *Physiologia Plantarum* 121,305–312.
- Regueira B., Kildegaard R., Hansen G., Mortensen H., Hertweck C. & Nielsen J. (2011) "Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*" *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 3035-3043.
- Richard D., Schiavi B. & Joullié M. (2004) "Synthetic studies of roquefortine C: synthesis of isoroquefortine C and a heterocycle". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(33), 11971-11976.
- Ropars J., Dupont J., Fontanillas E., Rodríguez De La Vega R., Malagnac F., Coton M., Giraud T. & López-Villavicencio M. (2012) "Sex in cheese: evidence for sexuality in the fungus *Penicillium roqueforti*". *PLoS One* 7, 11,e49665.
- Schümann J. & Hertweck C. (2006) "Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes". *Journal of Biotechnology* 124, 690–703.
- Schümann J. & Hertweck C. (2007) "Molecular Basis of Cytochalasan Biosynthesis in Fungi: Gene Cluster Analysis and Evidence for the Involvement of a PKS-NRPS Hybrid Synthase by RNA Silencing" *Journal of American Chemical Society* 129, 9564-9565.
- Stergiopoulos I., Zwiers L. & De Waard M. (2002) "Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily". *European Journal of Plant Pathology* 108, 719–734.
- Strieker M., Tanovic A., & Marahiel M. (2010) "Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics". *Current Opinion in Structural Biology* 20,234–240.
- Studt L., Hump H. & Tudzynski V. (2013) "Signaling governed by G proteins and cAMP is crucial for growth, secondary metabolism and sexual development in *Fusarium fujikuroi*" *PLoS One* 8: e58185.doi:10.1371/journal.pone.0058185.

- Teichert I & Nowrousian M (2011) "Evolution of genes for secondary metabolism in fungi. In: Pöggeler S, Wöstemeyer J (eds) Evolution of fungi and fungal-like organisms", The Mycota XIV, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pag 231-257.
- Ullán R., Godio R., Teijeira F., Vaca I., García-Estrada C., Feltrer R., Kosalkova K. & Martín J. (2008) "RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using  $\beta$ -lactam genes expression" *Journal of microbiological methods* 75, 209-218.
- Varga J., Rigó K., Kocsubé S., Farkas B., & Pál K. (2003) "Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus* species". *Research in Microbiology* 154,593–600.
- Wang Y., Geng Z., Jiang D., Long F., Zhao Y., Su H., Zhang K. & Yang J. (2013) "Characterizations and functions of regulator of G protein signalling (RGS) in fungi". *Applied Microbiological Biotechnology* 97, 7977-7987.
- Wiemann O., Willmann A., Straeten M., Kleigrew K., Beyer M., Humpf H. & Tudzynski B. (2009) "Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation" *Molecular Microbiology* 72(4), 931–946.
- Yu J., Chang P., Ehrlich K., Cary J., Bhatnagar D., Cleveland T., Payne G., Linz J., Woloshuk C., & Bennett J. (2004) "Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis". *Applied and Environmental Microbiology*, 1253–1262.
- Yu L. (2006) "Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*". *The Journal of Microbiology* p.145-154.
- Yu H. Seo J., Kim J., Han K., Shim W., Yun S. & Lee Y (2008) "Functional analysis of heterotrimeric G protein G $\alpha$  and G $\beta$  subunits in *Gibberella zeae*" *Microbiology* 154, 392-401.